

Chapitre III. HYBRIDATION MOLECULAIRE

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

Sondes nucléiques sont des séquences d'acides nucléiques simple brin (d'au moins 15 nucléotides), complémentaire de la séquence d'ADN recherchée (ADN cible), pour les ARN, on parle de Ribosonde. La sonde n'a pas besoin d'être aussi longue que l'ADN cible.

1. La température de fusion de l'ADN

C'est une température, appelée également Température de demi dénaturation (**T_m**) qui correspond à l'ouverture ou au déroulement de 50% de la chaîne de l'ADN chauffé. C'est l'effet hyperchromique qui correspond à la rupture des liaisons hydrogènes (liaisons faibles) et la séparation des 2 chaînes entraîne une augmentation dans l'absorption d'U.V de 40% à 260 nm. La valeur de T_m des ADN est une fonction linéaire du pourcentage de (G + C) de l'ADN

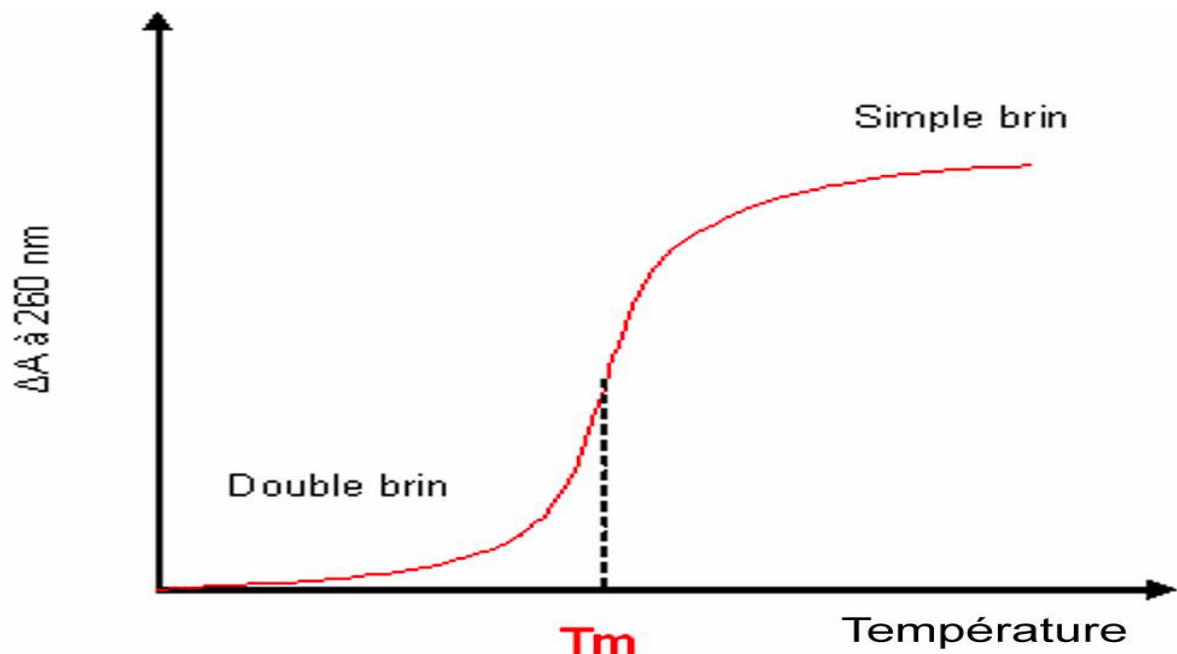


Figure: Mise en évidence du phénomène coopératif de passage de l'ADN double brin à l'ADN simple brin et mesure de la T_m.

Le résultat du passage de la forme bicaténaire à la forme monocaténaire de l'ADN est une augmentation du coefficient d'extinction de l'ADN : c'est l'effet hyperchrome. Les bases

azotées qui absorbent à cette longueur d'onde sont très ordonnées dans la forme bicaténaire et chaque base n'est plus un centre absorbant isolé. Cependant, les bases azotées de l'ADN simple brin se masquent moins et n'ont plus de structure ordonnée (quenching minimal). Le coefficient d'extinction moléculaire est plus élevé.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la valeur de la T_m :

➤ **la composition en bases** : 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 liaisons 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 . De manière générale, on note que la relation entre la composition en G+C et la T_m est de nature linéaire pour des ADN de longueurs identiques ou suffisamment longs (> 200pb) :

$T_m = 69,3 + 0,41 (\%G+C)$ Mais en pratique, pour les oligonucléotides (duplexes de parfaits de 11 à 20 bases), on utilise plutôt la formule : $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ dont il faut retrancher 1°C par motif AA, AA, ou TT et ajouter 1°C par motif GG, GC ou CC.

➤ **les mésappariements** : De manière générale, l'abaissement de la T_m est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement (mismatch : voir notions d'alignement global de bioinformatique).

