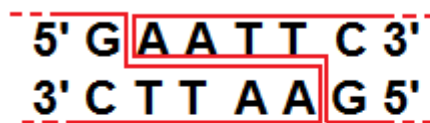


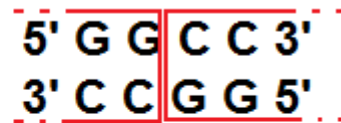
I – Les enzymes de restriction coupent l'ADN en fragments spécifiques :

- Les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences spécifique de l'ADN double-brin et les coupent (1960). Elles proviennent des bactéries où leur rôle était de couper l'ADN étranger (défense contre les phages bactériens)
- Les bases de l'ADN bactérien sont méthylées pour éviter de couper leur propre ADN
- Ces enzymes reconnaissent des séquences spécifiques de 4 à 8 paires de bases, dont elles vont hydrolyser les liaisons phosphodiester, et ce dans chaque brin
- Les sites de clivage présentent une asymétrie : le palindrome ou séquence palindromique



Coupure formant des bouts cohésifs

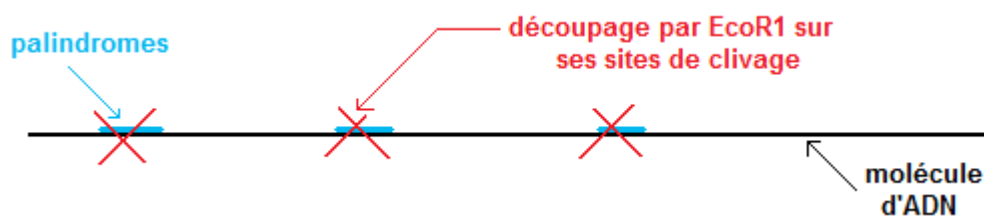
EcoR1



Coupure formant des bouts francs

Hae3

- Plus de 100 enzymes de restriction ont été purifiées et caractérisées grâce aux bactéries : on les note en abréviation en fonction de leur bactérie d'origine
- Exemple : EcoR1
 - o Genre : Escherichia
 - o Espèce : Coli
 - o Souche : R
 - o N° : 1 → 1^{ère} enzyme de restriction purifiée à partir de la souche R d'E. Coli



- Ainsi une enzyme comme EcoR1 va découper une molécule d'ADN en un grand nombre de petit fragment : elle va couper à chaque fois qu'elle reconnaîtra son site palindromique

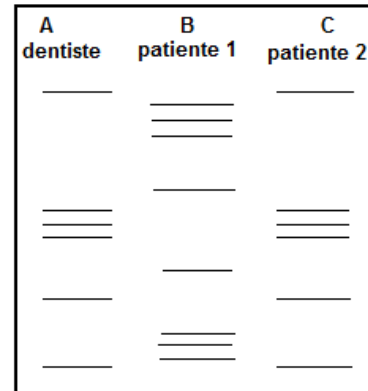
II – Les fragments de restriction

- Ils peuvent être séparés par électrophorèse en gel, et en général visualisés
- La mobilité électrophorétique d'un fragment d'ADN est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases (à savoir par cœur)
- 3 types de gel possibles, correspondant à des réseaux de mailles plus ou moins poreux
 - o Gel de polyacrylamide : fragment < 1000 paires de bases
 - o Gel d'agarose : fragment < 20000 paires de bases
 - o Gel d'agarose + champ électrique variable : fragment < 1 000 000 paires de bases

- Tout dépend du maillage : plus les mailles sont fines et plus les grosses molécules ont du mal à passer
- Pour visualiser l'ADN, on utilise un agent fluorescent qui va fluorescer quand il sera incorporé à l'ADN double-brin.

- Exemple avec l'identification de souches de virus

- 2 patientes accusent un dentiste de les avoir contaminé avec un virus. Ce virus a été retrouvé chez le dentiste, de la souche R. On va donc utiliser les enzymes de restriction et l'électrophorèse pour savoir si le dentiste est bien responsable de leur contamination ou non
- Sur le résultat on voit que l'enzyme de restriction (la même pour les 3) a donné les mêmes résultats pour le dentiste et la patiente n°2 : le dentiste est donc responsable de la contamination de la patiente n°2 car la souche est identique
- Par contre la patiente 1 ne peut pas attaquer le dentiste : la souche est différente

