L'étude des processus génétiques nécessite un grand nombre de techniques expérimentales. Cela consiste à utiliser des méthodes pour l'extraction, la purification, la séparation, restriction, l'amplification, le séquençage …etc.des acides nucléiques.
Cette partie du polycopié est divisée sur six sujets. Le premier est consacré à l'extraction et la purification de l'ADN jusqu'au calcul de la concentration et la pureté. Le deuxième sur la visualisation de l'ADN sur gel d'agarose et la détermination du PM. Le troisième sur l'hybridation du principe jusqu'au la détection des clones spécifiques. Le quatrième sur l'amplification de l'ADN par PCR. Le cinquième sur le séquençage de l'ADN et en fin la synthèse de l'ADNc.

1- Extraction et purification des acides nucléiques

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques. Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases endogènes une fois la cellule lysée.

1-1- Source d'ADN à cloner

Un fragment d'ADN spécifique (Ex. gène) est récupéré par différents façon (PCR, RT-PCR, extraction...etc.) et de différentes sources (cellules nucléés, virus). La mappe au dessous montre les différents façons d'obtenir l'ADN, afin de l'utiliser dans le clonage moléculaire (fig.1).

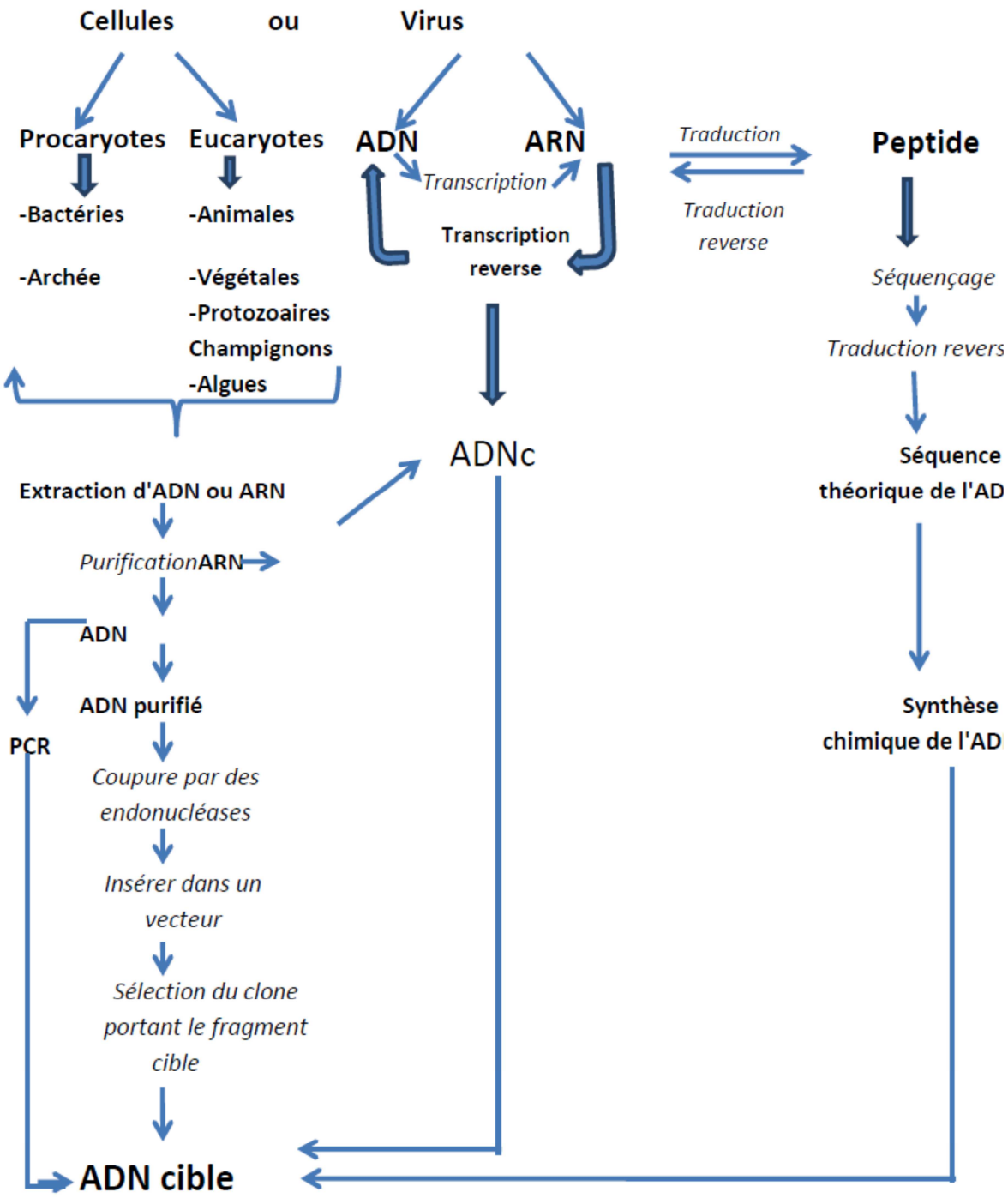


Fig.1: Carte de conception: Sources d'ADN

1-2- Préparation de l'ADN à partir du sang total

Les globules blancs (lymphocytes, macrophages…etc.) représentent la source majeure d'ADN en médecine. A partir de 10 à 30 ml de sang en présence d'un anticoagulant (ex. EDTA), il est possible de récupérer une quantité d'ADN (≈100µg) suffisante, pour des études qualitatives et quantitatives.

1-2-1- Protocole expérimental

1- Prélèvement de 10 à 30 ml de sang dans un tube contenant un anticoagulant (ex. EDTA).
2- Éclatement des globules rouges par une solution hypotonique
3- Récupération des globules blancs par centrifugation.
4- Préparation du lysat cellulaire en utilisant la solution de lyse (détergent comme le SDS ou sarcosyl + Protéinase K). Cette étape permet la libération de l'ADN nucléaire dans le milieu et la digestion des protéines qui lui étaient associées.
5- Extraction phénolique : cette étape permet de récupérer l'ADN dans la phase aqueuse après la centrifugation, car le phénol est un déprotéinisant puissant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles.
6-Extraction au chloroforme ou à l'éther : cette étape complète toujours une extraction phénolique, car elle permet d'éliminer les traces de phénol qui aurait pu être importé par la phase aqueuse (le phénol peut inhiber les enzymes utilisées dans l'amplification, la restriction…etc.).
7- Précipitation : cette étape permet la précipitation de l'ADN pour faciliter sa récupération. Il y'a deux types largement utilisés :
a-Précipitation à l'alcool éthylique : Elle doit être effectuée à haute force ionique (2.5 volumes d'éthanol 95° contre un volume d'échantillon). Pour les faibles concentrations, il faut prolonger le temps de précipitation (> 10h), comme il est possible d'accélérer la précipitation par le froid (-20°C à -70°C). L'ADN est récupéré par centrifugation.
b-Précipitation à l'isopropanol : Le principe est le même que la précipitation éthanolique. Ce type de précipitation se fait volume à volume. Mais deux caractéristiques majeures la différentient de la précipitation éthanolique.

-Le sel n'est pas nécessaire

- Les très petits fragments de DNA même à hautes concentrations ne sont pas précipités, ce qui permet de les éliminer.

8- Lavage : l'utilisation de l'éthanol 70° permet d'éliminer les sels, et les traces de l'isopropanol. L'ADN est récupéré par centrifugation.

9- Séchage: cette étape permet l'élimination de l'éthanol (s'évapore).

10- Resuspendre dans 10mM tris EDTA, l'eau purifiée de nucléases…etc.

