

**U.N.V Mostfa Benboulaid Batna2**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biochimie et de**  
**Microbiologie**

**Module : Techniques de Biologie**  
**Moléculaire**  
**Licence Biochimie appliquée**

# **Chapitre V :**

# **Techniques de recherche et d'identification**

# **d'un fragment d'ADN**

**Enseignant : Dr DEKKICHE. S**

# **PARTIE I :**

## **Technique de recherche d'un fragment d'ADN (Techniques d'hybridation moléculaire)**

### **Plan du cours**

#### **I- Hybridation moléculaire**

Les sondes nucléiques

- **Stabilité du duplexe**
- **Dénaturation du double brin d'ADN et  $T_m$**
- **Supports d'hybridation moléculaire**

#### **II-Différentes techniques d'hybridation moléculaire**

- **Southern Blotting**
- **Northern blot**
- **Western blot**
- **Le Dot blot**
- **Les puces d'ADN**
- **Hybridation in situ**

# Techniques de chercher un fragment d'ADN

chercher un fragment d'ADN x



Piéger ce fragment d'ADN x et le séparer des autres fragments



**Meilleur moyen (l'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 duplexe).



liaisons hydrogènes spécifiques (A=T) et (G=C)

# **Hybridation moléculaire**

## **Concepts de base**



**Echantillon d'acide  
nucléique monobrin**

**Conditions d'hybridation  
convenables (stabilité du  
duplexe)**

**?**

**?**

**Une sonde moléculaire  
( séquence est connue)**

**Supports d'hybridation  
moléculaire**

**?**

**?**

# Hybridation moléculaire

## Stabilité du duplexe formé

(plusieurs facteurs)

- ★ **La répulsion électrostatique**  
(Charge négatif)
- ★ **Les interactions dipôles- dipôles**  
(liaison hydrogènes)
- ★ **Le pH de la solution**
  - ★ **La longueur de la molécule**
    - ★ **Le coefficient de Chargaff (%GC)**
      - ★ **Présence d'agent dénaturant**  
(l'urée et le formamide )
        - ★ **Autres facteurs**

# Les sondes nucléiques

-Séquence d'ADN ou D'ARN

-Monobrin

--Taille variante (oligo nucléotide; 20-30 nucléotides ou d'un poly nucléotides qui va jusqu'à plusieurs centaines de nucléotides

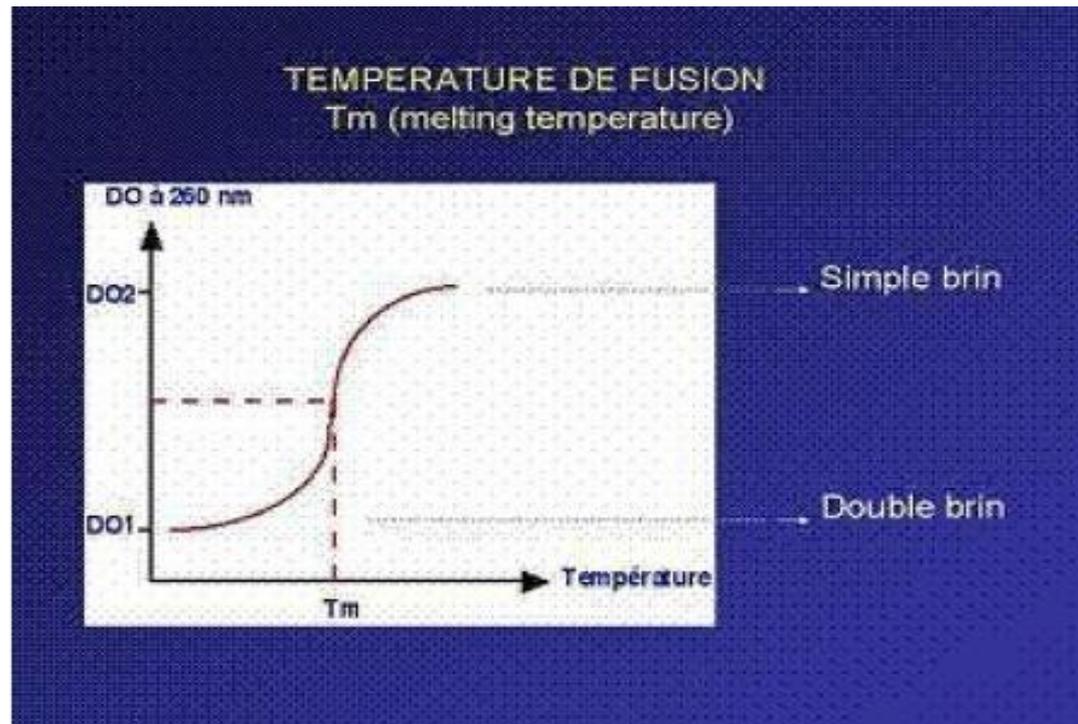
--Repérable grâce à un marquage (chaud ou froid)

# Dénaturation du double brin d'ADN (Chaleur)

Température de fusion ( $T_m$  = melting )



température à laquelle 50% de la molécule est dénaturé  
(température de la demi dénaturation)



