

III.1. Marquage des acides nucléiques

III.1.1. Sondes nucléiques

Les sondes nucléiques sont des molécules d'ADN ou d'ARN utilisées pour détecter une séquence spécifique (d'un génome ou d'une banque). Pour servir de système de détection, les sondes doivent être complémentaires et antiparallèles à la séquence recherchée, elles doivent être aussi marquées, le plus souvent par l'ajout des molécules radioactives. En pratique la taille des sondes varie de quelques dizaines de nucléotides à quelques kb. Elles sont entre autres utiles pour détecter un fragment d'ADN ou d'ARN sur une membrane ou une expérience de retardement sur gel. Une sonde peut aussi être utilisée comme substrat dans une réaction de séquençage, dans ce cas, le terme « amorce » est plus approprié que « sonde ». Dans tous les cas, il est nécessaire de connaître la séquence d'une sonde, puisqu'elle permet de diriger l'analyse vers une molécule précise. Il existe plusieurs possibilités pour obtenir une sonde nucléotidique:

- Une sonde oligonucléotidique peut être fabriquée par synthèse chimique, si la séquence de l'ADN à repérer est connue. Si elle est inconnue, on peut étudier la protéine correspondante et remonter grâce au code génétique à la séquence d'ADN. Dans ce dernier cas, le travail est particulièrement laborieux (nombre de codons élevé pour un même acide aminé).
- Une sonde peut être un ADNc. Une partie seulement de l'ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).

III.1.2. Différentes techniques de marquage des acides nucléiques

L'hybridation des acides nucléiques est un outil fondamental en biologie moléculaire pour détecter une séquence d'ADN d'intérêt. Elle est très fréquemment utilisée soit lors de criblage de banque d'ADNc ou génomique, soit lors d'études de l'organisation de régions spécifiques du génome (par *Southern blot*), soit lors de l'analyse de l'accumulation des transcrits dans les cellules. Le succès de ces techniques dépend de la possibilité d'obtenir des sondes d'ADN marquées à l'aide de nucléotides radioactifs ou modifiés chimiquement. Les techniques de marquage permettent d'obtenir des sondes marquées soit uniformément (marquage interne) soit à leur extrémités (marquage aux extrémités).

III.1.2.1. Marquage chaud (radioactivité)

Le marquage des sondes peut être réalisé par plusieurs isotopes radioactifs (tableau 02), dont leur choix dépendra principalement de l'utilisation de la sonde. Malgré que le soufre n'est pas présent dans les acides nucléiques mais comme il est proche chimiquement de l'oxygène des analogues soufrés des nucléotides dans lesquels un oxygène est remplacé par un soufre sont synthétisés.

Tableau 02 : Isotopes radioactifs utilisés pour le marquage des acides nucléiques

Isotope	Demi-vie	Energie
^{32}P β^-	14,3 jours	1.7 MeV
^{35}S , β^-	87.2 jours	0.17 MeV
^{14}C , β^-	5700 ans	0.16 MeV
^3H , β^-	12.3 ans	0.02 MeV

L'intensité du rayonnement dépend de la méthode de détection (rayonnement fort pour une détection sur un filtre, et un rayonnement moins énergétique pour une détection en microscopie). La détection des radioisotopes radioactifs peut se faire de plusieurs manières : par un compteur à scintillation, par radioautographie (film sensible ou émulsion), par un scanner spécial ou le phosphoimager.

✓ Marquage interne

○ Marquage par translation de coupure (*Nick-translation*)

Le marquage interne résulte d'une polymérisation *in vitro* de l'ADN en présence de nucléotides marqués. Cette polymérisation repose sur la complémentarité des deux brins d'ADN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I isolée d'*Escherichia coli* 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 5'exonucléasique qui élimine des nucléotides du côté 5'-P de la coupure. Ces deux actions conjuguées provoquent 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 (Fig.08). Si l'on utilise des nucléotides marqués au ^{32}P à haute radioactivité spécifique, on obtient des molécules d'ADN bicaténaires dont certaines portions sont fortement marquées (de l'ordre de 10^7 cpm/ μg).