1-2-2- Dosage des acides nucléiques

Les pyrimidines et les purines absorbent fortement les UV à 260nm.Une unité de densité optique à 260 nm correspond à:

- Une solution de DNA double brin à 50µg/ml
- Une solution de DNA simple brin ou RNA à 25µg/ml

C = A260 * DF * 100

Ces valeurs s'appliquent à des acides nucléiques parfaitement purs et en solution homogène. Pour vérifier la pureté de l'ADN il faut calculer : **P** (pureté)**= A260 /A280**Une solution d'ADN est considérée pure si : $\mathbf{1.7 \leq P \leq 2}$

2—Electrophorèse

2-1- Introduction

Les plus grands progrès des dernières décennies en biologie moléculaire ont été obtenus par l'analyse et la manipulation des macromolécules, l'ADN en particulier. Bien que la séquence des acides nucléiques détermine ses fonctions biologiques, la longueur de ces polymères constitue leur propriété physique la plus utile.

Parmi les techniques les plus utilisées pour la séparation des acides nucléiques selon leur taille est l'électrophorèse.

2-2-Définition

C'est une technique de bioséparation permettant la séparation des biomolécules selon leur charge et leur taille (ADN, ARN, protéines). Le terme électrophorèse vient de : électroce qui signifie énergie électrique et de phoresis (photo en grec) qui veut dire porter, avoir en soi.

Les acides nucléiques en solution portent une charge négative à cause de l'ionisation de leurs groupements phosphate (macromolécules polyanioniques uniformément chargées). Ils se déplacent donc vers l'électrode (+). Toutes les séquences d'acides nucléiques ont un rapport charge/masse à peu près identique, quelle que soit leur longueur, parce que tous les nucléotides sont à peu prés de même masse (masse molaire moléculaire moyenne des nucléotides 330 g/mol).

Suivant les théories de l'électrophorèse la mobilité µ dans un champ électrique au sein d'un gel doué de pouvoir de filtration est:

Log µ= Log**µo** - Kr. C

Log µo *: La mobilité de la molécule en milieu liquide*

C*: Concentration du gel*

Kr*: Coefficient de retardement dû au gel*

(Lui même est en fonction de la masse moléculaire de la molécule).

Deux sortes de matrice de gel sont utilisées: l'agarose et le polyacrylamide.Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules d'ADN en mouvement doivent passer; les molécules de grande taille ont plus de difficulté pour passer à travers les mailles (pores) crées par le réseau des microfibres du gel et vont donc migrer plus lentement que les petites molécules. La vitesse de migration de l'ADN est influencée par deux paramètres :

- La masse moléculaire (nombre de pb)
- La concentration du gel (tab. 1).

Il faut noter que la nature et la concentration du support de l'électrophorèse sont en fonction de la taille des fragments à séparer.

Tab.1: Taille des fragments à séparer selon la concentration du gel.

% d'**agarose**	Taille de fragments à séparer en **kb**	% d'**acrylamide**	Taille de fragments à séparer en **pb**
0.5	1 à 30	4	200 à 800
0.7	0.8 à 12	5	80 à 200
1	0.5 à 10	8	40 à 100
1.2	0.4 à 7	11	10 à 50
1.5	0.2 à 3		

Dans toutes les électrophorèses, des marqueurs de taille (ou de poids moléculaire) sont déposés et migrent parallèlement au DNA étudié.Une fois l'électrophorèse terminée, les molécules fluorophores, comme le bromure d'éthidium, qui se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les bases. Les bondes d'ADN (regroupent toute les molécules d'ADN de taille identique) sont visualisées sous UV (fig. 2).

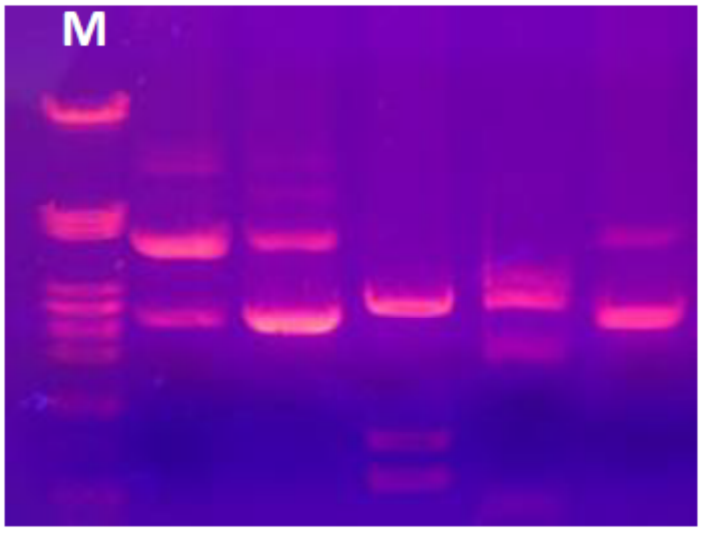


Fig.2: Visualisation des bandes d'ADN sous UV. **M**: marqueur de taille.

2-3- Détermination de la taille des fragments

La mobilité relative est le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration.La droite log(nombre de kb) = f(mobilité relative), permet de déterminer la taille d'une molécule d'ADN inconnue (fig. 3).

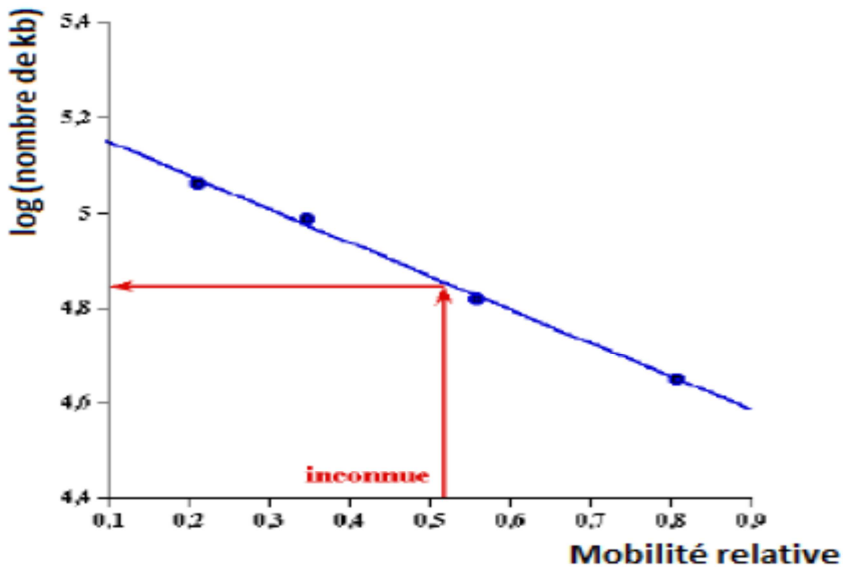


Fig.3: Distance de migration en fonction du logarithme de la taille des fragments d'ADN.

Les topoisoméres d'ADN (ont la même taille, mais dont les degrés de liaison sont différents) migrent différemment (fig. 4).

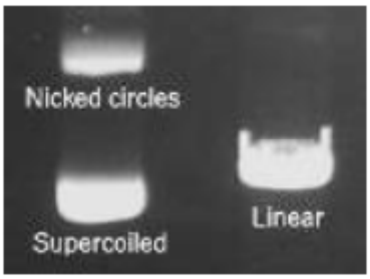


Fig.4: Migration des topoisoméres d'ADN (circulaire relâché; linéaire, et surenroulé) sur gel d'agarose.

