

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Chapitre IV : LES HYBRIDATIONS MOLECULAIRES

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: s.selka.sek@gmail.com

Chapitre IV :

LES HYBRIDATIONS MOLECULAIRES



I. Principe

Désigne l'**association** qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques **simples brins** de séquences **complémentaires** obtenus après dénaturation (ou fusion) et qui conduit à la formation d'un double brin.

But : identifier parmi un mélange de fragments, la présence d'une séquence particulière, pour cela, on utilise un fragment particulier qui sert de **sonde**.

1- Type de sondes :

- **Sonde génomique** : fragment obtenu par coupure de l'ADN génomique
- **Sonde ADNc** : sonde ADN obtenue par transcription réverse d'un ARNm messager
- **Sonde oligonucléotides** : ADN (ou ARN) simple brin de 18 à 50 nucléotides synthétisé chimiquement.

II. Facteurs influençant l'hybridation

- **La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation** : (si la concentration de l'ADN est grande, le nombre de copies hybridées sera grand : la vitesse d'hybridation augmente lorsque la concentration de l'ADN augmente ; la probabilité d'association des brins complémentaires est importante lorsque le temps est long).
- **La température d'hybridation** : elle favorise la rencontre des deux séquences complémentaires.
- **La force ionique** : la concentration en NaCl joue un rôle important dans les réassociations des segments complémentaires.
- **La taille du fragment nucléique**
- **La nature des acides nucléiques**

III. Types d'hybridation :

L'objectif de l'hybridation est la détection de la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l'utilisation d'un fragment d'ADN **complémentaire** : **sonde**.

Cela peut avoir lieu en **solution** ou sur **support solide** (immobilisation de la cible sur une membrane [nitrocellulose, nylon], sur verre, colonies bactériennes,etc.).

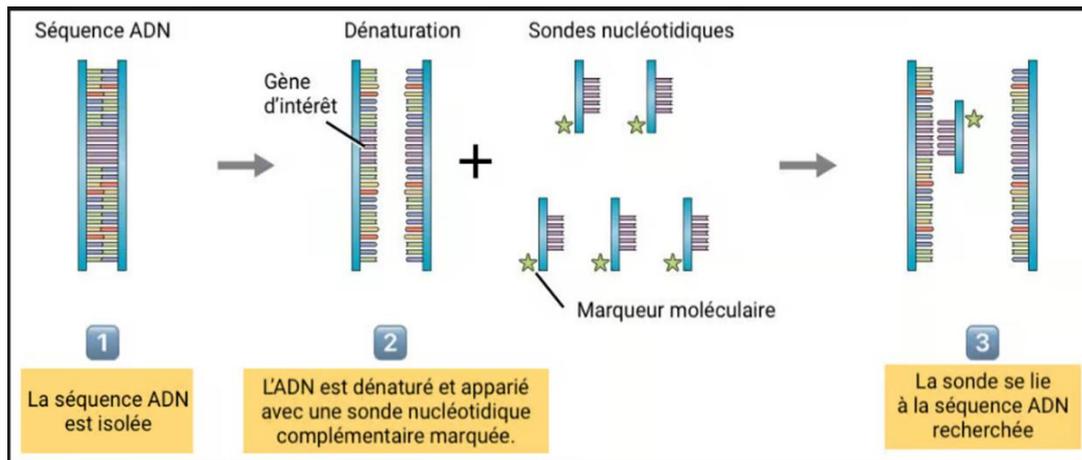


Fig.1 Le principe de la sonde

1- L'hybridation en phase liquide :

L'hybridation en phase liquide consiste à réaliser la réaction d'hybridation au sein d'un milieu contenant un tampon et du formamide; sous l'agitation thermique les deux molécules se rapparient l'une sur l'autre à température inférieure à celle de la température de fusion.

2- L'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).

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.

IV. Les hybridations moléculaires

Le Southern blotting

1 - Principe

Détecter l'ADN (analyse de la structure des gènes et la détection des anomalies).

C'est une technique d'hybridation moléculaire qui consiste à détecter spécifiquement des fragments d'ADN transférés sur filtre par leur hybridation à des séquences complémentaires (sonde) marquées par un radio-isotope.

2- Technique

- Digestion par les enzymes de restriction (plusieurs fragments d'ADN de différentes tailles)
- Électrophorèse : séparation des fragments
- Dénaturation des fragments par NaOH
- Transfert des fragments dénaturés sur membrane NC
- Fixation des fragments par UV ou à 80°C
- Hybridation avec des sondes marquées
- Rinçage : élimination des sondes non fixés
- Révélation du marquage : repérer la position des fragments hybridés avec la sonde.

