

Module : Techniques d'analyse de biologie moléculaire
Chapitre 3 : Enzymes agissant sur l'AND et Quantification : Southern, Northern et Western Blot

Rappel : Phénomène de Restriction

✓ **Les bactériophages**

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. Ils sont composés d'un génome d'acide nucléique (ADN simple brin ou double brin ou ARN) entouré par une couverture protéique protectrice.

Les bactériophages ne peuvent se multiplier qu'en utilisant la machinerie moléculaire de la bactérie qu'ils infectent. L'infection d'une cellule par un phage peut suivre une voie lytique ou lysogénique.

- Infection lytique: le phage provoque la lyse de la cellule hôte après son injection. (exp phage T4)
- Infection lysogénique : le phage ne provoque pas la lyse immédiatement mais après une long période pendant laquelle il se développe en même temps que le génome bactérien. (exp phage lambda: λ)

✓ **Les enzymes de restriction**

Par fois, l'infection de la bactérie par le phage ne provoque ni la lyse de la cellule bactérienne ni la multiplication du phage. Ce constat expérimental peut résulter de deux phénomènes: **la lysogénie** ou **la restriction**. Dans le premier cas le DNA du phage est intégré dans le DNA bactérien sous forme silencieuse, néanmoins susceptible d'être réveillée par une agression physique (UV, chauffage...). Dans le second cas le DNA phagique est détruit dès son entrée dans la bactérie par un système de protection: **les enzymes de restriction**.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes bactériennes participant à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus : système de restriction-méthylation. Elles catalysent la coupure de l'ADN non méthylé en des endroits caractérisés par une séquence spécifique de nucléotides (site de restriction). Les produits de cette digestion sont les fragments de restriction, dont la longueur, toujours la même pour un ADN donné, ne dépend que de la séquence primaire de cet ADN. Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des **endonucléases**, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des *exonucléases* qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').

Afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par l'enzyme, **une méthylase**, codée par le gène de méthylation, va modifier les nucléotides de l'ADN bactérien en les méthylant (sur une adénine ou une cytosine) pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.

L'ensemble du gène de **restriction** et du gène de **méthylation** constitue un système de défense de la Bactérie vis-à-vis des phages.

✓ **Séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restriction:**

Les séquences de nucléotides reconnues par les enzymes de restriction sont habituellement des séquences dites *palindromiques*. Les séquences palindromiques sont des séquences où la succession des nucléotides lue dans le sens 5' à 3' (gauche-droite) pour le premier brin est identique à la séquence lue dans le sens droite-gauche pour le second brin (sens 5' à 3'). Ces séquences palindromiques sont le plus souvent constituées de 4 ou 6 paires de bases.

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

Des enzymes de restriction différentes peuvent reconnaître des mêmes sites spécifiques, on les appelle *isoschizomères*.

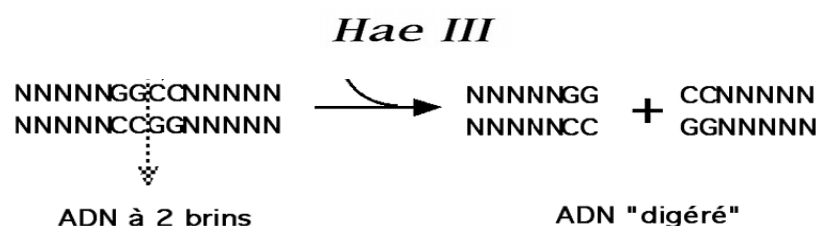
✓ **Nomenclature des enzymes de restriction:**

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). La première lettre de dénomination de l'enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme. La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite. On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à la souche bactérienne. Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes.

