

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Popular Democratic Republic of Algeria

Ministry of Higher Education and  
Scientific Research  
Abbes Laghrour University Khenchela  
Faculty of Natural and Life Sciences  
Department of Agronomiques  
Sciences



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة عباس لغرور -خنشلة-  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم العلوم الفلاحية

**Polycopié de cours pour le niveau Master 1 en biotechnologie  
végétale**

# GENETIQUE MOLECULAIRE

Préparé par : Dr BENCHELALI Soumia

Grade : Maitre de conférence classe "B"

Année universitaire 2024-2025

## **Intitulé du Master : BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES**

**Semestre : S1**

**Intitulé de la matière : Génétique moléculaire**

**Code : GM**

**Nombre de crédits : 04**

**Coefficient de la Matière : 02**

### **Objectifs de l'enseignement :**

Connaître les structures de l'ADN, ARN, et Protéines (Allozymes et isozymes), savoir extraire les allozymes et l'ADN, Connaître les différentes méthodes d'analyse du polymorphisme de l'ADN et de allozymes (RFLP, PCR, AFLP, RAPD, Microsatellites, séquençage), Interprétation des électrophorèses et génotypages.

**Connaissances préalables recommandées :** Biologie cellulaire, génétique, biologie moléculaire de base.

### **Contenu de la matière :**

- Structure et biologie moléculaire (ADN, ARNs, protéines, réplication de l'ADN, structure des gènes et opérons, code génétique, transcription et traduction.
- Régulation de l'expression des gènes.
- Génétique du développement.
- Analyse du polymorphisme protéique (Allozymes, isozymes, ...)
- Analyse du polymorphisme de l'ADN.
- Séquençage des macromolécules.

**Mode d'évaluation :** contrôles de connaissances et contrôles continus

**Références** (*Livres et photocopiés, sites internet, etc.*).

**1. BOUVIER, F, 1980.** L'information génétique [texte imprimé] : les concepts de la Biologie moderne / François Bouvier. - Paris : Editions privat, 1980. - 208 p. : fig. ; 24 cm. - (Bios). Bibliogr. p. 205-208. - ISBN 2708987011. **576.5/43, 576.5/43.2**

**2. HARRY, MYRIAM, 2001.** Génétique moléculaire et évolutive [texte imprimé] / Myriam Harry. - Paris : Maloine, 2001. - 326 p. : fig. en coul. ; 24 cm. - (Sciences fondamentales / Jean-François d'Ivernois). Bibliogr. Index. - ISBN 2224026757. **572.8/60, 572.8/60.2**

**3. J. RUSSEL, PETER, 1981.** Cours de génétique de la biologie moléculaire aux lois de Mendel [texte imprimé] / Peter J. Russel; Trad. Gonzy Treboul. - Paris : MEDSI., 1981. - 292 p. : fig. couv. en coul. ; 23 cm. Index p. 284-292. - ISBN 2286439037X. **576.5/29, 576.5/29.10**

### **Websites**

[http://genet.univ-tours.fr/fichiers\\_de\\_base/gen001300.HTM](http://genet.univ-tours.fr/fichiers_de_base/gen001300.HTM)

<http://www.myonet.org/GENETIQUE/glossaire.html>

## AVANT-PROPOS

La génétique moléculaire est une discipline fondamentale qui permet de décrypter les mécanismes régissant l'hérédité et l'expression des gènes au niveau moléculaire.

Ce polycopié est un support de cours de la matière ‘‘génétique moléculaire’’. Il est destiné comme support pédagogique aux étudiants de Master 1 en biotechnologie végétale, semestre 1, suivant le canevas ministériel en complément des notions générales de biologie moléculaire déjà acquises par les étudiants en troisième année de Licence en Biologie et physiologie végétale.

Cette polycopie de cours a été conçue pour offrir aux étudiants une compréhension approfondie des structures de l'ADN, de l'ARN et des protéines, ainsi que des outils méthodologiques nécessaires pour analyser leur polymorphisme.

L'objectif principal de cet enseignement est d'apporter aux étudiants les compétences théoriques et pratiques nécessaires pour maîtriser les techniques modernes utilisées en génétique moléculaire. Cela inclut l'extraction et l'analyse des allozymes et de l'ADN, les différentes approches d'étude du polymorphisme telles que RFLP, PCR, AFLP, RAPD, les microsatellites et le séquençage. Une attention particulière sera également portée à l'interprétation des résultats obtenus par électrophorèse et génotypage.

Cette polycopie constitue ainsi un outil pédagogique destiné à accompagner les étudiants dans l'acquisition de compétences théoriques et expérimentales nécessaires à l'étude de la génétique moléculaire. Elle permettra non seulement de mieux comprendre les mécanismes moléculaires fondamentaux, mais aussi d'aborder des applications pratiques dans divers domaines tels que la recherche et la biotechnologie.

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Nomenclature des nucléosides .....  | 4  |
| Tableau 2. Principales différences entre la réplication chez les eucaryotes et les procaryotes ..... | 12 |
| Tableau 3. Exemples des enzymes de restriction de type II.....                                       | 49 |
| Tableau 4. Classification des techniques de marquage moléculaire .....                               | 72 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Schéma général d'un nucléotide .....  | 2  |
| Figure 2. Différence entre ribose et désoxyribose.....  | 3  |
| Figure 3. Différences entre pyrimidine et purine et numérotation des atomes.....  | 3  |
| Figure 4. Schéma général d'un nucléotide monophosphate et liaison ester (A) et d'un nucléotide triphosphate et liaisons anhydride d'acide (B) ..... | 5  |
| Figure 5. Polymérisation de deux nucléotides et liaison phosphodiester .....  | 6  |
| Figure 6. Structures primaire et secondaire de l'ADN .....  | 7  |
| Figure 7. Réplication d'ADN semi-conservative.....  | 9  |
| Figure 8. Cycle cellulaire et réplication de l'ADN : de la phase G1 à la formation des cellules filles .....  | 10 |
| Figure 9. L'origine de la réplication chez les eucaryotes et procaryotes .....  | 11 |
| Figure 10. Les étapes de la réplication .....   | 12 |
| Figure 11. La transcription de l'ADN .....  | 14 |
| Figure 12. Principe générale de la traduction.....  | 15 |
| Figure 13 . Détail schématique des sites du ribosome (site P pour peptidyl en rose et site A pour aminoacyl en vert).....                           | 16 |
| Figure 14. Correspondance entre le codon de l'ARNm et l'acide aminé apporté par l'ARNt.....   | 17 |
| Figure 15. La régulation de l'expression des gènes .....  | 17 |
| Figure 16. Niveau de régulation de l'expression des gènes .....   | 18 |
| Figure 17. Mesure de la diversité génétique au niveau du phénotype et du génotype .....   | 23 |
| Figure 18. Structure des protéines.....   | 27 |
| Figure 19. Structure primaire des protéines.....  | 28 |
| Figure 20. Structure secondaire des protéines.....  | 29 |
| Figure 21. Les différentes liaisons de la structure tertiaire (A) et la structure tertiaire des protéines (B)..                                     | 30 |
| Figure 22. Structure quaternaire des protéines .....  | 30 |
| Figure 23. Le site actif d'une enzyme est le lieu de la réaction enzymatique. ....  | 32 |
| Figure 24. Électrophorèse des acides nucléiques .....   | 35 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 25. Formation d'agrégats moléculaires lors de l'électrophorèse .....   | 37 |
| Figure 26 . Effet du SDS sur la conformation et la charge d'une protéine.....   | 38 |
| Figure 27. Préparation du gel et mise en place de l'électrophorèse .....  | 39 |
| Figure 28. Coloration de gels de protéines au Bleu de Coomassie brillant (A) et au nitrate de l'argent (B).....           | 40 |
| Figure 29. Détermination de la masse molaire d'une protéine .....   | 41 |
| Figure 30. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (EBD ou 2D-PAGE) .....   | 42 |
| Figure 31. Type des enzymes de restriction .....  | 46 |
| Figure 32. Coupure France (A) et cohésive (B) des enzymes de restriction .....  | 48 |
| Figure 33. Principe de l'hybridation moléculaire.....   | 50 |
| Figure 34. Courbe de dissociation de l'ADN en fonction de la température .....  | 52 |
| Figure 35. Différent types de l'hybridation moléculaire en fonction de la $T_m$ et température du milieu réactionnel..... | 53 |
| Figure 36. Technique Southern blot .....  | 59 |
| Figure 37. Les étapes du clonage in vivo .....  | 63 |
| Figure 38. Structure d'un plasmide destiné au clonage bactérien .....   | 64 |
| Figure 39. Structure d'un phage.....  | 65 |
| Figure 40. Technique de la PCR .....  | 69 |
| Figure 41. Technique de la RFLP .....   | 75 |
| Figure 42. Technique de marqueur moléculaire RAPD .....   | 79 |
| Figure 43. Technique de marqueur AFLP .....   | 80 |

## TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| Avant-propos .....  | I  |
| Liste des tableaux .....  | II |
| Liste des figures .....   | II |
| Introduction générale.....                                      | 1  |
| Chapitre 1 : Structure et biologie moléculaire .....            | 2  |
| 1. Les acides nucléiques : structure et propriétés .....        | 2  |
| 1.1. Constitution chimique des nucléotides .....                | 2  |
| 1.1.1. Pentose .....  | 2  |
| 1.1.2. Base azotée.....   | 3  |
| 1.1.3. Nucléosides .....  | 4  |
| 1.1.4. Nucléotides .....  | 4  |
| 1.2. Les acides nucléiques.....                                 | 5  |
| 1.2.1. ADN (acide désoxyribonucléique).....                     | 6  |
| 1.2.2. ARN (acide ribonucléique) .....                          | 8  |
| 2. Réplication de l'ADN : mécanismes et enzymes impliquées..... | 9  |
| 2.1. Chromatine et ADN .....                                    | 9  |
| 2.2. Étapes de la réplication de l'ADN .....                    | 10 |
| 2.2.1. Initiation .....   | 11 |
| 2.2.2. Élongation .....   | 11 |
| 2.2.3. Terminaison .....  | 11 |
| 3. La transcription.....  | 13 |
| 3.1. Initiation .....   | 13 |
| 3.2. Élongation .....   | 13 |
| 3.3. Terminaison .....  | 13 |
| 4. Traduction et synthèse des protéines .....                   | 14 |
| 4.1. Initiation .....   | 15 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Élongation .....   | 15 |
| 4.3. Terminaison .....  | 15 |
| 5. Régulation de l'expression des gènes.....                                    | 17 |
| 5.1. Régulation au niveau transcriptionnel .....                                | 18 |
| 5.1.1. Chez les procaryotes .....   | 18 |
| 5.1.2. Chez les eucaryotes.....   | 18 |
| 5.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel .....                           | 19 |
| 5.3. Régulation au niveau traductionnel .....                                   | 19 |
| 5.4. Régulation au niveau post-traductionnel .....                              | 19 |
| Chapitre 2. Génétique du développement et le polymorphisme génétique .....      | 21 |
| 1. Génétique de développement.....  | 21 |
| 2. Polymorphisme génétique : source de diversité dans les gènes .....           | 21 |
| 4. Mesure de la variation génétique.....  | 22 |
| 4.1. Au niveau du phénotype : .....   | 22 |
| 4.2. Au niveau du génotype : .....  | 23 |
| 5. Les marqueurs génétiques .....   | 23 |
| 5.1. Types de marqueurs.....  | 24 |
| 5.1.1. Marqueurs morphologiques .....   | 24 |
| 5.1.2. Marqueurs protéiques (biochimiques) .....                                | 24 |
| 5.1.3. Les marqueurs ADN (moléculaires) .....                                   | 25 |
| 5.2. Marqueurs génétiques: propriétés recherchées.....                          | 25 |
| Chapitre 3 : Analyse du polymorphisme protéique (Allozymes, isozymes ... )..... | 27 |
| 1. Notions de base sur les protéines.....                                       | 27 |
| 1.1. Définition.....  | 27 |
| 1.2. Structure des protéines.....   | 28 |
| 1.2.1. Structure primaire .....   | 28 |
| 1.2.2. Structure secondaire.....  | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 1.2.3. Structure tertiaire .....  | 29 |
| 1.2.4. Structure quaternaire (optionnelle) .....  | 30 |
| 1.3. Fonction des protéines .....   | 31 |
| 2. Notions de bases sur les enzymes .....   | 31 |
| 2.1. Définition .....   | 31 |
| 2.2. Structure des enzymes.....   | 32 |
| 2.3. Fonctionnement enzymatique .....   | 32 |
| 2.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique .....  | 33 |
| 2.5. Allozymes et Isozymes .....  | 33 |
| 2.5.1. Allozymes .....  | 33 |
| 2.5.2. Isozymes .....   | 33 |
| 2.5.3. Applications biologiques et médicales.....   | 34 |
| 3. Analyse du polymorphisme et technologies basées sur les protéines .....  | 34 |
| 4. Séparation des enzymes et des protéines par l'électrophorèse .....   | 34 |
| 4.1. Types d'électrophorèse.....  | 36 |
| 4.1.1. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes ou électrophorèse<br>unidimensionnelle par isoélectrofocalisation (IEF).....                   | 36 |
| 4.1.2. L'électrophorèse en conditions dénaturantes unidimensionnelle ou SDS-PAGE (<br>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)..... | 38 |
| 4.1.3. L'électrophorèse bidimensionnelle (EBD ou 2D-PAGE) .....   | 41 |
| 4.2. Techniques d'identification .....  | 43 |
| Chapitre 3 : Analyse du polymorphisme de l'ADN.....   | 44 |
| 1. Polymorphisme de l'ADN (Acide désoxyribonucléique, DNA). .....   | 44 |
| 2. Approche méthodologique pour la mise en évidence du polymorphisme moléculaire....  | 45 |
| 3. Restriction de l'ADN.....  | 45 |
| 3.1. Type des enzymes.....  | 45 |
| 3.1.1. Les exonucléases :.....  | 45 |
| 3.1.2. Les endonucléases :.....   | 45 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2. Les enzymes de restriction .....                          | 46 |
| 3.2.1. Origine des enzymes de restriction: .....               | 46 |
| 3.2.2. Nomenclature des enzymes de restriction.....            | 47 |
| 3.2.3. Type des enzymes de restriction .....                   | 47 |
| 3.2.4. Mode de coupure.....                                    | 48 |
| 3.2.5. Exemples d'enzymes de type II.....                      | 48 |
| 3.2.6. Utilisations des enzymes de restriction.....            | 49 |
| 4. L'hybridation moléculaire.....                              | 49 |
| 4.1. L'objectif de l'hybridation moléculaire .....             | 49 |
| 4.2. Principe de l'hybridation moléculaire .....               | 49 |
| 4.3. Conditions de l'hybridation moléculaire .....             | 50 |
| 4.3.1. Stringence .....  | 51 |
| 4.3.2. Température de fusion $T_m$ (Melting temperature) ..... | 51 |
| 4.3.3. Facteurs ayant une influence sur l'hybridation.....     | 53 |
| 4.4. Les sondes nucléiques .....                               | 53 |
| 4.4.1. Les types de sondes.....                                | 53 |
| 4.5. Techniques de marquage de l'ADN .....                     | 54 |
| 4.5.1. Les agents de marquage .....                            | 54 |
| 4.5.2. Différents types de marquage des sondes .....           | 55 |
| a. Les sondes radioactives (chaudes) : .....                   | 55 |
| b. Les sondes non radioactives (froides).....                  | 57 |
| 4.6. Différents types d'hybridation.....                       | 57 |
| 4.6.1. Southern-Blot, H : ADN/ADN : .....                      | 57 |
| 4.6.1.1. Les applications de la technique de SOUTHERN .....    | 60 |
| 4.6.2. Northern Blot, H : ARN/ADN : .....                      | 61 |
| 4.6.3. Dot Blot ou Slot blotting : .....                       | 61 |
| 4.6.4. L'hybridation in situ (HIS) .....                       | 61 |

|  |    |
|--|----|
| 4.6.5. L'hybridation in situ en fluorescence (FISH, de l'anglais fluorescence in situ hybridization) :.....                                  | 61 |
| 5. L'amplification de l'ADN .....  | 61 |
| 5.1. Amplification in vivo = Clonage .....   | 62 |
| 5.1.1. Principales étapes du clonage .....   | 62 |
| 5.1.2. Obtention de l'ADN de l'organisme donneur.....  | 63 |
| 5.1.3. Les vecteurs de clonage: .....  | 63 |
| 5.1.4. Différent types de vecteurs : .....   | 64 |
| 5.1.5. Applications des vecteurs et les cellules hôtes.....  | 66 |
| 5.2. Amplification in vitro à l'aide de la réaction de polymérase en chaîne= PCR (polymerase chain reaction).....                            | 67 |
| 5.2.1. Objectif de la PCR.....   | 67 |
| 5.2.2. Principe.....   | 67 |
| 5.2.3. Composantes de PCR .....  | 68 |
| 5.2.4. La technique de PCR .....   | 68 |
| 5.2.5. Différent types de PCR.....   | 70 |
| 6. Applications de la technologie de l'ADN recombinant.....  | 70 |
| Chapitre 4. Les marqueurs moléculaires .....   | 71 |
| 1. Définition.....   | 71 |
| 2. Différents types de marqueurs moléculaires .....  | 73 |
| 2.1. Le polymorphisme de longueur des fragments RFLP : Restriction fragment length polymorphism ou SNP :Single nucleotide polymorphism ..... | 73 |
| 2.1.1. Avantage des RFLP .....   | 77 |
| 2.1.2. Inconvénients des RFLP .....  | 77 |
| 2.1.3. Applications .....  | 77 |
| 2.2. Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN par PCR : Technique RAPD ("Randomly Amplified Polymorphic DNA) .....                   | 78 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3. Les marqueurs AFLP : Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification<br>(Amplification Fragment Length Polymorphism)..... | 79 |
| Chapitre 5. Séquençage des macromolécules .....  | 81 |
| 1. Définition.....   | 81 |
| 1.1. Séquençage de l'ADN.....  | 81 |
| 2. Méthodes de séquençage .....  | 82 |
| 2.1. Le séquençage classique par la méthode de Sanger : .....  | 82 |
| 2.2. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) : .....  | 82 |
| Conclusion.....  | 83 |
| Références bibliographiques .....  | 84 |

## **INTRODUCTION GENERALE**

La génétique moléculaire est une discipline clé en biologie moderne, permettant de comprendre les mécanismes fondamentaux qui régissent l'hérédité, l'expression des gènes et la variabilité génétique. Grâce aux progrès technologiques, elle occupe aujourd'hui une place centrale dans les domaines de la recherche fondamentale, de la médecine et des biotechnologies.

Ce cours a pour objectif d'explorer en profondeur les bases moléculaires des processus biologiques, en commençant par la structure et la biologie moléculaire des macromolécules essentielles telles que l'ADN, les ARN et les protéines. Les mécanismes de réplication, de transcription et de traduction, ainsi que la structure des gènes et des opérons, seront abordés afin de fournir une compréhension globale du code génétique et de son fonctionnement.

Une attention particulière sera portée à la régulation de l'expression des gènes, processus fondamental permettant aux cellules de contrôler l'activité des gènes en réponse à des stimuli internes et externes. Par ailleurs, la génétique du développement sera traitée pour illustrer comment l'information génétique guide la formation et la différenciation des organismes.

L'analyse des polymorphismes moléculaires représente une partie cruciale de ce cours. Les techniques d'étude des polymorphismes protéiques, tels que les allozymes et isozymes, seront détaillées, ainsi que celles liées aux polymorphismes de l'ADN (RFLP, PCR, AFLP, RAPD, microsatellites). Enfin, le séquençage des macromolécules sera présenté comme une méthode essentielle pour décrypter l'information génétique avec précision.

Ce contenu permettra aux étudiants d'acquérir les connaissances nécessaires pour comprendre et interpréter les mécanismes moléculaires complexes à l'origine de la diversité génétique et de l'expression des gènes. Il vise également à fournir une base solide pour maîtriser les outils analytiques utilisés dans les laboratoires de génétique moléculaire et d'études des génomes.

## CHAPITRE 1 : STRUCTURE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 1. Les acides nucléiques : structure et propriétés

#### 1.1. Constitution chimique des nucléotides

Un des aspects les plus importants de la biologie moléculaire est l'étude du matériel génétique. L'information génétique de tout être vivant est stockée dans des macromolécules, polymères de nucléotides. Les nucléotides sont chacun formés d'un pentose, d'une base azotée et d'un ou plusieurs groupements phosphate (figure 1). Les nucléotides se distinguent entre eux par la nature du pentose, de la base et par le nombre de groupements phosphate.

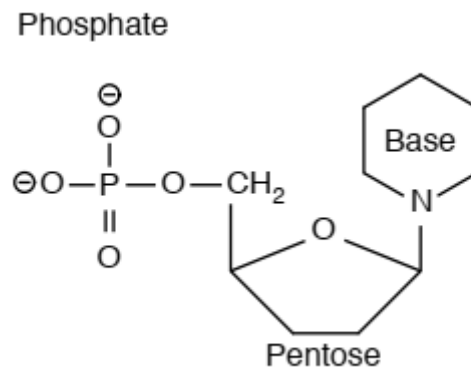


Figure 1. Schéma général d'un nucléotide

#### 1.1.1. Pentose

Le pentose présent dans les nucléotides peut être un ribose (dans l'ARN) ou un désoxyribose (dans l'ADN), tous deux des aldopentoses, c'est-à-dire des sucres à cinq carbones portant une fonction aldéhyde. La différence entre les deux se situe au niveau du carbone 2' portant dans le désoxyribose un hydrogène, alors qu'il porte une fonction -OH dans le ribose (figure 2). En fait, le désoxyribose dérive du ribose, par réduction de cette fonction -OH du carbone 2'.



Figure 2. Différence entre ribose et désoxyribose

### 1.1.2. Base azotée

Chaque nucléotide contient également une base azotée, qui peut être de deux types : une pyrimidine ou une purine. Toutes deux sont des molécules azotées hétérocycliques (figure 3). Les pyrimidines sont constituées d'un seul cycle à six atomes, quatre atomes de carbone et deux atomes d'azote. Les purines sont constituées de deux cycles accolés : un cycle pyrimidique et un cycle imidazole (cycle à cinq atomes, trois atomes de carbone et deux atomes d'azote).



Figure 3. Différences entre pyrimidine et purine et numérotation des atomes

Dans les nucléotides, il existe trois pyrimidines différentes : la cytosine, la thymine et l'uracile et deux purines différentes : l'adénine et la guanine.

Ces bases azotées représentent l'encodage du matériel génétique : c'est l'enchaînement particulier de ces bases qui constitue l'information génétique. Dans l'ADN, le codage est réalisé à l'aide de quatre bases parmi les cinq citées ci-dessus : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. Dans l'ARN, le codage est aussi réalisé par quatre bases, mais cette fois la thymine est remplacée par l'uracile.

### 1.1.3. Nucléosides

Un pentose et une base azotée peuvent se lier pour former un nucléoside. La liaison ainsi formée est appelée « liaison N-glycosidique », car elle se forme entre le carbone 1' du pentose et un atome d'azote (N) de la base.

En fonction de la nature du pentose, on parlera de ribonucléoside (si le pentose est un ribose) ou de désoxynucléoside (si le pentose est un désoxyribose). Afin de bien différencier les bases azotées et les nucléosides, il existe une nomenclature particulière (tableau 1). Pour les pyrimidines, le suffixe –idine est ajouté tandis que pour les purines c'est le suffixe –osine.

Tableau 1. Nomenclature des nucléosides

|                    | <b>Base</b> | <b>Nucléoside</b> | <b>Abréviation</b> |
|--------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| <b>Pyrimidines</b> | Cytosine    | Cytidine          | C                  |
|                    | Thymine     | Thymidine         | T                  |
|                    | Uracile     | Uridine           | U                  |
| <b>Purines</b>     | Adénine     | Adénosine         | A                  |
|                    | Guanine     | Guanosine         | G                  |

### 1.1.4. Nucléotides

Le carbone 5' du pentose peut se lier à un groupement phosphate par une liaison ester. L'ensemble d'un nucléoside (pentose + base azotée) et d'un groupement phosphate est alors appelé nucléotide monophosphate (figure 4). Un deuxième groupement phosphate peut se lier au premier par une liaison anhydride d'acide, on parlera alors de nucléotide diphosphate. De la même façon, un troisième groupement phosphate peut se lier sur le deuxième pour former un nucléotide triphosphate (figure 4). C'est sous cette forme que les nucléosides sont utilisés dans la synthèse des acides nucléiques.

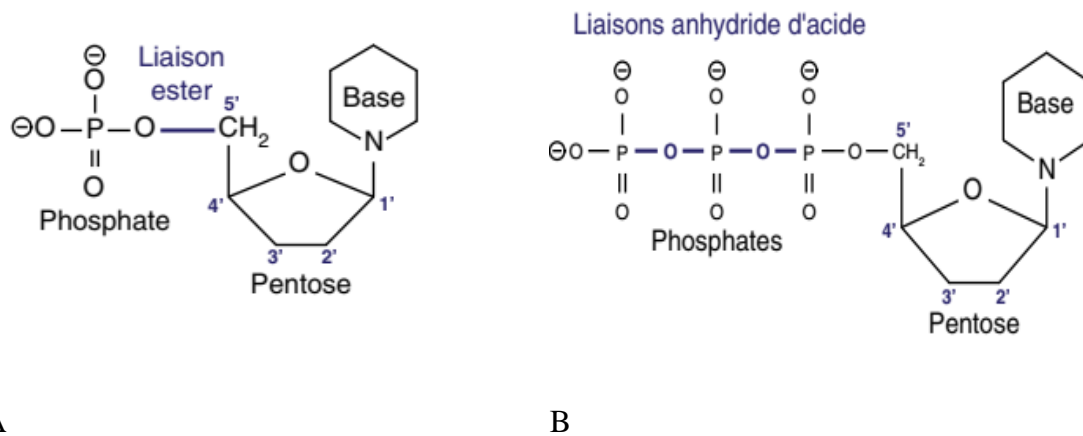


Figure 4. Schéma général d'un nucléotide monophosphate et liaison ester (A) et d'un nucléotide triphosphate et liaisons anhydride d'acide (B)

Le nom de chaque nucléotide commence par celui du nucléoside correspondant (en fonction de la base azotée), suivi du nombre de groupements phosphate (mono-, di- ou tri-phosphate). L'abréviation des nucléotides suit les mêmes règles : la première lettre correspond à l'abréviation du nucléoside, la deuxième lettre correspond au nombre de groupements phosphate (« M » pour mono-, « D » pour di- et « T » pour tri-) et la troisième lettre est un « P » (pour « phosphate »). Par exemple, le ribonucléotide portant une adénine et trois groupements phosphate est appelé « adénosine triphosphate », abrégé « ATP ».

