

**LES SONDES :** Petite séquence d'ADN ou d'ARN marquée (par un composé fluorescent, un radio-isotope ou une enzyme) que l'on utilise pour hybrider et détecter des séquences homologues, c'est-à-dire complémentaires<sup>1</sup>. L'hybridation peut avoir lieu aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et concerne des fragments de 15 nucléotides.

Les sondes doivent être spécifiques et sensibles. Elles ne s'associent qu'avec une séquence complémentaire et sont facilement repérables et quantifiables. Elles sont obtenues par :

- PCR : longueur de 10 Kb au maximum
- à partir de clones : 0,1 à quelques centaines Kb
- synthèse : oligonucléotide de 60 bases au maximum
- transcription (cas des sondes ARN) à partir d'ADN cloné dans un vecteur

**Exercice :** Comment déterminer la taille *L* d'une sonde qui soit unique dans un génome donné de taille *N*?

Une sonde dont la longueur *L* exprimée en nombre de bases sera unique dans un génome si  $4^L \geq 2 \times N$

La multiplication par un facteur égal à deux est due au caractère bicaténaire de l'ADN. Chez l'homme cette sonde aura une longueur de :

$$4^L \geq 2 \times (3,3 \times 10^9)$$

$$4^L \geq 6,6 \times 10^9$$

$$\log(4^L) \geq \log(6,6 \times 10^9)$$

$$L \times \log(4) \geq \log(6,6) + 9$$

$$L \geq [\log(6,6) + 9] / \log(4)$$

$L \geq 16,31$  d'où *L* aura la taille de 17 bases.

**Tableau N°5 :** Longueur minimum des sondes

Origine	Taille du génome	Taille de la sonde
Phage lambda	$4,6 \times 10^4$	9
<i>Escherichia coli</i>	$4,1 \times 10^6$	12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,7 \times 10^7$	13
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,3 \times 10^8$	14
<i>Homo sapiens</i>	$3,3 \times 10^9$	17

Les différents types de sondes sont :

