

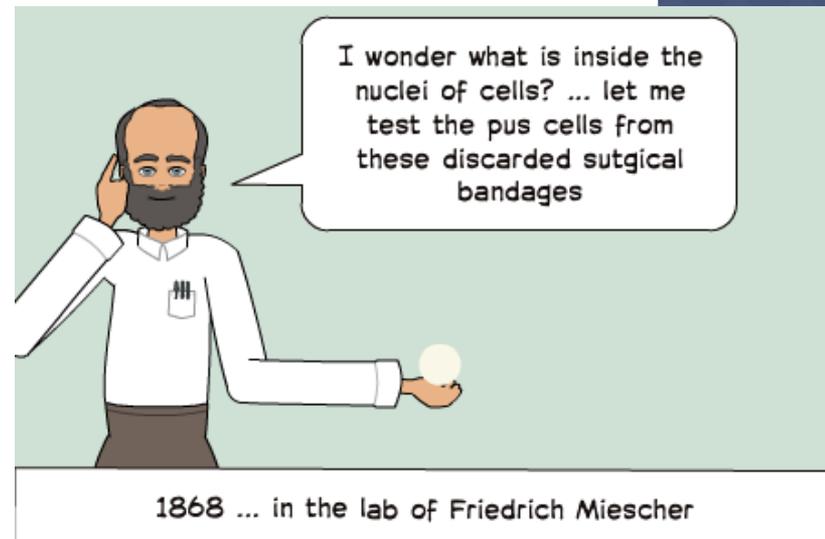
BIOLOGIE GÉNÉRALE

L'ADN SUPPORT DE
L'INFORMATION
GÉNÉTIQUE

HISTOIRE

- 1869; Friedrich Miescher a isolé la nucléine du noyau des leucocytes (globules blancs).

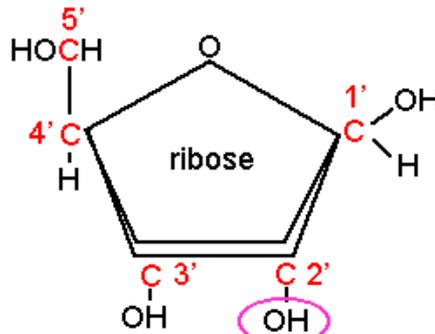
Il a établi qu'elle était fait d'acide (acide nucléique) et d'une partie alcaline (qui s'est révélée plus tard d'être les protéines).



HISTOIRE

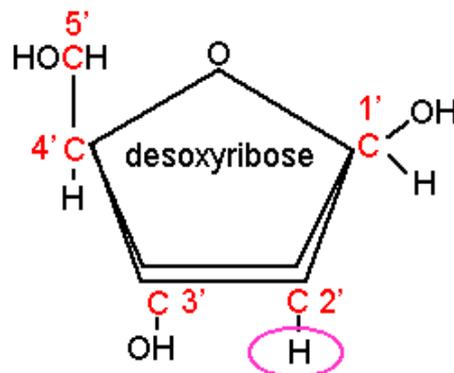
- 1900; Phoebus Levene étudie les acides nucléiques. Il a isolé deux types distinguables par les différents sucres présents dans leur composition.

l'acide ribonucléique (ARN) - ribose



carbone lié à un hydroxyle

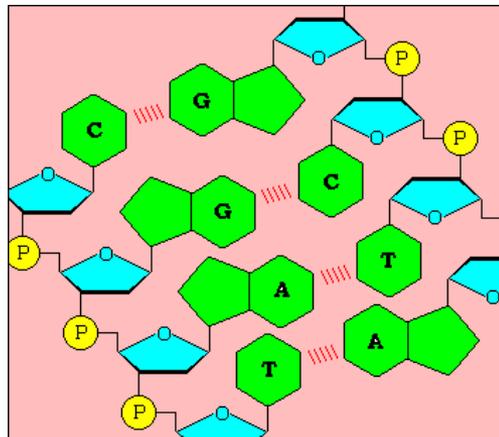
l'acide désoxyribonucléique (ADN) - désoxyribose



carbone lié à un seul atome d'hydrogène

HISTOIRE

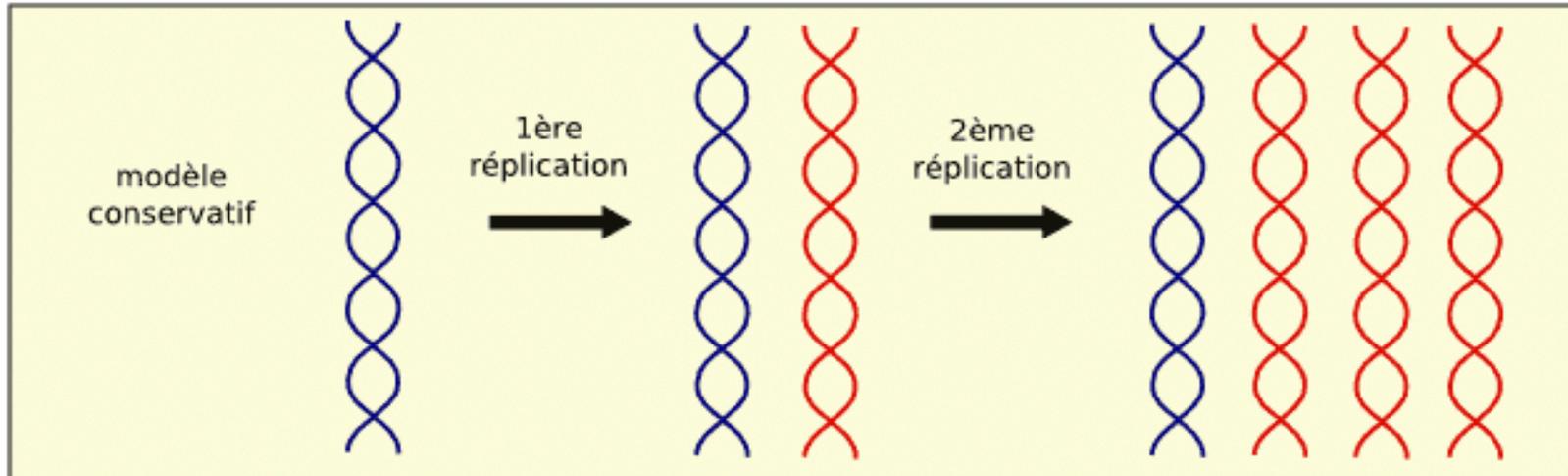
- ⦿ 1940; Erwin Chargaff a découvert que dans l'ADN, la quantité d'Adénine est toujours égale à la quantité de Thymine et que la quantité de Cytosine toujours égale la quantité de Guanine.
- ⦿ (Ce rapport constant est connu sous le nom de **règle de Chargaff**).



MODÈLE CONSERVATIF

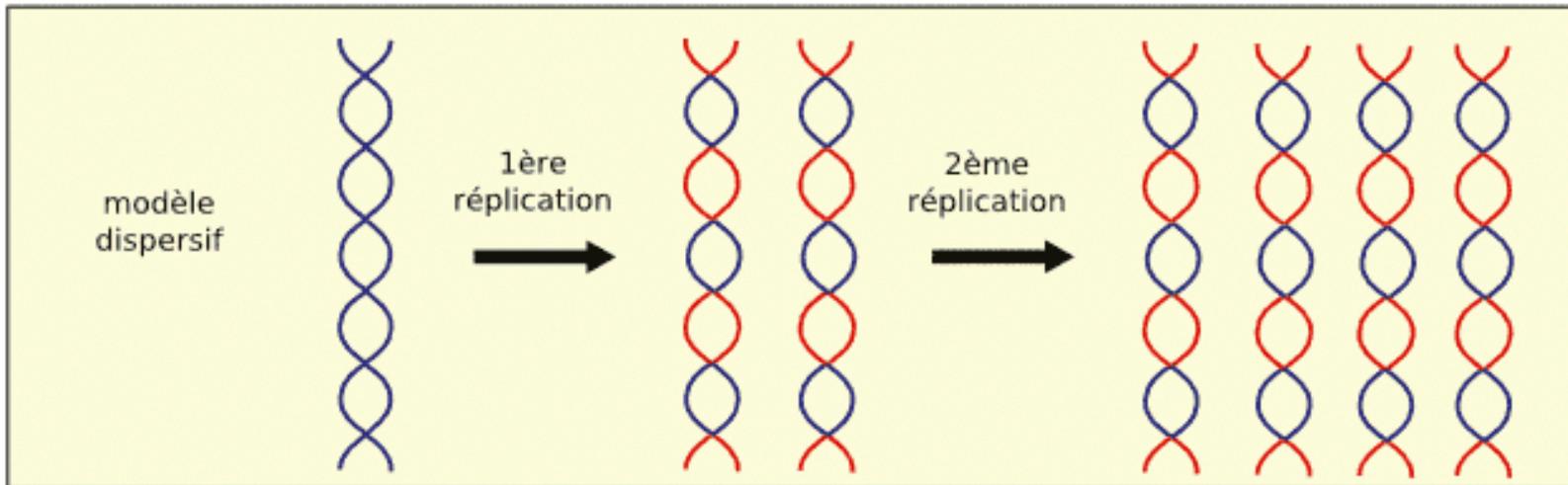
Pour la réplication de l'ADN, trois modèles ont été proposés :

La **réplication conservative**: à partir d'une molécule d'ADN bicaténaire "mère", on forme une nouvelle molécule d'ADN bicaténaire totalement néo-formée.