## 1.2. Les acides nucléiques

**Polynucléotides :** Les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides, avec deux types principaux : l'ADN (acide désoxyribonucléique), constitué de désoxyribonucléotides, et l'ARN (acide ribonucléique), formé de ribonucléotides. L'ADN stocke l'information génétique, qui est transcrite en ARN messager, puis traduite en protéines grâce à l'intervention d'ARN de transfert et ribosomiques.

Ces polymères se forment par polymérisation de nucléotides triphosphate, via une réaction entre le groupement hydroxyle ( $-OH$ ) du carbone 3' d'un nucléotide et le premier groupement phosphate d'un autre nucléotide (figure 5). Cette réaction libère un pyrophosphate inorganique et crée une liaison phosphodiester entre les nucléotides.

Les acides nucléiques ont une orientation spécifique : l'extrémité 5' porte un groupement phosphate libre, et l'extrémité 3' porte un groupement hydroxyle libre. Par convention, leur séquence est toujours lue et écrite dans le sens 5'  $\rightarrow$  3'.

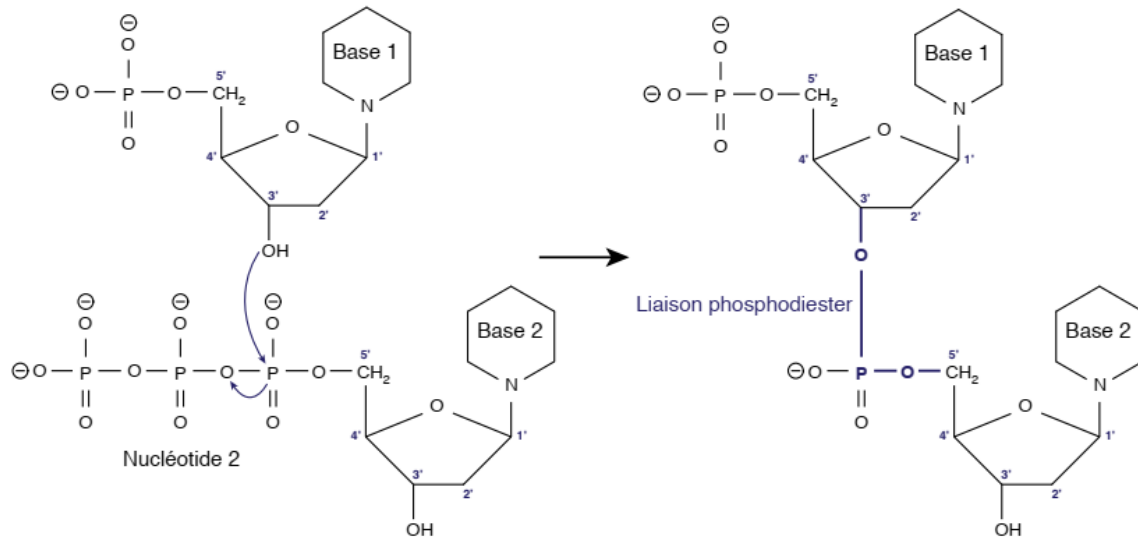


Figure 5. Polymérisation de deux nucléotides et liaison phosphodiester

**Appariements entre bases azotées :** Les bases azotées des acides nucléiques peuvent s'apparier grâce à des liaisons hydrogène, permettant la formation de structures tridimensionnelles. Ces appariements se font entre une pyrimidine et une purine selon les règles de complémentarité : l'adénine s'associe avec la thymine (dans l'ADN) ou l'uracile (dans l'ARN) via deux liaisons hydrogène, tandis que la guanine s'associe avec la cytosine via trois liaisons hydrogène. Ces appariements, dits « canoniques » ou de Watson/Crick, forment des paires de bases.

### 1.2.1. ADN (acide désoxyribonucléique)

L'ADN est un polymère de désoxyribonucléotides dont l'enchaînement constitue sa structure primaire. Il est généralement bicaténaire, formé de deux brins d'acides nucléiques antiparallèles, complémentaires et organisés en hélice, ce qui correspond à sa structure secondaire. Les brins antiparallèles sont orientés en sens opposés : l'un dans le sens 5' → 3' et l'autre dans le sens 3' → 5'. Leur complémentarité repose sur les règles d'appariement des bases : l'adénine s'associe à la thymine, et la guanine à la cytosine, par des liaisons hydrogène. Cette complémentarité assure la stabilité et la cohésion de la double hélice.

La double hélice de l'ADN adopte une structure tridimensionnelle caractérisée par deux sillons de taille inégale : un grand et un petit. Ces sillons permettent l'interaction avec des protéines spécifiques via des liaisons hydrogène et ioniques. Par exemple, les facteurs de transcription se lient généralement dans le grand sillon, où les bases azotées sont plus

accessibles, tandis que les histones interagissent avec le petit sillon. Ces interactions jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes et la structuration de l'ADN.

La forme la plus courante de la double hélice est l'ADN-B, une hélice orientée à droite avec un diamètre de 2 nm et une longueur de tour de 3,4 nm (10 paires de bases). Dans cette configuration, les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice. En conditions de déshydratation, l'ADN peut adopter la forme A, également orientée à droite, mais plus large (2,3 nm de diamètre) et plus compacte, avec des paires de bases inclinées par rapport à l'axe.

Une autre forme, l'ADN-Z, se distingue par une hélice orientée à gauche, plus étroite (1,8 nm de diamètre) et plus allongée (4,5 nm par tour). Cette configuration est observée dans des régions riches en appariements cytosine-guanine et est associée à des conditions particulières de séquence ou de tension dans la molécule.

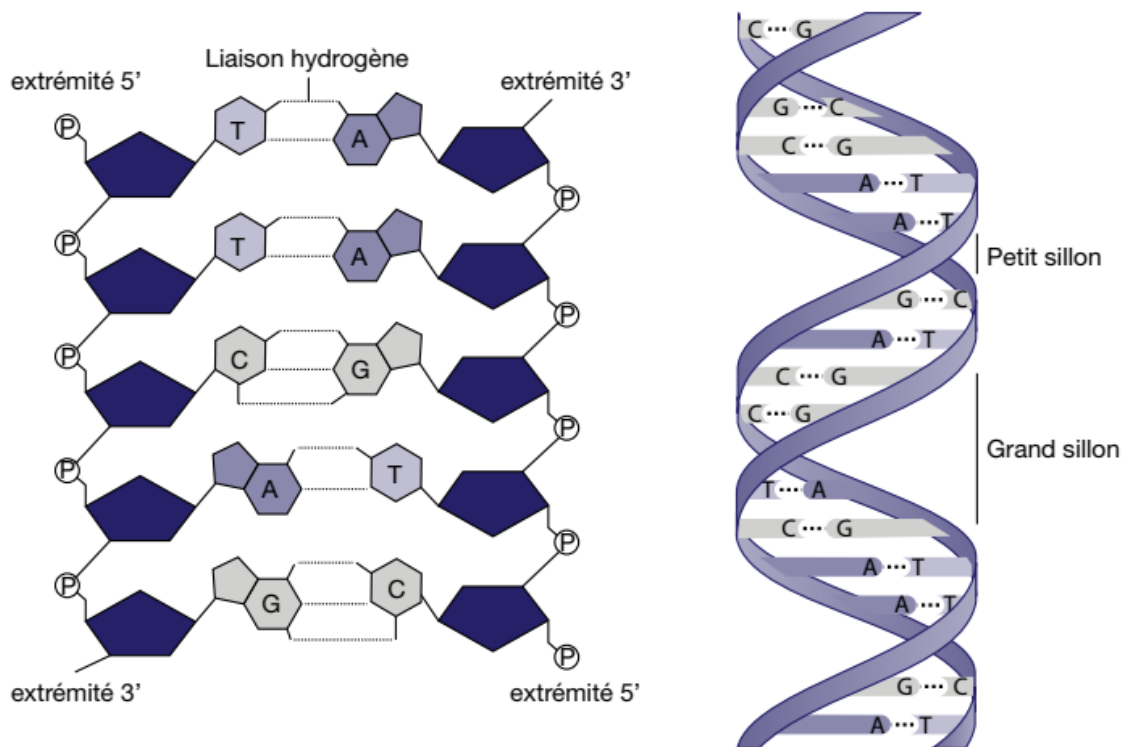


Figure 6. Structures primaire et secondaire de l'ADN

### 1.2.2. ARN (acide ribonucléique)

L'ARN est un polymère constitué de ribonucléotides. Contrairement à l'ADN bicaténaire, la molécule d'ARN est généralement monocaténaire, c'est-à-dire constituée d'une seule chaîne nucléotidique. Cette chaîne peut toutefois être repliée sur elle-même sur de courtes distances, en raison de l'établissement de liaisons hydrogène entre bases complémentaires.

Les ARN sont issus de la transcription de gènes spécifiques se trouvant dans l'ADN. Ils constituent une copie parfaite de la séquence en bases azotées des gènes, dans laquelle les thymine sont remplacées par des uraciles. La séquence des bases le long des molécules d'ARN est spécifique et va notamment permettre la synthèse de protéines.

Différentes molécules sont constituées d'ARN, qu'on peut classer en deux grandes catégories:

- **ARN codants** : ce sont les ARN messagers (ARNm), qui seront traduits en protéines par les ribosomes.

- **ARN non-codants** : ce sont tous les autres ARN, autrement dit les ARN qui ne seront pas traduits en protéines. Parmi leur énorme diversité, on citera par exemple :

- ARN ribosomiques (ARNr) : ARN qui s'associent avec les protéines ribosomiques pour former les ribosomes (rôle structural). Ils y ont également un rôle catalytique notamment dans la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés.

- ARN de transfert (ARNt) : adaptateurs moléculaires jouant un rôle essentiel dans la traduction des ARNm en protéines, en association avec les ribosomes.

- Petits ARN nucléaires (ARNsn) : uniquement chez les eucaryotes, les ARNsn permettent l'épissage des pré-ARNm dans le noyau, en association avec des protéines.

- Petits ARN nucléolaires (ARNsno) : uniquement chez les eucaryotes, les ARNsno présents dans le nucléole participent à la maturation des ARNr.

- Des ARN intervenant dans la régulation de l'expression génique à différents niveaux, comme les ARNs (qui régulent la traduction et la stabilité des ARNm chez les eubactéries), les ARNinc (qui régulent la transcription chez les eucaryotes) et les miARN (qui régulent la transcription, la stabilité des ARNm et la traduction chez les eucaryotes).

- La sous-unité ARN de la télomérase.

## 2. Réplication de l'ADN : mécanismes et enzymes impliquées

L'ADN peut se répliquer, grâce à une ADN polymérase et grâce à l'ouverture du double brin. Chaque brin de la molécule « mère » sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin. La synthèse se fait dans le sens 5' vers 3' et face à chaque nucléotide, la polymérase accroche au brin en cours de synthèse le nucléotide complémentaire suivant la règle A s'associe à T (et réciproquement) et G s'associe à C (et réciproquement).

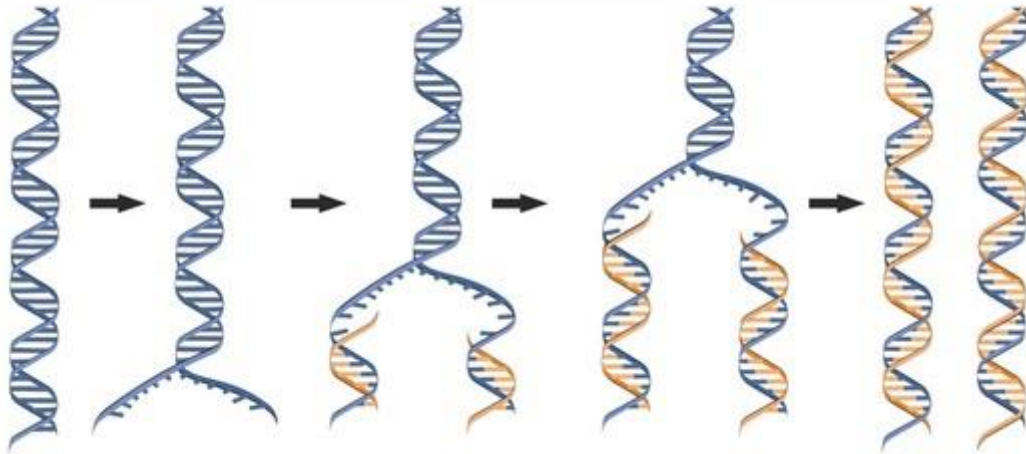


Figure 7. Réplication d'ADN semi-conservative

Comme l'illustre la figure 7, à l'issue de la réplication, à partir d'une molécule d'ADN double brin, on se retrouve avec deux molécules d'ADN filles double brin, chacune identique à la molécule mère de départ. Chacune des deux nouvelles molécules obtenues est formée d'un brin de la molécule d'origine et d'un nouveau brin synthétisé à partir des nucléotides incorporés. On dit que la réplication de l'ADN est semi-conservative.

Au niveau cellulaire, ce phénomène de réplication de l'ADN est couplé à la division cellulaire, à l'issue de laquelle on va obtenir deux cellules filles qui auront le même patrimoine génétique que celui de la cellule mère dont elles sont issues.

### 2.1. Chromatine et ADN

Au cours des phases du cycle cellulaires les chromosomes évoluent pour préparer les mitoses.

- Pendant la phase G1 la chromatine est décompactée et les gènes peuvent s'exprimer. Chaque chromosome ne contient qu'une chromatide.
- Pendant la phase S, les bulles de réplication s'ouvrent et la réplication commence.

- Pendant la phase G2 les deux chromatides issus de la réplication sont liés par leurs centromères : il y a deux chromatides par chromosome.
- Pendant la mitose le centromère se lie au fuseau achromatique et prépare la séparation. La chromatine est compactée au maximum.
- Après la mitose, la chromatine est décompactée et les gènes peuvent s'exprimer dans chacune des deux cellules filles.

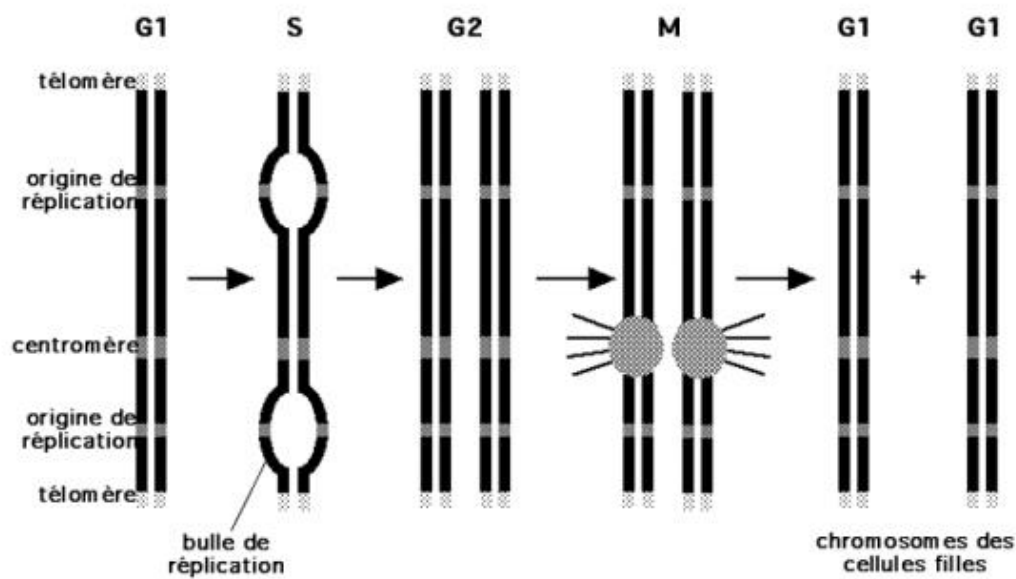


Figure 8. Cycle cellulaire et réplication de l'ADN : de la phase G1 à la formation des cellules filles

## 2.2. Étapes de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN commence en un ou plusieurs site(s) appelé (s) origine(s) de réplication (ORI) puis s'étend sous la forme de bulle (s) de réplication. Chaque bulle comporte deux fourches de réplication qui s'éloignent l'une de l'autre. Il y a ainsi deux systèmes de réplication qui évoluent en sens opposés. La réplication est dite bidirectionnelle.

Il existe une seule origine de réplication chez les procaryotes, tandis qu'il en existe plusieurs chez les eucaryotes (figure 9).

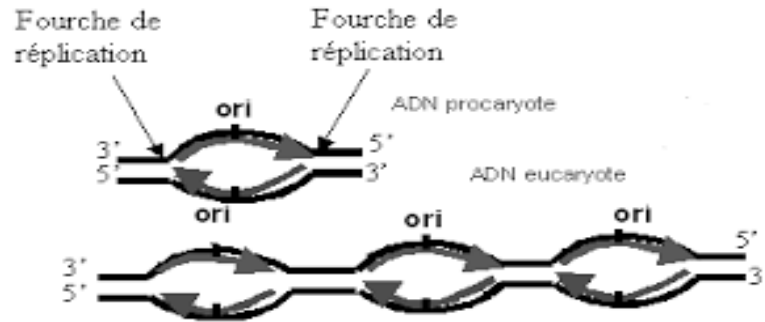


Figure 9. L'origine de la réplication chez les eucaryotes et procaryotes

### 2.2.1. Initiation

- La réplication commence à des points spécifiques appelés origines de réplication.
- L'enzyme hélicase dénoue l'ADN en brisant les liaisons hydrogène entre les bases azotées des deux brins, formant une fourche de réplication.
- Protéines de liaison à l'ADN simple brin (SSB : Single-Strand-binding protein) stabilisent les brins séparés pour éviter qu'ils ne se referment.
- L'ARN primase synthétise un petit fragment d'ARN, appelé primer, sur le brin matrice. Ce primer est nécessaire car l'ADN polymérase ne peut ajouter des nucléotides que sur un brin déjà existant.

### 2.2.2. Élongation

L'ADN polymérase ajoute des nucléotides complémentaires aux brins d'ADN matrice en suivant les règles de complémentarité des bases (A-T, G-C). Sur le brin directeur ( $5' \rightarrow 3'$ ), la synthèse est continue. Sur le brin retardé ( $3' \rightarrow 5'$ ), la synthèse est discontinue et se fait par la formation de fragments d'Okazaki, qui sont ensuite reliés entre eux par l'enzyme ADN ligase.

### 2.2.3. Terminaison

La réplication se termine lorsque les deux fourches de réplication se rencontrent. Les primers d'ARN sont ensuite retirés et remplacés par de l'ADN. L'ADN ligase relie les fragments d'Okazaki et complète la réplication.

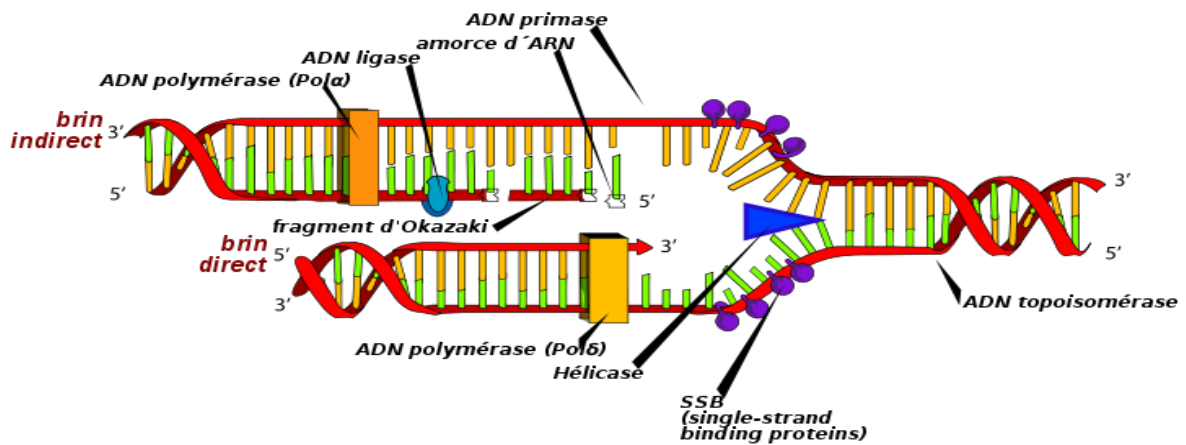


Figure 10. Les étapes de la réplication

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes et les procaryotes suit des principes de base similaires, mais il existe plusieurs différences notables en raison de leurs structures cellulaires distinctes. Voici les principales différences entre la réplication de l'ADN chez les eucaryotes et les procaryotes

Tableau 2. Principales différences entre la réplication chez les eucaryotes et les procaryotes

| Caractéristique         | Eucaryotes   | Procaryotes  |
|-------------------------|--|--|
| Localisation            | Noyau cellulaire   | Cytoplasme (nucléïde)                              |
| Origines de réplication | Multiples origines sur des chromosomes linéaires                           | Une seule origine sur un chromosome circulaire     |
| Enzymes                 | Complexes et multiples, incluant ADN polymérase $\alpha, \delta, \epsilon$ | Moins complexes, ADN polymérase III principalement |
| Structure de l'ADN      | Linéaire et associé à des histones   | Circulaire et non associé à des histones           |
| Réplication du télomère | Nécessite la télomérase  | Pas de télomères                                   |
| Vitesse de réplication  | Plus lente   | Plus rapide  |

### **3. La transcription**

La transcription est le processus par lequel une molécule d'ARN est synthétisée à partir d'une matrice d'ADN. Elle se déroule en trois étapes principales :

#### **3.1. Initiation**

Reconnaissance du promoteur : L'ARN polymérase se fixe sur une région spécifique de l'ADN appelée promoteur, située en amont du gène à transcrire. Chez les procaryotes, le promoteur contient des séquences consensus comme les boîtes -10 (TATAAT) et -35. Chez les eucaryotes, le promoteur inclut la boîte TATA (près de -25).

Ouverture de la double hélice : L'ARN polymérase sépare les deux brins d'ADN, formant une bulle de transcription. Le brin matrice (brin antisens) est utilisé pour la synthèse d'ARN.

Formation du complexe d'initiation : L'ARN polymérase commence à assembler les premiers nucléotides d'ARN complémentaires à la séquence de l'ADN matrice.

#### **3.2. Élongation**

Synthèse de l'ARN : L'ARN polymérase ajoute des ribonucléotides (A, U, C, G) au brin naissant d'ARN dans le sens  $5' \rightarrow 3'$ . Ces ribonucléotides sont complémentaires au brin matrice d'ADN (par exemple, A sur l'ADN est apparié à U dans l'ARN).

Progression de l'ARN polymérase : Elle se déplace le long de l'ADN, déroulant la double hélice en avant et réenroulant l'ADN derrière elle.

Bulle de transcription : Une région d'environ 10-20 paires de bases reste ouverte pour permettre l'ajout de nucléotides.

#### **3.3. Terminaison**

Signal de terminaison : Lorsque l'ARN polymérase atteint une séquence de terminaison sur l'ADN, la transcription s'arrête.

Chez les procaryotes, il existe deux mécanismes :

- Dépendant de la protéine Rho : Une protéine Rho se lie à l'ARN et provoque la dissociation du complexe.

- Indépendant de Rho : Une structure en épingle à cheveux suivie de riches en U dans l'ARN provoque la libération.

Chez les eucaryotes, une séquence signal de polyadénylation (AAUAAA) marque la fin de la transcription.

Libération de l'ARN : L'ARN polymérase se détache, et la molécule d'ARN synthétisée est libérée.

Résultat : Chez les procaryotes, l'ARN transcrit (ARNm) est directement prêt pour la traduction. Par contre, chez les eucaryotes, l'ARN pré-messager (pré-ARNm) subit des modifications post-transcriptionnelles (ajout de la coiffe 5', polyadénylation en 3', et épissage pour retirer les introns) avant d'être traduit en protéines.

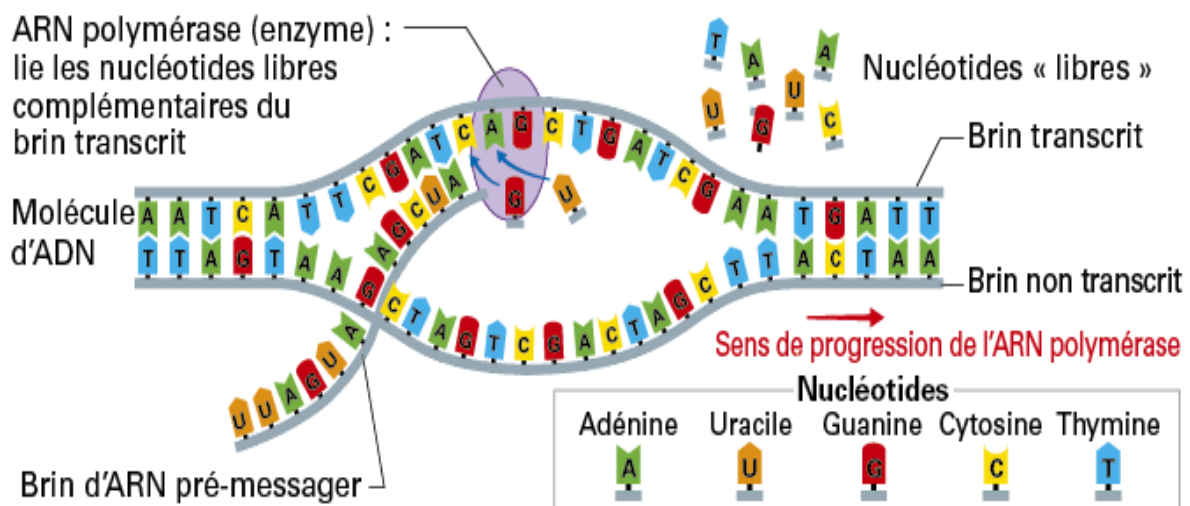


Figure 11. La transcription de l'ADN

#### 4. Traduction et synthèse des protéines

L'ARN messager (ARNm) mature quitte le noyau pour se rendre dans le cytoplasme où il va être traduit en protéine. La traduction correspond au décodage de l'information portée par l'ARNm (séquence de nucléotides) en protéine (séquence d'acides aminés). Les acides aminés vont se succéder dans l'ordre imposé par les nucléotides dans l'ARNm pour donner naissance à la protéine. Le passage du gène à la protéine fait intervenir un système de correspondance que l'on appelle code génétique. La traduction se fait en 3 étapes :

#### 4.1. Initiation

À partir de l'extrémité 5' de l'ARNm, le ribosome se déplace jusqu'à ce qu'il rencontre le codon initiateur AUG qui code pour la méthionine et s'y fixe.

#### 4.2. Élongation

Le ribosome parcourt le brin d'ARNm et ajoute un à un les acides aminés apportés par les ARN de transfert (ARNt).