- Les sondes ADN génomique
- Les sondes cDNA
- Les oligosondes
- Les ribosondes

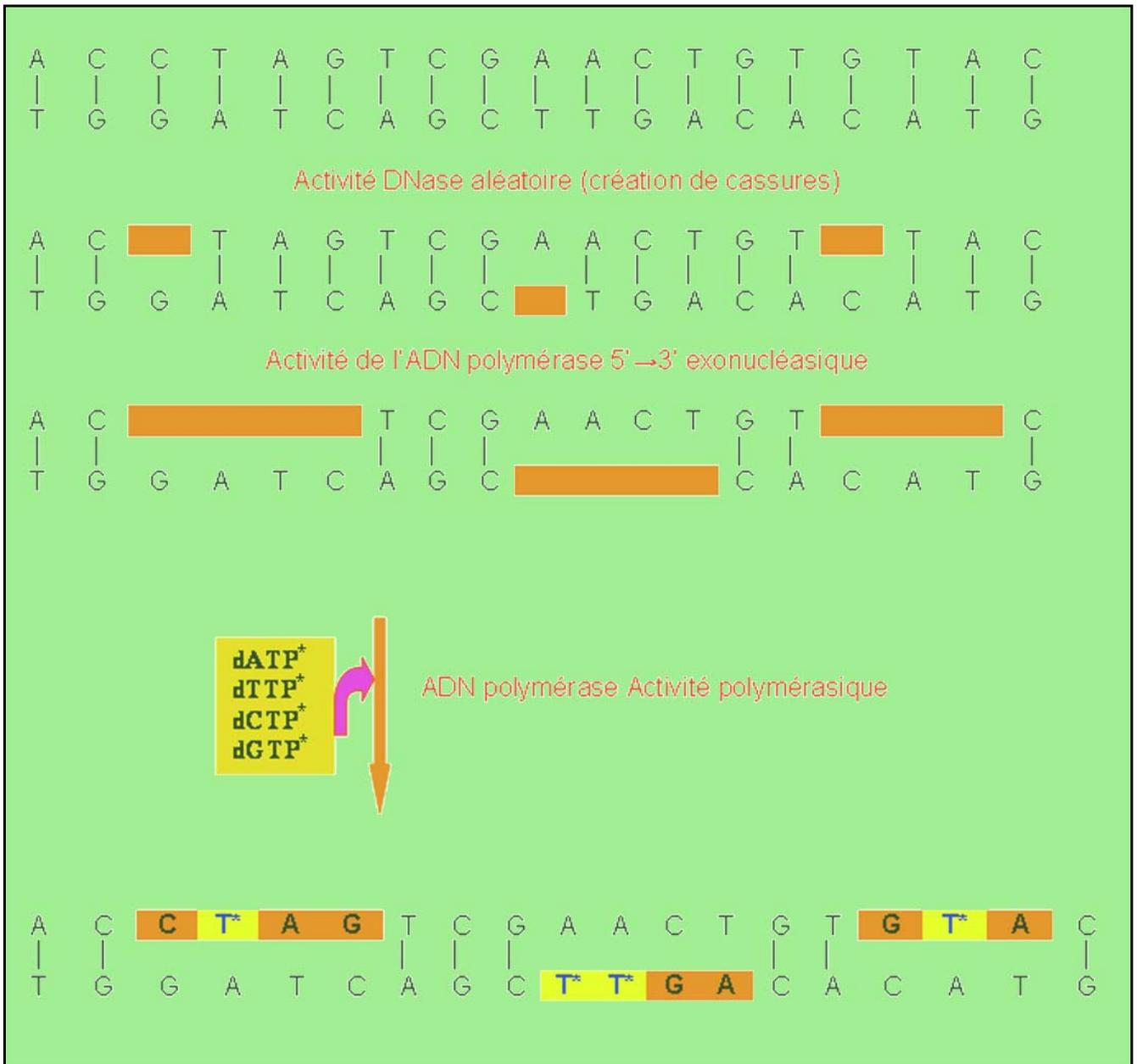
**4-1/ Le marquage des sondes :** Il existe en fait plusieurs stratégies pour marquer les sondes. On peut distinguer :

<sup>1</sup> <http://www.gnis-pedagogie.org/pages/classbio/glossaire.htm>

Nick translation  
Multi-amorçage au hasard  
Marquage des oligonucléotides

**4-2/ La Nick translation :** La DNase I coupe aléatoirement les brins de l'ADN bicaténaire. Les extrémités 3' ainsi libérées deviennent un site de fixation pour l'ADN polymérase I qui va :

1. Détruire l'ADN par son activité exonucléasique (dans le sens 5'→3')
2. Resynthétiser (activité polymérasique ) une nouvelle chaîne avec les nucléotides dont un au moins est radioactifs présents dans le milieu d'incubation enzymatique.



