République Algérienne Démocratique et Populaire
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
Département de Génétique Moléculaire et Appliquée

COURS 8:

HYBRIDATION MOLECULAIRES ET SONDES

Dr ABDI Meriem
Génie génétique, Licence 3 Biochimie

HYBRIDATION MOLECULAIRE

- L’hybridation moléculaire est la propriété que présente une molécule d’acide nucléique monobrin de s’associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin qui lui est complémentaire.
- L’hybridation moléculaire est permise par les liaisons hydrogènes que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques qui constituent les deux brins d’acides nucléiques.
- La force de liaison entre les deux brins d’ADN (ou d’ARN) dépend du nombre de liaisons hydrogène qui lient les deux brins entre eux.

HYBRIDATION MOLECULAIRE

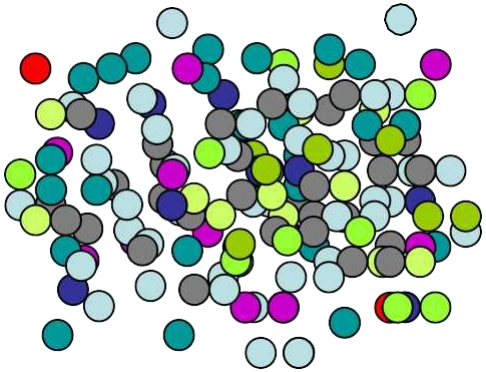
- La force de liaison entre les deux brins d'ADN (ou d'ARN) dépend du nombre de liaisons hydrogène qui lient les deux brins entre eux.
- L'hybridation moléculaire est :

spécifique : sous certaines conditions expérimentales, un monobrin ne peut s'apparier qu'avec un autre monobrin de séquence complémentaire.

réversible : l'expérimentateur peut, en jouant sur les conditions expérimentales (essentiellement la température du milieu réactionnel et sa composition) réaliser ou au contraire supprimer (dissociation) l'hybridation de deux molécules.

PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'HYBRIDATION

- Détecter une molécule que l'on appellera « cible » (ADN, ARN ou une protéine) dans un mélange en contenant des millions similaires.



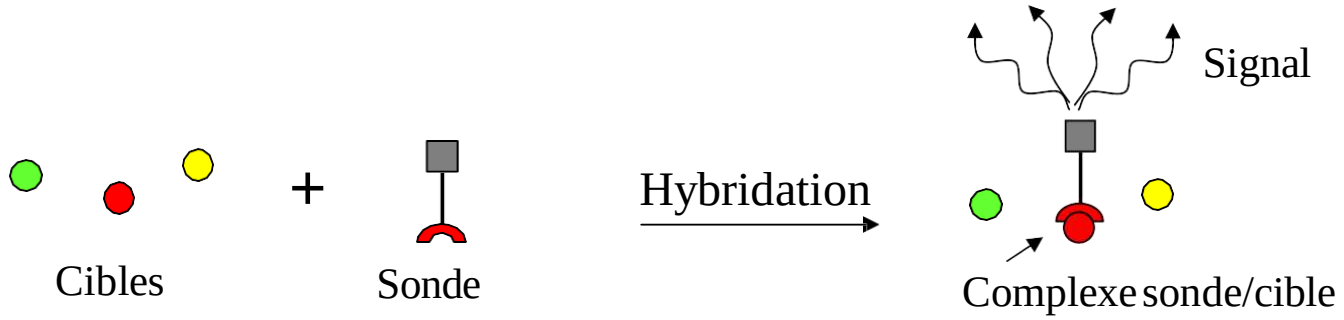
Trouvez la boule rouge ● dans lemélange ?

Exemples :

- Rechercher si un gène est présent chez une personne donnée.
- Rechercher si un ARN est présent dans un type tissulaire donné (muscle).
- Rechercher si la protéine particulière est présente dans le sang d'une personne.

PRINCIPE DE LA STRATÉGIE D'HYBRIDATION

- On veut identifier une molécule **cible** dans un ensemble de molécule similaire mais non identique.
- Pour cela on utilise une molécule appelée **sonde** qui va se fixer/hybrider spécifiquement au type moléculaire recherché.



- On appel **hybridation** une association spécifique entre une sonde et une cible.

DIFFÉRENTS TYPES DE CIBLES

1. ADN:

- Rechercher si un gène est présent ou absent dans une cellule.
- Identifier un réarrangement d'un gène.

2. ARN:

- Étudier l'expression d'un gène dans des conditions différentes.
- Détecter l'expression d'un gène dans un tissu donné.

3. Protéines:

- Rechercher la présence d'une protéine dans des conditions différentes.
- Détecter la présence d'une protéine dans un tissus donné.

TYPES DE SONDES

1. Les différents types de sondes :

- ADN : simple brin, pas de sonde double brins

- ARN appelé ribosonde

- Protéines: ces sondes sont dans la très grande majorité des cas des anticorps

2. Les propriétés d'une sonde:

- Reconnaître de manière spécifique la cible recherchée (notion de stringence).

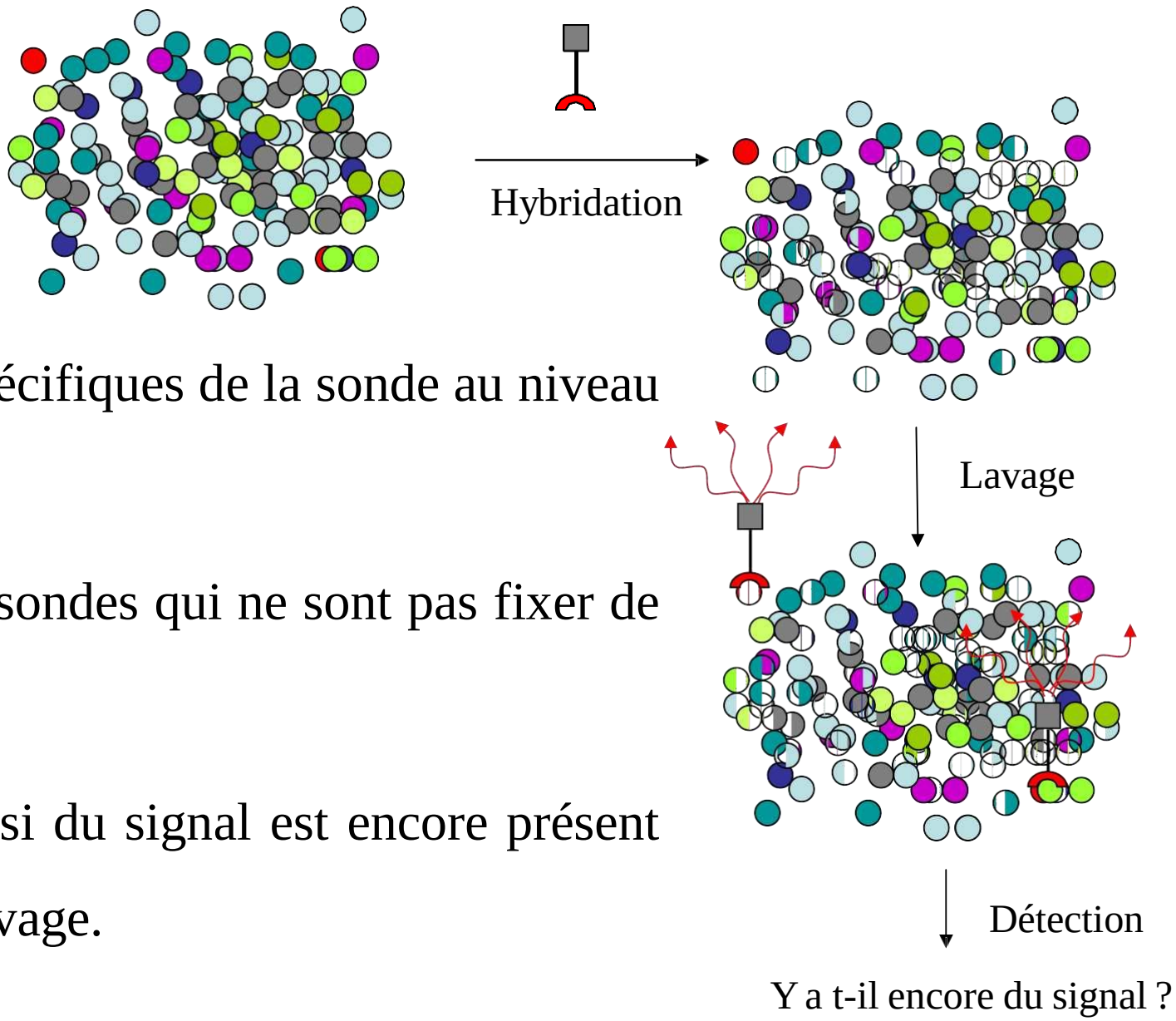
- Émettre un signal (détection).