L'ARNt joue le rôle d'adaptateur entre la séquence nucléique et l'acide aminé correspondant. En effet, chacun des 20 acides aminés est porté par un ARNt différent. Chaque ARNt reconnaît le groupe de 3 nucléotides (codon) spécifique de l'acide aminé qu'il transporte.

#### 4.3. Terminaison

La synthèse de la protéine s'arrête lorsque le ribosome atteint un codon STOP (UAG ou UAA ou UGA).

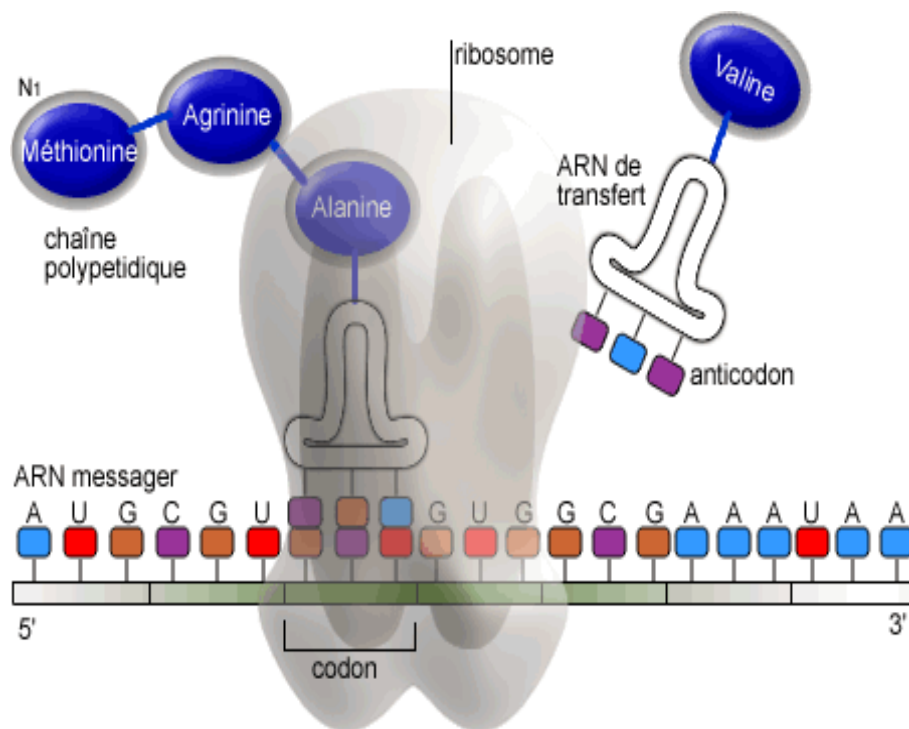
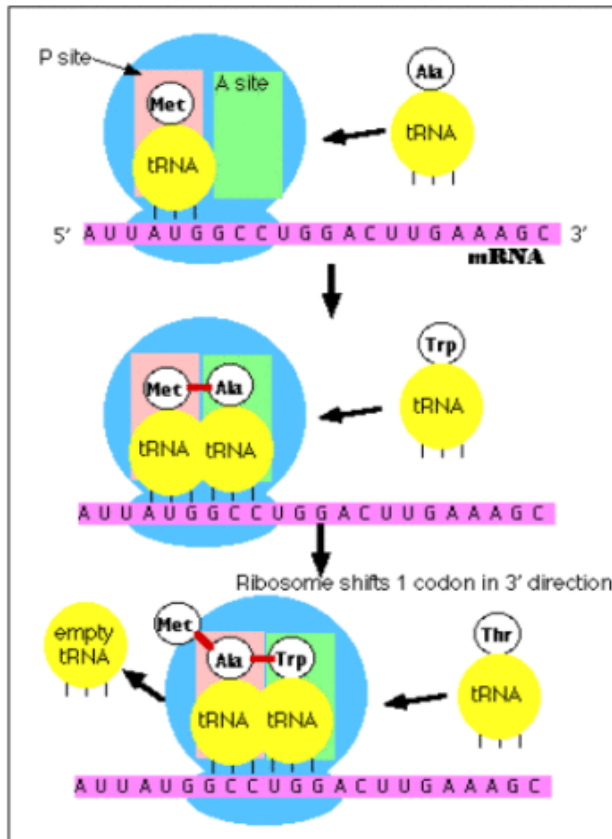


Figure 12. Principe générale de la traduction



Processus simplifié de la traduction: le ribosome possède deux sites : le site P qui initie la liaison peptidique et le site A qui accepte le nouvel ARNt chargé de son AA. Les ARNt sont acceptés en respectant la règle de complémentarité des bases (paires AU et GC) . Le peptide se termine lorsque le ribosome rencontre un codon stop car il n'existe pas d'ARNt qui puisse adapter d'AA à ce type de codon.

Figure 13 . Détail schématique des sites du ribosome (site P pour peptidyl en rose et site A pour aminoacyl en vert).

Code de l'ARNm UUU veut dire que l'acide aminé Phe sera amené au ribosome.

|   | U  | C  | A  | G  |
|---|--|--|--|--|
| U | UUU Phe<br>UUC Phe<br>UUA Leu<br>UUG Leu | UCU Ser<br>UCC Ser<br>UCA Ser<br>UCG Ser | UAU Tyr<br>UAC Tyr<br>UAA End<br>UAG End | UGU Cys<br>UGC Cys<br>UGA End<br>UGG Trp |
| C | CUU Leu<br>CUC Leu<br>CUA Leu<br>CUG Leu | CCU Pro<br>CCC Pro<br>CCA Pro<br>CCG Pro | CAU His<br>CAC His<br>CAA Gln<br>CAG Gln | CGU Arg<br>CGC Arg<br>CGA Arg<br>CGG Arg |
| A | AUU Ile<br>AUC Ile<br>AUA Ile<br>AUG Met | ACU Thr<br>ACC Thr<br>ACA Thr<br>ACG Thr | AAU Asn<br>AAC Asn<br>AAA Lys<br>AAG Lys | AGU Ser<br>AGC Ser<br>AGA Arg<br>AGG Arg |
| G | GUU Val<br>GUC Val<br>GUA Val<br>GUG Val | GCU Ala<br>GCC Ala<br>GCA Ala<br>GCG Ala | GAU Asp<br>GAC Asp<br>GAA Glu<br>GAG Glu | GGU Gly<br>GGC Gly<br>GGA Gly<br>GGG Gly |

**Genetic Code**

Figure 14. Correspondance entre le codon de l'ARNm et l'acide aminé apporté par l'ARNt

## 5. Régulation de l'expression des gènes

La régulation de l'expression des gènes permet aux cellules de contrôler quels gènes sont exprimés, à quel moment et en quelle quantité. Elle est essentielle pour assurer le bon fonctionnement des cellules, l'adaptation aux changements environnementaux, et le développement des organismes.

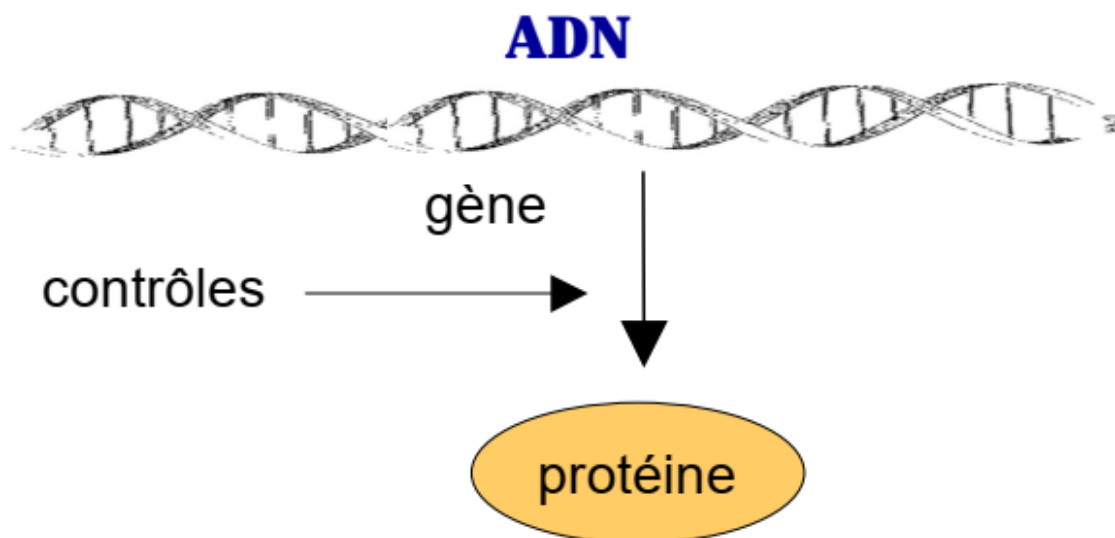


Figure 15. La régulation de l'expression des gènes

Deux modes de régulation de l'expression d'un gène ciblent par une molécule régulatrice :

- D'une façon positive : l'interaction déclenche la transcription du gène
- D'une façon négative : l'interaction empêche la transcription du gène

Le promoteur d'un gène est un segment d'ADN qui contrôle l'expression du gène. Le promoteur se lie à une enzyme, l'ARN polymérase, qui lit la séquence d'ADN et génère la molécule d'ARN correspondante. Le promoteur définit si un gène doit être transcrit et à quel taux. Certains promoteurs sont constamment actifs alors que d'autres ne sont actifs que dans certaines cellules et selon les besoins.

Cette régulation peut s'effectuer à différents niveaux :

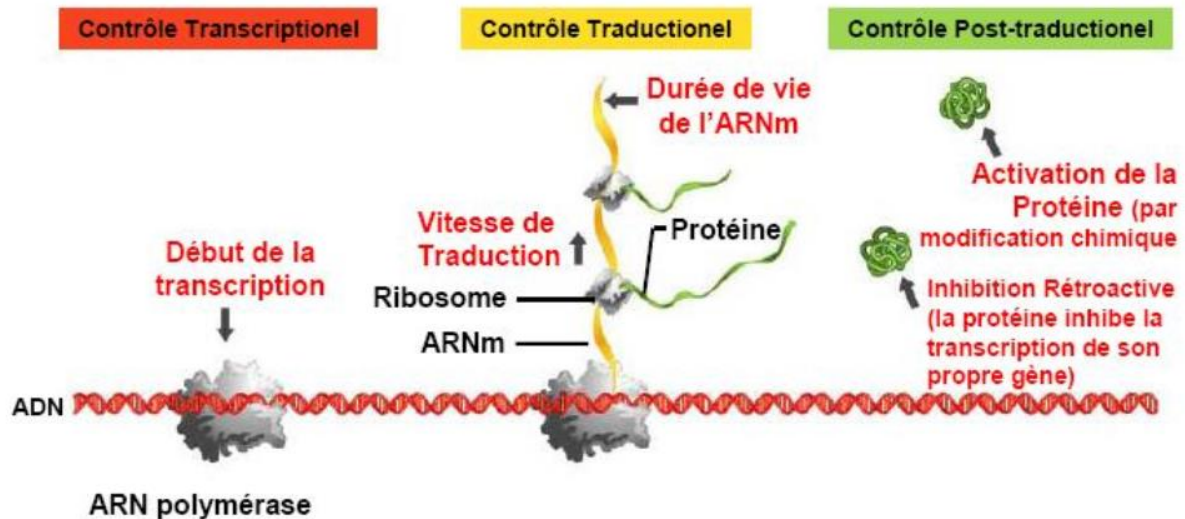


Figure 16. Niveau de régulation de l'expression des gènes

## 5.1. Régulation au niveau transcriptionnel

C'est l'étape principale de contrôle de l'expression des gènes, qui agit avant même que l'ARN messager (ARNm) ne soit produit.

### 5.1.1. Chez les procaryotes

Les opérons sont des ensembles de gènes sous le contrôle d'un même promoteur. Ils permettent une régulation coordonnée. Par exemple :

Opéron lactose (lac) : Activé en présence de lactose et absence de glucose.

Opéron tryptophane (trp) : Réprimé en présence de tryptophane.

Des protéines régulatrices comme les activateurs (stimulent la transcription) ou les répresseurs (inhibent la transcription) se lient à l'ADN.

### 5.1.2. Chez les eucaryotes

La régulation est plus complexe et implique :

Facteurs de transcription : Se lient aux promoteurs ou amplificateurs pour stimuler ou réprimer l'ARN polymérase.

Modifications de la chromatine :

Acétylation des histones : Favorise l'ouverture de la chromatine pour activer la transcription.

Méthylation de l'ADN : Réprime l'expression des gènes en rendant l'ADN inaccessible.

## **5.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel**

Elle agit sur l'ARNm après sa synthèse pour moduler son utilisation ou sa stabilité

Chez les eucaryotes :

Épissage alternatif : Permet de produire différentes protéines à partir d'un même gène.

Modification de l'ARNm :

Ajout d'une coiffe 5' et d'une queue poly-A pour protéger l'ARNm.

Contrôle de la stabilité de l'ARNm par des séquences spécifiques (ex. régions 3' non traduites).

Interférence par l'ARN (ARNi) : Les microARN (miARN) ou petits ARN interférents (siARN) inhibent la traduction ou dégradent l'ARNm cible.

## **5.3. Régulation au niveau traductionnel**

Cette régulation contrôle directement l'utilisation de l'ARNm pour produire des protéines.

Mécanismes :

Blocage de la traduction par des protéines qui se lient à l'ARNm.

Contrôle de la disponibilité des ribosomes.

Action des miARN qui empêchent l'assemblage du ribosome sur l'ARNm.

## **5.4. Régulation au niveau post-traductionnel**

Une fois la protéine synthétisée, sa fonction peut être régulée par des modifications chimiques ou son ciblage vers des compartiments spécifiques.

Modifications post-traductionnelles :

Phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, etc., qui modulent l'activité ou la stabilité des protéines.

Dégradation des protéines :

Les protéines inutiles ou endommagées sont ciblées par l'ubiquitine et dégradées dans le protéasome.

### **5.5. Régulation en réponse à l'environnement**

Les cellules adaptent leur expression génique en fonction des signaux environnementaux (nutriments, hormones, température, stress, etc.).

Par exemple :

Chez les procaryotes : La disponibilité du lactose active l'opéron lac.

Chez les eucaryotes : Les hormones stéroïdes se lient à des récepteurs nucléaires qui activent ou répriment des gènes spécifiques.

## CHAPITRE 2. GENETIQUE DU DEVELOPPEMENT ET LE POLYMORPHISME

### GENETIQUE

#### 1. Génétique de développement

La génétique du développement étudie comment les gènes régulent les processus biologiques responsables de la formation et de la structure des organismes au cours de leur développement. Cela inclut :

- Les gènes de régulation (comme les gènes homéotiques) qui contrôlent l'expression de nombreux autres gènes impliqués dans le développement.
- Les réseaux génétiques qui coordonnent la temporalité et l'espace des processus développementaux.

#### 2. Polymorphisme génétique : source de diversité dans les gènes

Le polymorphisme génétique désigne la variation des séquences d'ADN au sein d'une population ou entre populations. Ces variations peuvent affecter :

- Les gènes structuraux, influençant directement la composition des protéines.
- Les régions régulatrices, modifiant l'expression des gènes (quand, où, et combien de temps un gène est exprimé).
- Les gènes de développement, qui contrôlent les étapes critiques de la morphogénèse.

Le polymorphisme génétique constitue la matière première de la diversité génétique, tandis que la génétique du développement en est l'architecte. Ensemble, ils permettent de comprendre comment les variations génétiques contribuent à la diversité des formes et des fonctions biologiques, et jouent un rôle crucial dans l'évolution des espèces.

#### 3. la diversité génétique

La diversité génétique se réfère à la variation **des gènes** au sein des espèces, c'est-à-dire la variation héritable dans et entre les populations d'organismes. Au final, toute variation réside dans :

→ **Variation de séquence d'ADN** : la séquence des quatre paires de bases qui composent la molécule d'ADN, et comme tels constituent le code génétique

→ **Variation au niveau de la quantité d'ADN par cellule, ou le nombre et la structure des chromosomes** : D'autres types de diversité génétique peuvent être également identifiés à tous les niveaux d'organisation dans le noyau, y compris la quantité d'ADN par cellule, le nombre de chromosomes et la structure de l'ADN.

La diversité génétique est la résultante de la sélection, la mutation, la migration, la dérive génétique et/ou la recombinaison.

Les conséquences de ces phénomènes sont des changements dans les fréquences de gènes et d'allèles qui jouent sur l'évolution des populations. Des situations semblables peuvent se produire par sélection artificielle comme l'amélioration des plantes.

Les ressources génétiques végétales comprennent la variation génétique actuelle potentiellement utile pour l'avenir de l'humanité. Ces ressources incluent :

- Des espèces sauvages apparentées aux espèces cultivées
- Des espèces sauvages non apparentées
- Des variétés traditionnelles et/ou des variétés de pays
- Des variétés commerciales, hybrides ou lignées sélectionnées

De ce fait, il faut conserver les ressources génétiques végétales pour pouvoir éventuellement les utiliser.

#### **4. Mesure de la variation génétique**

La conservation et l'utilisation efficaces des ressources génétiques végétales requièrent une évaluation précise de la variation génétique qu'elles comportent. La variation génétique peut être mesurée à deux niveaux:

**4.1. Au niveau du phénotype** : la combinaison de caractères individuels résultant d'un génotype et son interaction avec l'environnement, L'évaluation de la variation phénotypique se concentre sur les caractères morphologiques, ces caractéristiques qui définissent la forme et l'apparence d'un ensemble d'individus. Certains de ces caractères peuvent être considérés comme "génétiques" si leur présence dans des individus apparentés est héritable et ne dépend pas de l'environnement, indiquant qu'ils sont associés à une séquence particulière d'ADN.

**4.2. Au niveau du génotype :** la composition génétique particulière d'un organisme, L'évaluation de la variation génotypique se fait au niveau de la molécule d'ADN responsable de la transmission de l'information génétique.

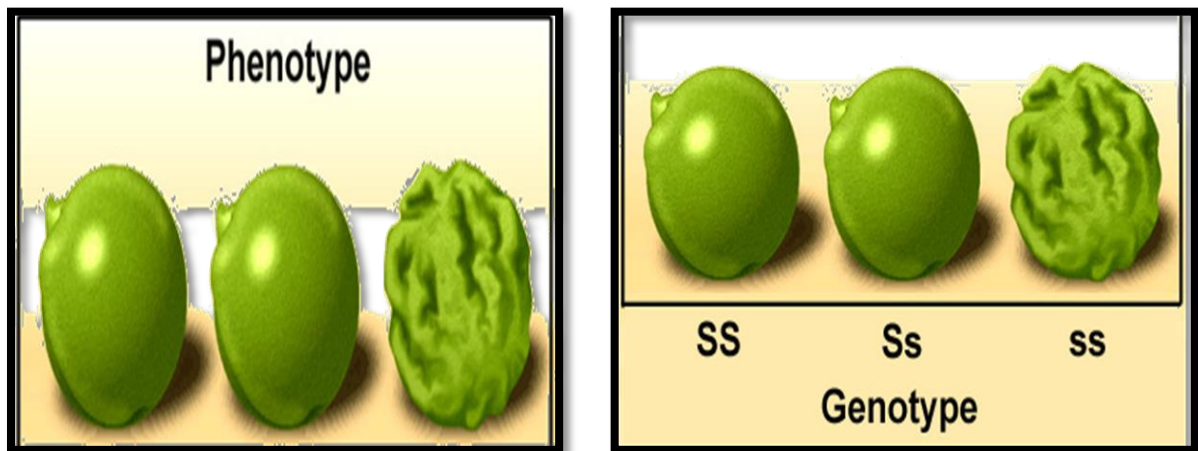


Figure 17. Mesure de la diversité génétique au niveau du phénotype et du génotype

## 5. Les marqueurs génétiques

Marqueur génétique: Un allèle, une bande dans un gel (isozyme ou protéines) ou un caractère qui sert expérimentalement de preuve pour identifier un individu ou l'une de ses caractéristiques.

Le marqueur génétique est une séquence polymorphe d'ADN aisément détectable, utilisée en cartographie génétique pour « baliser » le génome.

Un marqueur génétique (genetic marker) c'est une région polymorphe d'une molécule d'ADN. Les séquences de cette région pourront être différentes entre plusieurs individus.

Un marqueur génétique est un caractère mesurable qui peut détecter une variation dans la séquence soit protéique, soit nucléique.

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible :

- d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification,
- de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique.

## 5.1. Types de marqueurs

Les marqueurs génétiques renseignent sur le génotype d'un individu et ne sont pas modifiés par l'environnement. Ils peuvent être utilisés tout au long d'une expérimentation et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (l'information génétique de la plante est contenue en totalité dans toutes les cellules).

Les principaux types de marqueurs génétiques utilisés sont

- Marqueurs morphologiques
- Marqueurs protéiques (biochimiques)
- Marqueurs ADN (moléculaires)

### 5.1.1. Marqueurs morphologiques

Traditionnellement, la diversité dans et entre les populations était déterminée en évaluant des différences morphologiques.

#### Les avantages:

- Disponibles immédiatement
- Nécessitent seulement un équipement simple
- Constituent la mesure la plus directe du phénotype

#### Inconvénients

- Peu polymorphes et en général dominants, peuvent varier selon les stades de développement et leur nombre limité
- Nécessitent une expertise sur la plante cultivée ou l'espèce
- Soumis à l'influence de l'environnement

### 5.1.2. Marqueurs protéiques (biochimiques)

Ce sont des protéines ou isozymes qui correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Dans ce sens, ce sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome. Les marqueurs protéiques (protéines et isozymes) sont générés par électrophorèse en utilisant l'avantage des propriétés de migration des protéines

et enzymes, et révélés par la coloration histochimique spécifique des enzymes qui sont analysées. Ces marqueurs Détectent des polymorphismes entre individus.

Avantage:

- Nécessitent un équipement relativement simple
- Complément robuste de l'évaluation morphologique de la variation

Inconvénients:

- Soumis à l'influence de l'environnement
- En nombre limité
- malheureusement sont ambigus, puisqu'ils désignent dans d'autres contextes des molécules dont la présence indique un stade de différenciation ou un état physiologique.

### **5.1.3. Les marqueurs ADN (moléculaires)**

Les marqueurs moléculaires d'ADN : Ce sont les plus étudiés. Ces marqueurs sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites.

Avantages:

- non soumis à l'influence de l'environnement
- Potentiellement en nombre illimité
- Mesure objective de la variation
- Des tests peuvent être réalisés tout au long du développement de la plante

Inconvénients: ;

- Inconvénient majeur nécessitent un équipement technique plus complexe

### **5.2. Marqueurs génétiques: propriétés recherchées**

•Polymorphe, c'est à dire variable entre individus. Le degré de polymorphisme détecté dépend de la technologie utilisée pour le mesurer ;

• non épistatique : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et la non-épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interactions intra et interlocus ;

• Codominant: l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes ; il peut donc être distingué de chacun des homozygotes parentaux ;

• Reproductible dans toute expérience de laboratoire : aussi bien entre expériences dans le même laboratoire qu'entre différents laboratoires réalisant des expériences identiques.

• Distribué régulièrement le long du génome : Plus la couverture du génome est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation du polymorphisme.

• Discriminant : c'est à dire capable de détecter des différences entre individus proches apparentés.

• Insensible au milieu : non sujet aux influences environnementales. La révélation du génotype d'un marqueur doit être indépendante de l'environnement dans lequel l'individu vit ou son stade de développement.

• Neutre : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) que ceux qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité, les polymorphismes moléculaires sont neutres ;

• Economique : Facile, rapide et peu coûteuse pour sa détection sur un grand nombre d'individus. Si possible, l'équipement doit être à usage multiple dans l'expérience.

Multiallélique.

# CHAPITRE 3 : ANALYSE DU POLYMORPHISME PROTEIQUE (ALLOZYMES, ISOZYMES ...)

## 1. Notions de base sur les protéines

### 1.1. Définition

Les protéines ont été définies comme étant des macromolécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes.

Elles sont formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Chacune de ces chaînes est constituée de l'enchaînement de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

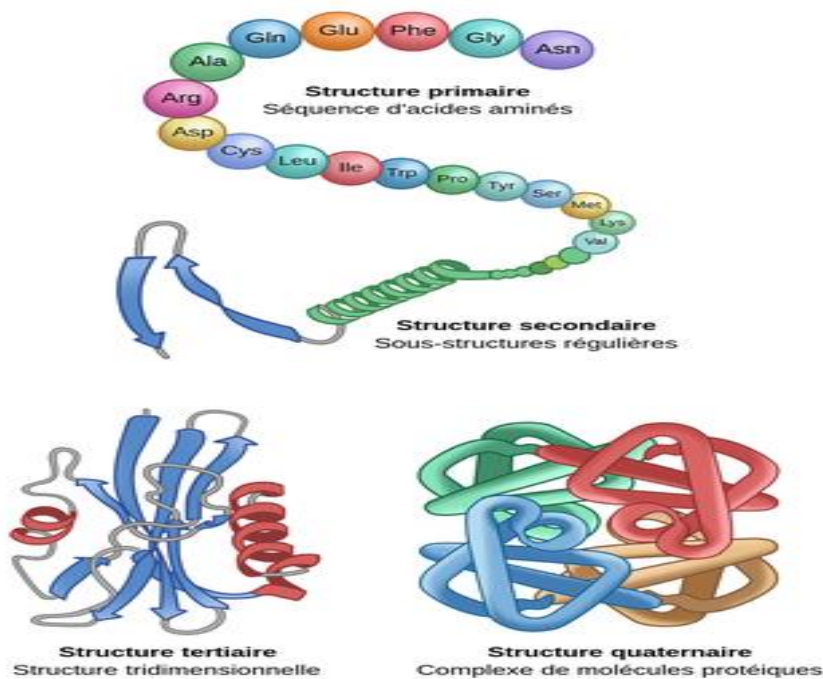
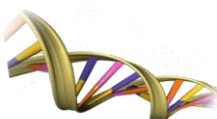


Figure 18. Structure des protéines

L'information portée par les bases de l'ADN



Est traduite en protéines. Elle est le fruit de traduction de l'ARN messager en séquence protéique.

Les acides aminés sont des composés organiques bi-fonctionnels qui contiennent un groupe amine basique (-NH<sub>2</sub>) et un acide carboxylique (-COOH). Dans les protéines, on trouve communément 20 acides aminés, de fonctions et propriétés diverses en fonction de la nature de la chaîne latérale -R.

## 1.2. Structure des protéines

### 1.2.1. Structure primaire

La structure primaire d'une protéine correspond à la séquence linéaire des acides aminés qui la composent. Cette séquence est déterminée par les gènes et constitue la base de toutes les autres structures. Les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques, formant une chaîne polypeptidique. Toute modification dans cette séquence peut altérer la fonction de la protéine.

