

TP de l'UE BCH 3025 : Biologie Moléculaire et Génie Génétique

(Année Académique 2021/2022)

Pr BIGOGA/Pr NJAYOU/Pr DJUIDJE/Dr PECHANGOU/Dr FONKOUA

TP N°1 : Introduction aux techniques de Biologie moléculaire et organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire

- 1) Importance des techniques de biologie moléculaire
- 2) Organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire
 - a. Bonnes pratiques
 - b. Equipements
 - c. Matériel et consommables
 - d. Préservation du matériel génétique
- 3) Les techniques d'extraction du gene
 - a. A partir d'un échantillon liquide
 - b. A partir d'un de tissu
- 4) Les techniques d'amplification du gène
- 5) Les techniques de purification du gène
- 6) Les techniques de quantification du gène

TP N°2 : Extraction et coloration de l'ADN

Extraction de l'ADN d'un matériel végétal (oignon) et mise en évidence du constituant de la méduse

N.B.

TP N°1 : dans le cadre du TPE, l'étudiant devra se présenter en salle de TP avec ses recherches présentées sous forme de devoir dans une chemise cartonnée.

TP N°2 : l'étudiant devra se présenter en salle de TP avec son cahier de préparation.

FICHE DE TRAVAUX PRATIQUES N°1 :

Généralités sur les outils et techniques de Biologie Moléculaire (OTBM) et présentation d'un laboratoire de Biologie Moléculaire

Introduction

Les outils de biologie moléculaire (OTBM) regroupent un ensemble de techniques de pointe utilisées pour les analyses biologiques d'organismes vivants et la compréhension des mécanismes de la cellule à l'échelle des molécules. Initialement développés et appliqués en laboratoire, ces outils ont trouvé de nombreuses applications dans différents secteurs (médecine, défense, génétique humaine, environnement...)

Les outils de biologie moléculaire, au sens large, sont les outils permettant d'isoler, de manipuler ou encore de caractériser les composants moléculaires d'une cellule ou d'un ensemble de cellules. Les composants moléculaires classiquement étudiés sont l'ADN et l'ARN mais peuvent également inclure les protéines de structure (constituants cellulaires) ou de fonction (enzymes responsables de la dégradation des contaminants) et les acides gras (constituants de la membrane des cellules) (Figure 1).

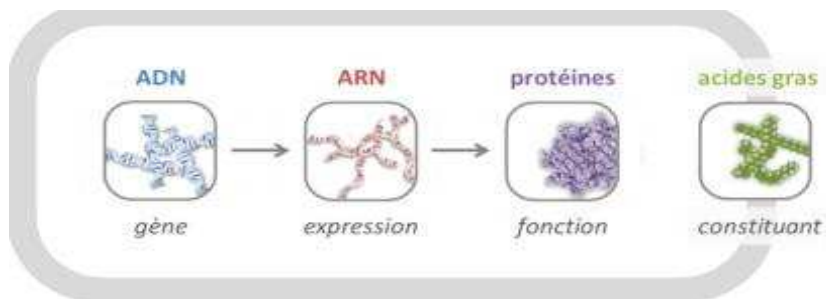
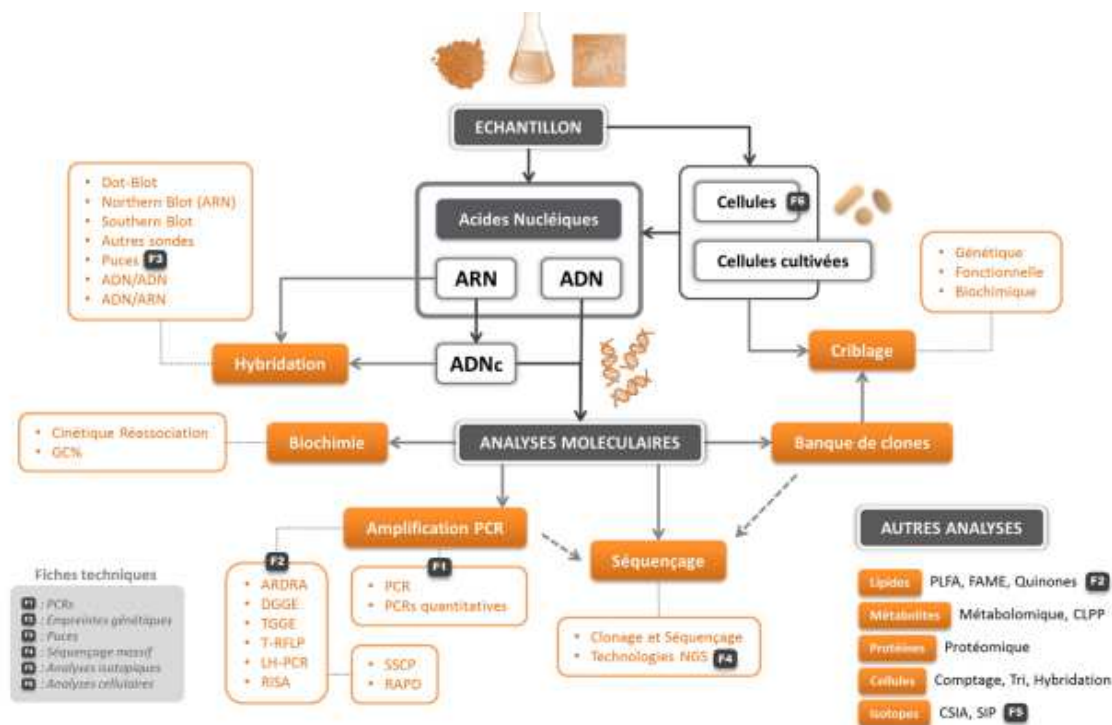