➤ **la nature du milieu de l'ADN**: 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. Cette diminution est de 15°C pour une unité logarithmique de concentration ionique. Les cations divalents ont un effet encore plus important. D'autres substances telles que le formamide peuvent abaisser la T_m lors des hybridations. Dans ce cas, la T_m est estimée selon la formule suivante (pour 100 pb) :

$\Delta T_m = -0,6 \times (\% \text{ formamide})$.

➤ **la longueur des fragments des ADN** : 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. La variation de température de fusion est donnée par la relation suivante :

$\Delta T_m = -500/\text{nombre de pb}$. On constate tout de même que l'effet longueur est important pour les petits fragments.

REMARQUE: on peut utiliser une formule empirique qui regroupe tous ces paramètres à la fois pour des fragments de taille inférieure à 100 pb:

$$T_m = 16,6 \log [M] + 0,41 (\%G+C) + 18,5 - (\% \text{ mismatch}) - (675/\text{longueur en bases}) - 0,65 (\% \text{ de formamide})$$

Avec $[M]$ = la concentration en ions Na^+

2. L'hybridation

Si la séparation des brins de l'ADN est suivie d'un refroidissement progressif et lent, il y aura réassociation progressive des deux brins complémentaires de l'ADN (Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci lui est complémentaire): c'est le phénomène de l'hybridation.

Cette réassociation peut s'effectuer entre des séquences d'ADN et d'ARN ce qui permet d'obtenir des hybrides ADN/ARN plus stables. La séparation des produits de l'hybridation (ADN simple brin, ADN double brin et hybride ADN/ARN) se fait par centrifugation dans un gradient de concentration de chlorure de Césium.

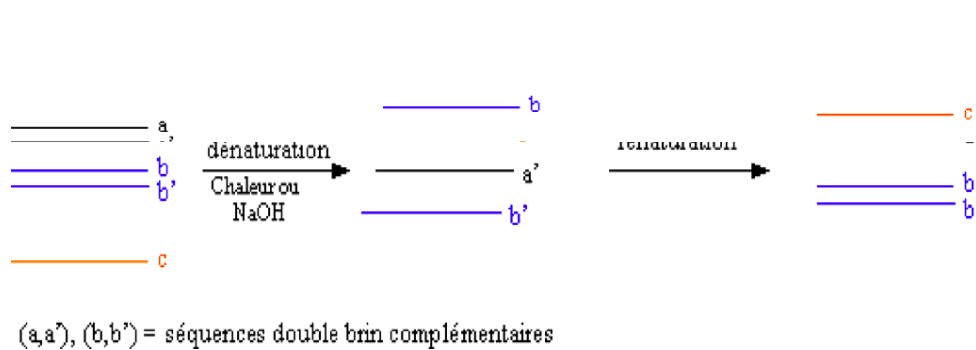


Figure: Principe de l'hybridation

Plusieurs facteurs peuvent influencer le phénomène d'hybridation, à savoir :

❖ **Concentration de l'ADN et temps** : notion de CoT et de RoT . L'hybridation des séquences nucléiques est aléatoire. Cependant, si la concentration de l'ADN est grande, le nombre de copies hybridées sera grand. Il en résulte donc que la vitesse d'hybridation augmente lorsque la concentration de l'ADN augmente. Il en est de même pour le facteur temps : la probabilité d'association des brins complémentaires est importante lorsque le temps est long. L'hybridation est quantifiée en fonction de ces deux variables prises ensemble. Dans le cas des ADN, cette variable est nommée le CoT , pour le cas des hybrides ADN/ARN, elle est dite le RoT :

