

Ce résumé comporte trois chapitres essentiels

I. Hybridation moléculaire

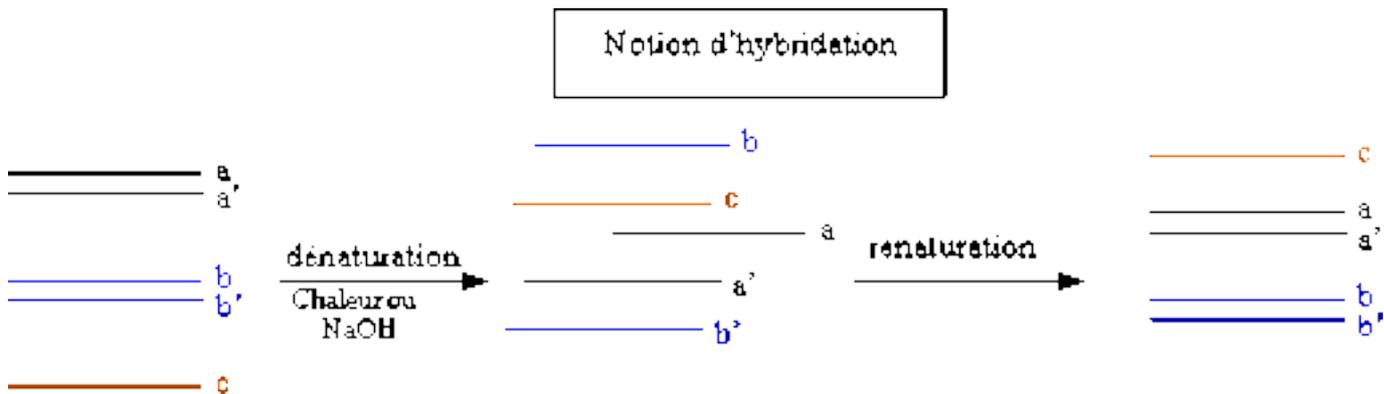
L'hybridation moléculaire est l'association de 2 simples brins d'ADN (ADNs) par formation de liaisons H entre ces deux brins.

On distingue les hybrides:

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

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.



(a, a'), (b, b') = séquences double brin complémentaires

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.

Pour effectuer l'hybridation des acides nucléiques il faut séparer les doubles brins en augmentant la température de milieu réaction à la température de fusion.

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

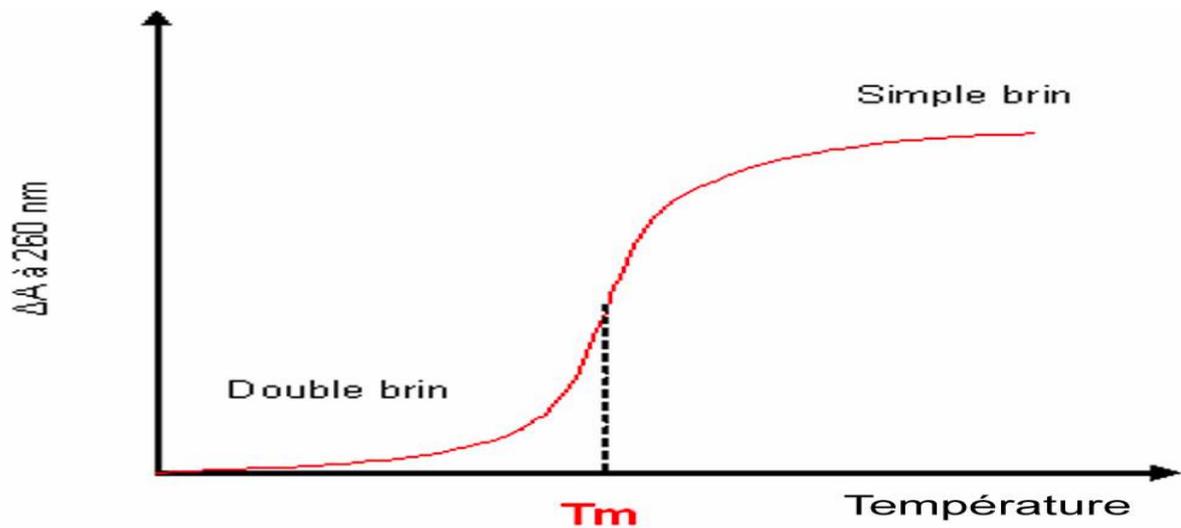


Figure: Mise en évidence du phénomène coopératif de passage de l'ADN double brin à l'ADN simple brin et mesure de la T_m .

