



HAL
open science

Les techniques de base de la génétique moléculaire

Juliette Riquet, Frederique Pitel

► **To cite this version:**

Juliette Riquet, Frederique Pitel. Les techniques de base de la génétique moléculaire. Productions Animales, 2000, HS 2000, pp.29-35. hal-02690317

HAL Id: hal-02690317

<https://hal.inrae.fr/hal-02690317>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

J. RIQUET, F. PITEL

INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire,
BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

e-mail : riquet@toulouse.inra.fr

1 - Notions de base de génétique

Les techniques de base de la génétique moléculaire

Résumé. Les techniques les plus couramment utilisées en génétique moléculaire font l'objet de cet article. La première partie présente les outils de base, fondés sur des principes de physique, de chimie ou de biologie. Différentes combinaisons de ces outils sont ensuite développées pour aborder les techniques utilisées dans différents domaines de la biologie moléculaire : fragmentation, séparation, repérage, multiplication et lecture de l'ADN. L'accent est mis sur la diversité des techniques pouvant être mises en œuvre et sur la vitesse d'évolution de ces techniques.

Cet article constitue un préambule à ceux concernant l'utilisation des techniques moléculaires dans nos domaines de recherches. Les méthodes de biologie moléculaire ne sont pas toutes évoquées, seules les plus couramment utilisées pour l'analyse de l'ADN sont présentées. Leurs limites sont liées à chaque type d'utilisation qui en est faite, les avantages et inconvénients de chaque technique seront donc évoqués dans les autres articles de cet ouvrage.

Les techniques de génétique moléculaire reposent sur un nombre limité d'outils (hybridation, électrophorèse, enzymes, cellules ...), qui seront présentés avant de détailler les techniques principales de manipulation de l'ADN.

Les techniques mises au point pour analyser l'ADN sont tributaires de la constitution même des génomes. Le nombre de paires de bases d'un génome de vertébré dépasse en général le milliard (1,2.10⁹ paires de bases chez la poule, 3.10⁹ chez les mammifères). La biologie moléculaire appliquée à la génétique a pour but l'étude d'une région du génome et la recherche d'un gène, voire d'une mutation (concernant, à la limite, une seule base parmi les quelques milliards). Les techniques mises au point ont donc pour objectif de cibler le fragment intéressant au sein d'une molécule d'ADN des millions de fois plus grande. Le facteur «quantité» est le plus souvent limitant : la quantité d'ADN contenue dans une cellule est infime (de l'ordre du picogramme). Il faut donc également disposer de techniques permettant l'amplification préalable du matériel que l'on souhaite étudier.

Les recherches menées sur l'ARN reposent pour une grande part sur des méthodes similaires. En revanche les protéines ont des caractéristiques particulières, et une partie seulement des techniques présentées peuvent leur être appliquées. Nous avons choisi de ne pas évoquer ici les procédés propres aux études d'expression des gènes faisant intervenir l'ARN et les protéines.

1 / Les outils de la biologie moléculaire en génétique

Les techniques de base de la biologie moléculaire consistent le plus souvent à tirer parti des caractéristiques propres du matériel biologique sur lequel on travaille (comme les propriétés physico-chimiques de l'ADN) et à exploiter des organismes, surtout des microorganismes, du monde vivant.

1.1 / Propriétés de l'ADN

L'ADN est une molécule double brin, dont les deux brins sont complémentaires. Si on sépare les deux brins (par simple chauffage ou par action d'un agent dénaturant comme la soude, l'urée ou la formamide), on a donc accès à deux molécules simples brins. Un fragment d'ADN plus ou moins long, simple brin et de séquence complémentaire à la séquence cible pourra s'associer à celle-ci : il y a hybridation de deux brins complémentaires. Des techniques comme la PCR (Polymerase Chain Reaction), les Southern blots, le criblage de banques et l'hybridation *in situ* s'appuient sur cette caractéristique.

L'ADN est constitué de nucléotides, auxquels une modification peut être apportée (isotopes radioactifs du phosphore ou du soufre, molécule fluorescente). Ces constituants modifiés de l'ADN permettent alors son marquage et la visualisation de la molécule.

L'ADN est une molécule chargée négativement. Cette propriété permet de faire migrer de l'ADN sur différents supports dans un champ électrophorétique.

L'ADN a d'autres propriétés physico-chimiques que nous n'aborderons pas, et qui permettent de lui faire subir sonication (fragmentation aléatoire à l'aide d'ultra-sons), centrifugations, dosages, précipitations, chromatographies et autres manipulations dont le détail se trouve dans tout bon ouvrage de biologie moléculaire (cf liste des références).