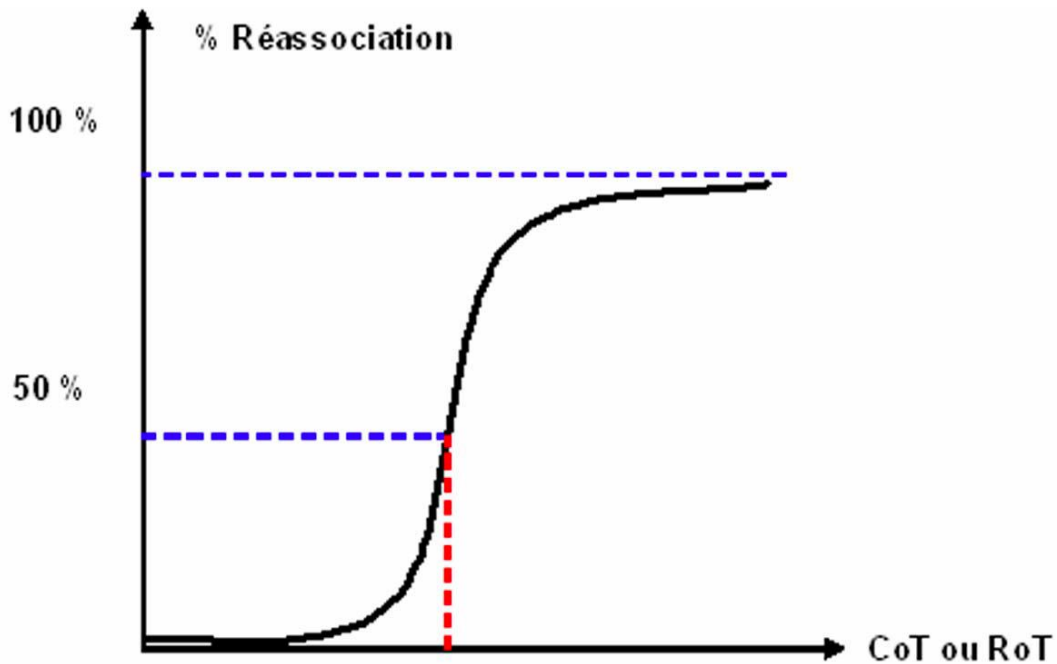


Figure N°6 : Courbe de détermination du Cot et du Rot

❖ **La température** : elle favorise la rencontre des deux séquences complémentaires, donc la vitesse d'hybridation. On note que les meilleures vitesses d'association sont observées pour des températures inférieures à 25% de la T_m de la molécule considérée.

❖ **La taille du fragment nucléique** : Dans le cas où les deux séquences complémentaires sont parfaitement identiques, la vitesse de réassociation de ces deux brins augmente proportionnellement avec la racine carrée de la longueur des fragments considérés.

❖ **La nature des acides nucléiques** : La vitesse de réassociation dépend à la fois de la nature de l'hybride et de sa concentration. Si l'hybridation concerne un mélange ADN/ADN et si l'ADN est en excès par rapport à l'ARN, la vitesse d'hybridation ARN/ADN est 5 fois plus faible que la réassociation ADN/ADN. An revanche, si l'ARN est en large excès, la vitesse de réassociation sera identique à celle de ADN/ADN.

❖ **La force ionique** : la concentration en NaCl joue un rôle important dans les réassociations des segments complémentaires. Pour une concentration de NaCl qui avoisine 1M, la vitesse de réassociation peut être multipliée par un terme de 10. Jusqu'aux environs de 1,2M et au-delà, la force ionique sera sans effet.

3. Types d'hybridation

3.1. Hybridation en phase liquide

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. Les hybrides formés sont quantifiés 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).

3.2. Hybridation sur support solide

La séquence complémentaire cible est fixée (immobilisée) sur un support solide. 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).

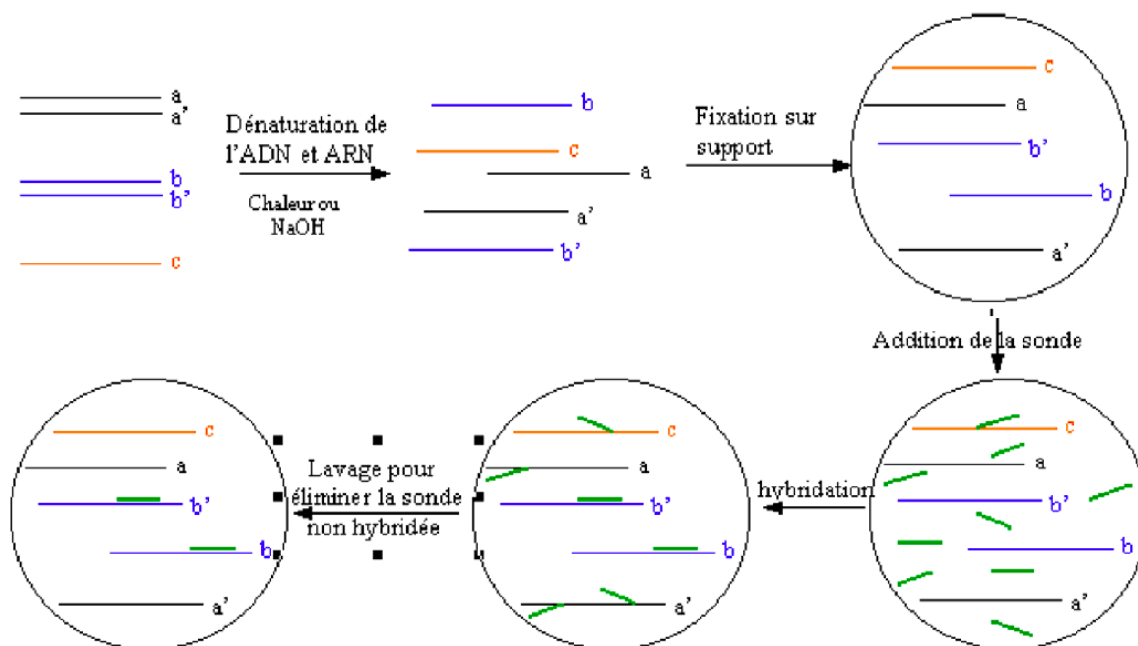


Figure: Hybridation sur support

L'hybridation sur support s'effectue avec plusieurs types de supports qui 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 des forces ioniques fortes. 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 réhybridations.