3. Les différents types de signaux portés par les sondes :

- Les signaux dits «chauds» →Émission de radioactivité

- Les signaux dits «froids » →Émission d'un signal lumineux

PRINCIPE DE L'HYBRIDATION



1. **Hybridation:** Fixation spécifiques de la sonde au niveau de sa cible.

2. **Lavage:** Élimination des sondes qui ne sont pas fixer de façon spécifique.

3. **Détection:** On recherche si du signal est encore présent dans l'échantillon après le lavage.

Un signal = la cible est présente

LES SONDES D'ACIDES NUCLÉIQUES

- Les sondes de type acide nucléique vont s’hybrider à leur cible par **complémentarité** de séquence.
- Une sonde d’acide nucléique peut être une séquence d'ADN ou d'ARN mais elle doit être **obligatoirement** monobrin.
- Sa taille peut être très variable.
- La sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage.

MARQUAGE DES SONDES D'ACIDES NUCLÉIQUES

L'agent de marquage :

1. Marquage radioactif
2. Marquage froid (fluorescent)

Stratégies de marquage :

1. Nick translation « déplacement de brèche »
2. Multi-amorçage au hasard
3. Marquage des extrémités 5'
4. PCR

LES SONDES RADIOACTIVES CHAUDES

Les radioisotopes utilisés pour marquer les acides nucléiques :

1. Phosphate^{32} (radio-isotope le + utilisé)
2. Hydrogène^{3} (tritium)

-Incorporés dans la sonde enzymatiquement au moyen de DNTP radiomarqués

- Les sondes radioactives présentent un avantage: grande sensibilité
- Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :
- Nécessité de se protéger du rayonnement émis = un maniement des sondes inconfortable.

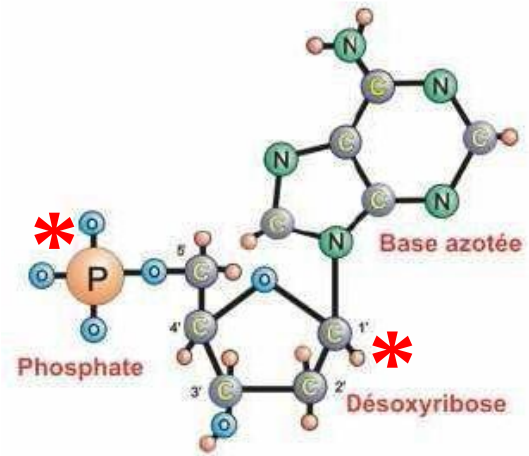
-Décroissance rapide du P^{32} ce qui nécessite un besoin de marquer les sondes fréquemment.

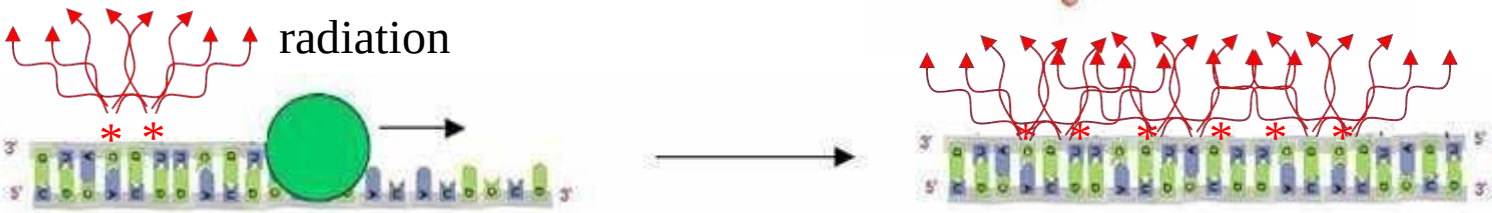
Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes « froides ».

MARQUAGE DIRECT AVEC UN RADIOISOTOPE

Un nucléotide portant le marqueur est incorporé directement au cours de la synthèse de la sonde et l'émission de la sonde est continue.

Ici nucléotide n'est pas modifié par un groupement chimique supplémentaire mais un des atome qui le constitue est radioactif





Exemples:

Phosphate ^{32} (radio-isotope le + utilisé)

Hydrogène ^{3} (tritium)

LES SONDES FROIDES

Les sondes froides utilisent des groupements chimiques fluorescents.

Le marquage d'une sonde froide peut être :

1. Direct: nucléotide modifié par un fluorophore.

2. Indirect: nucléotide marqué par un reporter qui sera lui même repéré par une molécule affine couplé à un fluorochrome

Dans les deux cas l'incorporation du nucléotide au niveau de l'ADN sera fait de manière enzymatique.

Les sondes radioactives présentent un avantage : pas de nécessité de se protéger du rayonnement émis.

Les sondes radioactives présentent quelques inconvénients :

- Elles sont sensibles à la lumière
- Moins sensibles que les sondes radioactives

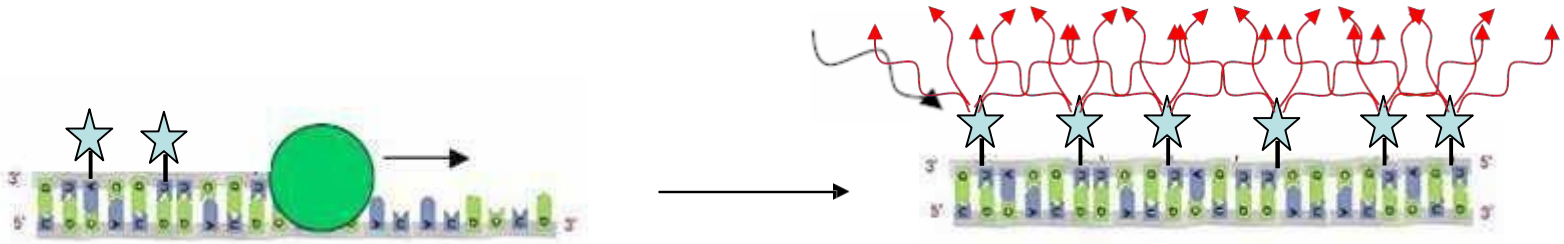
LES SONDES FROIDES

Marquage direct avec un fluorophore

- Un nucléotide portant le marqueur est incorporé directement au cours de la synthèse de la sonde.
- Le groupe chimique porté par le nucléotide fluoresce quand il est exposé à une lumière présentant une longueur d'onde donnée.