1.2 / Biologie moléculaire

La génétique moléculaire fait appel à des manipulations de molécules organiques, qui sont à l'origine synthétisées, digérées, liées, détruites *in vivo*. Les outils de la biologie moléculaire ont donc été en partie fournis par le matériel vivant lui-même.

L'ADN est présent dans tous les tissus animaux, et les manipulations sur cette molécule nécessitent au préalable son extraction. Le tissu le plus souvent utilisé comme source d'ADN est le sang : on peut l'obtenir facilement (sans opération invasive), et il contient une grande quantité d'ADN contrairement à d'autres sources possibles d'ADN (poils, plumes...). Les techniques d'extraction sont nombreuses (choisies en fonction de la quantité de matériel de départ, de la source d'ADN, de la qualité requise...), et font appel à des manipulations successives (lyse, précipitation, centrifugation...).

La culture *in vitro* de cellules est un préalable à de nombreuses applications de biologie moléculaire (hybridation *in situ*, études d'expression de gènes, fabrication d'hybrides somatiques...).

Les microorganismes tels que des bactéries ou des levures sont utilisés dans les opérations de manipulation *in vitro* de fragments d'ADN.

En outre, à partir des bactéries, on a isolé des molécules capables de reproduire *in vitro* les transformations de l'ADN qu'elles effectuent naturellement *in vivo* : les enzymes. Elles représentent une bonne part des outils de base pour le biologiste moléculaire.

Les enzymes de restriction reconnaissent un site spécifique de l'ADN (souvent 4 ou 6 paires de bases palindromiques), et hydrolysent la molécule dans ce site ou au voisinage de celui-ci. Elle permettent d'obtenir, à partir d'une molécule entière, des fragments d'ADN dont la longueur et le nombre vont dépendre de la répartition des sites de restriction sur le fragment d'origine. La coupure peut générer

des bouts francs ou des bouts cohésifs (figure 1). Elles sont utilisées dans de nombreuses techniques de biologie moléculaire, comme les Southern blots, le clonage, la recherche de certains polymorphismes, etc.

Les polymérase synthétisent le brin complémentaire d'un brin d'ADN à partir de nucléotides libres présents dans le milieu réactionnel. La Taq polymérase (isolée de la bactérie *Thermophilus aquaticus*), thermostable, est utilisée notamment dans la réaction PCR. Le fragment Klenow de l'ADN polymérase I (extraite de la bactérie *Escherichia coli*) est employé pour le marquage de l'ADN.

Les ligases assemblent des fragments d'ADN linéaires entre eux. Elles créent une liaison covalente entre les extrémités, de séquences compatibles, de deux fragments d'ADN (figure 1). Elles sont utilisées notamment dans les procédures de clonage, dans l'addition d'adaptateurs (oligonucléotides de séquence connue) à de l'ADN génomique digéré, dans certaines analyses de polymorphisme ...

D'autres enzymes sont très utiles en biologie moléculaire, comme les kinases (qui ajoutent un groupement phosphate en 5'), les phosphatases (qui, à l'inverse, éliminent le groupement phosphate), et d'autres encore (RNAses, DNAses, nickases...) dont nous ne pouvons ici faire l'inventaire exhaustif.

2 / Les techniques de manipulation de l'ADN

La plupart des techniques utilisées en génétique moléculaire sont mises au point en combinant les outils de base précédemment décrits. Les techniques utilisées peuvent être classées selon leurs objectifs, à savoir fragmenter l'ADN, séparer les fragments, repérer les morceaux d'ADN d'intérêt puis multiplier le fragment à étudier et, enfin, à l'échelle la plus petite, lire directement la séquence d'ADN.

Figure 1. Exemples d'enzymes de restriction utilisées en génétique moléculaire : une digestion par l'enzyme *HaeIII* génère des extrémités franches, *Sau3AI* et *BamHI* des extrémités cohésives 5' sortantes et compatibles entre elles, l'enzyme *PstI* des extrémités 3' sortantes. Certaines enzymes comme *MboII* digèrent l'ADN en dehors de leur site de reconnaissance.

