

Master: Agroalimentaire et contrôle de qualité
Master: Microbiologie appliquée

UEF4:
Méthodes moléculaires et contrôle de
qualité
« Techniques de contrôle moléculaire »

Dr Alioua S
2019/2020

PROGRAMME



Chapitre 1: Rappel sur les différents microorganismes responsables des toxi-infections alimentaires

Chapitre 2: Analyses immunologiques

Chapitres 3: techniques d'hybridation moléculaire et technique PCR

CHAPITRES 3

Technique PCR Et Techniques D'hybridation Moléculaire

PARTIE 01: TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE



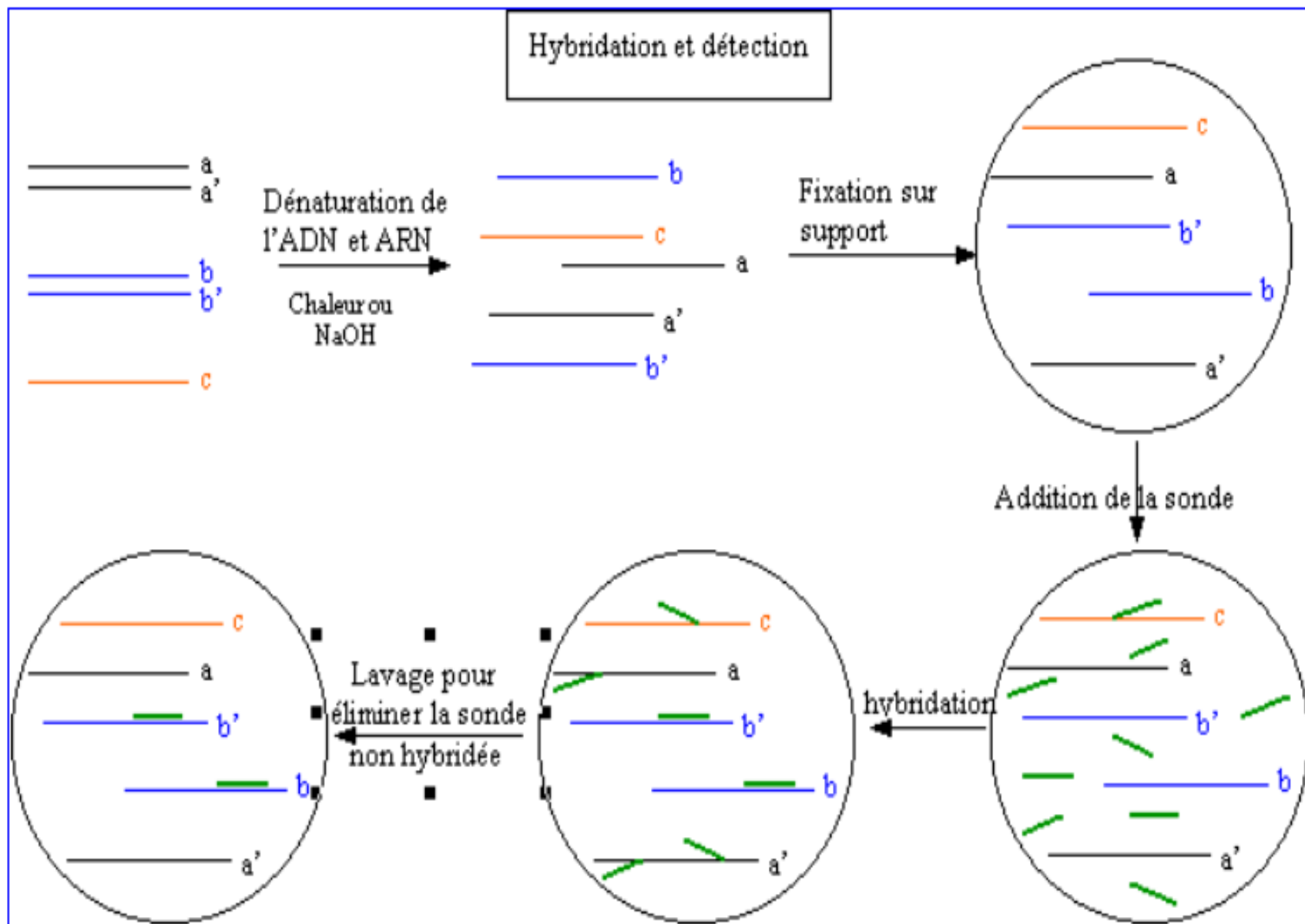
DÉFINITION

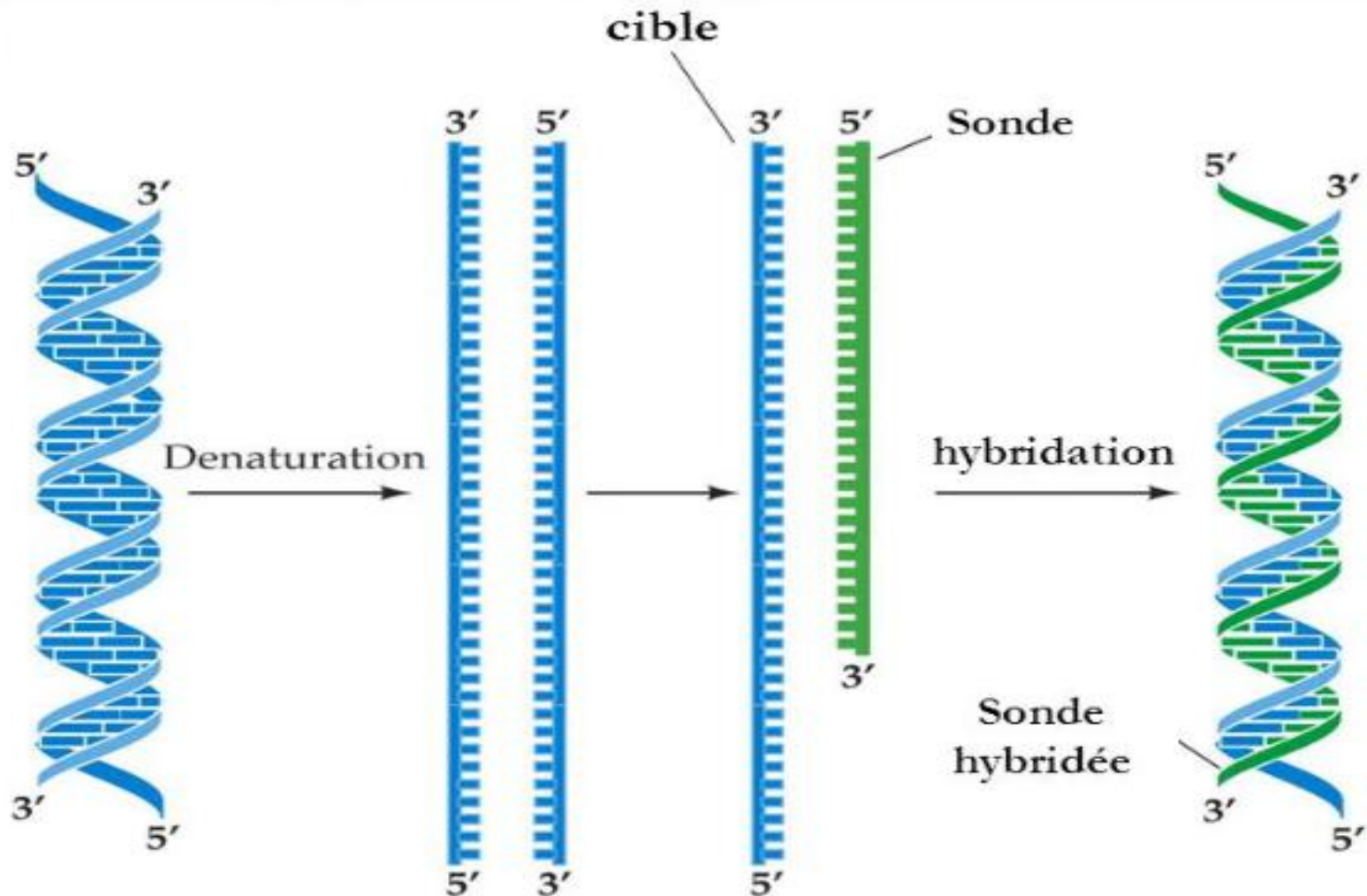
- L'hybridation moléculaire est la propriété que présente une molécule d'acide nucléique **monobrin** de **s'associer spontanément** et de façon **spécifique** et **réversible** à une autre molécule monobrin qui lui est **complémentaire**.
- Lorsque la deuxième séquence est marquée, elle est appelée **sonde moléculaire**.
- L'hybridation moléculaire est permise par les **liaisons hydrogènes** que peuvent établir les bases puriques et pyrimidiques. La force de liaison entre les deux brins d'ADN (ou d'ARN) dépend du nombre de liaisons hydrogène qui lient les deux brins entre eux.

- Le duplex formé est détectable et le signal obtenu offre des informations qualitatives et quantitatives sur la séquence cible détectée.

L'hybridation moléculaire est :

- **Spécifique** : sous certaines conditions expérimentales, un monobrin ne peut s'apparier qu'avec un autre monobrin de séquence **complémentaire**.
- **Réversible** : l'expérimentateur peut, en jouant sur les conditions expérimentales réaliser ou au contraire supprimer l'hybridation de deux molécules.





Sonde : fragment d'ADN ou ARN marqué ; générée in vitro avec une séquence complémentaire de la séquence recherchée.