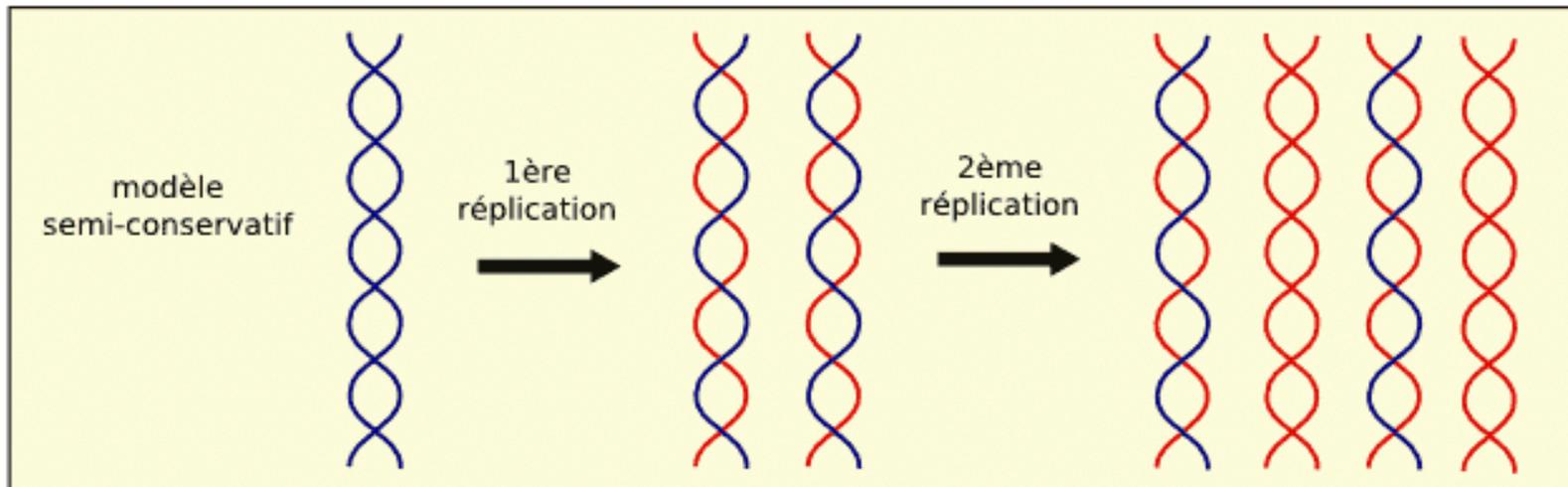
MODÈLE DISPERSIF

La réplication dispersive: à partir d'une molécule d'ADN bicaténaire "mère", les nouveaux brins sont constitués à la fois d'ADN de la molécule mère et d'ADN néo-formé.



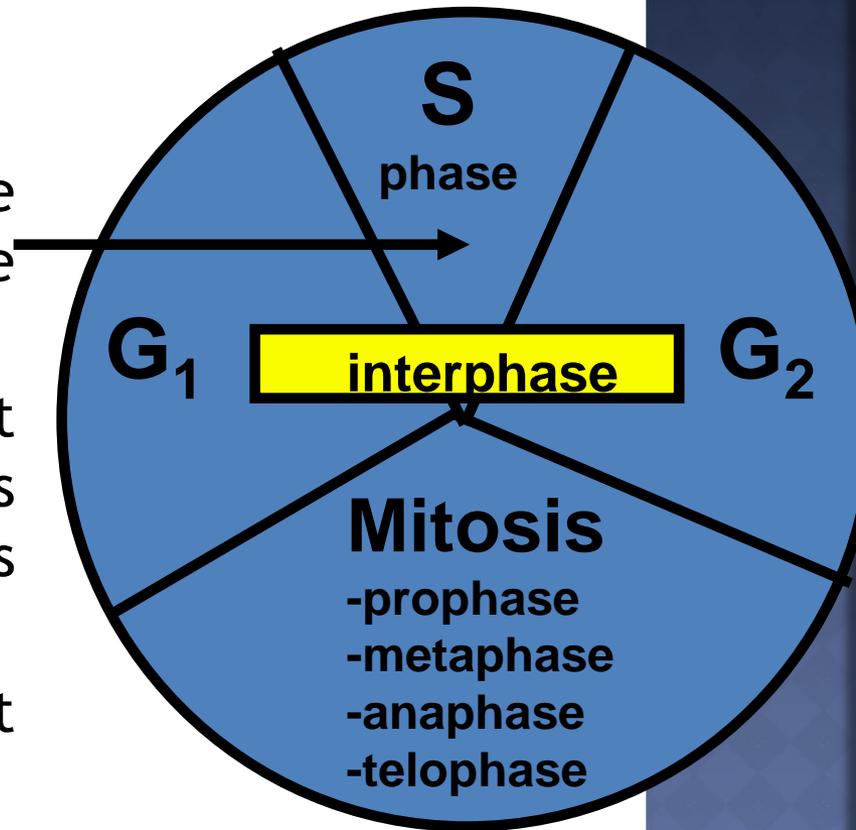
MODÈLE SEMI-CONSERVATIF

La réplication semi-conservative: Chacun des deux brins de la molécule d'ADN bicaténaire "mère" sert de matrice pour la formation d'un nouveau brin complémentaire.



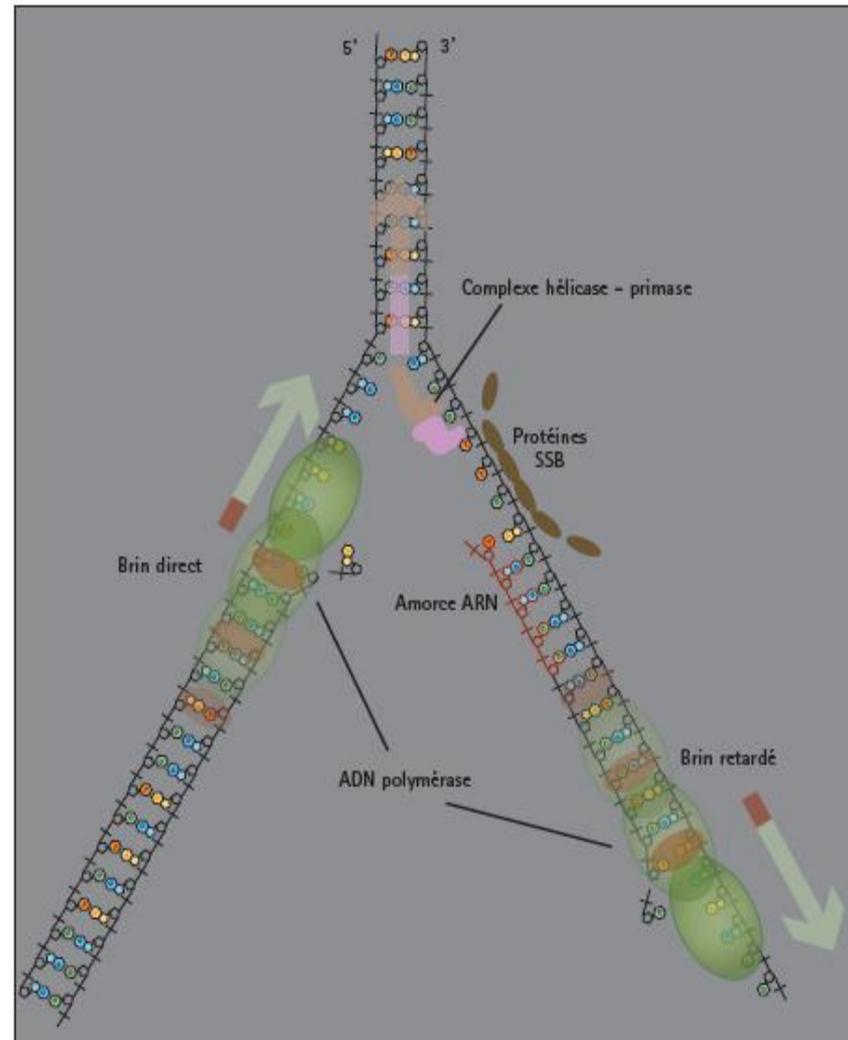
PHASE S

- La réplication d'ADN
- assure que chaque cellule fille aura un ensemble complet de molécules d'ADN.
- d'ADN séparent en deux brins, et ensuite produisent deux brins complémentaires en suivant les règles de bases complémentaires.
- chaque brin de double hélice sert de modèle pour le nouveau brin.

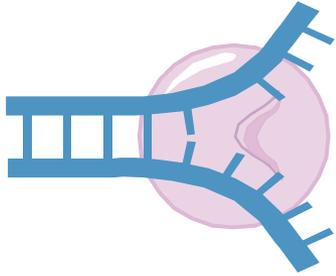


LES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA REPLICATION DE L'ADN

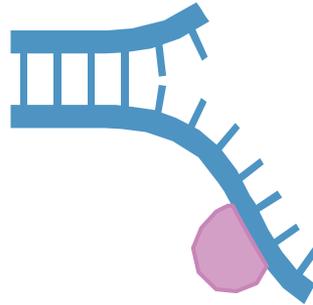
Les enzymes qui assurent ces modifications de l'état d'enroulement de l'ADN sont **les topoisomérases**.