Exemples de fluorophores :

Cyanine 5, cyanine 3, alexa, red texas…



LES SONDES FROIDES

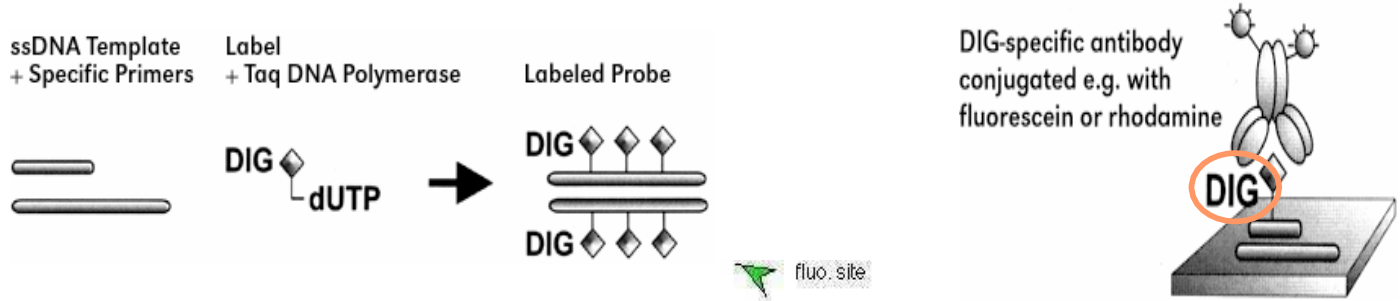
Marquage indirect

Le marquage se réalise en deux étapes:

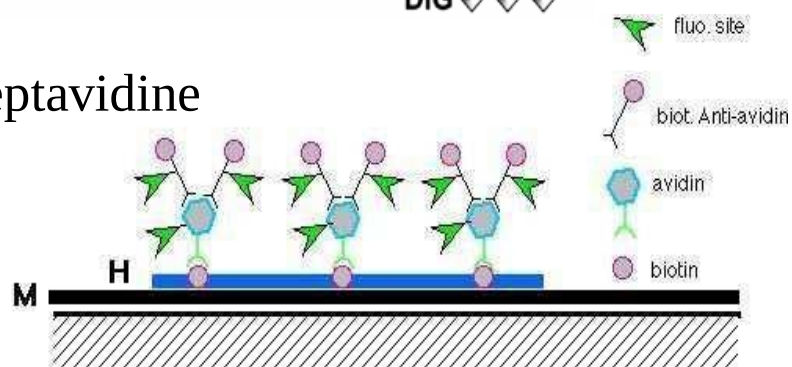
1. Incorporation d'un nucléotide modifié non fluorescent (digoxigénine ou biotine) au cours de la synthèse

2. Utilisation d'un anticorps couplé à un fluorophore complementaire aux nucléotides modifiés

Marquage par le digoxigénine

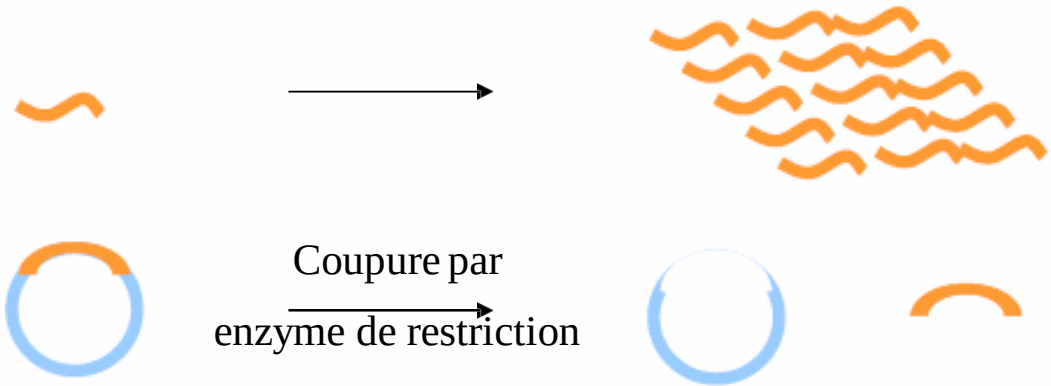


Marquage par la biotine-streptavidine



Origines des sondes et techniques de marquage

- Les sondes d'acides nucléiques peuvent être des produits PCR ou issu du clonage de l'ADN.

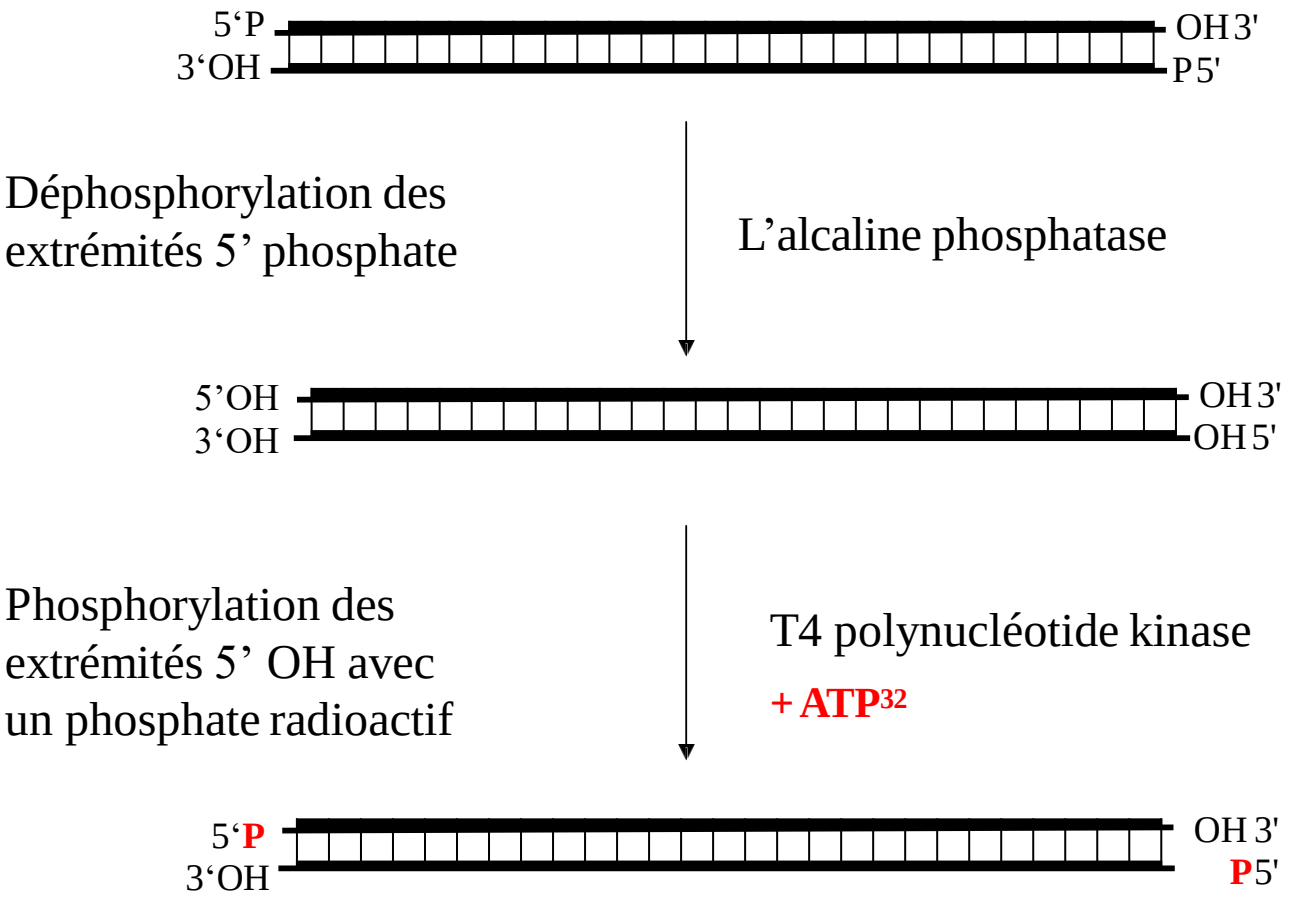


- Les sondes d'acides nucléiques peuvent être marquées **au cours** de leur synthèse: PCR