3.3. 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.

Au laboratoire, les principales applications de l'HIS sont la localisation des gènes sur des chromosomes en métaphase et la recherche de bactéries qui ont intégré un plasmide ou un phage recombinant.

Plusieurs sondes peuvent être utilisées pour réaliser une HIS : l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

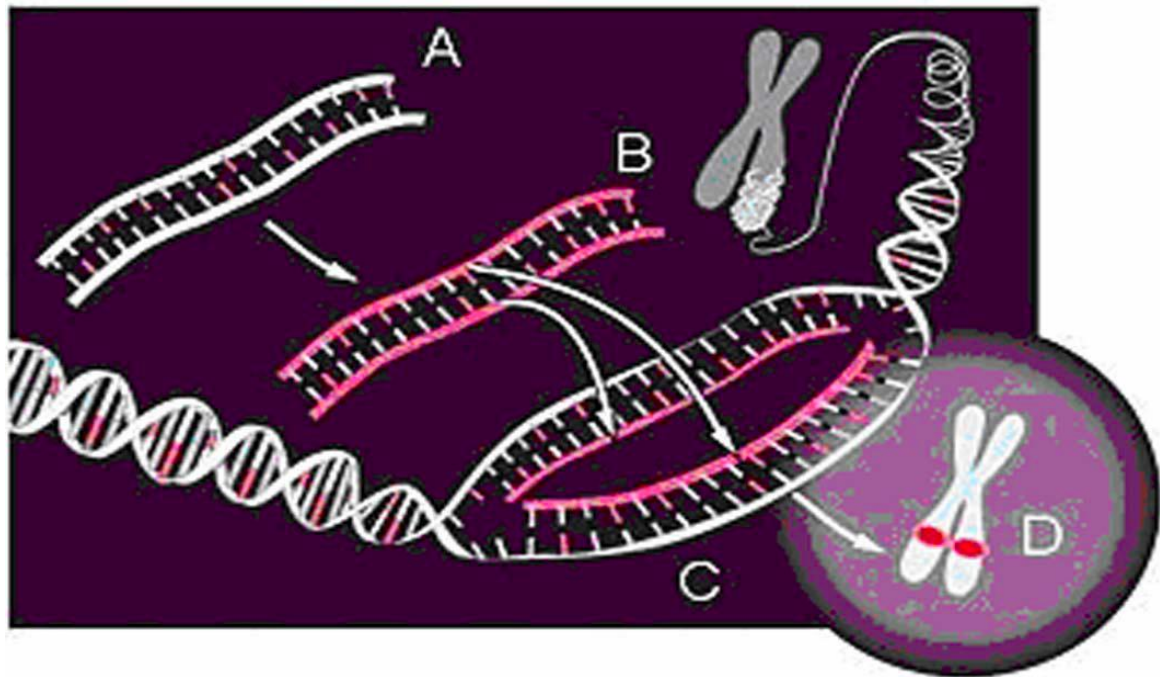


Figure: Technique de l'hybridation fluorescente in situ. En **A** : sonde. **B** : sonde colorée à l'aide d'un **fluorochrome**. **C** : hybridation avec l'ADN nucléaire. **D** : apparence du chromosome métaphasique où la sonde s'est fixée.

En fonction du marquage de la sonde on distingue :

	Marquage	Révélation
Sondes chaudes	Isotopes radio-actifs (tritium H ₃ , P ₃₂ , P ₃₃ ou S ₃₅)	Autoradiographie
Sondes froides	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 Anticorps marqués par une enzyme
	Enzymes (phosphatase alcaline)	Anticorps ou chromogènes

Chapitre IV. Techniques d'analyse du génome et de ses modifications

Fabrication d'une banque d'ADN

Une banque d'ADN constitue l'ensemble des clones obtenu à partir d'un seul échantillon d'ADN. Il existe trois types de banques d'ADN:

1- Banque génomique: Banque couvrant l'ensemble du génome.

2- Banque d'ADN complémentaire ou ADNc: Banque constituée d'ADNc, qui ne représente pas nécessairement la totalité des ARNm. Il s'agit plutôt d'une banque fabriquée à partir uniquement des régions transcrites du génome.

3- Banque d'expression: Banque dans laquelle le vecteur porte des signaux transcriptionnels permettant à n'importe quel insert cloné de produire un ARNm et en dernier lieu, une protéine.