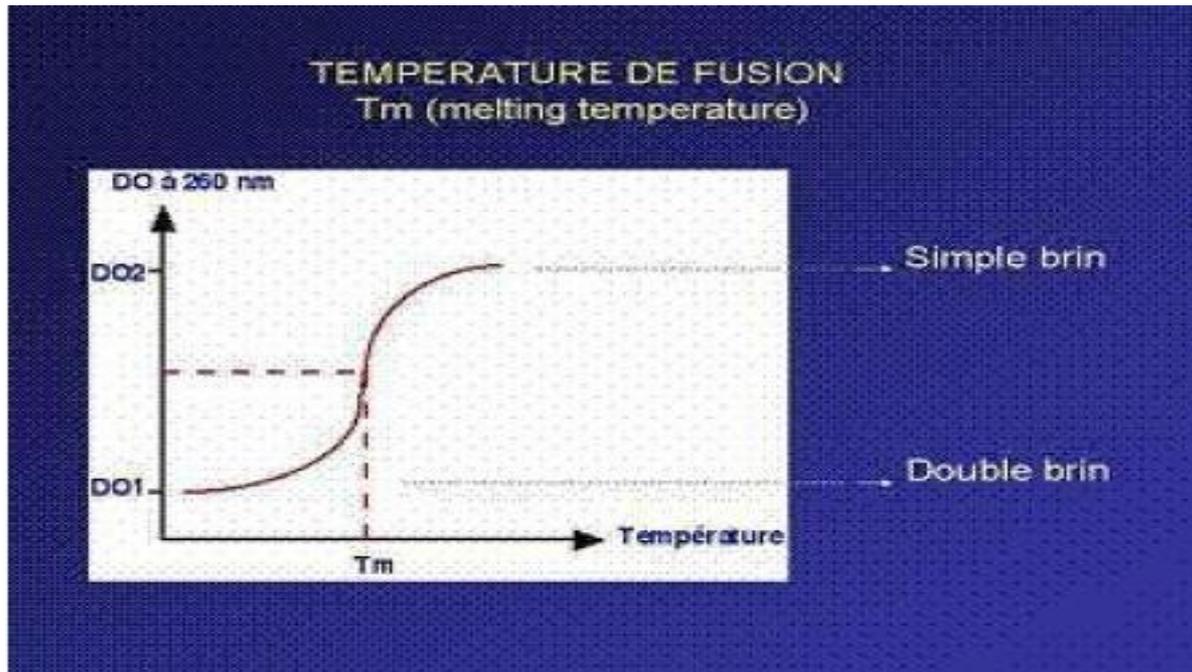
*Courbe de dissociation de l'ADN en fonction de la température*

# **Facteurs influençant la $T_m$**

- Longueur du fragment de l'ADN considéré**
- % en GC,**
- Force ionique**
- pH**
- Agent dénaturant (l'urée et le Formamide)**

# Détermination de la Tm

Estimation par absorbance



*Courbe de dissociation de l'ADN en fonction de la température*

Calcul a partir de la composition en oligo nucléotides

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \text{Log}(\text{Na}^+) + 0,41 \cdot (\% \text{GC}) - 600/\text{N} - 63 \cdot (\% \text{ formamide})$$

N correspond au nombre de paire de nucléotides

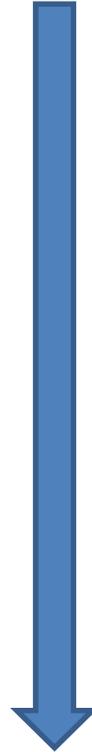
# Supports d'hybridation moléculaire



• **Hybridation sur Support liquide**  
(hybridation en phase homogène)



- **Hybridation sur support solide** (hybridation en phase hétérogène, membrane de cellulose ou membrane de nylon)



- **Hybridation insitu**  
(cellule, tissu, colonie)

# Différentes techniques d'hybridation moléculaire

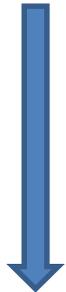
basées sur le même principe (l'hybridation moléculaire), mais des objectifs plus ou moins différents



**Southern Blotting**



**Northern blot**



**Western blot**



**Dot blot**



**Les puces d'ADN**



**Hybridation in situ**

# Technique de Southern blot

**-Extraction de l'ADN**



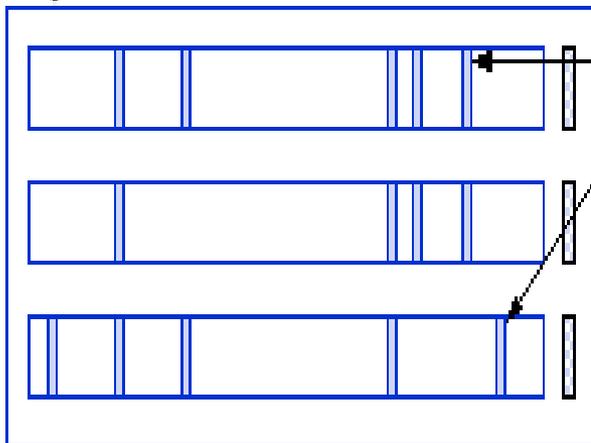
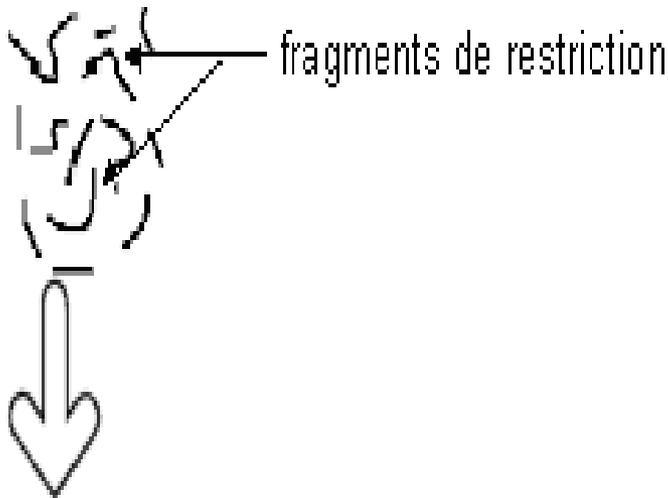
**-Digestion enzymatique (milliers de fragments de différentes tailles)**



