

# Cours de génie génétique



**L3 biochimie**

**Par Dr. GUENDOUZE A.**

1

## CHAPITRE III

**Hybridation moléculaire, sondes et  
marquage de l'ADN**

2

## Introduction: Hybridation d'une sonde

Pour détecter de façon spécifique une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN), on synthétise un petit fragment d'ADN dont la séquence correspond au moins en partie à celle de l'acide nucléique à détecter.

Elle doit être marquée ( prochaines diapositive)

La plupart des sondes sont constituées d'ADN, mais il existe également des sondes d'ARN (ribosondes)

3

## Marquage d'ADN

- Le marquage consiste en l'incorporation d'un atome ou groupement possédant des propriétés particulières permettant sa mise en évidence expérimentale : radioactivité, fluorescence (fluoresceine ou rhodamine), ligand (biotine) ou des molécules antigéniques ( digoxygénine). Ainsi, selon la nature de ce dernier, on distingue :
  - Marquage **radioactif** dit **chaud**
  - Marquage **froid** dit **biochimique**

4

## Marquage radioactif

- 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).
- Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triphosphate radiomarqués
- Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et [hybridation \*in situ\*](#).

5

## Marquage radioactif

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).

Le Phosphore 32 est le radio-isotope le plus utilisé incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides tri P radio-marqués.

Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation *in situ*.

6

## Marquage interne

7

### 1. Marquage par translation de coupure (Nick Translation) ou déplacement de brèche

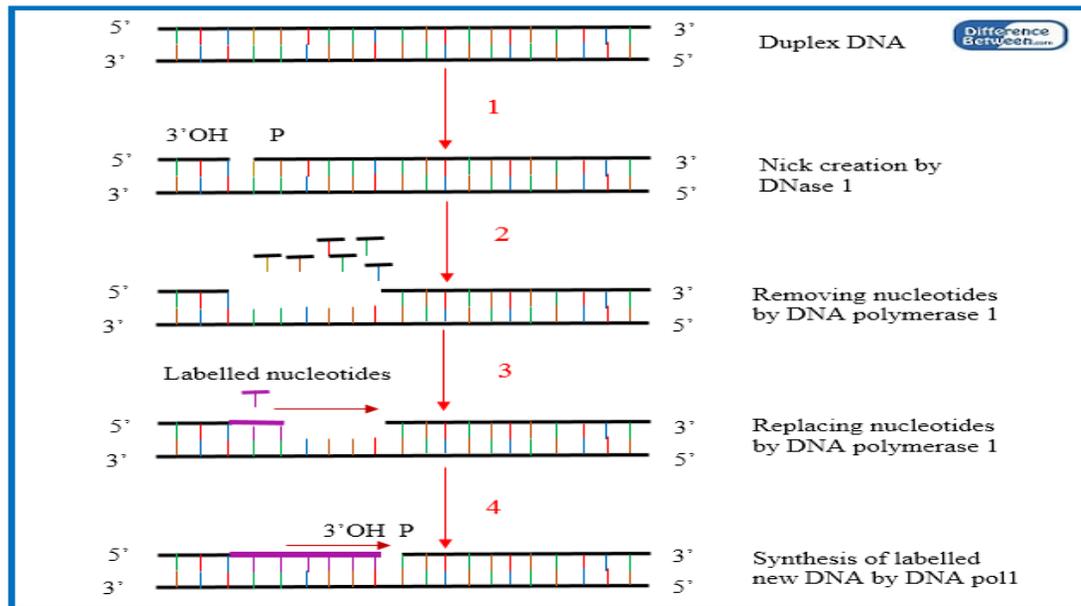
Le marquage interne résulte d'une polymérisation *in vitro* de l'ADN en présence de nucléotides, précurseurs marqués. Cette polymérisation repose sur la complémentarité des deux brins d'ADN. Le fragment Klenow est capable, en utilisant comme modèle le brin complémentaire, d'ajouter des nucléotides à une extrémité 3'-OH d'ADN, qui apparaît lorsque l'un des brins d'une molécule d'ADN est coupé.

Cette enzyme présente également une activité d'exonucléase qui élimine des nucléotides du côté 5'-P de la coupure. L'élimination des nucléotides du côté 5'-P couplée à l'ajout séquentiel de nucléotides à l'extrémité 3'-OH provoque un mouvement du site de coupure ("translation de coupure") le long de l'ADN.

Avant l'action de la polymérase, les coupures sont réalisées par la DNase I. Cette endonucléase provoque des coupures simple brin et au hasard sur l'ADN.

Si l'on utilise des nucléotides marqués au  $^{32}\text{P}$  à haute radioactivité spécifique, on obtient alors des molécules d'ADN double brin dont certaines portions sont fortement marquées.