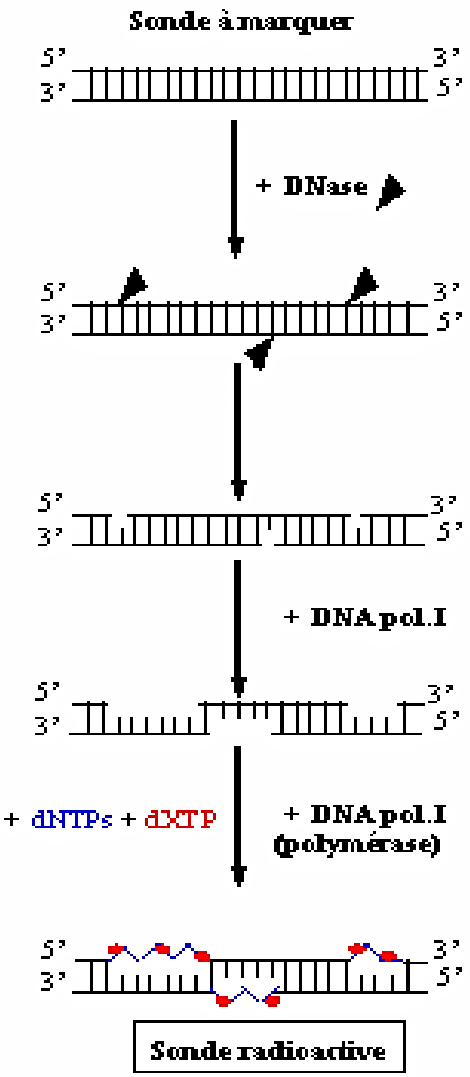
- Les sondes d'acides nucléiques peuvent marqués **après** leur synthèse:

  - Marquage des extrémités 5'
  - Nick translation « déplacement de brèche »
  - Multi-amorçage au hasard

Marquage des extrémités 5’ de l’acide nucléique



Marquage par déplacement de brèche « nick translation »



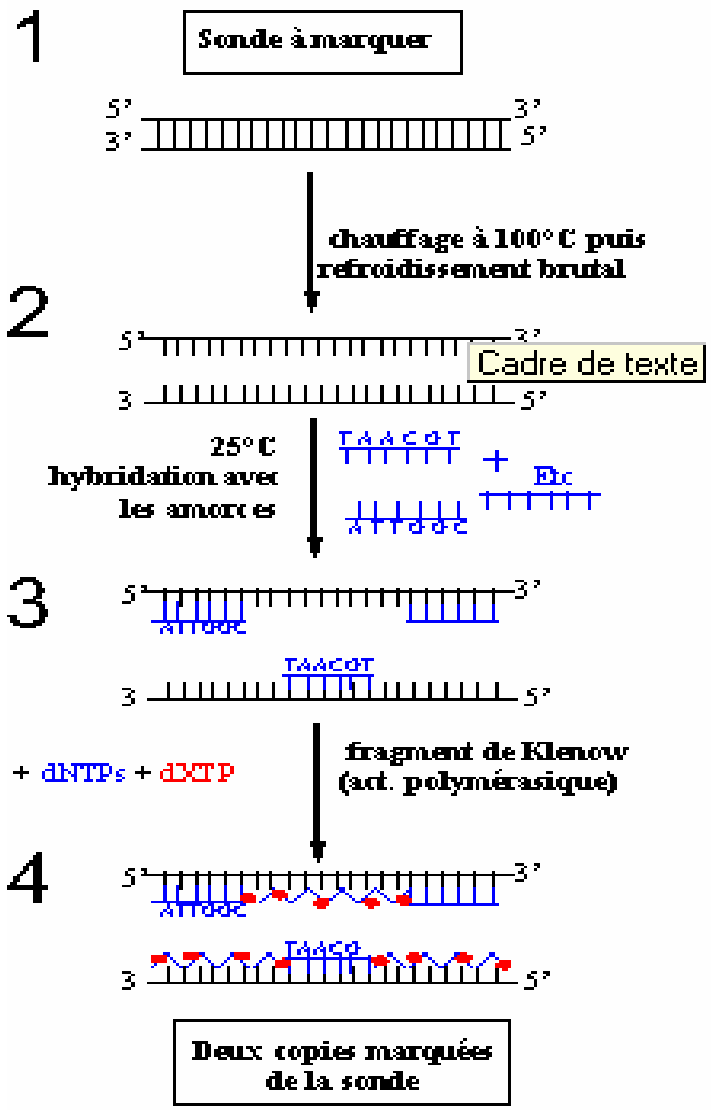
Endonucléase utilisée dans des conditions ménagées

La DNAse génère quelques cassures aléatoires simple brin

Au niveau des cassures, la DNA polymérase I détruit l'ADN par son activité exonucléasique (5'-3')….

… et le synthétise par son activité polymérase en présence de nucléotides dont un est marqué.

Marquage par «amorçage au hasard » (Random Priming)



- Séparation des deux brins de la sonde

- Ajout d'amorces hexamères « random » qui s'hybrident avec l'ADN de manière aléatoire

- L'ADN polymérase va synthétiser l'ADN complémentaire

- Le brin d'ADN synthétisé est marqué

Les différents types de l'hybridation

L'hybridation peut se réaliser sur des échantillons :

- En solution

- Fixée sur support solide :

    - immobilisation sur membrane, sur verre

    - colonies bactériennes

    - chromosome

    - coupe de tissus...

Hybridation *in situ* sur chromosome

Objectif : déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve un gène d'intérêt.

Exemple: recherche sur un chromosome, un des gène du virus d'Epstein Barr

En pratique:

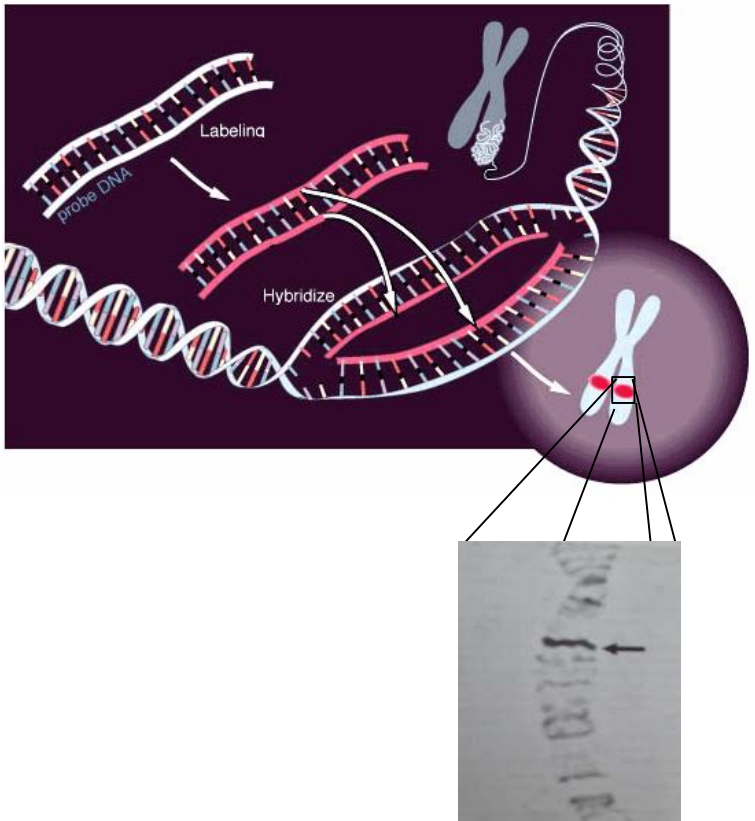
-Préparation des chromosomes

- Hybridation de la sonde marquée directement sur les préparations fixées sur lame

- Sonde marquée au tritium (H^3):

rayonnement très court, donne donc une

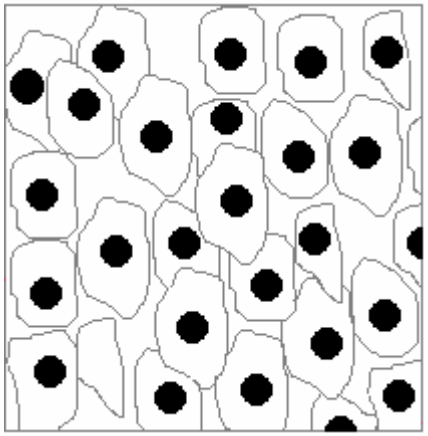
localisation fine de la zone émettant la radioactivité.