3- Hybridation des acides nucléiques

L'hybridation est une propriété fondamentale des acides nucléiques qui repose sur les règles de complémentarité. Il est possible d'apparier des brins d'ADN ou ARN avec des oligonucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière antiparallèle et complémentaire. Ces oligonucléotides sont appelés sondes nucléiques (fig. 5). Pour le cas de deux brins complémentaires de la même molécule d'ADN (brins homologues) on parle de renaturation (hybridation à 100%). Chaque 1% de non homologie diminue la température d'hybridation (Th) de 1°C.

L'hybridation moléculaire est utilisée surtout dans la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes. La complémentarité dépendra de la spécificité et de la sensibilité.

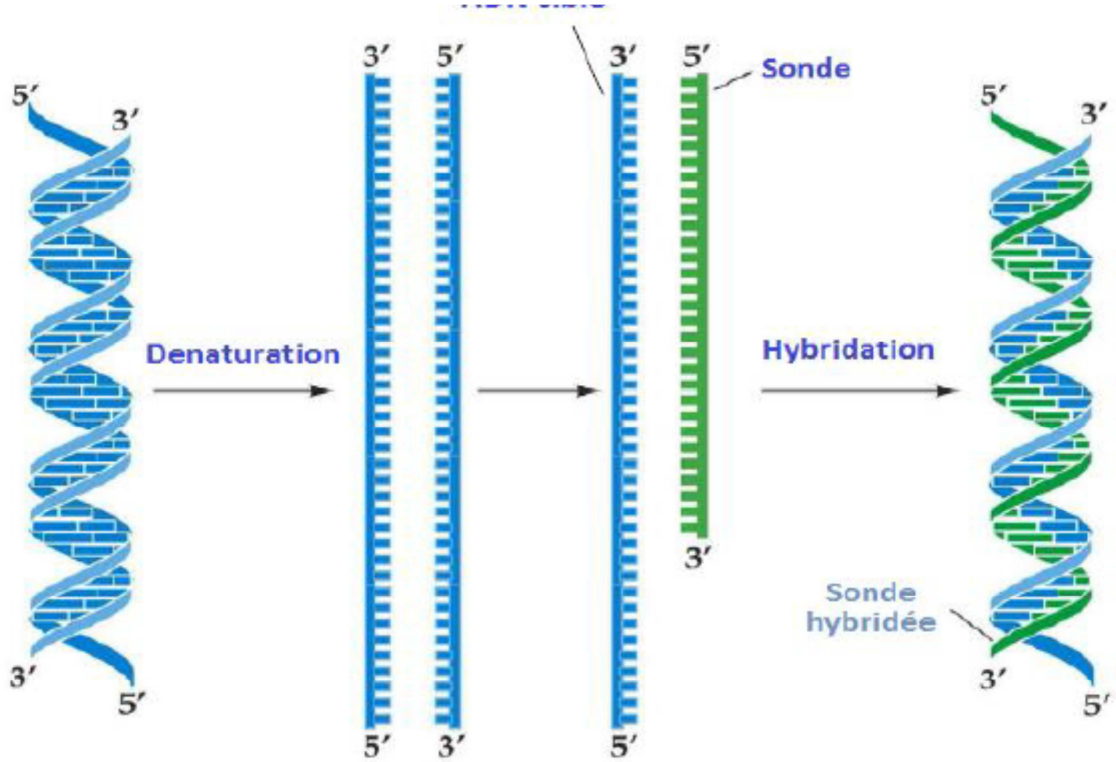


Fig.5: Hybridation des acides nucléiques (Passarge, 2007).

La Th est estimée en utilisant plusieurs formules, cela dépend de la:

- Longueur du fragment (nombres de nucléotides).
- Composition du milieu
- Mis-appariement
- Le contenu en C+G

3-1-Formules utilisées pour calculer la Th

Formule de Wallace: Tm = 4 (C+G) + 2(A+T) ; Th = Tm-5

La formule de Wallace permet de déduire la Th des petits oligonucléotides (Ex. Les amorces).

Pour les oligonucléotides avec N < 100 nucléotides on utilise la formule suivante en tenant compte la concentration du sel, les mésappariements et la concentration de formamide:

Tm = 16.6log[Na+] + 0.41(%(C+G))+ 81.5-(675/N)-%mismatch- 0.65% de formamide

Dans les conditions réactionnelles standards la Tm pour les longs séquences (>100):

Tm = 69.3 + 0.41(%(C+G))

La formule globale:

Tm = 81.5 + 16.6log[sel] + 0.41[%(C+G)] - % mis-appariement – (500/N) – 0.65%(formamide).

3-2 Facteurs influençant l'hybridation

- La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation
- La température d'hybridation
- La force ionique
- La complexité des séquences

3-3-Types d'hybridation

L'objectif de l'hybridation est la détection de la présence d'un acide nucléique d'uneséquence donnée par l'utilisation d'un fragment d'ADNcomplémentaire = sonde. Cela peut avoir lieu en solution ou sur support solide (immobilisation de la cible sur une membrane[nitrocellulose, nylon], sur verre, colonies bactériennes, chromosomes, plage de lyse ...etc.).

3-3-1-Hybridation d'ADN sur support solide : Southern blot

La procédure de ce type d'hybridation est résumée en sept étapes (fig. 6)

1– Extraction de l'ADN

2– Digestion enzymatique (par les enzymes de restriction)

3– Electrophorèse du produit de la digestion

4– Transfert sur membrane

5– Hybridationavec une sonde spécifique marquée.

6– Lavages

7– Révélation

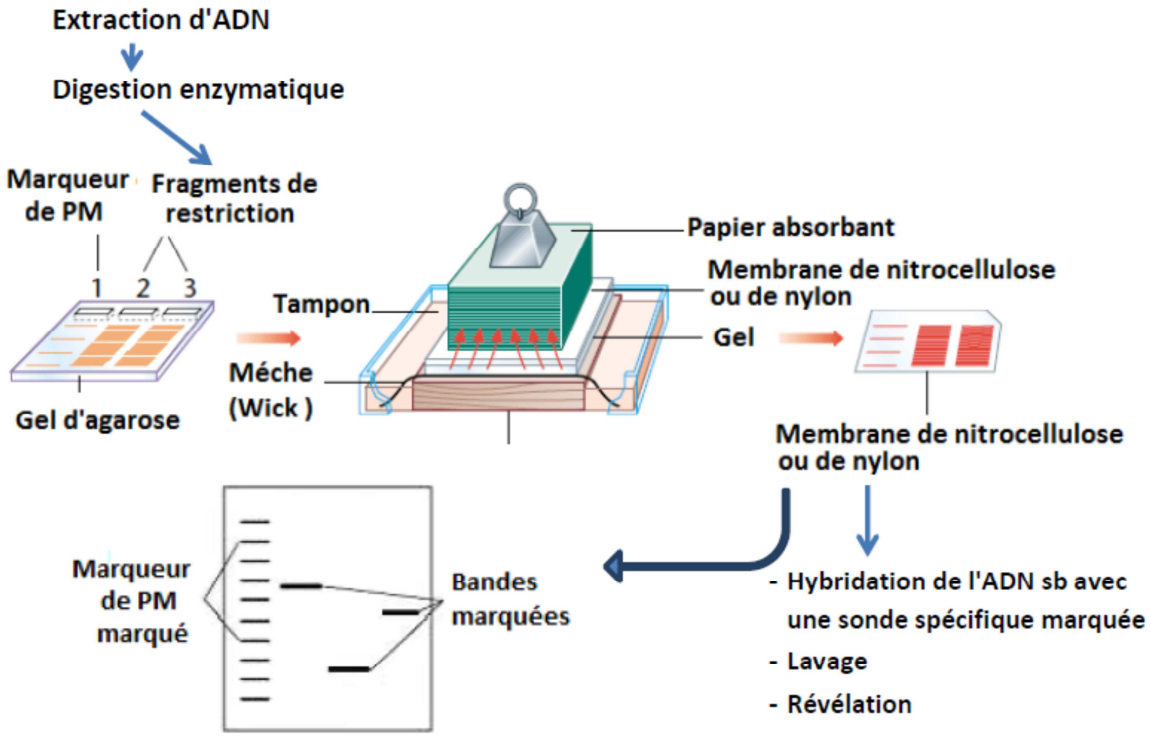


Fig.6: Southern Blot.