Figure 1

Les analyses s'effectuent classiquement après une étape d'extraction et de purification des composants moléculaires des cellules dans la chaîne analytique de traitement des échantillons. La **séance 2** sera consacrée à l'extraction du matériel génétique à partir d'un échantillon végétal et d'un échantillon animal.

I-Résumé des outils et techniques (Figure2)



La figure 2 ci-dessus présente les différents outils et les étapes lors des études expérimentales portant sur les acides nucléiques ou leurs produits d'expression (protéines)

Ces techniques peuvent être regroupées en

1. Technique d'amplification (PCR et clonage)
2. Technique de séquençage
3. Technique de séparation

Technique d'amplification (PCR et Clonage)

La PCR (*Polymerase Chain Réaction*, Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une méthode d'amplification génique, mise au point par le prix Nobel de Chimie Kary B. Mullis (1986), qui permet de dupliquer de manière exponentielle une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité. C'est une méthode essentielle dans l'analyse des acides nucléiques (ADN et ARN) qui est utilisée pour détecter, quantifier ou simplement amplifier des séquences ou gènes d'intérêt à partir d'un mélange complexe de molécules d'acides nucléiques. Le principe de la méthode est décrit dans la **Figure 3**.

Les produits générés par PCR dépendent de la spécificité de la séquence des amorces oligonucléotidiques choisies pour amplifier la région d'intérêt. Ces amorces spécifiques sont des séquences de nucléotides synthétisés à façon. Cette technique permet d'amplifier des morceaux de gènes, des gènes entiers ou encore un ensemble de plusieurs gènes.

La PCR peut être appliquée à

- L'amplification de marqueurs taxinomiques (identité des cellules : eg, 16S, IGS) pour déterminer la structure d'une communauté.

- L'amplification de gènes de fonction (eg, dégradation) pour déterminer ou quantifier leur présence ou leur activité.

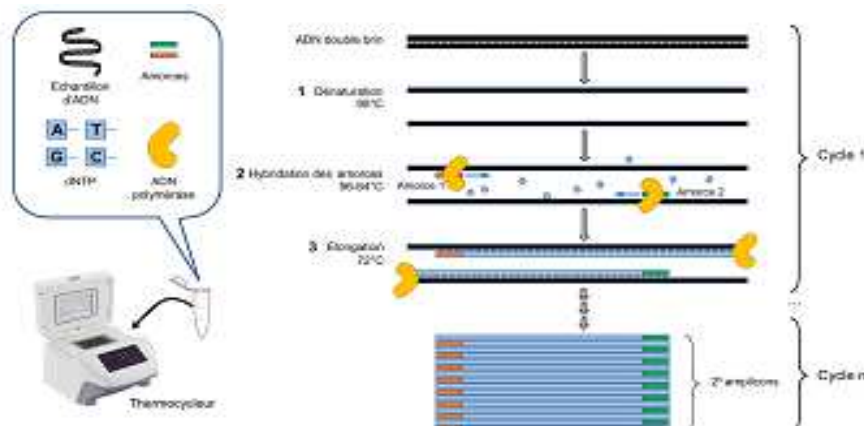


Figure 3 : Principe de la PCR. La technique est basée sur la répétition de cycles de transition de température qui alternent après une phase de dénaturation initiale des molécules d'ADN (1'). Le mélange réactionnel contient l'ADN ou l'ADNc, la polymérase, les nucléotides, et les amorces spécifiques permettant d'amplifier la région d'intérêt. Le nombre de cycles (n), constitués d'étapes de dénaturation (1), hybridation (2), élongation (3) est généralement supérieur à 30 et conduit à l'obtention théorique de 2^n molécules.