NATURE BIOCHIMIQUE DES SONDES

Les sondes sont de trois types :

- **formées d'ARN** : ce sont des Ribo-sondes ; elles forment un hétéroduplex avec l'ADN cible qui est plus stable qu'un homoduplex. Ces ribo-sondes sont peu stables dans le temps à cause de leur sensibilité aux RNases ubiquitaires. Elles sont produites par transcription in vitro.
- **formées d'ADN** : ce sont des molécules d'ADN naturel marquées à posteriori ou bien des oligonucléotides (oligosondes) marqués lors de leur synthèse chimique.

- **formées de polymères artificiels** sur lesquels sont greffés des bases permettant de mimer des séquences nucléiques. Ces molécules non naturelles sont de ce fait peu sensibles aux attaques enzymatiques et donc **très stables** dans le temps. Par exemple les PNA (peptide nucleic acids) sont des polymères proches des protéines dans lesquelles les chaînes latérales sont constituées de bases nucléiques.



TYPES DE MARQUAGES

Il existe deux grands types de marquages :

- **les marquages chauds**, dans lesquels le signal est lié à la radioactivité des sondes qui contiennent un ou plusieurs atomes radioactifs de courte période comme le phosphore 32 (P 32) ou le soufre 35 (S35) ou le tritium (H 3). Le seul avantage de ce type de marquage est sa sensibilité, mais les méthodes luminométriques permettent de s'en rapprocher voir de l'égaliser en s'affranchissant des problèmes liés à l'utilisation de radio isotopes (coût, dangerosité et élimination de déchets spécifiques).

- **Les marquages froids** qui sont de deux types : soit la sonde est liée à un fluorochrome, soit elle l'est à un ligand qui sera reconnu spécifiquement et avec une forte affinité par une molécule réceptrice. Deux exemples sont bien connus ; le couple biotine / avidine et le couple digoxygénine / anticorps anti DIG