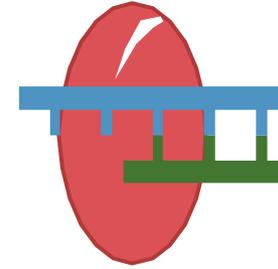
LES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPLICATION DE L'ADN



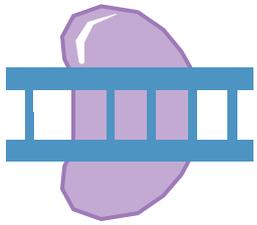
Hélicase coupent et déroulent de courtes segments d'ADN



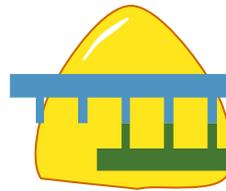
SSB stabilise l'ADN



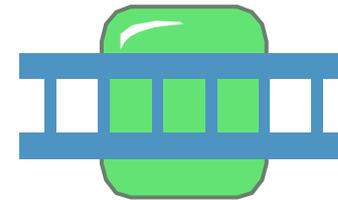
ARN Primase synthétise une pièce d'ARN pour commencer le procès d'élongation



ADN Polymérase III
Lien des nucléotides pour former nouvel ADN



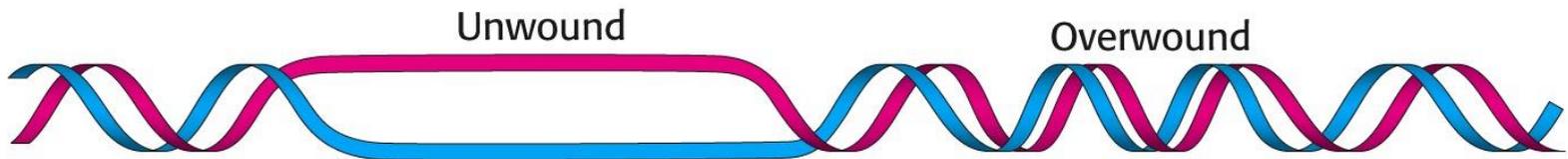
ADN Polymérase I
remplacé l'amorce d'ARN



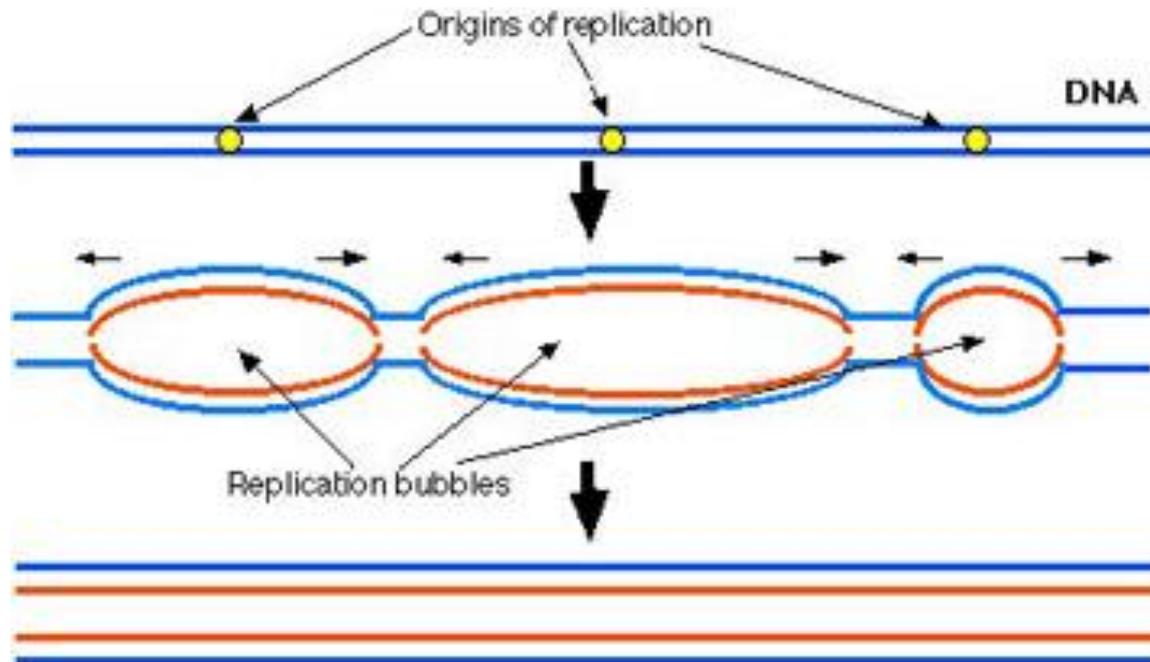
Ligase liens /coudre les fragments d'ADN (frag. Okazaki).

LE PROCESSUS DE RÉPLICATION

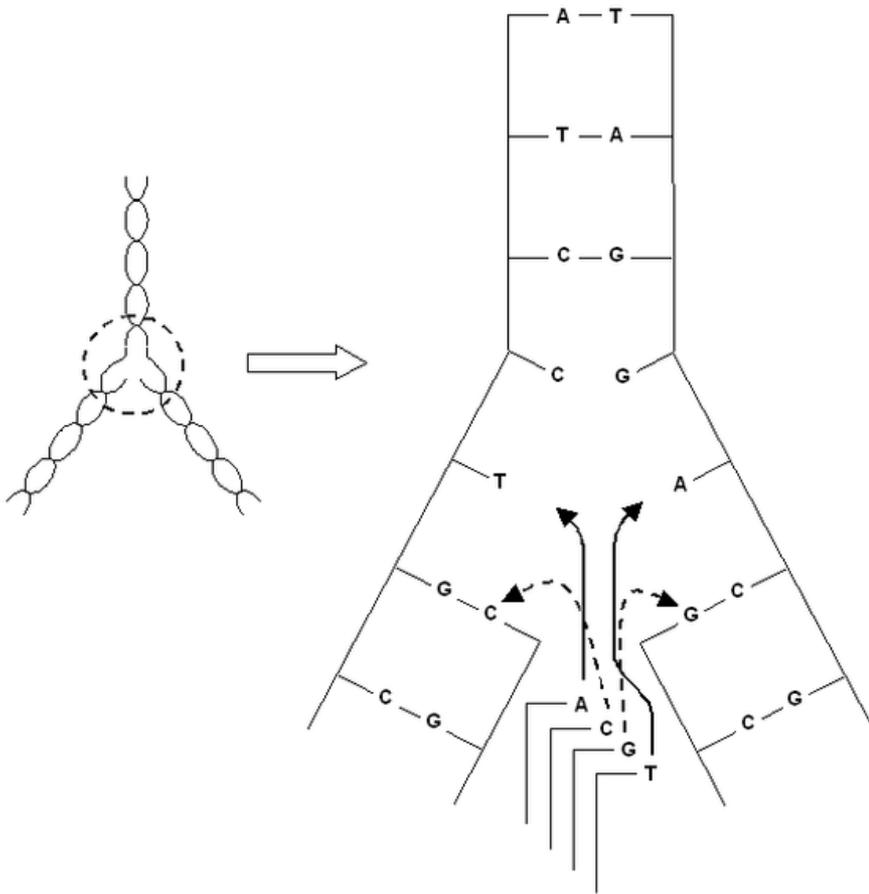
- ◎ **1. L'activation:** Une partie de la double hélice de l'ADN est déroulée pour exposer les bases azotées
 - L'enzyme **hélicase** coupe et déroulent de courts segments d'ADN avant la fourche de réplication (ils coupent les liaisons hydrogène entre les bases).



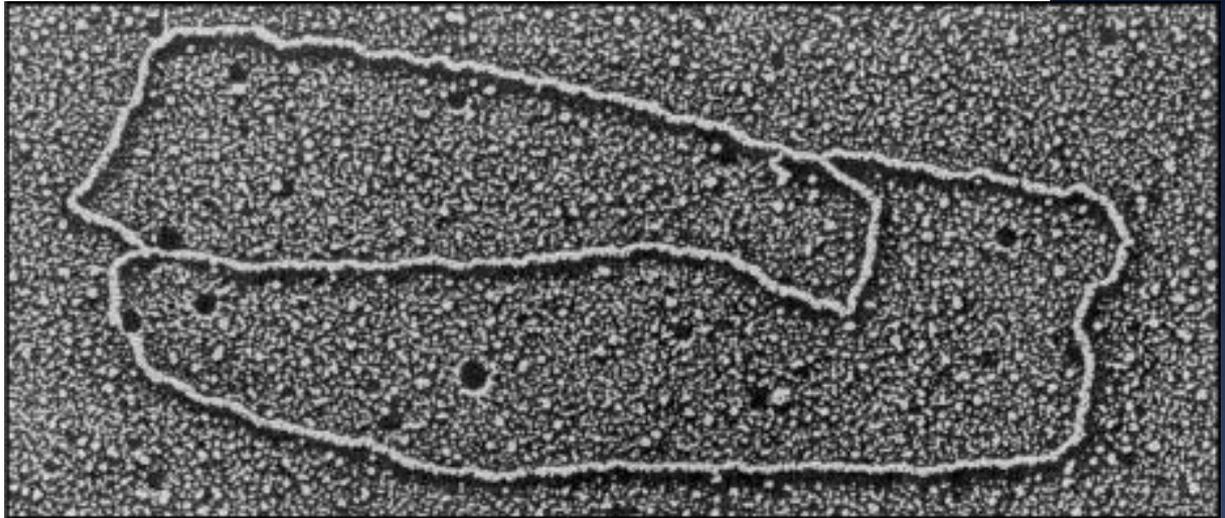
- Des bulles de réplication se forment à différents endroits tout au long de la molécule d'ADN, ce qui accélère le processus de réplication.
- Chaque moitié de bulle de réplication est nommée une *fourche de réplication* (Y).



