

## **Cour 03 : les sondes nucléiques et technique de transfert**

### **1. Hybridation moléculaire**

#### **Introduction :**

L'hybridation moléculaire ou appelée aussi hybridation des acides nucléiques est un moyen essentiel en biologie moléculaire pour détecter une séquence d'ADN d'intérêt. Elle est fréquemment utilisée soit lors de criblages de banques d'ADN génomique ou ADNc, soit lors d'études de l'organisation de régions spécifiques du génome par Southern blot, soit lors de l'analyse de l'accumulation des transcrits dans les cellules. Le succès de ces méthodes dépend de la possibilité d'obtenir des sondes d'ADN marquées à l'aide de nucléotides radioactifs ou modifiés chimiquement. Les techniques de marquage donnent soit des sondes marquées uniformément (marquage interne), soit à leurs extrémités (marquage aux extrémités).

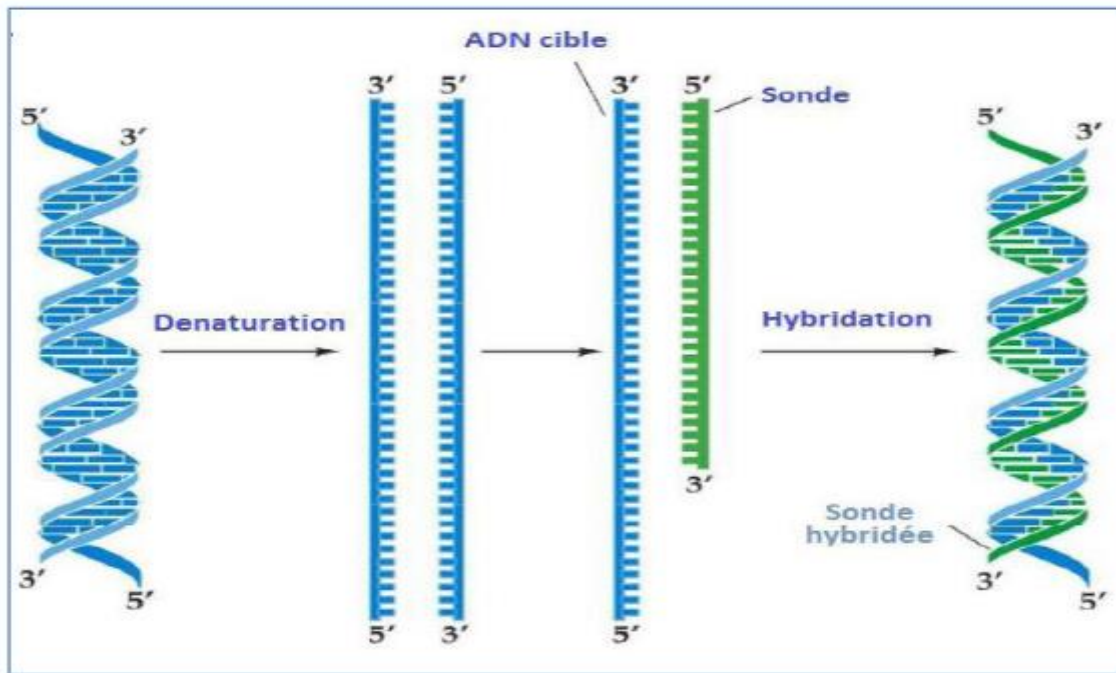
Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire. Les sondes d'acides nucléiques peuvent être fabriquées sous forme de molécules simple brin ou double brin mais doivent être utilisées sous forme simple brin.

#### **I. Principe de l'hybridation moléculaire :**

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 d'ARN) avec des oligonucléotides ou polynucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière anti-parallèle et complémentaire. Ces oligo- ou polynucléotides sont appelés sondes nucléiques ou amorces selon leur utilisation.

L'hybridation moléculaire est l'association de 2 simples brins d'ADN (ADNs) par formation de liaisons H entre ces deux brins. On distingue les hybrides:

- ADN-ADN = Homoduplex
- ADN-ARN = Hétéroduplex



**Figure : Hybridation des acides nucléiques**

L'hybridation complémentaire entre deux brins d'ADN homologues est appelée renaturation.

Ce phénomène est en relation directe avec la température d'hybridation notée  $T_h$ .