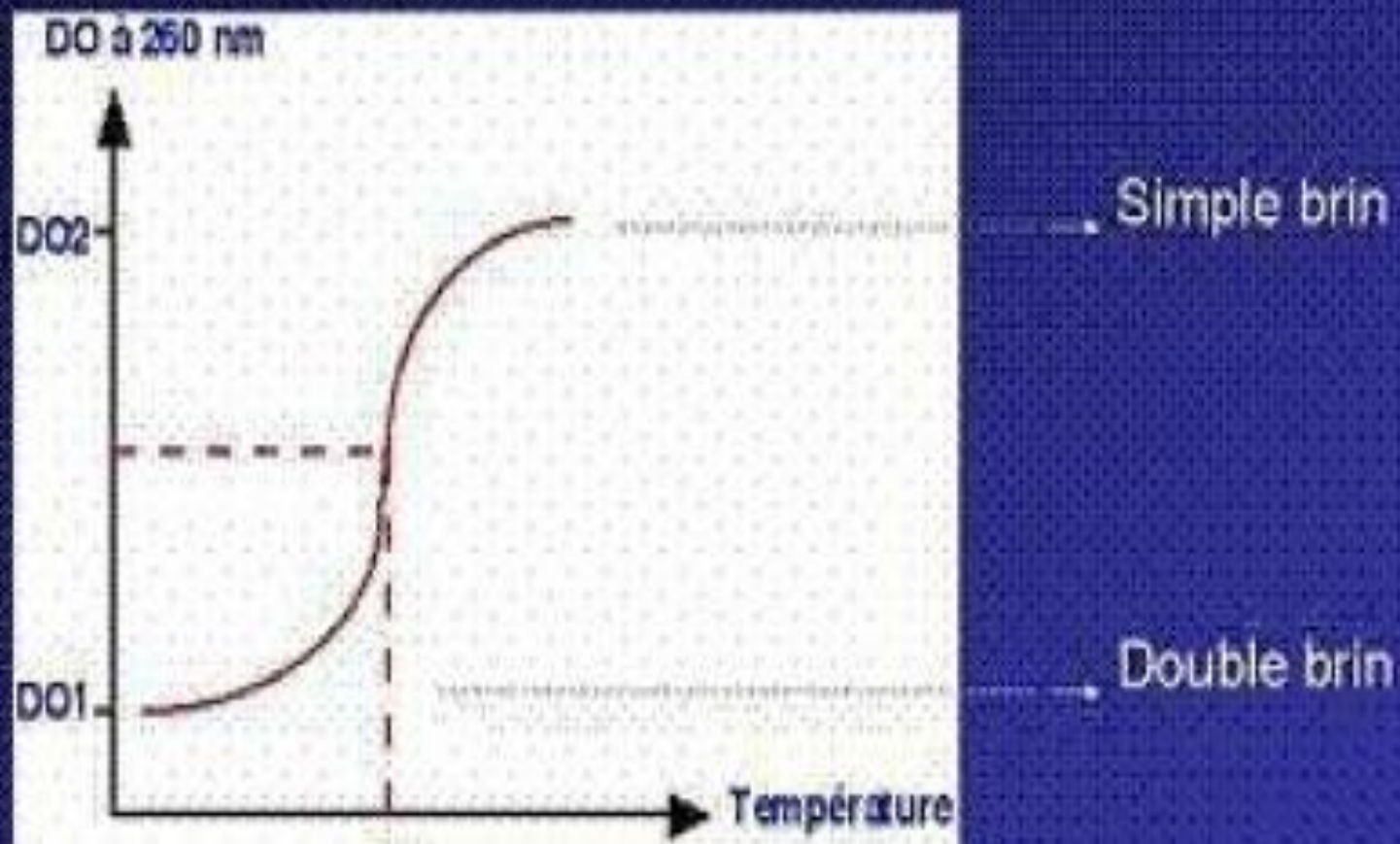
FACTEURS INFLUENÇANT L'HYBRIDATION

1. La température

- Les molécules d'acides nucléiques double-brin se dénaturent à la chaleur (énergie supérieure à l'énergie de liaison qui associe les deux brins).
- En fonction de la température, les molécules vont se présenter sous forme double brin ou simple brin ou un mélange des deux.
- La température de fusion (T_m ou T_f) est la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin et l'autre moitié sous forme monobrin.
- On peut construire une courbe de dissociation de l'ADN en fonction de la température, par la mesure de l'absorbance à 260 nm car les molécules d'ADN simple brin et double brin n'ont pas la même absorbance.

TEMPERATURE DE FUSION

T_m (melting temperature)

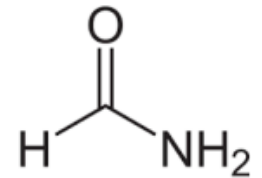


- La dénaturation d'une molécule d'ADN initialement sous forme double brin nécessite que la température soit élevée au-dessus de la température de fusion. La dénaturation est très rapide (quelques secondes).
- La renaturation de deux monobrans dissociés nécessite que la température soit abaissée au-dessous de la température de fusion.
- La renaturation est un processus lent, de quelques secondes à plusieurs dizaines d'heures selon la complexité des deux brins d'ADN et leur concentration dans la solution.
- Une amorce s'hybridera en quelques secondes avec une matrice d'ADN car l'amorce a une séquence très courte et qu'elle est présente à une concentration extrêmement élevée.
- Un génome entier mettra plusieurs jours à se renaturer, parce que sa séquence est très longue et complexe.

2. La composition du milieu réactionnel

a) La teneur en sel (en particulier en cations monovalents type Na^+)

- Les ions Na^+ stabilisent les ions phosphate de la chaîne d'ADN et limitent la répulsion entre les chaînes monobrins. La présence de Na^+ facilite donc la réassociation.



b) La teneur en produits chimiques : formamide

- La formamide crée des liaisons H avec les bases azotées de la molécule d'ADN, donc la dénaturation sera plus rapide. La formamide aura tendance à déstabiliser les hybrides imparfaits.

3. La stringence

- Ensemble de conditions expérimentales de température, de pH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire.
- Elle est d'autant plus forte que la température est proche de la température de fusion et que la concentration en cations monovalents est faible.
- Des conditions très stringente rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique tandis que des conditions peu stringentes permettent une hybridation moins spécifique.

ETAPES DE L'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

Pour la plupart des techniques une succession de **cinq étapes** sont nécessaires pour réaliser l'ensemble des opérations

- 1)** étape de fixation ou d'adsorption des séquences nucléiques à détecter sur un support solide ;
- 2)** étape de saturation des sites non spécifiques par un ou plusieurs produits (ADN et ou protéines) ;

- 3) étape d'hybridation des sondes dans des conditions physicochimiques de moyenne stringeance (spécificité moyenne => des hybridations non spécifiques peuvent avoir lieu)
- 4) plusieurs étapes de lavages en conditions de stringeance croissante pour détruire les hybrides non spécifiques et démasquer les hybrides spécifiques ;
- 5) la détection des sondes hybridées, lors de laquelle une ou plusieurs étapes de lavages permettent d'éliminer tous les composants adsorbés au support de manière non spécifique.



APPLICATIONS DE L'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE



1- SOUTHERN BLOT

- Cette méthode a été initialement décrite par E.M. Southern en 1975.
- Elle consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires marquées par un radioisotope.

ETAPES DE LA TECHNIQUE

- Extraction de l'ADN génomique.
- Digestion par des enzymes de restriction différentes du même ADN génomique.
L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction différentes. Dans ces conditions, on obtient un très grand nombre de fragments, mais seuls quelques fragments correspondent à une partie ou à la totalité du gène étudié.

- Séparation électrophorétique des fragments d'ADN par électrophorèse dans un gel d'agarose.
Après séparation électrophorétique des fragments d'ADN bicaténaires obtenus par digestion enzymatique, on réalise une dénaturation des fragments par un traitement alcalin (la soude) du gel d'électrophorèse. Ce traitement transforme les fragments d'ADN double brin (ou bicaténaires) en fragments d'ADN monobrin (ou monocaténaires).
- Transfert des fragments monocaténaires du gel d'agarose à un support souple (feuille de nylon par exemple).
Le transfert des fragments monocaténaires s'effectue par simple capillarité.