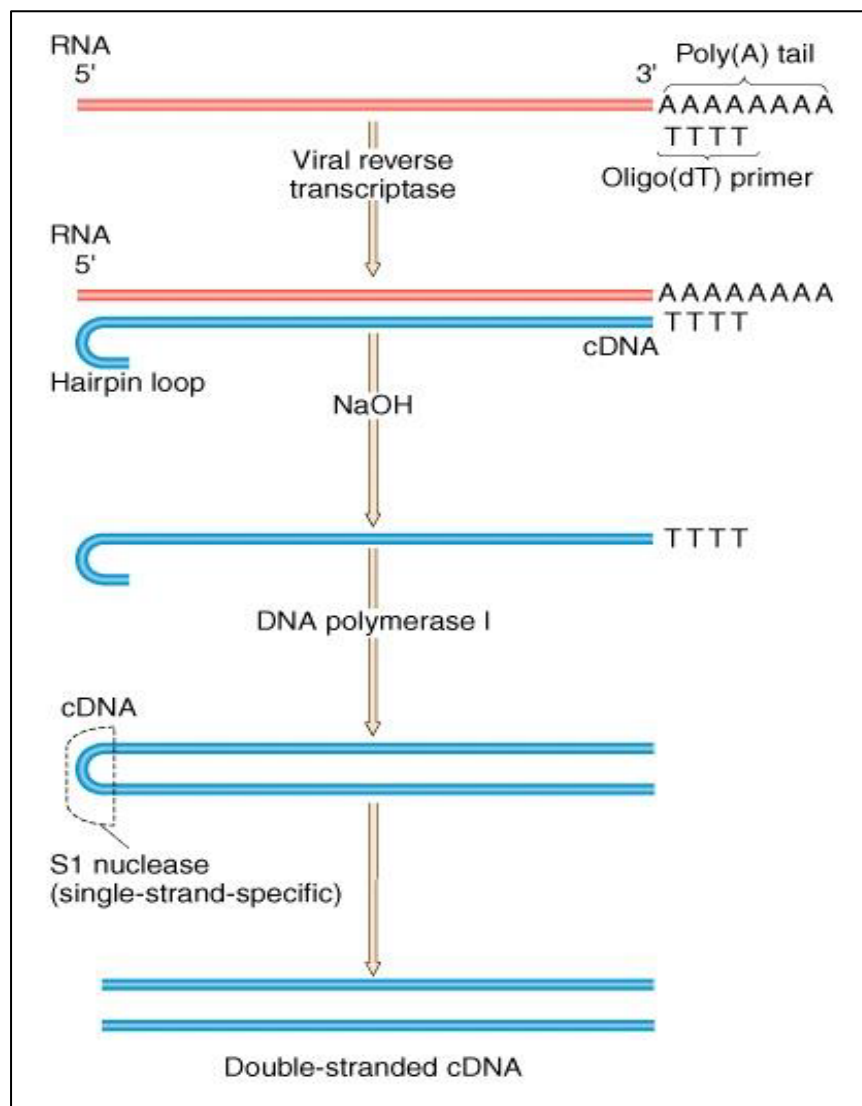


Figure : Préparation de l'ADNc à partir de l'ARNm

1. Construction des banques

A. Amplification *in vivo* à l'aide du clonage d'ADN

L'ensemble formé par un vecteur et un ou des fragments insérés est appelé ADN recombinant. Le mélange d'ADN recombinant est ensuite utilisé pour transformer des cellules bactériennes. En général, il pénètre une seule molécule de vecteur recombinant par cellule bactérienne. Ces cellules sont étalées et se multiplient en formant des colonies. Par conséquent, une colonie contient une population très importante d'inserts identiques d'ADN, et on appelle cette population un clone d'ADN.