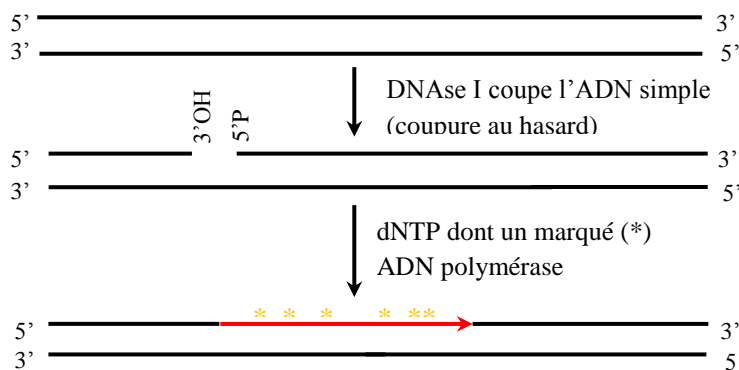


Fig.08 : Marquage d'ADN par translation de coupure (*Nick translation*)

- **Marquage par amorçage aléatoire (*Random-priming*)**

Un mélange d'héxanucléotides de séquences aléatoires est utilisé comme source d'amorces pour la synthèse in vitro d'ADN à partir d'une molécule d'ADN double brin préalablement dénaturée (les deux brins sont séparés par la chaleur). Si le mélange d'héxanucléotides est suffisamment hétérogène, il se forme des hybrides sur n'importe quelle séquence de l'ADN matrice rendu monocaténaire. Ces structures hybrides bicaténaires servent de point d'ancrage à une ADN polymérase le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*) qui copie le brin complémentaire. L'utilisation de nucléotides marqués permettra la synthèse d'une molécule spécifique d'ADN radioactive (Fig.09). Les sondes obtenues ont une radioactivité spécifique très élevée de l'ordre de 10^8 cpm/ μ g.

- ✓ **Marquage externe (aux extrémités)**

Ce type de marquage est utilisé par exemple pour de petites molécules de quelques dizaines de nucléotides, comme un oligonucléotide. Cette technique est également utile lorsque l'on désire une polarité du marquage comme pour les empreintes à la DNase I (Fig.10). La limite de ce marquage est l'introduction d'un seul atome marqué par molécule d'ADN, d'où une activité spécifique assez faible. Deux enzymes différentes permettent de réaliser le marquage de chacune des extrémités.

- **La polynucléotide kinase du bactériophage T4** : qui catalyse le transfert du phosphate radioactif du γ - ^{32}P ATP (ATP marqué au ^{32}P sur le troisième phosphate) sur l'extrémité 5'-P d'un fragment d'ADN. Cette technique est notamment appliquée pour obtenir des oligonucléotides marqués qui seront utilisés comme sonde pour le criblage de banques.
- **La transférase terminale** : comme cette enzyme est capable d'ajouter un didésoxynucléotide (nucléotide modifié chimiquement) marqué en 3'-OH d'un fragment d'ADN. La séquence de la molécule marquée ainsi obtenue est donc allongée d'un analogue de nucléotide à chacune de ses extrémités.

Il est important de signaler que les sondes radioactives et malgré qu'elles présentent une sensibilité importante plus élevée que les sondes froides, présentent de nombreux inconvénients : nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, un maniement des sondes inconfortable décroissance rapide du ^{32}P , d'où besoin de marquer les sondes fréquemment. Pour pallier à ces problèmes, on peut avoir recours aux sondes froides.