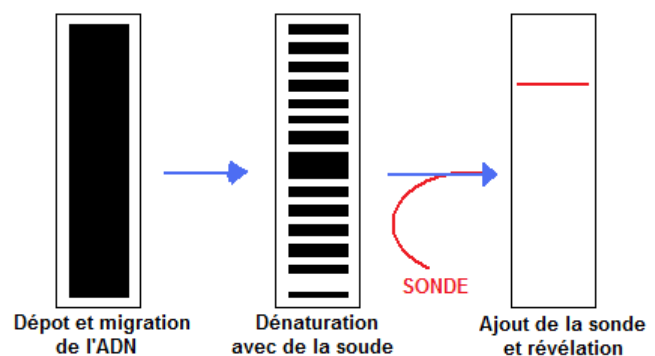


- Quelques règles à savoir

- Quelle que soit l'enzyme de restriction employée, à la fin, si l'on met les fragments bout à bout la molécule aura la même longueur.
 - Si avec la même enzyme de restriction on obtient pour 2 molécules d'ADN les mêmes résultats, alors c'est la même.
- Dans le cas de l'ADN humain le modus opératoire est différent : en effet si le virus possède 6000 paires de bases dans son génome, l'être humain en possède 10^6 fois plus ! On aurait alors une colonne noire dans l'électrophorèse

- Exemple avec la recherche du gène de la β -globine

- On découpe l'ADN avec une enzyme de restriction puis on le fait migrer
- L'ADN est alors toujours double brin et migre sur gel d'agarose
- On va ensuite dénaturer avec la soude pour essayer de voir plus clair
- On va le transférer sur membrane de nylon
- La sonde marquée est dénaturée par chaleur puis transférée avec l'ADN dénaturé via la soude
- On ne peut pas dénaturer l'ADN par chaleur dans ce cas précis, car le gel d'agarose fond si on le chauffe



- Rappel
 - o Southern Blot : ADN
 - o Western Blot : Protéines
 - o Northern Blot : ARN



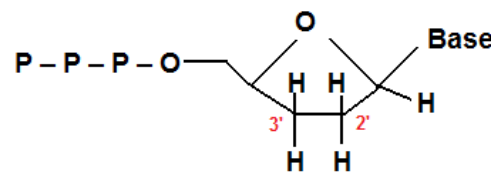
Entraînez vous sur des QCM portant sur les électrophorèses, que vous aborderez de façon plus poussée dans les prochains cours : ça vaut facilement 2 points / 25 et c'est souvent très vicieux. Les chiffres sont à connaître par cœur tout comme les méthodes pour séquencer virus et génomes humain.

III – Le séquençage : la méthode de Sanger

- La clé du séquençage vient de la génération d'un fragment d'ADN
- La taille dépend de la dernière base de la séquence grâce au principe de l'interruption contrôlée de la réplication enzymatique
- Le séquençage nécessite
 - o Une amorce d'ADN simple brin (oligonucléotide) de quelques paires de bases qui doit être complémentaire d'une partie de la séquence que l'on veut séquencer
 - o Une ADN polymérase qui va synthétiser l'ADN complémentaire
 - o Des désoxyribonucléotides triphosphates : dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 - o Un interrupteur de chaîne : 2'3' didésoxyribonucléotide

Le didésoxyribonucléotide (ddNTP)

- o Ne possède pas de OH en 3' mais un H
- o Cela bloque l'extension de la chaîne néosynthétisée car il manque l'extrémité OH pour former la liaison phosphodiester suivante en 3'
- o Si l'ADN polymérase utilise un ddNTP : arrêt de l'élongation
- o Dans le séquençage, il faut donc que [dNTP] >> [ddNTP]



Dans le cadre d'un séquençage à grande échelle


- o On va utiliser tous les « ingrédients » mentionnés au dessus
- o On va marquer les ddNTP avec des couleurs, qui seront reconnues par un laser
- o L'expérience se divise en 2 temps après synthèse des brins
 - La reconnaissance de la longueur des brins synthétisés (électrophorèse)
 - La reconnaissance de la couleur des ddNTP au bout des chaînes néosynthétisées (laser)

3' - GAATTCGCTAATGC - 5' **brin matrice**
 5' - CTTAAGCGATTACG - 3'
 5' - CTTAAGCGATTAC - 3'
 5' - CTTAAGCGATT(A) - 3'

- Ici on a mis un fragment de 14 paires de bases et on a mis des dNTP et des ddNTP : on a alors généré des fragments de tailles différentes

- Puis on va faire passer au laser les différents fragments pour savoir quelle est la couleur du dernier ddNTP : le laser va détecter les pics, et au final on obtient le résultat suivant :
- Ainsi on sait qu'à la 12^{ème} position/14 on a un ddATP, ce qui signifie qu'en 2^{ème} position du brin matrice (en partant de 5') on a une Thymine
- En répétant l'opération jusqu'à 800 fois on peut ainsi connaître parfaitement la séquence à étudier (cette méthode atteint sa limite quand le fragment à séquencer dépasse 600-800 paires de bases)



 *L'erreur courante est de parfaitement comprendre qu'à un ddCTP correspond une Guanine sur le brin matrice, mais ensuite d'oublier que le brin matrice est en sens opposé par rapport au brin néosynthétisé. On a vu dans pas mal d'anciens concours des questions jouant sur cette subtilité, et quand on a passé 5 min à réfléchir sur le séquençage, se tromper sur le sens c'est dommage !*