Source bactérienne	Abréviation enzymatique	Séquence 5' -> 3' 3' -> 5'	Extrémités générées
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae III</i>	GG CC CC GG	
<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	<i>Sau 3AI</i>	GATC CTAG	
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	<i>Bam HI</i>	G GATC C C CTAG G	
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst I</i>	C TGCA G G ACGT C	
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo II</i>	GAAGANNNNNNNN CTTCTNNNNNNNN	

2.1 / Fragmenter

Les méthodes d'analyse ne permettent pas d'appréhender globalement la totalité de l'ADN. Toute manipulation nécessite donc une fragmentation préalable du génome :

- tirer parti de la condensation de l'ADN en chromosomes lors de la métaphase est le premier moyen de travailler sur un génome fragmenté. Ce phénomène est exploité dans les techniques d'hybridation *in situ* sur chromosomes (Yerle 2000, cet ouvrage) et dans les manipulations de tri de chromosomes (voir plus loin) ;

- on peut également s'intéresser uniquement à la partie codante de l'ADN (5 à 10 % du génome) en ne travaillant que sur les ADN complémentaires (ADNc), c'est-à-dire les fragments d'ADN synthétisés à partir des ARN messagers (ARNm) présents dans les tissus étudiés ;

- nous avons la possibilité, grâce aux enzymes de restriction, de fractionner la molécule d'ADN pour obtenir des fragments dont la taille est compatible avec l'utilisation des techniques de laboratoire. D'autres types de fragmentation sont également utilisés (sonication, fragmentation mécanique, irradiation...);

- une manière de «fragmenter» l'ADN est de ne cibler dès le départ qu'une petite portion du génome : l'utilisation de la PCR (voir plus loin) entre dans ce cadre.

2.2 / Séparer

La molécule d'ADN étant fragmentée, il faut séparer les différents fragments pour les visualiser individuellement ou pour sélectionner ceux qui nous intéressent.

Pour voir

L'une des techniques appartenant au quotidien du biologiste moléculaire est l'électrophorèse. Elle permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille : la migration dans un champ électrique est effectuée sur différents types de gels - dans lesquels la mobilité est influencée par la densité du maillage moléculaire - avec différentes conditions de migration, qui peuvent affecter la mobilité des fragments.

Gels d'agarose : en fonction du pourcentage d'agarose dans le gel, des fragments de quelques dizaines à quelques milliers de paires de bases peuvent être discriminés, en champ électrique constant. Ces gels sont utilisés couramment pour séparer des fragments d'ADN avant Southern blot (voir plus loin), vérifier la qualité ou la quantité d'un échantillon d'ADN, déterminer la taille d'un produit PCR, d'une insertion d'ADN dans un vecteur... Grâce à l'utilisation de champs électriques alternatifs, on peut aller jusqu'à la séparation de fragments de plus de 10 000 kilobases : c'est l'électrophorèse en champs pulsés.

Gels d'acrylamide : ils sont plus résolutifs que les gels d'agarose et permettent de séparer des fragments de quelques dizaines à quelques centaines de paires de bases, à la base près. Ils sont utilisés tels quels pour la séparation fine de fragments d'ADN de tailles voisines : séquençage d'ADN, analyses de polymorphismes de longueur comme les microsatellites ou les AFLP ... Différentes compositions de ces gels (par exemple présence ou absence d'agents

dénaturants comme la formamide ou l'urée), associées à différentes conditions de migration (à chaud, à froid, en gradient de température...) donnent autant de techniques différentes qui permettent de révéler des polymorphismes de toutes sortes.

Pour cibler

Dans certaines conditions, l'ADN est individualisé en chromosomes. Si les chromosomes d'une espèce sont suffisamment différents entre eux (chromosomes de porc ou de bovins, macrochromosomes de poule), ils peuvent être triés, par cytométrie en flux, en fonction de leur taille et de leur composition en paires de bases. On peut ainsi isoler plusieurs centaines de copies d'un chromosome qui nous intéresse, pour diverses applications comme le «chromosome-painting» en cartographie comparée (Gellin 2000, cet ouvrage) ou la recherche de marqueurs spécifiques d'un chromosome.

La fabrication d'hybrides somatiques (Yerle 2000, cet ouvrage) permet de disposer de chromosomes ou fragments de chromosomes séparés dans des clones différents.

La technique la plus courante permettant de cibler une portion du génome est le clonage (figure 2) : l'ADN génomique est fragmenté à l'aide d'enzymes de restriction et inséré dans un «vecteur». Ce vecteur permet alors l'introduction et la multiplication de la séquence dans un microorganisme hôte (bactérie ou levure). Chaque cellule hôte intégrera un fragment d'ADN différent et l'ensemble de ces clones constituera une «banque» du génome étudié.