## II. Température d'hybridation :

La température d'hybridation  $T_h$  est déterminée en utilisant plusieurs formules qui sont en fonction de certains éléments :

- Le contenu en C+G : la complémentarité des deux brins de l'ADN est maintenue grâce à l'appariement entre G et d'une part et A et T d'autre part. Mais le nombre de liaison hydrogène n'est pas le même pour chaque couple de base. Il est évident donc que le nombre de bases sera un facteur non négligeable dans le calcul de la  $T_m$ . on utilise plutôt la formule :  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ .
- Longueur du fragment (nombres de nucléotides) : La  $T_m$  devient plus grande si la longueur de l'ADN l'est aussi : un ADN long contient plus de liaisons à dissocier qu'un ADN plus court.
- Composition du milieu : les sels sous forme de cations monovalents, lorsqu'ils sont ajoutés aux fortes concentrations ( $>1M$ ) n'influencent pas les valeurs de  $T_m$ . Par contre, aux faibles concentrations, la  $T_m$  diminue.

Mis-appariement : De manière générale, l'abaissement de la  $T_m$  est de  $1^\circ\text{C}$  pour une valeur de 1% de mésappariement.

Dans le cas d'hybridation des petits oligonucléotides tel que des amorces cette température est en déduite à partir de la formule de Wallace qui permet de calculer la température de fusion ( $T_m$ ) représentant la température de demi dénaturation de la chaîne de l'ADN chauffé.

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) ; T_h = T_m - 5$$

Dans le cas des d'hybridation de fragment d'acide nucléiques de taille inférieure à 100 pb , une formule empirique tenant compte de la concentration du sel, les mésappariements et la concentration de formamide est utilisée :

$$T_m = 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% (C+G)) + 81.5 - (675 / \text{Nombre de base}) - \% \text{ mismatch} - 0.65 \% \text{ de formamide.}$$

Dans le cas de longues séquences (>100) et des conditions réactionnelles standards la  $T_m$  est calculée selon la formule suivante :  $T_m = 69.3 + 0.41 (\% (C+G))$

### III. Facteurs influençant l'hybridation :

Plusieurs facteurs peuvent affectés le phénomène hybridation des acides nucléique, à savoir :

- La température d'hybridation
- La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation
- La force ionique
- La nature des acides nucléiques
- La taille du fragment nucléique

### IV. Les différents types d'hybridation :

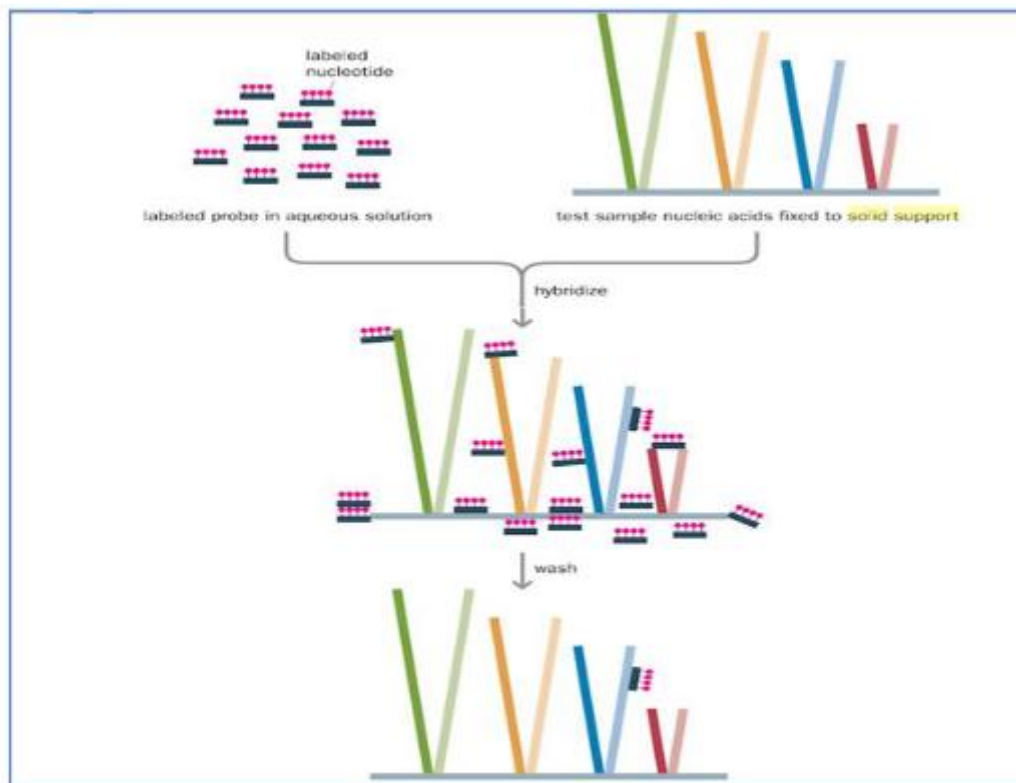
L'objectif des méthodes d'hybridation moléculaire est de détecter la présence d'un acide nucléique spécifique par l'utilisation d'un fragment d'ADN ou d'ARN complémentaire, appelé sonde. Cela peut être réalisé soit sur support solide, soit en phase liquide.

