

Module : Techniques d'analyse de biologie moléculaire
Chapitre 6 : La technique DGGE, SSCP et les Puces à ADN

I- La technique de gel électrophorèse en conditions dénaturantes (DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Décrit par Fischer et Lerman (1983), la DGGE est une technique d'empreinte moléculaire visant à séparer des molécules d'ADN de même longueur dans un gel contenant un agent dénaturant (formamide/urée) les fragments d'acide nucléique sont soumis à différentes concentrations croissantes en dénaturant (gradient vertical de dénaturant). Les 2 brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT et GC (2 liaisons hydrogènes pour AT contre 3 pour GC). Deux molécules différentes peuvent avoir des brins qui ne se sépareront pas au même moment et migreront alors différemment. La molécule la plus stable migrera moins vite que celle qui se dénaturera dans le gradient (migrent plus loin sur le gel).

La DGGE est actuellement très utilisée pour l'analyse de la diversité du gène de l'ARN ribosomique (16S ou 18S) de populations microbiennes naturelles (sol, milieux aquatiques) et aussi le diagnostic direct des maladies génétiques. Cette technique permet de révéler une mutation ponctuelle unique dans les fragments d'ADN ayant jusqu'à 300 paires de bases et une composition en GC inférieure à 50%.

La DGGE sert également à distinguer les génotypes homozygotes des hétérozygotes pour un fragment particulier d'ADN. Pour bénéficier de cette possibilité, la sensibilité de la méthode est augmentée en dénaturant et renaturant lentement les fragments avant de les déposer sur gel. Les hétérozygotes formés par renaturations des brins correspondant à des allèles différents présentent de mauvais appariements et sont moins stables avec une température de fusion encore plus faible que les homoduplexe. Ils donnent des bandes qui migrent très peu. Cette technique est efficace pour mettre en évidence des polymorphismes dans des fragments amplifiés par PCR.

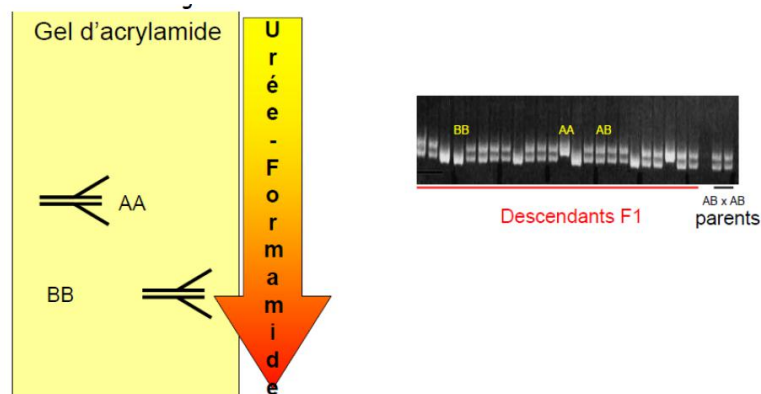


Figure1 : Mise en évidence des homozygotes et des hétérozygotes par la DGGE.

II- La technique SSCP (Single Strand Chain Polymorphism)

La technique SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. Le produit de la PCR étant dénaturé à 94°C, est rapidement refroidi dans la glace. Les molécules simple brin ne s'apparient pas mais forment des structures secondaires simples (conformation spatiale). Chaque simple brin prend une conformation qui est lui propre en fonction de sa séquence et des appariements possibles à l'intérieur de ce brin. Les deux brins d'ADN complémentaires prennent des conformations différentes en raison des différentes stabilités des liaisons A-T et G-C. Chaque brin d'ADN a une vitesse de migration dans un gel d'électrophore sur gel de polyacrylamide qui est lui propre en fonction de sa conformation spatiale. La réassociation des brins complémentaires est empêchée durant toute la migration. La technique est très sensible et elle est capable de révéler des différences due à un seul nucléotide (mutation ponctuelle) pour des fragments d'une taille inférieure à 200 nucléotides.

Dans le cas d'un homozygote, on peut observer deux bandes, chacune correspondant à une structure secondaire légèrement différente. Dans le cas d'un hétérozygote, au moins quatre bandes peuvent être observées.