8



9

## 1. Marquage par translation de coupure (Nick Translation)

Une autre explication: on utilise 2 enzymes :

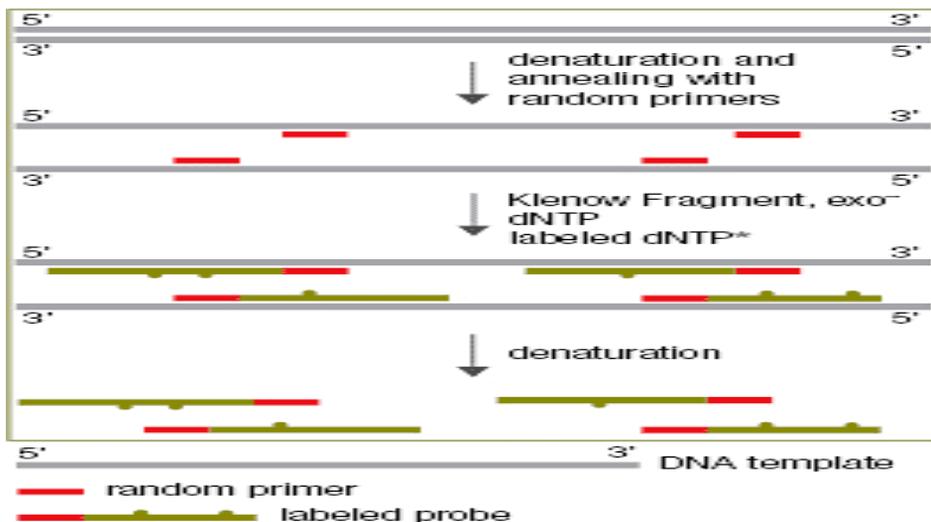
- **DNase I** dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt
- **DNA pol. I** pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud.
- l'ADN double brin traité par la Dnase I est clivé au hasard.
- 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 ( $^{32}\text{P}$ ). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au  $^{32}\text{P}$ .
- La sonde radioactive obtenue devra être dénaturée avant utilisation.

10

## 2. Marquage par amorçage aléatoire (*random priming*)

- Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la 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  $^{32}\text{P}$ . La sonde radioactive obtenue devra être dénaturée avant utilisation
- Ce type de marquage est très employé dans les laboratoires pour par exemple les Southern et Northern Blot,

11



Marquage par amorçage aléatoire (*random priming*)

12

## Les sondes doubles brins

### Marquage aux extrémités

13

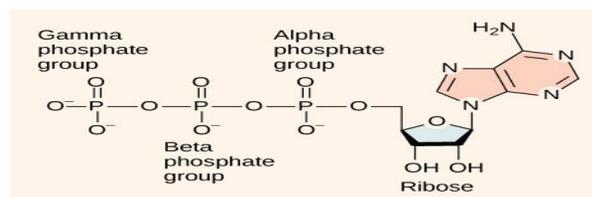
### La polynucléotide kinase

La polynucléotide kinase du bactériophage T4 catalyse le transfert du phosphate  $\gamma$  de l'ATP sur une fonction alcool du carbone 5' d'un ADN ou d'un ARN.

L'enzyme catalyse aussi l'échange du phosphate 5' terminal d'un ADN ou d'un ARN avec le phosphate  $\gamma$  de l'ATP, en présence d'ADP comme accepteur de phosphate.

La polynucléotide kinase est utilisée au laboratoire pour incorporer du phosphate radioactif ( $^{32}\text{P}$ ) sur l'extrémité 5' d'un acide nucléique, soit par transfert (la chaîne ne possède pas de groupement phosphate), soit par échange

Ces oligonucléotides marqués seront utilisés comme sonde pour le criblage de banques.



14

## La transférase terminale

La transférase terminale catalyse l'addition de désoxynucléotides sur une fonction alcool 3'OH terminale de l'ADN. L'enzyme préfère les molécules d'ADN dont l'extrémité 3'OH est sortante, mais il existe des conditions qui favorisent la catalyse sur l'ADN à bouts francs.

Elle incorpore plus spécifiquement les purines ou les pyrimidines en fonction du cation divalent qu'on lui donne comme cofacteur :  $Mg^{++}$  pour les purines,  $Co^{++}$  pour les pyrimidines ou encore  $Mn^{++}$ .

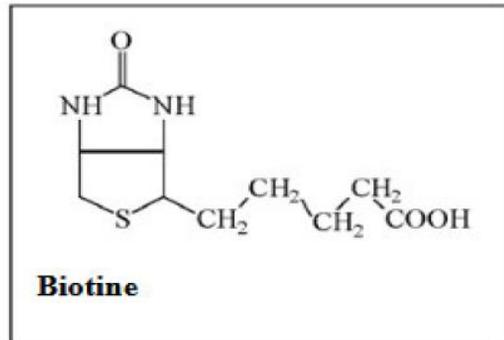
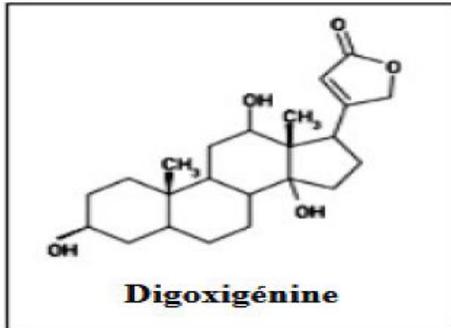
15

## Marquage chimique

De plus en plus, les nucléotides radioactifs sont remplacés par des nucléotides marqués par des molécules non radioactives (d'où le terme de "**sondes froides**").

Les différentes molécules associées aux nucléotides sont entre autres la **digoxigénine**, la **biotine** et la **fluorescéine**.

