

## CHAPITRE IV: L'Hybridation Moléculaire

### I) Définitions:

#### 1. hybridation moléculaire:

Association de 2 simples brins d'ADN (ADNs) par formation de liaisons H entre ces deux brins. On distingue les hybrides:

- ADN-ADN = Homoduplex
- ADN-ARN = Hétéroduplex

#### 2. sondes nucléiques

Séquences d'acides nucléiques simple brin (d'au moins 15 nucléotides), complémentaire de la séquence d'ADN recherchée (ADN cible). pour les ARN, on parle de Ribosonde. La sonde n'a pas besoin d'être aussi longue que l'ADN cible.

### II) Marquage des sondes nucléiques:

#### 1. Les techniques de marquage:

Quelle que soit l'agent de marquage (radioactif ou non), les techniques de marquages sont les mêmes.

##### a) Nick-Translation ou « coupure-substitution »:

Fig p 32

- Digestion ménagée de l'ADNd à marquer par la DNase I: création de coupures aléatoires sur les 2 brins.
- Utilisation de l'enzyme de Kornberg:
  - fonction exonucléase 5'→3': destruction d'un certain nombre de nucléotides autour des points de cassure.
  - fonction ADN pol I: resynthétisation des segments détruits. Apport des 4 dNTP dont l'un est marqué.

##### b) Random-Priming ou « multiamorçage au hasard »:

Fig p 33

- Dénaturation de l'ADNd à marquer.
- Hybridation avec un mélange d'héxanucléotides synthétiques: il y a 4096 ( $4^6$ ) combinaisons possibles pour ces hexamères; certaines d'entre elles pourront s'hybrider à l'ADNs à marquer issu de la dénaturation et constituer des amorces pour la fonction ADN pol I du fragment de klenow.
- Extension des amorces par le fragment de Klenow avec les 4 dNTP dont l'un est marqué.

#### 2. les agents de marquage:

##### a) Isotopes radioactifs: qui permettront de constituer des sondes « chaudes »:

ex: le  $^{32}\text{P}$  est le plus utilisé pour le marquage des nucléotides. Il émet des rayonnements  $\beta$  qui vont impressionner des plaques photographiques lors de l'autoradiographie.

inconvénients:

- Ils représentent un danger pour l'utilisateur.
- Il faut des autorisations administratives pour les utiliser.
- La durée de vie des marqueurs est faible (période ou « demie-vie » de l'isotope utilisé)

b) Marqueurs non-radioactifs: qui constitueront les sondes « froides »:

La détection des sondes froides est basée sur une réaction enzymatique qui fera apparaître un produit coloré ou fluorescent ou bien une production de photons.

### III) Les principales techniques d'hybridation:

On distingue 2 types de techniques:

- techniques directes ou « in situ »: sans extraction de l'ADN
- techniques indirectes: nécessite l'extraction de l'ADN

#### 1. **Technique de Southern ou « Southern blot » ou « blotting »:**

C'est une technique indirecte mise au point en 1975. Elle permet de détecter une séquence d'ADN génomique dite unique (une seule copie ou un très petit nombre) parmi  $10^6$  fragments.

Fig 3 p 34

méthode:

- 1) Extraction de l'ADNd à analyser (génomique humain).
- 2) Digestion de cet ADNd par enzyme de restriction:  
→ on obtient environ  $10^6$  fragments d'ADNd.
- 3) Séparation des fragments par électrophorèse: on obtient une traînée fluo aux UV.
- 4) Traitement du gel d'agarose par la soude:  
→ dénaturation des fragments de restriction, on obtient de l'ADNs hybridable ultérieurement.
- 5) Transfert des fragments de restriction dénaturés sur une membrane d'hybridation:  
→ le transfert s'effectue par capillarité.
- 6) Fixation de l'ADNs sur la membrane d'hybridation: pour empêcher que les brins complémentaires s'unissent par liaison H.  
→ par cuisson sous vide à  $80^{\circ}\text{C}$  (membrane de nitrocellulose)  
→ par irradiation aux UV courts: 254nm (pour les membrane de nylon).
- 7) Préhybridation: On sature les sites de la membrane d'hybridation non-occupés par l'ADNs pour éviter qu'ils le soient par la sonde et que cela fausse la détection.  
→ on utilise de l'ADN hétérologue issue de sperme de saumon ou de hareng (génomique éloigné du génome humain).
- 8) Hybridation
- 9) Lavages: pour éliminer l'excès de sonde non-hybridée et déshybrider les mauvais appariements: « mismatch ».
- 10) détection de l'hybridation: selon le marqueur utilisé.

Le Southern est une technique longue et fastidieuse qui est la base de l'essor de la biologie moléculaire mais qui est souvent remplacée par la PCR.