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 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 . 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).

➤ **les mésappariements** : De manière générale, l'abaissement de la T_m est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement (défaut d'appariement entre les bases sur les 2 bras).

➤ **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.

➤ **la longueur des fragments des ADN** : La T_m devient plus grande si l'ADN est long: un ADN long contient plus de liaisons à dissocier qu'un ADN plus court.

2. Facteurs influençant l'hybridation

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

❖ **Concentration de l'ADN et temps** : notion de C_oT et de R_oT . 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 C_oT , pour le cas des hybrides ADN/ARN, elle est dite le R_oT :

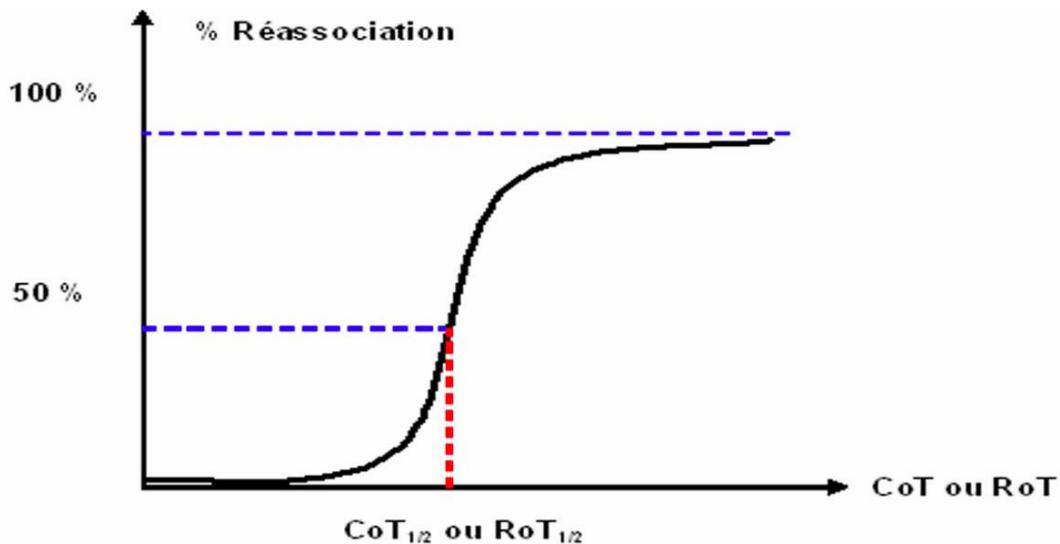


Figure: Courbe de détermination du Cot et du Rot

❖ **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).

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 fixations 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).

3.4. Southern blot et Northern blot

Dans ces deux types d'expériences, on cherche à repérer soit dans le génome soit dans les ARNm d'une cellule un fragment particulier, par exemple un gène donné. Pour cela, on utilise une sonde marquée d'ADN dont la séquence est complémentaire du fragment recherché. Le « repérage » se fait par hybridation entre la sonde marquée et le fragment d'ADN ou d'ARNm correspondant. Le marquage de la sonde avec un radioélément ou un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'hybridation.

- **Southern blot**

On débute l'expérience par une extraction de génome total, on fait subir une restriction à cet ADN total par une enzyme de restriction.

Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Suivant la taille du génome total extrait on peut obtenir jusqu'à 106 fragments.

Ensuite après dénaturation des ADN par la soude, l'empreinte du gel est réalisée par transfert et fixation des fragments d'ADN sur une membrane de nylon.

