

L'HYBRIDATION MOLECULAIRE

2-1/ 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 :

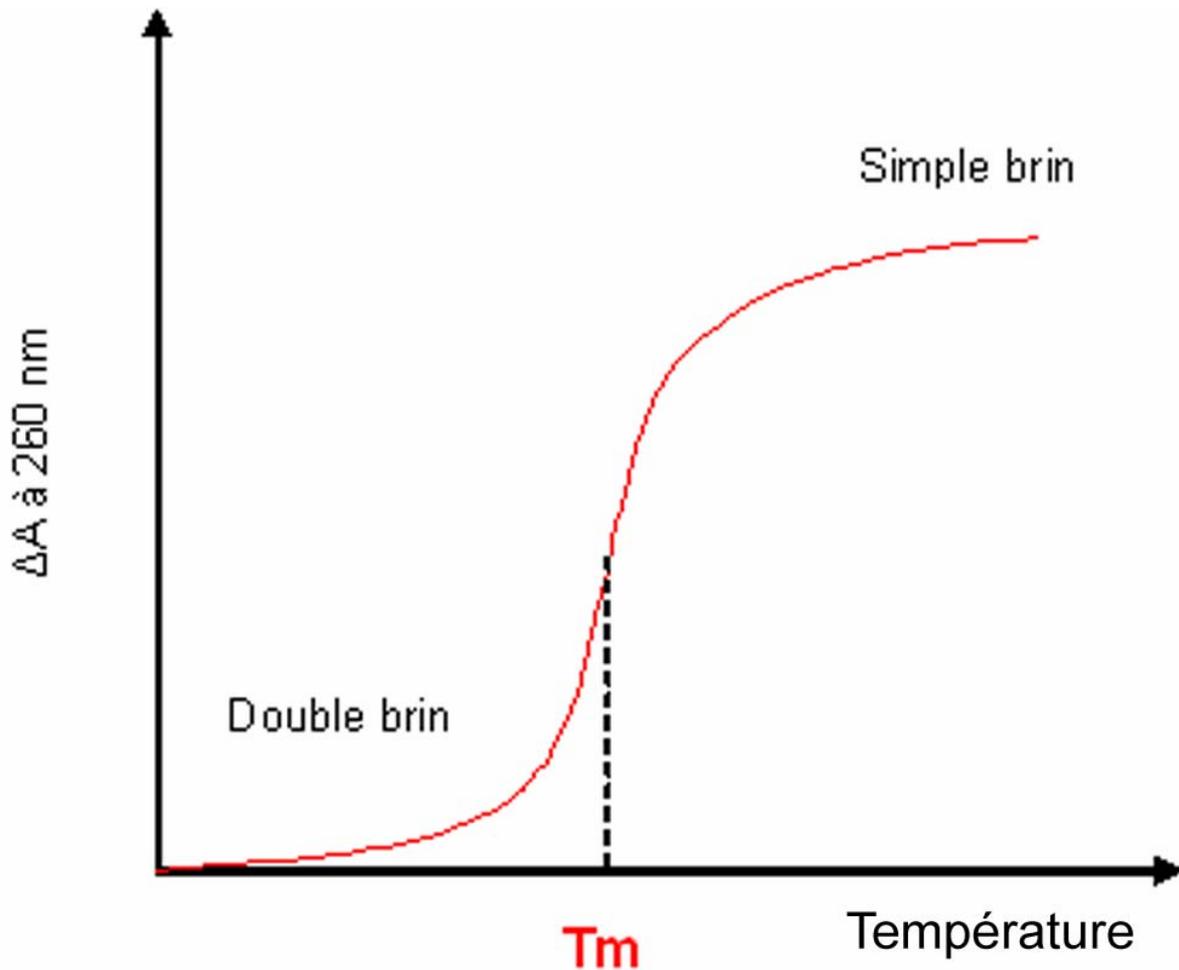


Figure N°4 : Mise en évidence du phénomène coopératif de passage de l'ADN double brin à l'ADN simple brin et mesure de la T_m.