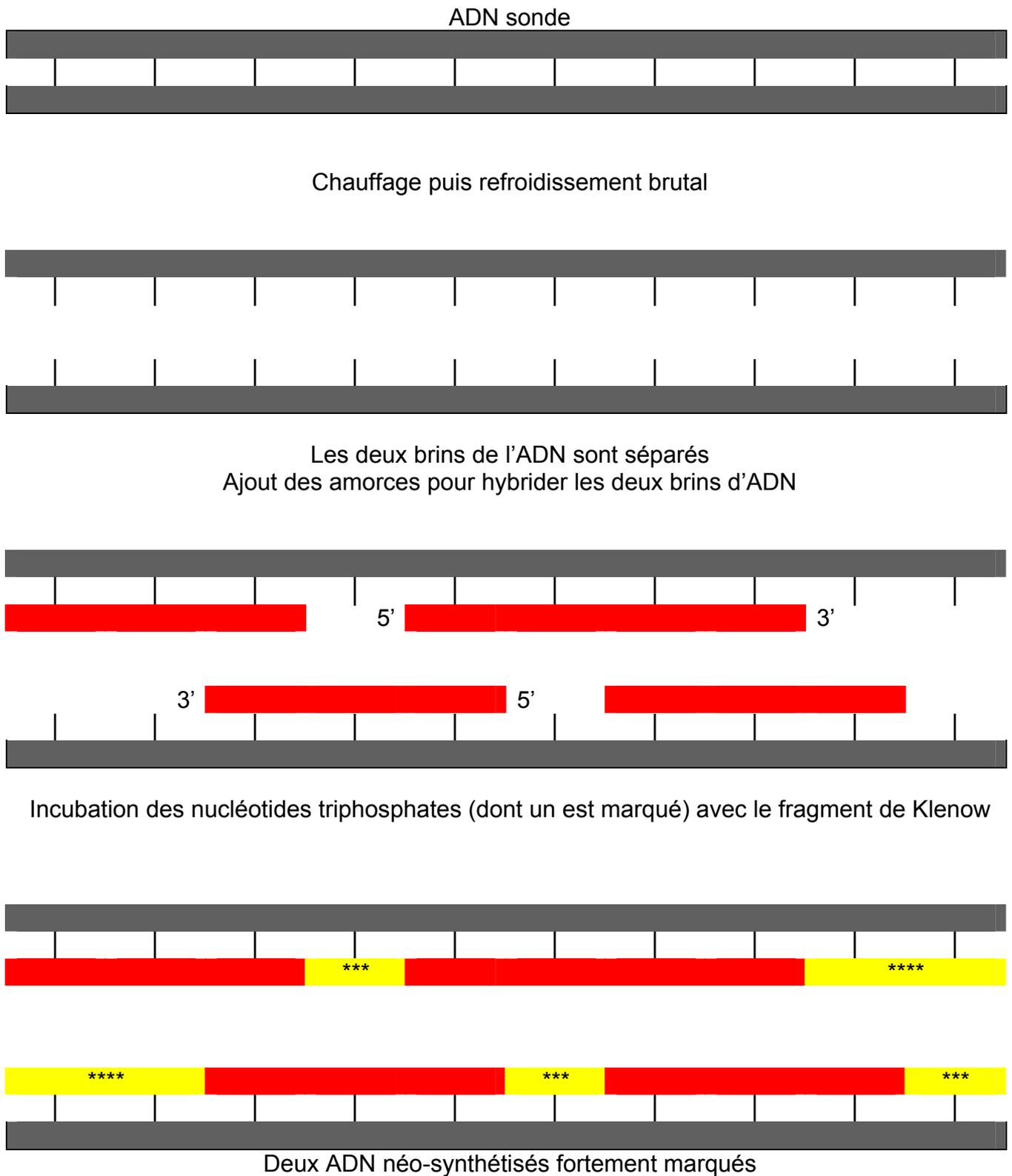
**Figure N°17 :** Principe de la nick-translation

#### 4-3/ Le multi-amorçage au hasard : multirandom priming.

L'ADN bicaténaire est dénaturé par chauffage à 100°C afin de séparer les deux brins, puis refroidi brutalement pour empêcher que les deux brins ne se réassocient.

Chacun des deux brins est hybridé à 25°C au hasard avec des petites amorces (6 nucléotides). Les séquences de ces hexanucléotides sont différentes. C'est une combinaison de 4 nucléotides parmi 6 positions différentes ; ce qui donne 1024 séquences possibles et il y aura certainement quelques hexanucléotides qui s'hybrideront avec les deux d'ADN.

L'enzyme ADN polymérase I, grâce à son fragment de Klenow, assure la synthèse des deux brins complémentaires dans le sens 5'→3' en utilisant les nucléotides triphosphates (ATP, CTP, TTP et GTP) dont un est marqué. Les brins d'ADN néo-synthétisés sont alors marqués :



**Figure N°18:** Principe de la technique de multi random priming