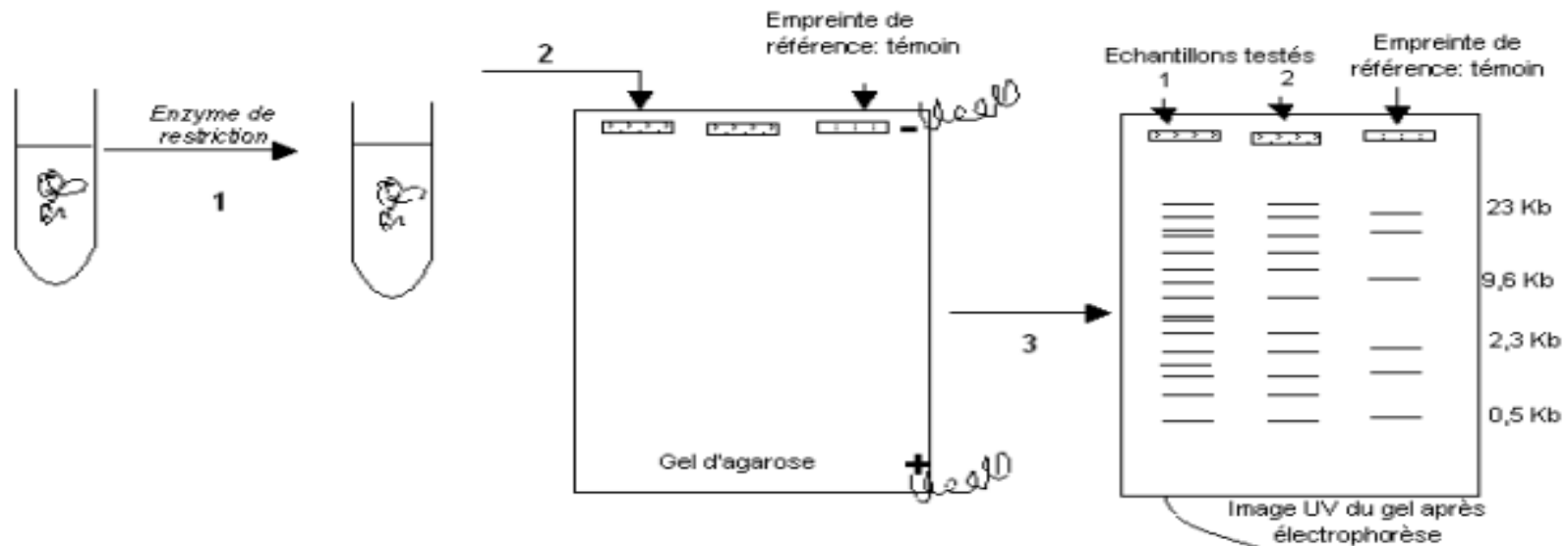
- Fixation des fragments monocaténaire d'ADN sur le support souple et hybridation dans des conditions optimales de stringence avec une sonde complémentaire marquée à un radioisotope.
- Les fragments monocaténaire d'ADN transférés sont mis en présence d'une sonde qui va s'hybrider dans des conditions physico-chimiques bien définies. La sonde s'apparie avec les fragments d'ADN monocaténaire selon les règles de complémentarité. De plus, elle est marquée avec un radioisotope (soit à son extrémité 5', soit à l'intérieur de la chaîne polynucléotidique).



- Lavages et révélation (dans ce cas par autoradiographie).

Après de nombreux lavages, le support solide est mis en contact avec un film photographique pendant plusieurs jours. Le film est ensuite révélé. Les bandes d'ADN monocaténaires hybridées avec la sonde radioactive sont visibles sous forme de bandes noires sur un fond blanc. La position de ces bandes par rapport à des témoins de poids moléculaire permet de déterminer la taille de ces fragments.

- Cette technique permet de repérer un fragment d'ADN particulier dans un génome.