On peut aussi révéler la présence des séquences spécifiques dans les ARN (Northern Blot) et des protéines (Western Blot) utilisant le même principe.

3-3-2-Hybridation *in situ* sur chromosome

Cette technique permet de déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène d'intérêt. Les chromosomes fixés sur lame sont hybridés avec une sonde marquée (H3). L'éxamination microscopique révèle les signaux positifs sous forme de grains noirs disposés sur le chromosome. Comme exemple d'application est la détection des gènes viraux intégrés dans les chromosomes. Examine

3-3-3-Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

Ce type d'hybridation permet la détection parmi un grand nombre de bactéries ou de phagesrecombinants (plage de lyse) celle ou celui qui contient le fragment d'ADN cible. La réalisation de cette technique passe par les étapes suivantes:

- Culture pure sur boite de Petri (colonies ou plage de lyse)
- Transfert sur membrane de nylon ou de nitrocellulose
- Lyse alcaline des bactéries et dénaturation de l'ADN
- Fixation par la chaleur ou les UV
- Hybridation avec une sonde marquée
- Lavage
- Autoradiographie

Extraction d'ADN

Digestion enzymatique

- Hybridation de l'ADN sb avec une sonde spécifique marquée

- Lavage

- Révélation

- Localisation des clones d'intérêt.

4- Réaction de Polymérisation en Chaîne "PCR"

La synthèse et le séquençage d'ADN ont permis l'émergence d'une méthode d'amplification de l'ADN appelée PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction), à partir d'un gène (ou fragment)

spécifique, de grand quantité d'ADN sont obtenues *in vitro*. L'ADN polymérase copiant jusqu'à un milliard de fois cette région cible « quantité suffisante pour être révélée ».

4-1-Historique

Cette méthode de Biologie Moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtint pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993.
Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN.

4-2- Etapes de PCR :

La dénaturation de la double hélice nécessite une haute température (autour de 95°C), donc l'enzyme utilisée doit être résistante aux hautes températures ou bien elle devait être ajoutée lors de chaque cycle. Ce problème a été résolu en utilisant une ADN polymérase thermiquement stable d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus*, isolée d'une source chaude. Cette enzyme nommée ADN Taq polymérase est stable à 95°C (tab. 2) et n'est pas affectée par l'étape de dénaturation. Avec l'utilisation du Taq polymérase, l'ADN étant copié à 72°C et non plus 37°C, son utilisation augmente la spécificité de la PCR. Car aux hauts températures l'hybridation non spécifique d'amorces à l'ADN **non** cible est rare. Les produits de l'ADN Taq polymérase sont donc plus homogènes que ceux obtenus avec l'ADN polymérase III d'*E. coli*. En résumé il y'a quatre étapes :

1- **Dénaturation** (autour de 95°C) : Sert à dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin.

2- **Hybridation** (autour de Th): Lors du refroidissement du mélange, les amorces étant en excès, la plupart des brins d'ADN cibles se fixent à celles et non entre eux.

3- **Extension** (72°C) : L'ADN polymérase « prolonge les amorces : côté 3'-OH libre » en utilisant les brins cibles comme matrice.

4- Après une période appropriée d'incubation, le mélange est chauffé de nouveau pour séparer les brins. Il est alors refroidi pour que les amorces s'hybrident aux régions complémentaires de l'ADN nouvellement synthétisé. Le processus complet est alors répété « cycle ».

Tab.2: Les différences entre ADN Taq Polymérase et l'ADN polymérase III.

	ADN Taq polymérase	ADN polymérase III
Stabilité thermique à 95°C	+++	-
Activité exonucléase	-	+ (5'→ 3')

L'ADN polymérase de l'hyper thermophile *Pyrococcus furiosus* (croissance optimale à 100°C, la bactérie a été isolée d'une source hydrothermale), appeler Pfu polymérase. C'est la meilleure polymérase thermostable pour la correction des erreurs de réplication (Fidélitéélevée) grâce à son activité auto-correctrice. Cette enzyme est très utilisée lorsqu'une haute précision est requise.De plus elle est plus stable que la Taq polymérase.

4-3 Thermocycleur

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur (fig. 7). Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (effectuer automatiquement les cycles de chauffage) (fig. 8).

Le secret de la PCR est que le produit d'un cycle d'extension sert de matrice pour le suivant (fig. 8), ainsi la technique PCR est remarquable par le fait que l'ADN cible se double à chaque cycle. En pratique 20 à 40 cycles sont habituellement réalisés, ils génèrent 106 à 109 fois la séquence cible. « Elle repose sur la succession de plusieurs cycles » (fig.9).

La progression géométrique de raison 2 (tab. 3) permet d'établir une relation pour calculer le nombre des copies totale et cibles.

Tab. 3: Progression géométrique de raison 2 des cycles de PCR et nombre de copies.

Cycle	1	2	3	4	5	6	----------**n**	**n** : nombre de cycle
Copies totale (**N**)	2	4	8	16	32	64	----------	$N=2^n$
Copies parasites	2	4	6	8	10	12	----------	2n
Copies cibles	0	0	2	8	22	52	----------	2^n-2**n**

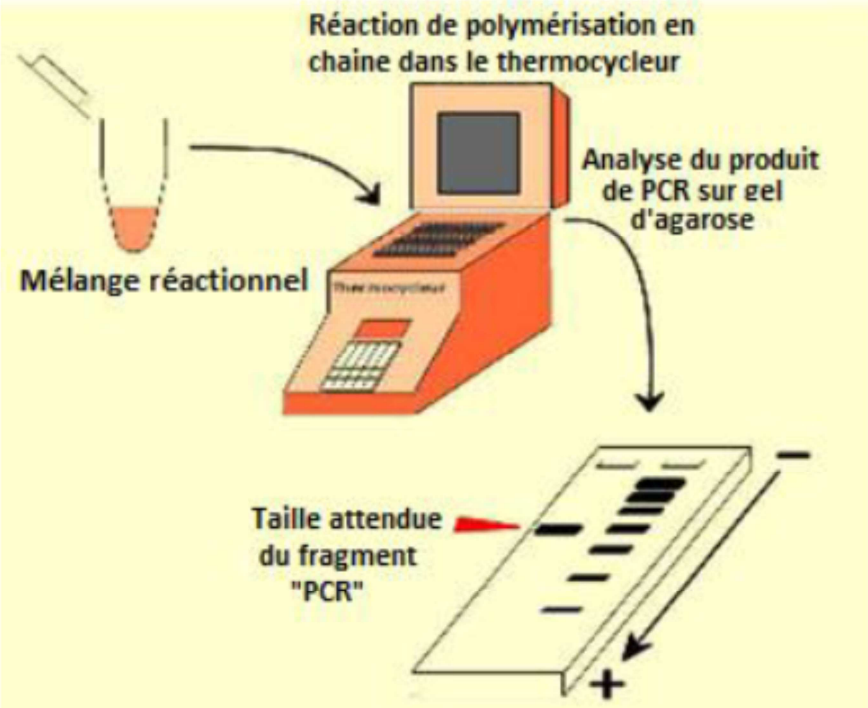


Fig.7:Réaction d'amplification d'ADN dans le thermocycleur et visualisation du produit de PCR par électrophorèse.