#### 1. Hybridation sur support solide :

La séquence complémentaire cible est immobilisée sur un support solide (Figure). Cette méthode facilite la séparation des fractions hybridées de celles non hybridées. Cependant, la

vitesse d'hybridation est nettement inférieure à celle de la phase liquide (jusqu'à 10 fois). Ce type d'hybridation est représenté par différentes techniques tel que le Southern blot, Northern blot et le dot plot. Plusieurs types de supports permettent d'immobiliser les brins d'acides nucléiques :

- **La nitrocellulose** : représente le premier support d'immobilisation ayant été utilisé pour la fixation des acides nucléiques. Ce support, requiert une forte concentration ionique, ce qui permet de créer des liaisons irréversibles sous vide et à 80°C.
- **Les membranes synthétiques (à base de nylon)** : De même, elles nécessitent de fortes forces ioniques. Ces membranes permettent des liaisons plus stables que celles obtenues avec la nitrocellulose à cause de leur traitement par les rayons UV courts (254 nm). Ce type de liaison, va permettre plusieurs déhybridations et réhybridation.



**Figure : Représentation de l'Hybridation sur support solide**

## 2. Hybridation en phase liquide :

L'hybridation en phase liquide est plus rapide, plus sensible, est réalisée en tubes ou en microcupules. Les segments complémentaires sont placés dans une solution contenant un tampon et de la formamide. L'agitation thermique assure la liaison entre les fragments complémentaires. Cette température est généralement inférieure de 15°C à la  $T_m$  de l'ADN

concerné. Il existe de nombreuses techniques de séparation, puis de révélation de l'hybride formé. Selon le système choisi, la détection finale peut être réalisée selon trois méthodes.

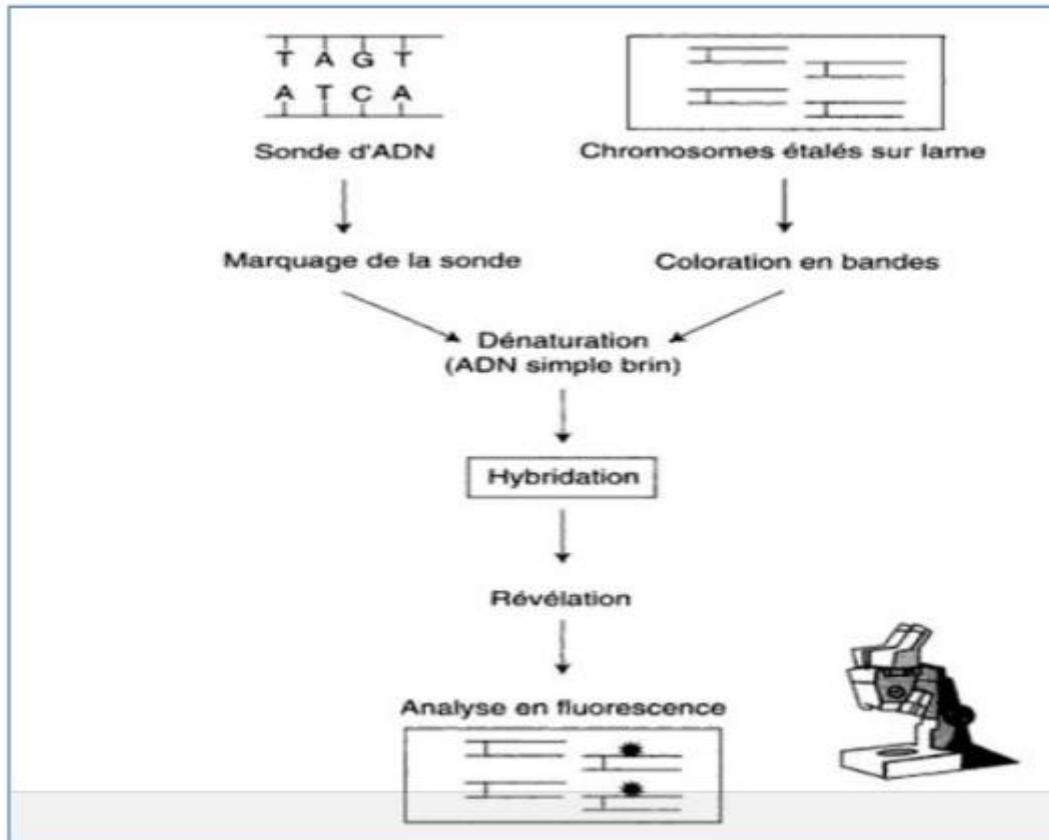
1. les méthodes spectrophotométriques : la diminution en DO à 260nm est due à l'augmentation du taux des hybrides.
2. la technique de la nucléase S1 : digestion des ADN et ARN simples brins.
3. La chromatographie sur hydroxylapatite : Seuls les doubles brins se fixent en raison d'une forte concentration en sels.