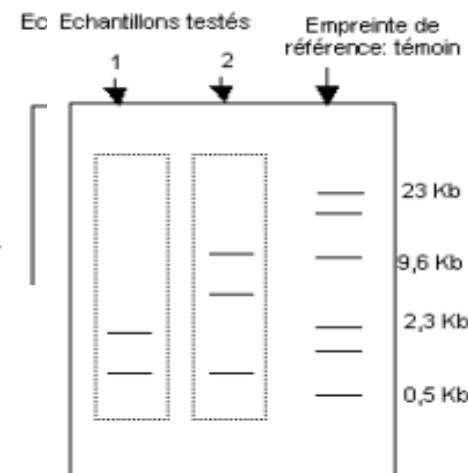


5: transfert et fixation de l'ADN sur membrane de nylon ou autre

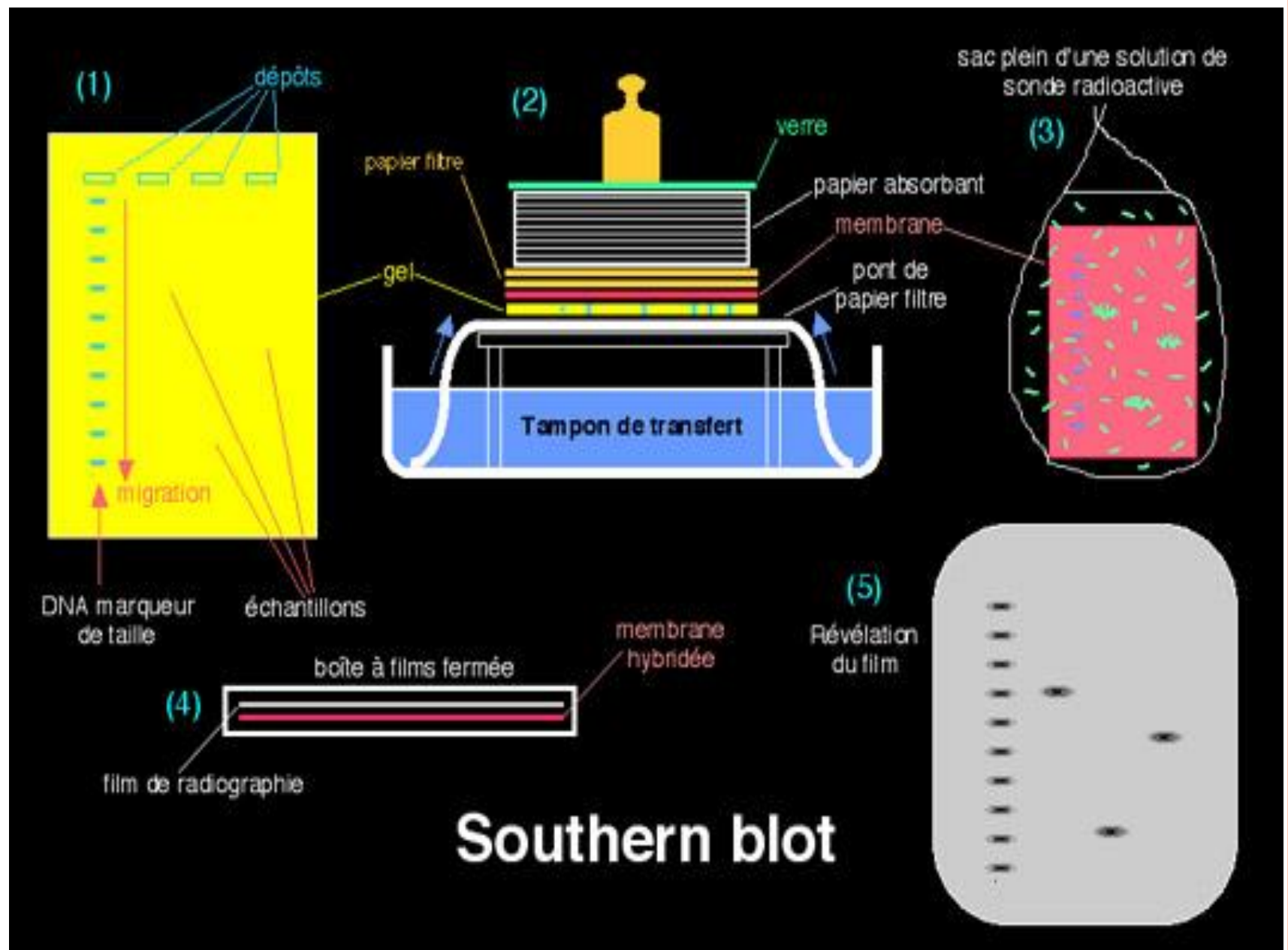
4: dénaturation dans le gel des fragments de restriction

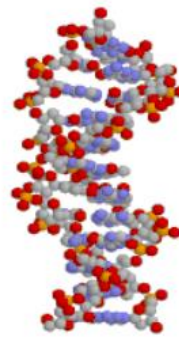
6: hybridation avec une sonde marquée dénaturée

7: lavages

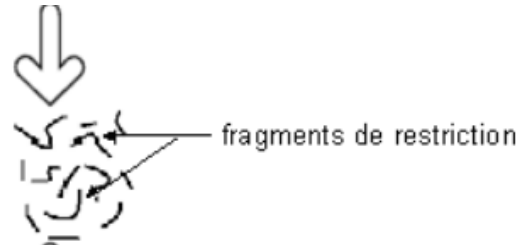


8: autoradiographie montrant les fragments de restriction hybridés avec la sonde spécifique

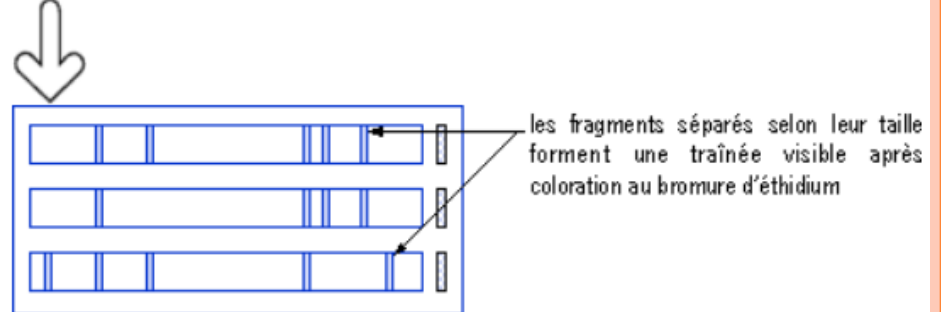




1- clivage enzymatique de restriction



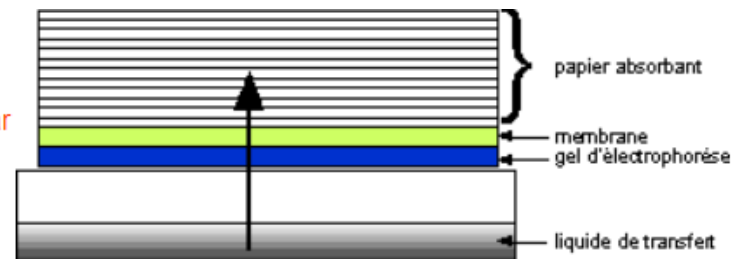
2- électrophorèse sur gel d'agarose



3- dénaturation dans le gel des fragments de restriction



4- transfert sur support solide (membrane de nylon ou nitrocellulose) par capillarité (buvardage)

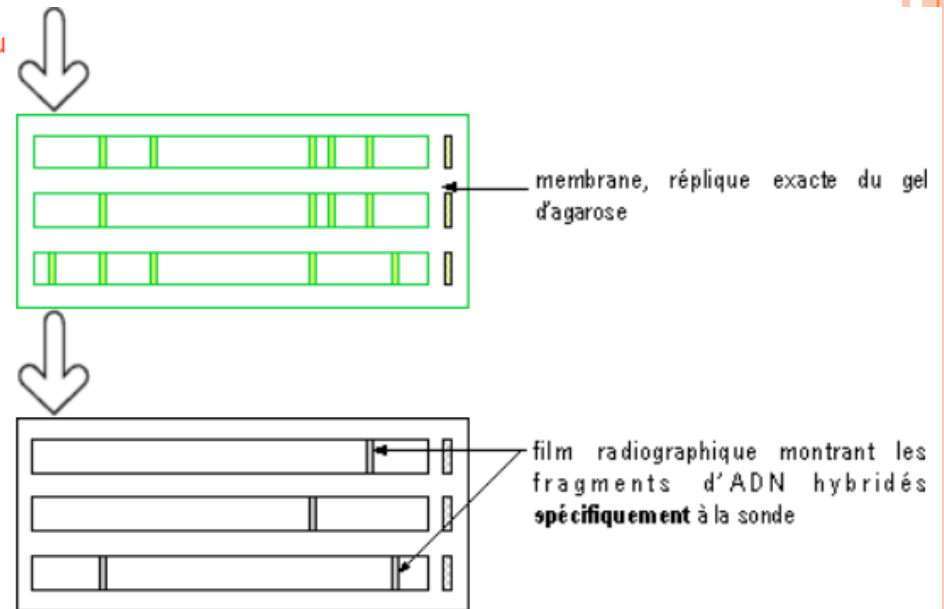


5- fixation de l'ADN sur la membrane par cuisson (mb. nitrocellulose) ou exposition U.V (mb. nylon)

