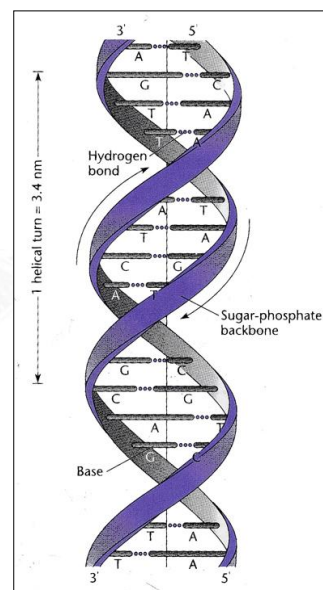


Explications théoriques

L'ADN: Définitions

L'ADN (**A**cide **D**ésoxyribo **N**ucléique) est la molécule qui est utilisée dans la nature comme support matériel de l'information génétique des êtres vivants, un peu comme un livre avec son texte serait un support matériel d'information sur les objets ou idées qui y seraient décrits. C'est dans l'ADN qu'est stocké le "programme de construction" des êtres vivants. C'est le même principe dans tout le monde biologique: on trouve de l'ADN chez tous les animaux, les plantes et chez les bactéries aussi. Ce programme est différent pour chaque espèce; l'ADN vu dans ses détails est différent, mais le langage de programmation est le même.



Figures 1a et 1b Molécules d'ADN.

L'ADN est une molécule ayant la forme d'une chaîne dont les maillons sont des nucléotides. Le choix de nucléotides est limité à 4, symbolisés par les lettres A, C, G et T. Cet ADN est en réalité une double chaîne de nucléotides se faisant face, les deux chaînes étant complémentaires. C'est-à-dire que, pour des raisons chimiques, le nucléotide A est toujours apparié au nucléotide T et le nucléotide C fait toujours face au nucléotide G. Les affinités chimiques, qui sont à la base de cette complémentarité, ont une grande importance dans les méthodes d'analyse d'ADN.

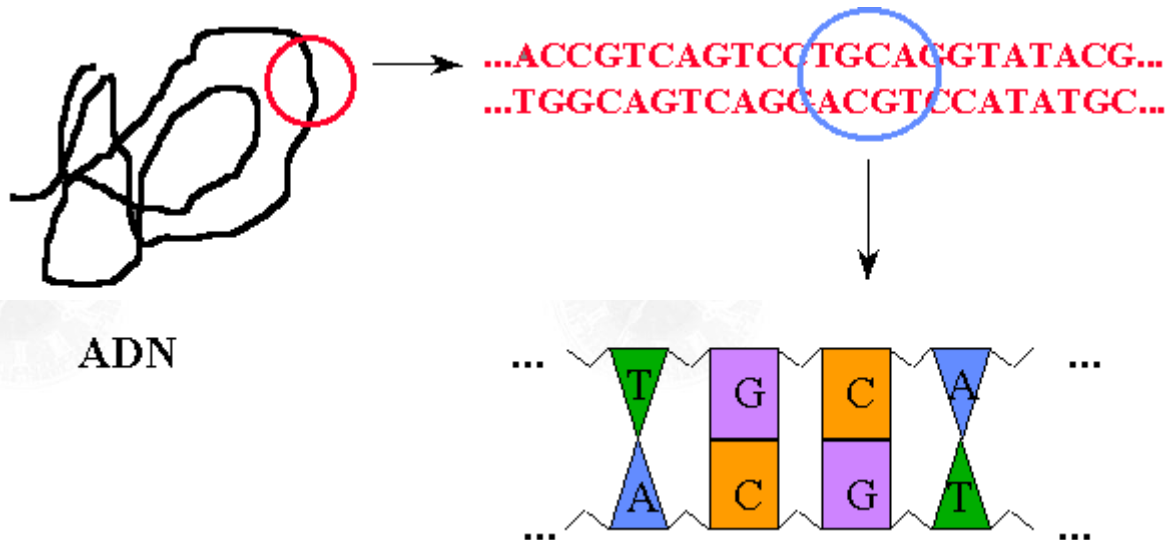


Figure 2 Structure schématisée de l'ADN.

La structure générale de l'ADN est identique parmi les divers organismes: chez l'homme, l'ADN est une énorme molécule constituée de 3 milliards de nucléotides que l'on peut tout à fait comparer à un texte. A raison de 1000 lettres par page, le "texte" de l'ADN de chacune des cellules humaines remplirait environ 3000 volumes de 1000 pages chacun.