III.1.2.2. Marquage froid

De plus en plus, les nucléotides radioactifs sont remplacés par des nucléotides marqués à l'aide de molécules non radioactives (d'où le terme sondes froides, par opposition aux sondes chaudes). Différents types de marquage existent, avec parfois une sensibilité de détection supérieur même à celle

des sondes radioactives. Les **principes** de marquage **sont les mêmes** que ceux décrits dans les paragraphes précédents, seuls les techniques de détection diffèrent d'un type de marquage froid à l'autre.

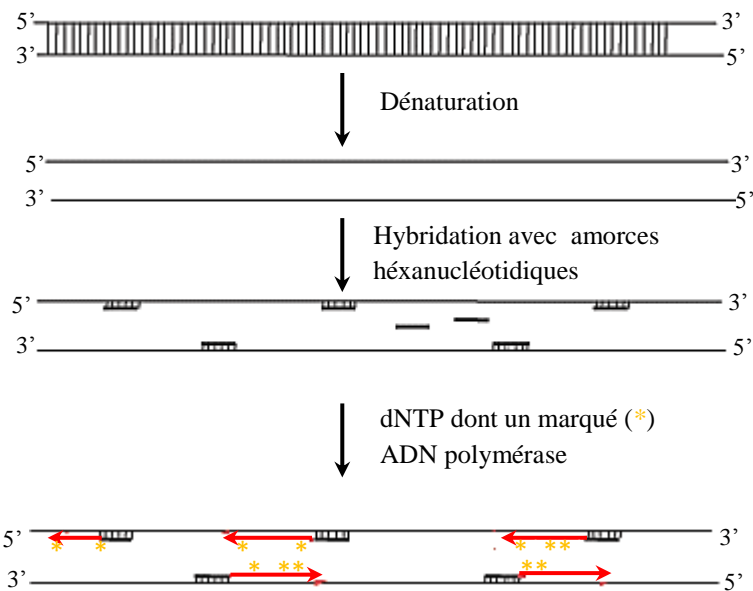


Fig.09 : Marquage d'ADN par amorçage aléatoire (*random priming*)

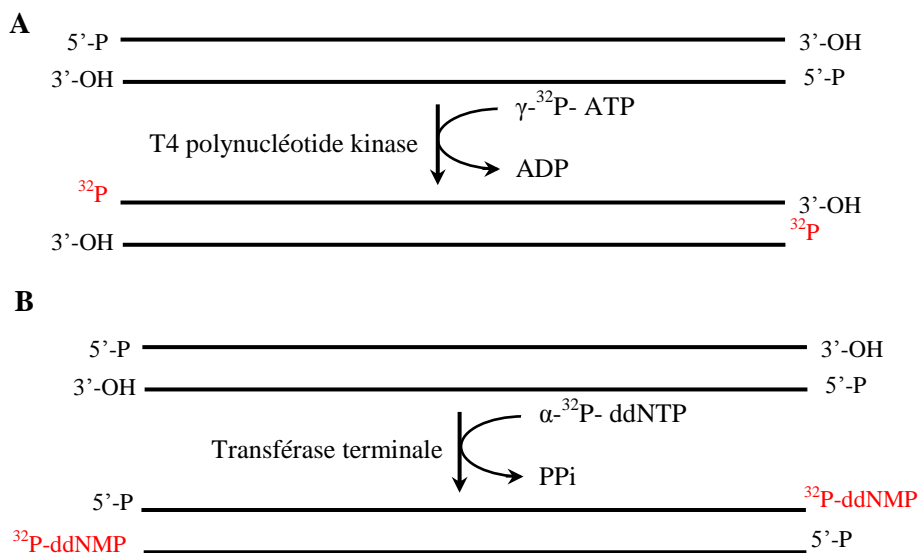


Fig.10 : Marquage d'ADN aux extrémités. **A :** Marquage de l'extrémité 5', **B :** Marquage de l'extrémité 3'.

✓ Marquage indirect

Les deux types de marquage froid les plus fréquentes sont les marquages à la biotine et à la digoxigénine (Fig.11). L'utilisation de ces composés est commencée au début des années 80, dont le radical libre des nucléotides (le plus souvent l'uridine triphosphate-dUTP) est substitué par la biotine ou la digoxigénine attachée au bout d'une chaîne carbonée de longueur variable selon le fabricant. Les sondes se révèlent grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes, qui sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière après excitation.