Le résultat du passage de la forme bicaténaire à la forme monocaténaire de l'ADN est une augmentation du coefficient d'extinction de l'ADN : c'est l'effet hyperchrome. Les bases azotées qui absorbent à cette longueur d'onde sont très ordonnées dans la forme bicaténaire et chaque base n'est plus un centre absorbant isolé. Cependant, les bases azotées de l'ADN simple brin se masquent moins et n'ont plus de structure ordonnée (*quenching* minimal). Le coefficient d'extinction moléculaire est plus élevé.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la valeur de la T_m :

1. **la composition en bases** : la complémentarité des deux brins de l'ADN est maintenue grâce à l'appariement entre G et 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 T_m . De manière générale, on note que la relation entre la composition en G+C et la T_m mets 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, AA, ou TT et ajouter 1°C par motif GG, GC ou CC.
2. **les mésappariements** : De manière générale, l'abaissement de la T_m est de 1°C pour une valeur de 1% de mésappariement (mismatch : voir notions d'alignement global de bioinformatique).
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 T_m . Par contre, aux faibles concentrations, la T_m 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 T_m lors des hybridations. Dans ce cas, la T_m est estimée selon la formule suivante (pour 100 pb) : **$\Delta T_m = -0,6 \times (\% \text{ formamide})$** .
4. **la longueur des fragments des ADN** : La T_m 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 3: 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^+

2-2/ L'hybridation : Si la séparation des brins de l'ADN est suivie d'un refroidissement progressif et lent, il y aura réassociation progressive des deux brins complémentaires de l'ADN (*Il s'agit de la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci lui est complémentaire*): c'est le phénomène de **l'hybridation**. Cette réassociation peut s'effectuer entre des séquences d'ADN et d'ARN ce qui permet d'obtenir des hybrides **ADN/ARN** plus stables. La séparation des produits de l'hybridation (ADN simple brin, ADN double brin et hybride ADN/ARN) se fait par centrifugation dans un gradient de concentration de chlorure de Césium.

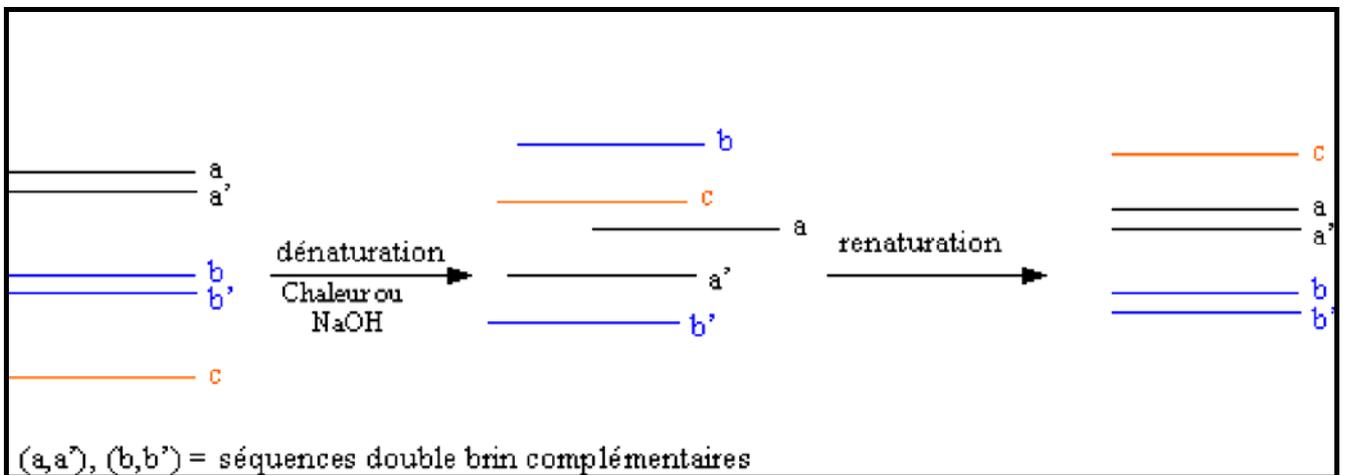


Figure N°5 : Principe de l'hybridation

Plusieurs facteurs peuvent influencer le phénomène d'hybridation, à savoir :