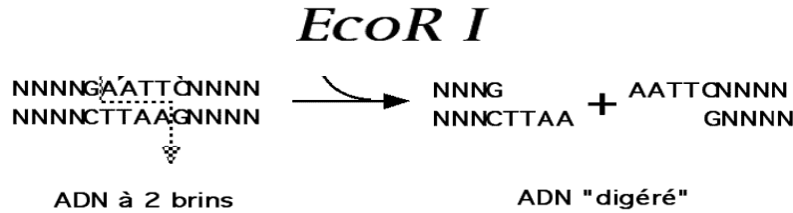


✓ **Types de coupures réalisées par les enzymes de restriction:** Les enzymes de restriction peuvent donner deux types de coupures: la coupure à **bouts francs** et la coupure à **bouts collants (cohésifs)**.

- **La coupure à bouts francs** aboutit à une coupure au milieu de la séquence palindromique, il ne peut donc pas y avoir d'association spontanée entre les fragments résultant de la coupure.



- **La coupure à bouts collants** (ou à extrémités adhésives) correspond à une coupure qui se fait de part et d'autre du centre de symétrie. Après une coupure de ce type les parties simple-brin complémentaires peuvent s'apparier.



✓ **Les classes d'enzyme de restriction**

Les enzymes de type I: Ces enzymes coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin.

Les enzymes de type II: présentent *un site de reconnaissance* (souvent palindromique) et *un site de coupure* identique ou proche du site de reconnaissance.

Les enzymes de type III: présentent également un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

❖ **Autres enzymes d'usage courant en biologie moléculaire**

1) **Les polymérase des acides nucléiques**

Les polymérase permettent de créer, de répliquer ou d'étendre une chaîne de nucléotides.

a) **Les ADN polymérase**

Les principaux ADN polymérase utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

ADN polymérase I	Fragment de Klenow : → <u>fragment de l'ADN pol I</u>	ADN polymérase du phage T4
Polymérase en 5'→3'	Polymérase en 5'→3'	Polymérase en 5'→3'
Exonucléase en 3'→5'	Exonucléase en 3'→5'	→ <u>Très active</u>
Exonucléase en 5'→3'	Pas d'exonucléase en 5'→3' → <u>Pas de risque de dégradation</u> de l'ADN néoformé	Pas d'exonucléase en 3'→5' → <u>Pas de correction d'erreurs</u>
		Exonucléase en 5'→3'
		→ <u>Très active</u>

De nouvelles polymérase ont récemment trouvé une application, elles proviennent d'archéobactéries :

Taq polymérase :

Polymérase en 5'→3'

Exonucléase en 5'→3'

Pas d'exonucléase en 3'→5' (pas de correction d'erreurs)

Optimale à 72°C, très thermorésistante

Une autre polymérase très utilisée est la **terminal-transférase**, qui permet d'ajouter des désoxynucléotides à l'extrémité 3'-OH d'un ADN. Cette particularité peut être facilement mise à profit pour ajouter une séquence à un ADN.



Une polymérase particulière est la **rétrotranscriptase**. Sont des DNA polymérases qui peuvent synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc ou cDNA) en prenant un ARN comme matrice, pour former un hybride ADN:ARN. Elles catalysent donc la réaction inverse de la transcription, d'où le nom de transcriptases reverse.

b) Les ARN polymérases

Ces polymérases ont besoin d'un promoteur spécifique pour transcrire l'ADN en ARN. On les utilise pour transcrire des ADN, pour les traduire, ou pour réaliser des sondes.

2) Les nucléases

a) La DNase

Cette enzyme extraite du pancréas est une endonucléase coupant préférentiellement après une pyrimidine en libérant une extrémité 3' OH et une extrémité 5'P libres. Le DNA peut être aussi bien sous forme simple brin que double brin, dans le dernier cas la coupure peut se faire sur un seul brin aussi bien que sur les deux brins.

b) La nucléase S1

La nucléase S1 est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin, bien qu'à des concentrations élevées elle agisse aussi sur les hybrides. Elle agit en milieu acide, en présence d'ions Zinc.

c) L'exonucléase III

L'exodésoxyribonucléase III d'*Escherichia coli*, qu'on rencontre aussi chez *Haemophilus influenzae*, hydrolyse de préférence les extrémités 3'OH des DNA double-brin en remontant vers le côté 5'. (3'→5' exonucléase). Elle produit des nucléosides 5'-phosphate.