**•Séparation électrophorétique (gel d'agarose)**



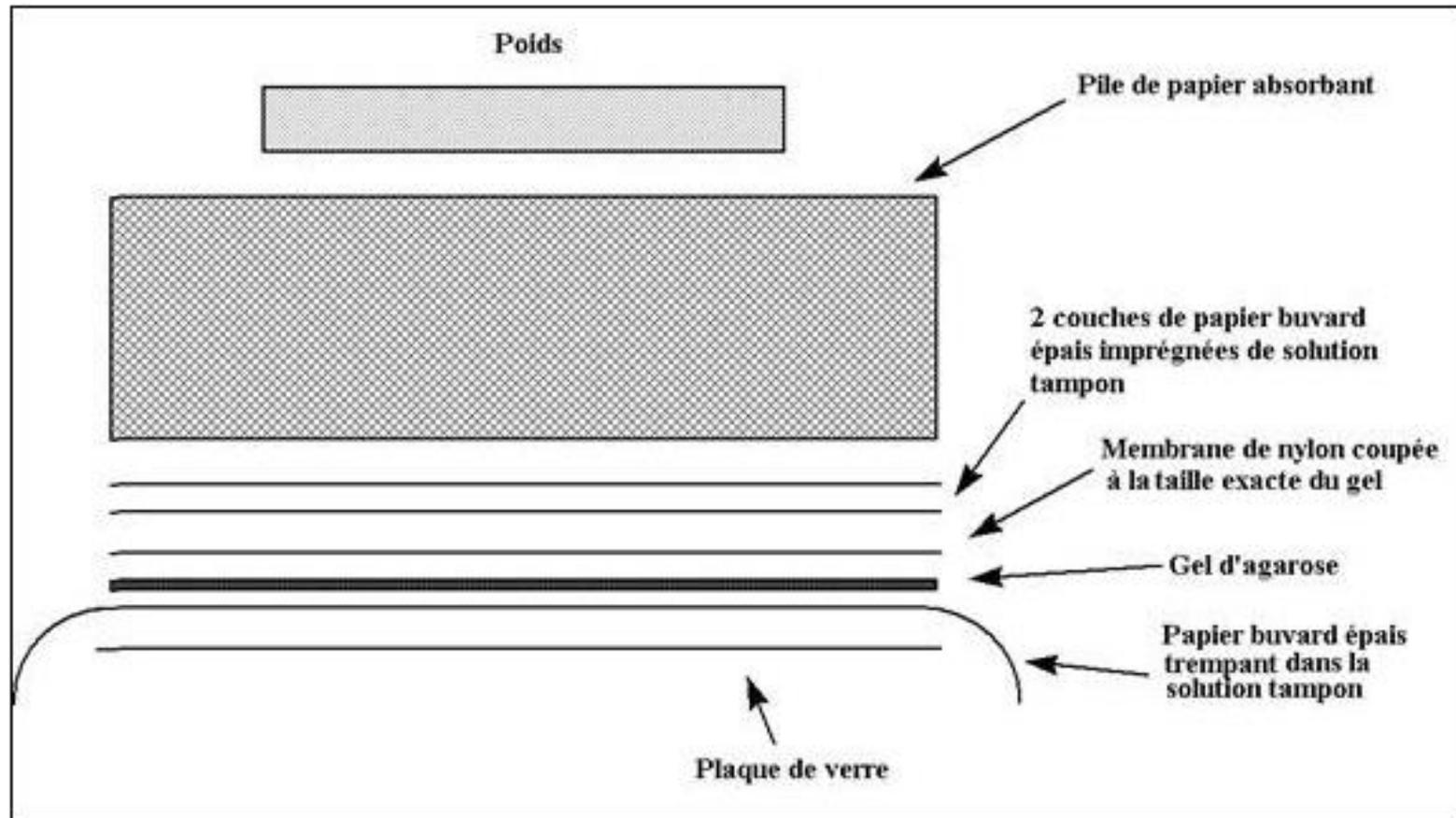
**•Dénaturation des fragments d'ADN**  
**•(incubation du gel dans une solution alcaline)**



les fragments séparés selon leur taille forment une traînée visible après coloration au bromure d'éthidium

# Technique de Southern blot

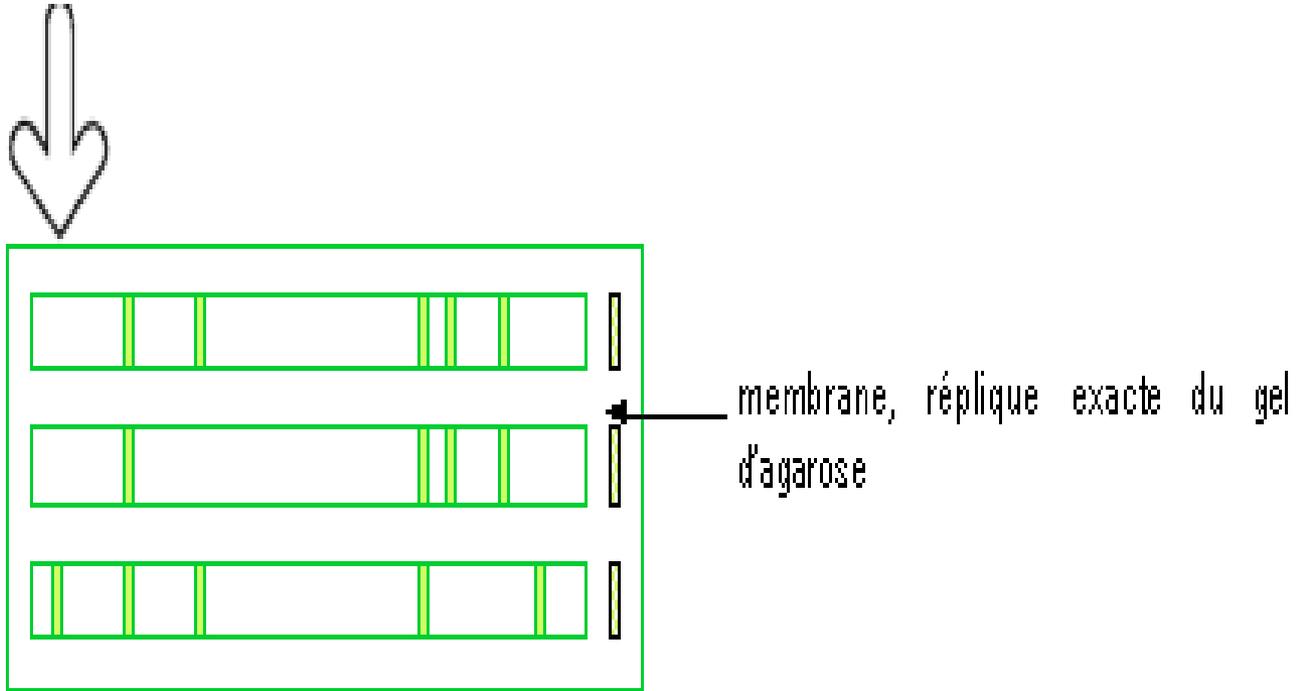
- ➔ **Transfert par capillarité et fixation des fragments dénaturés sur un support solide** (membrane de nylon ou de nitrocellulose)