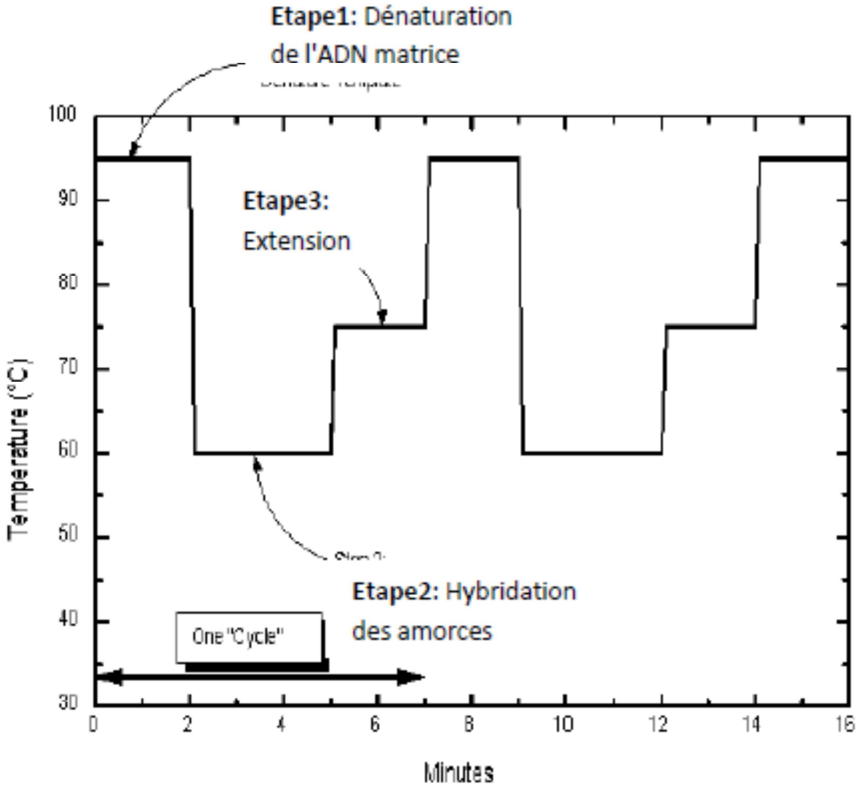


Fig.8: Profile de cycles de la température de la PCR

Etape1: Dénaturation de l'ADN matrice

Etape2: Hybridation des amorces

Etape3: Extension

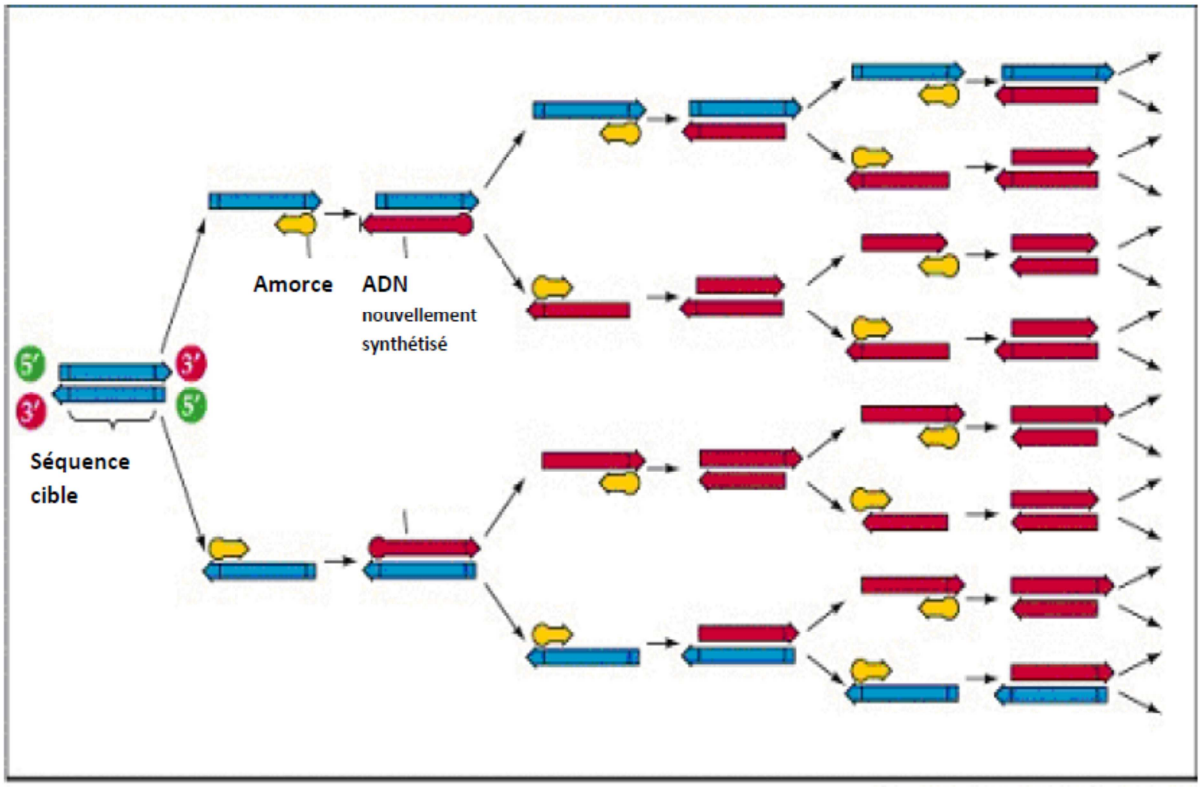


Fig.9: Amplification d'ADN par PCR. Le produit d'un cycle sert de matrice pour le cycle qui suit.

Le désigne des amorces (primers) repose sur les critères suivants:

- Taille entre 17 à 31 nucléotides
- Contenu GC : ≈ 50 %
- Thproches entre les deux amorces (F et R).
- Absence de répétition d'un même nucléotide
- Absence de complémentarité entre les deux amorces (pas de risque de formation de dimères)
- Faible risque de formation des structures secondaires (Ex. Epingle à cheveux).

Pour calculer le Th d'une amorce on utilise la formule suivante:

$$\mathbf{Th}= 4\ (C+G) + 2(A+T) - 5$$

4-4-Applications et sensibilité de la PCR

La PCR est un outil puissant, facile d'utilisation, hautement efficace, extrêmement sensible et spécifique, lors de chaque cycle, la quantité d'ADN étant multiplié par deux (augmentation exponentielle).

La connaissance de séquence de bordures entourant un gène d'intérêt est importante, les produits d'amplification obtenus par PCR peuvent être utilisés pour le clonage et le séquençage de ces gènes, ou pour des études comparatives ou phylogénétiques. Dans ces deux derniers cas, les amorces sont spécifiques à des régions conservées d'un gène commun d'une grande variété d'organismes. Par Exemple : le gène qui code pour l'ARNr 16S a des régions hautement conservées encadrant une région hautement variables. La PCR est utilisée aussi dans :

ADN nouvellement synthétisé

Séquence cible

Amorce

ADN nouvellement synthétisé

- La mutagénèse dirigée
- Les études paléontologiques (fossiles : momies, plantes, animaux, …etc.)
- Le diagnostique microbiologique
- Le diagnostique moléculaire des maladies génétiques et infectieuses (surtout les cancers et les microorganismes difficilement cultivés Ex. *Bartonella,* virus …etc.).

N.B.La présence d'un gène spécifique indique la présence vraie semblable de l'agent causative. Ainsi, la PCR évite de devoir cultiver l'organisme, une procédure souvent longue et onéreuse.