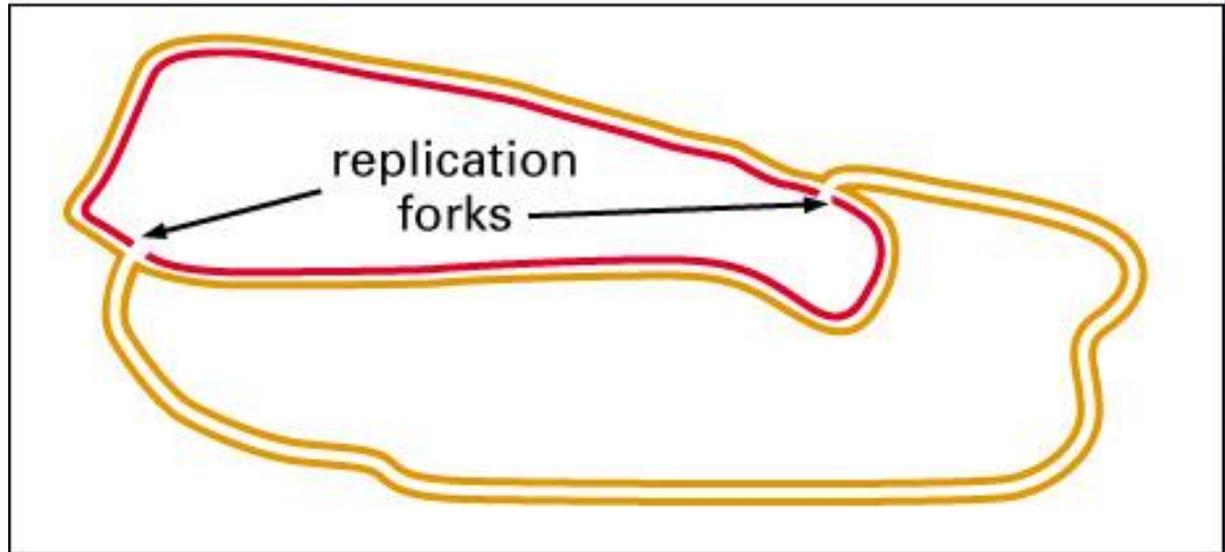
FOURCHE DE RÉPLICATION



- La fourche permet l'ajout de nucléotides.



Fourche de réplication

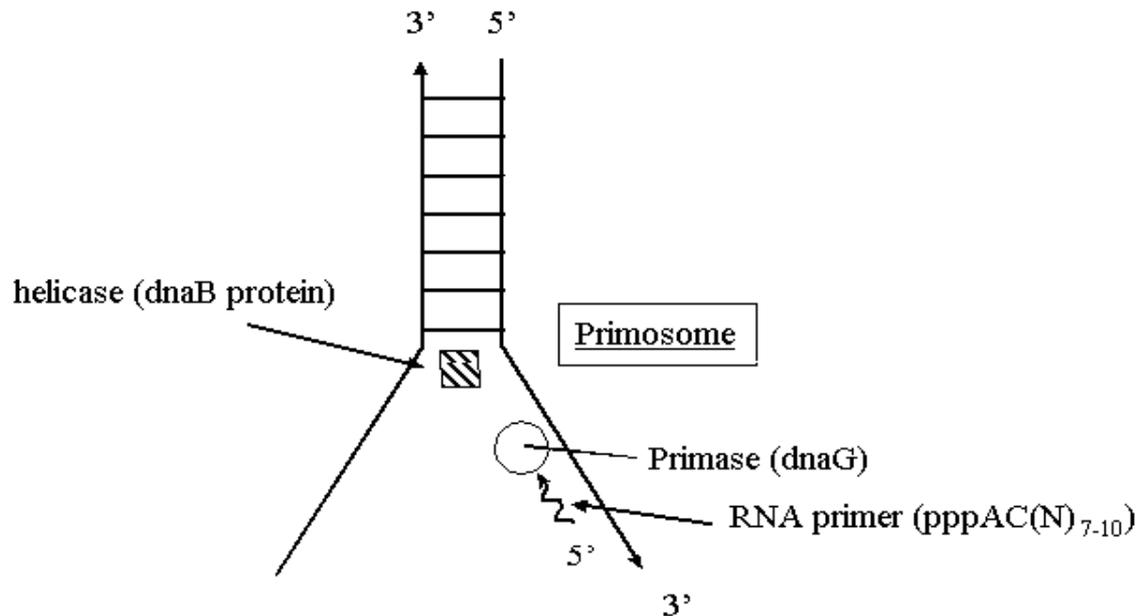


1 μm

Figure 5-6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

RÉPLICATION D'ADN

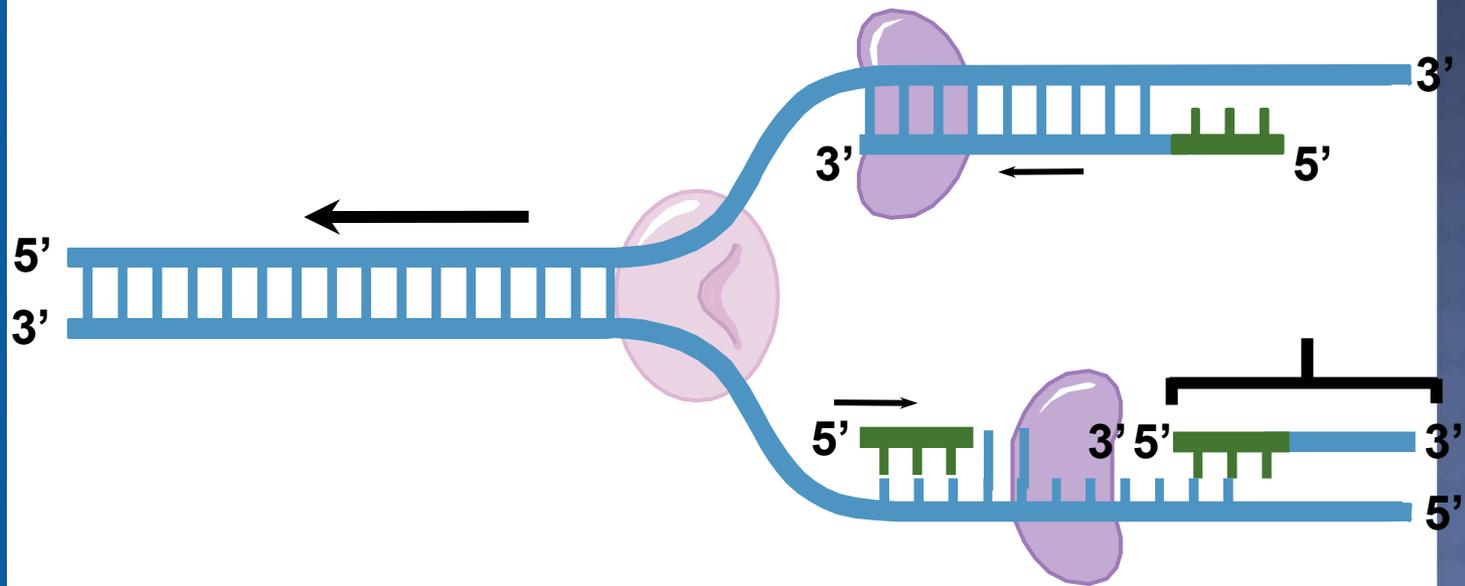
- 2. **Élongation:** deux nouveaux brins d'ADN sont assemblés en utilisant l'ADN parental comme matrice.
- L'enzyme **ARN Primase:** Synthétise une pièce d'ARN pour commencer le proces d'élongation



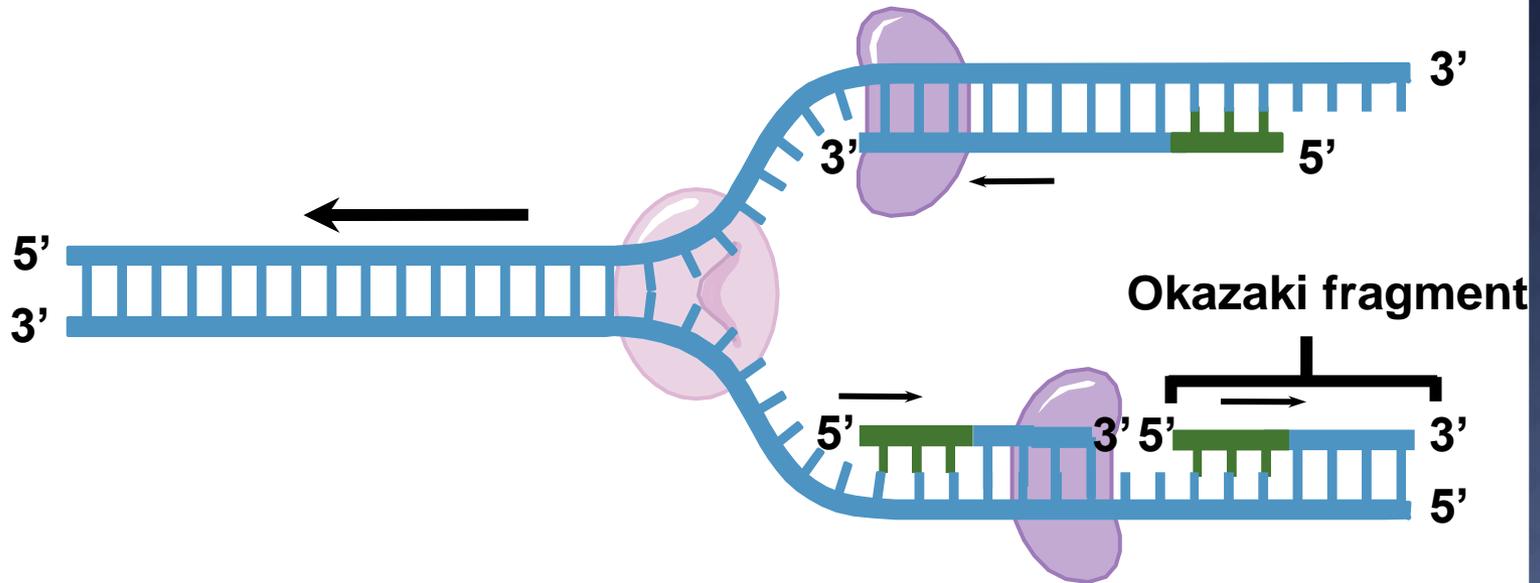
RÉPLICATION D'ADN

2. Élongation:

