

Hybridation moléculaire et sondes

1. DEFINITIONS

* **Dénaturation = Fusion** : Rupture des liaisons hydrogènes entre les 2 brins. Il faut donc un apport d'énergie.

Ce phénomène est visualisable grâce à l'effet hypochrome : variation de la DO à 260 nm dûe au passage db \rightarrow sb.

❖ **Température de fusion T_m** : Température à laquelle se produit le passage de l'état bicaténaire à l'état monocaténaire.

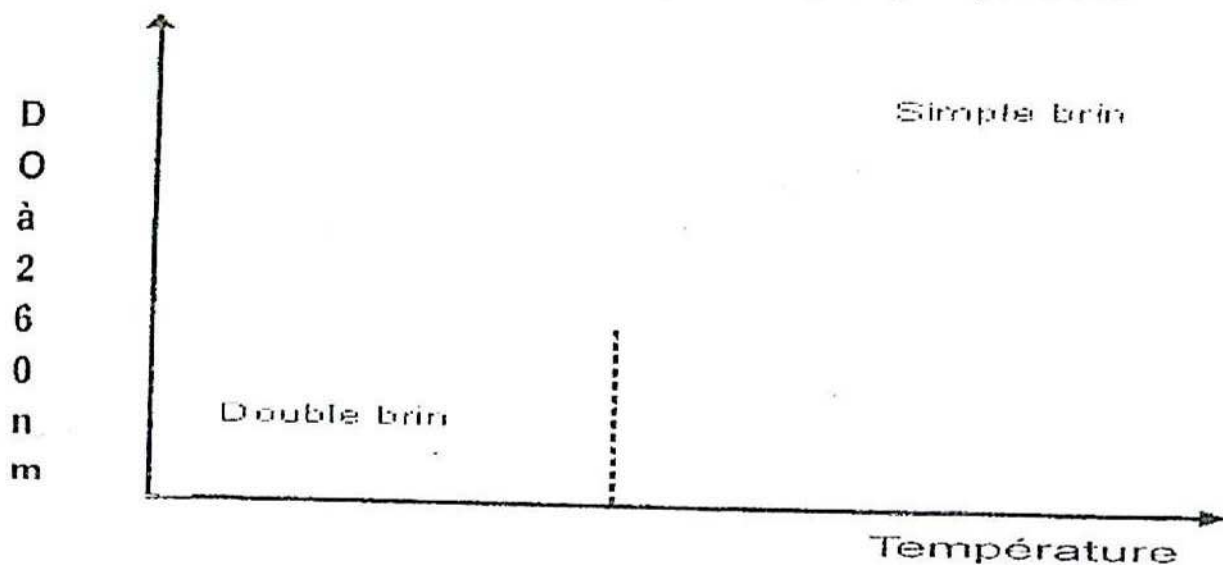
T_m est fonction de plusieurs éléments :

- composition en bases
- longueur des brins
- les mésappariements
- milieu environnant l'ADN :

. Une diminution de la force ionique diminue le T_m . . La présence de formamide diminue le T_m .

1-1/ 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:



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

2 - les facteurs influençant la Tm

2.1. La composition en bases :

La complémentarité des deux brins de l'ADN est maintenue grâce à l'appariement entre G et C 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 Tm. De manière générale, on note que la relation entre la composition en G+C et la Tm 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, AT, ou TT et ajouter 1°C par motif GG, GC ou CC.

2.2. Les mésappariements :

De manière générale, l'abaissement de la Tm est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement (mismatch).