### **3. Hybridation in situ (HIS):**

C'est une technique qui permet, par l'utilisation de sondes, de mettre en évidence et de repérer, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques connues. Elle est très proche, dans son principe, du Southern et du Northern Blot et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. A la seule différence que les Southern et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin), un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

### **4. Hybridation in situ sur chromosome (FISH):**

Cette technique permet de déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène d'intérêt et que l'on possède la sonde. La région à étudier (située sur un chromosome préalablement légèrement dénaturé par traitement chimique pour le débarrasser des protéines associées) est repéré grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire. Certains de ces nucléotides de cette sonde sont couplés à une molécule antigénique reconnue par un anticorps fluorescent. En utilisant diverses sondes, greffées à des antigènes différents, on peut ainsi visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes. Technique permettant de déterminer la position d'un fragment d'ADN dans le génome : le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p: bras court et q: bras long) et par rapport aux bandes (mises en évidence par la coloration Giemsa) du chromosome.



**Figure : Les différentes étapes de la FISH**

## V. Marquage et suivi des acides nucléiques

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, northern, ....). 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.

### 1- Marquage radioactif « chaud »

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin). On dispose de plusieurs isotopes radioactifs qu'on pourra incorporer dans la sonde. On peut utiliser :  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ .

Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation in situ. On peut aussi

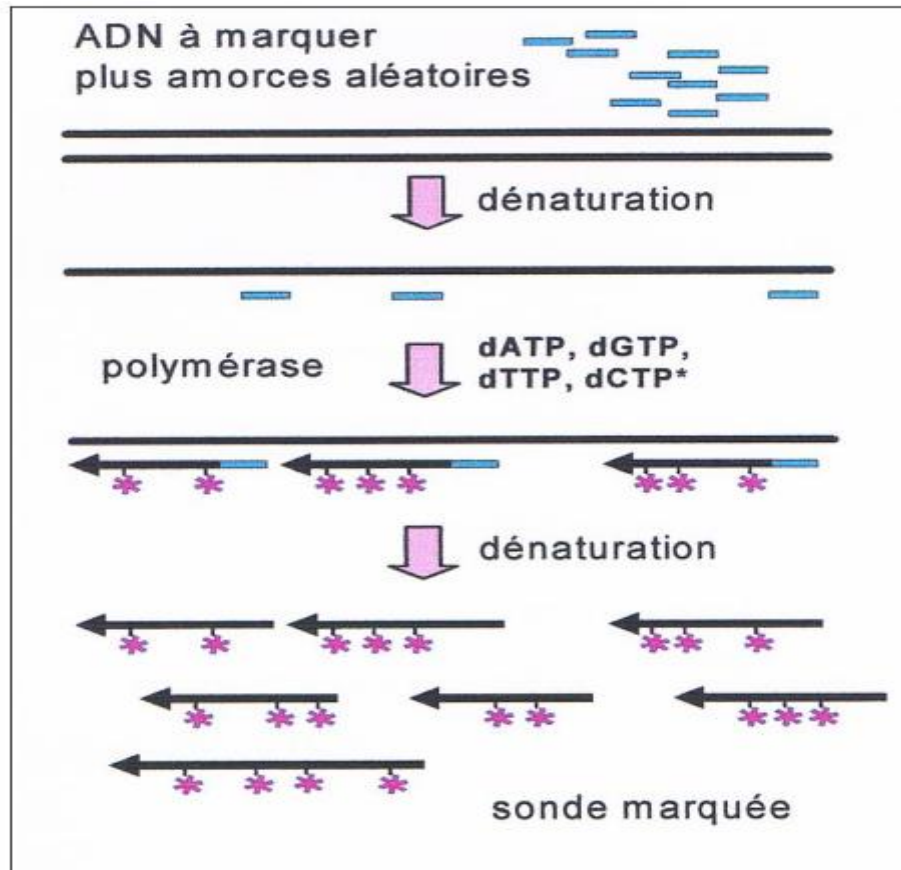
réaliser un marquage en 5' : avec la T4 polynucléotide kinase. La radioactivité est aussi utile pour le marquage des oligonucléotides de synthèse.