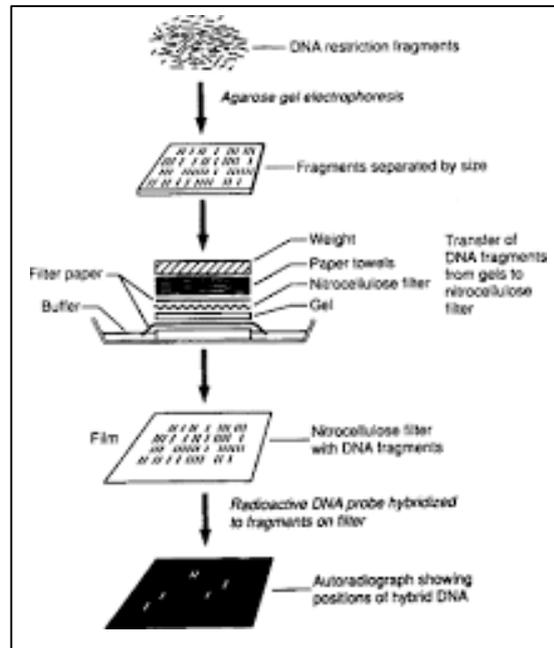
Cette membrane est ensuite hybridée avec une sonde marquée. L'hybridation est réalisée en milieu liquide sous agitation, cette opération est suivie de lavages pour éliminer les sondes non appariées.

C'est la trace de la sonde sur un film d'autoradiographie qui est mesurée. Les fragments hybridés avec la sonde apparaissent sur l'autoradiographie.

Cette technique permet de repérer un fragment d'ADN particulier dans un génome.

- **Northern blot**

Cette technique permet le repérage d'un type de molécule d'ARN dans une population (mêmes étapes que le Southern blot).



4. Marquage des sondes

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 dioxigénine	Avidine et streptavidine Anticorps marqués par une enzyme
	Enzymes (phosphatase alcaline)	Anticorps ou chromogènes

II. 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.

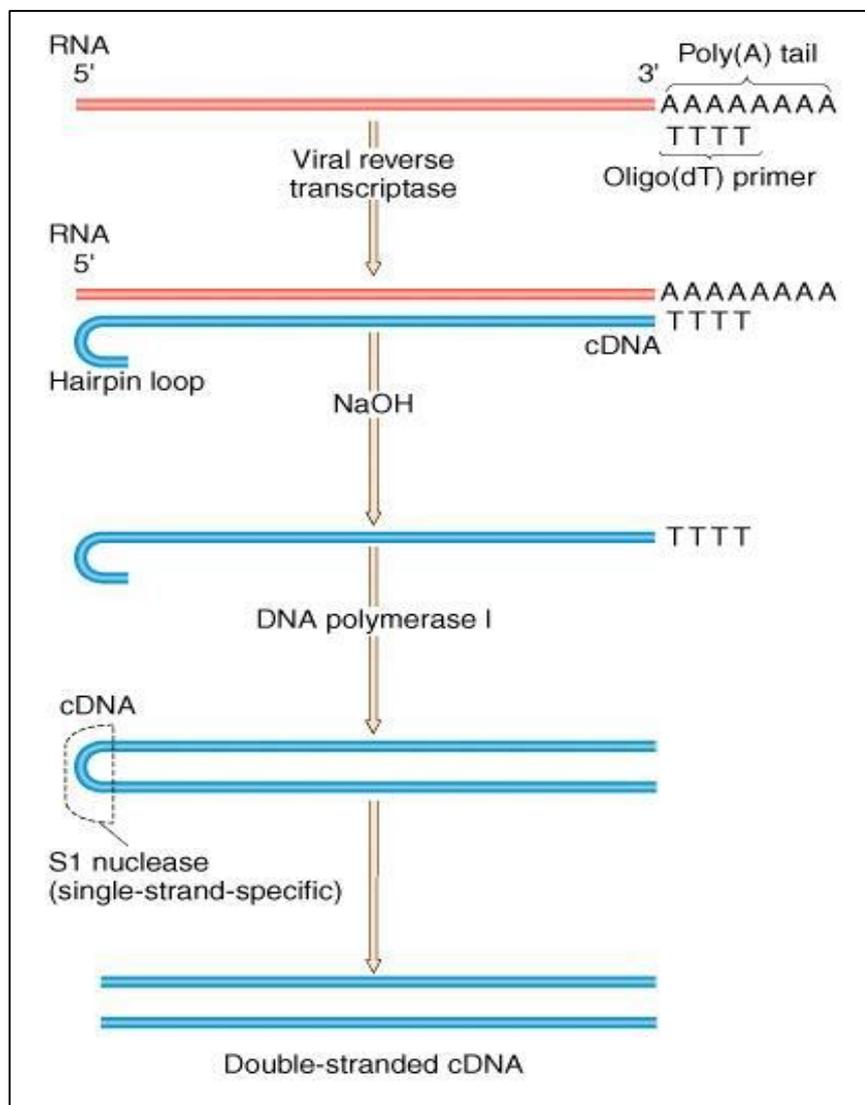


Figure : Préparation de l'ADNc à partir de l'ARNm

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.