- **Concentration de l'ADN et temps : notion de CoT et de RoT.** 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** :

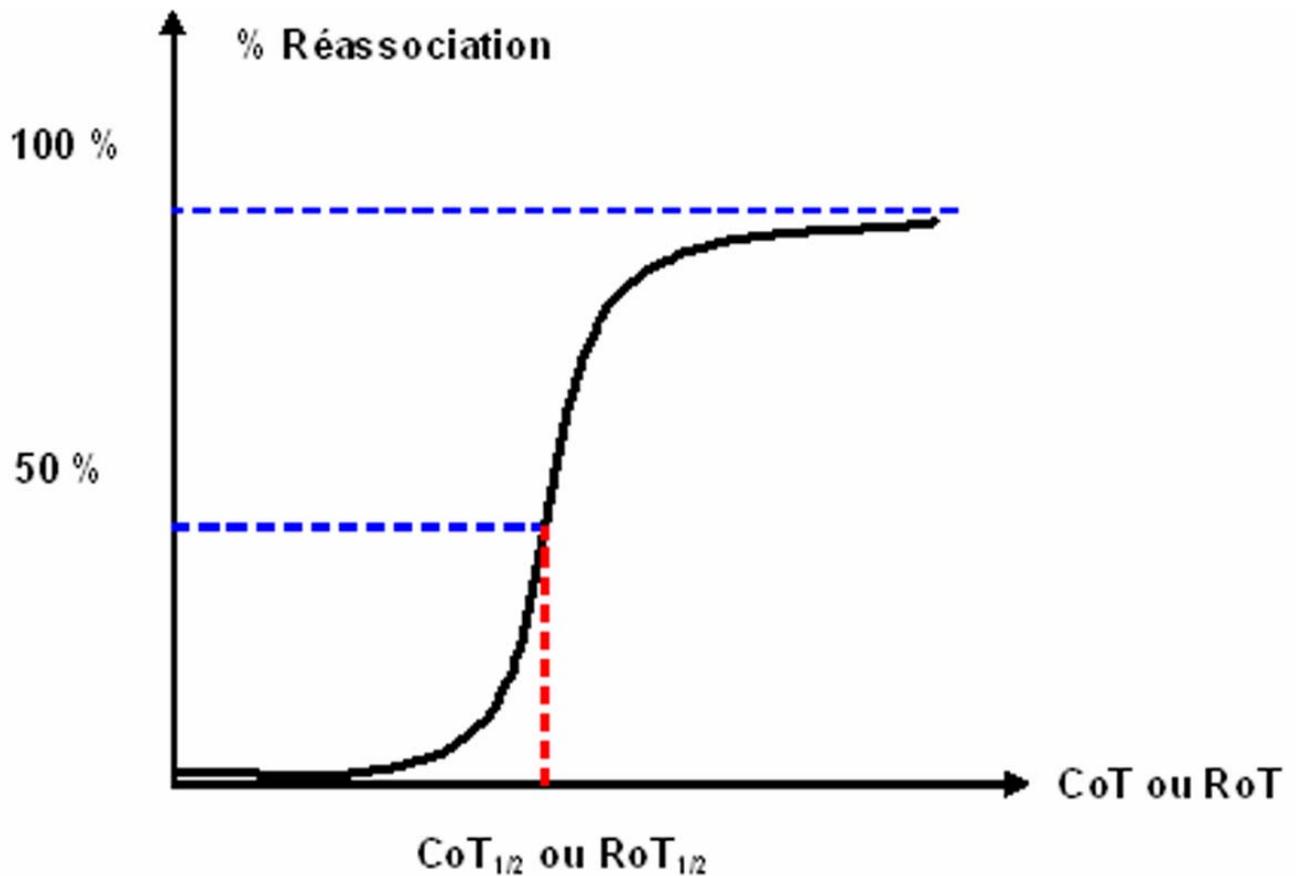


Figure N°6 : Courbe de détermination du Cot et du Rot

- **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 T_m 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. An revanche, si l'ARN est en large excès, la vitesse de réassociation sera identique à celle de ADN/ADN.
- **La force ionique :** la concentration en NaCl joue un rôle important dans les réassociations des segments complémentaires. Pour une concentration de NaCl 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.

2-3/ Les différents types d'hybridation :

2-3-1/ Hybridation en phase liquide : Les segments complémentaires sont placés dans une solution contenant un tampon et de la formamide. L'agitation thermique assure la liaison entre les fragments complémentaires. Cette température est généralement inférieure

de 15°C à la Tm de l'ADN concerné. Les hybrides formés sont quantifiés selon trois méthodes :

1. les méthodes spectrophotométriques (la diminution en DO à 260nm est due à l'augmentation du taux des hybrides)
2. la technique de la nucléase S1 (digestion des ADN et ARN simples brins)
3. La chromatographie sur hydroxylapatite (Seuls les doubles brins se fixent en raison d'une forte concentration en sels).

2-3-2/ Hybridation sur support solide : La séquence complémentaire cible est fixée (immobilisée) sur un support solide. Cette méthode facilite la séparation des fractions hybridées de celles non hybridées. Cependant, la vitesse d'hybridation est nettement inférieure à celle de la phase liquide (jusqu'à 10 fois).