- L'Enzyme **ADN Polymérase**: Commencent à ajouter un nucléotide à la fois pour créer un nouveau brin complémentaire (dans la sens 5' à 3')



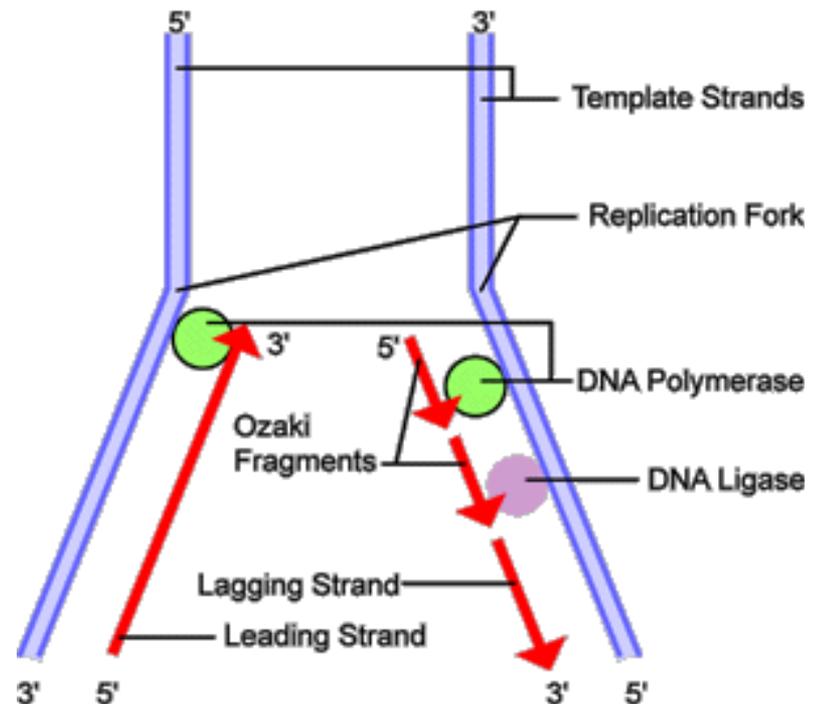
BRIN PRINCIPALE



- Répliqué sans interruption dans la direction (5' à 3')
- Il suit la direction de la fourche de réplication
- Plus vite que le brin trainant

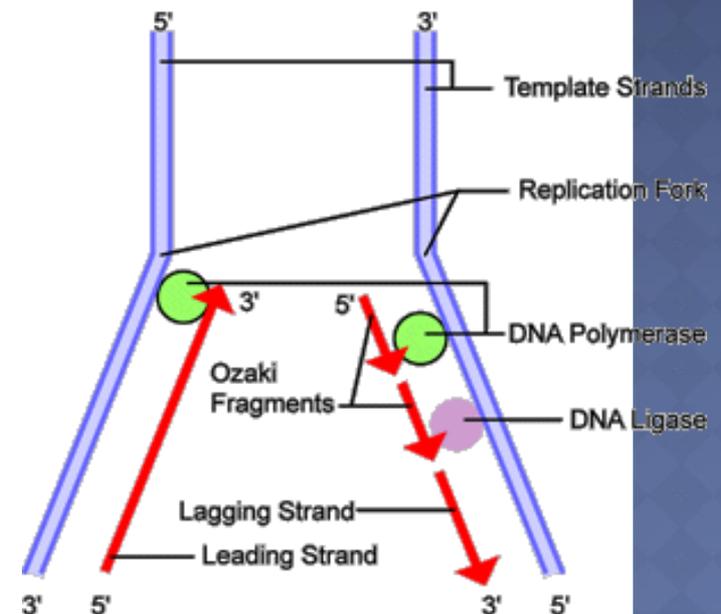
BRIN PRINCIPALE

- Répliqué sans interruption dans la direction (5' à 3')
- Il suit la direction de la fourche de réplication
- Plus vite que le brin trainant



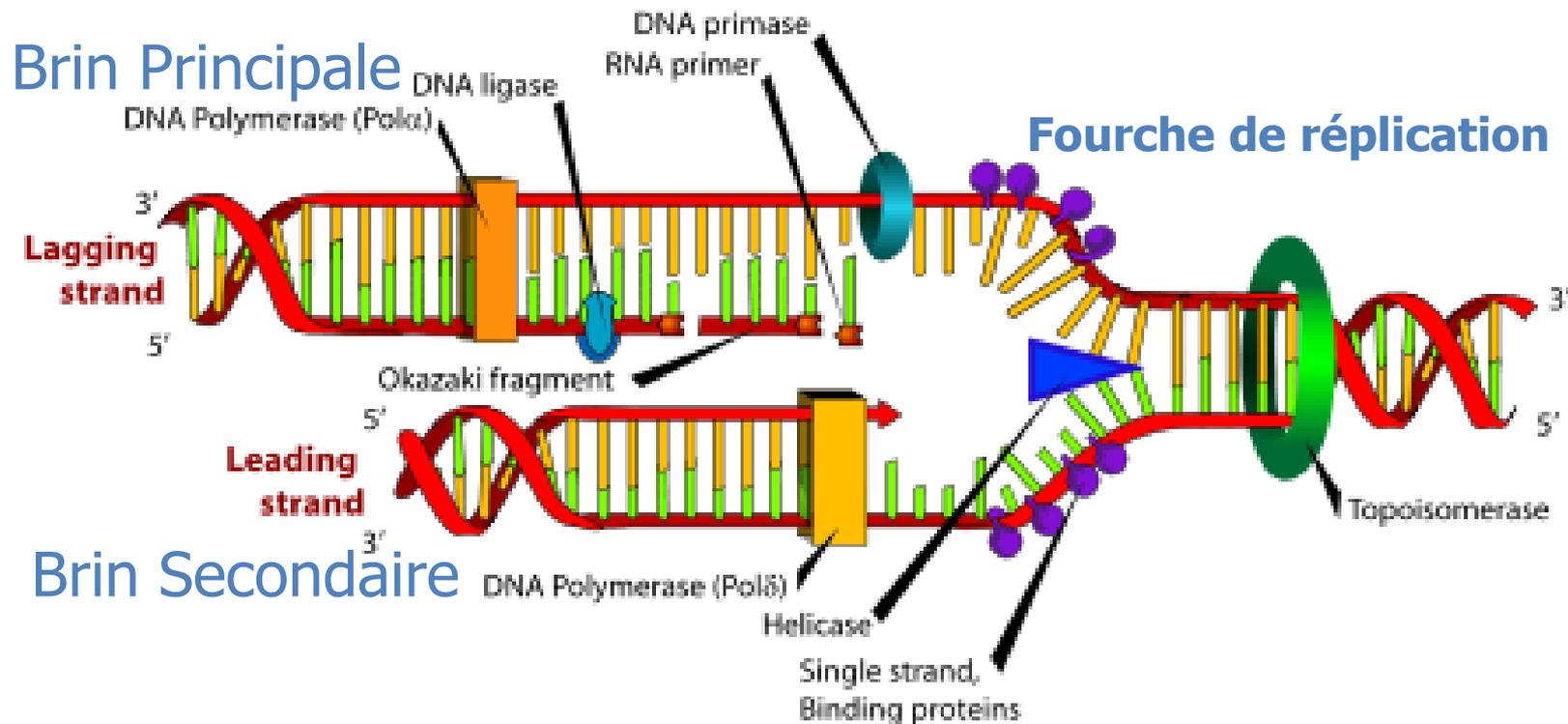
BRIN SECONDAIRE

- Répliqué dans la **direction opposée du déroulement de l'hélice (3' à 5')** Il ne suit pas la direction de la fourche de réplication
- Le brin trainant est le nouveau brin qui grandit de façon ***discontinue***, tout en s'éloignant de la fourche de réplication
- Fabrique les fragments qui s'appellent les **Fragments d'Okazaki**



BRIN SECONDAIRE

- L'Enzyme **Ligase**: Colle les fragments d'Okazaki ensemble (catalyse la formation des liaisons phosphate entre les nucléotides)





RÉPLICATION D'ADN

- ③ **3. Achèvement:** le processus de réplication est terminé et les nouvelles molécules d'ADN, composées chacune d'un brin d'ADN parental et d'un brin d'ADN fils, se reforment en hélices.

Les amorces d'ARN qui initient la réplication sont dégradées. La lacune engendrée par cette action est comblée par l'action de l'ADN polymérase I. La soudure du brin d'ADN est effectuée par une enzyme appelée ligase qui génère des liaisons phosphodiester entre le 3'OH et les nucléosides triphosphates.

RÉPLICATION D'ADN

Correction immédiate des erreurs

Le taux **d'erreur** lors **de la polymérisation** est **d'environ 1/10 000**, cependant l'erreur observée sur **l'ADN néo-synthétisé est de 1/108**.

Cette différence est expliquée par la **reconnaissance des erreurs de l'ADN Polymérase et la réparation immédiate**.