En fonction du matériel à cloner (ADN génomique, ADNc), de l'utilisation ultérieure que l'on veut faire de la banque (criblage, séquençage, expression...), de la taille des fragments que l'on veut obtenir (quelques centaines de paires de bases ou quelques kilobases), on utilise l'un ou l'autre des vecteurs de clonage existants : plasmide (100 pb à 5 kb) < phage (10 à 20 kb) < cosmide (environ 40 kb) < PAC ou BAC (50 à 200 kb) < YAC (100 à 2000 kb) (Rogel-Gaillard 2000, cet ouvrage).

2.3 / Repérer

En dehors de l'utilisation de la microscopie (par exemple, visualisation de chromosomes en métaphase en cytogénétique) ou lorsque l'ADN est précipité sous forme de «méduse» au cours d'extractions de grandes quantités d'ADN, cette petite molécule n'est pas visible.

Plusieurs méthodes de révélation de l'ADN sont disponibles, utilisées seules ou en combinaison.

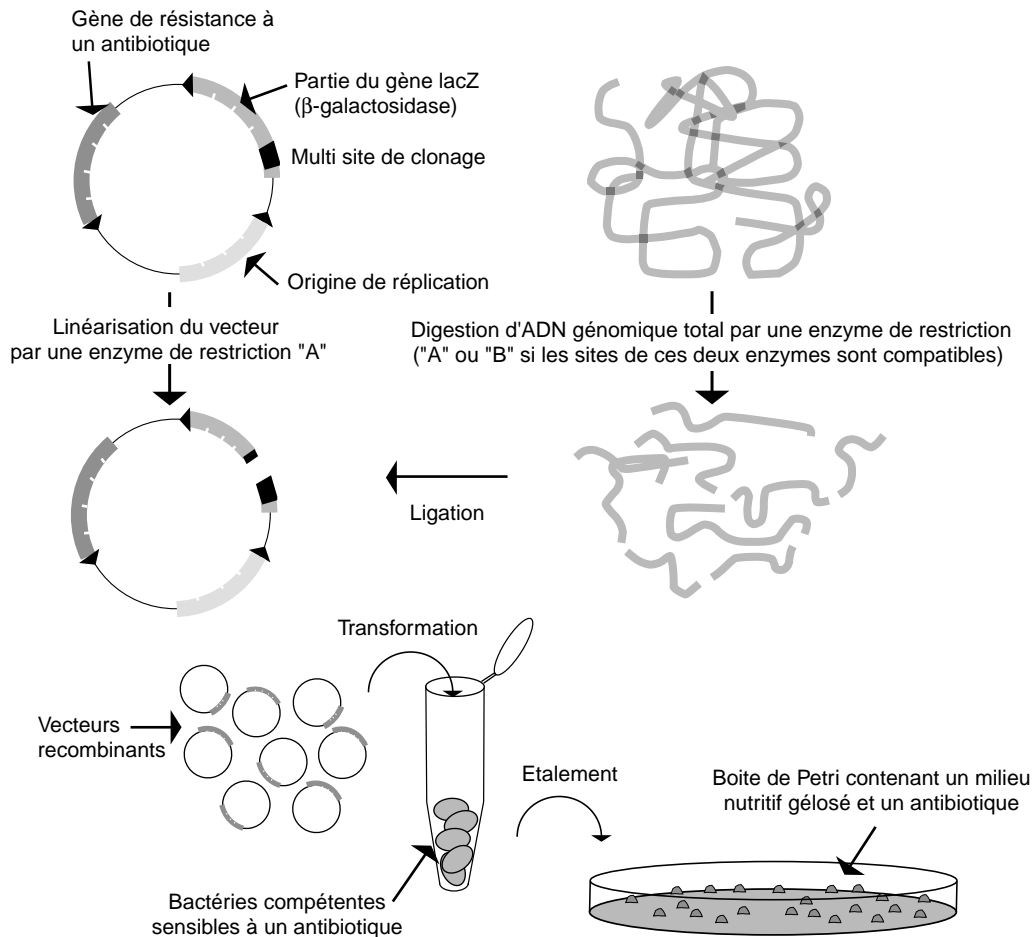
Par coloration

Deux méthodes de coloration de l'ADN sans marquage préalable sont couramment utilisées :

- la révélation par bromure d'éthidium (BET) : cet agent intercalant se fixe à l'ADN double brin, et émet une fluorescence quand il est excité par des rayons ultraviolets ;

- la coloration à l'argent : cette technique est le plus souvent utilisée pour les colorations de fragments simples brins, pour lesquels le BET est moins efficace. Elle est basée sur le même principe que la photographie et permet la formation d'un précipité d'argent sur la molécule d'ADN.