2.3. 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 Tm. Par contre, aux faibles concentrations, la Tm 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 Tm lors des hybridations. Dans ce cas, la Tm est estimée selon la formule suivante (pour 100 pb) :

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

2.4. La longueur des fragments des ADN :

La Tm 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 :

$$\Delta T_m = - 500/\text{nombre de pb.}$$

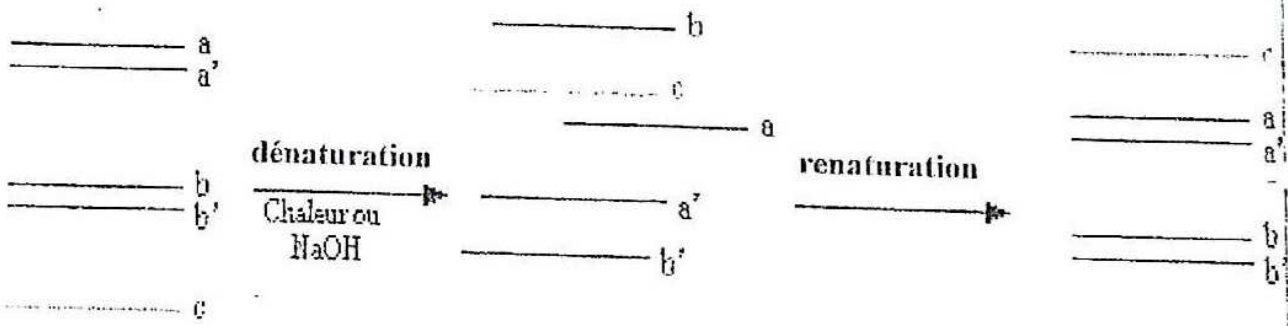
On constate tout de même que l'effet longueur est important pour les petits fragments.

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

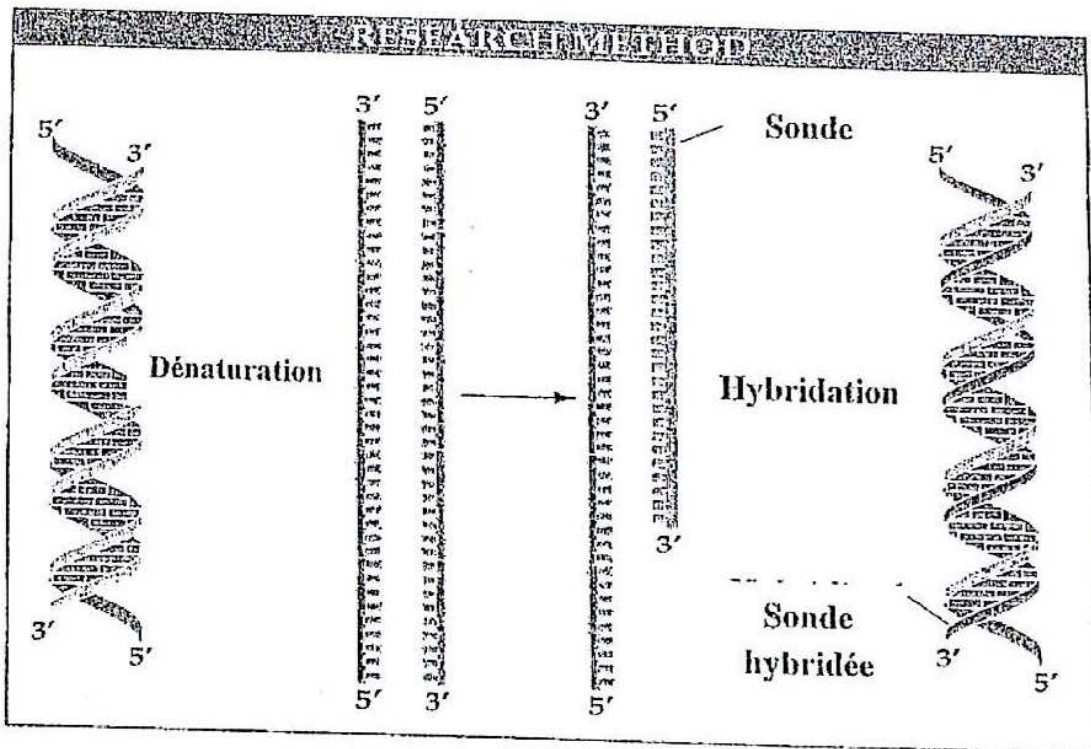
$$T_m = 16,6 \log [M] + 0,41 (\%G+C) + 18,5 - (\% \text{ mismatch}) - (675/\text{longueur en bases}) - 0,65 (\% \text{ de formamide})$$