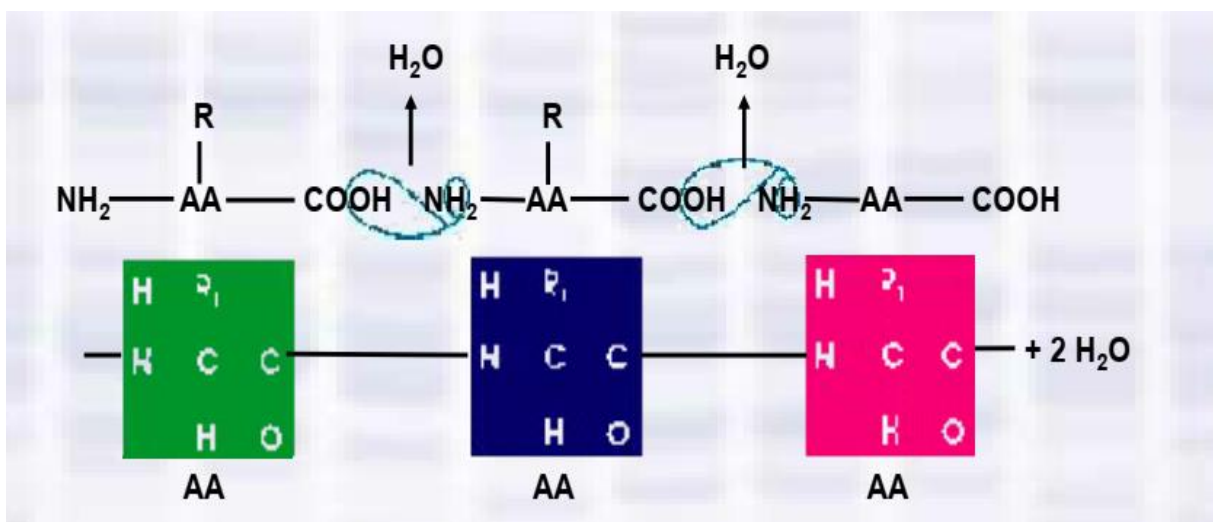


Figure 19. Structure primaire des protéines

### 1.2.2. Structure secondaire

La structure secondaire correspond à l'organisation locale de la chaîne polypeptidique en motifs réguliers, stabilisée par des liaisons hydrogène entre les atomes du squelette polypeptidique. Les principaux types de structure secondaire sont :

**Hélice alpha (α) :** Une structure en spirale, stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements C=O et N-H.

**Feuillet bêta ( $\beta$ )** : Une structure en feuillets pliés, où les segments de la chaîne polypeptidique sont alignés côte à côte et maintenus par des liaisons hydrogène.

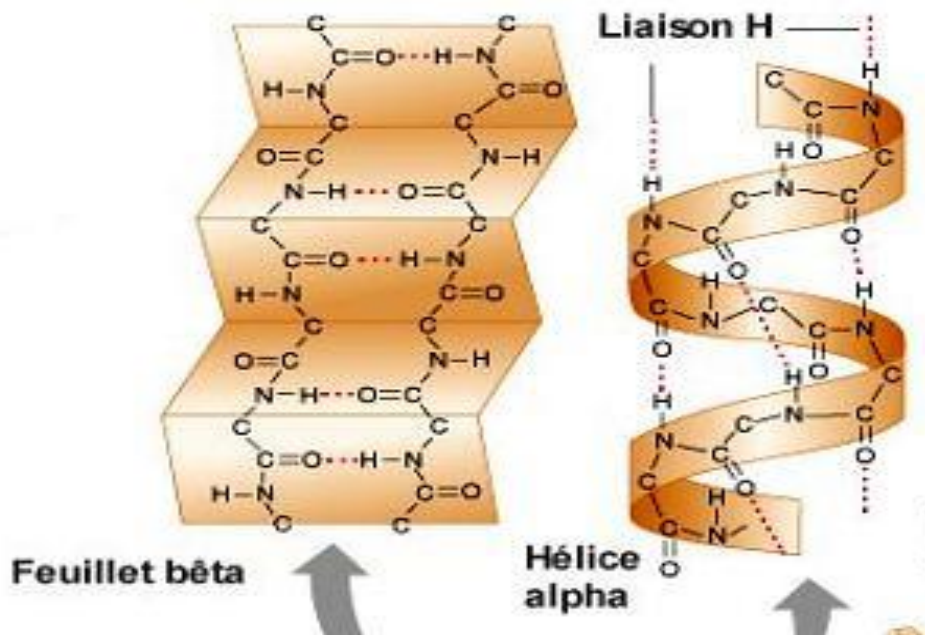


Figure 20. Structure secondaire des protéines

### 1.2.3. Structure tertiaire

La structure tertiaire est l'organisation tridimensionnelle globale de la protéine. Elle est déterminée par les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés (groupes R), telles que :

- Liaisons hydrogène.
- Interactions hydrophobes.
- Liaisons ioniques (entre groupements chargés).
- Ponts disulfure (liaisons covalentes entre deux cystéines).

Cette structure détermine la fonction biologique de la protéine, car elle crée les sites actifs ou de liaisons nécessaires à son activité.

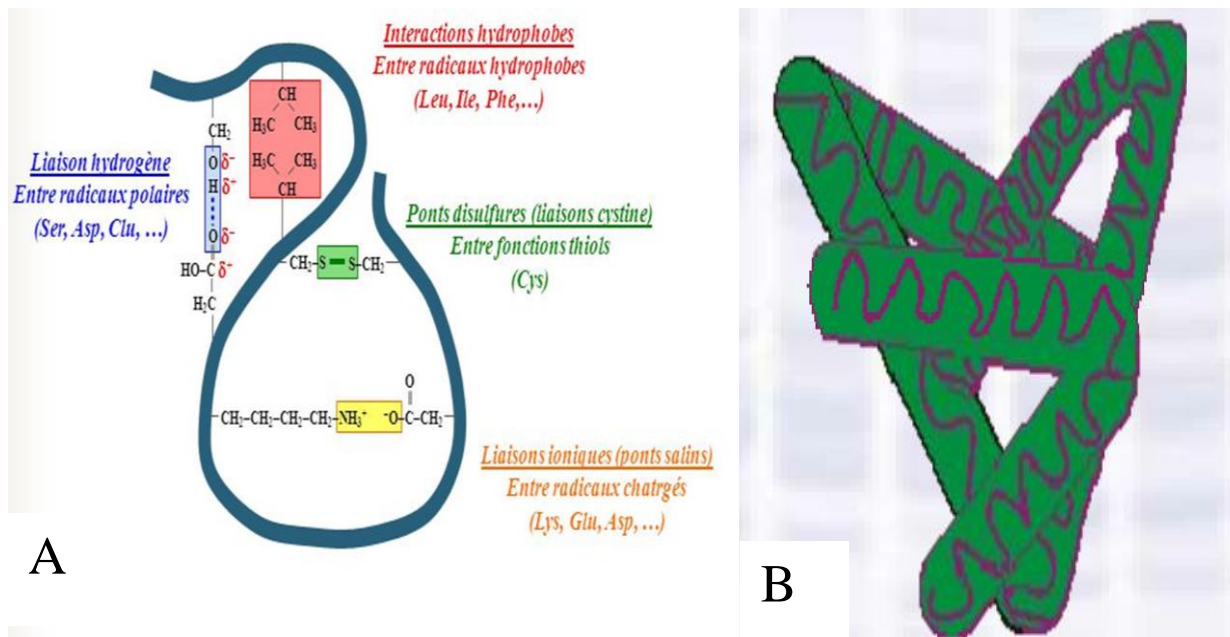


Figure 21. Les différentes liaisons de la structure tertiaire (A) et la structure tertiaire des protéines (B)

#### 1.2.4. Structure quaternaire (optionnelle)

Certaines protéines, comme l'hémoglobine, possèdent une structure quaternaire, qui correspond à l'assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques (sous-unités) en une structure fonctionnelle pour former des dimères, trimères, tétramères etc.

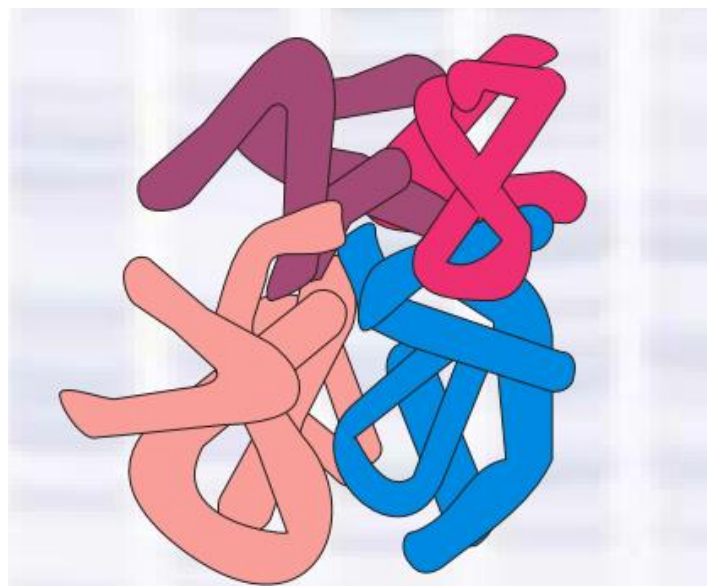


Figure 22. Structure quaternaire des protéines

### 1.3. Fonction des protéines

Les protéines ont de nombreuses fonctions différentes, à la fois structurales et fonctionnelles. Les protéines, par leur diversité structurelle et fonctionnelle, remplissent des rôles variés et indispensables dans les organismes vivants. Leur importance est telle qu'elles interviennent dans presque tous les processus biologiques essentiels.

- **Fonction enzymatique** : Catalyse les réactions biochimiques. Exemples : Amylase (dégrade l'amidon), DNA polymérase (synthèse de l'ADN).
- **Fonction structurale** : Apporte soutien et stabilité aux cellules et tissus. Exemples : Collagène (résistance des tissus), kératine (cheveux, ongles).
- **Fonction de transport et stockage** : Transporte ou stocke des molécules ou ions. Exemples : Hémoglobine (transport d'oxygène), ferritine (stockage du fer).
- **Fonction de signalisation** : Transmet des signaux entre ou dans les cellules. Exemples : Insuline (régule la glycémie), récepteurs membranaires (signalisation intracellulaire).
- **Fonction de mouvement** : Génère des mouvements cellulaires ou multicellulaires. Exemples : Myosine (contraction musculaire), dynéine (transport intracellulaire).
- **Fonction immunitaire** : Défend l'organisme contre les agents pathogènes. Exemples : Anticorps (neutralisation des antigènes), cytokines (coordination immunitaire).
- **Fonction de régulation génétique** : Contrôle l'expression des gènes. Exemples : Facteurs de transcription (activation ou répression de gènes), protéines ribosomiques (traduction).
- **Fonction de réserve** : Sert de source d'acides aminés pour la croissance. Exemples : Ovalbumine (blanc d'œuf), caséine (protéine du lait).

## 2. Notions de bases sur les enzymes

### 2.1. Définition

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui augmentent la vitesse des réactions chimiques sans être consommées ou modifiées de façon permanente. Leurs propriétés fondamentales sont :

- **Spécificité** : Une enzyme agit sur un substrat spécifique ou un groupe de substrats apparentés.

- Efficacité : Les enzymes accélèrent les réactions, parfois de plusieurs millions de fois, en réduisant l'énergie d'activation.
- Sensibilité : Leur activité dépend des conditions de température, de pH et de concentration en substrat.

## 2.2. Structure des enzymes

Protéines globulaires : La majorité des enzymes sont des protéines repliées en structures tertiaires ou quaternaires.

Site actif : Zone spécifique où le substrat se lie et où la réaction catalytique a lieu.

Clé-serrure : Le substrat s'ajuste parfaitement au site actif.

Ajustement induit : L'enzyme modifie légèrement sa forme pour s'adapter au substrat.

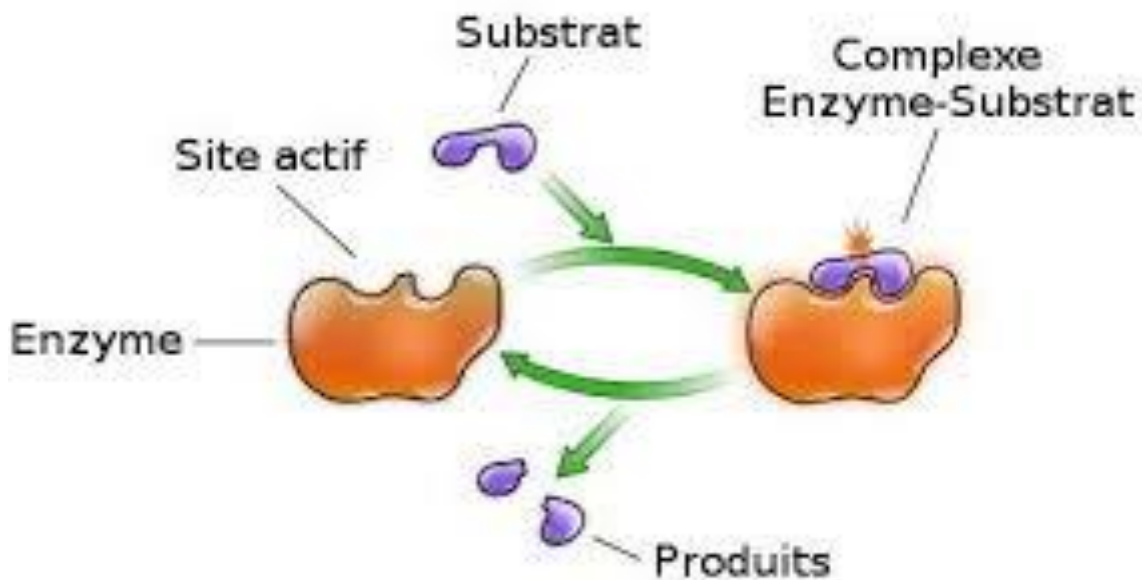


Figure 23. Le site actif d'une enzyme est le lieu de la réaction enzymatique.

## 2.3. Fonctionnement enzymatique

Le mécanisme d'action d'une enzyme suit plusieurs étapes :

Fixation : Le substrat se lie au site actif pour former un complexe enzyme-substrat.

Catalyse : L'enzyme abaisse l'énergie d'activation et facilite la transformation du substrat.

Libération : Les produits de la réaction sont libérés, et l'enzyme est prête pour une nouvelle réaction.

## 2.4. Facteurs influençant l'activité enzymatique

- Température : Une augmentation modérée accélère la réaction, mais une température excessive peut dénaturer l'enzyme.
- pH : Chaque enzyme a un pH optimal. Un pH trop élevé ou trop bas réduit son efficacité.
- Concentration en substrat : L'activité enzymatique augmente avec la concentration en substrat, jusqu'à atteindre une saturation.

## 2.5. Allozymes et Isozymes

Les allozymes et les isozymes sont des variantes enzymatiques qui diffèrent par leur structure, mais elles catalysent des réactions chimiques similaires.

### 2.5.1. Allozymes

Les allozymes sont des variantes d'une même enzyme produites par des allèles différents d'un même gène. Résultent de mutations au niveau de l'ADN qui modifient légèrement la séquence d'acides aminés de l'enzyme.

**Propriétés** : Légères différences dans la structure primaire (séquence d'acides aminés). Activité enzymatique similaire, mais avec des variations potentielles en termes d'efficacité ou de stabilité. Exemple : Les allozymes de lactate déshydrogénase (LDH) chez différentes populations d'une même espèce.

### 2.5.2. Isozymes

Les isozymes (ou isoenzymes) sont des formes distinctes d'une enzyme codées par des gènes différents, mais catalysant la même réaction chimique. Produits de gènes distincts au sein d'une même espèce.

**Propriétés** : Peuvent différer dans leur structure primaire, secondaire, ou quaternaire. Existents souvent dans différents tissus ou organes, adaptés aux besoins spécifiques du tissu. Différentes propriétés cinétiques et réponses aux conditions physiologiques. Exemple : L'hémoglobine adulte (HbA) et fœtale (HbF) : Adaptées aux environnements physiologiques différents.

### **2.5.3. Applications biologiques et médicales**

#### **Étude des allozymes**

- Utilisées pour analyser la diversité génétique dans les populations.
- Indiquent des niveaux de polymorphisme au sein d'une espèce.

#### **Étude des isozymes**

- Employées pour détecter des maladies ou des lésions spécifiques :
- Permettent de comprendre les mécanismes métaboliques dans différents tissus.

Les allozymes reflètent la variabilité génétique au sein d'un gène unique, souvent utile pour étudier la diversité et l'adaptation des populations.

Les isozymes montrent l'adaptation fonctionnelle de différentes enzymes dans divers tissus ou contextes physiologiques.

### **3. Analyse du polymorphisme et technologies basées sur les protéines**

Les protéines sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome. Leur séparation basée sur les propriétés de migration des protéines, par électrophorèse et détection par des dosages histochimiques spécifiques.

### **4. Séparation des enzymes et des protéines par l'électrophorèse**

L'électrophorèse : c'est une méthode d'analyse et de fractionnement basée sur la migration différentielle des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. L'électrophorèse utilise un support. Les plus courants sont le papier, l'acétate de cellulose, les gels d'agarose et les gels de polyacrylamide. Idéalement, le support d'une électrophorèse devrait être parfaitement inerte chimiquement, contrairement à ce qui se passe pour certains types de chromatographie.

En biochimie, l'électrophorèse sur gel (un polymère : agarose, polyacrylamide, amidon,...) est utilisée pour séparer les macromolécules biologiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide. On peut faire varier la concentration de polymère par rapport à celle du tampon, ainsi que son taux de

réticulation. Plus le polymère est concentré et réticulé, et plus la taille des pores du gel est petite. On peut ainsi ajuster les propriétés du gel à la taille des molécules à analyser.

D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Le polyacrylamide forme des réseaux beaucoup plus réticulés, ils sont donc indiqués pour des molécules de masses moléculaires moins élevées, typiquement les protéines. Notons que des fragments d'ADN de tailles limitées peuvent nécessiter l'utilisation de gels d'acrylamide plutôt que d'agarose. C'est en particulier le cas des fragments utilisés pour le séquençage qui ne dépassent généralement pas quelques centaines de nucléotides et dont le gel doit permettre de séparer des fragments dont la taille diffère d'un seul nucléotide. La migration des protéines dépend:

- de la charge de la protéine
- de sa taille
- du support (gel plus ou moins réticulé, papier)

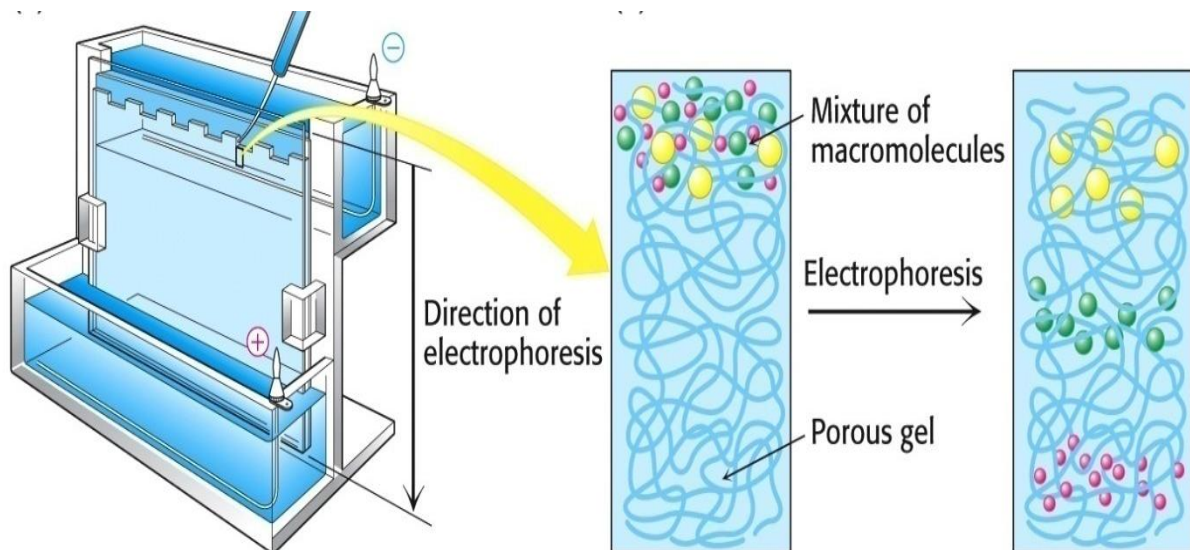


Figure 24. Électrophorèse des acides nucléiques

## 4.1. Types d'électrophorèse

### 4.1.1. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes ou électrophorèse unidimensionnelle par isoélectrofocalisation (IEF).

Dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes, les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pI (point isoélectrique : la charge de prts est = 0, Les prts sont chargées + au  $\text{pH} <$  à leur pI et - au  $\text{pH} >$  à leur pI).

Une protéine chargée + migrera vers la cathode devenant de moins en moins chargée au fur et à mesure qu'elle traversera le gradient de pH jusqu'à ce qu'elle arrive à son pI et inversement pour une protéine chargée -, c'est ce qui va permettre de séparer les protéines sur la base de très petites variations de charge.

On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes (des espèces qui se comporte à la fois comme un acide et une base), molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou  $\pm$  étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel. Il existe de telles molécules de petit poids moléculaire et solubles (ampholines) et il existe également des gels à base d'acrylamide modifiée contenant des groupements acides et basiques fixés (gels d'immobilines).

La vitesse de migration dépendra de :

1. la charge native de la molécule : Plus la charge est importante, plus la vitesse de migration sera importante. Signalons que cette charge native peut varier en fonction du pH, qui est le plus souvent fixé par l'expérimentateur au moyen de l'utilisation d'une solution tampon. Signalons également que selon le signe de la charge native, les molécules pourront migrer vers l'anode (molécules chargées négativement) ou vers la cathode (molécules chargées positivement) .
2. la masse moléculaire. Plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible. Rappelons que le choix du support est essentiel.

En effet, un support mal choisi peut entraîner une absence de migration (molécule trop grosse pour le maillage du support) ou au contraire une mauvaise, voir pas de séparation (molécule trop petite pour le maillage du support).

3. la structure tridimensionnelle (conformation) : En effet, à masse moléculaire égale, une molécule pourra selon sa forme être plus ou moins ralentie dans sa progression par le support. Par exemple, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse.

### Avantages

- Cette technique permet la séparation des différentes protéines en état natif (conditions non dénaturantes) en fonction du point isoélectrique pI.
- De déterminer expérimentalement le point isoélectrique d'une protéine.

### Inconvénients

- l'interprétation délicate, il est fréquent que les molécules présentes dans l'échantillon soumis à électrophorèse s'agrègent entre elles, formant de très gros ensembles impossibles à séparer.

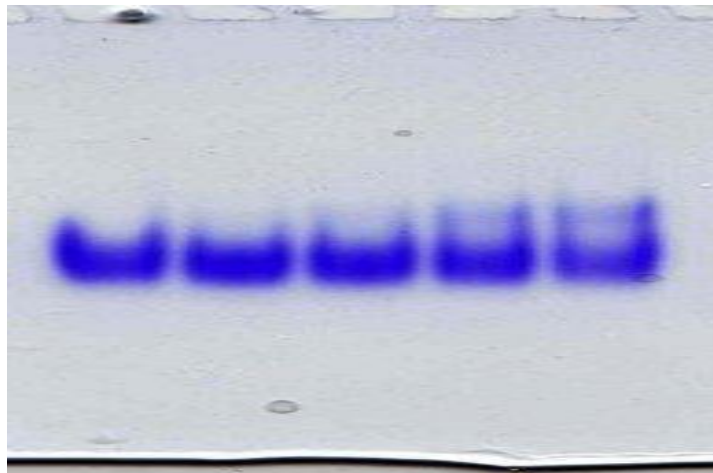


Figure 25. Formation d'agrégats moléculaires lors de l'électrophorèse

- On ne peut pas déterminer la masse moléculaire des protéines

#### 4.1.2. L'électrophorèse en conditions dénaturantes unidimensionnelle ou SDS-PAGE ( Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Les protéines sont d'abord dissociées en leurs sous unités polypeptidiques en les chauffant en présence d'un agent réducteur : le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures et un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives et par conséquent, les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native et elles n'ont plus de pont disulfure et elles sont sous une forme monomérique.

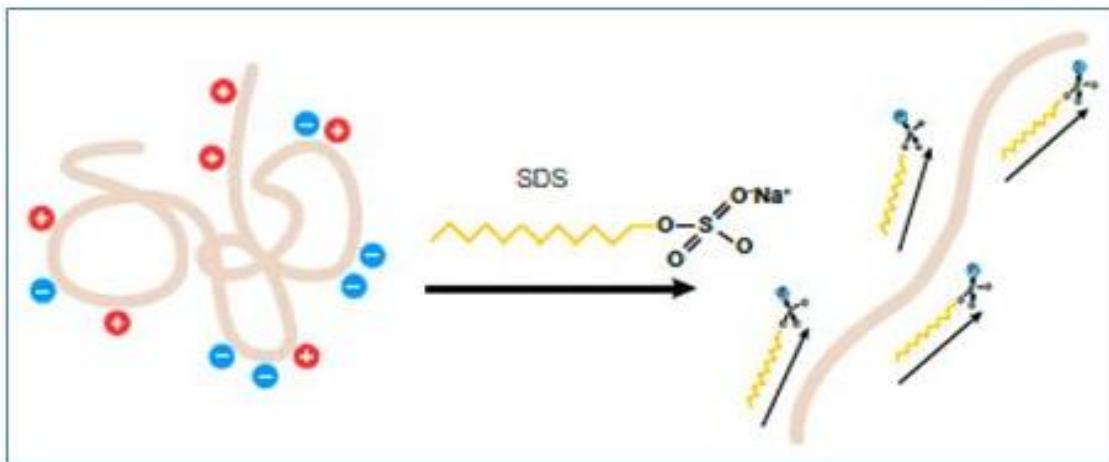


Figure 26 . Effet du SDS sur la conformation et la charge d'une protéine.

Il en résulte qu'en présence de SDS la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire. Donc la séparation se fait uniquement en fonction de la masse moléculaire.

#### Avantages

- l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple que pour une électrophorèse en condition non dénaturante.
- L'utilisation d'un détergent permet de solubiliser les protéines hydrophobes, et en particulier les protéines membranaires, qui ne peuvent être séparées par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

La vitesse de migration dépendra de :

1. La masse moléculaire : Plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible. Rappelons que le choix du support est essentiel.