# Technique de Southern blot

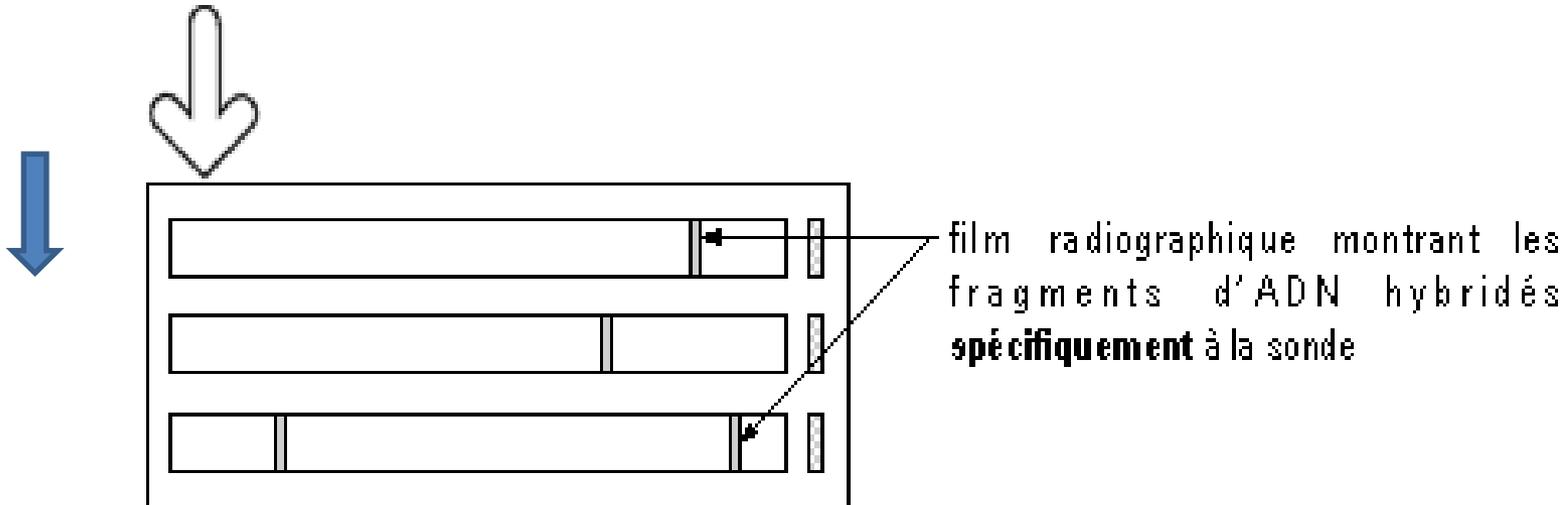
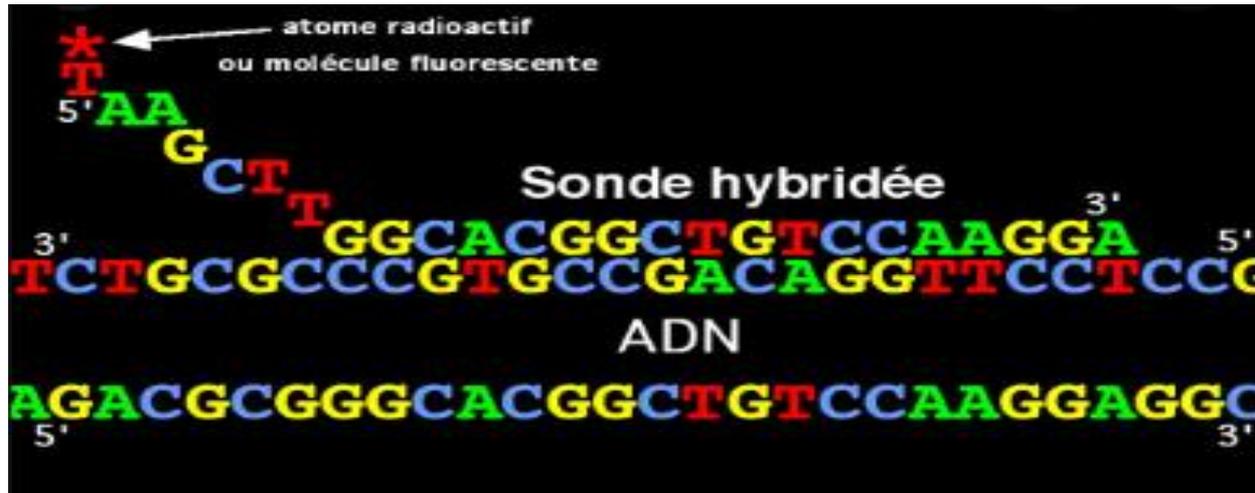


La membrane est démantelée du blot et traitée (80°C, ou UV)