- Résultat lu sous microscope: les signaux positifs apparaissent sous forme de grains noirs disposés sur les chromosomes.

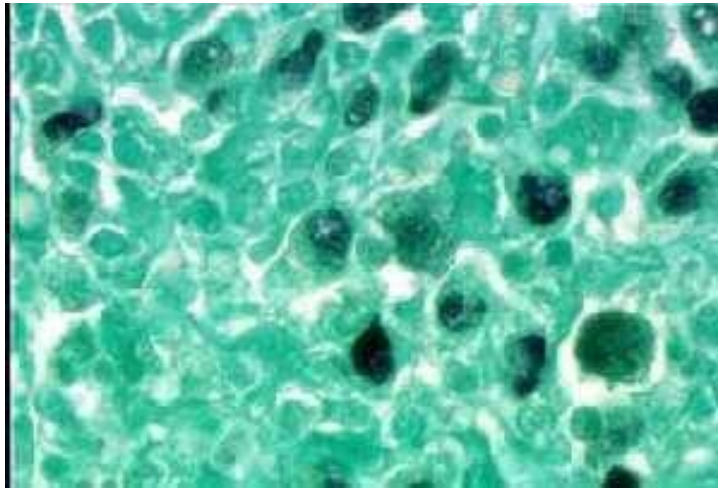
Hybridation *in situ* sur cellule entière

Détecter les cellules infectées par le virus d'Epstein-Barr, à l'aide d'une sonde reconnaissant l'ARN du virus



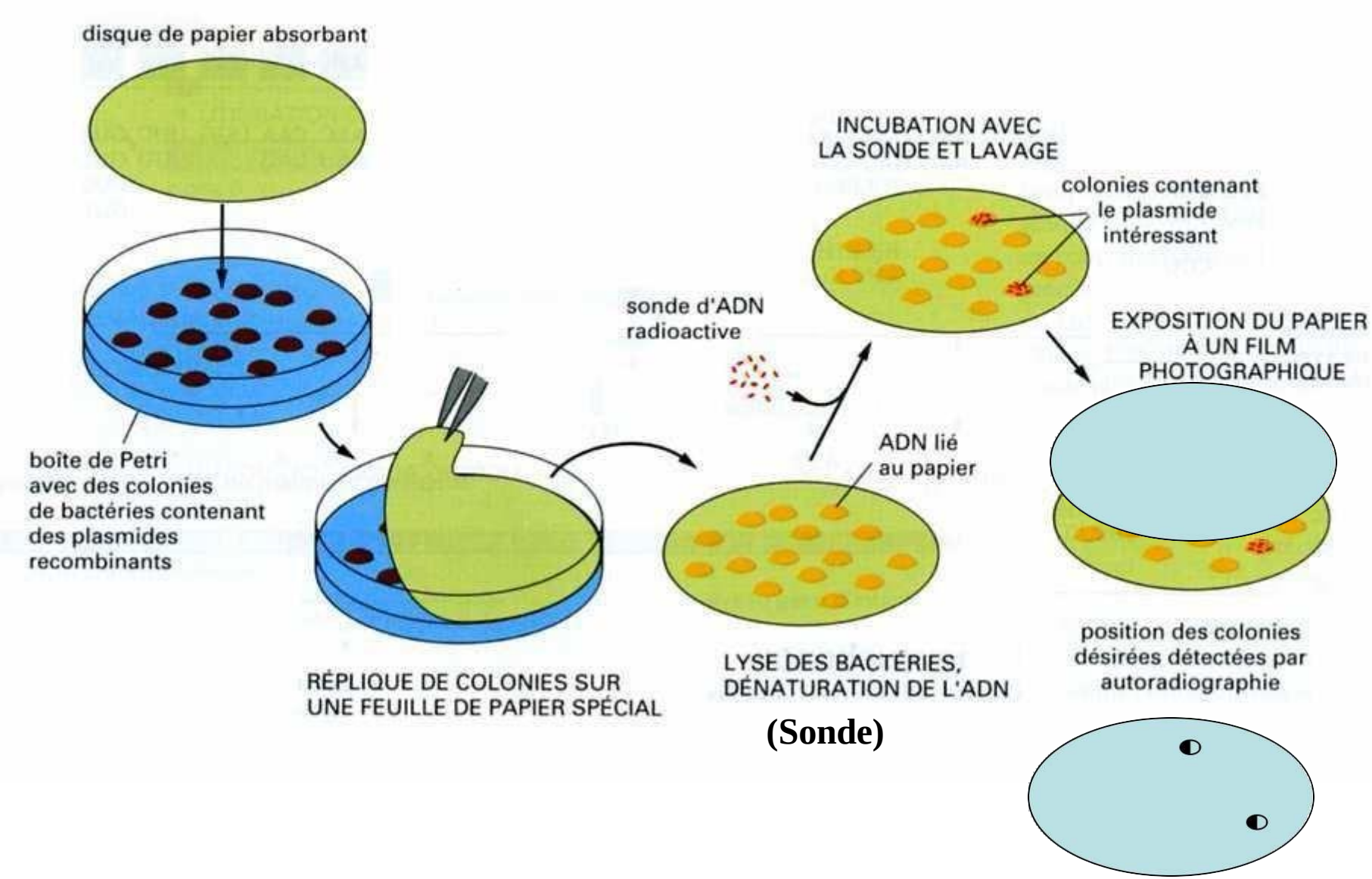
Hybridation

Lavage
Révélation



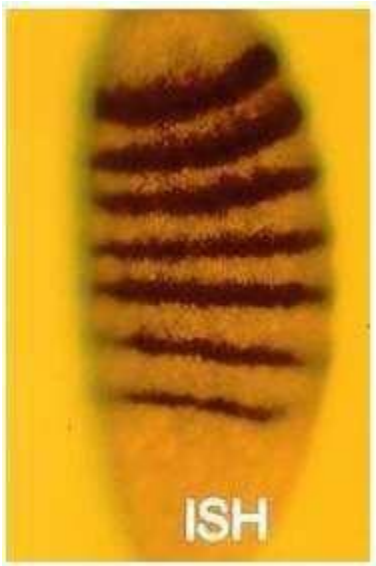
- coloration nucléaire bleu foncé des noyaux infectés
- contre coloration verte des autres noyaux