Les cellules humaines contiennent environ 700 fois plus d'ADN que la bactérie E. Coli, alors que certaines cellules d'amphibiens et de végétaux contiennent 30 fois plus d'ADN que les cellules humaines.

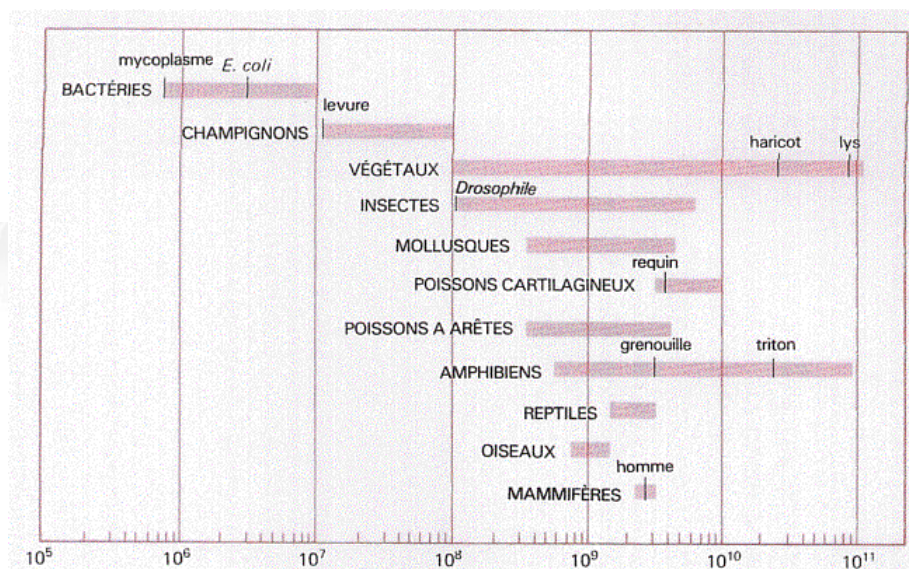


Figure 3. Taille de l'ADN de divers organismes. Le nombre de paires de nucléotides par génome haploïde est montré.

L'ADN: Organisation

L'ADN est constitué de régions dites **codantes** qui contiennent l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine. Ces régions sont les **gènes**. L'ensemble de ces gènes constitue notre héritage génétique ou l'héritage génétique de tout autre organisme qu'il soit animal, végétal, ou encore bactérien.

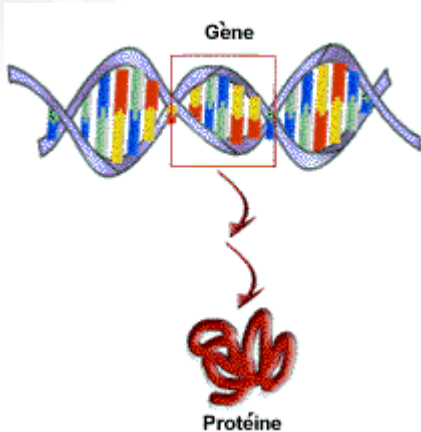


Figure 4 Représentation d'un gène.

Mais une grande partie de l'ADN ne contient aucune information sur la synthèse des protéines. C'est ce qu'on appelle des régions **non codantes**.

Quand on parle d'ADN, on pense au support de l'information génétique qui se trouve à l'intérieur du noyau cellulaire, en une paire d'exemplaires hérités du père et de la mère. Mais les cellules sont équipées d'organelles, appelées mitochondries, participant notamment aux fournitures en énergie de la cellule. Ces mitochondries contiennent aussi leur propre ADN, d'où son nom: ADN mitochondrial.