L'exonucléase III permet la formation de DNA simple brin à partir d'une de ses extrémités, sa conjugaison avec la nucléase S1 permet d'effectuer des délétions à des sites définis dans un DAN.

d) Les ARNses:

Les ribonucléases A : la ribonucléase A est l'enzyme de la digestion des ARN chez les animaux. Elle agit comme une endonucléase, préférentiellement après les nucléotides à pyrimidine, en hydrolysant la liaison entre le phosphate et le carbone 5' du nucléotide suivant.

Les ribonucléases H : La ribonucléase H est une ribonucléase bactérienne qui intervient dans la maturation des RNA amorces qui servent à initier la réplication des plasmides.

3) Ligases

Les ligases catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre une extrémité 3'-OH et 5'-P.

On utilise principalement :

- **ADN ligase d'E. Coli** : lie les bouts collants. NAD comme cofacteur.
- **ADN ligase du phage T4** : lie les bouts collants et les bouts francs. ATP comme cofacteur.

4) Kinases et phosphatases

On utilise :

- **Phosphatase alcaline** : élimine les groupements phosphates en 5' et empêche la liaison du vecteur sur lui-même lors du clonage.
- **Kinase de T4** : ajoute un groupement phosphate en 5'

1. Electrophorèse des acides nucléiques

Principe :

Technique basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules.

Réalisation :

Les fragments d'un DNA digéré par une enzyme de restriction comme Hha I, sont des anions et si on les soumet dans un gel à un champ électrique, ils migrent vers le pôle positif (anode) à une vitesse d'autant plus grande qu'ils sont de taille plus petite.

On place dans un des puits de dépôt des fragments de DNA de tailles connues pour servir de marqueurs de taille.

On ajoute dans les dépôts deux colorants :

- un bien visible sur le gel qui va migrer très rapidement avant les fragments de DNA pour limiter la distance parcourue au bord de l'anode ;
- un autre, le bromure d'éthidium qui se fixe spécifiquement au DNA quelle que soit la séquence et qui émet une fluorescence mauve lorsqu'on l'éclaire avec des rayons ultraviolets.

On examine le gel sous lumière ultra-violette à 254 nm et on photographie les fragments d'ADN digéré.

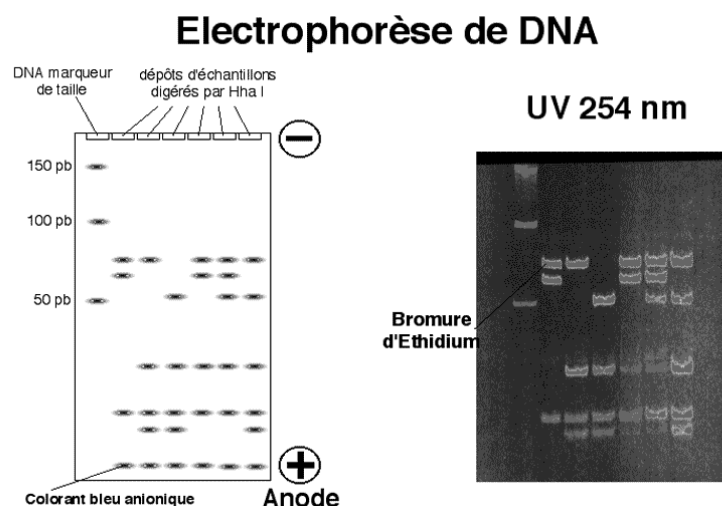


Figure 1 : Electrophorèse de DNA. (Raisonnier A, 2006)