# Technique de Southern blot

## → Hybridation moléculaire sondes marquées

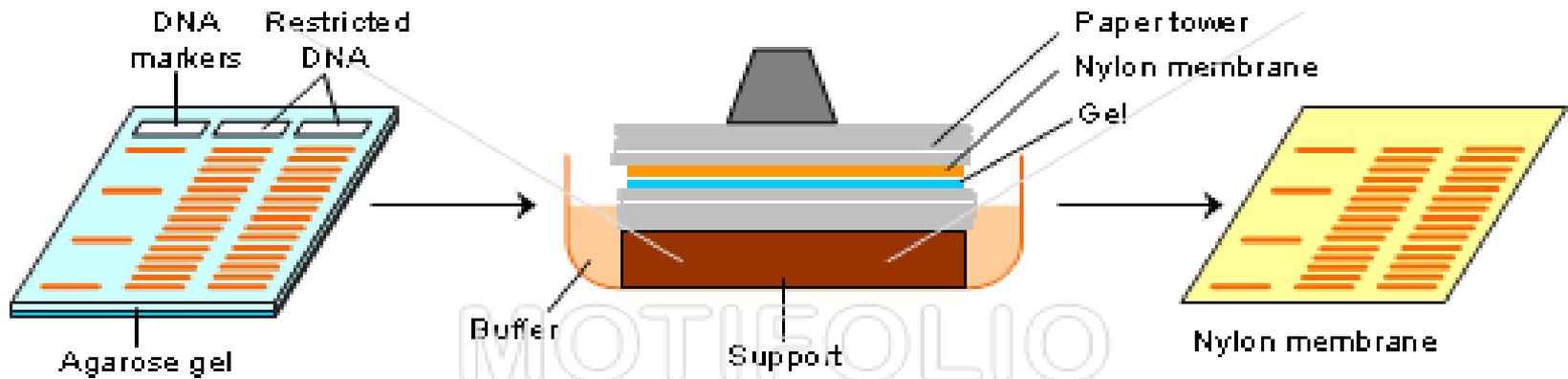


Lavage (solution tamponnée) et révélation

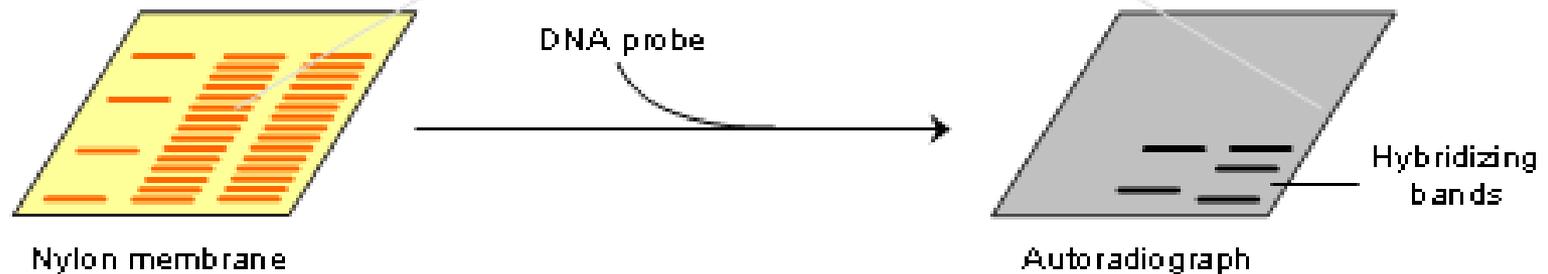
# Technique de Southern blot

## Southern blot

(A) Transfer of DNA from gel to membrane



(B) Hybridization analysis



# **Application de la Technique de Southern blot**

**Nombreuses applications**

- Etablissement de cartographie de restriction**
- Mise en évidence de famille multi géniques  
pseudo gènes**
- Détection de polymorphisme de restriction**
- Détection de répétition, de délétion,  
d'inversions, de recombinaison de gènes.**

# **Méthode du Northern blot**

- Principe le même que pour le Southern Blot**
- Ce sont les ARN qui sont analysés et pas l'ADN**
- (Cette méthode est peu employée actuellement).*

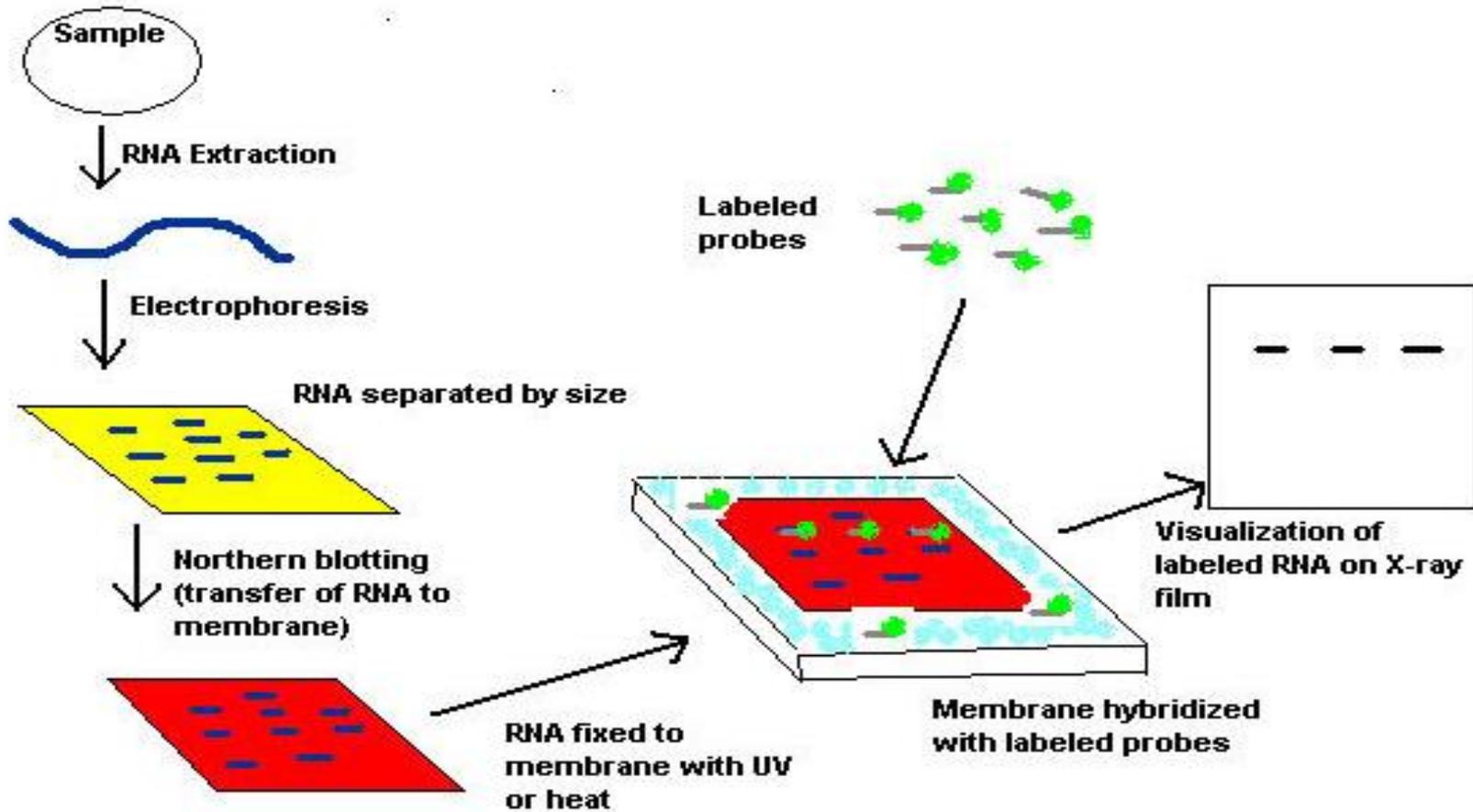
## **But**

- Détermination des gènes qui sont actifs dans les différents types cellulaires.**
- Pour repérer l'expression d'un gène dans un tissu, dans des conditions particulières de l'environnement...**

## **Méthodologie**

- pas besoin de digérer les ARNs par les enzymes de restriction.**
- séparation des ARNs selon leur taille par migration dans un gel d'agarose contenant un agent dénaturant (formamide)**
- Les étapes de transfert et d'hybridation similaires à celles utilisées pour l'ADN**

# Méthode du Northern blot



# Méthode du Western blot

Séparation des protéines par électrophorèse sur gel, transfert sur membrane et détection à l'aide d'anticorps marqués.