Figure 2. Principe de construction d'une banque plasmidique d'ADN génomique total. Les éléments du vecteur essentiels au clonage sont indiqués : l'origine de réplication permet la multiplication du vecteur dans la cellule hôte de manière indépendante de la bactérie ; le gène de résistance à un antibiotique permet de sélectionner les bactéries ayant intégré un vecteur (la bactérie est, quant à elle, sensible à l'antibiotique utilisé dans le milieu de culture des boîtes) ; le multi site de clonage permet l'insertion de l'ADN étranger ; cette séquence se trouve au milieu du fragment du gène LacZ, ce qui permet une discrimination par la couleur des bactéries dont le vecteur contient un insert.



Par marquage

Au lieu d'être révélés après leur séparation, les fragments d'ADN peuvent être marqués au préalable :

- par des éléments radioactifs : ^{32}P , ^{33}P et ^{35}S sont les radioéléments les plus utilisés en biologie moléculaire. Il faut leur ajouter le tritium, utilisé en hybridation *in situ*. Le principe du marquage d'un fragment d'ADN est l'incorporation, grâce à une enzyme, de nucléotides marqués radioactivement. Sans entrer dans les détails, cette incorporation peut être effectuée au sein même de la molécule («nick-translation» ou «random-priming», avec utilisation du fragment Klenow de l'ADN polymérase I), à son extrémité 3' (terminale transférase), ou à son extrémité 5' (polynucléotide kinase). L'ADN est révélé par simple autoradiographie. Cette méthode est longtemps restée la technique prépondérante pour la révélation de fragments d'ADN. Certains lui préfèrent actuellement le marquage par des produits non radioactifs comme la biotine ou la digoxigénine (suivi de méthodes de détection spécifiques) ;

- par des fluorophores : une des manières de visualiser un fragment d'ADN est de le marquer par un fluorophore préalablement à la migration. L'excitation de ce fluorophore par un laser entraîne l'émission de fluorescence, détectée par une caméra.

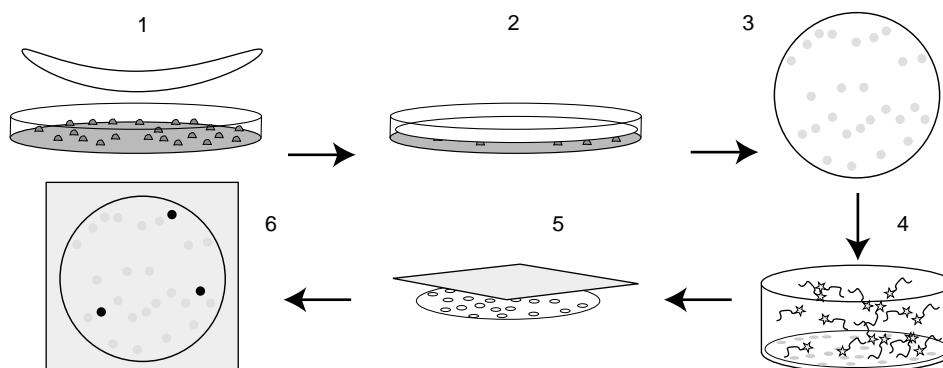
C'est le principe du séquenceur automatique, très utilisé pour le séquençage et le typage de marqueurs génétiques comme les microsatellites. Les amorces servant à l'amplification PCR ou à la réaction de séquence sont marquées, de manière à détecter en temps réel le fragment obtenu, pendant son passage devant le laser. On peut également incorporer des nucléotides marqués pendant la réaction PCR.

L'utilisation d'un séquenceur a de nombreux avantages par rapport à des migrations sur gel classique suivies de révélation. Citons notamment la possibilité de déposer plusieurs échantillons dans un même puits (quatre fragments différents de même taille pourront être distingués à l'aide de quatre fluorophores différents), la lecture immédiate des résultats et, surtout, l'informatisation des données, qui permet des gains considérables de temps et de fiabilité des résultats.