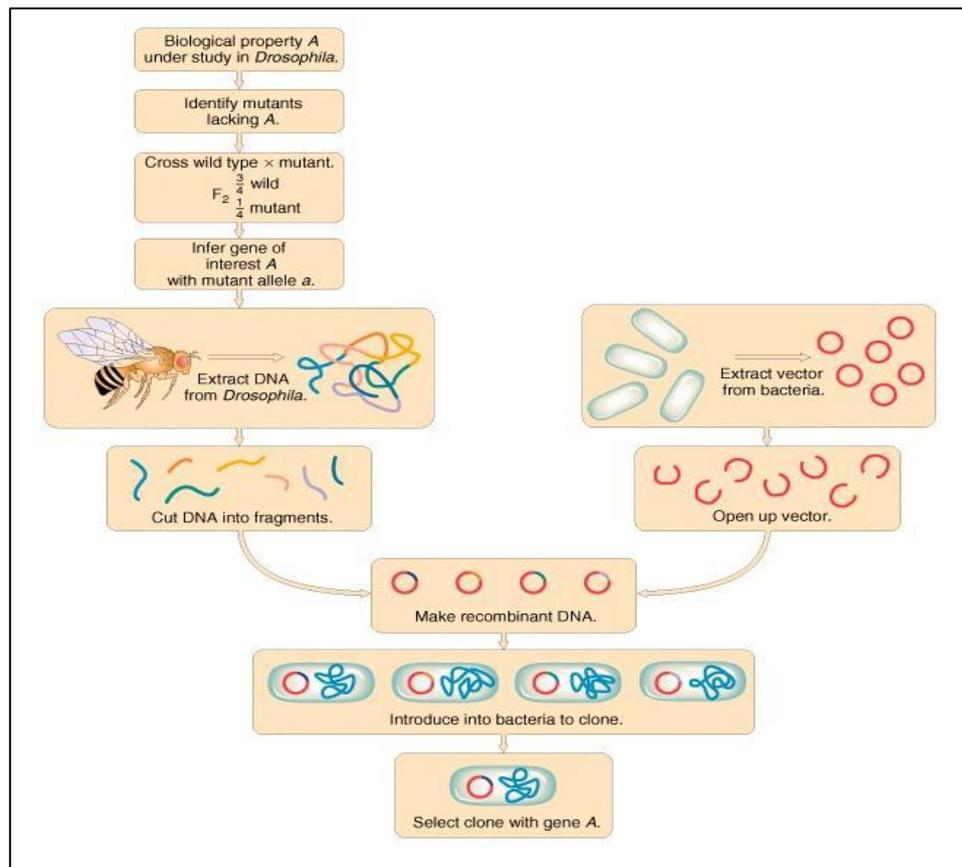


Figure : Clonage d'ADN

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.