5- Séquençage

Le séquençage est une technique d'analyse de l'ADN, il permet de déterminer l'ordre des nucléotides. Actuellement la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de Sanger.

5-1- Méthode de Sanger

Cette méthode génère des fragments d'ADN terminés par l'une des quatre bases marquées au préalable, car l'élongation de la chaîne s'arrêtera après l'incorporation d'un didésoxynucléotide (ddNTP) (fig. 10). C'est le principe sur lequel baser cette méthode.

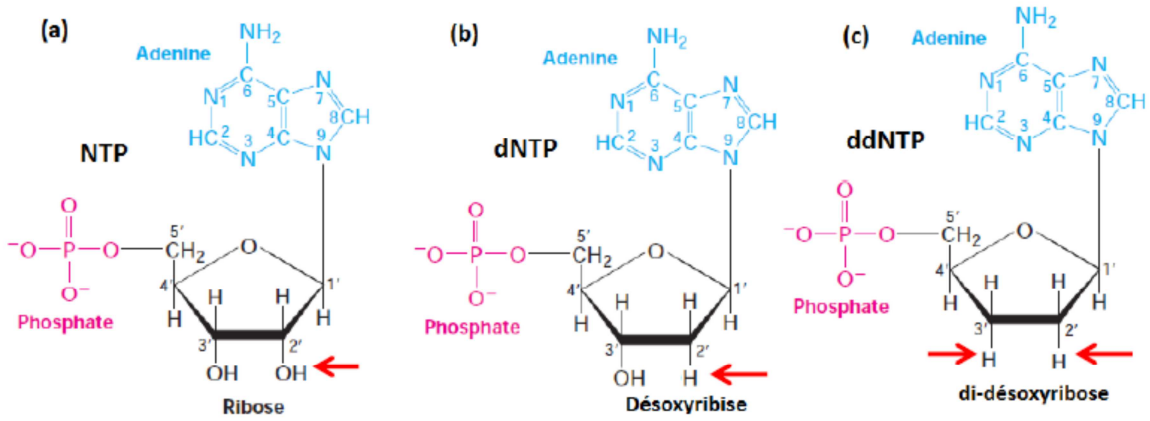


Fig.10: Les différentes formes des nucléotides.

La méthode de Sanger permet de déterminer une séquence inconnue par l'intermédiaire d'une copie d'ADN simple brin. Réalisé grâce à l'ADN polymérase et une amorce spécifique. Pour mieux comprendre le principe de séquençage, on utilise des ddNTP non marqués. Alors on utilise quatre tubes séparés contenant l'**un** des **d**dNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Chaque tube contient: ADN polymérase (Ex. Pfu Polymérase); amorce (F **ou** R), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); eau purifiée de nucléases (WFN), MgCl2 et l'ADN à séquencer.
:*Amorce (primer)*

La détermination de l'enchaînement des nucléotides dans un fragment d'ADN simple brin par la méthode de Sanger comporte deux étapes:

1- Synthèse du brin complémentaire d'un brin matrice à l'aide d'une polymérase à partir d'une amorce, en présence des 4 dNTPs et d'un ddNTP qui joue le rôle de terminateur de chaîne (absence de 3'-OH). Quatre réactions en parallèle sont nécessaires, chacune avec l'un des terminateurs présents en faible quantité.

2- Séparation par électrophorèse (PAGE) des fragments synthétisés, le nombre de ces fragments dépend du nombre de résidus nucléotidiques. Donc la position des terminateurs dans la séquence (fig. 10).

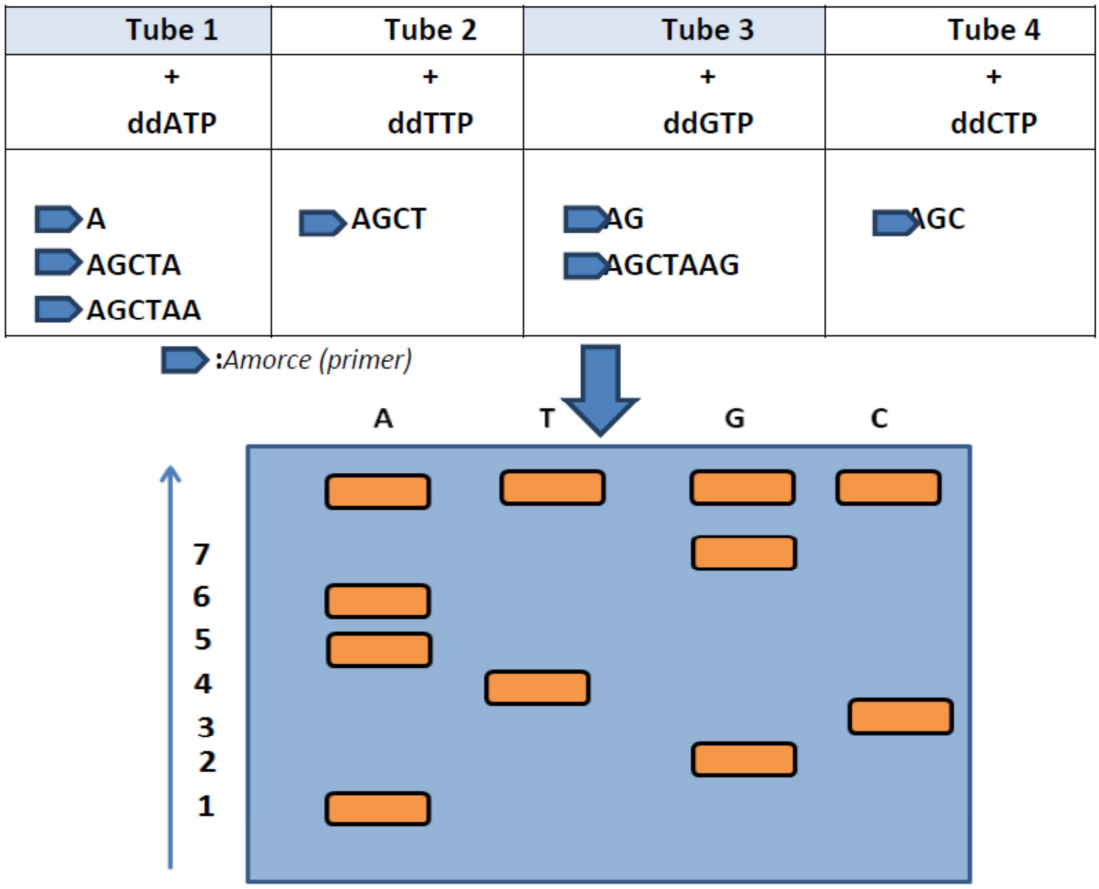


Fig.10: Séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger

5-2- Marquage des produits d'extension

Dans le séquençage automatique, des marqueurs fluorescents sont utilisés, un marqueur différent pour chaque ddNTP (bleu, rouge, vert, orange...etc.). La polymérisation se fait dans un seul tube contenant le mélange réactionnel et les quatre ddNTPs.

5-3- Séquençage d'un produit de PCR

Avant de séquencer un produit de PCR il faut le purifier en éliminant les composants suivants:

- Les dNTPs (car le rapport dNTP/ddNTP est important)
- Les amorces (on besoin d'une seule amorce F ou R pour amplifier un seul brin)
- Les sels (pour éviter l'inhibition de la polymérase lors du séquençage)

- Les produits de PCR non spécifiques (pour éviter les chevauchements de séquences: séquence artefacts).