Par hybridation d'une sonde marquée

Les techniques précédemment décrites s'intéressent à la révélation de fragments d'ADN que l'on souhaite visualiser directement (après PCR, électrophorèse de fragments discernables...). Elles s'appliquent également au marquage des sondes utilisées en hybridation : dans de nombreux cas, on ne s'in-

Figure 3. Principe du criblage d'une banque plasmidique d'ADN génomique total. Une membrane de nylon est posée sur la boîte de Pétri (1 et 2). Une partie des bactéries de chaque colonie se fixe à la membrane (3). La réplique bactérienne, après dénaturation de l'ADN, est hybridée à une sonde radioactive (4). Après lavages (élimination de l'excès de sonde), un film autoradiographique est mis en contact de la membrane (5). Les "spots positifs" correspondent aux clones contenant un fragment d'ADN homologue de la sonde (6).



téresse qu'à une région précise du génome, perdue dans un mélange complexe contenant la totalité de l'ADN. On a alors recours à l'hybridation. La complémentarité des deux brins d'ADN permet de récupérer le fragment intéressant dans le génome grâce à l'hybridation sur la molécule d'ADN d'une sonde spécifique : cette sonde est une courte séquence d'ADN (de quelques dizaines de paires de bases à quelques kilobases), dont la séquence est suffisamment complémentaire de l'ADN cible pour permettre une hybridation spécifique. Une sonde marquée permet l'observation, voire la sélection, du fragment intéressant.

Différents types de sondes (uniques, répétées, génomiques, ADNc) et différentes sortes d'hybridation (sur chromosomes en métaphase, colonies bactériennes, membranes ...) peuvent être combinées en fonction de l'objectif à atteindre :

- pour connaître la localisation d'un gène sur un chromosome, on utilisera une sonde correspondant à un fragment de ce gène (génomique ou ADNc), que l'on hybridera sur les chromosomes en métaphase. La sonde fluorescente ou radioactive sera ensuite repérée à l'endroit où elle s'est hybridée sur le chromosome ;

- pour sélectionner, dans une banque d'ADN génomique d'une espèce, un clone portant le fragment du gène intéressant, mais pour lequel on ne dispose que d'une sonde hétérologue (gène humain à isoler chez la poule par exemple), on effectuera l'hybridation sur des membranes où l'ADN des clones d'une banque de l'espèce étudiée aura été préalablement fixé (répliques bactériennes). La sonde étant marquée (radioactivement par exemple), on visualisera les colonies sur lesquelles la sonde s'est hybridée : c'est le criblage de la banque (figure 3) ;

- pour isoler, à partir d'une banque, des clones portant un microsatellite, on pourra hybrider les répliques bactériennes avec une sonde marquée dont la séquence correspondra au motif répété des marqueurs que l'on souhaite isoler, (CA)₁₀ par exemple.

On peut également hybrider une sonde sur un Southern blot : l'ADN génomique est digéré, les fragments sont séparés en fonction de leur longueur par électrophorèse. Les fragments d'ADN sont ensuite dénaturés *in situ*, pour être transférés à l'état simple brin sur membrane. Ces fragments sont alors mis en présence d'une sonde, généralement radioactive, ce qui permet après révélation autoradiographique

d'obtenir un profil de bandes spécifiques. Cette technique est utilisée pour l'analyse de marqueurs génétiques (RFLP ou minisatellites), pour des comparaisons de profil d'hybridation d'un fragment de gène sur différentes espèces (Zooblot) ... Si la membrane n'est pas issue d'un gel, mais du dépôt sous forme de points de produits PCR, on parle de dot-blot.

Actuellement, les programmes systématiques d'étude des génomes ont favorisé la mise en place de filtres à haute densité pour des hybridations en grand nombre : les produits PCR ou les clones bactériens sont déposés de façon dense et régulière sur membranes, voire sur micro-support (puces à ADN : Rogel-Gaillard 2000, Hatey 2000, cet ouvrage).

2.4 / Multiplier

L'ADN génomique étant une denrée rare, la première façon d'en obtenir des quantités importantes est d'utiliser la multiplication naturelle de cette molécule, c'est-à-dire de l'extraire à partir d'un nombre important de cellules (extractions à partir de sang, culture de cellules en grande quantité pour les extractions à partir d'hybrides somatiques, etc). Dans un deuxième temps, quand on s'intéresse à un fragment particulier du génome, il existe plusieurs possibilités pour l'amplifier.