# Les puces d'ADN

## Bio puces, DNA chips, DNA micro arrays

Support miniaturisée (membrane de nylon soit une plaque de verre, de quelques cm<sup>2</sup> de surface sur lequel sont greffés plusieurs dizaines de milliers d'oligo nucléotides de séquences connues (sondes)

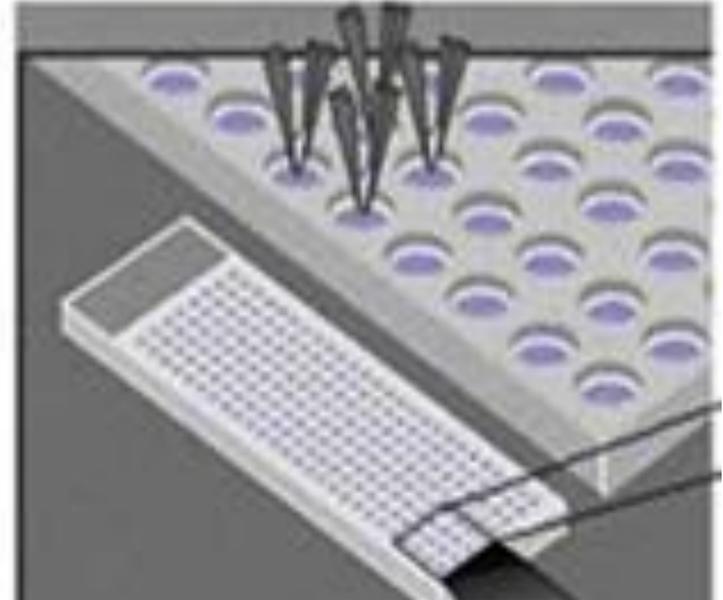


Puce à ADN verre

# **Les puces d'ADN**

## **Méthodologie**

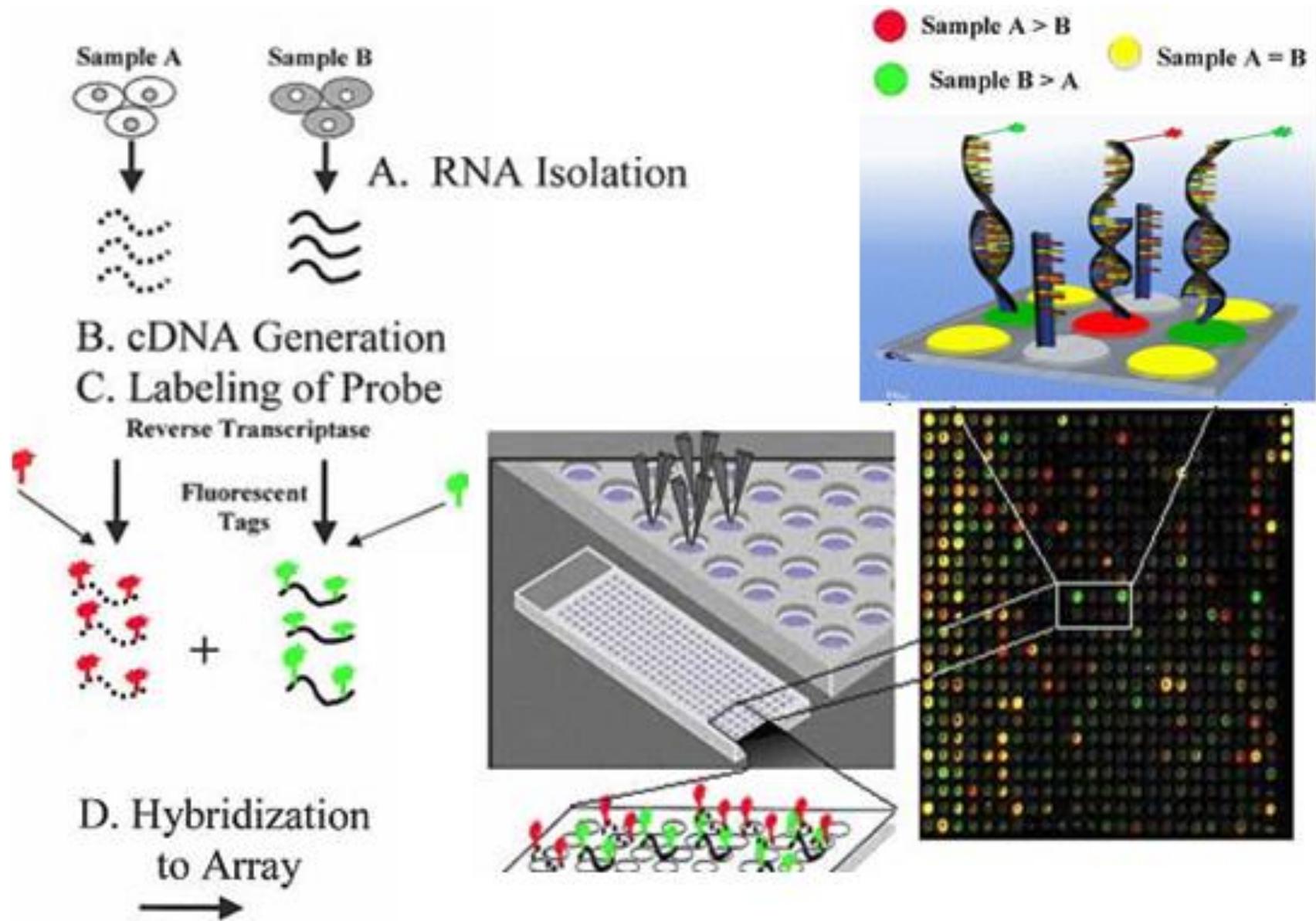
- Grace a une micropipette, on dépose des milliers de fragments d'ADN**
- Chaque point de la puce représente une sonde précise,**
- Reconnaissance entre l'ADN cible de l'échantillon et la séquence complémentaire d'ADN sur la puce,**
- les 2 fragments s'apparient.**