Cette action de «**contrôle-correction**» dénommée **proofreading** est due à une activité 3'-exonucléase spécifique de ces polymérases. Le processus supposé est le suivant :

La polymérase en action entoure l'ADN, **si la base ajoutée n'est pas adéquate la structure spatiale de l'ADN est modifiée ce qui permet de laisser agir l'activité exonucléasique 3'**.

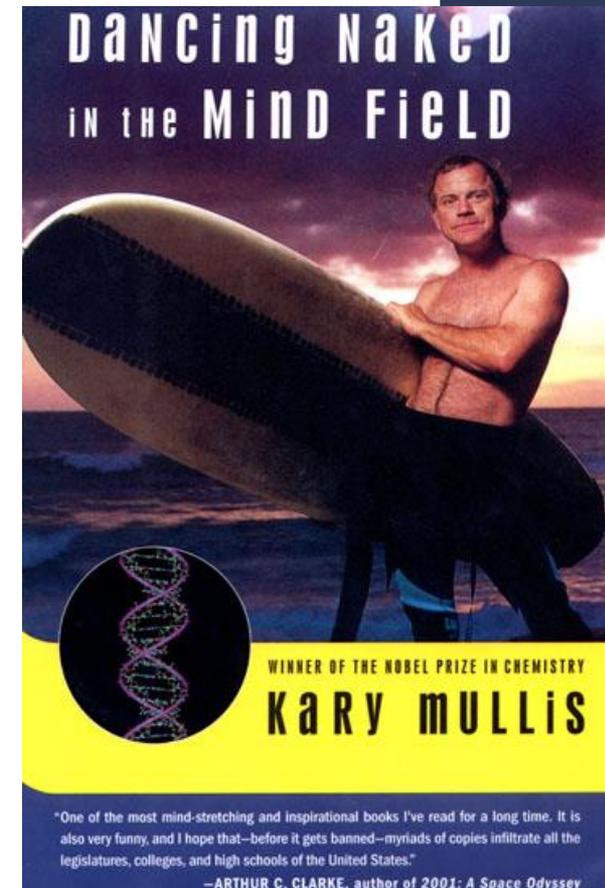
Ce mécanisme extrait la base incorrectement incorporée ce qui permet le redémarrage de la polymérase avec l'incorporation du bon nucléotide.

LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)



La **PCR (Polymerase Chain Reaction)** fut inventée par **Kary Mullis** en 1983 et brevetée en 1985.

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN.



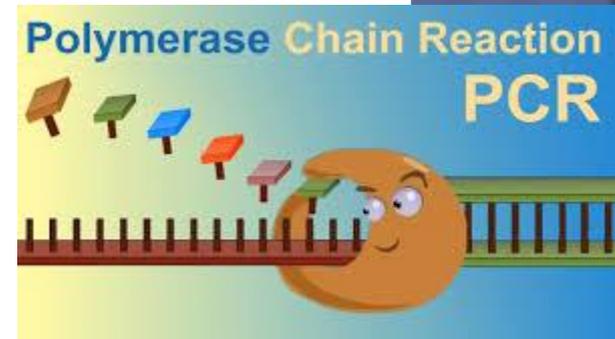
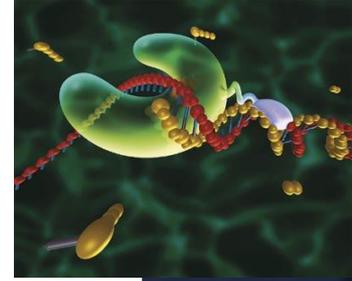
"One of the most mind-stretching and inspirational books I've read for a long time. It is also very funny, and I hope that—before it gets banned—myriads of copies infiltrate all the legislatures, colleges, and high schools of the United States."

—ARTHUR C. CLARKE, author of 2001: A Space Odyssey

LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

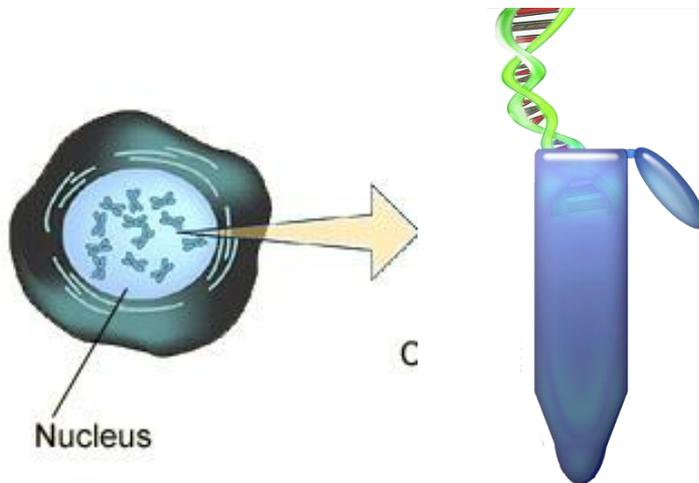
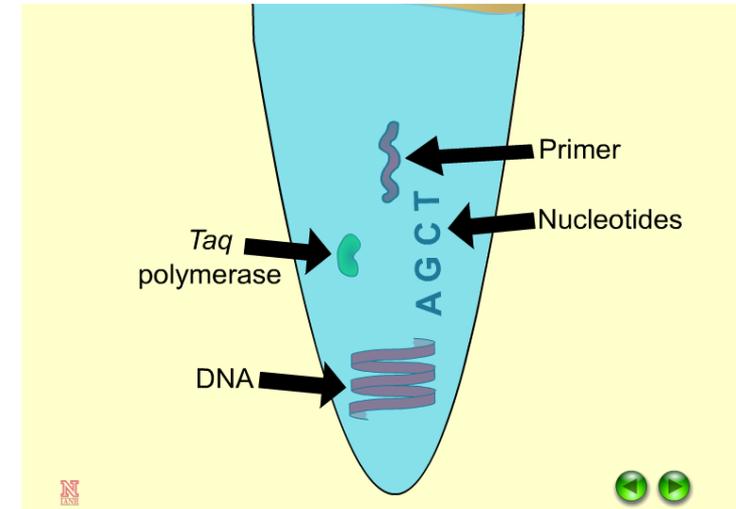
Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

Si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, **il est possible de sélectivement la répliquer en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités réduites d'extrait d'ADN.**



BUT ET PRINCIPE

La PCR permet donc d'obtenir par réplication in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait.



LE MÉLANGE RÉACTIONNEL ET LES CYCLES DE TEMPÉRATURE

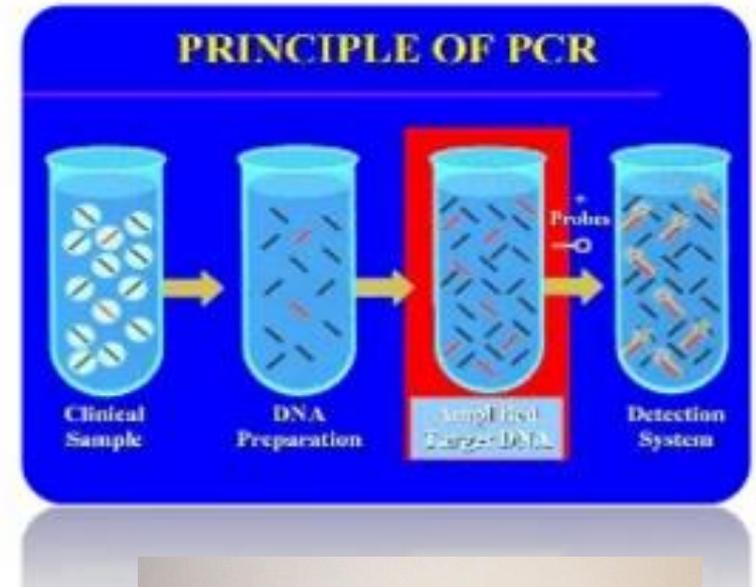
La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend:

- l'extrait d'ADN (ADN matriciel),
- la Taq polymérase,
- les amorces
- les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une
- solution tampon.

94° C for 30 sec *Hot Start*

94° C for 1 sec
53° C for 1 sec
72° C for 3 sec } 30 cycles

72° C for 10 sec *Final Extension*



Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à **des cycles de température** dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (**appareil dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C par effet Peltier**).

L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes.

94° C for 30 sec *Hot Start*

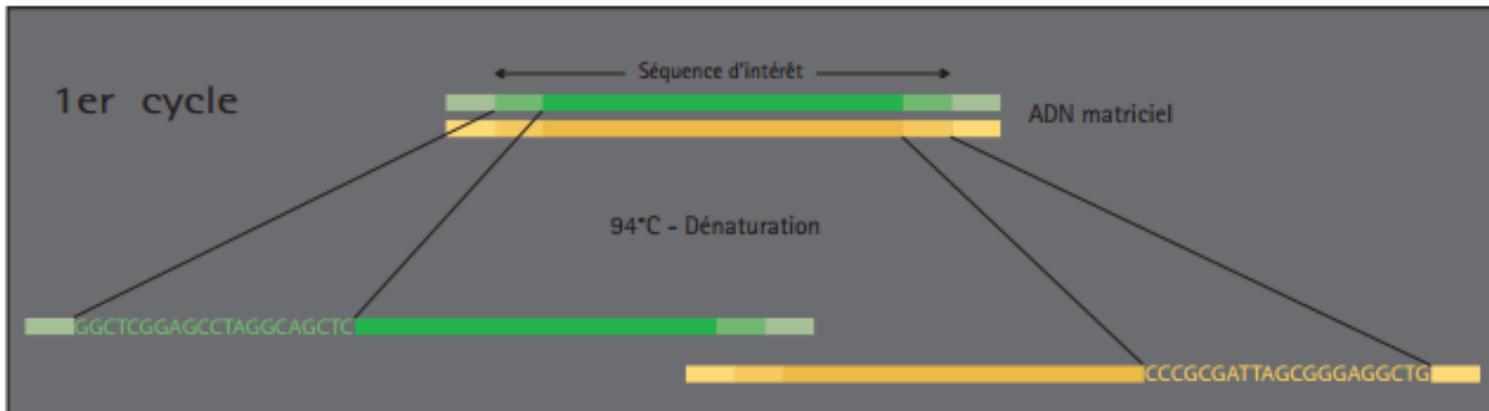
94° C for 1 sec }
53° C for 1 sec } 30 cycles
72° C for 3 sec }