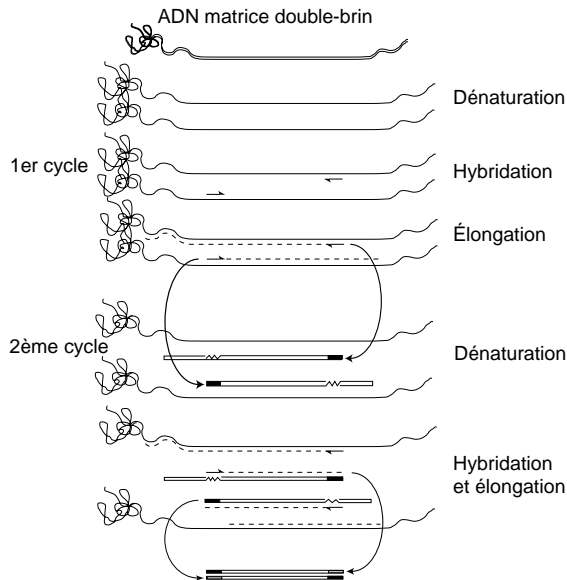
Clonage

Le clonage, déjà évoqué plus haut dans l'isolement de fragments d'ADN, permet d'obtenir en grande quantité le fragment d'ADN cloné dans une colonie bactérienne : une sonde spécifique, un fragment d'ADN génomique à séquencer, un ADNc, etc, peuvent être conservés et multipliés par la bactérie grâce à la multiplication cellulaire. Le vecteur porté par la bactérie se multiplie en parallèle à l'ADN bactérien, et une extraction spécifique permet ensuite d'isoler l'ADN intéressant de l'ADN de la bactérie.

PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est, depuis sa mise au point (Saiki *et al* 1985), la technique de base de la biologie moléculaire : elle permet à la fois de cibler le ou les fragments que l'on veut étudier, et d'augmenter leur quantité de manière exponentielle (figure 4). Cette technique a pourtant deux limites : d'une part un minimum d'information sur la séquence est nécessaire pour la définition d'amorces spé-

Figure 4. Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Chaque cycle est décomposé en trois étapes : dénaturation des deux brins d'ADN, hybridation spécifique des amorces encadrant le fragment à amplifier et élongation (synthèse des brins complémentaires par une polymérase). A chaque cycle, il y a doublement du nombre de copies du fragment amplifié, les brins néosynthétisés auparavant servant également de matrice. Une réaction de 30 cycles d'amplification produit en théorie 2^{30} copies du fragment.



cifiques permettant l'amplification ciblée d'un fragment et, d'autre part, la taille maximum des fragments est limitée par l'efficacité des polymérases utilisées (de quelques paires de bases à une vingtaine de kilobases). Elle est utilisée dans tous les types d'application.

2.5 / Lire

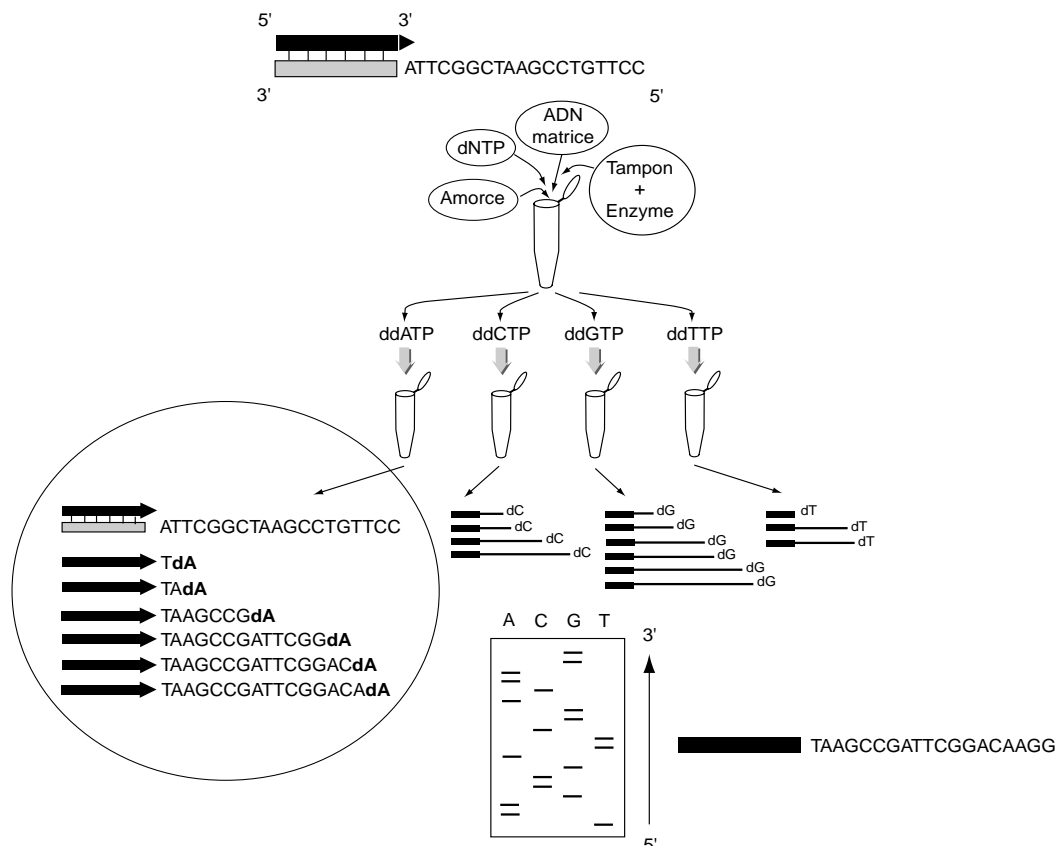
Le stade ultime de la biologie moléculaire est de travailler directement à l'échelle de la paire de bases.