En effet, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer ( Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé→ plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées).

- la structure tridimensionnelle (conformation) : En effet, Une protéine globulaire (assimilable à une sphère) migre d'autant moins que sa masse molaire est élevée.

### Préparation du gel et mise en place pour l'électrophorèse

- Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques. Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits.
- La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes différents d'échantillon de protéines à séparer.
- Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Du tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique.
- Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits.

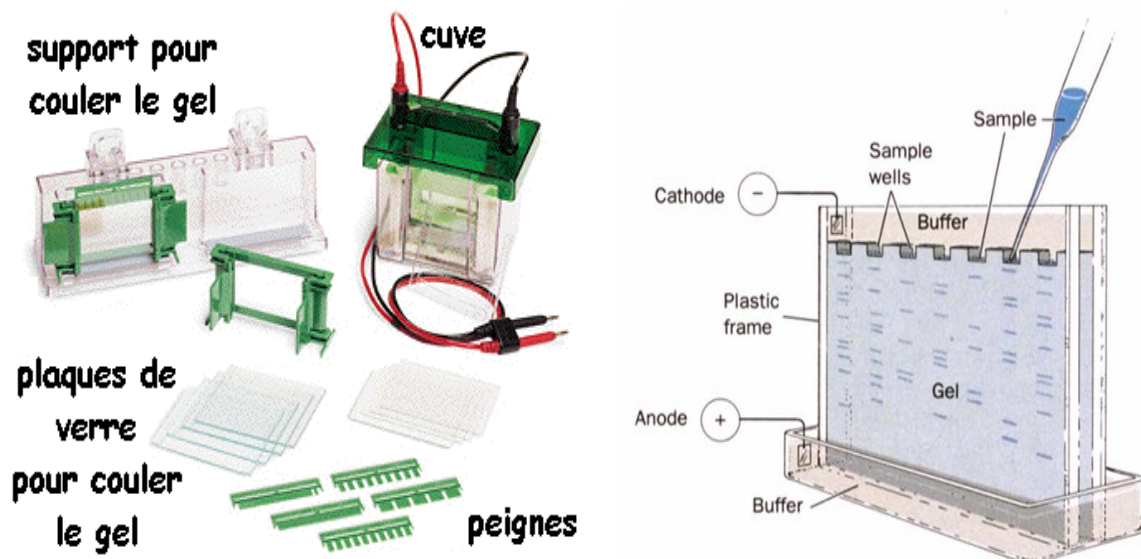


Figure 27. Préparation du gel et mise en place de l'électrophorèse

Les protéines sont révélées par une coloration : par exemple avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent.

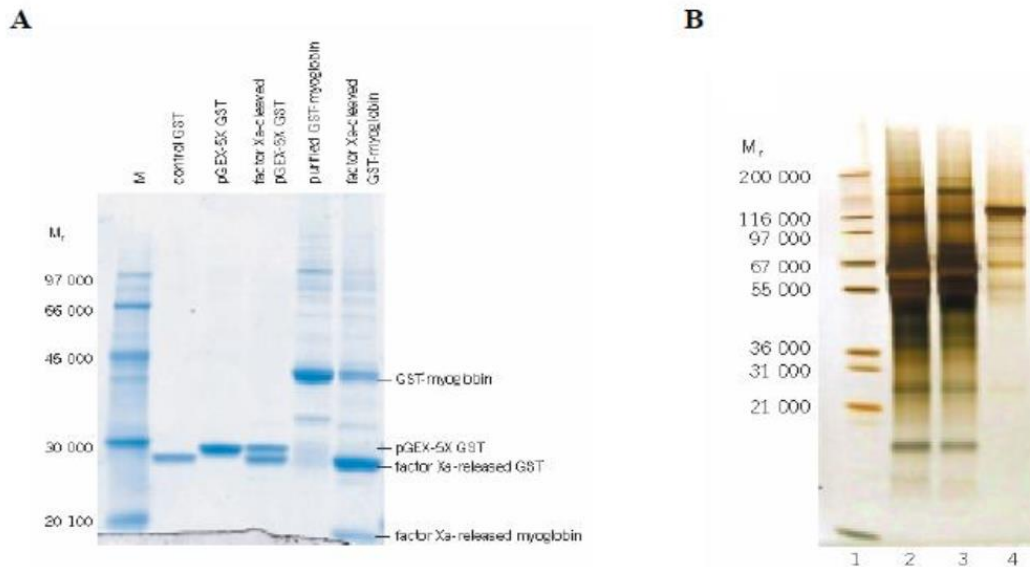


Figure 28. Coloration de gels de protéines au Bleu de Coomassie brillant (A) et au nitrate de l'argent (B)

Après migration, apparaissent différentes bandes sur le gel ces bandes constituent un électrophorégramme et caractérise un individu.

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (voir schéma). Exemple de marqueurs :

- myosine (205 kDa)
- $\beta$  galactosidase (116 kDa)
- phosphorylase  $\beta$  (97,4 kDa)

### Détermination de la masse molaire d'une protéine

La mobilité relative est le rapport : 
$$\frac{\text{Distance de migration d'une bande}}{\text{Distance de migration du front de migration}}$$

La droite :  $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilités relatives})$  permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

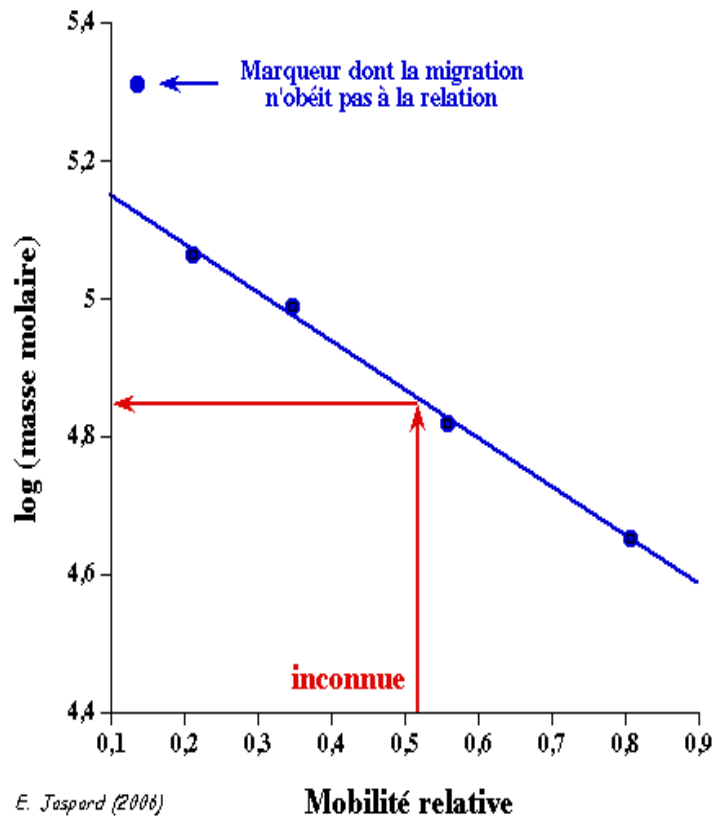


Figure 29. Détermination de la masse molaire d'une protéine

#### 4.1.3. L'électrophorèse bidimensionnelle (EBD ou 2D-PAGE)

En effet, du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur masse molaire et leur charge nette à un pH donné. Cette valeur est caractérisée par le point isoélectrique ou pI. Les protéines ont :

- des pI qui s'échelonnent de 2 à 12
- des masses molaires de 5 kDa à 590 kDa

Le principe consiste à séparer les protéines dénaturées d'abord selon le pI par une IEF, puis une deuxième séparation, à 90° par rapport à la première selon leur masse moléculaire par une SDS-PAGE

**1ère dimension : une isoélectrofocalisation (IEF)** où les polypeptides migrent jusqu'à un pH égal à leur pI. Le gradient de pH peut être obtenu soit par l'utilisation d'**ampholytes**, qui

créeront le gradient lors de l'application du champ électrique, soit par l'utilisation d'**immobilines**.

**2ème dimension** : une séparation selon la masse molaire est un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (sodium dodécyl sulfate ou SDS) et réduction des ponts disulfure. Ces deux électrophorèses sont effectuées de manière perpendiculaire l'une par rapport à l'autre (figure 30).

Comme les paramètres de la séparation sont indépendants, cette technique est particulièrement résolutive : plusieurs centaines de chaînes polypeptidiques peuvent être séparées sous forme de taches de protéines ou spots sur un gel.

La résolution obtenue est suffisante pour mettre en évidence la présence d'isoformes et cela permet d'analyser les variations quantitatives des protéines entre génotypes. Ces variations sont le reflet du polymorphisme d'éléments génétiques qui contrôlent l'expression des gènes de structure.

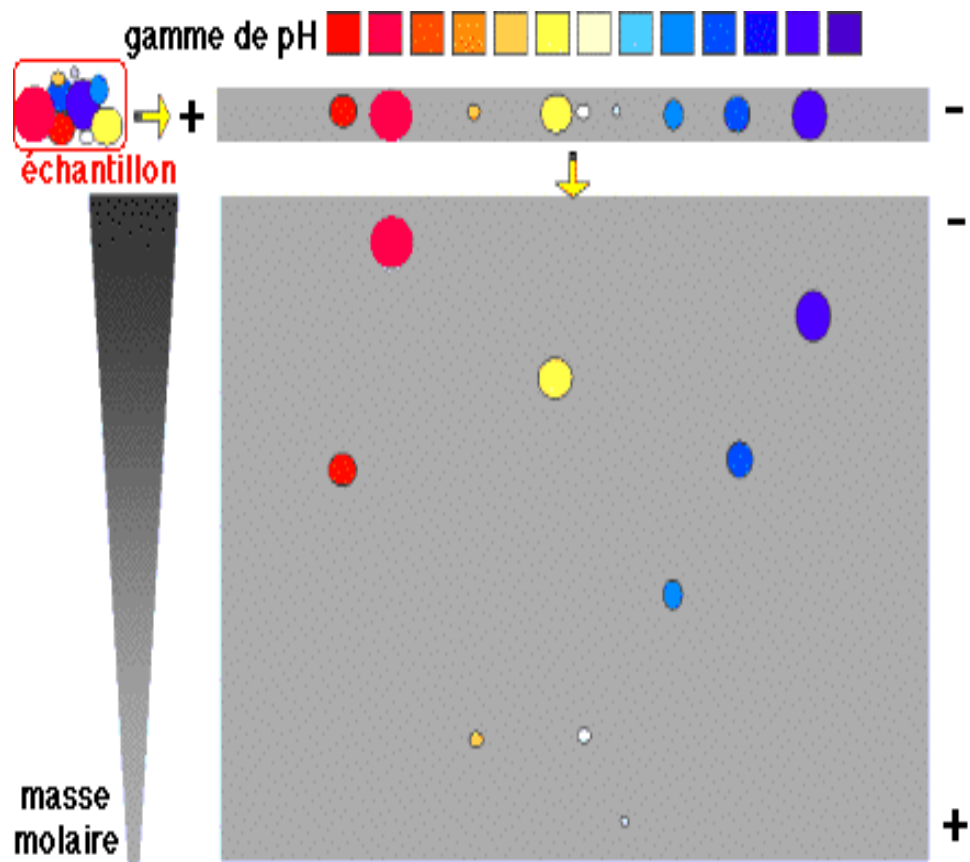


Figure 30. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (EBD ou 2D-PAGE)

**Avantage :**

- C'est un outil puissant pour la proteomique.
- Il permet de séparer jusqu'à plusieurs milliers de protéines.

**Inconvénients :**

- Un désavantages à priori de l'EBD est qu'elle ne donne pas la fonction des prts révélées (sauf si l'on dispose d'anticorps).

**4.2. Techniques d'identification**

Pour identifier les protéines, on peut utiliser:

- Des anticorps
- Découper les spots et séquencer (micro-séquençage)
- Découper les spots, digérer à la trypsine et identifier les protéines grâce à la spectrométrie de masse (estimation très précise des masses moléculaires des peptides obtenues après digestion par une protéase) → ces techniques présentent l'avantage d'être moins couteuse en argent et en quantité de prts nécessaire.

## CHAPITRE 3 : ANALYSE DU POLYMORPHISME DE L'ADN

### 1. Polymorphisme de l'ADN (Acide désoxyribonucléique, DNA).

La génétique des populations permet d'étudier les variabilités d'origine génétique des populations. Cette variabilité est appelée « polymorphisme ». Une population est dite polymorphe si dans cette population une portion d'ADN a une variation de séquence correspondant à plusieurs formes alléliques dont la plus fréquente ne dépasse pas plus d'une certaine fraction de la population totale, entre 95 ou 99 pour cent.

Dans une population, on dit qu'un gène est polymorphe, s'il possède au moins deux allèles ayant une fréquence supérieure ou égale à 1 %. S'il ne possède pas deux allèles avec une fréquence supérieure ou égale à 1 % mais que le gène existe quand même en plusieurs exemplaires, il est polyallélique (un gène polymorphe est donc obligatoirement polyallélique). Monomorphisme : les gènes monomorphes n'ont pas de variabilité. Cryptopolymorphisme : moins de 1 % ; les maladies génétiques humaines sont en général dans ce cas.

Les DNA nucléaire et cytoplasmique (DNA des chloroplastes (cpDNA) et le DNA mitochondrial (mtDNA)) peuvent être étudiés pour leur polymorphisme. Les cpDNA et mtDNA sont de taille plus faible par rapport à celle du DNA nucléaire. Cependant, ils existent sous forme de plusieurs copies dans une cellule et sont généralement transmis maternellement.

- **Polymorphisme basé sur la restriction de l'ADN :**
- Polymorphisme détecté par les marqueurs moléculaires de type 'RFLP'
- **Polymorphisme basé sur la polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR):**
  - Polymorphisme détecté par les marqueurs moléculaires de type RAPD
  - Polymorphisme détecté par les marqueurs de type microsatellites (SSR)
- **Polymorphisme basé sur la restriction de l'ADN et la PCR.**
  - Polymorphisme détecté par les marqueurs de type AFLP
  - Polymorphisme détecté par d'autres techniques

## **2. Approche méthodologique pour la mise en évidence du polymorphisme moléculaire**

L'approche méthodologique pour la mise en évidence du polymorphisme moléculaire repose sur plusieurs étapes clés permettant d'analyser la variabilité génétique. Tout d'abord, la restriction de l'ADN consiste à utiliser des enzymes de restriction pour fragmenter l'ADN en segments spécifiques, en fonction des sites de reconnaissance enzymatiques, révélant ainsi des différences dans les séquences. Ensuite, l'hybridation intervient grâce à l'utilisation de sondes moléculaires marquées qui se lient de manière spécifique aux séquences complémentaires des fragments d'ADN, facilitant la détection des variations. Enfin, l'amplification par PCR (réaction en chaîne par polymérase) permet de multiplier des régions ciblées de l'ADN, rendant les polymorphismes plus visibles et exploitables pour des analyses génétiques précises. Cette méthodologie intégrée est largement utilisée pour étudier la diversité génétique, identifier des marqueurs moléculaires et caractériser les variations entre individus ou populations.

## **3. Restriction de l'ADN**

Pour fragmenter l'ADN en petits morceaux, deux approches principales peuvent être utilisées. La première consiste à couper l'ADN au hasard. Cela peut être réalisé par sonication, qui utilise des ondes de haute fréquence pour briser les molécules d'ADN, ou par cisaillement hydrodynamique, où les molécules d'ADN sont accélérées en passant dans une région étroite, provoquant des forces d'élongation qui entraînent leur rupture. La seconde approche, plus contrôlée et répétable, repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction. Ces enzymes reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN et les coupent de manière précise, permettant ainsi d'obtenir des fragments reproductibles.

### **3.1. Type des enzymes : il y a 2 types**

**3.1.1. Les exonucléases :** dégradent l'ADN à partir de l'une de ses extrémités : 3', 5', On trouve trois différents types d'exonucléase :

- type I : elles coupent de 3' - 5'
- type II : elles coupent de 5' - 3'
- type III : elles coupent de 3' - 5' et de 5' vers 3'.

**3.1.2. Les endonucléases :** Enzyme capable de cliver les liaisons phosphodiester entre 2 nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'un acide nucléique.

Les endonucléases diffèrent des exonucléases, puisqu'elles peuvent cliver les brins d'acide nucléique de manière interne, alors que les exonucléases n'attaquent la molécule d'acide nucléique qu'au niveau de ses extrémités

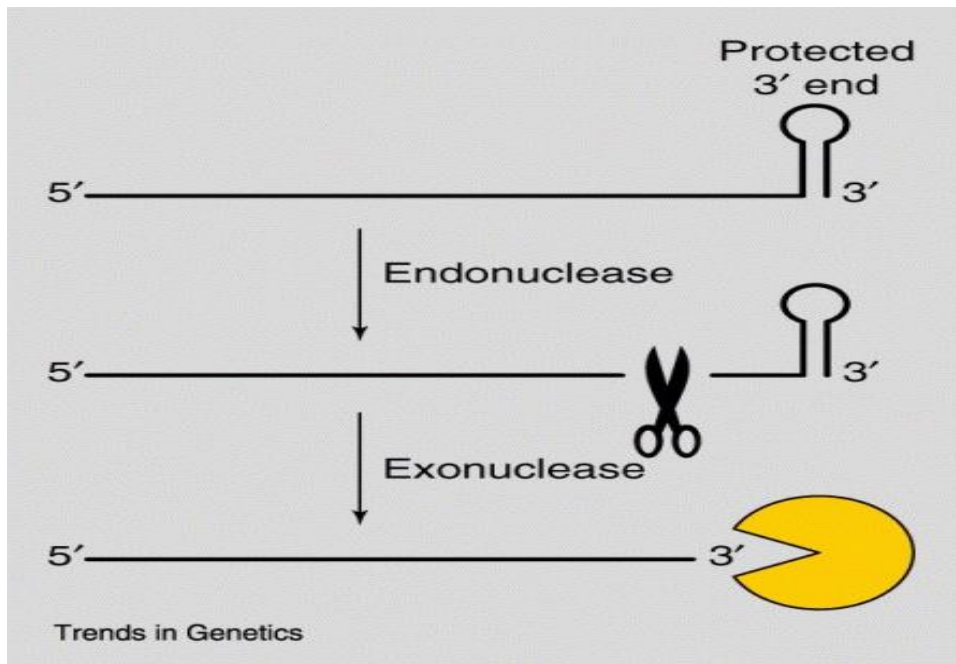


Figure 31. Type des enzymes de restriction

### 3.2. Les enzymes de restriction

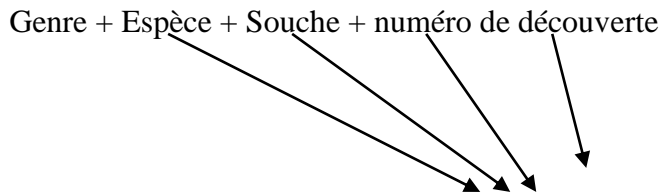
Ces E appartiennent à la classe des endonucléases. Une ER est une protéine qui peut couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique = site de restriction → chaque ER reconnaît ainsi un site spécifique.

**3.2.1. Origine des enzymes de restriction:** Les ER sont d'origine bactérienne, et constituent un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages, des virus spécifiques des bactéries. Lorsque le virus injecte son ADN dans le micro-organisme, celui-ci est coupé par l'enzyme de restriction au niveau de ses sites spécifiques. La destruction du génome du virus bloque ainsi l'infection.

Pour éviter que l'enzyme de restriction ne coupe l'ADN de son propre génome, la bactérie fabrique aussi une deuxième enzyme appelée méthylase (E de méthylation) qui reconnaît également le site de restriction. La méthylase ne coupe pas l'ADN, mais le modifie en lui rajoutant un groupement méthyle sur un ou plusieurs nucléotides du site (méthylation de la cytosine sur C5 ou de l'adénine sur N6). Cette méthylation empêche la coupure par l'enzyme

de restriction. Ce mécanisme de défense, appelé système de restriction/modification ; associe systématiquement ces deux enzymes, l'une de coupure et l'autre de protection.

### 3.2.2. Nomenclature des enzymes de restriction



**La bactérie :** Escherichia coli Ry13 → EcoR : I, II,.....etc

**Les enzymes :** EcoR I : première enzyme isolée chez Escherichia coli Ry13

EcoR V : cinquième enzyme isolée chez Escherichia coli Ry13

### 3.2.3. Type des enzymes de restriction

Selon la relation spatiale entre la séquence reconnue et le lieu de coupure, il est possible de distinguer trois types d'enzymes de restriction.

**Les enzymes de type I et de type III :** reconnaissent une séquence d'ADN spécifique et coupent en un endroit aléatoire, d'une distance d'environ :

|                                 |   |   |
|---------------------------------|---|---|
| 1 000 à 5 000 pb pour le type I | } | plus loin que le site de restriction (Ces 2 types ont également une activité méthylasique en plus de leur activité endonucléasique, ce qui les différencient du type II). |
| 20 à 25 pb pour le type III     |   |   |

**Les enzymes de type II :** ce sont, les plus utilisées, reconnaissent une séquence spécifique de 4,6 ou 8 Pb et coupent en un endroit spécifique de cette séquence, ces sites de restriction sont généralement des séquences palindromiques ou palindromes (se lisent de droite à gauche et inversement, comme le mot radar et la phrase "esope reste ici et se repose"). De manière générale, les enzymes de restriction sont bloquées par le monoazide d'éthidium.

### 3.2.4. Mode de coupure

Les ER coupent dans la séquence selon 2 modes franche et cohésive.

**Coupure franche :** sont obtenues des extrémités franches par coupure au mm endroit sur les 2 brins

**Coupure cohésive :** coupure décalée sur les 2 brins

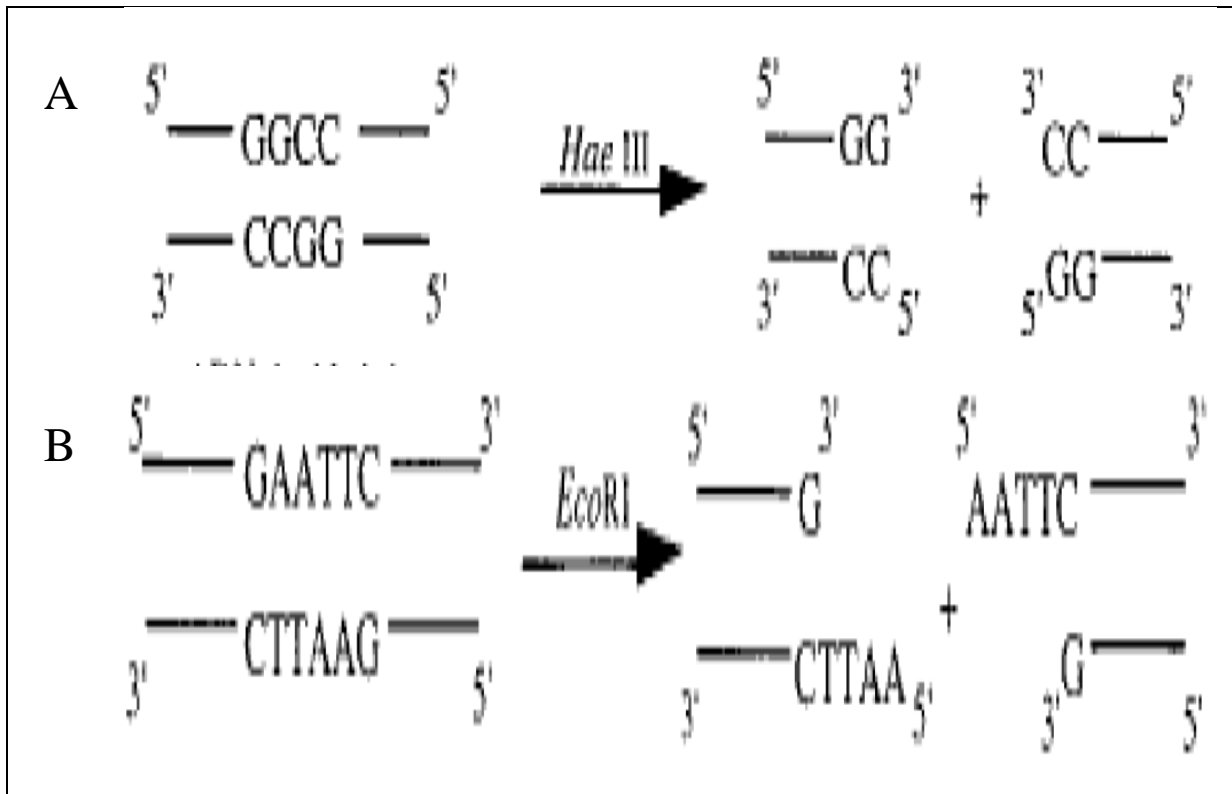


Figure 32. Coupure France (A) et cohésive (B) des enzymes de restriction

**NB :** après restriction 2 ER sont dites compatibles, quand elles génèrent après digestion des fractions aux extrémités cohésives complémentaires. Ces fragments peuvent être facilement ligaturés.

- Couper → ER
- Copier → ADN et ARN polymérase
- Coller → les ligases assure la liaison phosphodiester des 2 simples brins d'ADN complémentaires (hybridation).

### 3.2.5. Exemples d'enzymes de type II

Tableau 3. Exemples des enzymes de restriction de type II

| Enzyme        | Source                      | Séquence reconnue    | Coupure                                | Extrémités (après coupure) |
|---------------|-----------------------------|----------------------|--|----------------------------|
| <u>Eco RI</u> | <i>Escherichia coli</i>     | 5'GAATTC<br>3'CTTAAG | 5'---G AATTC---3'<br>3'---CTTAA G---5' | Cohésives                  |
| PstI          | <i>Providencia stuartii</i> | 5'CTGCAG<br>3'GACGTC | 5'---CTGCA G---3'<br>3'---G ACGTC---5' | Cohésives                  |
| SmaI          | <i>Serratia marcescens</i>  | 5'CCCGGG<br>3'GGGCCC | 5'---CCC GGG---3'<br>3'---GGG CCC---5' | Franches                   |

### 3.2.6. Utilisations des enzymes de restriction

Après restriction, on obtient des fragments de différentes tailles. Ces fragments peuvent être séparés par migration sur un gel d'électrophorèse et on peut les utiliser de différentes façons :

Pour faire du clonage, la mise en évidence du polymorphisme, réalisation d'une carte de restriction (La carte de restriction est une carte donnant la position sur l'ADN des différents sites de restriction pour différentes enzymes), dépistage d'une anomalie.