Généralement on utilise des kits de purification permettant d'éliminer tous les composants non essentiels mêmes des produits non spécifiques < 100 pb par des colonnes de chromatographie (filtration sur gel). Mais les inconvénients de cette méthode qu'elle est relativement coûteuse et n'élimine pas les produit non-spécifique > 100pb.

S'il y'a des produits de PCR non spécifiques > 100 pb la purification se fait sur gel d'agarose (utilisant low melting agarose), seulement la bande spécifique qui est récupérée, puis purifiée et séquencée.Les inconvénients de la purification sur gel qu'elle est très longue, coûteuse et donne de faibles rendements et le risque des mutations lors de la révélation des bandes sous UV en utilisant un agent intercalent.

N.B.Il y'a des enzymes permettant d'éliminer les dNTPs (ex. phosphatase) et les amorces (Ex. nucléase agissant sur l'ADN simple brin). Mais le coût élevé limite leur utilisation.

6- ADN C " ADN complémentaire"

6-1- Caractéristiques de l'ARNm eucaryote

Chez les eucaryotes la région codante peut être interrompue par 1 ou plus d'introns. Donc si on utilise l'ARNm on peut réaliser les avantages suivants :

1- Les introns sont éliminés par épissage (splicing).

2- Les tissues spécifiques permettent d'avoir des quantités considérables d'ARNm (plus de copies par rapport au gène d'intérêt).

Il faut noter que l'ARNm chez les eucaryotes est caractérisé par la queue poly (A), donc on peut utiliser poly (T) (12 à 18) comme amorce pour des ARNm eucaryotes différents et aussi pour leur extraction (fig.11).

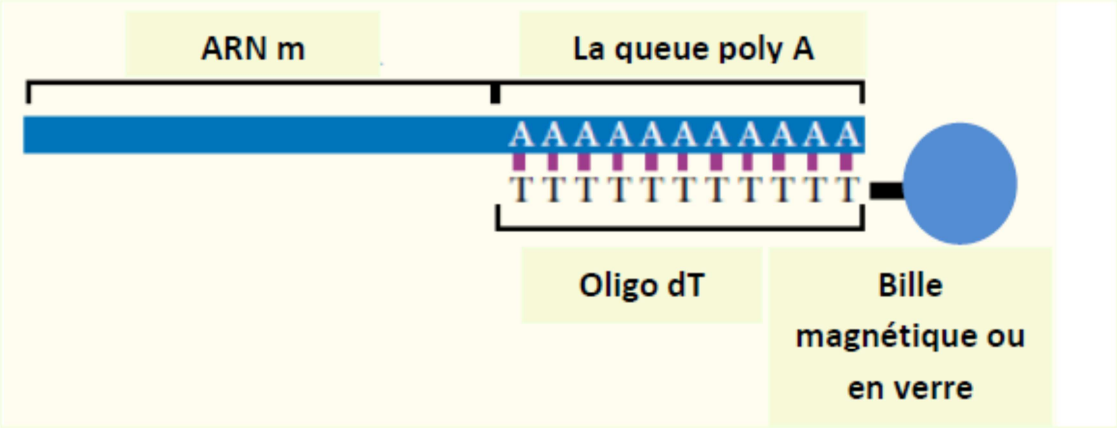


Fig.11: L'utilisation d'une queue poly (T) fixée sur un support pour l'extraction des ARNm eucaryotes.

6-2- Synthèse de l'ADNc

La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses (RT). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN. Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus dont elles sont une des principales caractéristiques. Par exemples, la transcriptase inverse du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV), celle du Virus de la Leucémie Murine (Mo-MLV [Moleny Murine Leukemia Virus] ou Mu-LV).

Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT (12 à 18) constituée d'une succession de désoxythymidines (comme sur le schéma ci-dessous en rouge). Dans ce cas, tous les ARNm sont a priori copiés en ADNc.

La ribonucléase H ou RNAse H (E.C.3.1.26.4) est une enzyme qui hydrolyse le brin d'ARN dans un double brin hybride ADN:ARN. Elle libère des extrémités 3'-OH et 5'-phosphate. La RNAse H n'hydrolyse pas l'ARN simple ou double brin (fig.16).

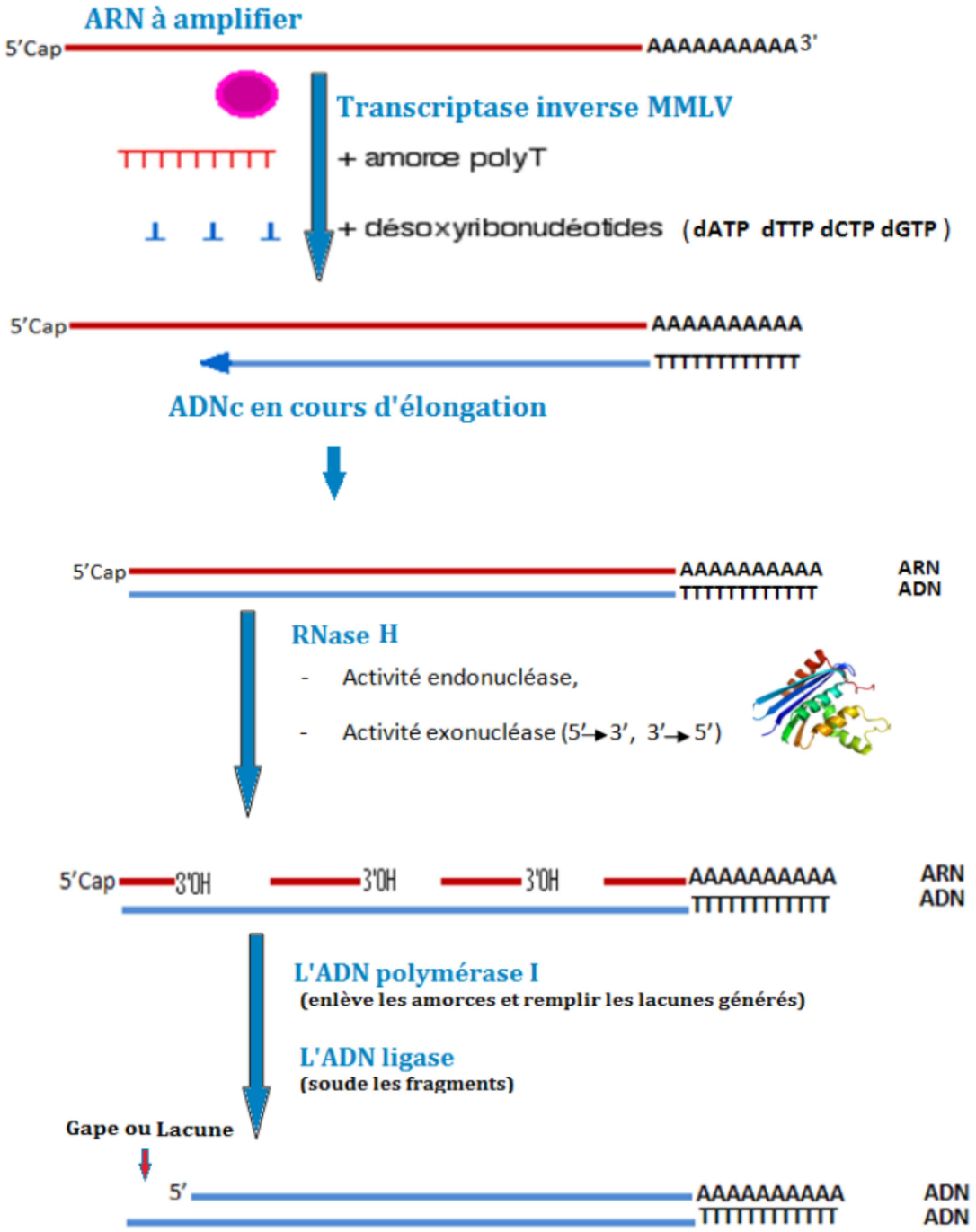


Fig.16: Les étapes de la synthèse d'ADNc. ***N.B.*** Il reste une GAP ou bien résidu 5' Cap-ARN.