L'hybridation *in situ* sur colonies de bactéries



Hybridation *in situ* sur coupe de tissu

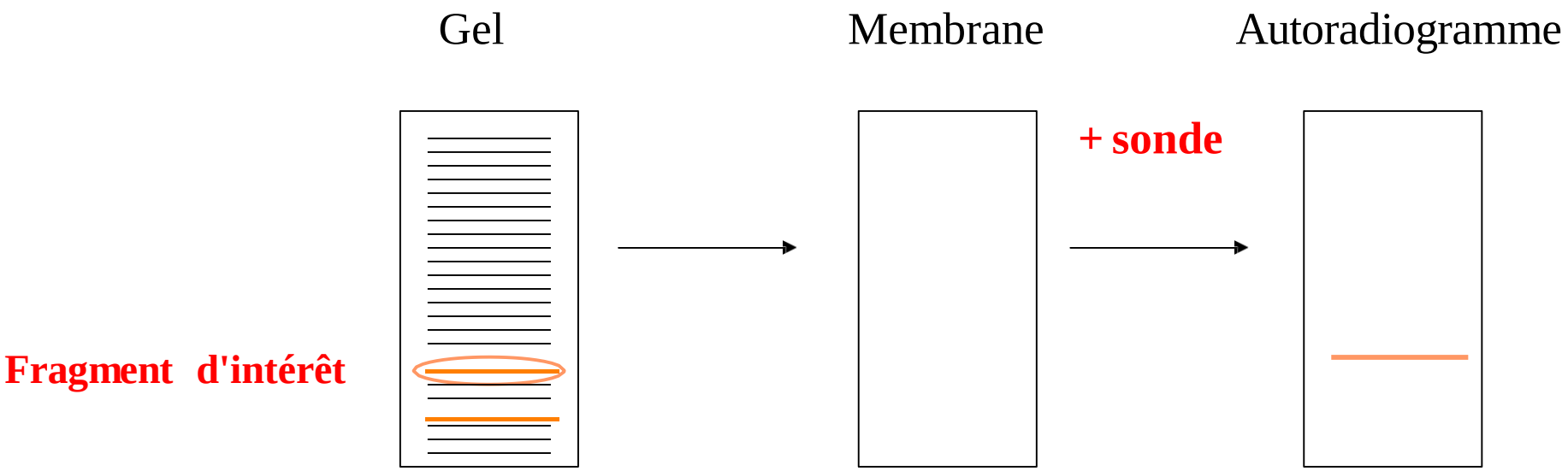
Objectif : Déterminer quelle sous population du tissu exprime un ARN donné (un tissu est généralement constitué de différents types cellulaires, pas toujours faciles à séparer)



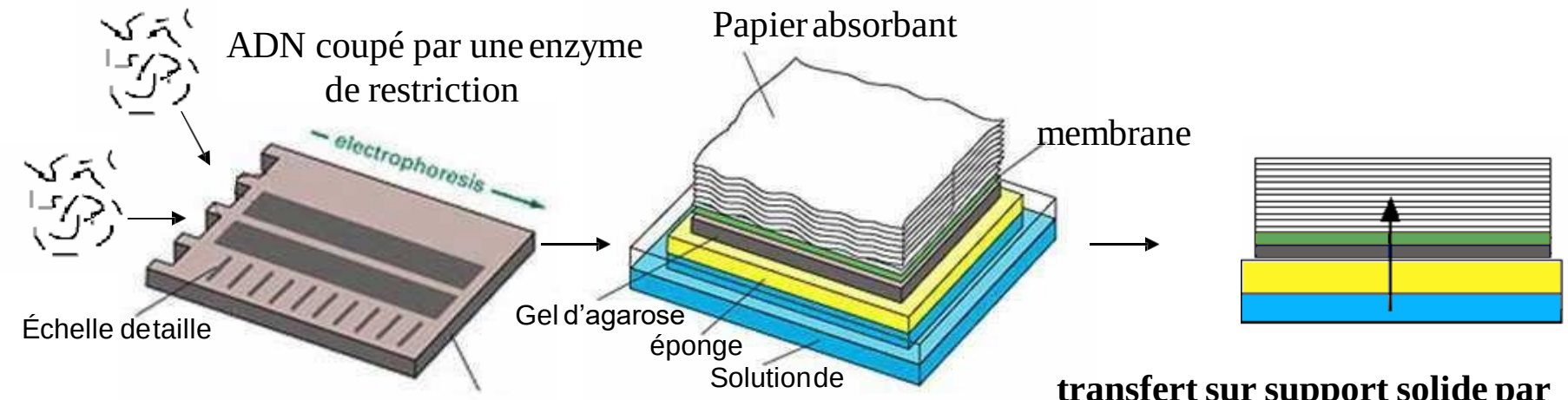
Coupe d'embryon de drosophile qui a subi une hybridation avec soit une sonde complémentaire de gène *IHC* (gauche) soit du gène *ISH* (droite). Ces deux gènes sont impliqués dans le développement embryonnaire de la drosophile.

Principe du Southern blot

- Méthode a été initialement décrite par E.M. Southern en 1975.
- L'expérience de Southern-blot consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre grâce à leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope.



SOUTHERN-BLOT

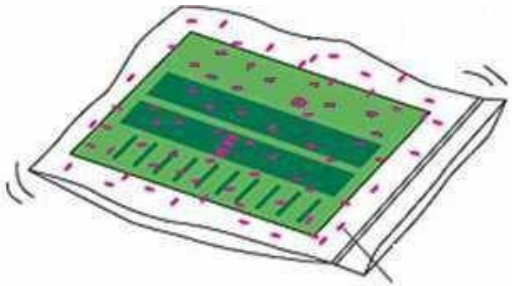


électrophorèse sur gel d'agarose +dénaturation dans le gel des fragments de restriction (NaOH)

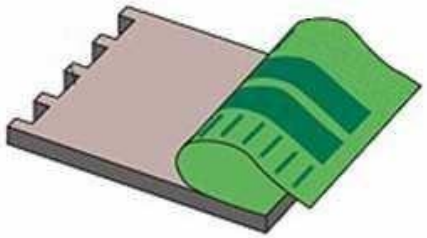
transfert sur support solide par capillarité (buvardage = blot

Lavage

révélation



hybridation



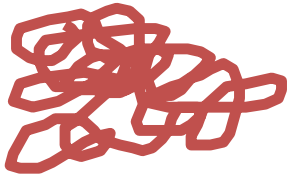
Révélation de la sonde (autoradiographie)

hybridation avec une sonde marquée dénaturée

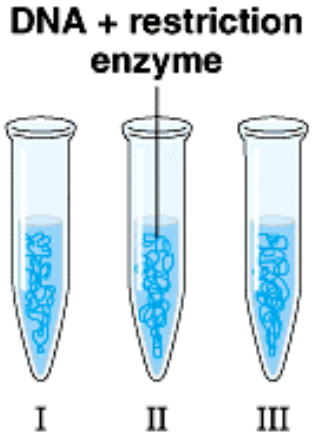
Fixation de l'ADN sur la membrane par les U.V