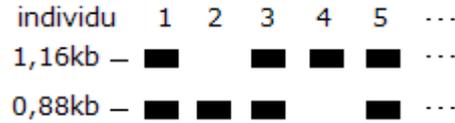
Cette technique est utilisée en génétique pour le polymorphisme de l'ADN: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

- RFLP di-allèle: basée sur la création ou la disparition d'un site de restriction dans un endroit donné du génome. Il existe un couple: Enzyme de restriction/sonde. Quand on a cloné une sonde, on la teste avec différentes enzymes de restriction.

Par exemple: avec une sonde p114.12 pour le diagnostic anténatal de l'hémophilie A.

- Mise en évidence d'un RFLP di-allélique: Avec une sonde spécifique du gène codant pour le facteur VIII (sonde p114.12) et l'enzyme de restriction Bcl I
  - 1) analyse de l'ADN extrait d'une centaine d'individus non-apparentés.
  - 2) digestion de l'ADN par l'enzyme Bcl I.
  - 3) Southern

On obtient un polymorphisme:



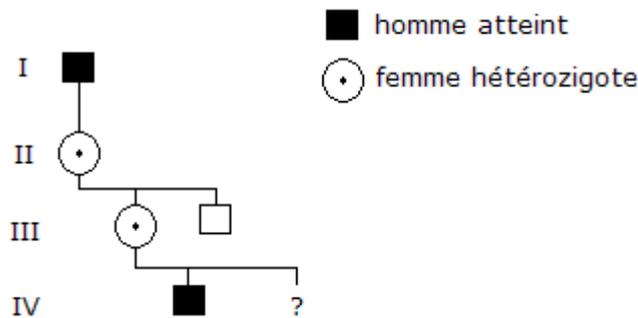
Certains individus ne présentent qu'un fragment de restriction d'une certaine longueur (2), d'autre un fragment d'une autre longueur (4) et d'autres encore plusieurs fragments (1,3,5).

Par exemple il existe un polymorphisme p114.12/Bcl I

On observe 2 allèles a et b correspondant respectivement aux fragments de 0,88kb et 1,16kb.

**Problème:** Une femme, déjà mère d'un garçon hémophile attend un second enfant; elle souhaite un diagnostic antenatal de l'hémophilie A.

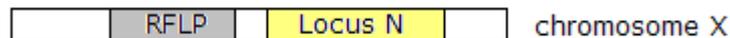
**Réponse:** On établit la généalogie suivante:



La mère est une « conductrice obligatoire », c'est à dire qu'elle est hétérozygote pour la maladie: soit  $X_N / X_n$  avec:

- N = allèle normal
- n = allèle délétère

Il faut savoir quel X est transmis: on utilise le RFLP étroitement lié au gène N:



La sonde ne peut se fixer que dans cette région

Analyse des ADN de la famille:

	mère	1er enfant (hémophile)	frère de la mère (sain)
1,16kb	■	■	
0,88kb	■		■
	↓	↓	↓
	hétéro	homo pour 1,16kb	homo pour 0,88kb

On peut en déduire que l'allèle délétère n est associé au fragment de 1,16kb (b) => maladie

Analyse de l'ADN de la mère: on a donc:

$X_{Na} / X_{nb}$  OU  $X_{Nb} / X_{Na}$

Analyse de l'ADN du frère sain:

$X_{Na} / Y$

Analyse du fils hémophile:

$X_{nb} / Y$

Le génotype de la mère est donc:  $X_{nb} / X_{Na}$

Analyse de l'ADN du fœtus: Prélèvement de trophoblaste duquel on extrait l'ADN foetal  
Après analyse chromosomique (caryotype) on déduit que c'est un garçon. Il y a donc un risque d'hémophilie (la mère peut lui avoir transmis le chromosome  $X_{nb}$ ).

ADN foetal:

	foetus
1,16kb	■
0,88kb	
	↓
	homo pour 1,16kb

La mère a transmis le chromosome  $X_{nb}$ .

## 2. Technique du Northern blot:

Elle est identique à la technique du Southern blot mais est effectuée avec de l'ARN.

## 3. Technique du « dot-blot » ou « slot-blot »:

L'ADN (ou ARN) extrait est déposé sur une membrane d'hybridation sans avoir été digéré.

→ On différencie deux techniques par la forme des dépôts:

- ● dot blot
- ■ slot blot

## 4. Hybridation in situ:

### a) Hybridation sur colonie:

Elle s'effectue sur colonie ou plages de lyse.

→ criblage de banque.

### b) Hybridation sur chromosome:

Elle s'effectue sur des chromosomes métamorphiques fixés sur lame.

→ Localisation des gènes (cartographie physique)

On utilise des sondes fluorescentes avec la technique de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).