16

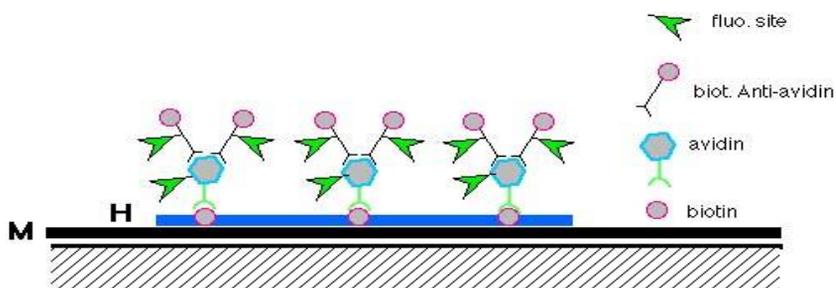


17

## Exemple: La biotine (Vit.B)

La révélation se fait par fixation sur la biotine de l'avidine puis fixation d'un anticorps anti-avidine fluorescent.

- Cet anticorps fluorescent est alors excité, il récupère la lumière émise par les sites fluorescent et l'émet.



18

## Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex

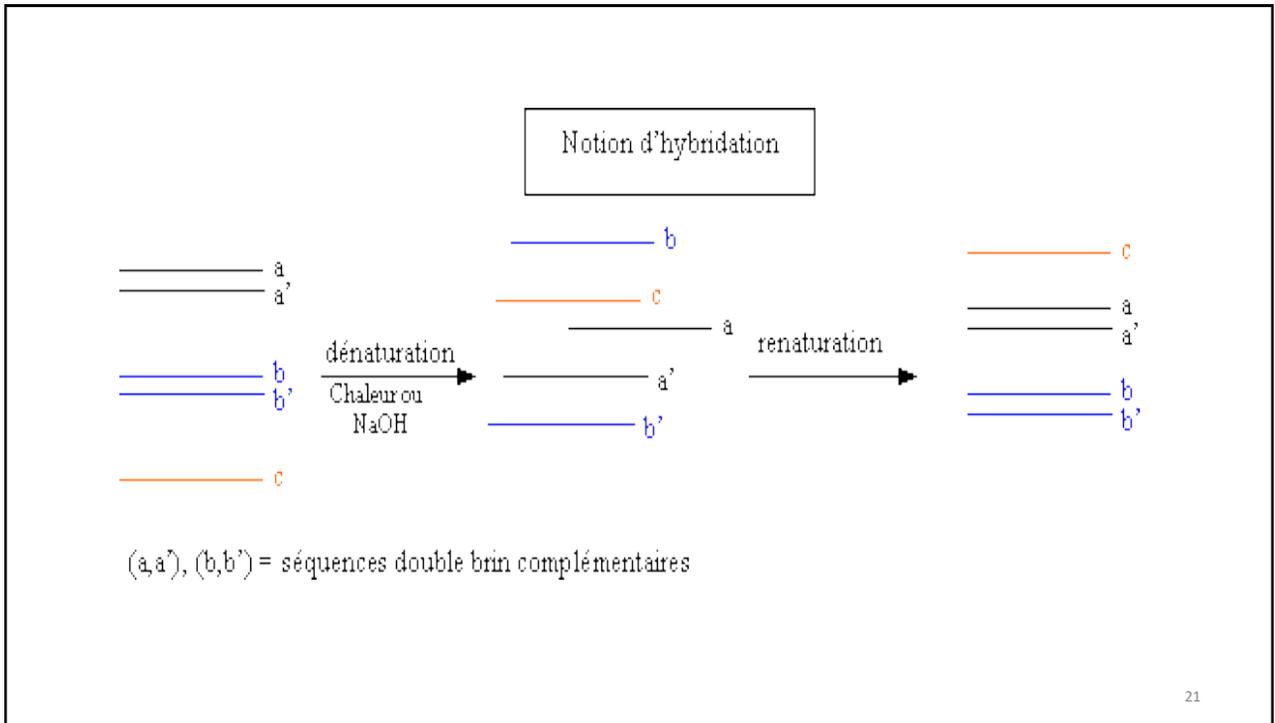
19

## Hybridation moléculaire

Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques :

- deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U)
- et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G).

20



- Un fragment de DNA double brin affecte normalement une structure secondaire en double hélice.
- En élevant la température jusqu'à la  $T_m$ , on disjoint 50 % environ des liaisons hydrogène qui unissent les brins de DNA, ce qui dénature partiellement la double hélice.
- Lorsque la température atteint 95°C. toutes les liaisons hydrogène sont rompues et **la dénaturation** du DNA est complète : DNA simple brin, qualifié de « **dénaturé** ».
- En refroidissant brutalement (glace) les structures secondaires ne se reforment pas et le DNA reste dénaturé. Au contraire, si on refroidit doucement, la double hélice se reforme progressivement. Un oligonucléotide (sonde) ajouté à ce moment peut s'**hybrider** avec un fragment complémentaire du DNA.
- L'hybridation d'une sonde marquée sur un DNA dénaturé permet de marquer spécifiquement tous les fragments de ce DNA dont la séquence est complémentaire de la sonde.

## Les sondes nucléotidiques

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.

23

## Caractéristiques générales d'une sonde nucléotidique

Une sonde nucléotidique peut être une séquence **d'ADN ou d'ARN**, mais obligatoirement **monobrin**.

**Sa taille est très variable** : oligonucléotide de **20-30** nucléotides ou à l'opposé de **plusieurs centaines** de nucléotides.

La sonde est **complémentaire** et **antiparallèle** du fragment recherché.

Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à **un marquage**.

24

## Exemples d'application des sondes

25

### Hybridation sur support : Southern blot

- Cette méthode a été initialement décrite par E.M. Southern en 1975.
- Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope..

26

## Southern blot

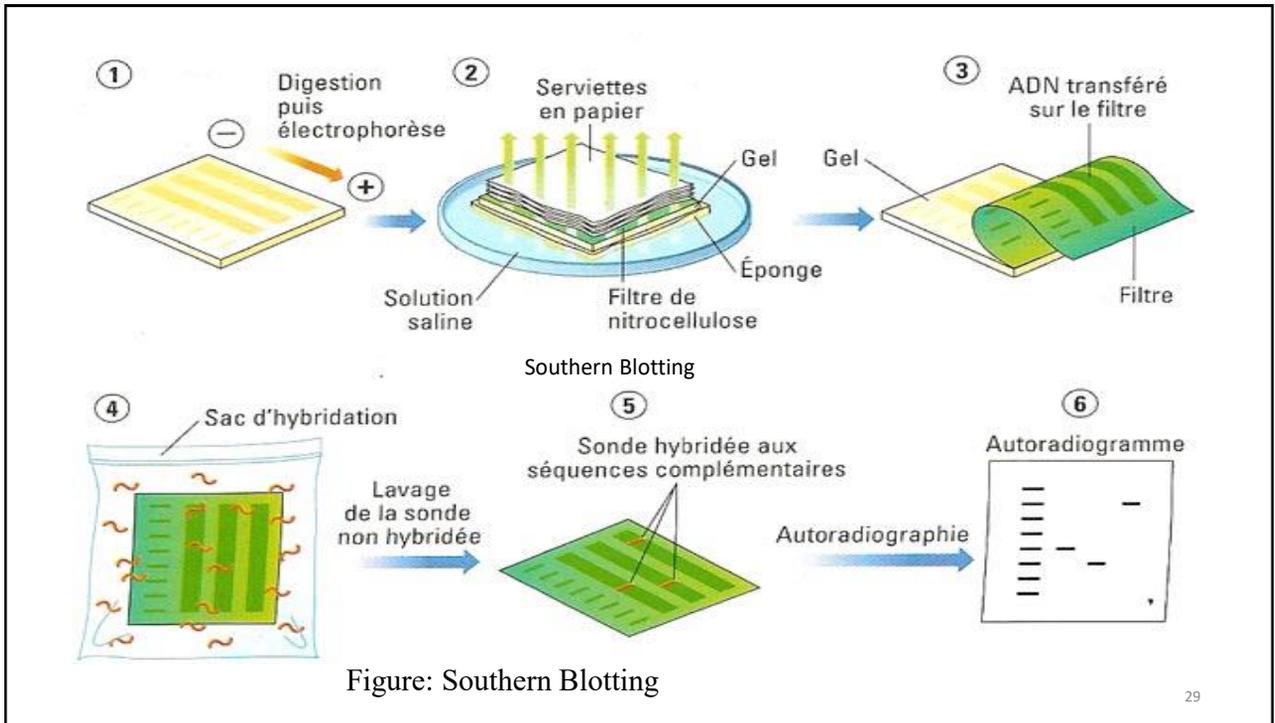
Les étapes successives de cette technique sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN génomique.  
Exemple: extraction à partir des leucocytes circulants obtenus à partir de sang total.
- Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique.
- Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.
- Après séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin en fragments d'ADN monobrin .

27

- Transfert des fragments monocaténares du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon ou membrane de nitrocellulose) par simple capillarité (effet buvard: *blotting*).
- Fixation des fragments monocaténares d'ADN sur le support souple et hybridation avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.
- Lavages et révélation (dans ce cas par autoradiographie).  
Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique. Le film est ensuite révélé. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments.

28



29

## Northren blotting

Cette technique permet le repérage d'un type de molécule d'ARN dans une population.

**Utilisation :** Pour repérer l'expression d'un gène dans un tissu, dans des conditions particulières de l'environnement

Southern Blotting	Northern Blotting
Southern name of inventor	Northern a misnomer
Separation of DNA	Separation of RNA
<u>Denaturation needed</u>	<u>Denaturation not needed</u>
Nitrocellulose filter membrane	Amino benzylomethyl filter paper membrane
DNA- DNA hybridization	RNA- DNA hybridization

30

## Comparaison entre Southern et Northern blotting

Southern Blotting	Northern Blotting
Southern name of inventor	Northern a misnomer
Separation of DNA	Separation of RNA
Denaturation needed	Denaturation not needed
Nitrocellulose filter membrane	Amino benzyloxymethyl filter paper membrane
DNA- DNA hybridization	RNA- DNA hybridization

31

## hybridation sur colonies ou plages de lyse phagiques

l'hybridation sur colonies ou plages de lyse phagiques permet de repérer parmi plusieurs candidats ceux qui portent une séquence particulière : très utilisé pour le criblage des banques.

32

## Chapitre IV

### **Les banques génomique et d'ADNc,**

33

### **Une banque génomique**

- Est une collection d'ADN génomique total d'un même organisme
- Une banque d'ADN constitue l'ensemble des clones obtenu à partir d'un seul échantillon d'ADN (un génome d'une espèce).
- L'ADN d'une espèce peut être fragmenté dans des plasmides qui sont introduit dans des bactéries. L'ensemble de ces bactéries s'appelle une banque.