Les applications de l'électrophorèse des acides nucléiques

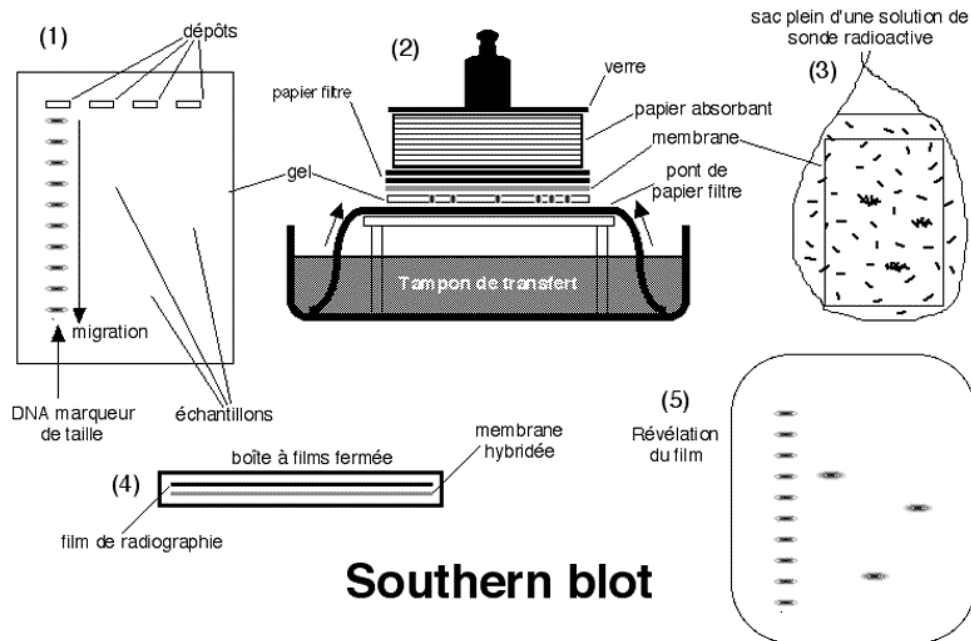
- Estimation du poids moléculaire de fragments d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction.
- Analyse d'ADN ou d'ARN après une amplification par PCR
- Séparation de fragments d'ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas de Northern Blot.

2. Hybridation en Southern Blot

Le Southern blot est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.

Les conditions nécessaires à cette hybridation moléculaire étant incompatibles avec le support en agarose, SOUTHERN eut l'idée de réaliser une réplique du gel en transférant l'ADN sur un support solide constitué par une membrane de nitrocellulose avant l'hybridation. Ce support est aujourd'hui remplacé par une membrane de nylon. Précédant l'étape de transfert de l'ADN sur une membrane, l'ADN est rendu monobrin à l'aide d'un agent dénaturant (soude NaOH) de façon à ce qu'il puisse ensuite s'hybrider avec la sonde. Le transfert est obtenu par capillarité (**blotting**) en déposant le gel d'agarose recouvert de la membrane sur un système qui assure son hydratation. Un courant liquidien ascendant créé à l'aide d'une couche de papier absorbant et d'un poids va permettre le déplacement de l'ADN du gel vers la membrane. A la fin de l'opération qui dure quelques heures, la membrane contient l'ensemble des fragments d'ADN qui étaient contenus dans le gel et aux mêmes positions que dans celui-ci : il s'agit donc d'une réplique exacte du gel d'électrophorèse.

L'ADN génomique transféré est ensuite fixé de façon irréversible sur la membrane par cuisson à 80°C (nitrocellulose) ou irradiation aux UV (nylon). Après une étape dite de préhybridation (préincuber la membrane avec de l'ADN pour en éliminer tous les sites qui n'ont pas été saturés par l'ADN lors du transfert) au cours de laquelle la membrane contenant l'ADN est mise dans les conditions de température, de pH et de salinité nécessaires à l'hybridation, celle-ci est réalisée en mettant en contact l'ADN génomique et la sonde moléculaire marquée à l'aide d'un traceur radioactif ou chimioluminescent. Cette étape d'hybridation est réalisée en milieu liquide et sous agitation. Lorsqu'une molécule d'ADN sonde va rencontrer une molécule d'ADN cible (fragment d'intérêt), la complémentarité des séquences va permettre la réassociation des deux molécules simple brin en une molécule double brin. Après une étape de lavage destiné à éliminer les molécules de sondes marquées qui ne se sont pas hybridées, la membrane est soumise à une autoradiographie qui va permettre la visualisation des fragments d'intérêt.