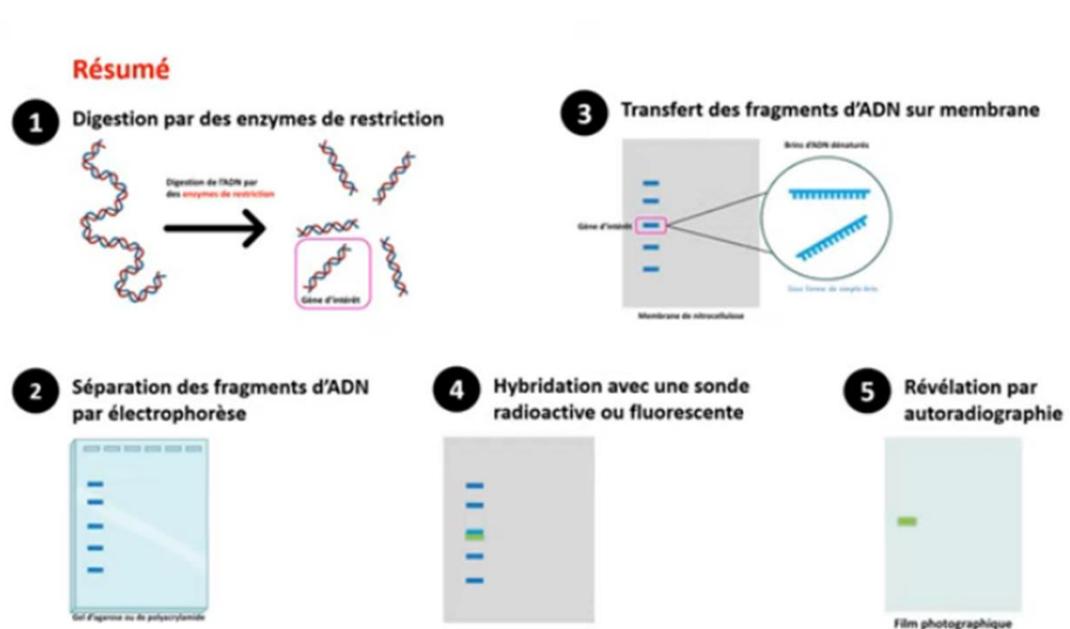
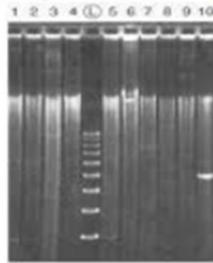


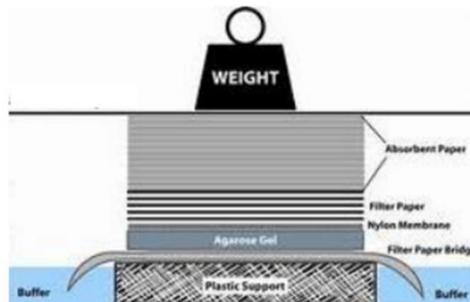
Fig.2 La technique de Southern blotting

Extraction de l'ADN génomique d'une plante
 ↓
 Digestion par différentes enzymes de restriction
 ↓
 Séparation des fragments d'ADN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose (séparation d'une traînée continue de bandes d'ADN en fonction de leur taille et dont l'une d'elles correspond au gène recherché qui sera identifiée par la sonde marquée après Southern blot)



Dénaturation des fragments d'ADN digérés par **traitement alcalin** (acide) du gel d'électrophorèse

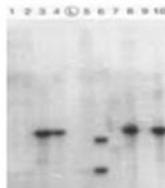
↓
Southern blot



Transfert par capillarité des fragments d'ADNs séparés sur une membrane poreuse souple (feuille de nylon).