6- hybridation avec une sonde marquée dénaturée

7- lavages

8- autoradiographie



2- NORTHERN BLOT

- Le principe est le même que pour le Southern Blot mais ici ce sont les **ARN** qui sont étudiés. donc plus besoin de digérer par enzyme de restriction.
- La visualisation d'un ARN par une sonde permet de :
 - Apprécier sa distribution dans les tissus, étudier son abondance relative
 - Déterminer sa taille
 - Détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN.

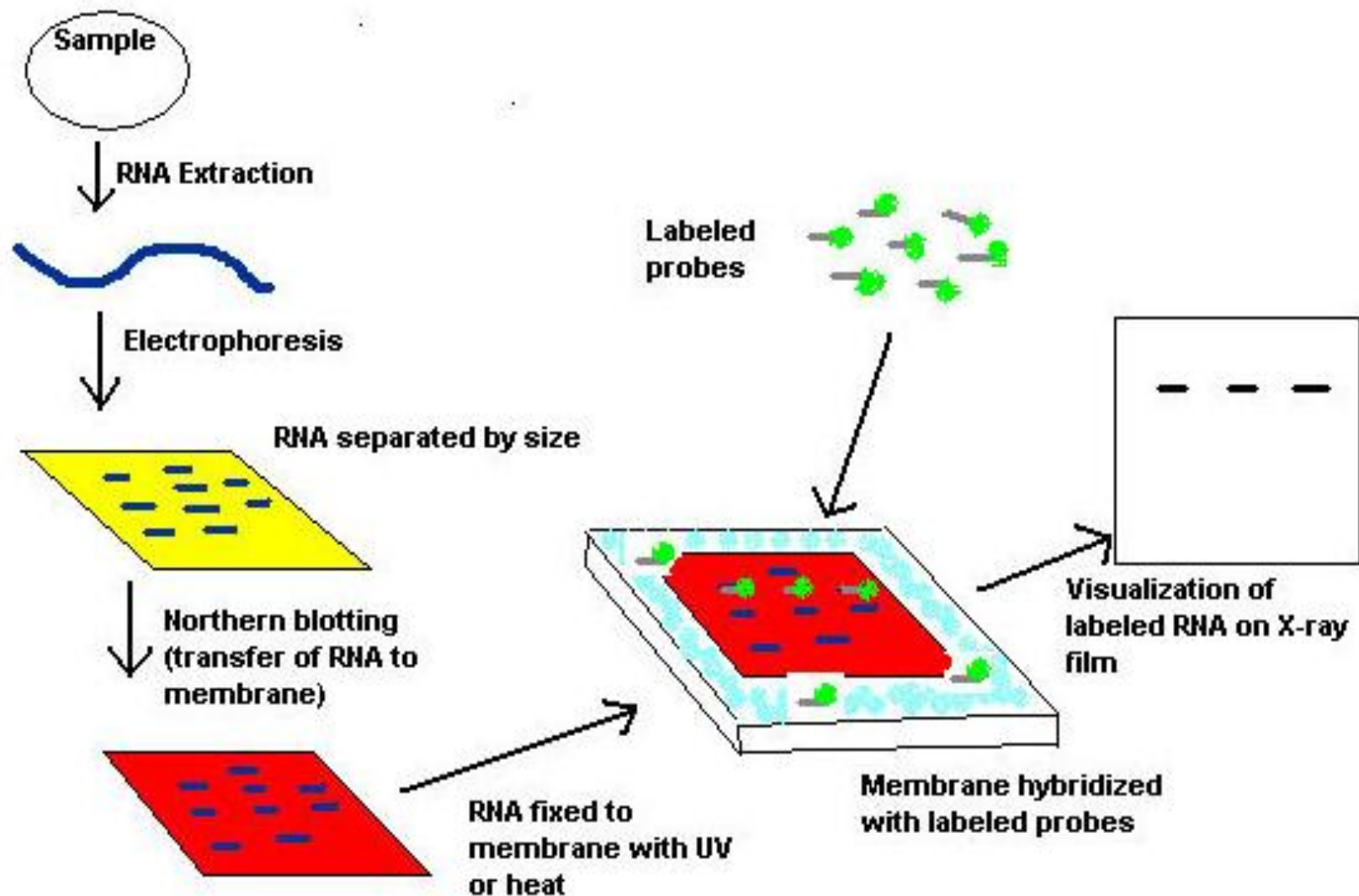


Schéma de principe du Northern blot

3- LES PUCES À ADN

- Un grand nombre de fragments d'ADN sont fixés sur un support solide, on va hybrider ces fragments d'ADN fixés sur la puce avec une population d'acides nucléiques marqués. Sur la puce on peut définir une unité d'hybridation comme un spot.
- Chaque spot correspond au dépôt d'un fragment d'ADN de séquence connue, en quantité donnée et en un point précis (un même ADN est souvent déposé en deux spots pour faire une répétition).
- Les ADNs fixés sur la puce s'appellent des **sondes**, l'avantage des puces c'est qu'on peut réaliser l'hybridation de milliers de sondes vis à vis d'une population choisie d'acides nucléiques.
- Alors que dans les expériences précédemment décrites (Southern blot, Northern blot), on hybridait la population d'acides nucléiques avec une seule sonde marquée.