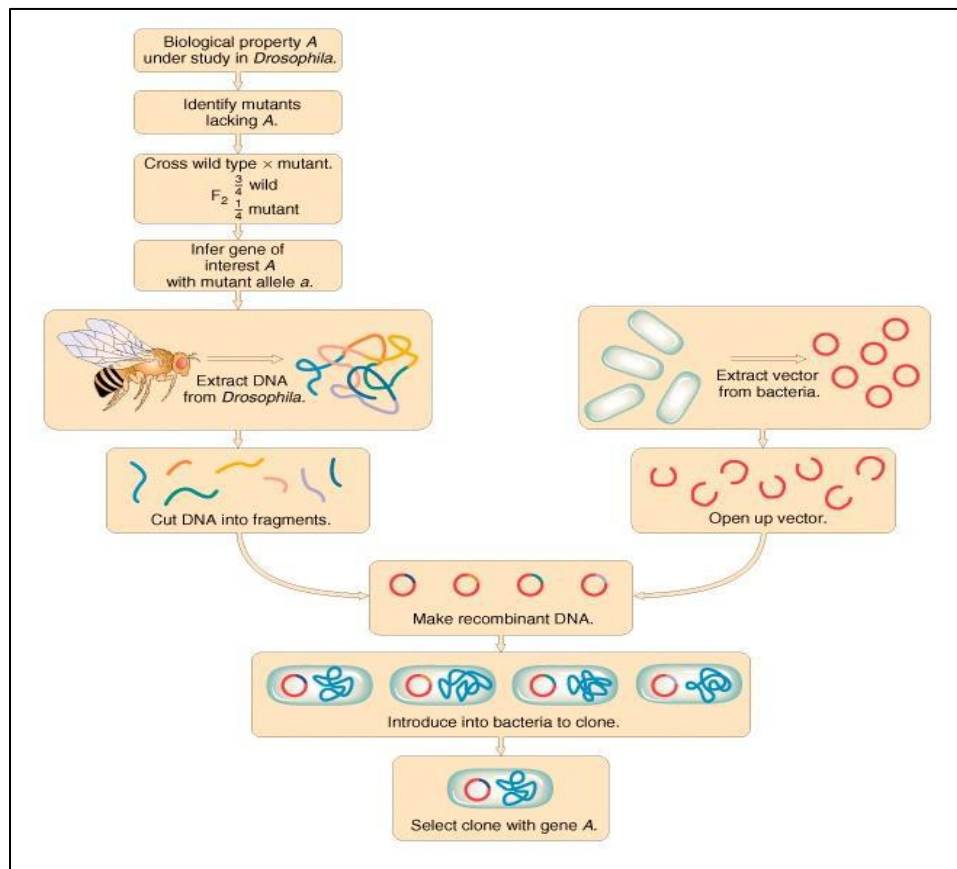


Figure : Clonage d'ADN

B. Amplifier l'ADN recombinant

L'ADN recombinant ligaturé pénètre dans une cellule bactérienne par transformation. Après son entrée dans la cellule hôte, le vecteur plasmidique est capable de se répliquer car les plasmides possèdent habituellement une origine de répllication. La colonie résultante de bactéries contiendra des milliards de copies de l'insert d'ADN donneur de départ. Cet ensemble de copies amplifiées du fragment unique d'ADN donneur constitue un clone d'ADN.