Southern blot

Figure 2 : les différentes étapes du Southern blot. 1. Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille. 2. On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables. 3. La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire. 4. On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film. 5. On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent. (Raisonnier A, 2006)

3. Hybridation en northern blot

Il est souvent nécessaire de pouvoir localiser un transcrite d'ARN dans un tissu particulier. Dans ce cas on peut utiliser une variation de l'analyse par transfert de type Southern. Les RANm totaux sont extraits du tissu, séparés en fragments de différentes tailles par électrophorèse puis transférés sur une membrane (on appelle cela un transfert de type northern ou Northern blot) (la membrane est en nitrate de cellulose ou de nylon traité afin de rendre sa surface positivement chargée). La membrane est ensuite hybridée à une sonde d'ADN simple-brin marqué provenant d'une copie clonée du gène en question. Si un ARNm complémentaire à la sonde d'ADN est présent, il sera révélé par l'apparition d'une bande sur le film.

Les northern blots fournissent des informations sur l'expression des gènes spécifiques ; ils sont utilisés pour étudier les profils d'expression génique des tissus embryonnaires, du cancer et des maladies génétiques. Les northern blots détectent également les ARNm produits par épissage alternatif (des transcrits différents issus d'un même gène) et sont utilisés pour obtenir des informations sur les ARNm traduits. Combinés avec des marqueurs ARN de taille connue, les northern blots permettent de mesurer la taille des ARN transcrits d'un gène.