- **La biotine** La biotine qui correspond à la vitamine B8 ou appelée encore la vitamine H est une coenzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B9 et B12. D'un point de vue biologique, on la retrouve dans toutes les espèces vivantes. La biotine est utilisée en biologie moléculaire et biochimie expérimentale du fait de son affinité très élevée pour la streptavidine ainsi que pour l'avidine (Fig.04). Cette dernière est une protéine du blanc d'œuf, elle comporte 4 sites de liaison pour la biotine. Elle est généralement produite par génie génétique dans *Streptomyces avidinii*, sous une forme non glycosylée et prend alors le nom de streptavidine. La streptavidine ou les anticorps n'ont pas d'activité enzymatique propre, on utilise des protéines de fusion pour les détecter. L'anticorps ou la streptavidine sont couplés avec une protéine ayant une activité enzymatique facilement détectable comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase.
- **Digoxigénine (DIG)** : La taille relativement petite de ce stéroïde naturel et la facilité avec laquelle il peut être lié à des molécules biologiques, ainsi que la disponibilité d'anticorps ciblant cette molécule en font un outil utile en biologie moléculaire. Dans ce cas la digoxigénine est conjuguée à un nucléotide, le plus souvent au dUTP, qui peut être incorporée par les ARN et ADN polymérases lors de la synthèse *in vitro* de brins complémentaires (dans le cas d'ADN polymérases, le DIG-UTP s'incorpore à la place de la thymidine). La DIG conjuguée aux acides nucléiques ou à des glucides (permettant par la suite son incorporation dans les glycoprotéines) peuvent alors être détectées à l'aide d'anticorps antidigoxigénine (Fig.12).

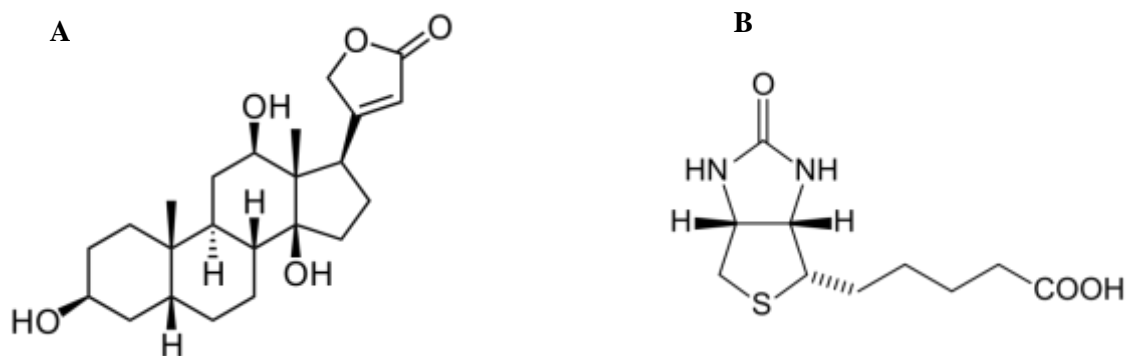


Fig.11. Structure chimique de A : La digoxigénine (DIG), B : La biotine.