## 4. L'hybridation moléculaire

### 4.1. L'objectif de l'hybridation moléculaire

- Révéler si une molécule d'ADN contient une séquence ou un gène particulier par l'utilisation d'un fragment d'ADN complémentaire = sonde.
- Détection et identification d'une molécule d'ADN ou d'ARN ou de protéines de séquence donnée dans un mélange.

### 4.2. Principe de l'hybridation moléculaire

Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci

lui est complémentaire. L'hybridation moléculaire est permise par les liaisons hydrogènes que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques constituant l'ADN.

Les molécules cibles rendues simples brin sont au préalable fixées sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose. La sonde simple brin et la cible dénaturé sont mises en au contact dans des conditions permettant une renaturation. Lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles, elles s'hybrident et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde. Des lavages appropriés des membranes permettent d'éliminer alors toute hybridation non spécifique et de ne garder que les hybrides sondes/cibles recherchés. Dans le cas de marquage radioactif, les hybrides sont repérés en plaçant la membrane au contact d'un film autoradiographique, qui est ensuite développé comme un film photographique ; dans le cas d'un marquage chimique, l'hybride moléculaire est révélé souvent par test colorimétrique sur membrane.

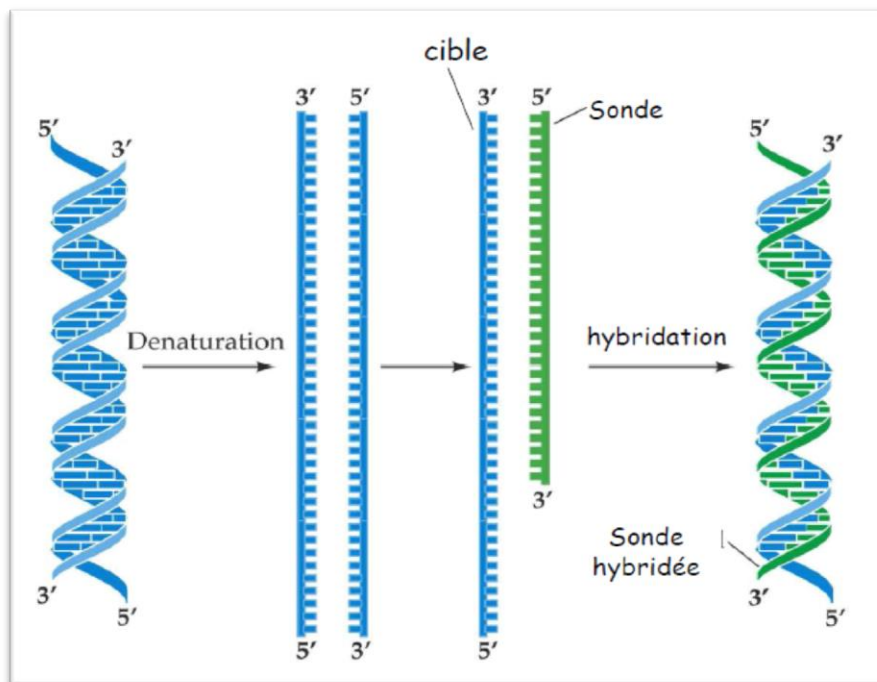


Figure 33. Principe de l'hybridation moléculaire

#### 4.3. Conditions de l'hybridation moléculaire

Les 2 brins à appairer doivent être complémentaires et antiparallèles.

L'appariement est possible entre bases complémentaires portées par 2 molécules distinctes, ou par la même molécule, possibilités d'hybridation : ADN/ ADN, ADN /ARN, ARN /ARN.

L'hybridation moléculaire est :

- **Spécifique** : Sous certaines conditions expérimentales (stringence), une séquence d'ADN monobrin ne peut s'apparier qu'à la séquence qui lui est complémentaire dans le génome.
- **Réversible** : l'expérimentateur peut, en jouant sur les conditions expérimentales (essentiellement la température du milieu réactionnel) réaliser ou au contraire supprimer (dissociation) l'hybridation de deux molécules d'ADN.

#### 4.3.1. Stringence

Conditions expérimentales de température, de PH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire. La stringence est proportionnelle à la température et à l'inverse de la concentration en cations monovalents (Na<sup>+</sup> par exemple).

- Des conditions très stringentes (T° élevée, concentration en Na<sup>+</sup> faible) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique.
- Des conditions peu stringentes (T° plus faible, concentration en Na<sup>+</sup> plus élevée) permettent une hybridation moins spécifique.

#### 4.3.2. Température de fusion T<sub>m</sub> (Melting temperature)

C'est le paramètre déterminant dans la spécificité et la réversibilité de l'hybridation moléculaire. C'est la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin. Le passage d'une forme à l'autre est brutal. Ce passage se visualise très bien si on mesure la DO à 260 nm (UV) car l'ADN simple brin absorbe plus les UV que l'ADN double brin. Le T<sub>m</sub> dépend de nombreux facteurs tels que :

- La longueur du fragment d'ADN considéré,
- Sa richesse en cytosines et guanines
- La concentration en ion Na du milieu réactionnel.

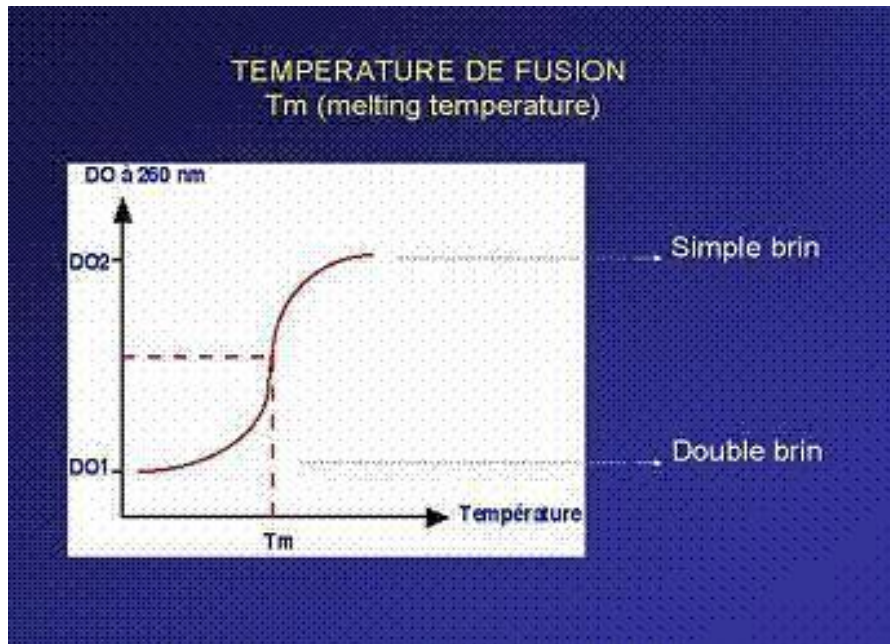


Figure 34. Courbe de dissociation de l'ADN en fonction de la température

En pratique, l'expérimentateur peut créer ou supprimer l'hybridation moléculaire en choisissant une température du milieu réactionnel inférieure, égale ou supérieure au T<sub>m</sub>.

- Si la température du milieu réactionnel est supérieure au T<sub>m</sub> → pas d'hybridation.
- Si la température est égale (en pratique légèrement inférieure) au T<sub>m</sub> → il y aura hybridation spécifique, c'est à dire à l'endroit de la séquence cible qui est complémentaire de l'oligonucléotide.
- Si la température est très inférieure au T<sub>m</sub>, il y aura hybridation sur la séquence complémentaire mais aussi hybridation non spécifique, c'est à dire à des endroits de la séquence cible qui ne sont pas parfaitement complémentaires de l'oligonucléotide. Cette situation est parfois intéressante, par exemple dans le cas d'expériences de mutagenèse dirigée.

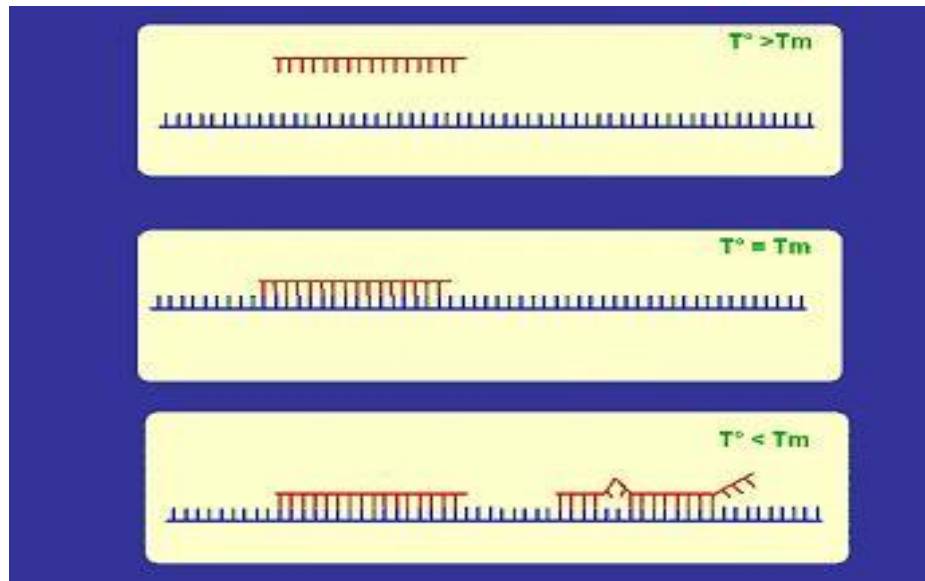


Figure 35. Différent types de l'hybridation moléculaire en fonction de la  $T_m$  et température du milieu réactionnel

#### 4.3.3. Facteurs ayant une influence sur l'hybridation

- La température : la  $T$  optimale d'hybridation est en général inférieure au  $T_m$  de la sonde
- La taille des fragments ou des sondes
- La force ionique : l'hybridation est accélérée en forte concentration saline
- La nature des hybrides : la stabilité des hybrides des plus stables aux moins stables est : ARN/ARN, ARN/ADN, ADN/ADN.

#### 4.4. Les sondes nucléiques

Ce sont petits fragments de 0,5 à 3 Kb d'acide nucléique (ADN ou ARN) antiparallèles et complémentaires d'une séquence spécifique d'un génome ou d'une banque, capable de reconnaître par hybridation et de marquer cette séquence pour permettre son identification ou son isolement.

##### 4.4.1. Les types de sondes

- Sonde génomique : fragment obtenu par coupure de l'ADN génomique.
- Sonde ADNc : sonde ADN obtenue par transcription inverse d'un ARNm (séquence codante).

- Sonde oligonucléotidiques : ADN ou ARN simple brin de 18 à 50 nucléotides synthétisé chimiquement
- Ribosonde : une sonde d'ARN

Obtention des sondes : synthèse par :

- clonage
- PCR

## 4.5. Techniques de marquage de l'ADN

### 4.5.1. Les agents de marquage

Les agents de marquage ont longtemps été des radioisotopes du phosphore ( $^{32}\text{P}$ ) (pour la méthode de Southern par exemple) ou du soufre ( $^{35}\text{S}$ ) (pour le séquençage de l'ADN). Ils permettent une détection facile des produits marqués grâce à l'autoradiographie qui consiste à imprégner un film photographique par le rayonnement radioactif. En raison de leur toxicité et des problèmes de gestion des déchets qu'ils génèrent, ils sont maintenant de plus en plus souvent remplacés par d'autres systèmes de marquages dits « froids » car non émetteurs de rayonnements radioactifs :

- les marquages à l'aide de fluorochromes : ce sont des molécules cycliques capables d'émettre un rayonnement si elles sont excitées par une source (par exemple un faisceau laser). La longueur d'onde d'émission est spécifique du fluorochrome et est détectable par un système d'analyse (séquenceur automatique).

- les marquages colorimétriques : il s'agit de réactions enzymatiques entre un substrat branché sur le nucléotide et une enzyme. Le produit de la réaction est coloré et donc détectable.

- les marquage par chimioluminescence : il s'agit alors de détecter l'émission de photons émis par des molécules luminescentes qui réagissent sur une molécule branchée (digoxigénine par exemple). Le signal est détecté par autoradiographie.

#### 4.5.2. Différents types de marquage des sondes

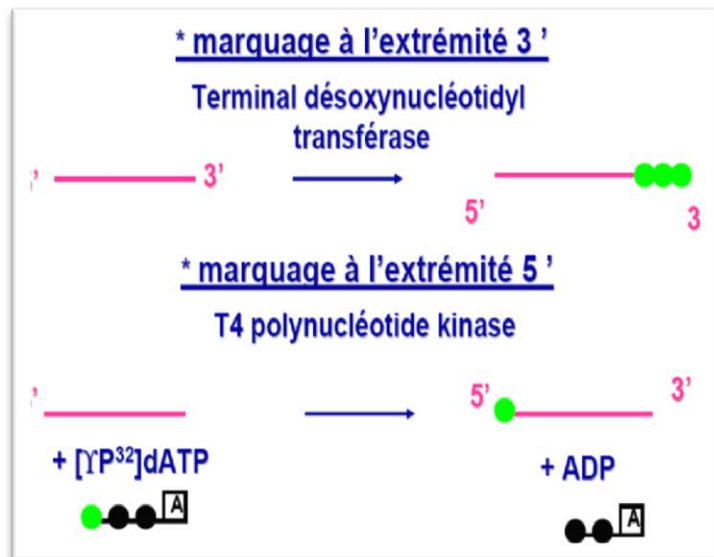
On distingue le marquage dit 'chaud' utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages 'froids' qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

**a. Les sondes radioactives (chaudes) :** dépend de la localisation du marquage ; l'extrémité ou interne à la cellule) et la nature de la séquence marquée ; simple ou double brin.

l'agent de marquage : Phosphate<sup>32</sup> (radio-isotope le + utilisé), Soufre<sup>35</sup>, H<sup>3</sup> (tritium)  
Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués.

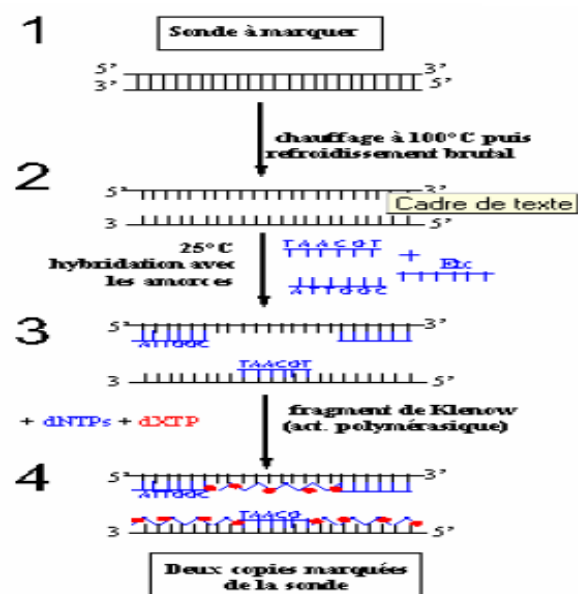
-Marquage aux extrémités (simple brin) : c'est un marquage des oligonucléotides

- marquage en 5' : T4 polynucléotide kinase ajoute un P<sup>32</sup> en 5' (sonde peu radioactive)
- marquage en 3' :
  - avec une ADN polymérase:
  - avec une exonucléase
  - avec un terminal transférase



Marquage interne (double brins) :

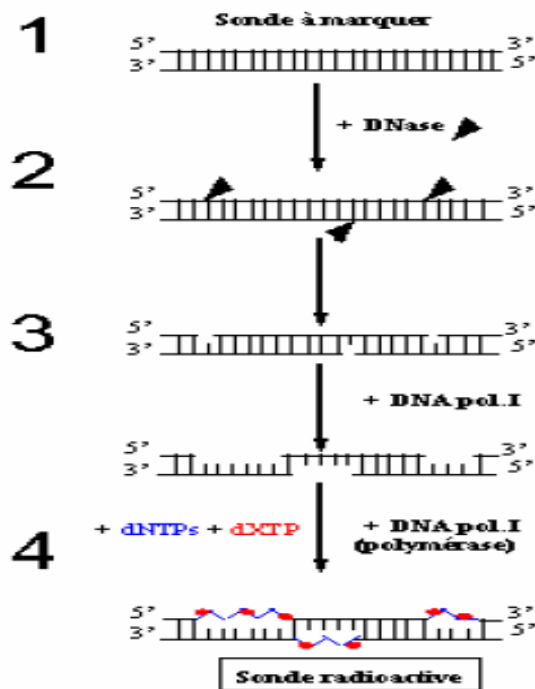
1. Separation des 2 brins
2. Ajout d'un cocktail d'oligonucleotides ; hybridation au hasard
3. Les oligonucleotides servent d'amorces a la Polymerase (fragment de Klenow de la Pol I) qui utilise des nucleotides libres dont il est marque
4. Brin neosynthetise radioactif



➤ Amorçage aléatoire (Random priming) :

➤ Translation par coupure (Nick translation) :

1. Endonuclease utilisée dans des conditions ménagées
2. La DNase génère quelques cassures aléatoires simple brin
3. Au niveau des cassures la DNA polymérase I détruit l'ADN par son activité exonucléasique (5'-3')....
4. ... et le synthétise par son activité polymérase en présence de nucléotides dont un est marqué



**NB :** les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

1. nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, maniement des sondes inconfortable
2. décroissance rapide du P32, d'où besoin de marquer les sondes fréquemment
3. Les marquages est selon la nature de la sonde :

ADNc : nick-translation ou random priming ou PCR

ARN : transcription in vitro

Oligonucléotide : 3' tailing

**b. Les sondes non radioactives (froides):**

- **direct :** nucléotide modifié par un fluorophore ; Le nucléotide portant le marqueur est incorporé directement, au cours de la synthèse du fragment d'ADN. un fluorophore ; groupe chimique qui fluoresce quand il est exposé à une longueur d'onde donnée : Fluoresceine, Cy5, Cy3, Rhodamine, Texas red, TAMRA, TET,

- **indirect :** nucléotide marqué par un reporter qui sera repéré par une molécule affine Biotine, digoxigénine et fluorescéine.

La révélation se fait par colorimétrie ou fluorescence.

**4.6. Différents types d'hybridation**

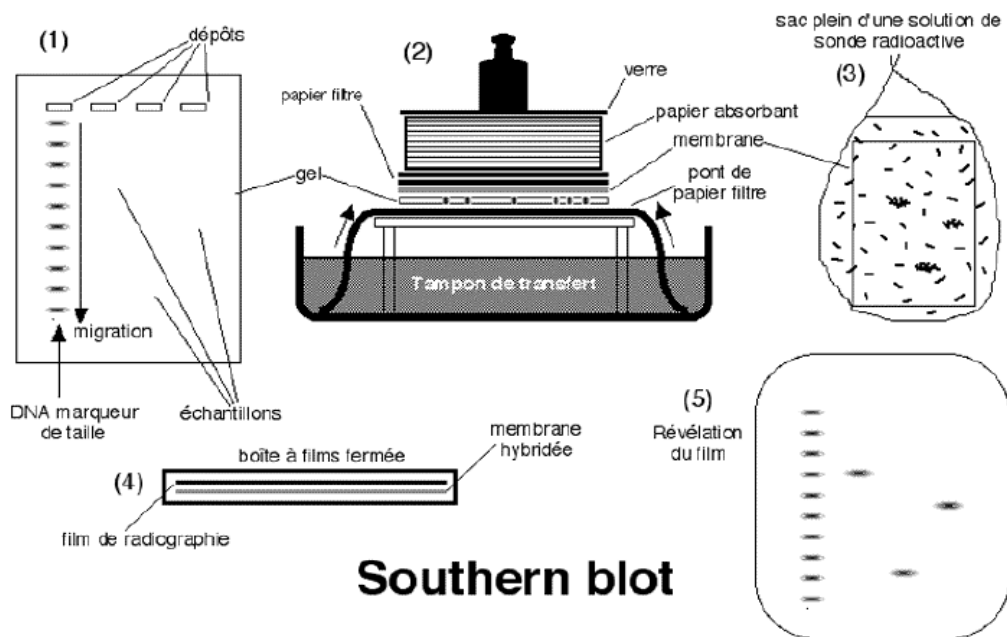
- H sur un support solide : immobilisation sur membrane (nitrocellulose, nylon) : Northern blotting **ARN/ADN**, Southern blotting **ADN/ADN**, Dot blotting et Slot-blotting : la sonde est constituée d'ADN alors que la cible peut être soit ADN ou ARN monocaténaire.
- sur verre, colonies bactériennes, chromosomes, coupe de tissus, cultures cellulaires.....
- H in situ (FISH)
- H en solution (PCR )

**4.6.1. Southern-Blot, H : ADN/ADN :** est une technique mise au point pour rechercher ou détecter spécifiquement des fragments d'ADN sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire. Les étapes successives de cette technique sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN génomique : Cette extraction s'effectue à partir des leucocytes circulants par exemple obtenus à partir de sang total.
- Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique : L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction différentes (dans le tube 1, on réalisera une digestion par l'enzyme 1 ; dans le tube 2, une digestion par l'enzyme 2 ; etc....). On peut bien entendu réaliser des digestions par deux enzymes dans un même tube. Dans ces conditions, on obtient un très grand nombre de

fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.

- Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose : Après séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin (ou bicaténaires) en fragments d'ADN monobrin (ou monocaténaires).
- Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon par exemple) : Le transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support type nylon s'effectue par simple capillarité.
- Fixation des fragments monocaténaires d'ADN sur le support souple et hybridation dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.
- Lavages et révélation : Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique pendant plusieurs jours. Le film est ensuite révélé. Les bandes d'ADN monocaténaires hybridées avec la sonde radioactive sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments. Donc le principe est :
  - Extraction ADN
  - Fragmentation
  - Electrophorèse
  - Transfert
  - Hybridation, lavages, révélation



— "SOUTHERN BLOTTING" OU HYBRIDATION ADN/ADN —

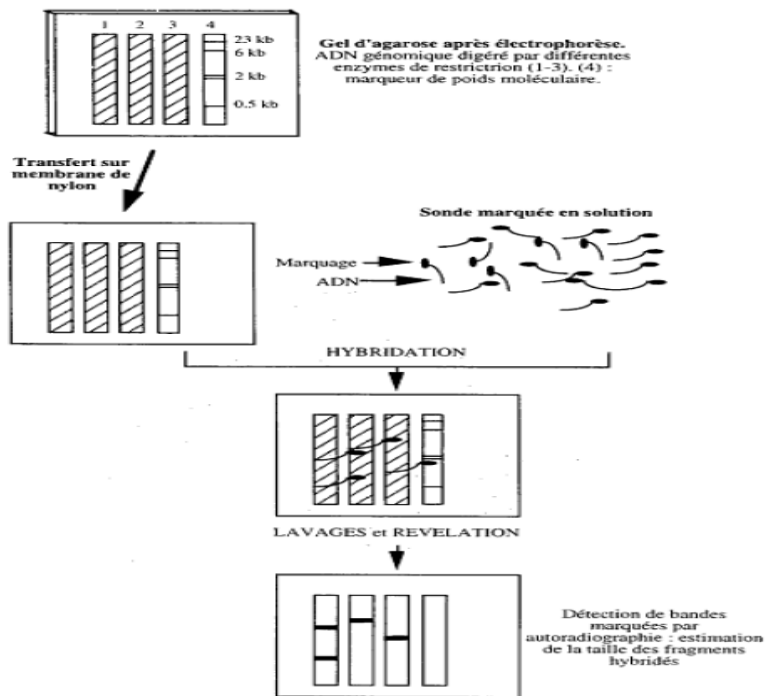
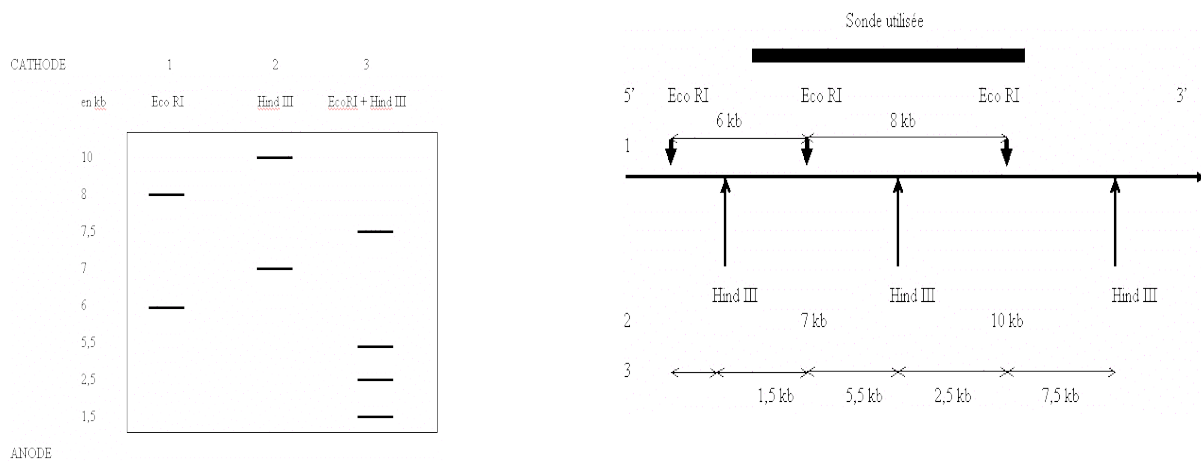


Figure 36. Technique Southern blot

#### 4.6.1.1. Les applications de la technique de SOUTHERN

1-Carte de restriction de l'ADN : Les enzymes de restriction coupent l'ADN au niveau de séquences parfaitement définies. Il est donc possible d'établir une véritable carte d'un gène donné par la technique de Southern. Cette carte porte le nom de carte de restriction. En pratique, l'ADN à étudier est réparti en différentes fractions. Chaque fraction est traitée par une enzyme de restriction ou un couple d'enzymes de restriction. Ainsi dans l'illustration ci-dessous : Dans le puits 1, on dépose l'ADN digéré par Eco RI seule; dans le puits 2, on dépose l'ADN digéré par Hind III seule et dans le puits 3, l'ADN digéré par Eco RI et Hind III. La détection des différents fragments est réalisée à l'aide d'une sonde marquée du gène étudié (voir illustration).

#### Illustration des fragments après migration    Illustration des positions sur l'ADN



2-Si on dispose de sondes spécifiques du gène à explorer. Mise en évidence des délétions dans un gène ou une zone juxta-génique. L'étendue de la délétion peut être estimée par la détermination de la taille des fragments d'ADN.

Comparaison de l'ADN de différents individus avec mise en évidence des polymorphismes de restriction.

3-En présence de mutation(s) ponctuelle(s) dans des sites de restriction, des variations dans la taille de certains fragments seront observées et ceci par exemple à l'intérieur d'une même population. Ces petites différences entre des individus dans une même population sont appelées de polymorphisme de taille des fragments de restriction (ou RFLP pour "restriction fragment length polymorphism").