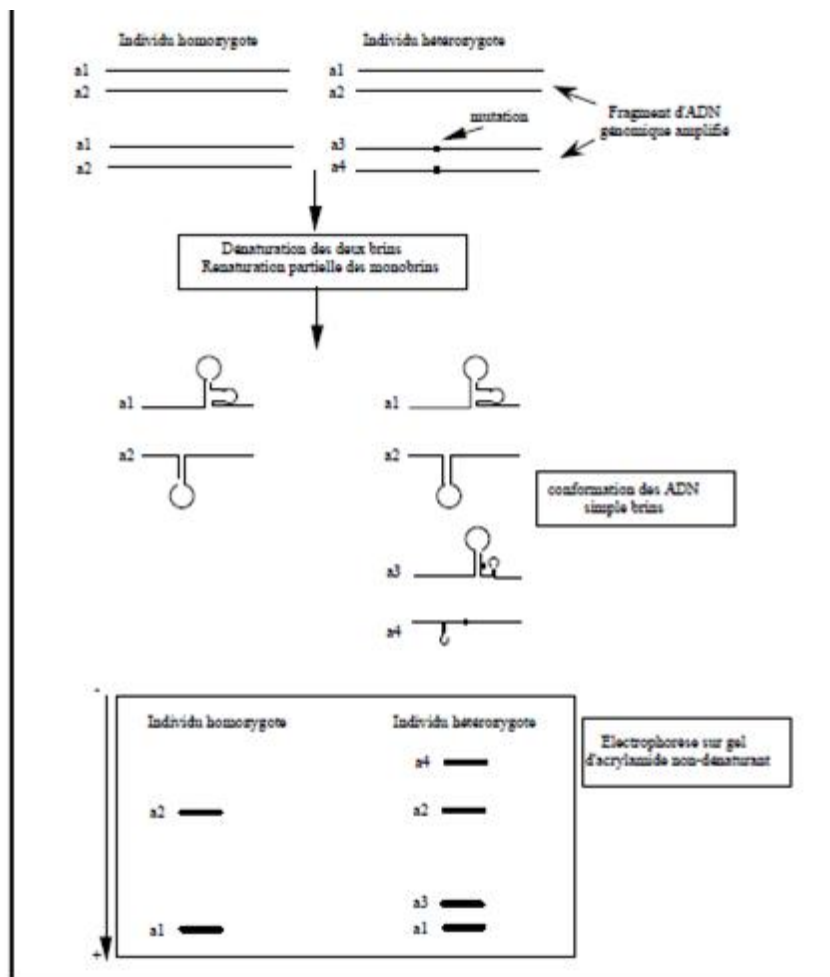


Figure 2 : Mise en évidence des mutations génétiques par la méthode SSCP.

III- Les puces à ADN

Une puce à ADN est une lamelle de verre sur laquelle on a fixé des brins d'ADN qui sont souvent des oligonucléotides. Les brins sont arrangés de telle manière à connaître la séquence correspondant à chaque spot. Le nombre de spots peut être très élevé, jusqu'à 100 000 par lamelle de la taille d'une lamelle utilisée conventionnellement en microscopie. La sonde est marquée à l'aide d'un composé fluorescent et la détection s'effectue à l'aide d'un laser. La présence d'une hybridation indique qu'il existe une séquence complémentaire dans la sonde.

Par exemple si on spotte toutes les séquences des gènes connus chez l'homme et qu'on hybride avec les ARN d'un type cellulaire, les gènes qui hybrident correspondent à ceux qui sont exprimés dans les cellules ayant servi à préparer la sonde.

On peut aussi spotter les gènes correspondant à une bactérie qui contamine les aliments. On prépare une sonde à l'aide d'ADN extrait de l'aliment, lorsqu'il y a hybridation on en déduit que la bactérie est présente dans l'aliment.

Les puces à ADN sont utilisées pour déterminer le profil d'expression des gènes, détecter des mutations et des polymorphismes ainsi des anomalies chromosomiques. Comme elles peuvent être utilisées aussi pour l'étude des interactions ADN/protéines.

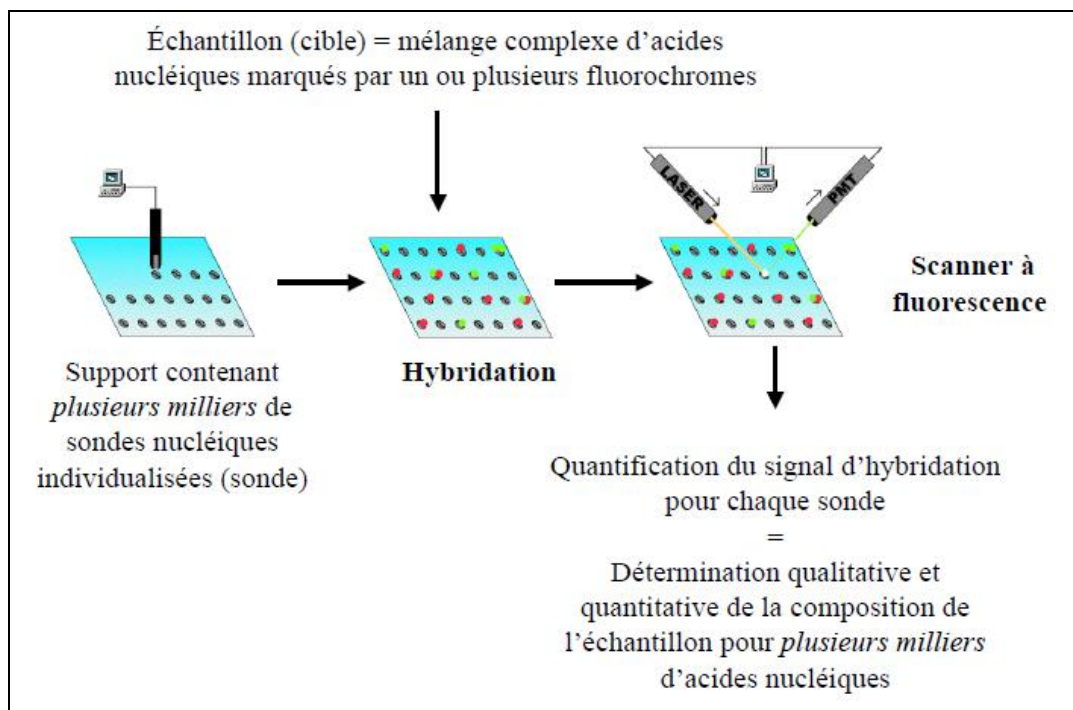


Figure 3 : Principe général des puces à ADN.

Mm GHARZOULI FERTOUL. R