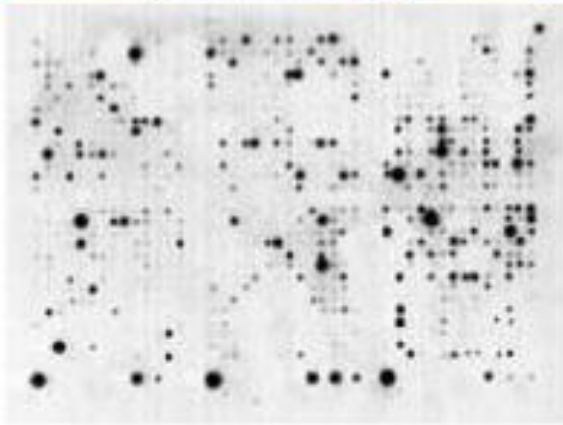
Types de puce :

- **Les macroarrays** : on a une densité de fragments d'ADN d'environ 25 spots/cm² et les dépôts se font sur une membrane de nylon.
- **Les microarrays** : la densité du dépôt est plus élevée (1000 ADN/cm²) et il se fait sur une lame de verre. Les ADN sont des fragments amplifiés dont la taille varie entre 200 et 2000 pb mais peuvent aussi être des oligonucléotides de 50 à 70 pb.
- **Les puces à oligonucléotides** : représentent la miniaturisation la plus poussée (300 000 oligonucléotides/cm²) dans ce cas la taille des oligonucléotides est d'environ 25 pb.

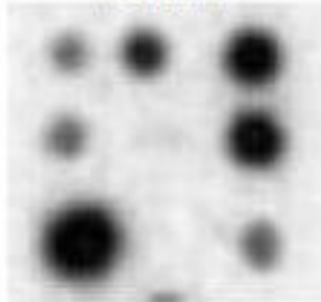
- Différents supports peuvent être utilisés (nylon, verre) ainsi que différentes techniques pour déposer les acides nucléiques sur la puce. Le dépôt de l'acide nucléique peut se faire après synthèse ou bien on réalise une synthèse in situ par photolithographie.



Filtres haute densité (macroarrays)



Détail :



Taille : 12cm x 8cm

- 2400 clones par membrane
- marquage radioactif
- 1 condition expérimentale par membrane

Lames de verre (microarrays)



Détail :



Taille : 5,4cm x 0,9cm

- 10000 clones par lame
- marquage fluorescent
- 2 conditions expérimentales par lame

Puces à oligonucléotides



Détail :



Taille : 1,28cm x 1,28cm

- 300000 oligonucléotides par lame
- marquage fluorescent
- 1 condition expérimentale par lame

Illustration montrant différents types de puces

Utilisation des puces:

Les utilisations sont multiples :

- analyse de l'expression de gènes, détection et caractérisation d'espèces, recherche de mutations...
- Mesure de l'expression de gènes
- comparaison du profil d'expression des gènes dans les deux conditions expérimentales.
- Détection de SNP(Single Nucleotide Polymorphism) sont des variabilités ponctuelles de la séquence d'ADN.
- Détection d'agents pathogènes



4- HYBRIDATION IN SITU (SUR CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE)

- L'hybridation in situ s'applique à la détection de séquences cibles dans les cellules entières préparées sur des supports souvent en verre (*slide*). Les cellules sont fixées, perméabilisés et souvent décapées pour exposer les acides nucléiques qui sont dénaturés pour permettre leur hybridation par les sondes. Lorsque le marquage est fluorescent, on parle de FISH : *fluorescent in situ hybridation*
- Cette technique permet par exemple d'effectuer des caryotypes faciles à analyser, car chaque paire de chromosome fluoresce dans une couleur spécifique (FISH painting).

La technique comporte **trois étapes** principales:

- Une dénaturation de la sonde d'ADN ainsi que la cible chromosomique
- Une hybridation de la sonde, dans des conditions d'environnement précises
- Une étape de détection de la sonde



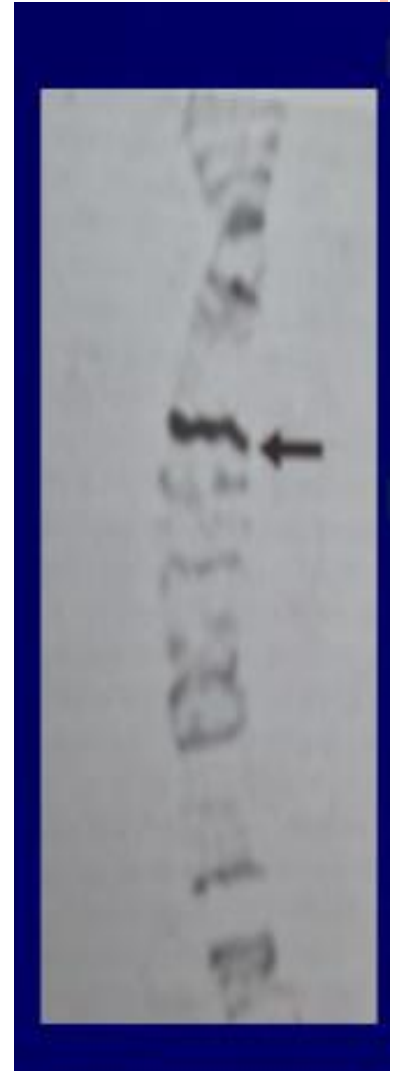
Objectif:

Déterminer sur quel chromosome et dans quel région se trouve le gène dont on possède la sonde