Etape du Southern blot

1. **Extraction de l ’ADN**



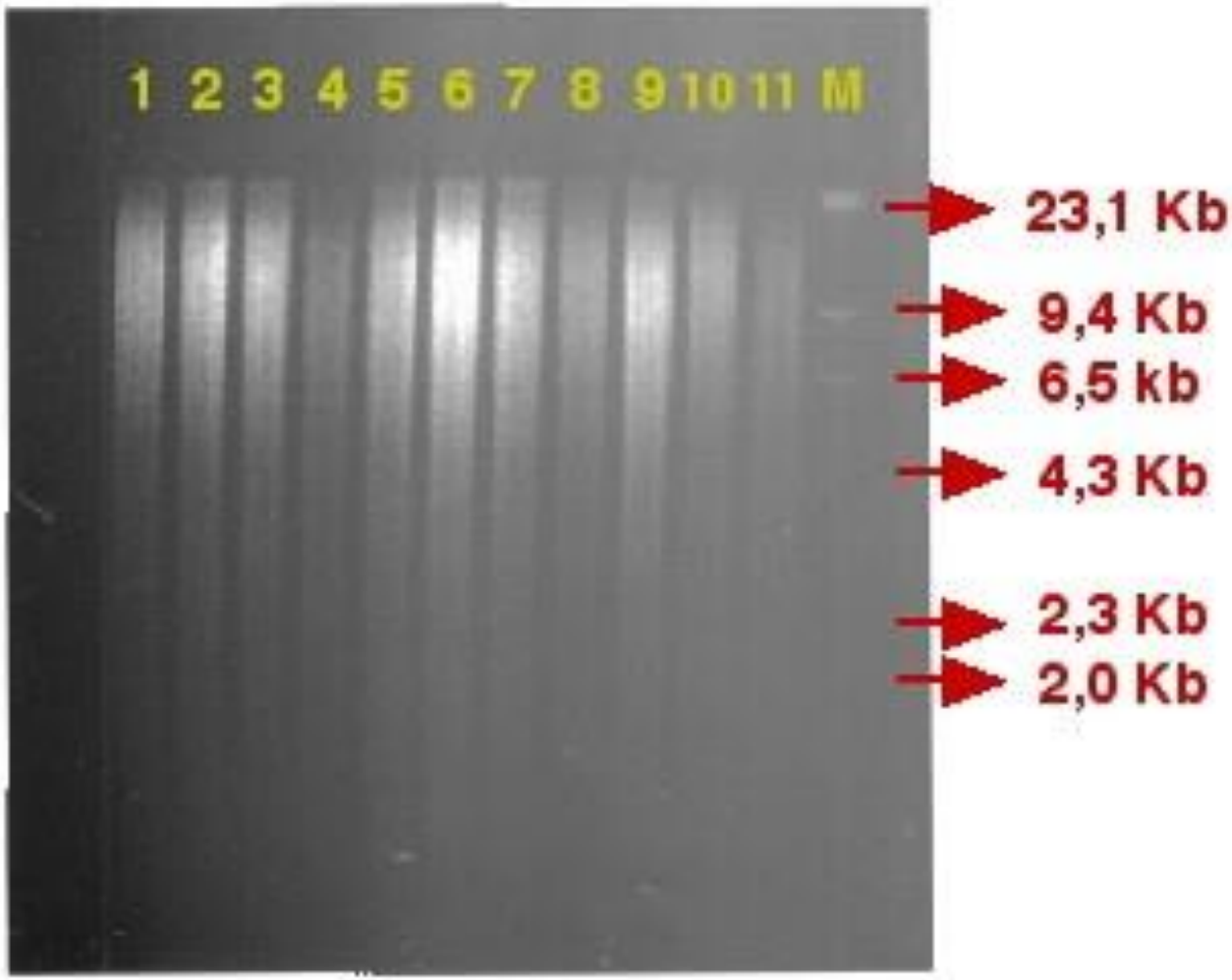
2. **Digestion de l ’ADN par une enzyme de restriction**