34

## Construction d'une banque d'ADN génomique

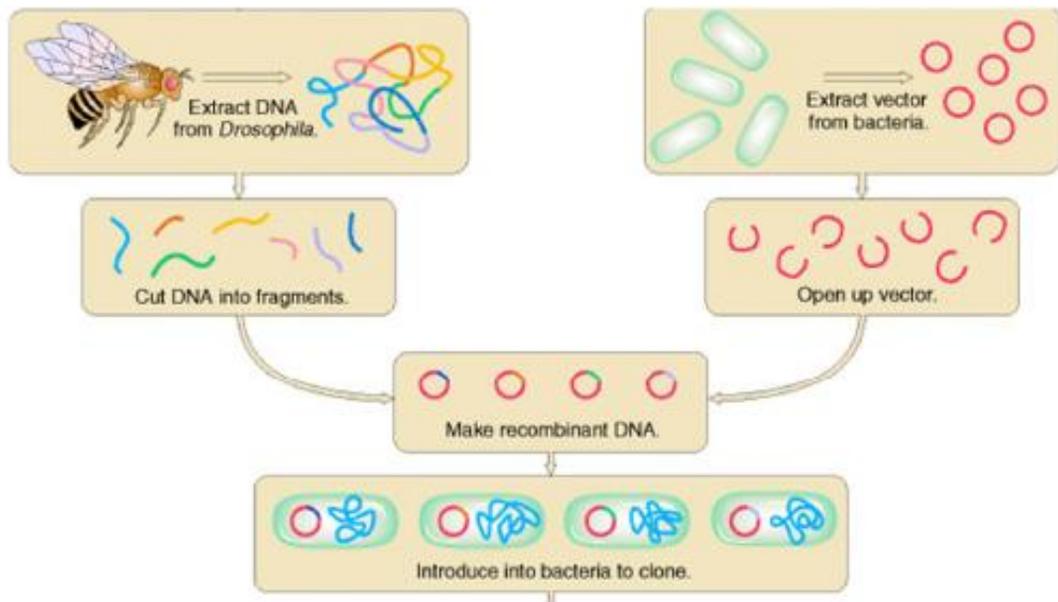
Le principe consiste à:

- i) isoler l'ADN génomique de l'espèce d'intérêt
- ii) digérer cet ADN par une enzyme de restriction permettant de libérer des fragments de restriction de taille compatible avec le vecteur choisi
- iii) cloner ces fragments dans un vecteur de clonage
- iv) intégrer ces vecteurs recombinants dans un micro organisme (ex: bactérie) afin des les multiplier

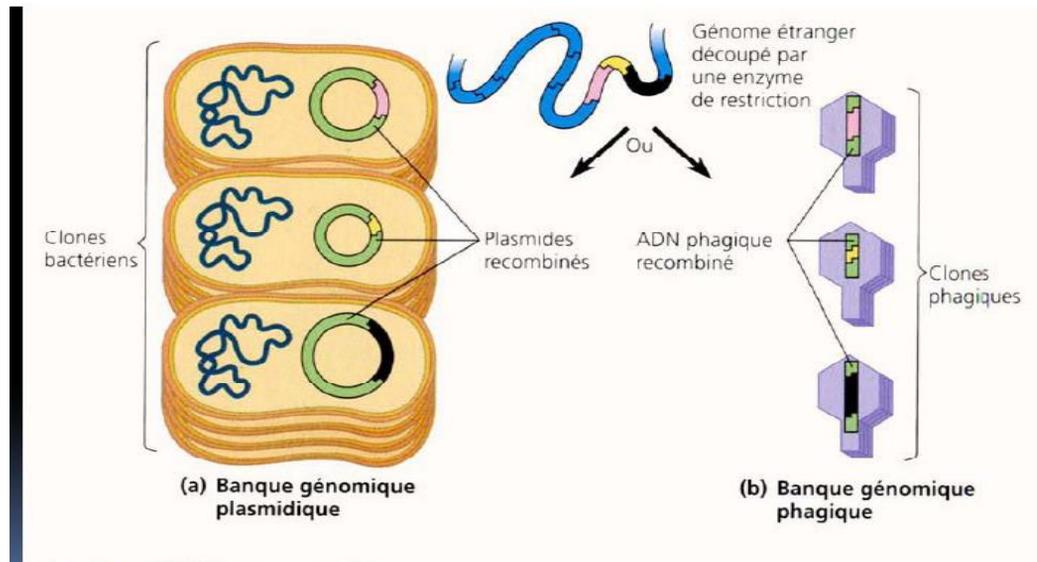
Les vecteurs phagiques seront mieux adapté au clonage d'une séquence génomique particulière alors que les cosmides et les YACs ou BACs seront choisi dans le but de caractérisation d'un génome