### **1.1 Le marquage des sondes double brins**

#### **a) Marquage par amorçage au hasard (Random Printing) :**

Très employé dans les laboratoires pour par exemple les Southern et Northern Blot, il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, nécessaires pour détecter un gène.

Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit  $4^6 = 4096$  nucléotides). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au  $^{32}\text{P}$ . Des ADN polymérases par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

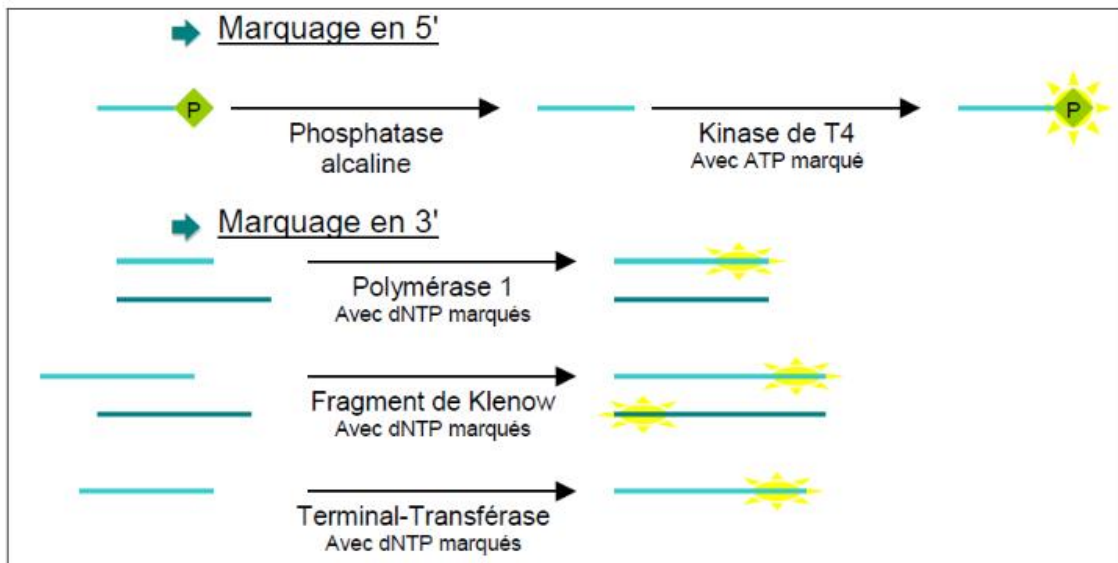


**Figure : Marquage par élongation d'amorces aléatoires (random priming).** L'ADN à marquer est dénaturé, puis hybridé à un mélange d'héxa- ou de nonanucléotides synthétiques de séquence aléatoire. Ces oligonucléotides, présents à haute concentration, servent d'amorce à une réaction de polymérisation en présence du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et de désoxynucléotides triphosphate, dont l'un au moins est marqué.

### b) Marquage en 3' ou en 5' :

Pour un marquage en 3' on peut utiliser : une ADN polymérase (fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse), une exonucléase, ou une terminal transférase. L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'*E. coli* infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP avec du  $^{32}\text{P}$  en position  $\gamma$  ou  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{g-ATP}$ , il est possible d'échanger le groupement 5'- phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radio-actif en position  $\gamma$  sur l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5'- sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.