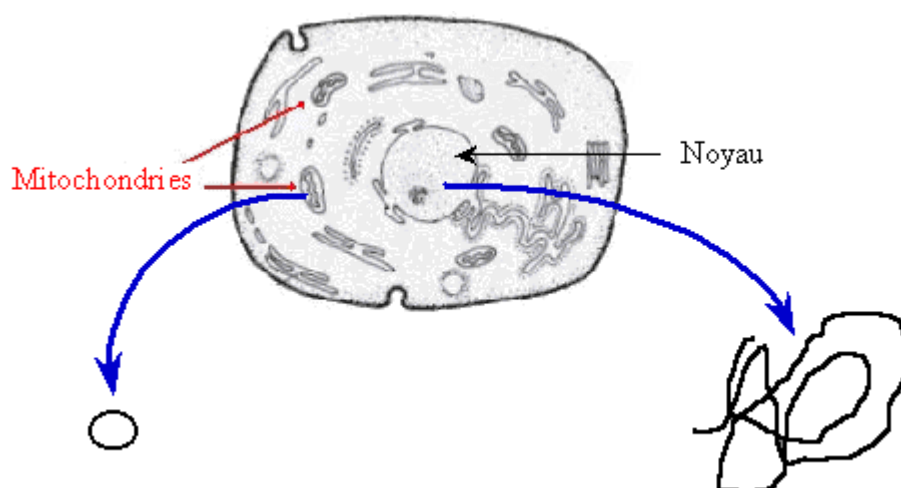


Figure 5 Représentation d'une cellule animale.

L'ADN: Analyses

Il existe de nombreuses variantes d'analyses en biologie moléculaire. Elles incluent toutes une première étape d'**extraction/purification d'ADN**. Il s'agit de prendre un échantillon du matériel à analyser (poisson, viande, lait, etc.) et de le traiter au moyen d'un réactif de dissolution pour dissoudre l'ADN dans le liquide puis le purifier pour le débarrasser des autres molécules indésirables qui se sont dissoutes avec lui.

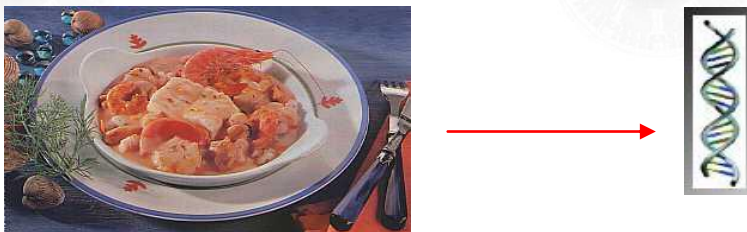
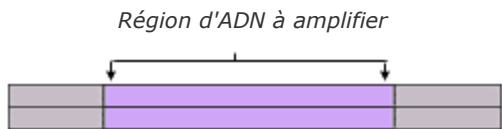


Figure 6 Extraction/purification de l'ADN

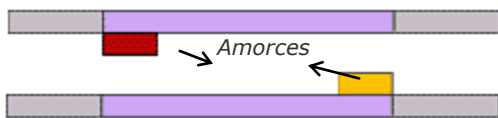
Ensuite, on utilise une technique qui vers la fin des années 80 a bouleversé la biologie moléculaire et par là tous les domaines susceptibles d'utiliser cette technologie. Il s'agit de la **PCR** correspondant au sigle anglais "**P**olymerase **C**hain **R**eaction". Il s'agit d'une technique de multiplication de l'ADN, une sorte de méthode de copiage moléculaire ou **photocopieuse d'ADN**. Les biologistes parlent de techniques d'amplification. Par cette méthode, des zones cibles bien choisies peuvent être recopié ou amplifié un nombre indéfini de fois. En effet, la PCR ne consiste pas à copier tout l'ADN contenu dans un échantillon. **Le copiage est tout à fait sélectif pour un (ou plusieurs) petit segment de l'ADN**. Dans l'éprouvette dans laquelle se déroule la réaction, on ajoute divers réactifs dont certains sont là pour déterminer quelle partie de l'ADN doit être copiée. Dans la pratique, on choisit donc ces réactifs pour pouvoir copier spécifiquement un marqueur génétique, une région ou séquence intéressante. Le copiage s'effectue par cycles, chaque cycle permettant le copiage de l'ADN modèle, ainsi que des copies déjà obtenues aux cycles précédents. Le processus est donc exponentiel, le nombre d'exemplaires de la séquence-cible étant multiplié par 2 à chaque cycle de copiage.



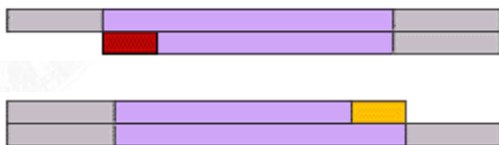
Etape 1: Dénaturation des brins par la chaleur.



Etape 2: Hybridation des amorces.