La banque obtenu est constituée de millions de clones recombinants

35



36

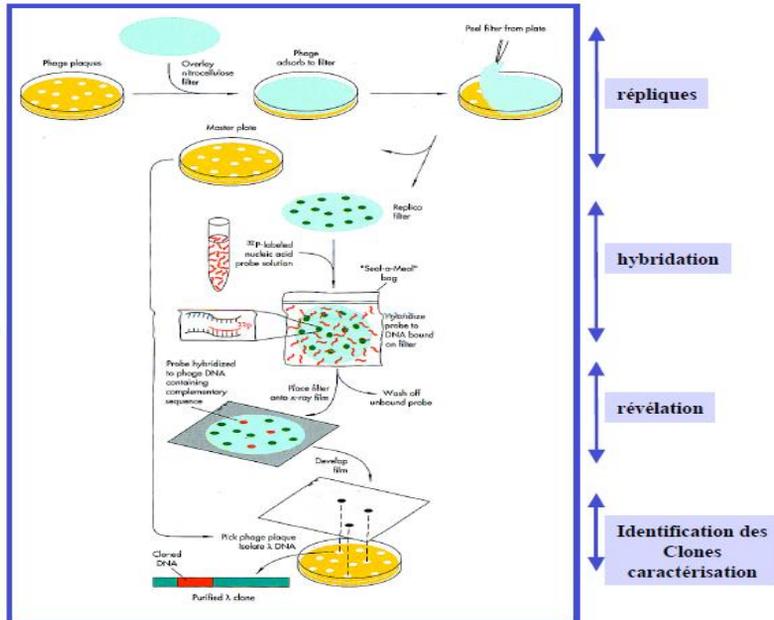


37

## Sélection (criblage) des clones intéressants dans une banque d'ADN génomique

- Une des techniques fréquemment utilisée est une forme d'hybridation *in situ*
- on effectue des répliques de clones bactériens cultivés en boîte de Pétri sur des disques de nitrocellulose, après un temps de culture suffisant, les bactéries de ces répliques sont ensuite lysées par la soude qui, en même temps, dénature l'ADN, les molécules simple brin correspondantes se trouvent immobilisées à l'emplacement de chaque clone. Après hybridation, avec la sonde radioactive, l'autoradiographie révélera les clones positifs.
- Il est alors possible de reprendre la colonie bactérienne correspondante, de l'inoculer pour une culture de grande ampleur et de purifier les plasmide recombinant

## Identification d'un gène avec une séquence nucléique



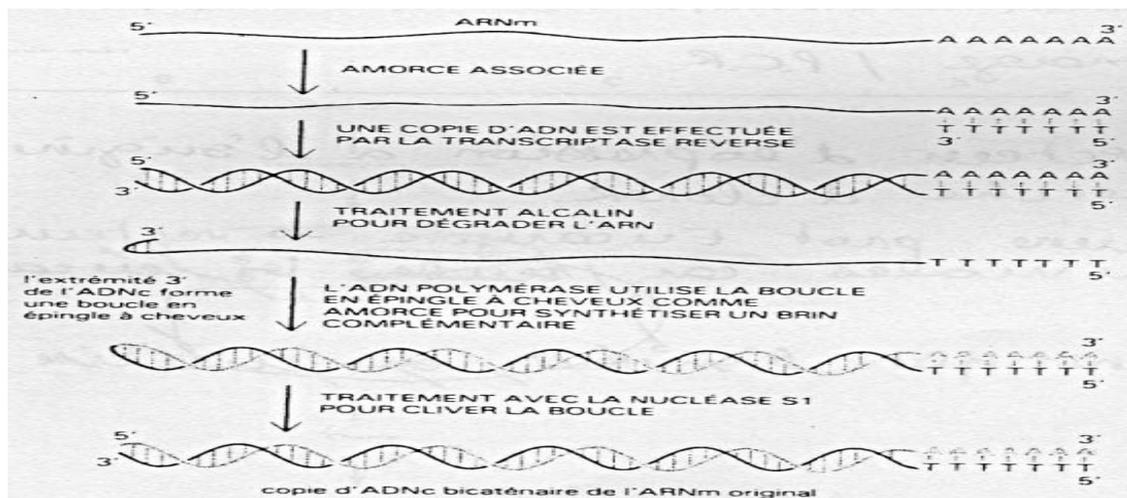
Chaque cellule portant un plasmide recombinant se développe en une colonie de cellules identiques, visible sous la forme d'un point blanc sur l'agar. Une réplique de la culture est ensuite réalisée en appuyant un morceau de papier absorbant sur la surface. Cette réplique est traitée à l'alcali (afin de faire éclater les cellules adhérentes et de dénaturer l'ADN du plasmide) puis hybridée avec une sonde d'ADN très radioactive.

## Construction d'une banque d'ADN à partir d'ARNm : banque d'ADNc.

- Une autre stratégie possible est de commencer le processus de clonage en sélectionnant les seules séquences d'ADN qui sont transcrites en ARN et qui sont donc supposées correspondre à des gènes : les ARN messagers.
- Cette méthode consiste à extraire l'ARNm à partir des cellules et à faire ensuite une copie d'ADN complémentaire (ADNc) de chaque molécule d'ARNm présente grâce à une transcriptase inverse.
- Intérêt: disposer de clones correspondant à la totalité des gènes exprimés dans un tissu donné

- Les molécules d'ADN monocaténaire synthétisées par cette enzyme sont ensuite converties en molécules d'ADN bicaténaire par l'ADN polymérase.
- Ces molécules d'ADNc sont ensuite insérées dans des plasmides et clonées comme précédemment. On obtient alors une banque d'ADNc.