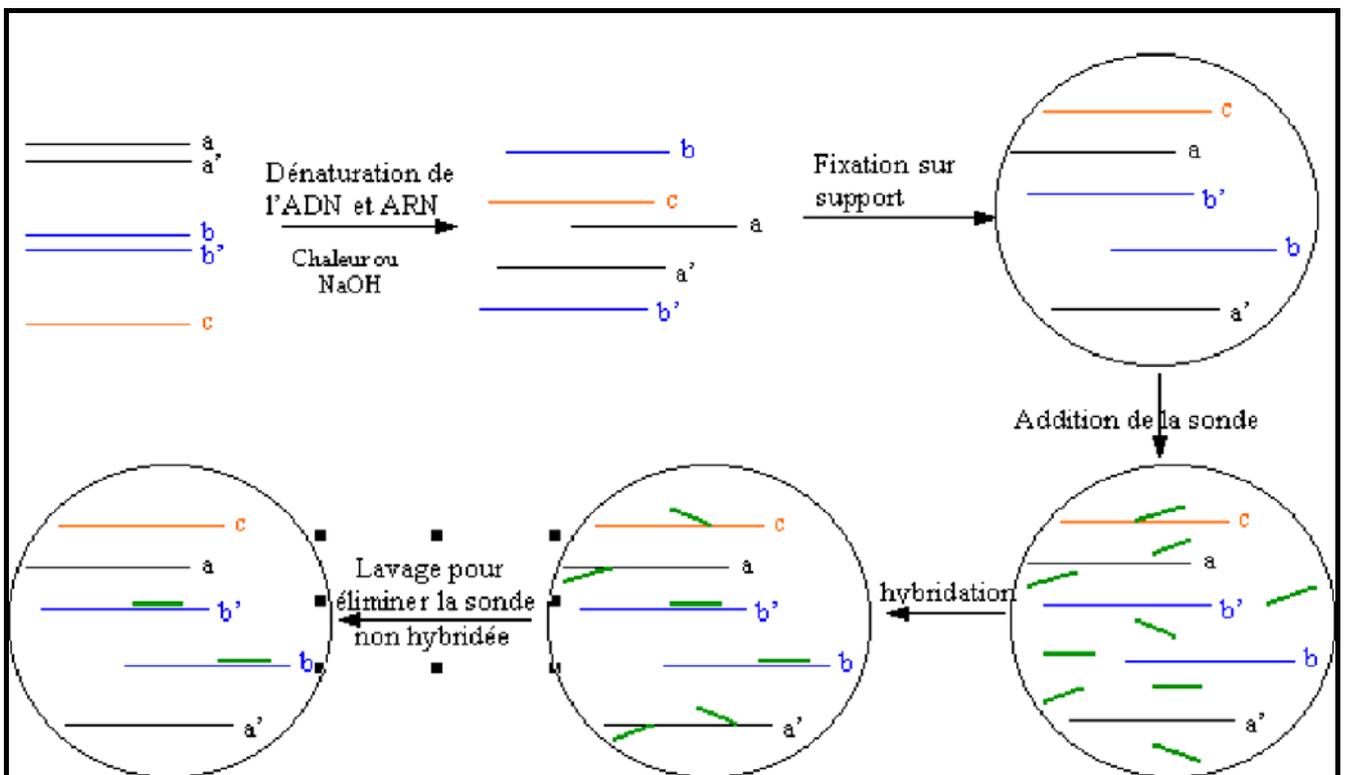


Figure N°7 : Hybridation sur support

L'hybridation sur support s'effectue avec plusieurs types de supports qui permettent d'immobiliser les brins d'acides nucléiques :

- **La nitrocellulose :** représente le premier support d'immobilisation ayant été utilisé pour la fixation des acides nucléiques. Ce support, requiert une forte concentration ionique, ce qui permet de créer des liaisons irréversibles sous vide et à 80°C.
- **Les membranes synthétiques (à base de nylon) :** De même, elles nécessitent des forces ioniques fortes. Ces membranes permettent des liaisons plus stables que celles obtenues avec la nitrocellulose à cause de leur traitement par les rayons UV courts (254 nm). Ce type de liaison, va permettre plusieurs déhybridations et réhybridations.

2-3-3/ Hybridation *in situ* (HIS): C'est une technique qui permet, par l'utilisation de sondes, de mettre en évidence et de repérer, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques connues. Elle est très proche, dans son principe, du Southern et du Northern Blot et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. A la seule différence que les Southern et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu.

Au laboratoire, les principales applications de l'HIS sont la localisation des gènes sur des chromosomes en métaphase et la recherche de bactéries qui ont intégré un plasmide ou un phage recombinant.

Plusieurs sondes peuvent être utilisées pour réaliser une HIS : l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides). En fonction du marquage de la sonde on distingue :

Tableau N°2 : Exemples de marquage des sondes

	Marquage	Révélation
sondes chaudes	Isotopes radio-actifs (tritium H ³ , P ³² , P ³³ ou S ³⁵)	Autoradiographie
Sondes froides	Produits fluorescents (FISH : Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization) : Le FISH est une technique de <u>cytogénétique</u> permettant de voir des éléments à l'intérieur de la cellule.	Microscopie à fluorescence
	Haptènes: biotine dioxygénine	Avidine et streptavidine Anticorps marqués par un enzyme
	Enzymes (phosphatase alcaline) :	Anticorps ou chromogènes

La présente figure explique le principe d'hybridation par le FISH (http://fr.wikipedia.org/wiki/Hybridation_fluorescente_in-situ) :