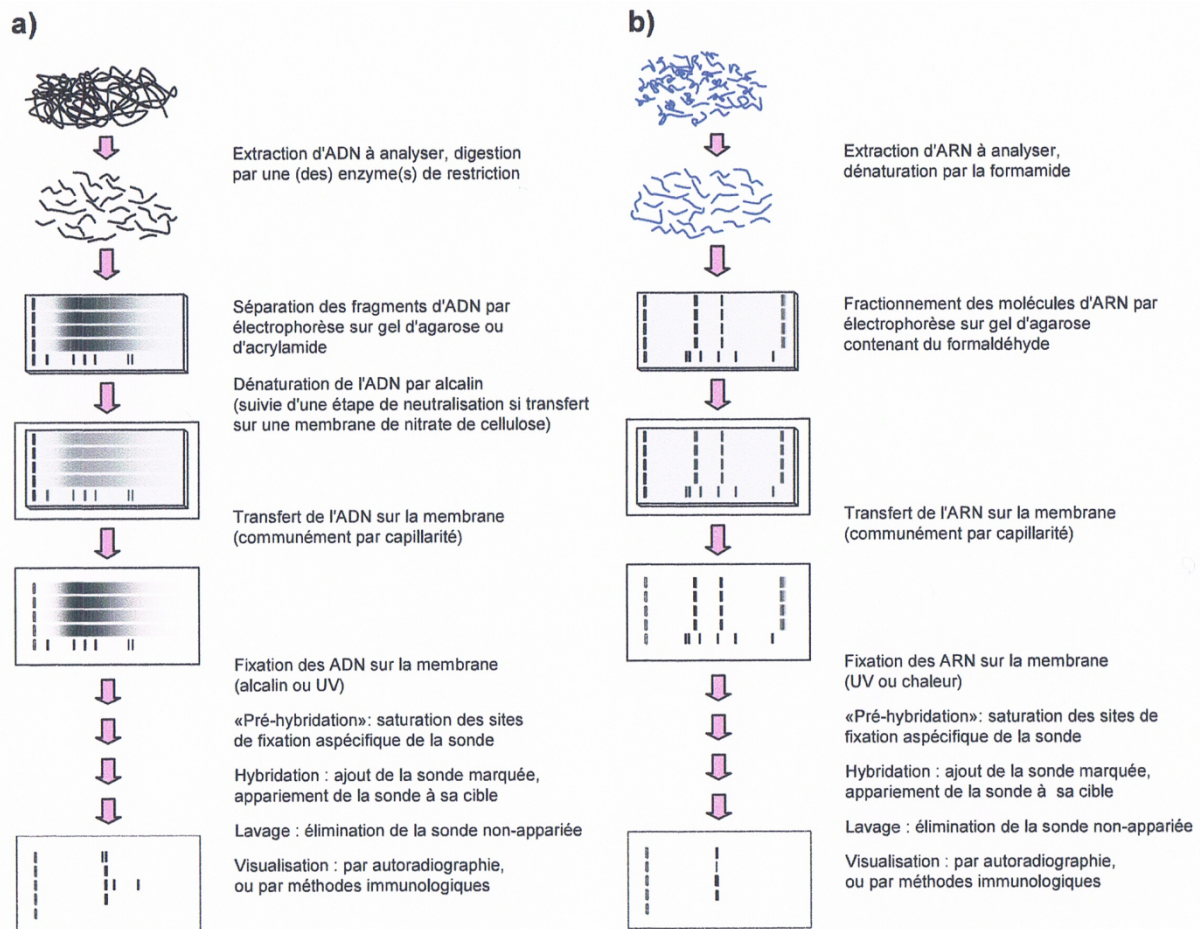
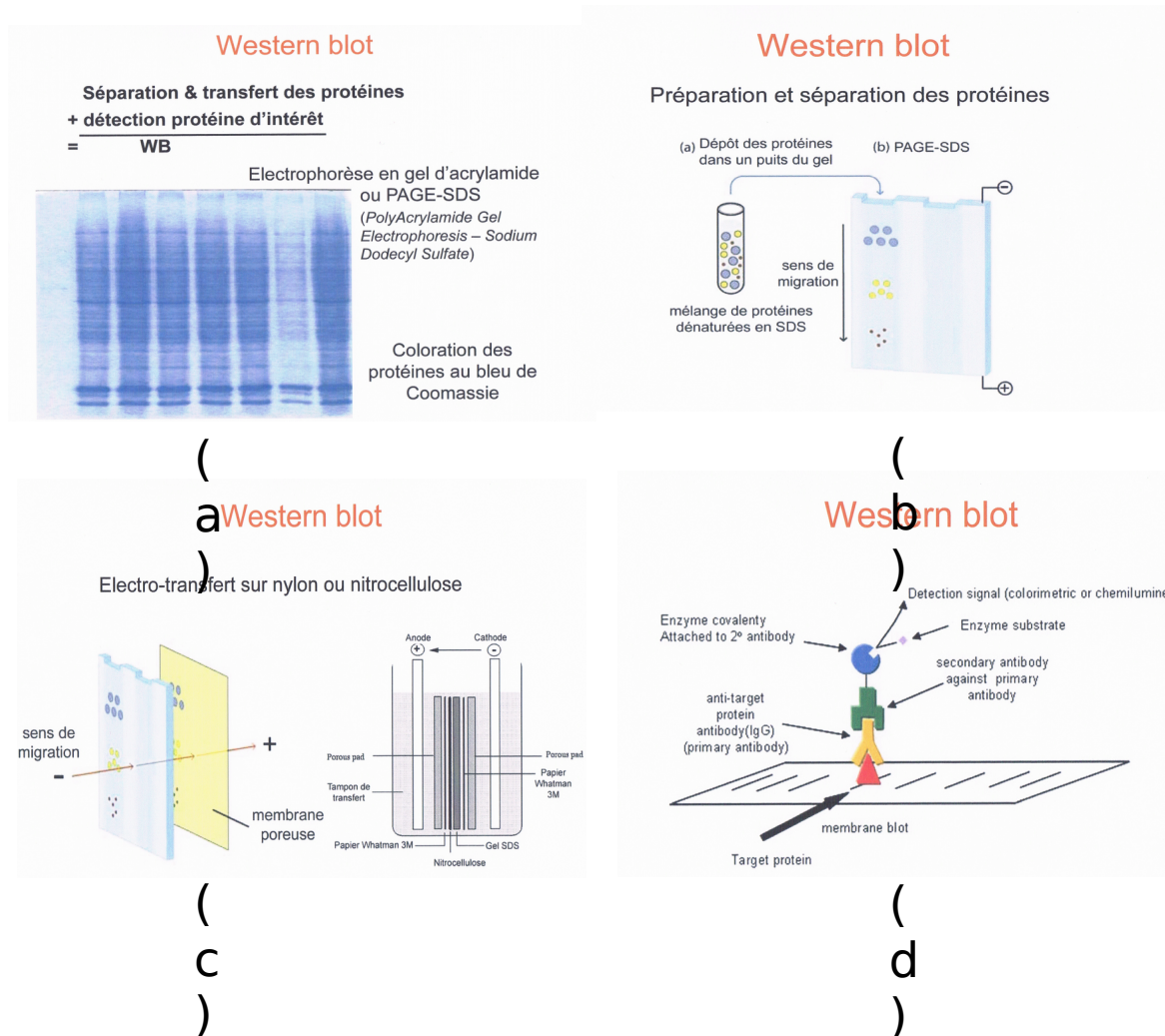