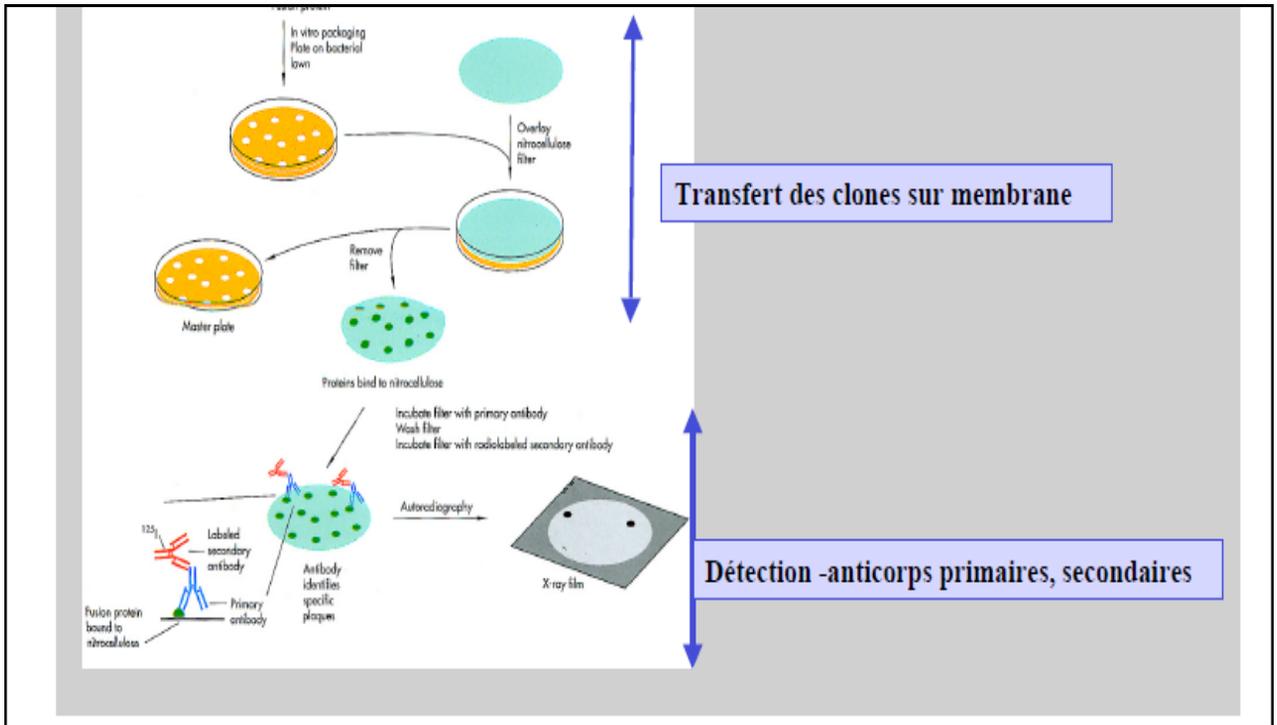
faux



- Une banque de pancréas contient des ADNc de l'insuline mais pas les ADNc de la myéline qu'on retrouve dans une banque d'ADNc de cerveau par exemple.

### Criblage par anticorps

- Une approche biochimique d'un phénomène peut aboutir à la purification d'une protéine et l'obtention d'anticorps spécifique de cette protéine.
- Ces anticorps peuvent être utilisés pour isoler un ADNc correspondant. Ceci suppose que la banque d'ADNc a été construite dans un vecteur d'expression: le site d'insertion des ADNc dans le vecteur se trouve en aval d'un promoteur bactérien.
- Les membranes d'hybridation, contenant la banque d'ADNc sont incubées avec les anticorps dirigés contre la protéine dont on veut cloner l'ADNc. Ces bactéries vont pouvoir synthétiser la protéine qui sera reconnu par les anticorps
- Le complexe stable antigène-anticorps est ensuite révélé par une réaction colorimétrique à l'aide d'un second Ac couplé à la phosphatase alcaline
- Les clones répondant à cette hybridation sont alors repérés sur la boîte de Pétri et prélevés.