Les techniques de PCR classique (dite à point final) ne permettent pas de quantifier précisément le nombre de séquences d'intérêt. Pour cela, des techniques de PCR quantitatives ont été développées (qPCR, RT-qPCR, dPCR).

CLONAGE : amplification du matériel génétique en utilisant des microorganismes capables de se multiplier malgré la présence de matériel génétique étranger.

Technique de séquençage

Le séquençage Sanger, également connu sous l'expression « séquençage par terminaison de chaîne » ou « séquençage dideoxy », fait référence en matière de séquençage de l'ADN depuis son invention dans les années 1970. Ce processus est basé sur la détection des nucléotides marqués terminateurs de chaîne qui sont incorporés par l'ADN polymérase lors de la réplification d'une matrice.

La technique « dideoxy » est basée sur la synthèse des brins d'ADN qui sont complémentaires à un brin d'ADN matrice. La réaction de séquençage fait appel à des **désoxynucléoside triphosphates (dNTP) normaux** et à des **didésoxynucléoside triphosphates (ddNTP) modifiés pour l'élongation de brin**. Les ddNTP sont chimiquement modifiés par un marqueur fluorescent et par un groupement chimique inhibant la formation de liaisons phosphodiester, ce qui entraîne la fin de l'extension de l'ADN par l'ADN polymérase à chaque fois qu'un ddNTP est incorporé. Les fragments d'ADN obtenus sont soumis à une électrophorèse capillaire durant laquelle les fragments migrent à différentes vitesses à travers une matrice de gel en fonction de leur taille. Chacun des quatre ddNTP modifiés est porteur d'un marqueur fluorescent distinct. Le signal fluorescent émis par chaque colorant fluorescent excité détermine l'identité du nucléotide dans la matrice d'ADN d'origine.

Séquençage Sanger vs. Séquençage à haut débit (nouvelle génération)

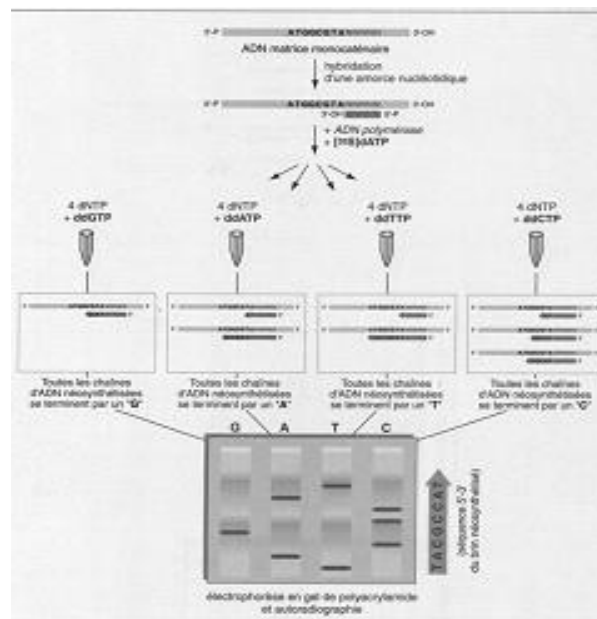
Le séquençage de l'ADN n'a pas cessé d'évoluer grâce à l'adaptation réussie du séquençage Sanger. L'établissement des techniques de séquençage seconde génération (NGS) et troisième génération a présenté des avantages substantiels par rapport à la méthode « dideoxy » traditionnelle. Le séquençage Sanger reste cependant très répandu dans ce domaine car il présente plusieurs avantages distincts. Il est spécifiquement préférable au NGS pour :

- le séquençage de gènes simples
- le séquençage économique d'échantillons simples
- le séquençage de vérification pour une mutagenèse dirigée ou la présence d'inserts clonés
- l'analyse de fragments plus longs (d'une longueur avoisinant 1000 pb) dans certains cas
- le fait d'être moins sujet aux erreurs que le NGS dans certains cas

Le séquençage nouvelle génération est souvent considéré comme étant supérieur au séquençage Sanger, notamment pour atteindre des objectifs nécessitant :

- l'interrogation simultanée rentable de plus de 100 gènes à la fois
- la détection de nouveaux variants en augmentant le nombre de cibles séquencées par run
- l'analyse d'échantillons avec de l'ADN en faible quantité
- le séquençage de génomes entiers, notamment de génomes microbiens

Les laboratoires font souvent appel aux deux techniques (Sanger et NGS), le séquençage Sanger étant utilisé pour les petits projets de routine et le NGS permettant des séquençages à grande échelle.