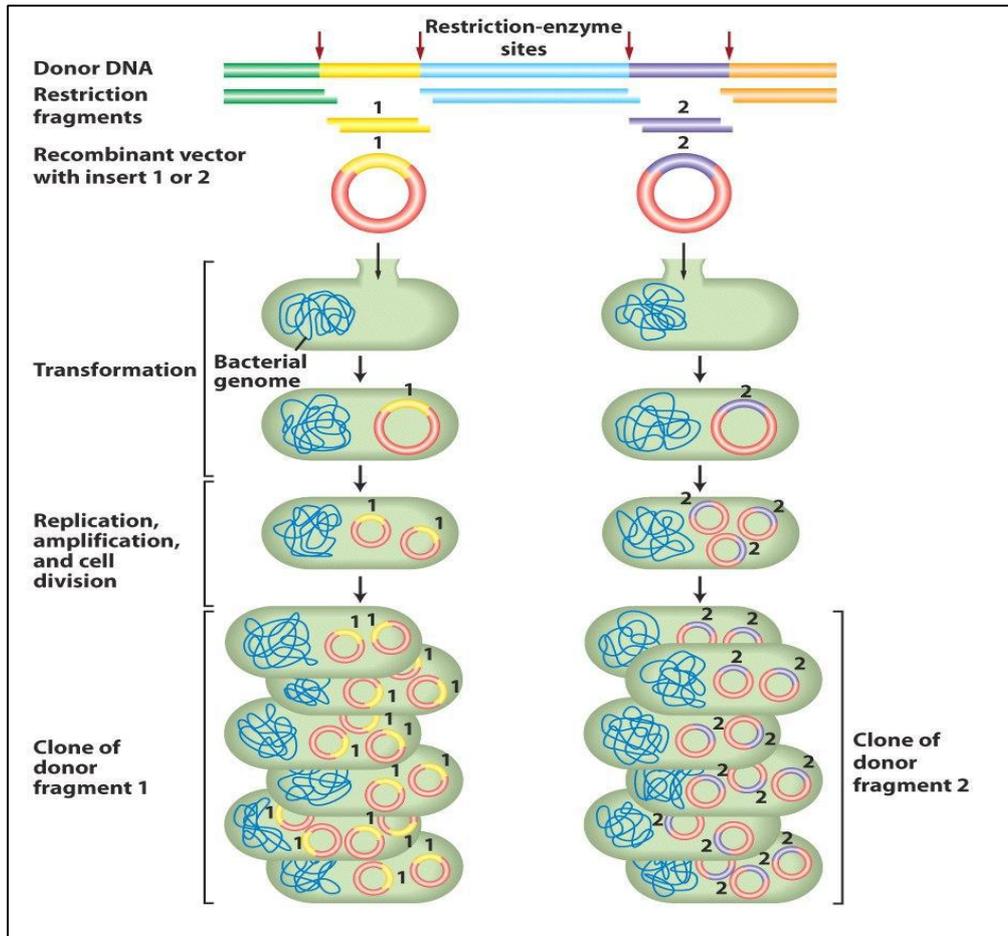


Figure : Clonage d'ADNc

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).

La PCR ou Polymerase Chain Reaction (la réaction en chaîne par polymérase) est une technique qui permet d'amplifier l'ADN ou l'ARN *in vitro*. Elle a été développée par Kary Bank Mullis (prix Nobel de chimie en 1993).

La PCR se base sur le principe suivant :

- Connaître d'abord les fragments (20 nucléotides) qui encadrent la séquence d'ADN à amplifier.
- Synthèse de séquences complémentaires à ces fragments : ce sont les amorces oligonucléotidiques.
- L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.

Réalisation de la PCR

L'ADN à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa T_m (en pratique, environ 95°C) pour séparer les deux brins. Les éléments nécessaires à cette réplication sont présents dans le tube, à savoir :

1) l'enzyme Taq polymérase : c'est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie (*Thermus aquaticus*) des sources chaudes ($80-90^\circ\text{C}$). D'autres enzymes thermorésistantes sont actuellement utilisées proviennent d'autres microorganismes : la *pfu* extraite de *Pyrococcus furiosus* et *Vent* extraite de *Thermococcus litoralis*.

2) les nucléotides triphosphates : Au départ on utilisait des concentrations qui allaient jusqu'à $1,5\text{ mM}$. Mais cette concentration cause des amplifications parasites dues aux erreurs de réplication. Les concentrations de 20 à $200\ \mu\text{M}$ sont de plus en plus utilisées.

3) les amorces : ces oligonucléotides initient le travail de la Taq polymérase. Leur T_m est de 5°C de moins que la température d'hybridation. Généralement, ce sont les valeurs comprises entre 55 et 70°C qui donnent de bons résultats avec des concentrations de $0,1$ à $0,2\ \mu\text{M}$.

4) les ions magnésium : A des concentrations de $0,5$ à $2,5\text{ mM}$, ils servent de stabilisateurs pour les nucléotides et activent l'enzyme.