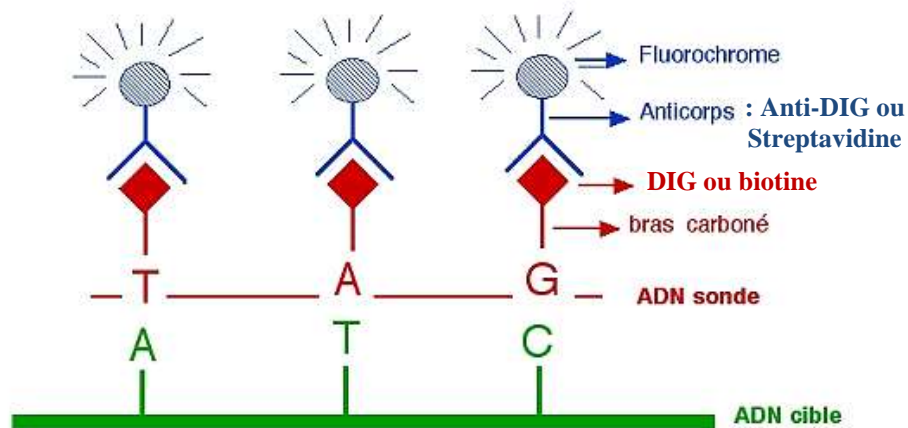


Fig.12 : Marquage indirect d'ADN.

✓ Marquage direct (Fluorescent)

Aujourd'hui, les fluorochromes sont **directement** fixés sur les nucléotides (sans anticorps). Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Différentes techniques sont utilisées pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le *Random-priming* et la *Nick-translation* (déjà citées dans la radioactivité). Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- Le DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole (310 nm – 372 nm), se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- Le FITC : Fluorescein isothiocyanate (exc 495 nm – λ_{em} 519 nm), fluoresce dans le vert.
- La Cy3 : Cyanine 3 (λ_{exc} 495 nm – λ_{em} 519 nm), fluoresce dans l'orange.
- Le Texas red (λ_{exc} 589 nm – λ_{em} 615 nm), fluoresce dans le rouge.
- La Cy5 : Cyanine 5 (λ_{exc} 650 nm – λ_{em} 670 nm), fluoresce dans le rouge.

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation. En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifuorescence. Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère

III.2. Hybridation moléculaire

Toutes les méthodes de biologie moléculaire reposent au départ sur le principe de l'hybridation moléculaire. 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** et **antiparallèle**. L'hybridation moléculaire est permise par les liaisons hydrogènes que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques constituant l'ADN ($A=T$, $C \equiv G$).

III.2.1. Facteurs influençant l'hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire sonde-fragment d'ADN à repérer nécessite des conditions physicochimiques parfaites (tampon, pH, température, force ionique etc.). Ces conditions sont appelées la **stringence**. Plusieurs facteurs peuvent également intervenir comme la longueur de la sonde et la complémentarité sonde-fragment avec possibilité de mauvais appariements. Le paramètre déterminant dans la spécificité et la réversibilité de l'hybridation moléculaire est la température de fusion (T_m : *melting temperature*). Le T_m se définit par la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin (Fig.13). Le passage d'une forme à l'autre est brutal du fait du caractère coopératif de la réaction, que ce soit dans un sens ou dans l'autre. Ce passage se visualise clairement si on mesure la densité optique « DO » à 260 nm (UV) car l'ADN simple brin absorbe plus les UV que l'ADN double brin. Le T_m dépend de nombreux facteurs tels que la longueur du fragment d'ADN considéré, sa richesse en cytosines et guanines et la concentration en ion Na dans le milieu réactionnel. En pratique, l'expérimentateur peut gérer l'hybridation moléculaire en choisissant une température du milieu réactionnel inférieure, égale ou supérieure au T_m . Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température. Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide

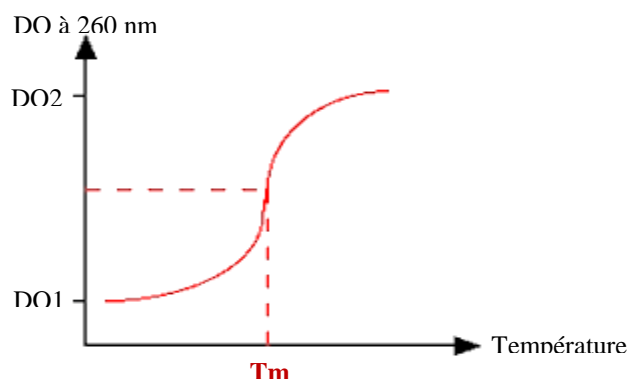


Fig.13: Présentation de la T_m .

- Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nucléotides, on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

- Si l'oligonucléotide a une longueur supérieure à 20 nucléotides, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au-delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$, et la formule sera la suivante :

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = [(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20])$$

- Pour être plus précis, il faut tenir compte aussi de la concentration en sodium du tampon d'hybridation. Lorsque cette concentration n'excède pas 1M, on utilise la formule :

$$T_m = 81.5 + 16.6(\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41[(G+C)/N] - (600/N)$$

III.2.2. Techniques d'hybridation moléculaire

III.2.2.1. Hybridation sur support : *Southern blot*

Le *Southern blot* est une technique permettant, après une phase de séparation sur gel, de visualiser spécifiquement des fragments d'ADN (ou **loci ciblés**). Cette technique a été mise au point par Edwin M. Southern en 1975 qui a combiné l'électrophorèse, le transfert et l'hybridation avec une **sonde marquée** pour permettre une détection spécifique d'ADN cible. Le *Southern blot* (*blot* : tache en français) est utilisé pour la détection de polymorphisme au niveau des sites de restriction (**RFLP** : *Restriction Fragment Length Polymorphism*) et l'hybridation *in situ* (sur colonies ou sur tissu). Les différentes étapes d'hybridation sur un support selon Southern sont détaillées ci-dessous et présentées dans la figure 14.

1. Après l'extraction de génome total, l'ADN est digéré par les enzymes de restriction.
2. Les fragments d'ADN résultant de la digestion enzymatique sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose afin d'obtenir une séparation en fonction de leur taille (à la fin de la migration, on n'observe pas sur le gel des bandes séparées mais une trainée d'ADN due aux fragments de taille très proche les uns des autres).
3. Le gel d'électrophorèse est immergé dans une solution alcaline (contenant habituellement de l'hydroxyde de sodium) permettant la dénaturation de l'ADN bicaténaire en ADN simple brin, pour qu'il soit accessible à l'appariement avec la sonde.
4. l'empreinte du gel est réalisée par transfert et fixation des fragments d'ADN sur une membrane (filtre) de nitrocellulose ou de nylon. Une pression est appliquée sur le gel en plaçant une pile de serviette de papier absorbant et par un poids sur la membrane et le gel. Ceci va permettre le

passage de l'ADN contenu dans le gel sur la membrane par capillarité grâce à une solution saline, ce qui conduit à la fixation de l'ADN sur la membrane.

5. La membrane est alors chauffée (80°C), dans le cas de nitrocellulose, ou exposée au rayonnement ultra-violet s'il s'agit de nylon, afin de fixer de manière permanente l'ADN sur la membrane (formation des liaisons covalentes entre l'ADN et la membrane). Une étape de pré-hybridation ensuite est réalisée permettant de traiter les sites laissés libres, ils seront saturés par une solution contenant une protéine (solution de blocage) telle que le sérum d'albumine et/ou à l'aide d'un détergent comme le laurylsulfate de sodium.
6. La membrane est ensuite mise en contact avec une sonde spécifique marquée complémentaire de l'ADN cible (l'hybridation est réalisée en milieu liquide sous agitation).
7. Après hybridation, la membrane est lavée pour éliminer la sonde en excès non appariée.
8. Une phase de visualisation (révélation) de l'hybridation aura lieu soit par autoradiographie, dans le cas d'une sonde radioactive ou par développement d'un film photographique impressionné après réaction de chimioluminescence (sonde fluorescente). La sonde va révéler la position sur la membrane des fragments d'ADN recherchés.

