

## Hybridation Moléculaire

### 1. Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs en plus de la composition en bases, longueur des duplex, complexité de la séquence.

### 2. Les différents types d'hybridation

L'hybridation peut avoir lieu :

- 1 - en solution
- 2 - sur support solide : immobilisation de la cible sur une membrane (nitrocellulose, nylon), sur verre, colonies bactériennes, chromosomes, coupe de tissus...etc

## Sondes nucléotidiques

### 1. Définition

Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier. Cette réaction sonde-fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire.

### 2. Caractéristiques générales

- Une sonde nucléotidique peut être une séquence d'ADN ou d'ARN, mais obligatoirement monobrin.
- Sa taille est très variable : oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides.
- La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment d'acide nucléique à reconnaître. (cette reconnaissance pouvant se faire entre ADN -ADN (ou ADN –ARN ou ARN- ARN).
- Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope. Le repérage de ce type peut se faire par fluorescence, coloration...etc.

### 3. Obtention d'une sonde

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 qui constitue une excellente sonde. Une partie seulement de l'ADNc est utilisée (après action d'enzymes de restriction et clonage des fragments obtenus).
- Une sonde peut être théoriquement un ARNm.

#### **4. Marquage des sondes**

##### **4.1. Les sondes radioactives (chaudes)**

Plusieurs isotopes radioactifs sont utilisés comme marqueurs en hybridation moléculaire : Phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ), soufre ( $^{35}\text{S}$ ),  $^3\text{H}$ . Les sondes radioactives sont détectées après l'hybridation à l'aide d'un compteur, ou par l'autoradiographie.

##### **Attention :**

Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

- nécessité de se protéger du rayonnement émis = un maniement des sondes inconfortable.
- décroissance rapide du  $^{32}\text{P}$  ce qui nécessite un besoin de marquer les sondes fréquemment.

Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes 'froides'.

##### **4.2. 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 (Tableau.1).

#### **5. Applications de l'hybridation**

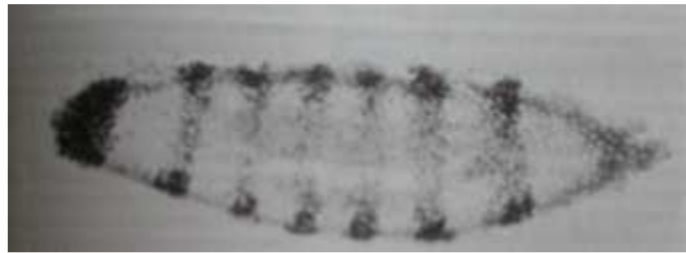
1. Hybridation d'ADN sur support solide : Southern Blot.
- 2 -Hybridation d'ARN sur membrane: Northern Blot.
- 3 - Hybridation d'ADN in situ : cette technique vise à localiser la séquence d'acide nucléique in situ (soit dans les chromosomes, soit dans des types particuliers de cellules).

##### **5.1. Hybridation sur coupe de tissu**

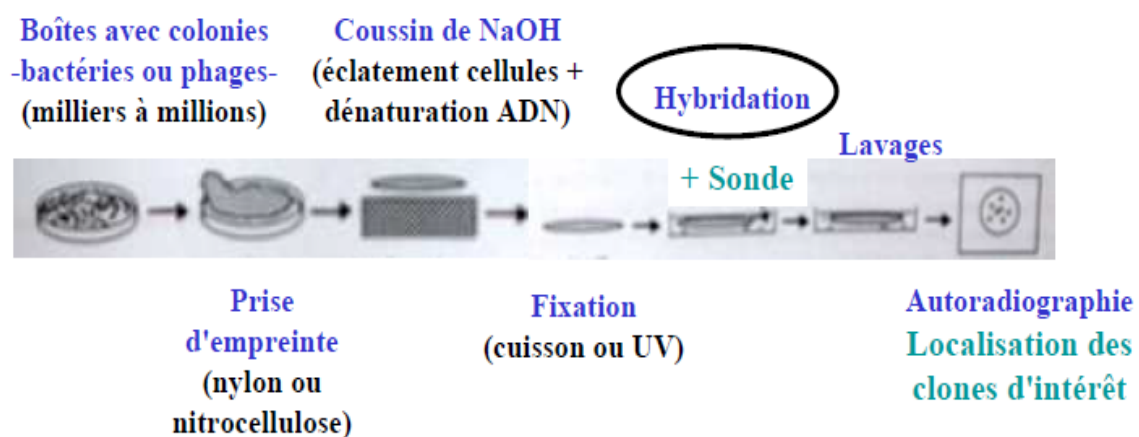
**Objectif :** déterminer quelle sous population du tissu exprime un ARN donné (un tissu est généralement constitué de différents types cellulaires, pas toujours faciles à séparer) (Fig.1).

##### **5.2. Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse**

**Objectif :** détecter parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants celle ou celui qui contient le fragment d'ADN recherché (criblage de banque) (Fig.2).



**Fig.1.** Coupe d'embryon de *Drosophile* qui a subi une hybridation avec une sonde d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire.



**Fig.2.** Hybridation sur colonie de bactéries, sur plaque de lyse.

**Marquage :** incorporation d'un atome ou d'un groupement possédant des propriétés particulières permettant sa mise en évidence expérimentale : radioactivité ( $^{32}\text{P}$ ), fluorescence (fluorophores : fluorescéine ou rhodamine), ligand (biotine) ou des molécules antigéniques (digoxigénine).

Tableau - 1.

Marquage	Radioactivité	Fluorescence	Biotine	Digoxigénine (DIG)
Marqueur	dXTP- $^{32}\text{P}$	dXTP-fluorochrome	dXTP-Biotine	dXTP-Digoxigénine
Exemple de système de révélation	Directe : mesure de la radioactivité	Directe : mesure de la fluorescence	Indirecte : streptavidine marquée (enzyme, fluorochrome)   Fluorochrome Streptavidine Biotine Sonde Matrice	Indirecte : anticorps anti-DIG couplé (enzyme, fluorochrome)   Substrat incolore Produit coloré Enzyme Anticorps anti-DIG Digoxigénine Sonde Matrice