Étapes de la réaction

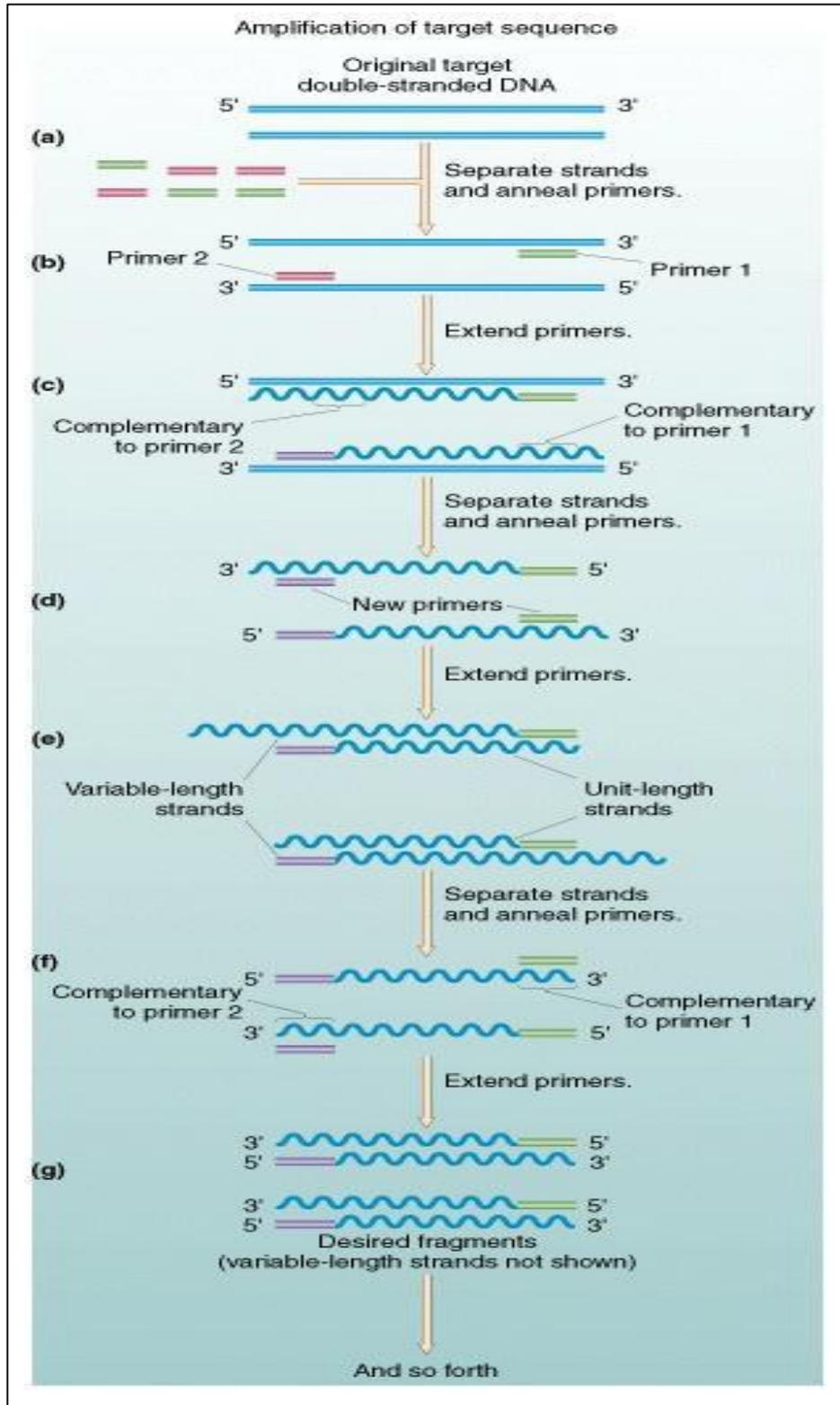
1) Dénaturation (95°C) : étape qui dénature les deux fragments d'ADN

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.

Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

Le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser. Puisque à chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à 2^n après n cycles.



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.

III. Détermination des séquences des acides nucléiques

Le séquençage est la lecture de la succession des nucléotides le long d'une molécule d'ADN. Le résultat produit est un texte écrit dans l'alphabet A, C, G, T. Les séquenceurs lisent des fragments de plusieurs bases, appelés « reads », dont la longueur varie en fonction des technologies. Le génome d'un organisme s'obtient ensuite par l'assemblage des « reads ». Depuis le milieu des années 2000, les séquenceurs à haut débit sont devenus un outil indispensable à la recherche en biologie et plus particulièrement dans le domaine du médical.