Etape 3: Elongation des amorces.



Synthèse de nouveaux brins d'ADN: fin du 1er cycle; répétitions des étapes 1 à 3.

Figure 7 Illustration schématique de la PCR

Il faut relever que **la PCR n'est pas une analyse en soi**. Ce n'est toujours qu'une première étape permettant de mettre à disposition du matériel en quantité suffisante pour effectuer toutes les analyses que l'on peut souhaiter et de le faire de façon sélective. La plupart du temps, la PCR sera suivie d'une analyse par **électrophorèse** du matériel amplifié. Les fragments obtenus sont séparés par migration dans une gélatine sous l'action d'un champ électrique. Par l'action de tamisage de la gélatine, l'électrophorèse conduit à une séparation des fragments selon la taille. Ces différents fragments sont ensuite rendus visibles par des colorants ayant une affinité pour l'ADN.

Selon les informations désirées, d'autres analyses subséquentes sont nécessaires. Par exemple, dans le cas d'une détermination d'espèce, après l'extraction d'ADN de la viande ou du poisson en question, le gène d'intérêt va être amplifié par PCR. En général, à ce stade, une électrophorèse - séparation de fragments d'ADN selon la taille - ne nous permettra pas de différencier les espèces car la plupart d'entre elles possèdent une longueur identique de séquence du gène étudié. Par contre, il existe des variations dans l'agencement ou l'ordre des nucléotides. Ce sont ces différences qui permettent de distinguer les espèces.

ACAGGACTAT	TCCTAGCCAT	GCACTACTCA	CCAGAGGCCT	CAACCGCCTT
ACAGGCCTAT	TCCTAGCAAT	ACACTATACA	CCAGACACAA	CAACAGCATT
ACAGGCCTTT	TCCTAGCCAT	ACACTATACC	TCCGACATCG	CCACCGCCTT
ACCGGCCTAC	TACTAGCCAT	GCACTACACA	GCAGACACAT	CCCTAGCCTT
ACAGGTTAT	TTTAGCTAT	ACATTATACA	GCAGATACAT	CATCAGCATT

Figure 8 Comparaison d'une partie de la séquence du gène d'intérêt (le cytochrome b) de 5 espèces animales différentes. Les nucléotides noircis montrent les similitudes et les nucléotides non noircis montrent les différences.

L'analyse consiste donc à mettre ces différences en évidence, soit en lisant directement l'ordre des nucléotides, il s'agit du **séquençage**, soit en découpant (digérant) les fragments avec l'aide d'outils appropriés - les enzymes de restriction - c'est la technique dite de **PCR-RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Dans la technique de **PCR-RFLP**, les enzymes ont la particularité de couper l'ADN partout où il détecte une séquence de nucléotides spécifiques. Une enzyme peut évidemment couper à plusieurs endroits le long de la séquence. Le découpage (digestion) de la séquence d'ADN générera plusieurs fragments de longueurs différentes qui pourront ensuite être séparé par électrophorèse. L'ensemble de ces morceaux constitue un profil ou plutôt "**l'empreinte génétique**" de l'espèce examinée.

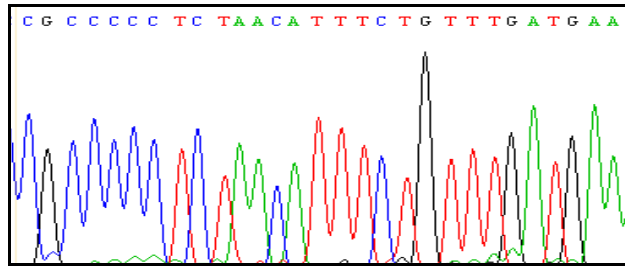


Figure 10 Illustration d'un résultat obtenu par la technique de séquençage. L'observation de la succession des pics de couleurs distinctes permet de "lire" la séquence du morceau d'ADN analysé.

L'ADN des animaux et des plantes contient des **séquences** dites "**répétitives**". Les spécialistes les qualifient également de "**microsatellites**". Ce sont des sortes de bégaiements de l'ADN. Chez les humains, le nombre de bégaiements rencontrés pour une séquence répétitive donnée variant fortement d'un individu à l'autre, l'analyse de telles séquences répétitives est à la base des profils ADN utilisés en police scientifique. Nous utilisons ces analyses de microsatellites pour l'identification des variétés de riz (authentification du riz Basmati). En effet, le nombre de répétitions rencontrées sur des séquences répétitives bien choisies est typique de chaque variété de riz. Le profil ADN obtenu au terme de leur analyse a l'allure de la figure 11.