**Figure : Marquage radioactif des sondes en 5' et 3'**

**c) Marquage par translation de coupure (Nick Translation) :**

utilise 2 enzymes :

\*DNaseI dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simples brin dans le fragment d'intérêt.

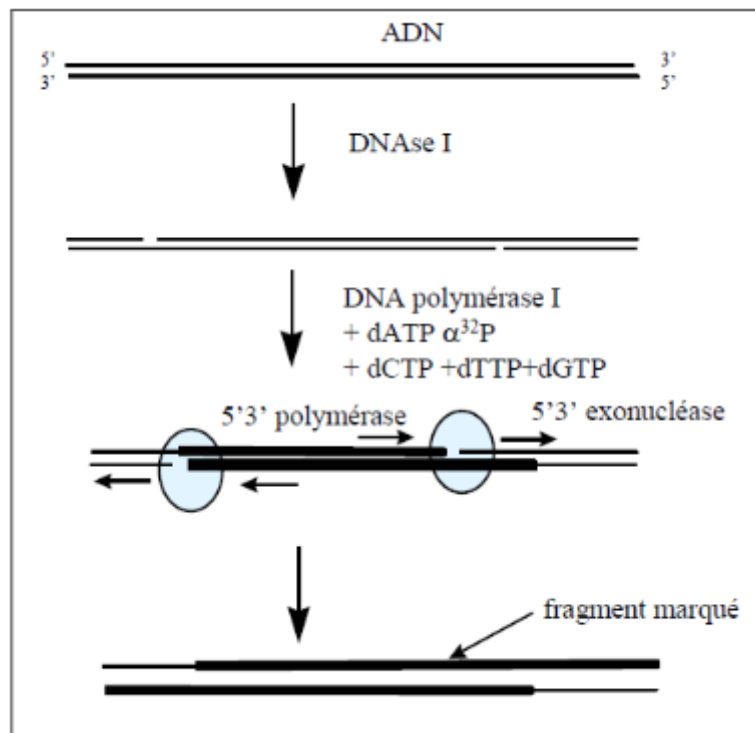
\*DNA pol.I pour dégrader l'ADN dans le sens 5'-3' au niveau de ces coupures et re- polymériser en présence d'un nucléotide chaud « nucléotide qui porte un marquage radioactif ».

On digère le fragment d'ADN par la DNase I de E. coli qui coupe après les pyrimidines, mais d'une façon ménagée de façon à ne faire que quelques coupures au hasard sur le fragment.

Ces coupures sur un seul des brins sont appelées des nicks, elles libèrent des extrémités 5' OH à l'intérieur du fragment. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (32P). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au 32P. Cette technique est appelée "technique de nick translation".

La difficulté de cette méthode est de réaliser la digestion ménagée pour initier la polymérisation. Si la digestion est trop forte, il y a trop de nick, certains se trouvent à proximité l'un de l'autre sur les deux brins et on obtient uniquement des petits morceaux d'ADN, si elle est trop faible, un grand nombre de molécules ne sont pas marquées. De plus l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I attaque le fragment d'ADN par l'extrémité et on obtient un

raccourcissement du fragment. Cette méthode « historique » n'est plus utilisée et a été remplacée par le « Random priming ».



**Figure : Marquage par translation de coupure (Nick Translation).**

## 1.2 Le marquage des sondes simples brin

### ➤ d'ADN :

\*sondes à activité spécifique importante (Southern, Northern Blot)

\*protection contre la nucléase S1, hybridation in situ.

**Avantage :** ne se renature pas sur elle-même lors de l'hybridation.

### ➤ d'ARN (ribosondes).

\*rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN, plus stables

\*pour hybridation in situ

**Remarque :** Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

- nécessité de se protéger du rayonnement émis.

- Décroissance rapide du P32, d'où un besoin de marquer les sondes fréquemment.

Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes « froides ».