- Historique (il est tombé une fois en 2006/2007)
 - o 1958 : Sanger séquence l'insuline (Prix Nobel)
 - o 1977 : Sanger séquence un virus de 5386 paires de bases (Prix Nobel)
 - o 1985 : Séquençage de la 1^{ère} bactérie : H. Influenza (1,8.10⁶ paires de bases)
 - o 2004 : Séquençage du génome humain : 3.10⁹ paires de bases
- Des sondes et des gènes peuvent être synthétisés par des méthodes chimiques
 - o On peut synthétiser de l'ADN simple brin grâce à l'addition séquentielle de monomères activés
 - o Formation d'une chaîne croissante à partir d'une chaîne solide
 - o Limité à 100 nucléotides

IV – Une séquence d'ADN sélectionnée peut être beaucoup amplifiée par PCR

- PCR : Polymerase Chain Reaction (amplification génique in vitro). En 1984 Mullis invente cette méthode très utilisée en routine médicale
- Il faut pour réaliser une PCR
 - o Des régions flanquantes entourant la cible à amplifier
 - o Une paire d'amorces complémentaires de ces flanquantes
 - o Les 4 dNTP en excès
 - o De l'ADN polymérase thermostable (provenant des bactéries des sources chaudes)
 - Cette enzyme s'appelle la Taq → Thermus Aquaticus
- La PCR comporte au moins 3 cycles, chaque cycle comportant 3 étapes
 - o Dénaturation de la molécule cible (double brin) en chauffant à 95°C pendant 30s
 - o Hybridation spécifique des amorces de 20 nucléotides sur les flanquantes
 - Les amorces vont trouver leur cible en quelques secondes
 - Elles sont présentes en excès
 - o Synthèse de l'ADN à température optimale (72°C) pendant 60s
- On répète ces opérations plusieurs fois
- Ce n'est qu'à la fin du 3^{ème} cycle qu'on obtient la séquence cible
- On forme de l'ADN double-brin qui correspond à l'ADN que l'on veut en grande quantité

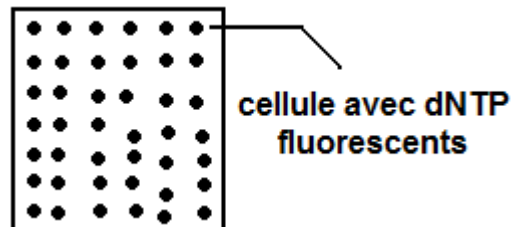
- En cas de choix, l'amorce va se concentrer sur les petites molécules
- En théorie (*la Taq fatigue à la longue en réalité !*), la PCR amplifie une molécule 2^n fois, n étant le nombre de cycles
 - o 20 cycles PCR $\rightarrow 10^6$ molécules
 - o 30 cycles PCR $\rightarrow 10^9$ molécules
- On peut ainsi amplifier 100 à 10000 paires de bases
- Applications
 - o Etudier un gène à la recherche de mutations
 - o Rechercher des virus (VIH) \rightarrow test de charges virales
 - o Pour obtenir en grandes quantités de l'ADN de bactéries difficilement cultivables (tuberculose) : on peut ainsi avoir en 2 jours des résultats qui mettaient 1 mois à être obtenus auparavant



Le schéma du prof a pas été mis dans ce cours car trop dur à faire sous paint. Ce passage n'est peut être pas absolument complet, mais toutes les infos nécessaires au concours 2007/2008 y sont ! Attention, ce n'est peut être pas le cas pour 2008/2009 !!!

V – Le niveau d'expression des gènes peut être étudié

- Les gènes sont présents en mêmes quantités dans les cellules
 - o 1 copie dans les cellules haploïdes
 - o 2 copies dans les cellules diploïdes
 - o De 0 à 100 ARNm pour chaque gène dans chaque cellule
 - o Les profils d'expression géniques varient d'une cellule à une autre ainsi que dans une cellule au cours du temps
- On utilise actuellement des méthodes dites « microarray » basées sur le principe de l'hybridation
- On étudie le niveau des transcrits : le transcriptome
- Mode opératoire
 - o On prend l'ARNm d'un tissu
 - o On utilise une enzyme : la transcriptase inverse
 - o On obtient l'ADN complémentaire que l'on va marquer grâce à des dNTP fluorescents, et ensuite vu l'intensité de la fluorescence, on peut savoir s'il y avait beaucoup d'ARNm et donc le niveau d'expression du gène
- Application médicale : cancer du sein (de nombreux types existent) : bien plus précis que l'histologie !



Ce cours est plein de chiffres, de techniques, et il est nécessaire de le connaître parfaitement (je sais, je répète tout le temps la même chose☺). La biochimie est une matière sans grosses surprises sur les 3 premiers chapitres du professeur Denamur. A savoir par cœur donc, car y'a peu de subtilités... Bon courage !

Ce document, ainsi que l'intégralité des cours de P1, sont disponibles gratuitement à l'adresse suivante : <http://coursp1bichat-larib.weebly.com>