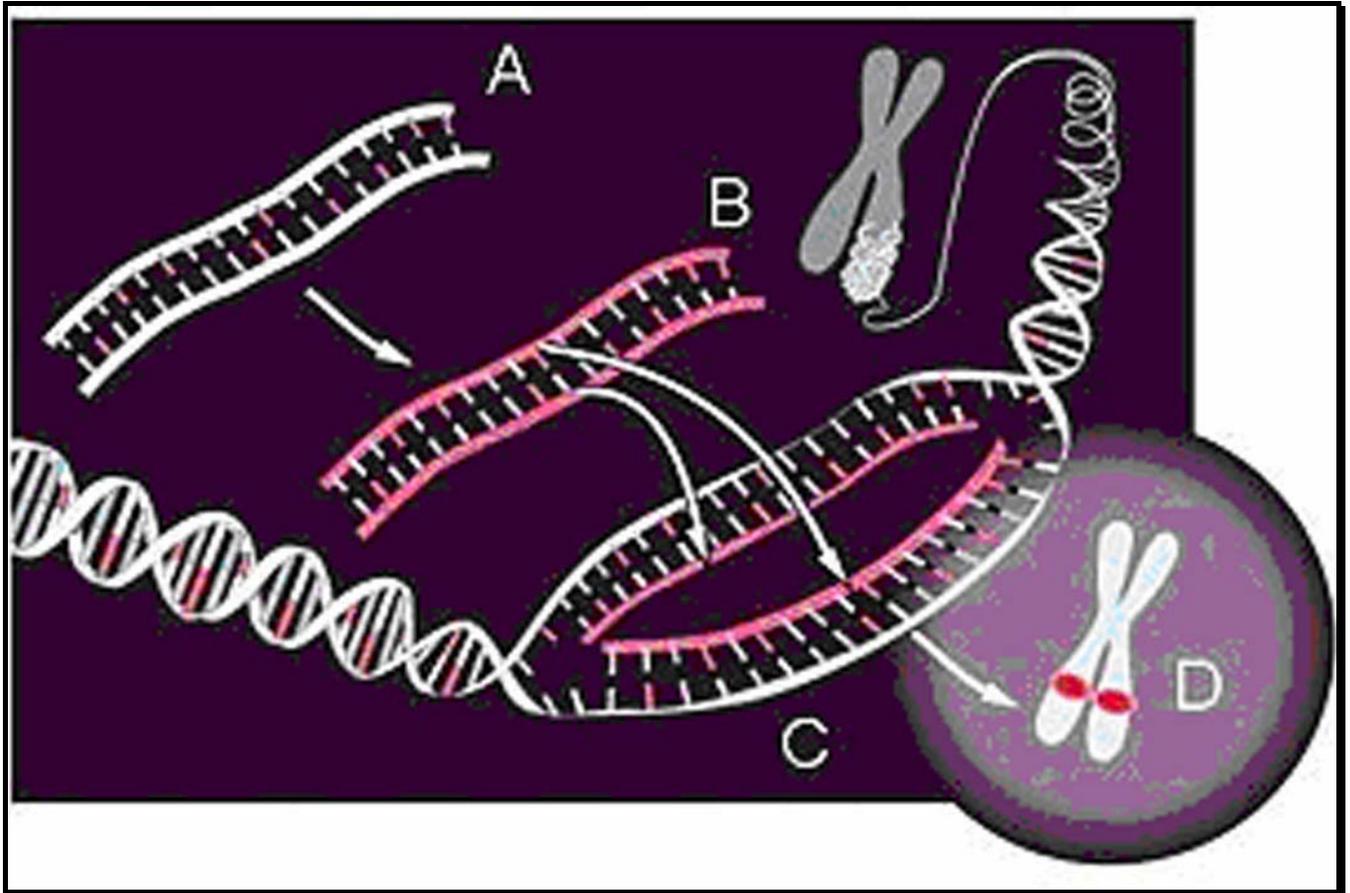


Figure N°8 : Technique de l'hybridation fluorescente *in situ*. En **A** : sonde. **B** : sonde colorée à l'aide d'un **fluorochrome**. **C**: hybridation avec l'ADN nucléaire. **D**: apparence du chromosome métaphasique où la sonde s'est fixée.