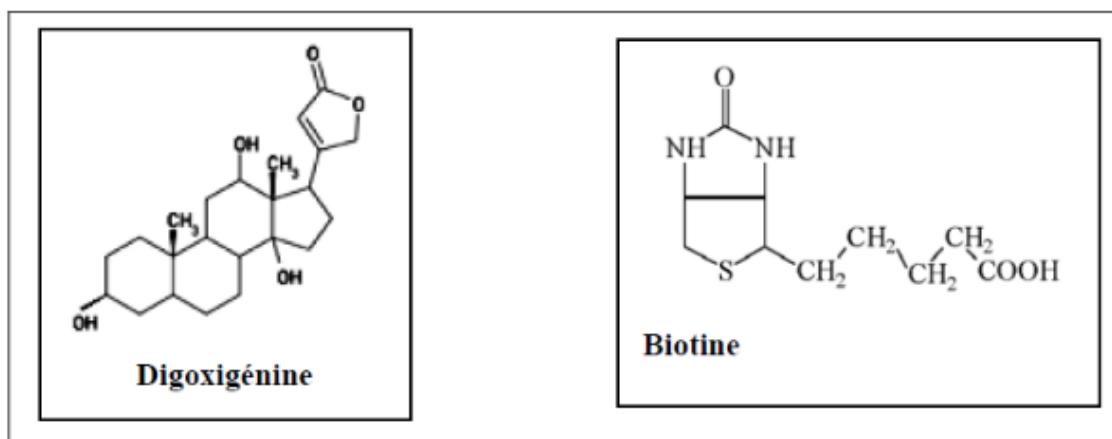
## 2- Marquages froids (fluorescence ; colorimétrie ; chimioluminescence)

### 2.1- Marquage indirect

Les deux types de marquage froid les plus souvent utilisés sont les marquages à la biotine et à la digoxigénine. Ces deux composés sont fixés sur un nucléotide, lui-même incorporé à la sonde.

Ce marquage est appelé colorimétrique (Colorants : biotine, digoxigénine, fluoresceine)

Exemple : l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (HorseRadish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie.



**Figure : Structure de la Digoxigénine et la Biotine**

- **La détection des sondes froides**

La biotine est détectée avec de la streptavidine. L'avidine est une protéine du blanc d'oeuf, elle comporte 4 sites de liaison pour la biotine. Elle est généralement produite par génie génétique dans *Streptomyces avidinii*, sous une forme non glycosylée et prend alors le nom de streptavidine. La digoxigénine se révèle à l'aide d'un anticorps.

**La streptavidine** ou les anticorps n'ont pas d'activité enzymatique propre, on utilise des protéines de fusion pour les détecter. L'anticorps ou la streptavidine sont couplés avec une protéine ayant une activité enzymatique facilement détectable comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase.

**La peroxydase** du raifort (radis noir) (HRP, horseradish peroxidase) est une protéine de 40 kDa. Elle catalyse la réaction :  $H_2O_2 + \text{donneur d'électron} \longrightarrow \text{produit coloré} + H_2O$  on utilise un chromogène comme donneur d'électrons

- soit du tétrachlorure de diamino-3-3'-benzidine (DAB) qui donne un précipité brun
- soit de l' amino-3-ethyl-9-carbazole (AEC) qui donne un précipité rouge.

### La phosphatase alcaline

C'est une protéine de 40 kDa isolé d'intestin de veau.

Plusieurs chromogènes peuvent être utilisés: new fushine, fast red, BCIP/NBT...

### 2.2- Marquage direct « Fluorophore »

Le nucléotide portant le marqueur est incorporé directement.

Groupe chimique qui fluoresce quand il est exposé à une longueur d'onde donnée :

Fluorescéine, Cy5, Cy3, Rhodamine, Texas Red.

Attention : ces sondes « froides » présentent un problème de sensibilité.

En fonction du marquage de la sonde on distingue :

|                       | <b>Marquage</b>  | <b>Révélation</b>  |
|-----------------------|--|--|
| <b>Sondes chaudes</b> | Isotopes radio-actifs (tritium $H_3$ , $P_{32}$ , $P_{33}$ ou $S_{35}$ )   | Autoradiographie   |
| <b>Sondes froides</b> | Produits fluorescents (FISH : Fluorescent In Situ Hybridization) : Le FISH est une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments à l'intérieur de la cellule. | Microscopie à fluorescence                                   |
|                       | Haptènes: biotine dioxygénine  | Avidine et streptavidine<br>Anticorps marqués par une enzyme |
|                       | Enzymes (phosphatase alcaline)   | Anticorps ou chromogènes                                     |