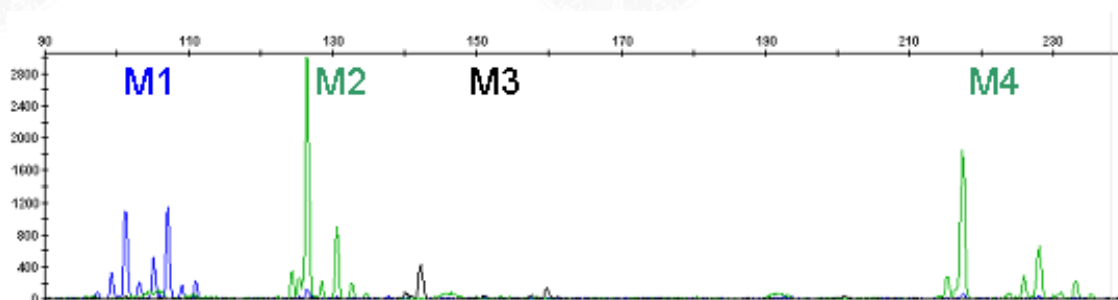


Figure 11 Exemple de profil ADN d'analyse de riz Basmati. Ce profil fournit le résultat d'analyse simultanée de 4 microsatellites (M1 à M4). La présence de plusieurs pics (p.ex. pour M1) montre sans ambiguïté que l'on est confronté à un mélange d'au moins 2 variétés de riz.

Comme évoqué plus haut, l'amplification par PCR est en principe suivie d'une autre technique servant à fournir des informations à partir des morceaux d'ADN obtenus au terme du copiage moléculaire qu'effectue la PCR [mesure de leur taille, PCR-RFLP,...]. Il existe toutefois des stratégies biochimiques ingénieuses qui permettent de libérer une molécule fluorescente chaque fois qu'une copie de la séquence-cible est créée. Si la séquence-cible est absente de l'échantillon, la fluorescence détectée reste inexistante quel que soit le nombre de cycles de copiage réalisés lors de la PCR. Si la séquence-cible est présente, la fluorescence émise augmente exponentiellement. La sensibilité des détecteurs utilisés n'étant toutefois infinie, c'est seulement après un certain nombre de cycles de copiage que la fluorescence atteint un niveau détectable. La présence ou l'absence de la séquence-cible dans l'échantillon étant observable en cours de PCR, on parle de

PCR en temps réel. Cette variante de PCR est en outre quantitative. En effet, le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne un seuil fixé est d'autant plus élevé que le nombre de molécule d'ADN-cible dans l'échantillon de départ était faible.

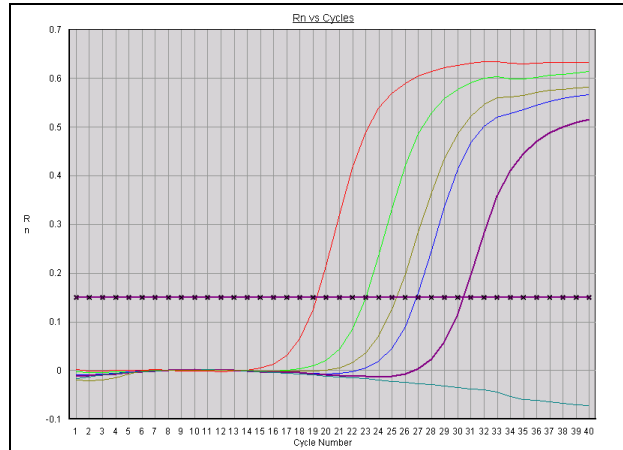


Figure 12 Exemple de résultat d'analyse par PCR en temps réel pour la détection d'ADN de porc dans des préparations à base de viande supposées être du pur boeuf. En abscisse, nous avons le nombre de cycles de copiage, et en ordonnées la fluorescence détectée. A chaque échantillon correspond une courbe de couleur différente. L'échantillon correspondant à la courbe gris-bleu ne contient pas de porc (par d'augmentation de fluorescence au fil des cycles de PCR). Les autres échantillons contiennent manifestement du porc à des degrés divers.