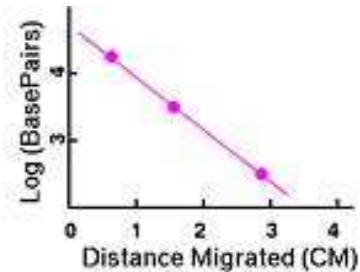
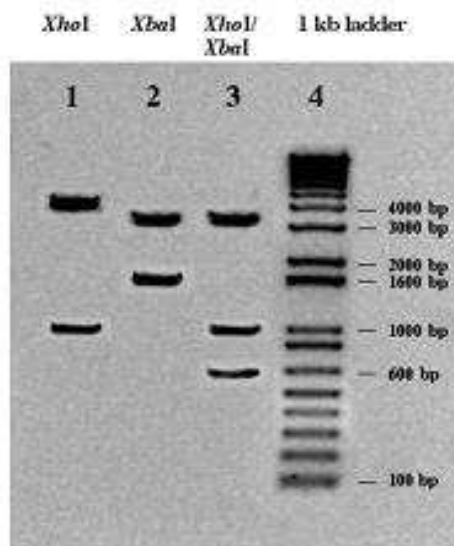


Technique de séparation (électrophorèse)

- **Électrophorèse sur gel** : cette technique permet de séparer des molécules en fonction de leur taille (appelée poids moléculaire) en les faisant migrer à travers un gel par application d'un champ électrique. Le courant entraîne les molécules et les mailles du gel les freinent. Leur migration dépend donc à la fois de leur taille mais aussi de la concentration du gel; elles iront d'autant plus loin qu'elles sont de petite taille et le gel moins concentré. Cette technique peut être utilisée pour séparer de l'ADN, de l'ARN (gels d'agarose ou d'acrylamide) ou des protéines (gel d'acrylamide).

Il est à noter que le gel d'agarose est préférentiellement utilisé pour l'ADN tandis que le gel de polyacrylamide est utilisé pour les protéines.

- **Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.**
- **Électrophorèse capillaire** : variante d'électrophorèse utilisée pour le séquençage de l'ADN.



Extraction des acides nucléiques

L'extraction ainsi que la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques purifiés afin de pouvoir mener une analyse spécifique en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques purifiés exempts de tout contaminant, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées.

- Extraction de l'ADN
- Extraction de l'ARN
- **Minipréparation ou Miniprep** : c'est une technique permettant d'extraire des **bactéries transformées**, une petite quantité d'**ADN plasmidique**.
- **Digestion enzymatique (restriction digest)** : c'est une technique utilisant des **enzymes de restriction** pour couper spécifiquement une molécule d'ADN afin de la manipuler ou de la cloner (voir BIOS 302, génie génétique).

II-Organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire

- Bonnes pratiques
- Equipements
- Matériel et consommables
- Préservation du matériel génétique

FICHE DE TP N°2 : Extraction de l'ADN d'un matériel végétal et mise en évidence du constituant de la méduse (cas de l'oignon)

Introduction

Chaque chromosome est constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN). L'ADN est une molécule qui peut se pelotonner lors de la division cellulaire, ce qui rend visibles les chromosomes.

Condensation de l'ADN = molécule complètement pelotonnée: le chromosome est visible.

Molécule d'ADN déroulée = dépelotonnée: le chromosome est invisible.

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériel biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériel de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- La rupture mécanique (ex: broyage ou lyse hypotonique)
- Le traitement chimique (ex: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols)
- La digestion enzymatique (ex: protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation du nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtration ou par précipitation.

Extraction de l'ADN de l'oignon

1^{ère} étape: Extraire le contenu du noyau cellulaire

Matériel

- Oignon
- Liquide vaisselle
- Eau
- Sel fin
- Ethanol 70%
- Mortier
- Entonnoir
- Filtre
- Tubes à essai

Mode opératoire

- Couper en petits morceaux un demi-oignon
- Broyer les morceaux avec une pincée de sel (une cuillère à café ou 1g), 3 ml de liquide vaisselle et 6 ml d'eau

- Filtrer le broyat dans le tube à essai
- Faire couler lentement le long de la paroi le même volume d'alcool (filtrat: alcool (V:V))

2^{ème} étape: Mettre en évidence le constituant de la méduse (l'ADN)

Matériel

- Méduse
- Verre de montre
- Agitateur/spatule
- Vert de méthyl acétique
- Eau

Mode opératoire

- A l'aide de l'agitateur, prélever la méduse et placer dans un verre de montre
- Ajouter quelques gouttes de colorant (vert de méthyl acétique)
- Attendre 5 minutes puis rincer à l'eau
- Observer et interpréter