↓
Fixation de l'ADNs sur la membrane (par cuisson de la membrane ou par exposition sous UV)
 ↓
Hybridation moléculaire de l'ADN fixé à la membrane avec **une sonde** radio-marquée dénaturée.
 ↓
 Lavages
 ↓
Autoradiographie (La membrane est mise en contact avec un film photographique)

↓
Révélation du film pour révéler les bandes d'ADNs hybridées dont la séquence est homologue à celle de la sonde (ces bandes 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)



Film photographique révélaté

Le Northern blotting

1 - Principe

- Similaire au Southern blot
- Analyse de l'ARN
- Les ARNms sont isolés (des tailles différentes qui dépendent de la longueur des protéines)

2- Technique:

- Électrophorèse : séparation des fragments
- Transfert des fragments sur membrane NC
- Fixation
- Hybridation avec des sondes marquées
- Rinçage
- Révélation du marquage

Hybridation sur support : Southern blot (ADN), northern blot (ARN)

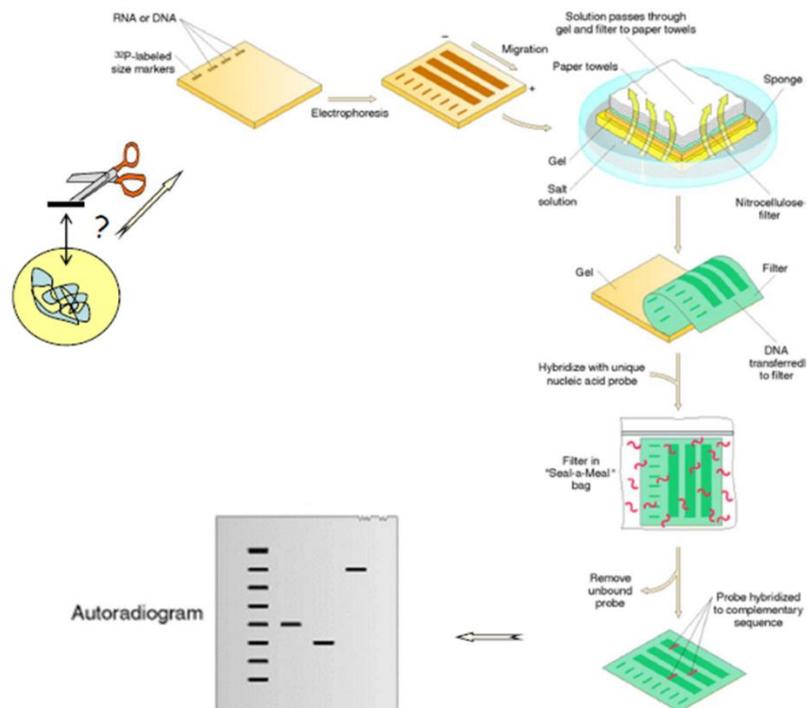


Fig.3 La technique de Southern blotting et northern blot

Le dot blot

1 - Principe :

- Technique plus simple car ni fragmentation ni électrophorèse ne sont nécessaires
- Utilisée pour les petits fragments d'ADN
- Recherche d'ADN étranger (Ex virus) dans un échantillon

2- Technique :

- Échantillon déposé directement sur la membrane NC
- Dénaturation
- Hybridation
- Rinçage
- Révélation

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**.

Plusieurs sondes peuvent être utilisées pour réaliser une HIS :

	Marquage	Révélation
sondes chaudes	Isotopes radio-actifs (tritium H3, P32, P33 ou S35)	Autoradiographie
Sondes froides	Produits fluorescents (FISH : Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization) : Le FISH est une technique de cytogénétique 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

1- Technique :

- De fines tranches de tissus sont coupés
- Placées sur une lame de microscope
- La sonde est ajoutée aux cellules de la lame (pénétrer dans le cytoplasme, se fixer à l'ARNm cible et formation d'hybrides)
- Révélation du marquage (apparition de zones colorées à l'intérieur des cellules sous microscope).

Références :

- Cours de Génie génétique: Dr Ghembaza Boublenza. L, Université de Tlemcen, Faculté SNV , Algérie.
- TD Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques: ADN, ARN & PLASMIDES : Dr Leila Medraoui, Université de Rabat, Faculté des Sciences, Maroc.
- SUPPORT DE COURS de GENIE GENETIQUE: Dr. KHOUAJA Fattouma, Université DE LA MANOUBA, INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE SIDI THABET (ISBST), Tunisie.
- Polycopié de la matière de génie génétique incluant Les cours, les travaux dirigés et les travaux pratiques: Dr Fathi Berrabah, Université de Djelfa, Faculté SNV, Algérie .
- www.medatice-grenoble.fr chapitre 8 méthodes d'études en biologie moléculaire.
- LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE: Pr Belarbi-Amar N, Université Oran1 Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Département de médecine, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Génétique cliniques, Algérie .
- Biologie Moléculaire et Génie Génétique: Dr. Nehal Fatima, Université de Chlef, FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies, Algérie.