## PCR: Polymerase Chain Reaction

## Polymerase Chain Reaction

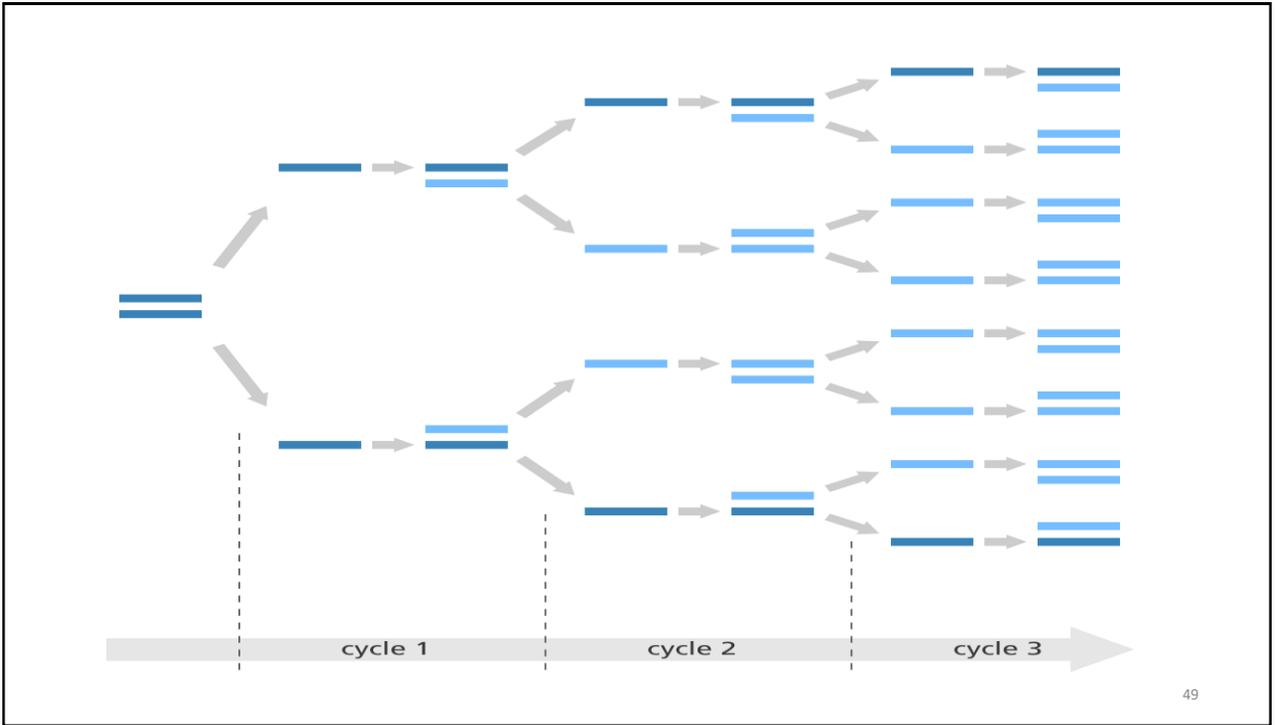
- PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase).
- Est une technique de répllication in vitro
- Elle permet d'amplifier énormément le nombre de copies d'une ou plusieurs **séquence cible spécifique** (l'Amplicon) de faible quantité et de petite taille: **jusque 2 ou 3 kb**

47

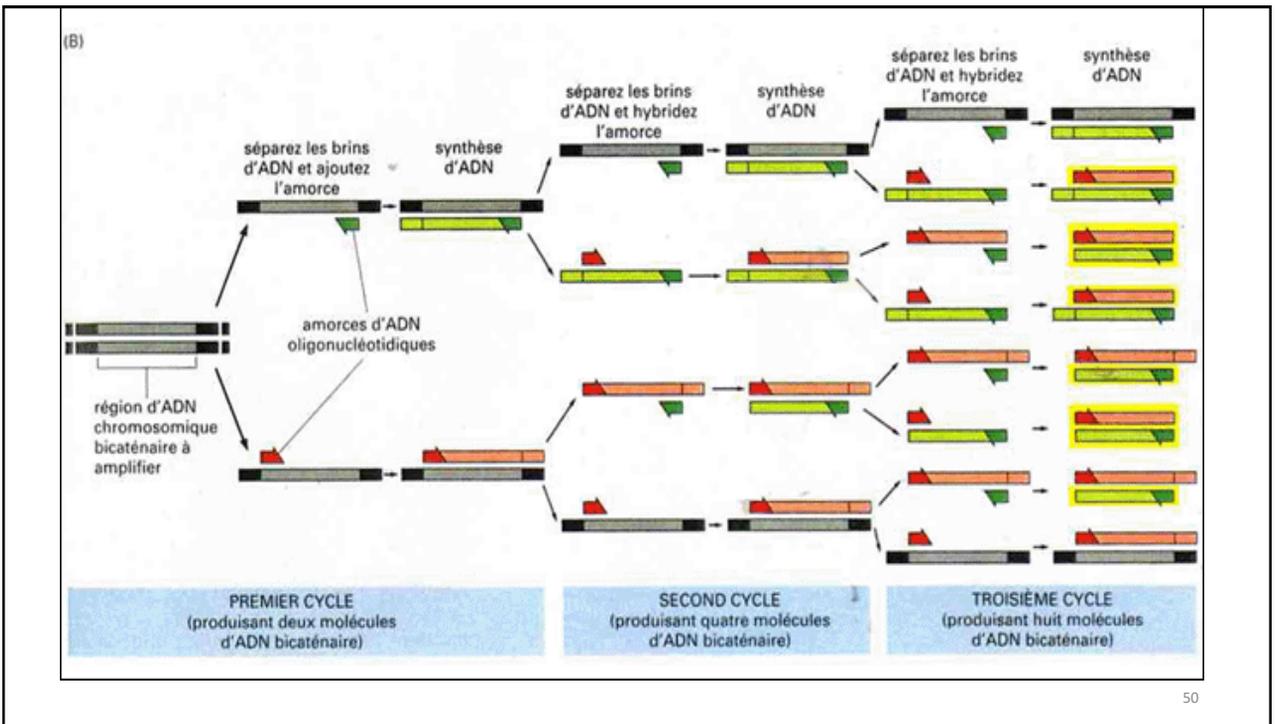
## Etapas de la PCR par cycle

- 1.La dénaturation de l'ADN:** à **95°C**, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. **L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.**
- 2.Hybridation des amorces:** le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune **complémentaire d'un des 2 brins**. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrans d'ADN est comprise entre **50°C et 65°C**. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- 3.Elongation:** intervention de la **taq polymérase** (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y **incorporant les** désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de **72°C**

48



49



50