III.2.2.2. Hybridation *in situ* (HIS)

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des 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. Mais les Southern et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin), un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

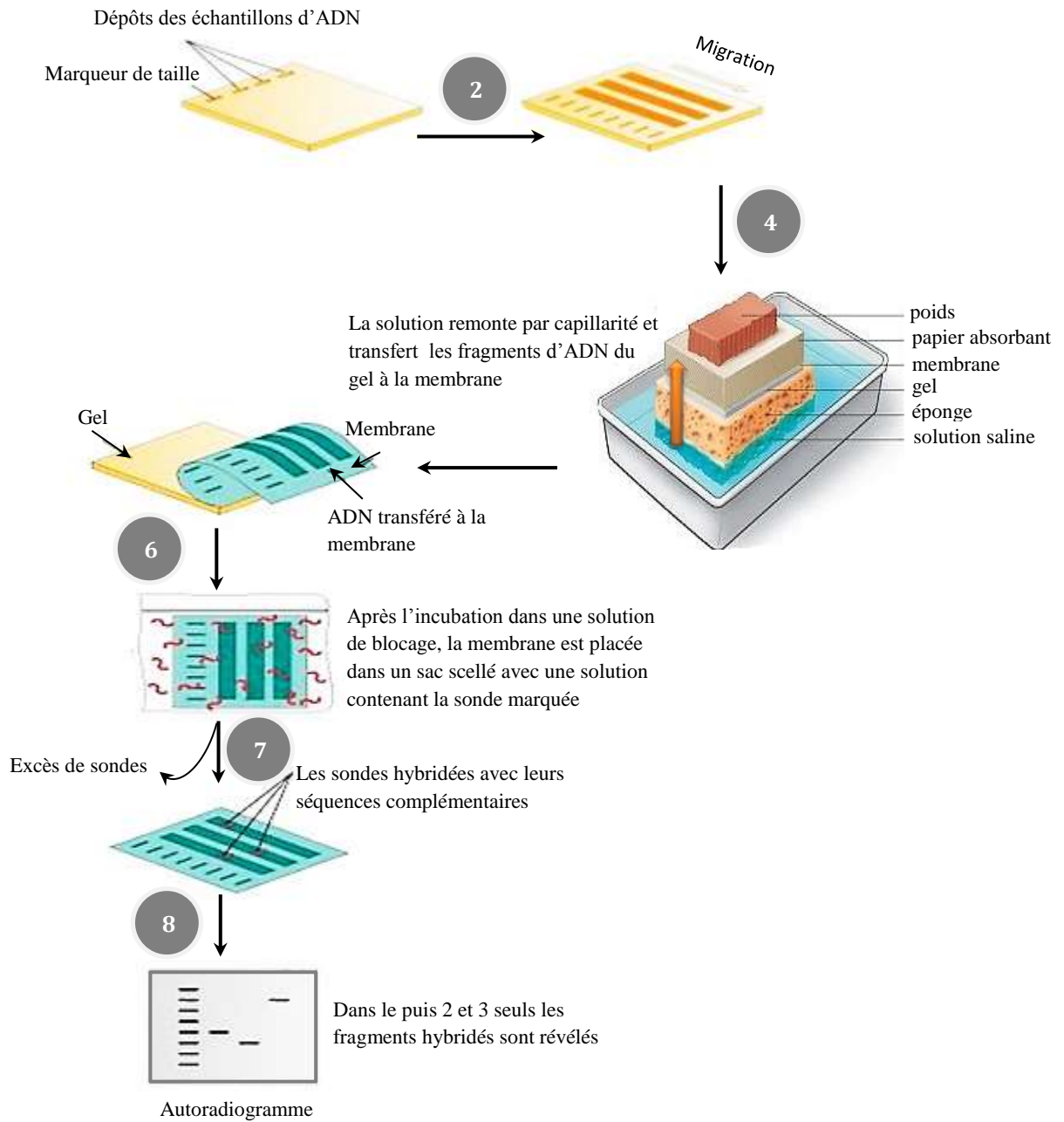


Fig.14: Hybridation moléculaire sur support par la technique de *Southern blot*.