Avec [M] = la concentration en ions Na⁺

3- Principe de l'hybridation



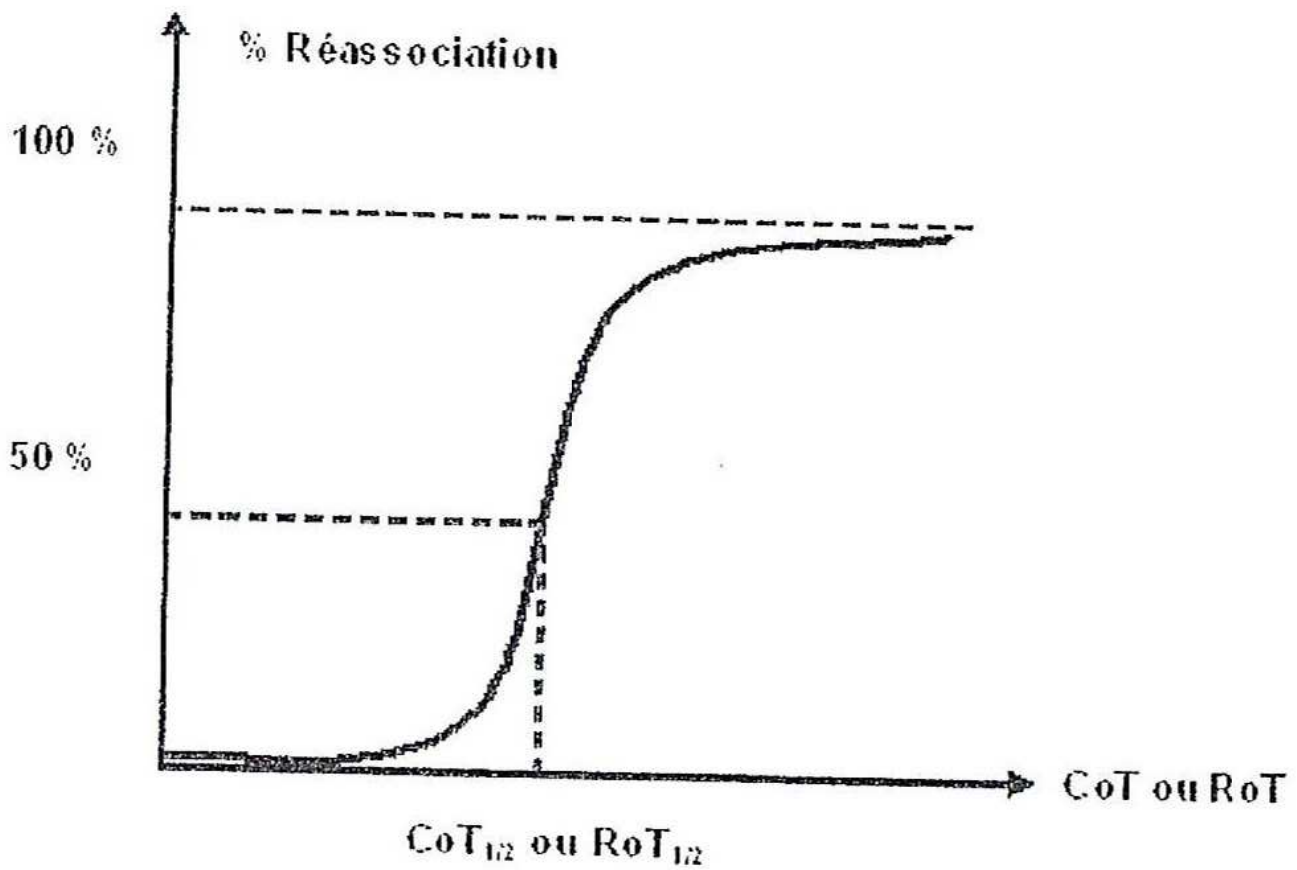
(a,a'), (b,b') = séquences double brin complémentaires



4 – Notion de Cot et Rot

Concentration de l'ADN et temps :

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 :