3. **Séparation des bandes sur gel d’agarose**

4. **Dénaturation de l ’ADN →simple brin**

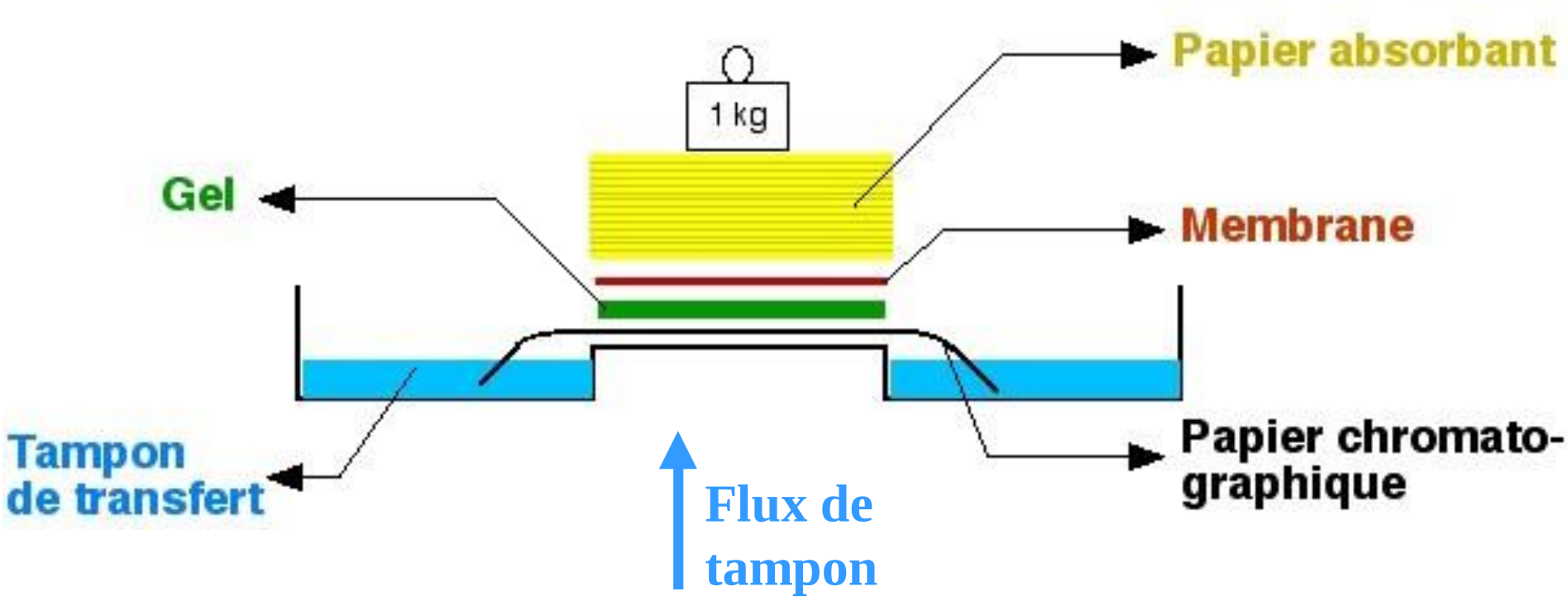
Etape du Southern blot



Gel d'agarose d'ADN humain digéré par *Eco*RI
M: lambda digéré par *Hin*dIII

Etape du Southern blot

5. Transfert sur membre de nitrocellulose ou nylon

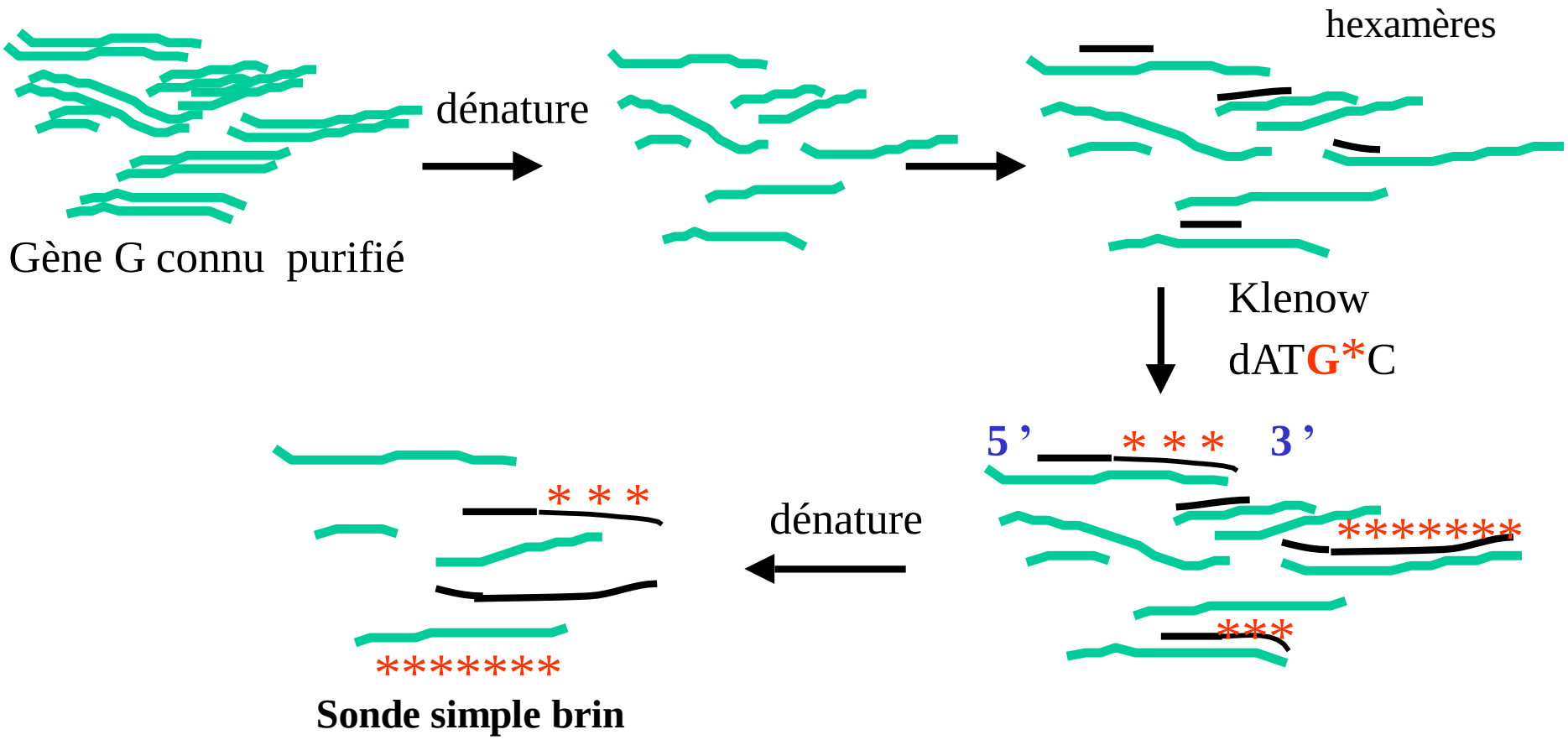


→ **Membrane permet d'immobiliser l'ADN et de le rendre accessible à la sonde**

Etape du Southern blot

6. Préparation de la sonde:

Méthode de « random priming » (ou amorçage aléatoire)



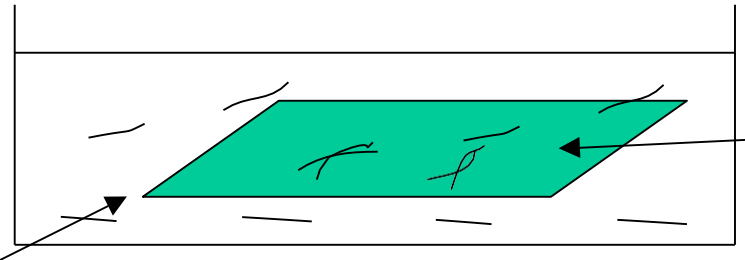
Etape du Southern blot

7. Hybridation

→ Favoriser l'hybridation

ADN simple brin

Sonde simple brin



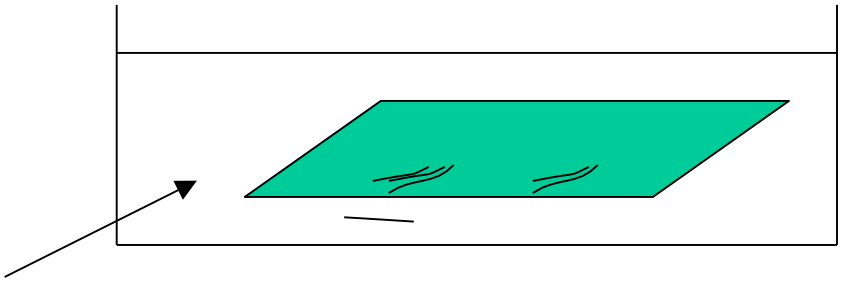
nylon

Solution d'hybridation: [Na+]

T°hyb= Tm- (20-25°C)

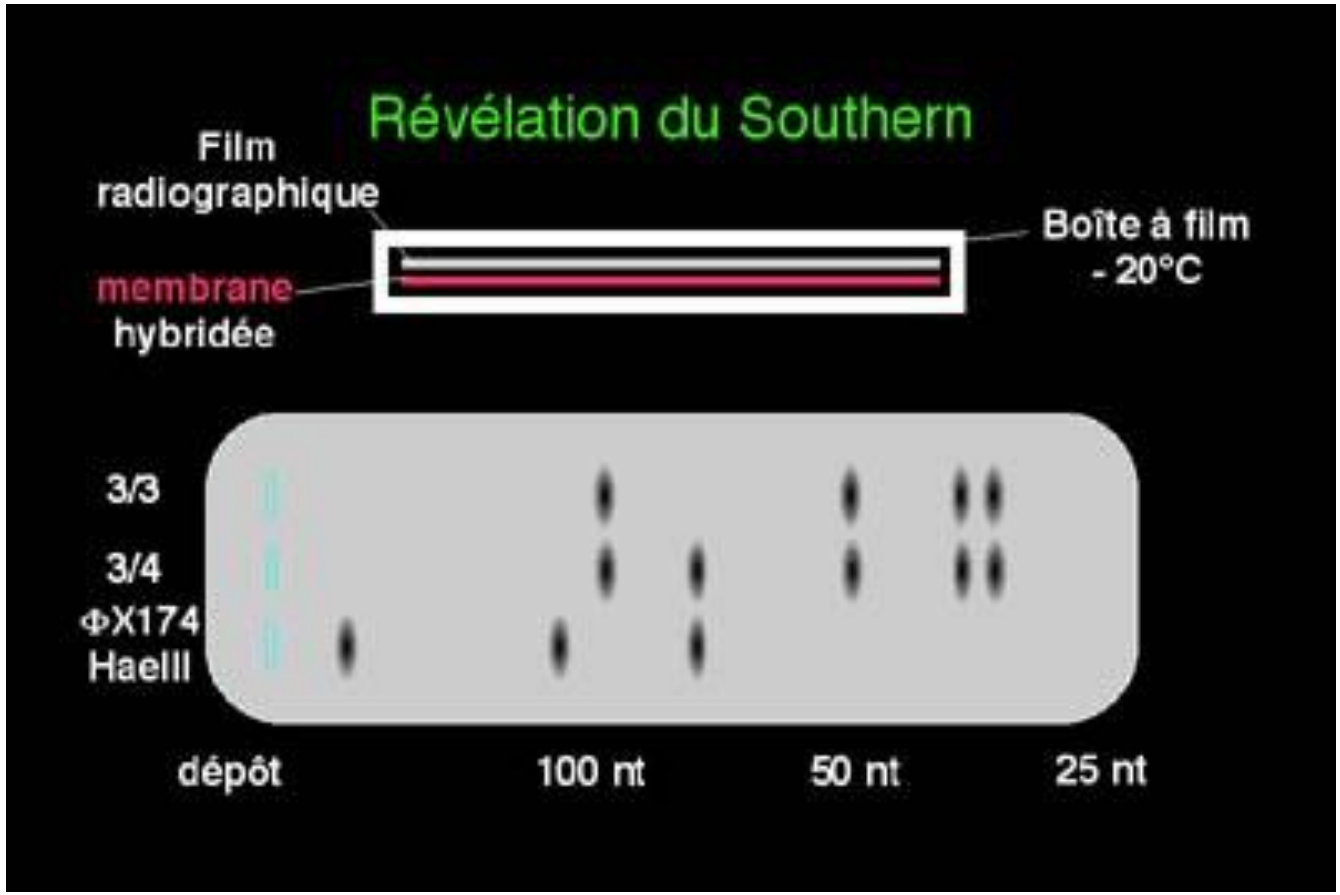
8. Rinçage

→ Eliminer l'hyb. non-spécifique



Solution de rinçage: conditions plus stringentes [Na+]

Etape du Southern blot

9. Révélation

Quelques heures à plusieurs jours