La détermination de la séquence d'un acide nucléique est actuellement extrêmement simple à réaliser grâce aux progrès technologiques et aux moyens informatiques modernes. La détermination de la totalité de la séquence d'un certain nombre de génomes est réalisée, celle du génome humain (environ 3,5 milliards de paires de bases) est aujourd'hui connue à plus de 90 %.

Les différentes méthodes de séquençage

1) Méthode chimique ou méthode de Maxam et Gilbert

1. Dénaturer un ADN double brin à un seul brin en augmentant la température.
2. Étiqueter radioactivement une extrémité 5' du fragment d'ADN à séquencer par une réaction de kinase en utilisant gamma-³²P.
3. Cliver le brin d'ADN à des positions spécifiques en utilisant des réactions chimiques. Par exemple, nous pouvons utiliser l'un des deux produits chimiques suivis par la pipéridine. le sulfate de diméthyle attaque sélectivement la purine (A et G), tandis que l'hydrazine attaque sélectivement les pyrimidines (C et T). Les traitements chimiques décrits dans le document de Maxam-Gilbert clivent à G, A + G, C et C + T. A + G signifie qu'il clive à A, mais de temps en temps à G aussi.
4. Maintenant, dans quatre tubes de réaction, nous aurons plusieurs brins d'ADN de différentes tailles.
5. Les fragments sont soumis à une électrophorèse dans des gels d'acrylamide à haute résolution pour la séparation de taille.
6. Ces gels sont placés sous un film à rayons X, ce qui donne alors une série de bandes sombres qui montrent l'emplacement des molécules d'ADN radiomarquées. Les fragments sont triés par taille et donc on peut déduire la séquence de la molécule d'ADN. Seuls les fragments marqués, c'est à dire ceux qui portent l'extrémité 5'- et donc commencent au même endroit-, sont visualisables. Certaines molécules s'arrêtent au premier G, d'autre au second etc...

Si au départ on a fait des coupures séparément et différentes avec plusieurs agents, on obtient pour chaque tube, des molécules de taille correspondant à la séquence. On ne dispose pas de schéma réactionnel permettant de couper après chacune des bases. Mais on dispose de moyens pour couper après G, après A+G, après C+T et après A. Si on charge ces quatre séquences sur le gel, on peut lire la séquence.

Cette méthode n'est plus guère utilisée sauf dans certains cas particuliers, par exemple lorsqu'on veut détecter la liaison d'une protéine sur l'ADN. En effet dans ce cas la liaison de la protéine empêche la coupure chimique, certains fragments sont absents et on observe des blancs sur le gel. Cette technique a été appelée "foot printing".