4-Mise en évidence des recombinaisons entre des gènes.

**4.6.2. Northern Blot, H : ARN/ADN :** Le principe est le même que pour le Southern Blot mais ici ce sont les ARN qui sont étudiés : donc plus besoin de digérer par enzyme de restriction ( la cible est un ARN et la sonde est un ADN).

La visualisation d'un ARN par une sonde permet de :

- apprécier sa distribution dans les tissus, étudier son abondance relative
- déterminer sa taille
- détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN.

**4.6.3. Dot Blot ou Slot blotting :** Cette technique permet de quantifier un ARN ou fragment d'ADN donné sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse( la sonde est ADN et la cible soit un ADN ou ARN), les A nucléiques cibles ne sont pas séparés par électrophorèse, ils sont directement déposés sur une membrane d'hybridation soit sous formes de point(**Dot**) soit de trait ( **slot**)

**4.6.4. L'hybridation in situ (HIS) :** est une technique de laboratoire pour localiser une séquence de nucléotides connue mono-brin (ARN ou ADN) sur une coupe histologique de tissu ou sur chromosome sur la base de l'affinité entre les bases azotées complémentaires. Elle permet ainsi de localiser l'expression d'un gène donné par détection de l'ARNm correspondant ou le nombre de copie d'un gène.

**4.6.5. L'hybridation in situ en fluorescence (FISH, de l'anglais fluorescence in situ hybridization) :** est une technique de biologie moléculaire d'hybridation *in situ* utilisant des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent et utilisées sur des coupes en microscopie. Le FISH est une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments situés à l'intérieur même de la cellule (chromosomes).

## **5. L'amplification de l'ADN**

L'amplification de l'ADN peut être réalisée selon deux approches principales : in vivo et in vitro. L'amplification in vivo, également appelée clonage, consiste à insérer un fragment d'ADN cible dans un vecteur (comme un plasmide) qui est ensuite introduit dans une cellule hôte, généralement une bactérie. À travers la réplication cellulaire, le vecteur contenant l'ADN d'intérêt est multiplié, produisant ainsi de nombreuses copies de l'ADN inséré. En revanche, l'amplification in vitro repose sur la PCR (réaction en chaîne par polymérase).

Cette technique utilise des amorces spécifiques, une ADN polymérase thermostable et des cycles successifs de dénaturation, d'hybridation et d'élongation pour multiplier de manière exponentielle un fragment d'ADN ciblé. La PCR est rapide, précise et ne nécessite pas de cellules hôtes, ce qui la rend particulièrement adaptée aux analyses en laboratoire.

### **5.1. Amplification in vivo = Clonage**

Le principe du clonage est simple. Il consiste à insérer un segment d'ADN étranger dans une petite molécule capable de se répliquer de façon autonome. Ce type de molécule d'ADN est appelé un vecteur de clonage.

Ce vecteur étant propagé dans une cellule hôte. La culture de cette cellule et la purification ultérieure du vecteur permettent de produire des quantités quasiment illimitées du fragment d'ADN cloné que l'on désire étudier.

**ADN recombinant :** Il s'agit d'un ADN hybride obtenu au laboratoire par la combinaison de deux ADN appartenant à deux espèces différentes.

Les vecteurs sont donc des petits ADN dans lesquels on insère un fragment d'ADN que l'on veut étudier. Ces petits ADN sont généralement des plasmides ou des bactériophages. Il est nécessaire d'introduire ces bactériophages ou plasmides dans les bactéries pour réaliser une multiplication de ceux-ci.

#### **5.1.1. Principales étapes du clonage**

1. Préparation de l'insert à cloner (fragment d'ADN) et du vecteur : coupure du vecteur et de l'ADN à intégrer par le mm ER,
2. Intégration-légation de l'insert dans le vecteur : Cas d'un vecteur plasmidique: l'ADN est introduit dans les bactéries traitées spécialement le plus souvent par choc thermique ou par choc électrique, ligation des extrémités libres du vecteur et de l'insert
3. Transformation de l'hôte par le vecteur recombiné : introduire les vecteurs dans les hôtes
4. Sélection des hôtes recombinants : par le biais des gènes de résistances, La transformation d'une bactérie sensible à un antibiotique par des plasmides portant un gène de résistance au même antibiotique aboutit à l'apparition d'une résistance uniquement pour les bactéries ayant incorporé les plasmides.
5. Criblage : les termes de cribler et de sélectionner n'ont pas la même signification: lors de la sélection, on élimine tous les clones non intéressants, le criblage permet de

repérer le clone intéressant ou sélectionner spécifiquement les clones contenant la séquence du gène recherché (par hybridation).

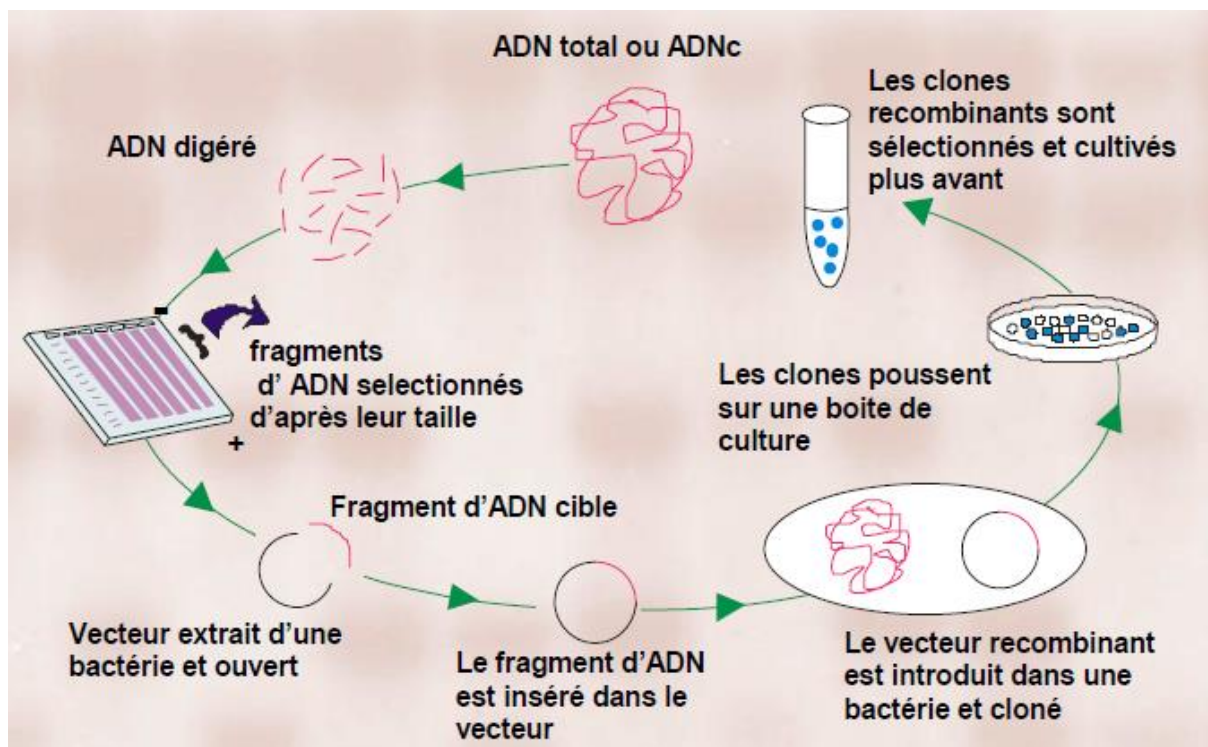


Figure 37. Les étapes du clonage in vivo

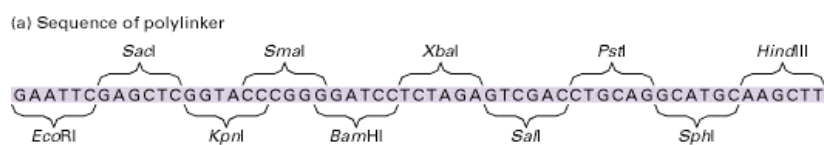
### 5.1.2. Obtention de l'ADN de l'organisme donneur

- A partir de l'ADN génomique (chromosomique) : région codante et non codante (régions promotrices, régulatrices)
- A partir de l'ARN: Principe de la "reverse transcription" Informations portées par l'ADN donneur : région codante, mais il y a aussi les régions (5' et 3' non traduites)

### 5.1.3. Les vecteurs de clonage: phages; plasmides ; cosmides ; BAC ; PAC ; YAC :

#### Propriétés des vecteurs de clonage :

- capables de répllication autonome dans une cellule hôte donnée
- possèdent un polylinker (séquence d'ADN avec +ieur sites de restriction) ou site multiple de clonage



- Possèdent des propriétés permettant la sélection de la cellule hôte (résistance ATB)
- supportent l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand



**2-Les phages :** sont des virus qui infectent les bactéries. Deux phages sont très utilisés comme vecteurs: le phage lambda et le phage M13, les séquences de ces phages utilisés comme vecteurs sont connues (40 à 50 kb d'ADN double brin). Deux parties sont individualisées dans le phage lambda:

- La tête du virus: elle renferme l'ADN viral.
- La queue du virus: elle renferme des protéines. Elle permet la fixation du virus sur la cellule-hôte bactérienne.

*Avantage:*

La taille des fragments d'ADN insérables est supérieure à celle des plasmides (40-50 kb).

La transformation des bactéries (=incorporation des phages) est plus efficace que pour les plasmides.

*Désavantage:*

Nombre de sites de restriction restreints dans le génome des phages.

Obligation d'empaqueter l'ADN.

Contraintes de taille pour l'ADN à insérer.

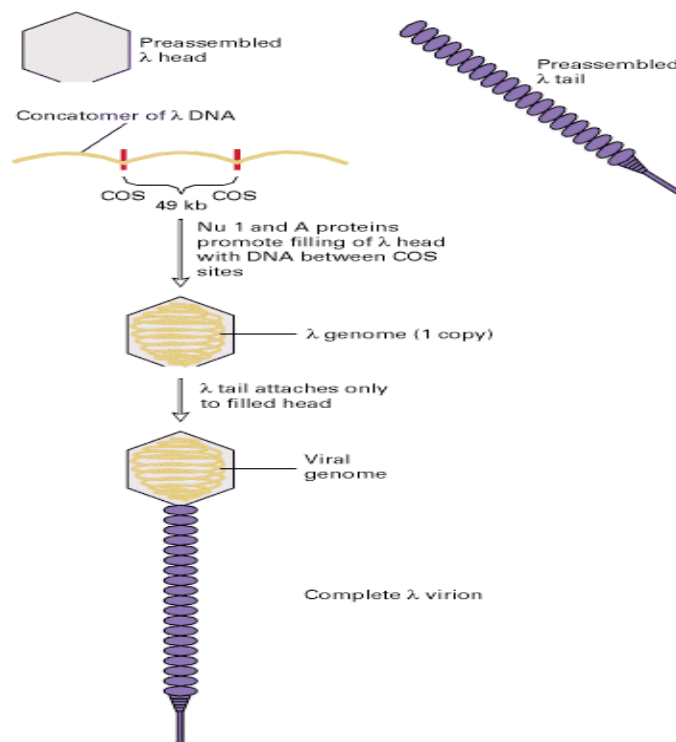


Figure 39. Structure d'un phage

**3-Les cosmides :** sont des vecteurs artificiels hybrides: phage lambda-plasmides. En fait, ils se comportent comme des plasmides avec des sites de restriction permettant l'insertion d'ADN étranger. Ils renferment également un gène de résistance aux antibiotiques

(ampicilline). De plus, un site cos d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.

*Avantage:*

La taille des fragments insérables peut atteindre 50 kb.

Leur incorporation dans les bactéries (transformation) est plus efficace que pour les plasmides.

*Désavantage:*

Obligation d'empaqueter l'ADN.

### **Autres types de vecteurs artificiels**

**Les BAC** (Bacterial Artificial Chromosome) : Peuvent cloner des fragments d'ADN de taille variant de 100 à 200kb.

**Les PAC** (P1-derived Artificial Chromosome) : Peuvent cloner des fragments d'ADN de taille variant de 100 à 200kb.

**Les YAC** (Yeast Artificial Chromosome) : Chromosome artificiel de levure).

Peuvent intégrer des fragments de grande taille (jusqu'à 400kb). Indispensables pour analyser les grands génomes (notamment, le génome humain). A noter : pour obtenir de grands fragments d'ADN, on utilise des enzymes de restriction qui ne coupent que très rarement.

Inconvénient : les fragments insérés subissent parfois des réarrangements (insertions, chimérismes, délétions) : les YAC ne peuvent être considérés comme absolument représentatifs de la région initiale introduite.

### **5.1.5. Applications des vecteurs et les cellules hôtes**

- Clonage et amplification d'une séquence d'ADN
  - Création des banques d'ADN génomiques et d'ADNc
  - Introduction d'un gène dans des cellules, des plantes ou des organismes OGM
  - Production d'ARN
- Production de protéines codées par les gènes insérés

#### **Cellules hôtes :**

- Bactéries : E. Coli : premier hôte utilisé, nombreux vecteurs plasmidiques connus et utilisables, culture en masse dans les fermenteurs, taux d'expression élevés (plusieurs g de protéine/litre) mais secrètent mal les protéines : éclatement des bactéries pas de modifications post-traductionnelles

- Levure *saccharomyces cerevisiae* modifications post traductionnelles mais pas de sécrétion, moins bon rendement
- Cellules CHO (chinese hamster ovary) culture de masse en bioréacteurs, protéines complexes mais cher et rendement plus faible.

**NB→Fabrication d'une banque d'ADN :** constitue l'ensemble des clones obtenu à partir d'un seul échantillon d'ADN. Il existe trois types de banques d'ADN:

- Banque génomique: Banque couvrant l'ensemble du génome.
- Banque d'ADN complémentaire ou ADNc: Banque constituée d'ADNc, qui ne représentent pas nécessairement la totalité des ARNm. Il s'agit plutôt d'une banque fabriquée à partir uniquement des régions transcrites du génome.
- Banque d'expression: Banque dans laquelle le vecteur porte des signaux transcriptionnels permettant à n'importe quel insert cloné de produire un ARNm et en dernier lieu, une protéine.

## **5.2. Amplification in vitro à l'aide de la réaction de polymérase en chaîne= PCR (polymerase chain reaction)**

### **5.2.1. Objectif de la PCR**

Chercher à repérer un gène particulier dans un génome entier, qui en contient jusqu'à des centaines de milliers, c'est comme chercher une aiguille dans une meule de foin. La technique de PCR permet de réaliser cet exploit en multipliant spécifiquement le segment d'ADN d'intérêt (ADN cible), donc permet de cibler un segment d'ADN particulier dans le génome et le recopier des millions de fois pour le rendre visible.

### **5.2.2. Principe**

Cette technique permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques (primer : synthétisés in vitro par des automates) complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

### 5.2.3. Composantes de PCR

1. ADN cible : purifié d'échantillon sec (sang sur papier, coupes histologiques incluses dans la paraffine, cheveux, fossiles, etc.....)
2. ADN-polymérase : la polymérase I de E.coli (labile à la chaleur), actuellement une polymérase thermostable (taq polymérase) extraite d'une bactérie vivante dans les sources chaudes thermophile (80-90°C) *Thermus aquaticus*.
3. Amorces : le choix des amorces est fondamental pour la spécificité de la région à amplifier. Elles seront synthétisées in vitro selon une séquence déterminée au préalable.
4. Nucléotides, tampon pour la concentration en Mg est critique pour la réaction d'amplification.

#### NB :

- ADN-polymérase enzyme capable de catalyser la réaction d'élongation d'un brin d'ADN complémentaire, elle est thermostable.
- Désoxyribonucléotides triphosphates : dNTP : dATP, dTTP, dCTP, dGTP.

### 5.2.4. La technique de PCR

La technique de PCR comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases:

1. Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN à T° de 92-95°C pendant 30 secondes à 1 minute.
2. Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques à T° entre 55-60°C ( cette T° est = T° d'annealing ou accrochage des amorces, est un paramètre très important pour la réussite de PCR et doit être calculée en fonction du Tm. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire pendant 30 secondes à 1 minute.
3. Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à T° de 70-72°C pendant 1-2 minutes.

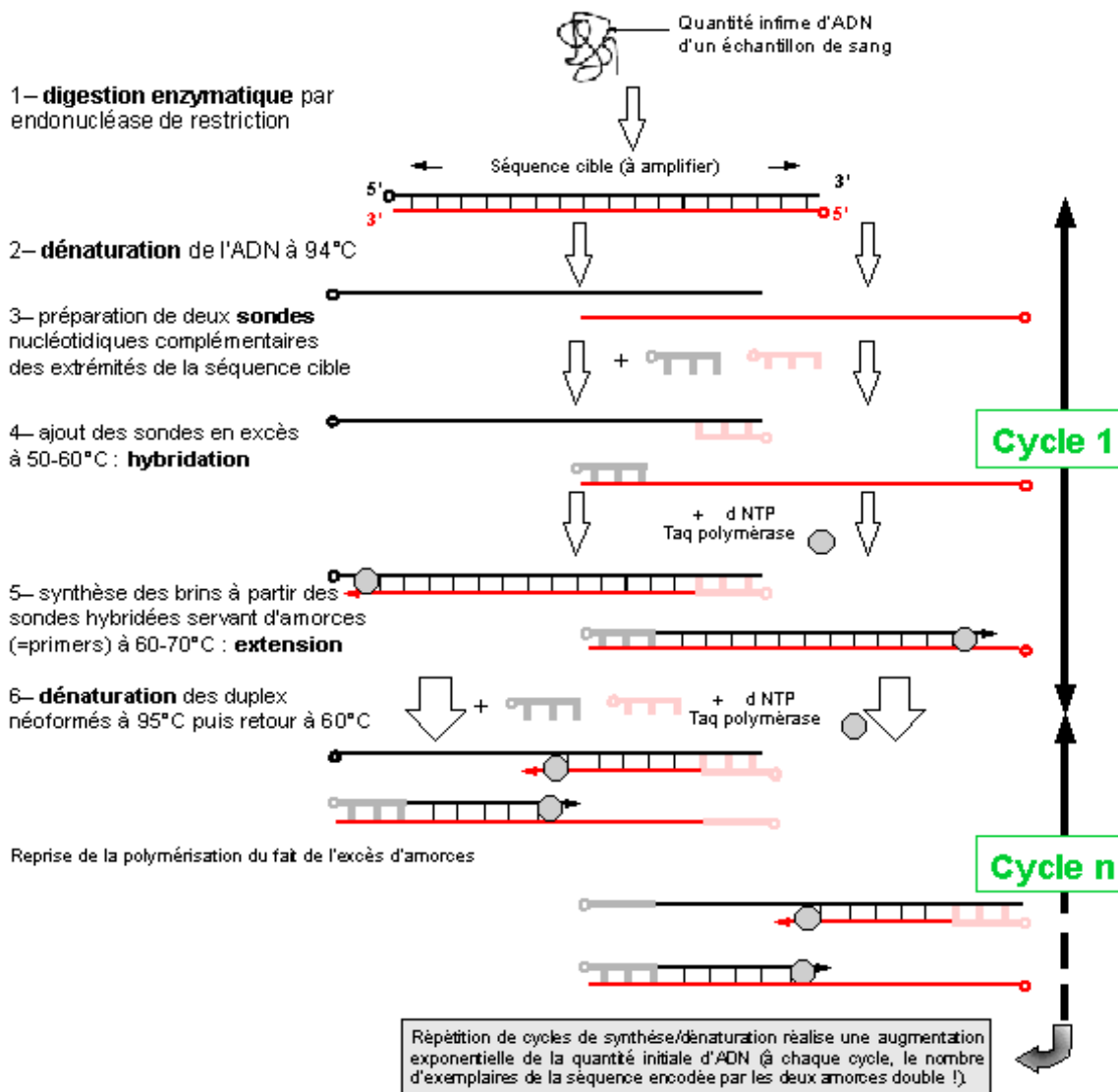


Figure 40. Technique de la PCR

Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur (Taq polymérase de *Thermus aquaticus*). Elle permet une automatisation des différents cycles (dans des appareils appelés thermocycleurs). Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40 et déterminé selon le protocole utilisé. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 105 à 106. Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres: concentration en MgCl<sub>2</sub>, concentration en amorces, spécificité des amorces etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L'introduction de logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels.

### **5.2.5. Différent types de PCR**

De nouveaux types de PCR ont été introduits. Nous citerons brièvement:

1. La PCR dite « Multiplex » pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose possède 27 exons) ou différents gènes simultanément. Il est possible d'introduire dans le milieu d'amplification des couples d'amorces spécifiques différentes sans compétition entre ces amorces.
2. La PCR dite « Nested PCR ». Elle correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR et a pour objectif d'améliorer la spécificité.
3. La PCR quantitative. Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.
4. La RT-PCR : Se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur le ADNc synthétisé. Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul mARN auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension. L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique. La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

## **6. Applications de la technologie de l'ADN recombinant**

Le fait de disposer d'un gène isolé sous la forme d'un clone (ou obtenu par PCR) ouvre diverses perspectives expérimentales:

- 1- On peut déterminer la séquence d'ADN de ce gène en utilisant la technique de séquençage.
- 2- On peut muter le gène cloné et le réintroduire dans son hôte d'origine afin d'étudier les propriétés fonctionnelles de ce gène.
- 3- On peut l'utiliser comme sonde pour la cartographie ou le diagnostic génétique.
- 4- On peut introduire le gène cloné dans un nouvel hôte afin de créer un organisme transgénique (ou génétiquement modifié) que l'on n'aurait pas pu obtenir facilement à la suite de procédures standards de croisement.

## **CHAPITRE 4. LES MARQUEURS MOLECULAIRES**

### **1. Définition**

Les marqueurs moléculaires d'ADN : Ce sont les plus étudiés. Ces marqueurs sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites.

Les marqueurs polymorphes sont des loci présentant plusieurs allèles de 2 à beaucoup qui vont servir de balises le long des chromosomes, ce sont rarement des gènes mais tous se transmettent entre générations comme des gènes.

La majorité des stratégies de marquage moléculaire détecte :

1. Des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN (comme par exemple les techniques AFLP : Amplified fragment length polymorphism, RFLP : Restriction fragment length polymorphism ou SNP :Single nucleotide polymorphism),
2. ou bien des modifications du nombre de copies de motifs répétés très courts de type microsatellites.
3. Une troisième catégorie de modifications du patrimoine génétique est liée à la présence et à l'activité des éléments transposables (transposon : est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans un génome, par un mécanisme appelé transposition.)

Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans

les programmes d'amélioration des plantes. Leurs caractéristiques permettent de les séparer en deux familles.

- Les marqueurs codominants (les bons marqueurs) et révélés individuellement dont les plus courants sont les marqueurs RFLP et microsatellites.
- Les marqueurs dominants et révélés « en masse ». Ils sont générés par des techniques de type RAPD ou AFLP qui permettent de réaliser facilement des empreintes génétiques.

Sur le plan moléculaire, on peut classer le polymorphisme en trois catégories : le polymorphisme de *séquence*, *d'insertion-délétion*, et *de nombre d'unités de répétitions* dans les régions répétées. Il n'existe pas de techniques développées spécifiquement pour le polymorphisme d'insertion-délétion, qui est de toute façon révélé par les techniques de mise en évidence du polymorphisme de séquence. Nous considérerons donc d'une part les variations de séquence, en mentionnant le cas échéant les variations d'insertion-délétion, d'autre part les variations de nombre d'unités de répétitions. En croisant les critères génétique et moléculaire, on définit les quatre familles de marqueurs présentées dans le tableau 1.

Tableau 4. Classification des techniques de marquage moléculaire

| Critère génétique   | Critère moléculaire                            |                                       |  |   |
|---|--|---------------------------------------|--|---|
|   | Séquence (et insertion-délétion <sup>a</sup> ) |                                       | Nombre de répétitions dans les ADN répétés |   |
|   | Différence recherchée                          | Technique                             | Taille de l'unité de répétition            | Technique   |
| Codominants et révélés individuellement                       | Site d'enzyme de restriction (ER)              | - RFLP<br>- PCR ciblée<br>puis CAPS   | 1 à 4 nucléotides (microsatellites)        | PCR ciblée puis électrophorèse en acrylamide ou agarose   |
|   | Conformation                                   | PCR ciblée puis SSCP                  |  |   |
|   | Stabilité                                      | PCR ciblée puis D/TGGE                |  |   |
| Dominants et révélés « en masse » (« empreintes génétiques ») | Site d'hybridation d'une amorce arbitraire     | MAAP :<br>- RAPD<br>- AP-PCR<br>- DAF | 1 à 4 nucléotides (microsatellites)        | ISSR (amorce microsatellite + quelques bases arbitraires) |
|   | Sites ER et amorce arbitraire                  | - AFLP<br>- tec MAAP                  | 5 à > 100 nucléotides (minisatellites)     | Southern avec sonde minisatellite                         |

## 2. Différents types de marqueurs moléculaires

### 2.1. Le polymorphisme de longueur des fragments RFLP : Restriction fragment length polymorphism ou SNP :Single nucleotide polymorphism

L'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction a été l'une des premières techniques à être largement utilisée pour détecter de la variation au niveau de la séquence d'ADN. Le principe de la RFLP réside dans la possibilité de comparer des profils de bandes, générées après digestion de molécules d'ADN d'individus différents par des enzymes de restriction. Diverses mutations peuvent avoir affecté de façon variable les molécules d'ADN, produisant des fragments de longueurs variables. Ces différences dans les longueurs de fragments peuvent être vues après électrophorèse sur gel, hybridation et visualisation.

#### Les étapes expérimentales sont les suivantes:

1. Extraction de l'ADN :génomique, mitochondrie, chloroplastes)
2. Digestion par enzyme de restriction et électrophorèse sur gel :
3. Transfert d'ADN selon la méthode de Southern (feuille de nylon ou de nitrocellulose), dans cette méthode, le gel est tout d'abord dénaturé dans une solution basique et placé dans un bac. Une membrane poreuse de nylon ou de nitrocellulose est étalée sur le gel, et un poids posé sur l'ensemble. Tous les fragments de restriction présents dans le gel se transfèrent sur la membrane sous forme simple brin par capillarité.
4. Hybridation d'ADN : les fragments séparés sont hbridés avec des sondes d'ADN radioactif ou méthode biochimique.