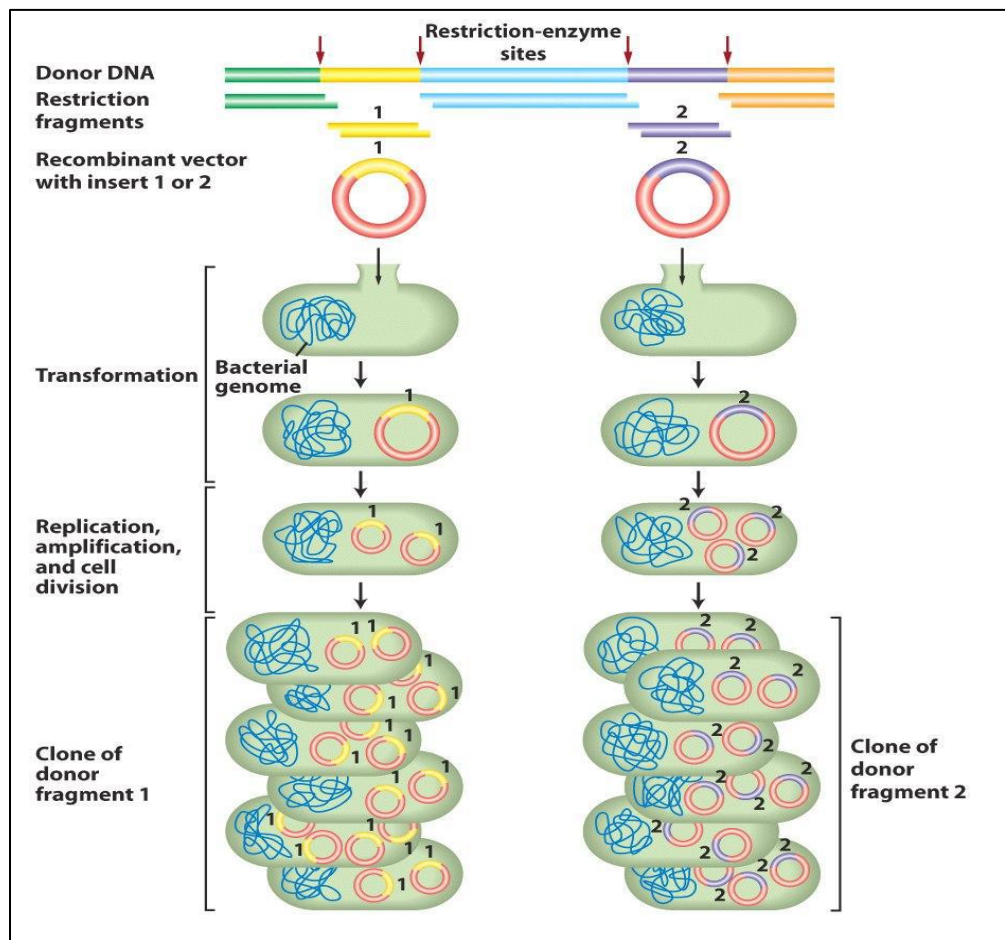


Figure : Clonage d'ADNc

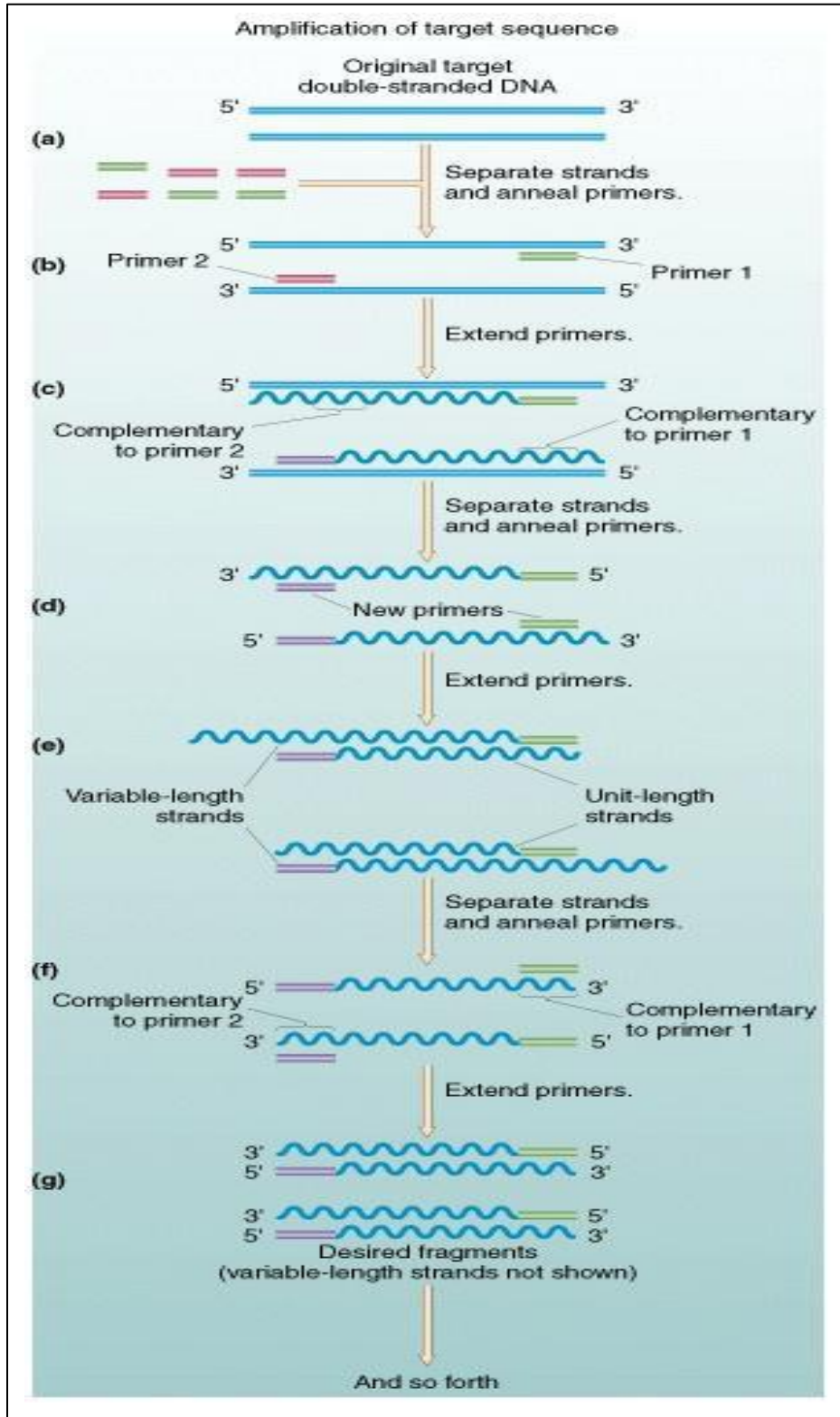
C. Amplification *in vitro* à l'aide de la réaction de polymérase en chaîne

Si on connaît la séquence de certaines parties du gène ou d'un fragment intéressant, on peut l'amplifier en conditions *in vitro* dans un tube, tout cela sans clonage. Cette procédure s'appelle la réaction de polymérase en chaîne (PCR ou *polymerase chain reaction* en anglais). Étapes de la réaction:

1) **Dénaturation (95°C)** : étape qui dénature les deux fragments d'ADN

2) **Hybridation** (température variable) : étape où les amorces s'hybrident à leurs séquences complémentaires

3) **Élongation** (72°C) : Extension des amorces par l'ADN polymérase.