## **Remarque**

- Les fragments d'ADN cible ou la sonde sont marqués par un agent soit radioactif (isotopes  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ), soit fluorescent.**
- Le signal de chaque spot est enregistré soit avec un compteur spéciale (dans le cas de radioactivité) soit par un scanner (fluorescence)**

# Les puces d'ADN



# Application de la puce d'ADN

- Analyse du génotype
- Analyse du transcriptome
- Diagnostic des facteurs de risques dans un très grand nombre de pathologies (cardiovasculaire, cancers, vieillissement .....)
- Utilisation en pharmacologie pour la mise au point de nombreux médicaments
- Détection de nombreux contaminations par des microorganismes et des organismes génétiquement modifiés dans l'agroalimentaire

# **Technique du Dot blot**

**Utilisée pour l'ADN et pour l'ARN, permet de les quantifier sans digestion enzymatique de restriction, ni séparation préalable sur gel d'électrophorèse**

**Un échantillon d'acide nucléique est dénaturé**



**Déposer sur un filtre de nylon**



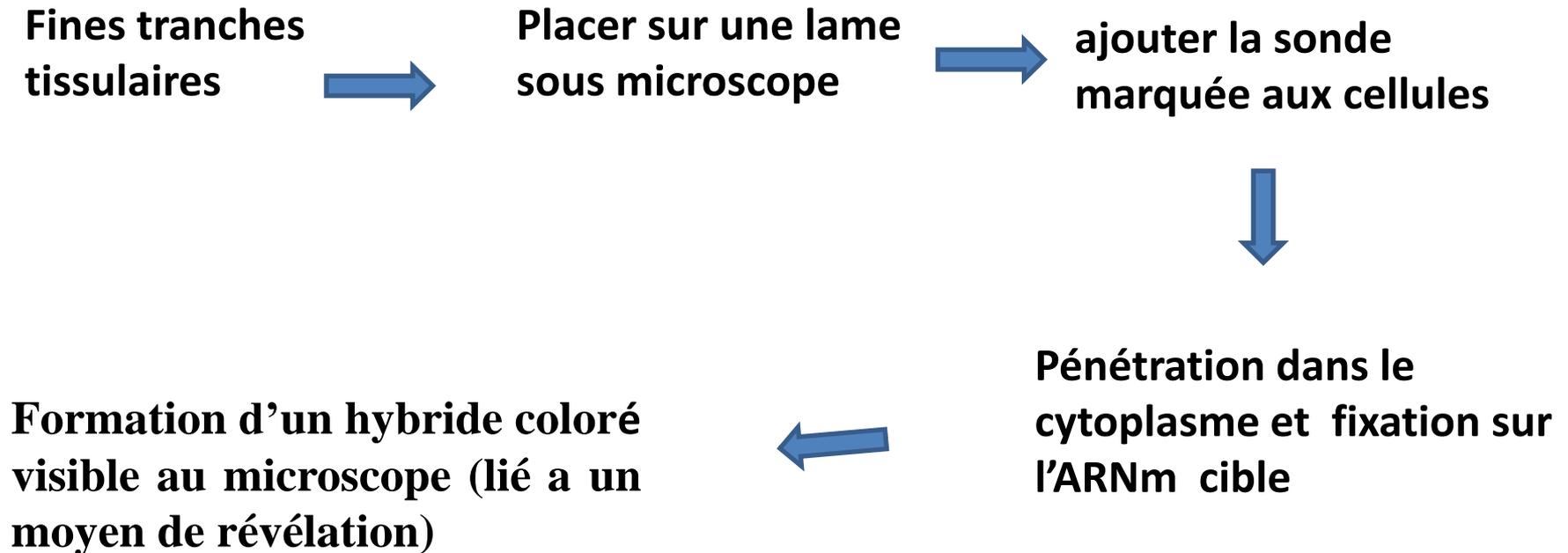
**réaliser directement une hybridation avec les sondes radioactives**

**lavage la révélation est réalisée par autoradiographie**



# **Hybridation in situ**

- Permet la détection directe des acides nucléiques dans des cellules intactes ou des tissus (coupes histologiques)**
- plus appliquée dans l'étude de l'expression des gènes (ARNm spécifiques)**



# Hybridation in situ

**Marquage des sondes et révélation**

```
graph TD; A[Marquage des sondes et révélation] --> B[Sondes chaudes = (initium, H3, P32, P33, S35)]; A --> C[Sondes froides]; B --> D[Autoradiographie]; C --> E[Sondes fluorescentes]; C --> F[non fluorescentes (-la biotine, -digoxigénine -phosphatase kinase)]; E --> G[fluorescence]; F --> H[Streptavidine pour la biotine];
```