#### Les sources de sondes ADN comprennent:

- *Des banques génomiques* —l'ADN total de la plante est digéré par des enzymes de restriction et les fragments individuels clonés dans un vecteur bactérien ou viral. Les sondes convenables sont sélectionnées à partir de cette banque "anonyme" pour l'analyse RFLP.
- *Des banques d'ADNc (ADN complémentaires)* — L'ARNm est isolé et "transcrit" en ADN, en utilisant l'enzyme transcriptase réverse. L'ADNc ainsi obtenu est cloné dans des vecteurs et utilisé comme une banque de sondes dans l'analyse RFLP.
- *De l'ADN cytoplasmique* — des banques d'ADN mitochondrial et chloroplastique

Du fait de la spécificité d'espèce montrée par beaucoup de sondes simple-copie, des banques génomiques ou d'ADNc doivent souvent être construites pour les études portant sur de nouvelles espèces. Cela peut être très consommateur en temps. Cependant, vu les

connaissances actuelles sur des séquences et gènes communs, on peut souvent utiliser des genres proches.

- Des séquences répétitives de type minisatellite ou microsatellite ont également une application particulière dans l'analyse RFLP. ce sont des portions existes sur l'ADN qui ne codent aucune protéine, sont très variables selon les individus et permettent donc d'établir les empreintes génétiques. Ce sont des séquences répétées d'un "motif" de base.

Les minisatellites : Ces motifs mesurent de 10 à 60 pb, se trouvent en tandem et se produisent en de nombreux locus du génome. Comme les polymorphismes sont liés au nombre d'unités répétées, les séquences sont aussi appelées « cores » et VNTR pour "variable number of tandem repeats". Une sonde soigneusement sélectionnée peut détecter des fragments de restriction qui représentent un grand nombre de locus. Les profils des fragments de restriction portant des minisatellites (encore appelées empreintes génétiques, ou "DNA fingerprint" en anglais) permettent de discriminer clairement différents individus.

Les microsatellites : Ces motifs constituent des séquences répétées en tandem courtes, appelées aussi STR, pour *Short Tandem Repeats*, en anglais. La plupart des séquences répétées sont des répétitions de 4 nucléotides, mais les longueurs de deux à cinq bases sont aussi étudiés. Exemple : CTGG CTGG CTGG CTGG CTGGCTGG

En récapitulation : Les minisatellites sont

- Poly-alléliques : grand nombre d'allèles différents à un locus donné (en fonction du nombre de répétitions de la séquence)
- Multi-locus : une même séquence de minisatellite va se trouver à différents endroits dans le génome (à chaque fois avec différents allèles possibles)

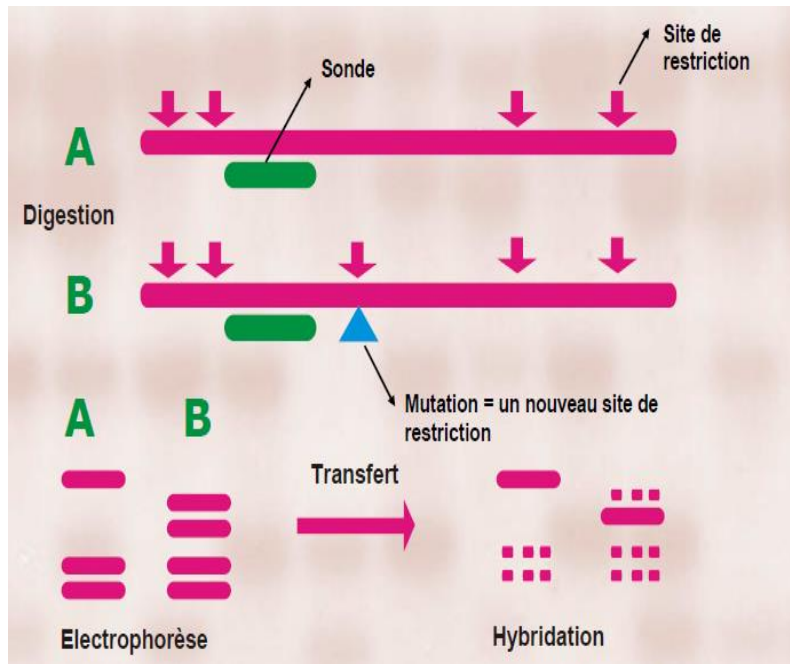
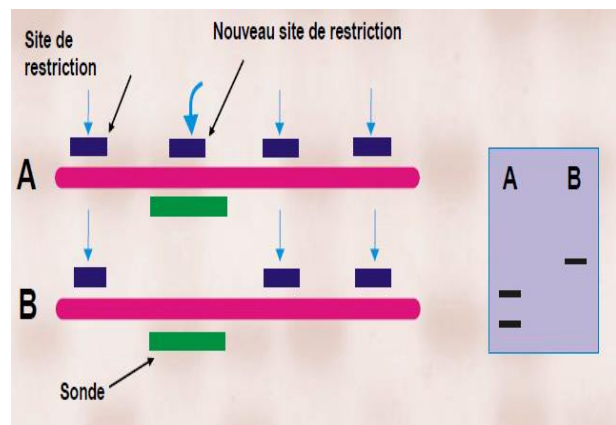
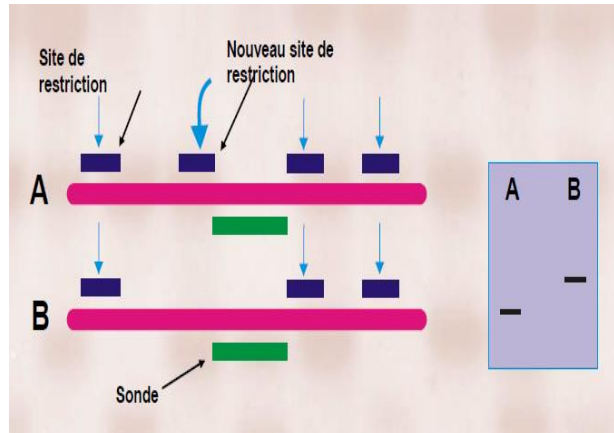


Figure 41. Technique de la RFLP

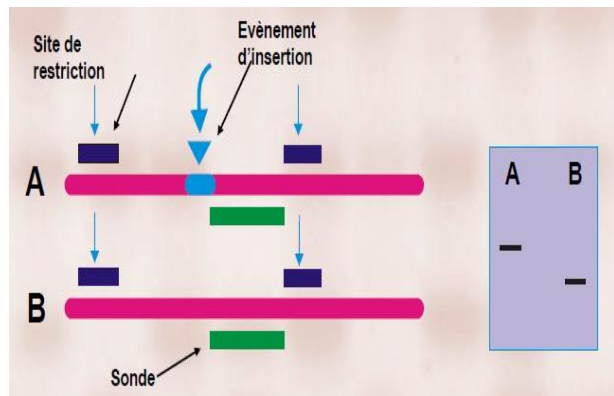
Une mutation crée un nouveau site de restriction dans la région cible. Deux bandes plus courtes sont alors détectées sur le film autoradiographique



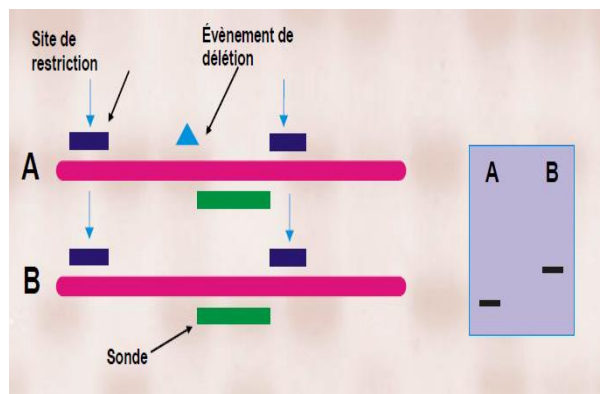
Une mutation crée un nouveau site de restriction entre deux sites de restrictions flanquants, produisant ainsi un fragment de restriction plus court.



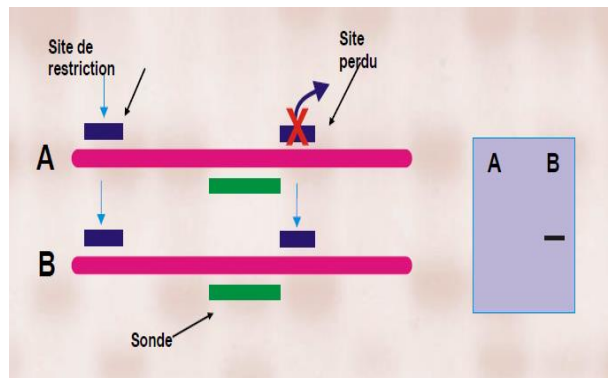
Une insertion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus grand



Une délétion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus court



Un des sites de restriction flanquants est changé ou perdu par mutation ou délétion. En conséquence, le fragment de restriction est modifié



### **2.1.1. Avantage des RFLP**

1. Méthodologie très robuste, bien transférable entre laboratoires
2. Hérité de façon codominante et, de ce fait, permet d'estimer l'hétérozygotie
3. Pas d'information de séquence requise
4. Puisque basée sur une homologie de séquence, fortement recommandée pour des analyses phylogénétiques entre espèces apparentées
5. Bien adaptée pour la construction de cartes de liaison génétique
6. Marqueurs spécifiques de locus, ce qui permet des études de synténie
7. Pouvoir discriminant – au niveau de l'espèce ou de la population
8. (sondes simple copie), ou au niveau individuel (sondes multicopies)
9. Simplicité – à condition d'avoir des sondes adaptées
10. disponibles, la technique peut facilement être appliquée à n'importe quelle plante

### **2.1.2. Inconvénients des RFLP**

1. Grandes quantités d'ADN nécessaires
2. Automatisation impossible
3. Faible niveau de polymorphisme chez certaines espèces
4. Peu de locus sont détectés par expérimentation
5. Nécessite une banque de sondes appropriée
6. Consommateur en temps, spécialement avec des sondes simple-copie
7. Coûteux
8. Nécessite la distribution de sondes entre des laboratoires ven collaboration
9. Technicité demandée modérée
10. Peut nécessiter différentes combinaisons sonde / enzyme

### **2.1.3. Applications**

1. Cartographie et clonage positionnel
1. Diagnostic des maladies génétiques
3. Médecine légale
4. Contrôles de filiation

5. Sélection assistée par marqueur génétique : utilisation de marqueurs associés aux caractères d'intérêt. Pas besoins d'attendre l'expression de ces caractères pour savoir le résultat.

6. Gestion de la variabilité génétique

7. Apparentements génétiques et histoire de la domestication

En résumé la RFLP, c'est une technique permet un polymorphisme de séquence révélé individuellement et détecte des changements de longueur dans des molécules d'ADN cibles après digestion par les ER.

Les bandes RFLP détectées en hybridant l'ADN cible par une sonde d'ADN, les profils de ces bandes reflètent différents évènements mutationnels au site d'hybridation de la sonde ou sa région avoisinante.

La RFLP est une technique très robuste, mais consommatrice en temps et qui demande un investissement technique.

## **2.2. Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN par PCR : Technique RAPD "Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

La technique RAPD est basée sur la méthode PCR. L'amplification de l'ADN génomique est, cette fois ci, réalisée à partir d'amorces de séquences aléatoires (10 bases, environ), utilisées seules ou par couples. Lorsqu'une seule amorce aléatoire est utilisée, l'amplification a lieu une fois celle-ci se fixe sur 2 sites complémentaires peu distants (maximum théorique de la PCR : 3000 pb).

Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce. Les amorces constituent donc les marqueurs. Pour l'ensemble du génome, une dizaine de fragments sont en moyenne amplifiés puis séparés par électrophorèse.

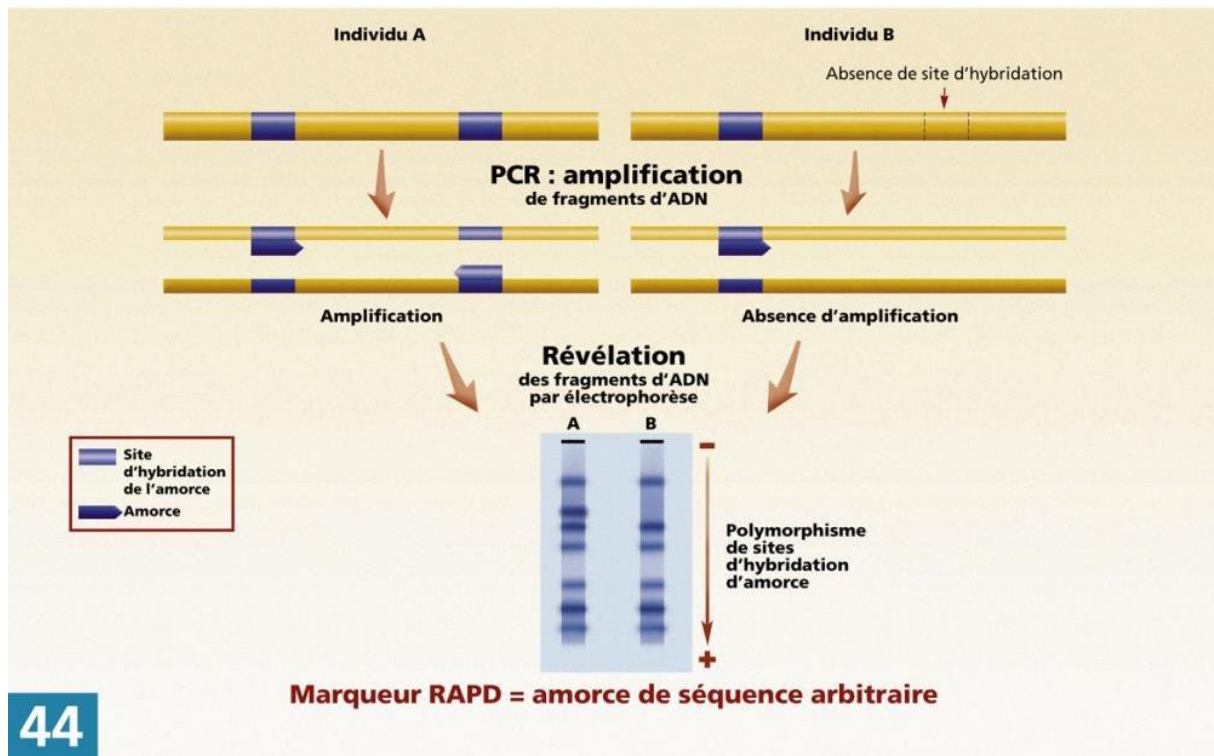


Figure 42. Technique de marqueur moléculaire RAPD

### 2.3. Les marqueurs AFLP : Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (Amplification Fragment Length Polymorphism).

L'AFLP est une méthode d'analyse hautement sensible utilisée fréquemment dans l'analyse de la diversité génétique. Elle combine les techniques RFLP et l'amplification de l'ADN par PCR. On distingue les étapes suivantes :

- L'ADN génomique est coupé par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées, sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification.
- Une première amplification (pré-amplification) est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction.
- La deuxième amplification (amplification sélective) utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3 nucléotides). Ainsi, seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine.

➤ Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de l'amplification sélective.

Cette technique est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire.

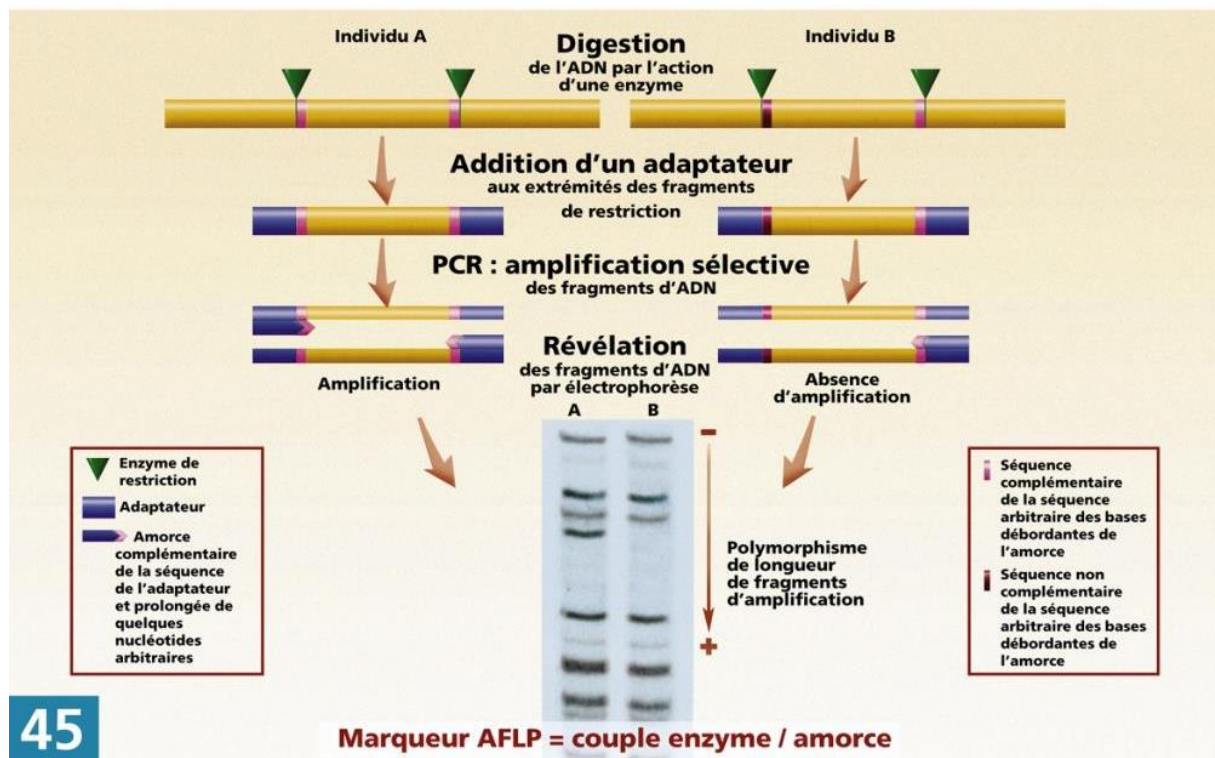


Figure 43. Technique de marqueur AFLP

## CHAPITRE 5. SEQUENÇAGE DES MACROMOLECULES

### 1. Définition

Le séquençage consiste en la détermination de l'ordre linéaire des composants d'une macromolécule, les séquences moléculaires. C'est une technique de détermination de l'ordre des acides aminés ou des nucléotides au sein d'un polymère. Par exemple avec les acides aminés d'une protéine, nucléotides d'un acide nucléique, un génome, etc.

#### 1.1. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN, détermine l'ordre des quatre blocs de construction chimiques - appelés "bases" (paires de bases) - qui composent la molécule d'ADN (aux niveaux génétiques).

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire. Déterminer cette séquence est donc utile aussi bien pour les recherches visant à savoir comment vivent les organismes que pour des sujets appliqués. En médecine, elle peut être utilisée pour identifier, diagnostiquer et potentiellement trouver des traitements à des maladies génétiques et à la virologie. En biologie, l'étude des séquences d'ADN est devenue un outil important pour la classification des espèces.

La séquence indique aux scientifiques le type d'informations génétiques contenues dans un segment d'ADN particulier. Par exemple, les scientifiques peuvent utiliser les informations de séquence pour déterminer quels segments d'ADN contiennent des gènes et lesquels portent des instructions réglementaires, activant ou désactivant les gènes. De plus, et c'est important, les données de séquence peuvent mettre en évidence des changements dans un gène qui peuvent provoquer une maladie.

Le génome humain contient environ 3 milliards de paires de bases qui expliquent les instructions pour créer et maintenir un être humain.

Les chercheurs sont désormais en mesure de comparer rapidement et à moindre coût de grandes étendues d'ADN - 1 million de bases ou plus - provenant de différents individus. De telles comparaisons peuvent fournir une énorme quantité d'informations sur le rôle de

l'hérédité dans la vulnérabilité aux maladies et en réponse aux influences environnementales. En outre, la capacité de séquencer le génome plus rapidement et à moindre coût crée un vaste potentiel pour les diagnostics et les thérapies. Certains grands centres médicaux ont commencé à utiliser le séquençage pour détecter et traiter certaines maladies. Dans le cancer, par exemple, les médecins sont de plus en plus en mesure d'utiliser des données de séquence pour identifier le type particulier de cancer d'un patient. Cela permet au médecin de faire de meilleurs choix de traitements.

La comparaison des séquences génomiques de différents types d'animaux et d'organismes, tels que les chimpanzés et les levures, peut également fournir des informations sur la biologie du développement et de l'évolution.

## **2. Méthodes de séquençage**

**2.1. Le séquençage classique par la méthode de Sanger :** Cette méthode repose sur l'incorporation de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués, qui arrêtent la synthèse de l'ADN à des positions spécifiques. L'ADN est ensuite analysé par électrophorèse pour déterminer la séquence.

**2.2. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) :** Cette approche moderne permet de séquencer de grandes quantités d'ADN rapidement et à moindre coût. Elle repose sur des technologies parallèles à haut débit qui génèrent des millions de courtes lectures d'ADN, assemblées ensuite par des outils bioinformatiques.

## CONCLUSION

La génétique moléculaire constitue un pilier essentiel de la biologie moderne, en apportant des réponses concrètes aux questions fondamentales sur l'hérédité, la variabilité génétique et l'expression des gènes. À travers l'étude approfondie de la structure des macromolécules, des mécanismes moléculaires clés comme la réplication, la transcription et la traduction, ainsi que des processus régulant l'expression des gènes et le développement, ce cours permet de comprendre les bases sur lesquelles repose la vie à l'échelle moléculaire.

L'exploration des polymorphismes moléculaires et des outils d'analyse associés, tels que RFLP, PCR, AFLP, RAPD, microsatellites et le séquençage, offre aux étudiants des compétences techniques et pratiques indispensables pour analyser et interpréter la diversité génétique. Ces connaissances sont aujourd'hui cruciales non seulement pour la recherche fondamentale, mais aussi pour des applications en médecine, en biotechnologie et dans le domaine des sciences de l'environnement.

En conclusion, ce cours fournit aux étudiants une compréhension globale et intégrée des mécanismes moléculaires de la génétique, tout en les préparant à maîtriser les outils analytiques modernes. Cela leur permettra de contribuer efficacement aux avancées scientifiques et technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire et d'aborder les défis de la génétique contemporaine avec rigueur et expertise.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andrews, A.T. 1981. Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Clarendon Press.
2. Camus, G. 2009. L'électrophorèse |Planet-Vie. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/l-electrophorese> (accessed 21 December 2024).
3. De Meeûs, T. 2012. 1. Qu'est-ce qu'un marqueur génétique ? Initiation à la génétique des populations naturelles : Applications aux parasites et à leurs vecteurs. IRD Éditions, Marseille. p. 19–28
4. Félix, M.-A. 2009. Variations génétiques et environnementales dans un réseau de signalisation intercellulaire. *médecine/sciences* 25(8–9): 705–712. doi: 10.1051/medsci/2009258-9705.
5. Gautheret, P. 2012. Biologie Moléculaire L2 (BIOL201) Cours de D. Gautheret - Recherche Google.
6. GNIS-Pédagogie. 2024. Ressources pédagogiques sur les semences, les plantes et leurs utilisations. SEMAE Pédagogie. <https://www.semae-pedagogie.org>.
7. Housset, C., and A. Raisonnier. 2010. Biologie Moléculaire. [https://www.academia.edu/35661998/Universit%C3%A9\\_Pierre\\_et\\_Marie\\_Curie](https://www.academia.edu/35661998/Universit%C3%A9_Pierre_et_Marie_Curie) .
8. JAMET, P. 2017. GÉNET - Les outils de génétique moléculaire. [https://genet.univ-tours.fr/gen001300\\_fichiers/GEN05D2/GEN05D2EC2.HTM](https://genet.univ-tours.fr/gen001300_fichiers/GEN05D2/GEN05D2EC2.HTM) (accessed 21 December 2024).
9. Kaisermann, J., M. Pawlowski, and Y. Mendel. Techniques de biologie moléculaire I. Cambridge Stanford Books.
10. Khan Academy. 2024. Les différents niveaux de structure protéique (leçon). Khan Acad. <https://fr.khanacademy.org/science/biologie-a-l-ecole/x5047ff3843d876a6:bio-6e-annee-sciences-de-base/x5047ff3843d876a6:bio-6-1h-les-proteines/a/orders-of-protein-structure> (accessed 21 December 2024).
11. La génomique. SEMAE Pédagogie. <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/genomique/> (accessed 21 December 2024).
12. Les marqueurs moléculaires. Les marqueurs moléculaires. SEMAE Pédagogie. <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/marqueurs-moleculaires/> (accessed 21 December 2024).
13. Lionnet Timothée, and S. Vincent. 2005. Biologie moléculaire résumé 01 - Introduction à la Biologie Moléculaire et Vincent - Studocu. <https://www.studocu.com/fr/document/universite-de-montpellier/biologie-moleculaire/biologie-moleculaire-resume-01/9511847>.
14. lunardi, joel. 2012. Méthode d'étude en biologie moléculaire - Chapitre 8 : Méthodes d'études Professeur Joël LUNARDI - Studocu. <https://www.studocu.com/row/document/beirut-arab-university/medical-biochemistry/methode-d-etude-en-biologie-moleculaire/5070990>.

15. Michel, V. 2016. Polymorphisme génétique et variation. *Encycl. Environ.* <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/polymorphisme-genetique-variation/> (accessed 21 December 2024).
16. Moullet, O., D. Fossati, F. Mascher, A. Schori, and R. Guadagnuolo. 2008. Molecular markers as tools in cereals breeding. *Rev. Suisse Agric.* 40: 133–138.
17. Pascual, L., M. Ruiz, M. López-Fernández, H. Pérez-Peña, E. Benavente, et al. 2020. Genomic analysis of Spanish wheat landraces reveals their variability and potential for breeding. *BMC Genomics* 21(1): 122. doi: 10.1186/s12864-020-6536-x.
18. Seve, P.M. 2012. Les acides aminés : Propriétés Physico-chimiques. : 29.
19. SIMON, M. 2011. Structures des protéines. <https://www.cours-pharmacie.com/biochimie/structures-des-proteines.html> (accessed 21 December 2024).
20. Tagu, D. 1999. *Principes des techniques de biologie moléculaire.* Editions Quae.
21. Tagu, D., and C. Moussard. 2006. *Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée.* Editions Quae.
22. takween. 2024. *Sciences vie. Biochimie, Biologie moléculaire et biotechnologies.* <https://www.takween.com/> (accessed 17 December 2024).
23. Thiry, M., N. Bourmeyster, J. Dommes, M. Lebrun, P. Rigo, et al. 2016. *Biologie moléculaire: exercices et méthodes.* Dunod, Paris, France.
24. Vienne, D. de. 1998. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales.* Editions Quae.
25. Zewert, T.E., and M.G. Harrington. 1993. Protein electrophoresis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4(1): 3–8. doi: 10.1016/0958-1669(93)90024-Q.