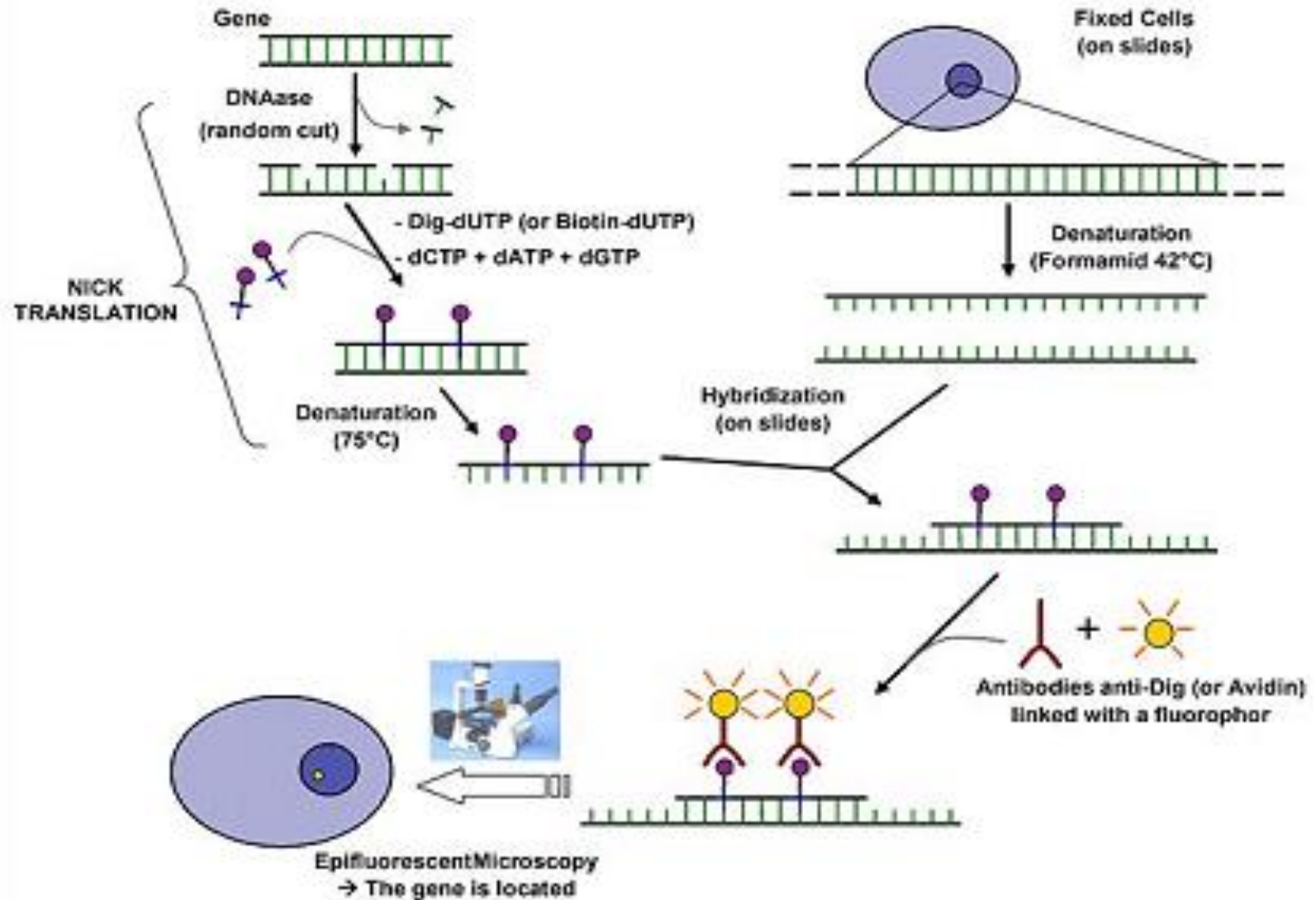


En pratique:

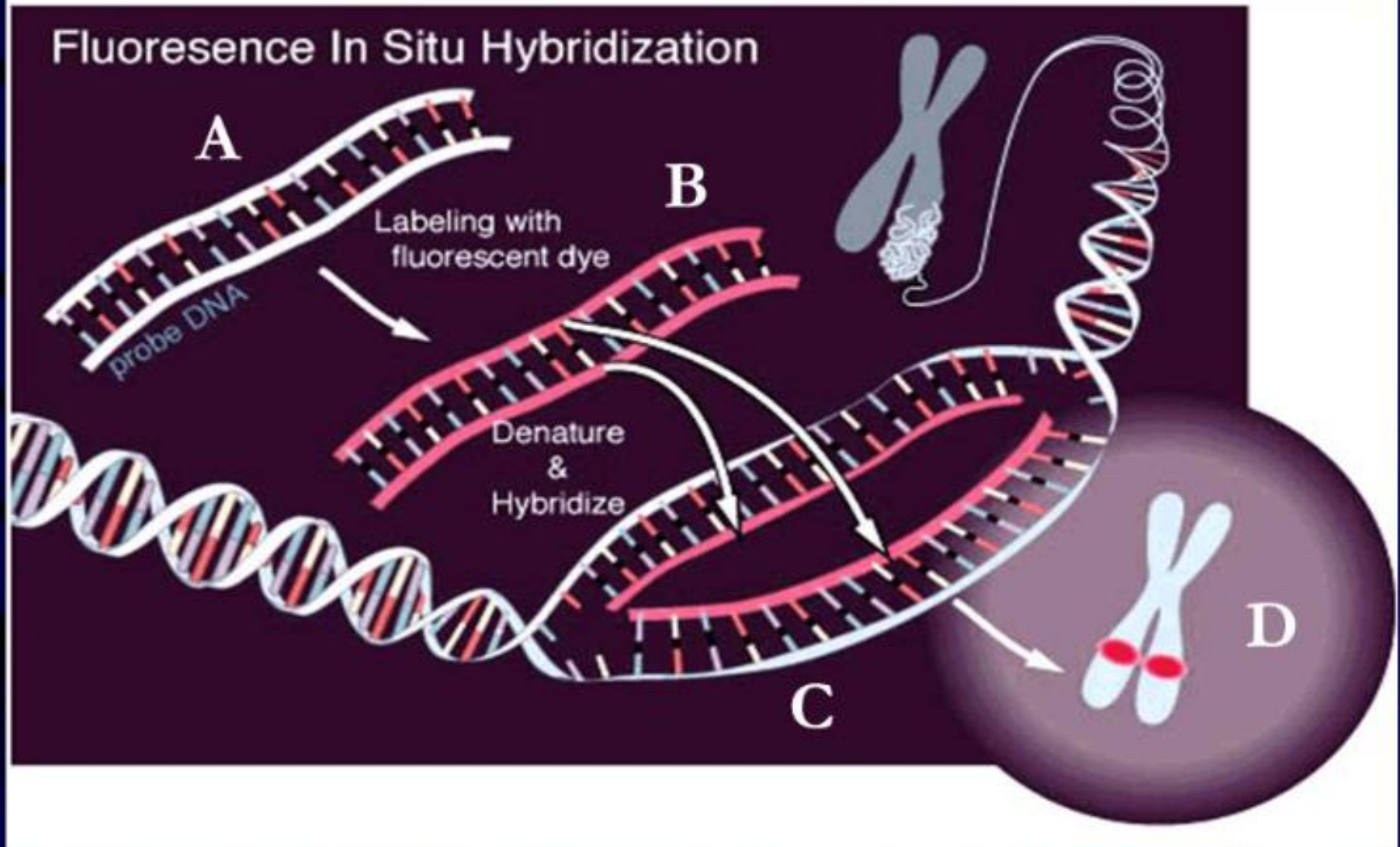
- Préparation des chromosomes
- Hybridation directement sur les préparations fixés sur lames
- Sonde marquée au tritium: rayonnement très court donne alors une localisation fine de la zone émettant la radioactivité
- Résultat lus sous microscope : les signaux positifs apparaissent sous forme de grains noirs disposés sur les chromosomes



FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Fluorescence In Situ Hybridization



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.