Figure 3 : Les différentes étapes du Southern blot (a) et northern blot (b) (Gaillardin C et Tinsley C.R, 2007).

4. Hybridation en western blot

La recherche des protéines à l'aide des sondes est également effectuée en utilisant des anticorps comme sondes. Un anticorps est une protéine fabriquée par le système immunitaire d'un animal. Elle se fixe avec une affinité élevée à une molécule telle que une protéine spécifique (qui joue le rôle d'un antigène), car l'anticorps possède une forme complémentaire spécifique de type clé-serrure avec l'antigène. Lorsqu'on veut détecter une protéine, on extrait un mélange des protéines des cellules, on les sépare en bandes de protéines distinctes par électrophorèse puis on les transferts sur membrane (il s'agit d'un transfert de type western ou Western Blot). La position d'une protéine spécifique recherchée sur la membrane est révélée lorsqu'on baigne la membrane dans une solution contenant l'anticorps obtenu à partir d'un lapin ou d'un autre hôte chez lequel l'antigène a été injecté au préalable. La position de la protéine est révélée par la position du marquage que porte l'antigène.



Figures 4: Les différentes étapes du Western blot. (a) : électrophorèse en gel d'acrylamide des protéine, (b) : préparation et séparation des protéines, (c) : Electro-transfert sur nylon ou nitrocellulose, (d) : détection par l'antigène. Pelletier L (2011).

5. Exemple d'application du Southern blot : RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragment de restriction)

(<http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>)

La technique RFLP repose sur la digestion d'un DNA cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par le DNA. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un DNA sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).

Si deux individus diffèrent par un ou plusieurs sites ou, même, par la distance séparant deux sites identiques consécutifs, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par l'enzyme de restriction. Les milliers de fragments obtenus après digestion enzymatique et révélés par le bromure d'éthidium (BET), montrent sous UV un seul voile continu (smear). Une fois transféré sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (Southern, 1975) et hybridé par un DNA sonde, le DNA cible digéré est visualisé par autoradiographie, si la sonde est

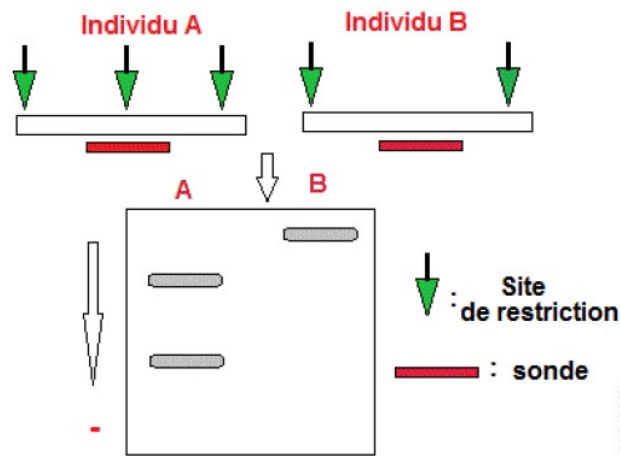
marquée au P32 (sonde chaude) ou par méthodes biochimiques si la sonde est non radioactive (sonde froide).