Courbe de détermination du Cot et du Rot

Autres facteurs influençant la Tm

- 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 Tm 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 :**

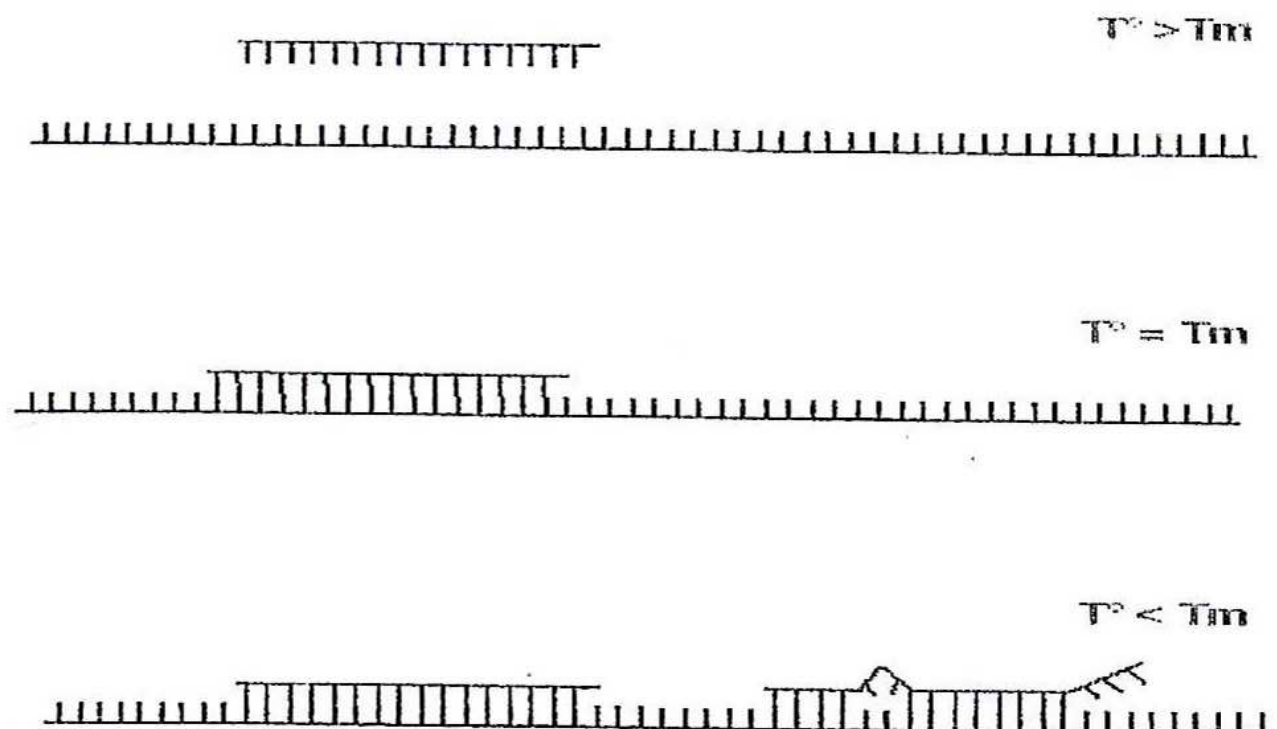
La vitesse de réassociation dépend à la fois de la nature de l'hybride et de sa concentration. Si l'hybridation concerne un mélange ADN/ADN et si l'ADN est en excès par rapport à l'ARN, la vitesse d'hybridation ARN/ADN est 5 fois plus faible que la réassociation ADN/ADN. En revanche, si l'ARN est en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

- **La force ionique :**

La concentration en Na Cl joue un rôle important dans les réassociations des segments complémentaires. Pour une concentration de Na Cl 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.

5 – La température de réassociation



6 - Les différents types d'hybridation

L'hybridation peut avoir lieu

1 - en solution

2 - sur support solide :

Immobilisation sur membrane (nitrocellulose, nylon), sur verre

colonies bactériennes

chromosomes

coupe de tissus...