72° C for 10 sec *Final Extension*



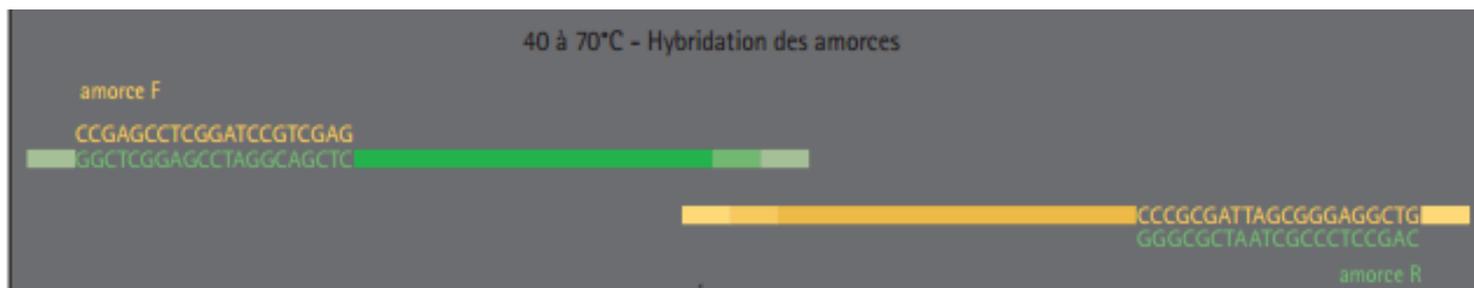
La dénaturation: 94°C

La première période s'effectue à une température de 94°C. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé: les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).



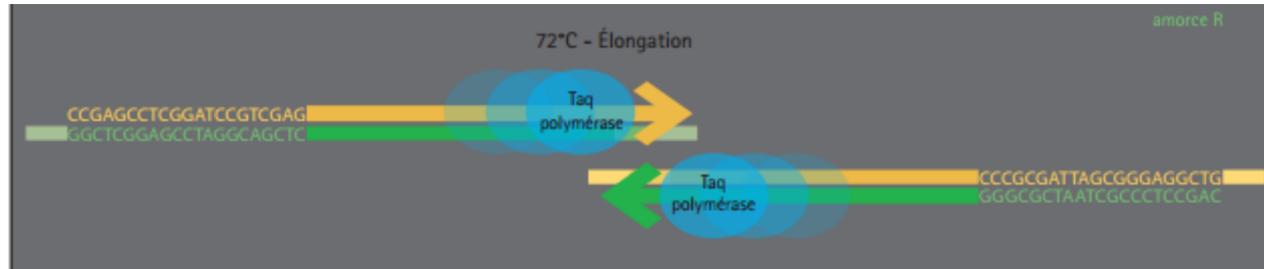
L'hybridation : 40 – 70°C

La deuxième période s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.



L'élongation : 72°C

La troisième période s'effectue à une température de 72°C. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaires amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.



Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. **Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN** (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle voit doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

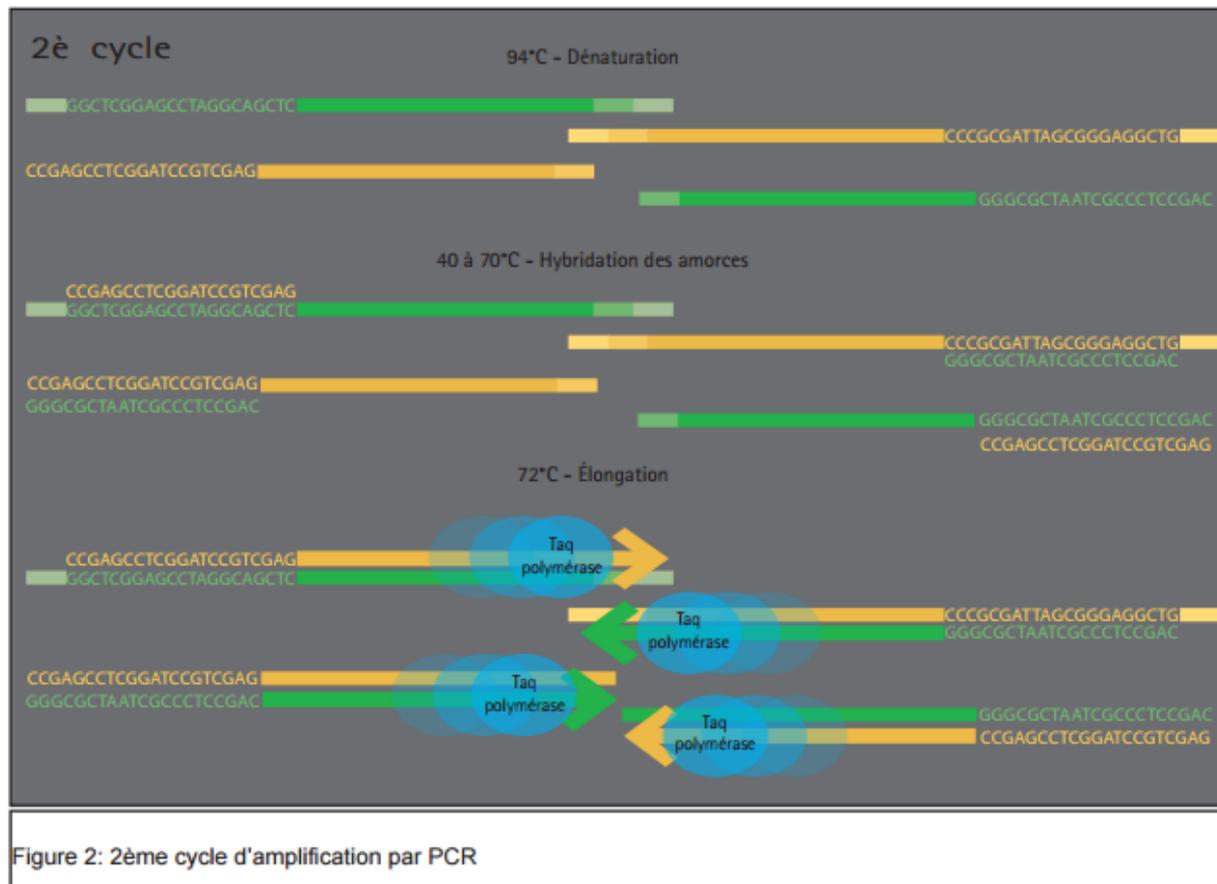
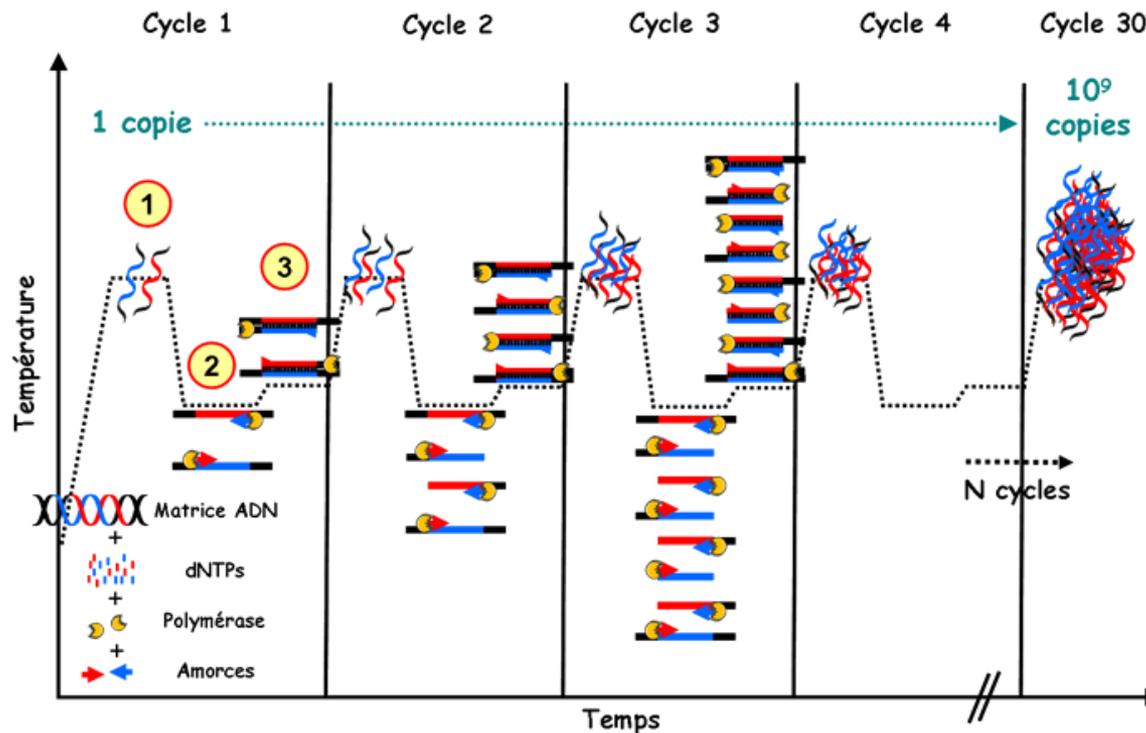


Figure 2: 2ème cycle d'amplification par PCR

Le choix de la durée des cycles de température et du nombre de cycles **dépend de la taille de la séquence d'intérêt** ainsi que de la taille et de la **complémentarité des amorces**. Il convient de réduire les durées au minimum non seulement pour un gain de temps mais aussi pour prévenir **le risque d'amplification non spécifique**. Pour la dénaturation et l'hybridation des amorces, 30 secondes suffisent généralement. Pour l'élongation, il faut compter 1 minute par kilobase d'ADN d'intérêt et 2 minutes par kilobase pour le cycle final d'élongation. Le nombre de cycles, généralement compris entre 20 et 40, est inversement proportionnel à l'abondance en ADN matriciel.



Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt).

La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par **électrophorèse sur gel d'agarose** (ou d'acrylamide).

L'ADN est révélé par une **coloration au bromure d'éthidium**. Ainsi, les produits sont-ils visibles instantanément par **transillumination aux ultraviolets** (280 – 320 nm).

Schéma de l'expérience

1 L'ADN est mélangé avec une enzyme de restriction. Les tubes sont alors incubés à 37°C pour permettre la coupure de l'ADN.



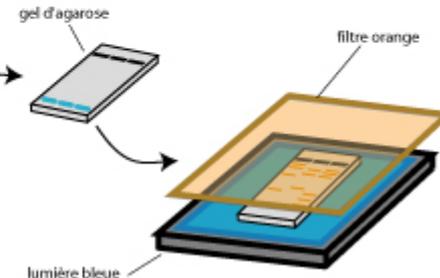
2 Les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose

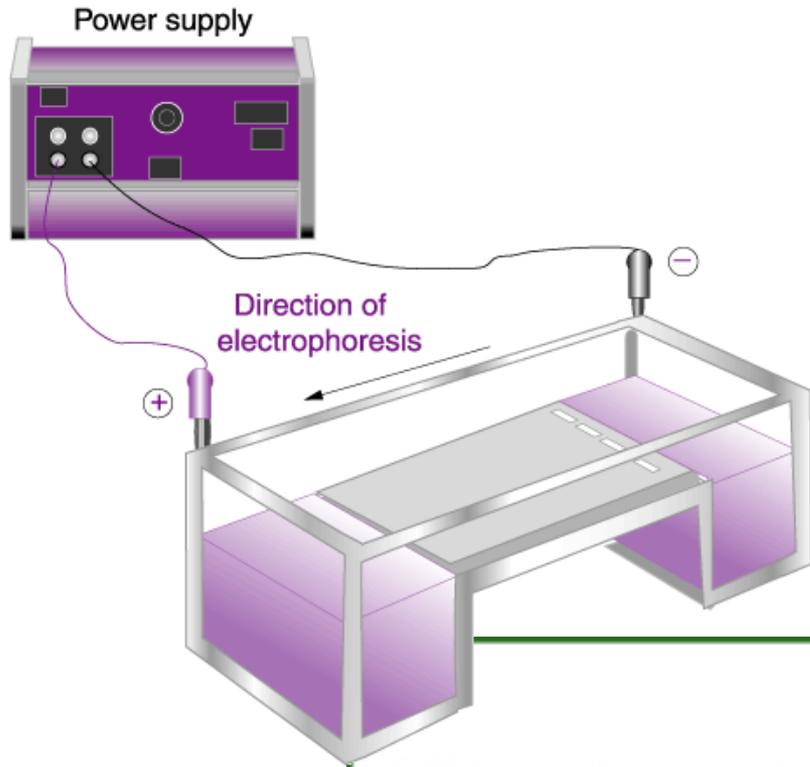


3 Un champ électrique permet de faire migrer et de séparer les fragments d'ADN.

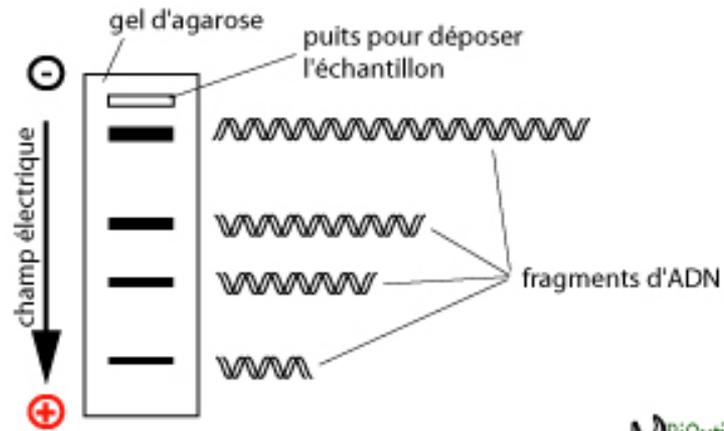


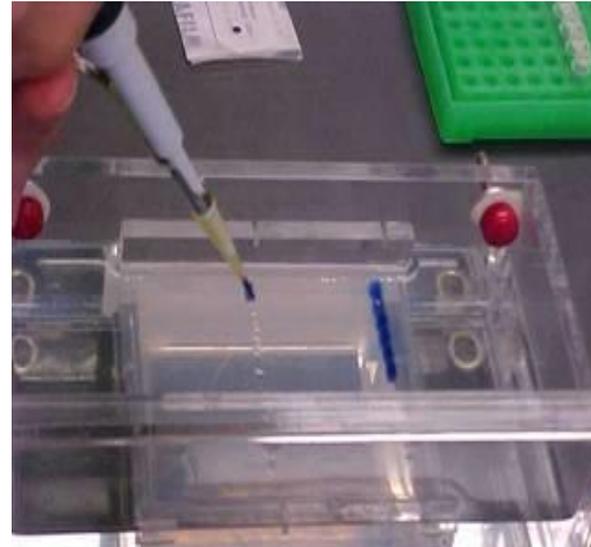
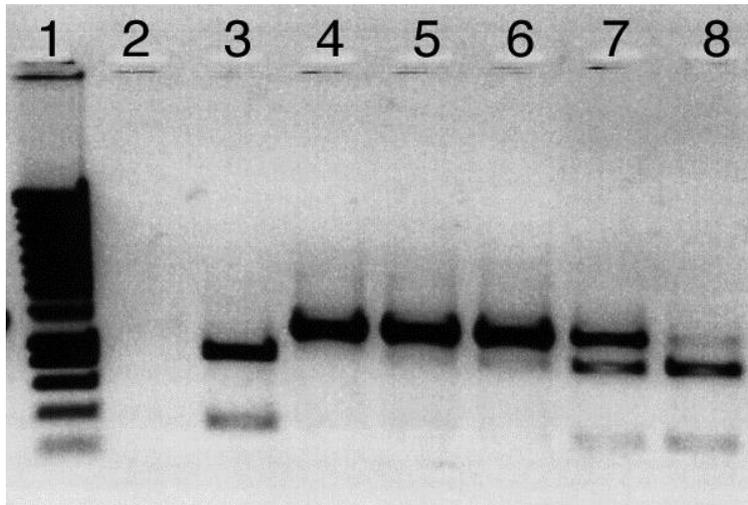
4 A la fin de la migration le gel d'agarose est déposé sur la lumière bleue. Un filtre orange permet de visualiser les fragments d'ADN. Le gel peut ainsi être photographié.





L'ADN est chargé négativement. Les fragments vont donc migrer vers le pôle + du champ électrique. Les petits fragments, moins freiné par la matrice du gel d'agarose, vont migrer plus rapidement.





- 1- marqueurs de taille d'ADN
- 2- témoin sans ADN (remplacé par de l'eau)
- 3- 100 pg d'ADN de la souche 57
- 4- 100 pg d'ADN de la souche FB29
- 5- ADN de l'échantillon à tester + 100 pg d'ADN de la souche FB29
- 6- ADN de l'échantillon à tester + 10 pg d'ADN de la souche FB29
- 7- ADN de l'échantillon à tester + 1 pg d'ADN de la souche FB29
- 8- ADN de l'échantillon à tester + 0,1 pg d'ADN de la souche FB29

LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

Les applications de la PCR sont multiples. C'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire.

Elle permet notamment en quelques heures le « clonage acellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage moléculaire.

La PCR est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique.

Elle est aussi employée pour **réaliser des empreintes génétiques,** qu'il **s'agisse de l'identification génétique d'une personne** dans le cadre d'une enquête judiciaire, ou de **l'identification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinée à des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale.**

La PCR est encore indispensable à la réalisation **d'un séquençage ou d'une mutagenèse dirigée.**

applications de la technologie PCR

| | |
|---|--|
| <p>Détection des mutations ponctuels : se fait par hybridation des produits PCR avec des sondes oligo-nucléotidiques (technique du "DOT-BLOT")</p> | <p>Maladies infectieuses : détection d'ADN ou d'ARN viral <i>Neisseria gonorrhoea</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>HIV-1</i></p> |
| <p>Introduction du produit PCR dans un vecteur: clonage du produit PCR</p> | <p>Etude de l'expression des gènes</p> |
| <p>séquençage direct du produit PCR</p> | <p>Contamination de l'eau</p> |
| | <p>DNA fingerprinting</p> |
| <p>Diagnostic de preimplantation : fertilisation in vitro</p> | <p>Cancérologie : lorsque sous traitement ; les cellules cancéreuses ne sont plus détectables par les outils usuels . La PCR détecte les mutation distinctes présentes des ces cellules cancéreuses</p> |