La synthèse d'ADNc est catalysée par des **transcriptases inverses** (reverse transcriptase RT en anglais). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire (cf. tableau ci-dessous). Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN.

Synthèse de l'ADNc ARN matrice	ADNc synthétisé
A	T
G	C
C	G
U	A

Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité3'-OH libre. Lorsque les ARN a amplifier sont polyadénylés en 3'(ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythymidines. Dans ce cas, tous les ARNm sont a priori copiés en ADNc.

6-4-Insertion de l'ADNc dans un vecteur approprié

Il y'a deux méthodes d'insertion de l'ADNc dans les vecteurs:

1- Addition d'une queue homopolymérique.

2- Addition d'un joint (linker).

L'addition d'une queue homopolymériquese fait par une ADN polymérase inhabituelle trouvée chez des types de cellules eucaryotes appelées « pré-lymphocytes ». Cette enzyme est appelée transférase terminale, elle est capable d'ajouter un désoxynucléotide dans la partie 3'-OH d'un brin d'ADN (ne nécessite pas d'une amorce et d'une matrice).

A la présence de cations divalents (Mg++, Co++), l'enzyme catalyse l'addition de dNTPs (Purines : Mg++; Pyrimidines : Co++) à l'extrémité 3' de l'ADN. Selon les conditions de réaction on ajoute trois à quelques milles nucléotides.

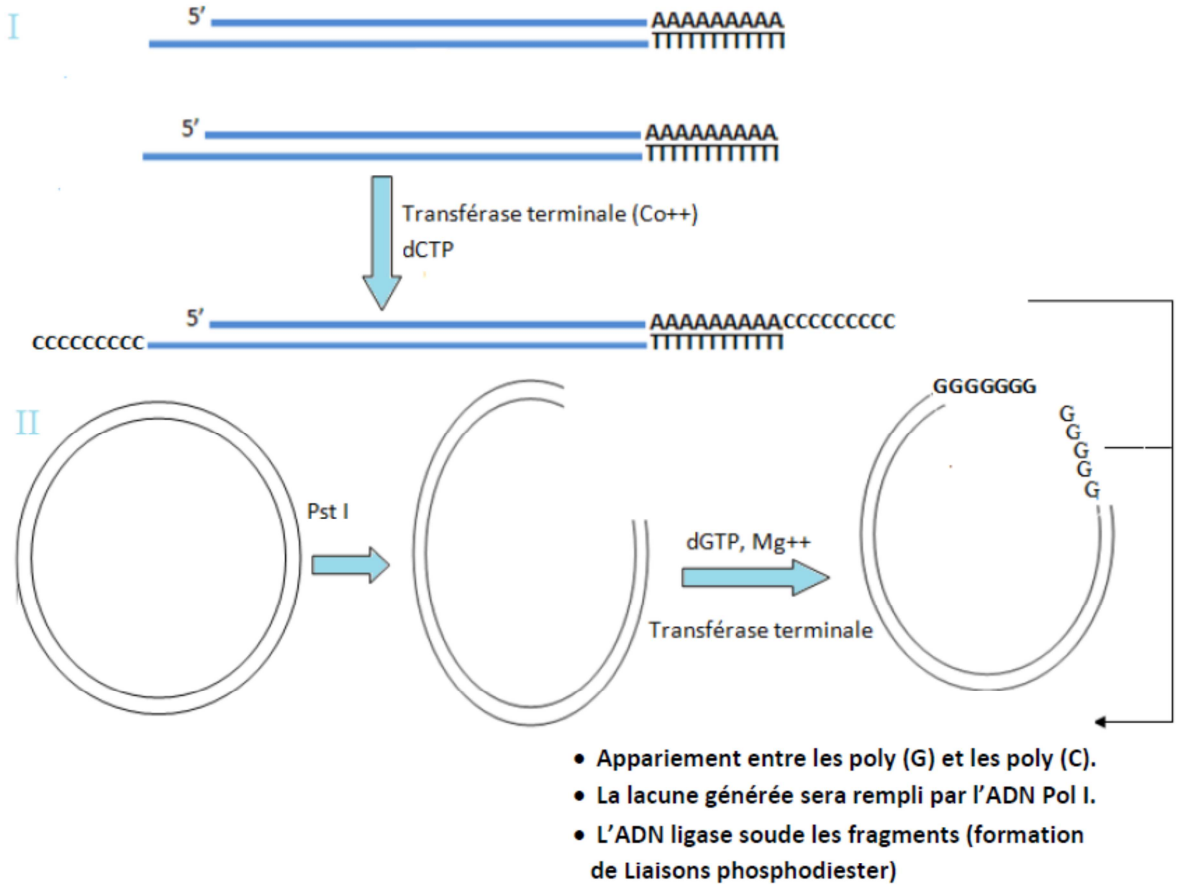
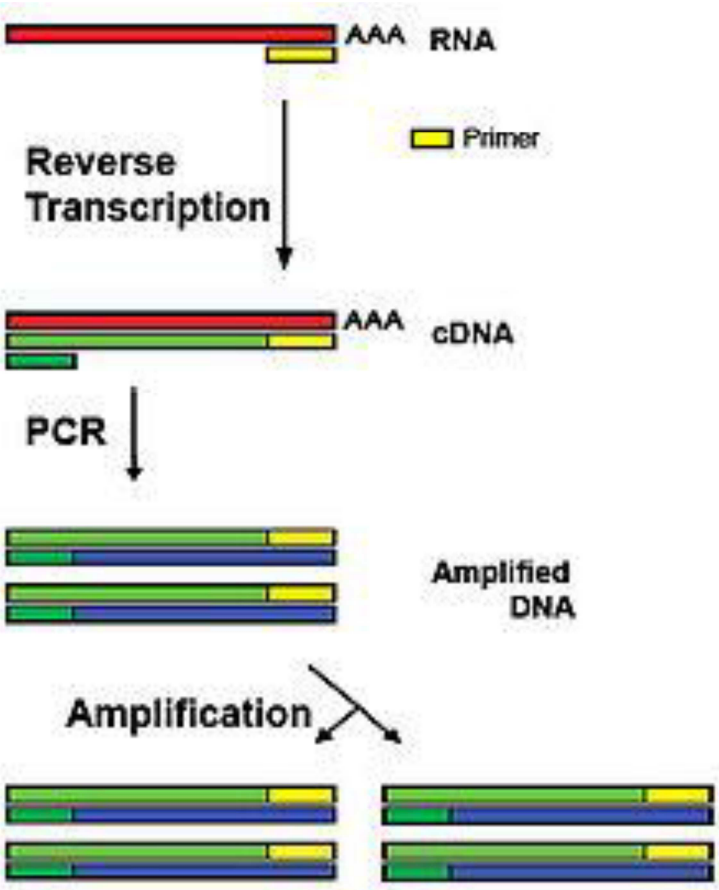


Fig. 17: Insertion de l'ADNc dans un vecteur.

RT-PCR

L'acronyme RT-PCR signifie Reverse Transcriptase PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc)

LaRT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée **transcriptase inverse**, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est en suite utilisé pour réaliser une PCR.

Dans la recherche scientifique, la technique de **qRT-PCR**, pour RT-PCR quantitative, est fréquemment utilisée. Celle-ci permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle est par exemple utilisée pour connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.