Séquençage

On peut actuellement accéder à la séquence d'un fragment d'ADN grâce au séquençage (figure 5).

L'utilisation de fluorophores a permis de simplifier ce protocole. Les améliorations apportées au cours des dernières années à la chimie de ces molécules et l'utilisation de nouvelles polymérases, font que ce protocole est utilisé actuellement dans le cadre de programmes de séquençage systématique des génomes. La mise en place, à grande échelle, de ce type de programme en génomique a également favorisé le développement d'une nouvelle technique de séquençage sur puces à ADN. Elle consiste à hybrider le fragment à séquencer sur des oligonucléotides (représentant toutes les combinaisons de bases possibles) fixés sur micros supports. L'intensité des signaux d'hybridation obtenus permet de déduire la séquence du fragment.

Figure 5. Principe du séquençage. Cette technique repose sur l'utilisation de di-désoxynucléotides, qui stoppent la réaction de synthèse. Le fragment à séquencer est dénaturé et une seule amorce est hybridée sur l'ADN matrice. Une polymérase synthétise le brin complémentaire à l'aide de nucléotides présents dans le mélange. L'incorporation aléatoire d'un di-désoxynucléotide stoppe la synthèse du fragment. Le produit obtenu correspond donc à un mélange de fragments de tailles différentes : à chaque base de la matrice d'origine correspond un ensemble de fragments de même taille. La visualisation des fragments après électrophorèse permet de déduire la séquence recherchée.



Cette technique est actuellement utilisée en génétique humaine pour le séquençage systématique du virus HIV et de gènes impliqués dans certains cancers (recherche de mutants permettant un traitement plus ciblé). En cartographie génétique, cette nouvelle technologie est par ailleurs utilisée pour le génotypage systématique de marqueurs bialléliques (Pitel et Riquet 2000, cet ouvrage).

Conclusion et perspectives

En fonction de l'origine du matériel sur lequel on travaille, de l'objectif à atteindre et de l'échelle du programme à mener à bien, différentes techniques de biologie moléculaire sont utilisées. Toutes reposent sur un ensemble d'outils de base à peu près immuable. En revanche, les techniques elles-mêmes évoluent très vite, et certaines de celles qui ont été

présentées ici ne seront sans doute plus utilisées que de manière ponctuelle dans quelques années.

La volonté de travailler à grande échelle sur le génome humain (séquençage complet, criblage des mutations d'un gène entier ...) a amené la biologie moléculaire à évoluer vers des techniques plus performantes, avec par exemple la miniaturisation des outils pour des manipulations d'un très grand nombre d'échantillons en simultané (mise au point des puces à ADN). La génétique moléculaire chez les animaux domestiques a toujours bénéficié des avancées de la génétique humaine. Nous sommes probablement à l'orée d'un changement d'échelle de nos programmes du fait de l'emploi d'un nouveau type d'outils générant une masse importante de données et de l'utilisation systématique de l'informatique.

Références

Gellin J., 2000. La cartographie comparée des génomes des vertébrés. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 95-102.

Hatey F., 2000. Recherche de gènes associés à des fonctions : l'approche fonctionnelle. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 153-160.

Kaplan J.C., Delpech M., 1994. Biologie moléculaire et médecine (2ème Ed). Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Pitel F., Riquet J., 2000. Les marqueurs anonymes et la détection de leur polymorphisme. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 45-53.

Rogel-Gaillard C., 2000. Les banques de grands fragments d'ADN. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 79-85.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Strachan T., Read A.P., 1998. *Génétique moléculaire humaine*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Tagu D., 1999. *Principes des techniques de biologie moléculaire*. INRA Editions, Paris.

Yerle M., 2000. Etablissement des cartes cytogénétiques et physiques. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 87-93.