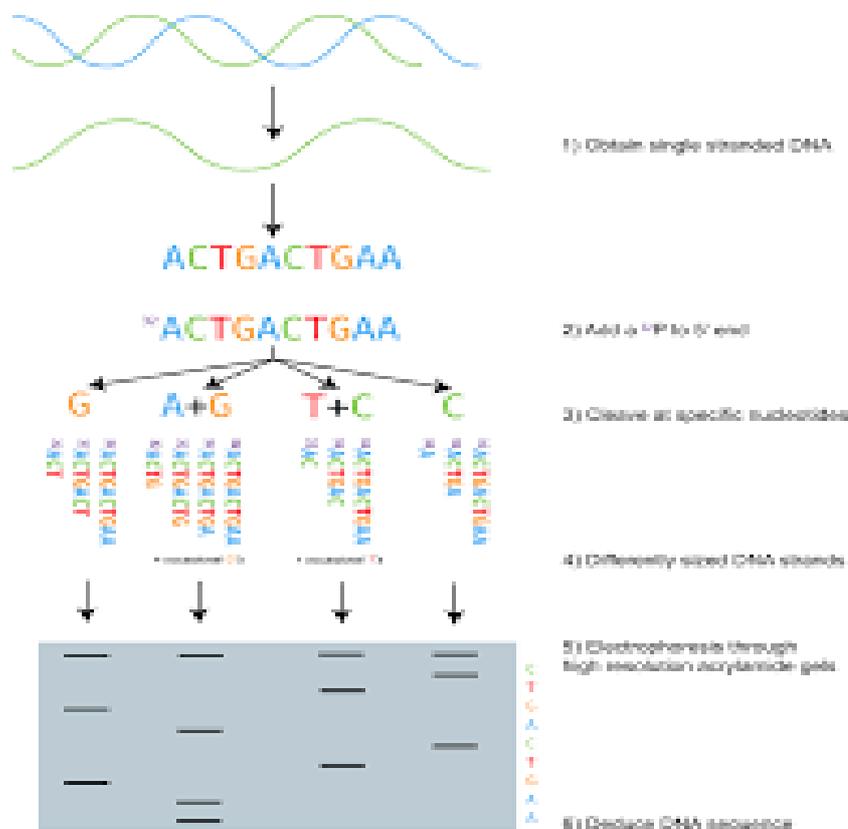


Figure : Méthode de Maxam et Gilbert

2) Méthode enzymatique ou méthode de Sanger

La première étape est l'obtention d'un ADN simple brin. On peut dénaturer l'ADN double brin par la chaleur ou par un traitement à la soude. On peut aussi utiliser une matrice simple brin. La deuxième étape est l'hybridation d'une amorce sur l'ADN simple brin. La troisième étape est la polymérisation du brin complémentaire dont l'extrémité 5' correspondra à l'extrémité 5' de l'amorce.

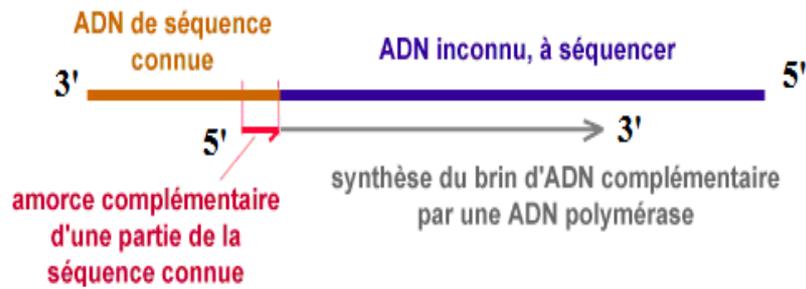


Figure : Méthode de Sanger

Le principe consiste à ajouter des didéoxynucléotides (ddNTP) aux désoxynucléotides lors de la polymérisation. Ainsi, si on ajoute du ddATP, aux dNTP, la polymérisation s'arrêtera lorsque la polymérase ajoutera un ddATP, mais continuera lorsqu'elle ajoutera un dATP. On aura donc une série de molécules s'arrêtant toutes à un A, ces molécules seront plus ou moins longues.

Parallèlement, dans trois autres tubes on ajoutera aux dNTP du ddCTP, du ddTTP ou du ddGTP. On obtiendra ainsi des molécules s'arrêtant soit aux C soit aux T soit aux G en fonction du ddNTP utilisé.

Dans les quatre tubes on a donc des molécules dont la taille dépend de la séquence. Pour les séparer on peut faire un gel d'électrophorèse en condition dénaturante de façon à ne voir que les molécules néosynthétisées.

La quantité d'ADN est faible et ne peut donc pas être directement visible sur le gel. Aussi pour le détecter, on marque le brin synthétisé en ajoutant un nucléotide radioactif lors de la polymérisation.

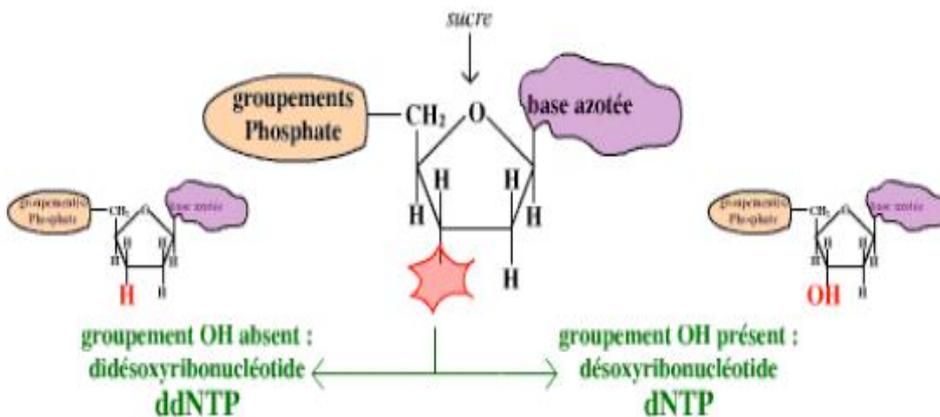


Figure : Deux types de nucléotides triphosphates