Amplification par PCR

2. Criblage des banques

Les vecteurs utilisés portent des marqueurs de transformation. Dans le cas des plasmides, il s'agit de gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, si des bactéries transformées avec ce plasmide arrivent à cultiver sur un milieu contenant l'antibiotique, c'est que ces bactéries initialement sensibles à l'antibiotique sont devenues résistantes. Seule l'intégration du plasmide porteur du gène de résistance peut expliquer l'apparition soudaine de cette résistance.

Ces bactéries contiennent la banque d'ADN. Cependant, parmi ces bactéries transformées, certaines peuvent avoir reçues le plasmide sans ADN étranger, d'autres possèdent un plasmide recombinant et parmi ces dernières, seules une infime minorité peuvent posséder le plasmide recombinant qui contient le gène que l'on veut isoler. Il faut être capable d'identifier ces cellules afin de récupérer l'ADN intéressant sous forme pure et en quantité suffisante.

3. puces à ADN

Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « DNA microarray » en anglais (de « array » = rang ordonné), est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le northern blot, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif. La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots » (de l'anglais spot=tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

4. Production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique

Exemple de l'insuline humaine.

L'insuline est une hormone peptidique constituée de 2 chaînes (A) et (B) reliées par des ponts disulfures et formées à partir de la préproinsuline par clivage d'une partie de la chaîne peptidique. Utilisée pour le traitement des diabètes insulino-dépendants, elle fut tout d'abord

extraites du boeuf (3 acides aminés différents avec l'insuline humaine) puis du porc (un seul acide aminé différent). Cependant, du fait de ces différences, ces insulines exogènes étaient immunogènes.

Le génie génétique a permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées.

La stratégie expérimentale suivante a été utilisée :

1) Isolement du gène de l'insuline

L'ARNm codant pour la proinsuline est isolé de cellules du pancréas. Par utilisation de la reverse transcriptase, on obtient de l'ADNc puis avec la polymérase, de l'ADNc bicaténaire.

2) Vecteur

Le plasmide pBR322 portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline est choisi comme vecteur de clonage. Le gène de résistance à la tétracycline contient un site de 6 bases reconnu par l'enzyme de restriction Bam HI. Il contient aussi un promoteur puissant, celui de la (3 galactosidase (P_{gai}) ou celui de tryptophane synthétase (Tryp E).

On a commencé par utiliser le promoteur de la p_{gai} mais celui-ci produisant moins d'insuline que le promoteur Tryp E, c'est finalement ce second promoteur qui a été utilisé.

3) Insertion dans le vecteur

Le plasmide est ouvert au site Bam HI. L'ADNc codant pour la proinsuline est flanqué de 2 linkers (séquence d'ADN bicaténaire artificiellement ajouté) pour avoir la séquence de nucléotides appropriée à la ligation (compatibilité). La ligation des 2 molécules d'ADN (vecteurs et ADNc) se fait par une ligase.

4) Hôte : cellule transformée

Le plasmide ainsi modifié est introduit dans une bactérie. La souche choisie est E coli K12 initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline

5) Sélection des clones

Le plasmide pBR322 apporte initialement les 2 résistances à l'ampicilline et à la tétracycline. Cependant, l'insertion du gène de la proinsuline au site Bam HI du plasmide ne lui permet pas d'apporter cette seconde résistance à la tétracycline.

Ainsi, les colonies bactériennes capables de se développer sur un milieu contenant de l'ampicilline sont des bactéries ayant intégrées le plasmide. Par réplique (à l'aide d'un papier buvard) sur un milieu contenant de la tétracycline, on repère alors les colonies d'E. coli qui sont à la fois résistante à l'ampicilline et sensible à la tétracycline ; Ces dernières sont alors celles qui ont intégrées le plasmide transformé avec le gène de la proinsuline.

6) Vérification de la production de proinsuline

Il faut ensuite vérifier que les colonies sélectionnées produisent bien de la proinsuline.

Pour cela, on applique sur les colonies choisies une membrane sur laquelle ont été fixés des anticorps capables de reconnaître la proinsuline. A l'aide d'un second anticorps marqué (méthode indirecte), on détecte alors les clones bactériens capables de produire de la proinsuline.

7) Modification et caractérisation du produit

Les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle. Le produit obtenu est purifié puis convertie en insuline par un mélange de trypsine et de carboxypeptidase B

L'insuline est ensuite analysée par HPLC et sa stéréochimie vérifiée. Enfin, des tests de toxicité et d'activité biologique sont effectués sur animal en mêmes temps que des études pharmacologiques et cliniques.

Autres applications possibles : de nombreuses molécules sont aujourd'hui synthétisées par génie génétique (vaccins, hormones, vitamines...). Actuellement, une autre voie de d'applications nombreuses sont la création d'organismes transgéniques, organismes dans lesquels on introduit dès les premiers stades embryonnaires des gènes modifiés. Une autre voie d'application est celle de la thérapie génique qui permettrait d'introduire des gènes sains dans un organisme contenant des gènes défectueux provoquant des maladies génétiques.