✓ **Origines du polymorphisme de restriction (RFLP) :**

- Perte ou gain d'un site de restriction
- Mutation de type insertion-déletion

Dans les deux cas les loci sont généralement bialléliques et l'expression des allèles est codominante.

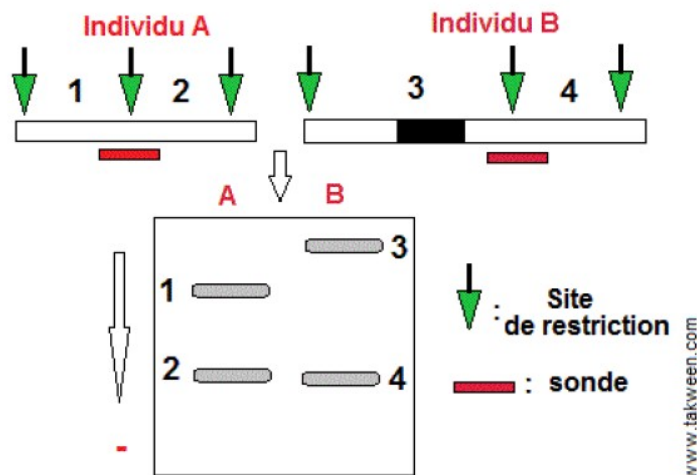
➤ **Polymorphisme dû à la disparition d'un site de restriction (mutations ponctuelles).** (<http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>)



Polymorphisme du DNA dû aux pertes de sites de restriction

www.takween.com

➤ **Polymorphisme dû aux mutations de type 'insertion - délétion'.**

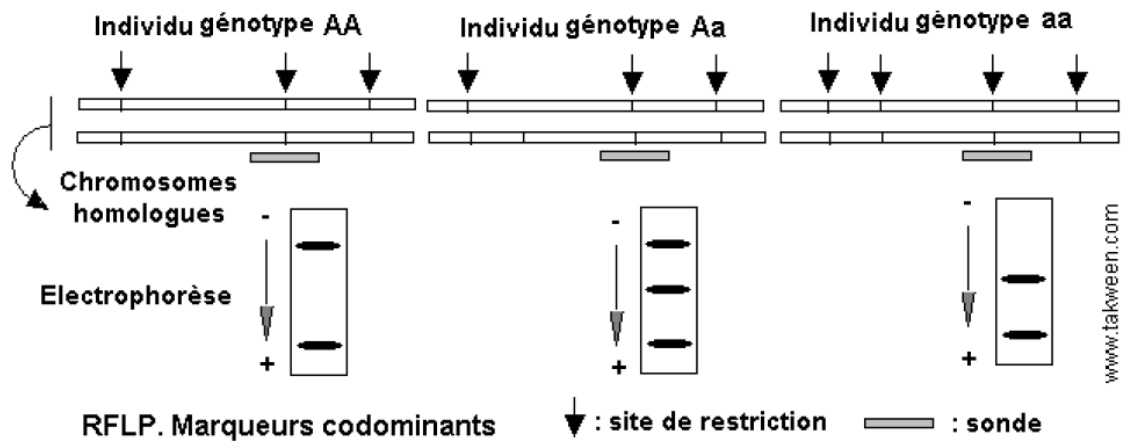


Polymorphisme du DNA dû à des mutations de type 'insertion-délétion'

www.takween.com

✓ **Caractéristiques principales des marqueurs RFLP.**

- Marqueurs reflétant un polymorphisme de longueur de fragment
- Marqueurs codominants



Mm GHARZOULI FERTOUL. R