Objectif : détecter la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l'utilisation d'un fragment d'ADN complémentaire = **sonde**

7 - APPLICATIONS DE L'HYBRIDATION

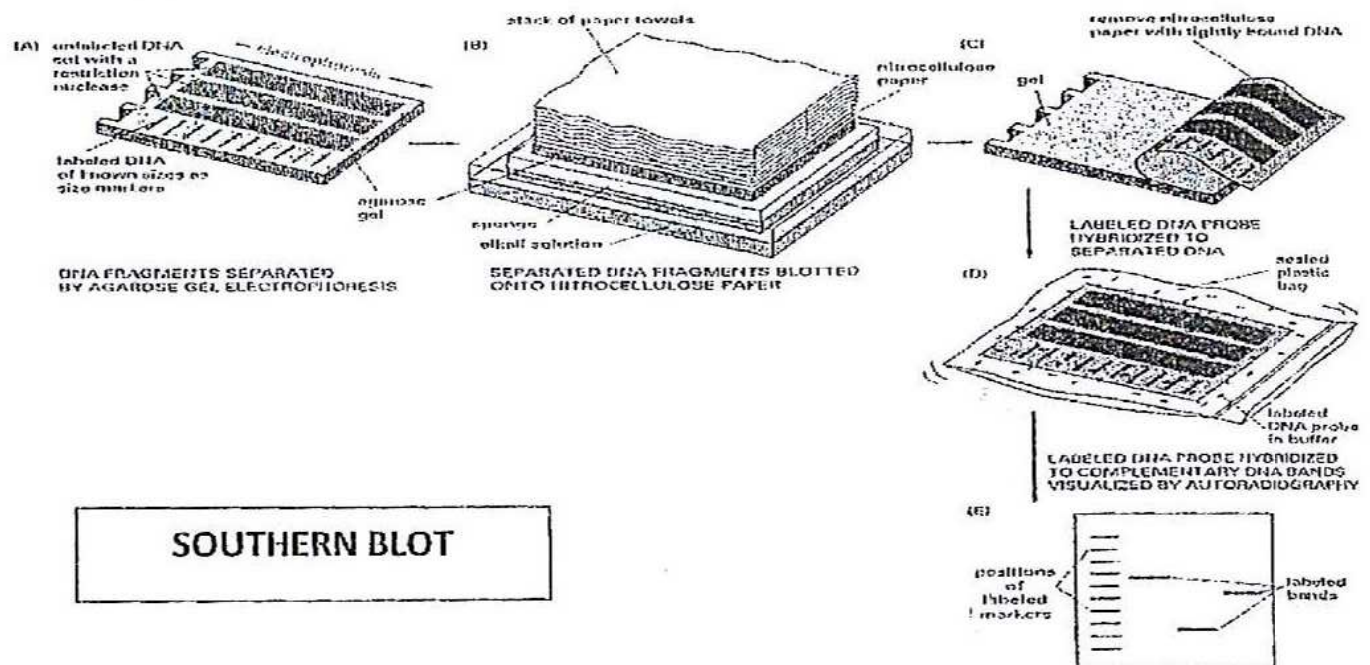
1-Hybridation d'ADN sur support solide : SOUTHERN BLOT

Procédure

- Extraction ADN
- Fragmentation
- Electrophorèse
- Transfert
- Hybridation, lavages, révélation

Applications

- Recherche d'altérations sur un gène
- Empreintes génétiques



Hybridation d'ARN sur membrane Northern Blot

• Procédure

- Extraction ARN - Electrophorèse - Transfert - Hybridation, lavages, révélation

• Application

- Analyse de l'expression d'un gène
- Recherche de variants d'épissage

Hybridation d'ADN *in situ*

❖ Procédure

Hybridation de sondes fluorescentes sur chromosomes en métaphase

❖ Applications

- Recherche de remaniements du génome
- Localisation d'un gène

Objectif : déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène dont on possède la sonde.

en pratique :

préparation des chromosomes

hybridation directement sur les préparations fixées sur lame

Sonde marquée au tritium (H^3): rayonnement très court, donne donc une localisation fine de la sonde émettant la radioactivité.

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