**Sondes chaudes =  
( initium, H3, P32,  
P33, S35)**

**Sondes froides**

**non fluorescentes  
(-la biotine, -  
digoxigénine  
-phosphatase kinase)**

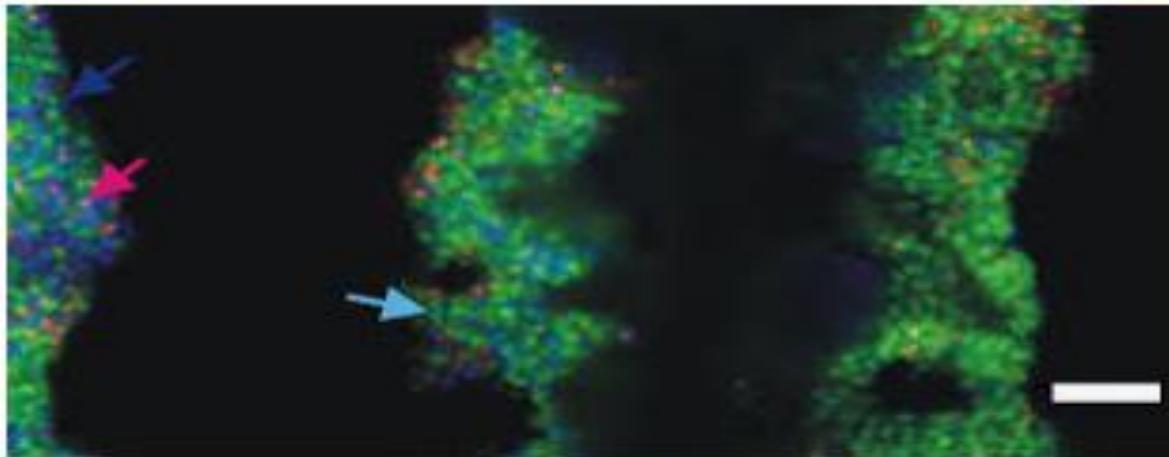
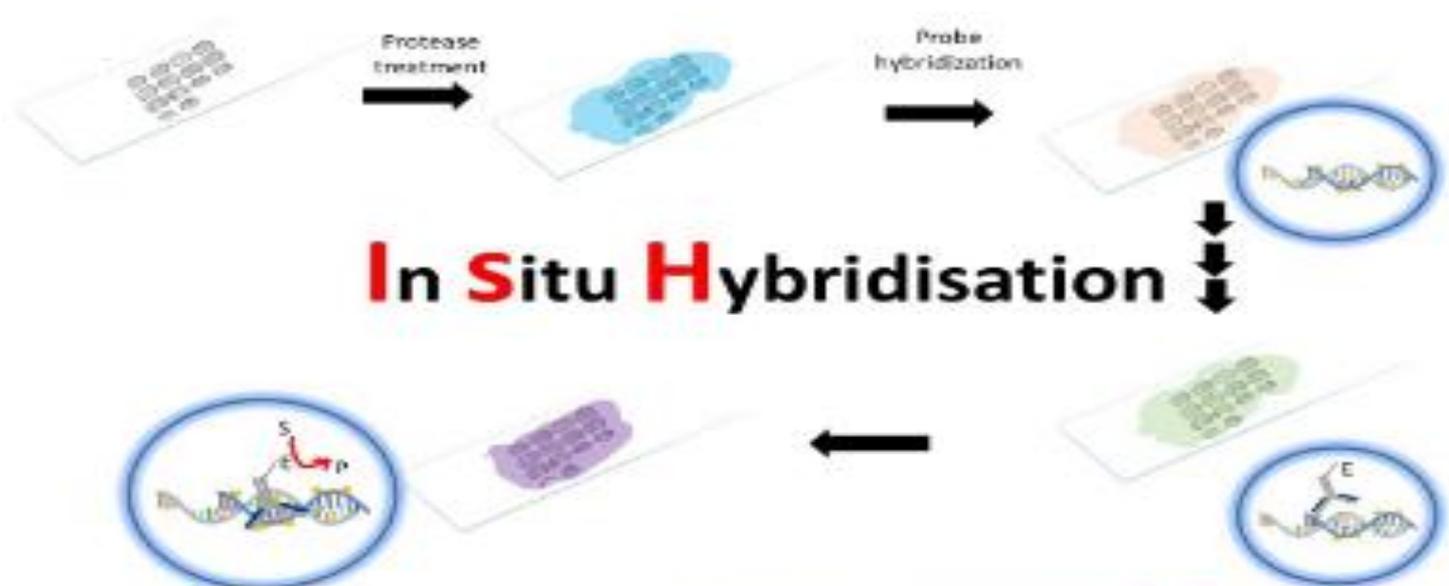
**Sondes  
fluorescentes**

**Autoradiographie**

**fluorescence**

**Streptavidine  
pour la biotine**

# Hybridation in situ



# Hybridation in situ

## Exemples des techniques variantes

### FISH

(hybridation avec fluorescence insitu)

hybrider la sonde fluorescente avec les chromosomes dans la cellule

identifier la position exacte d'un gène sur le chromosome

### Hybridation sur colonies

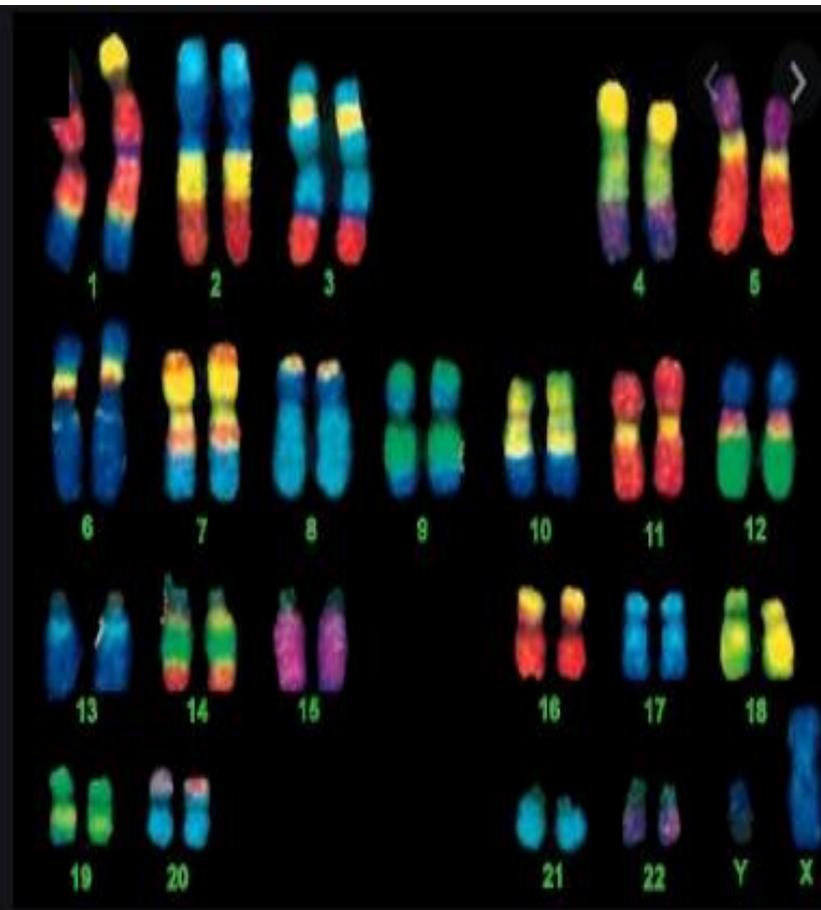
transférer les colonies existantes des boites de pétrie par un filtre ou une membrane

ajout des sondes et hybridation

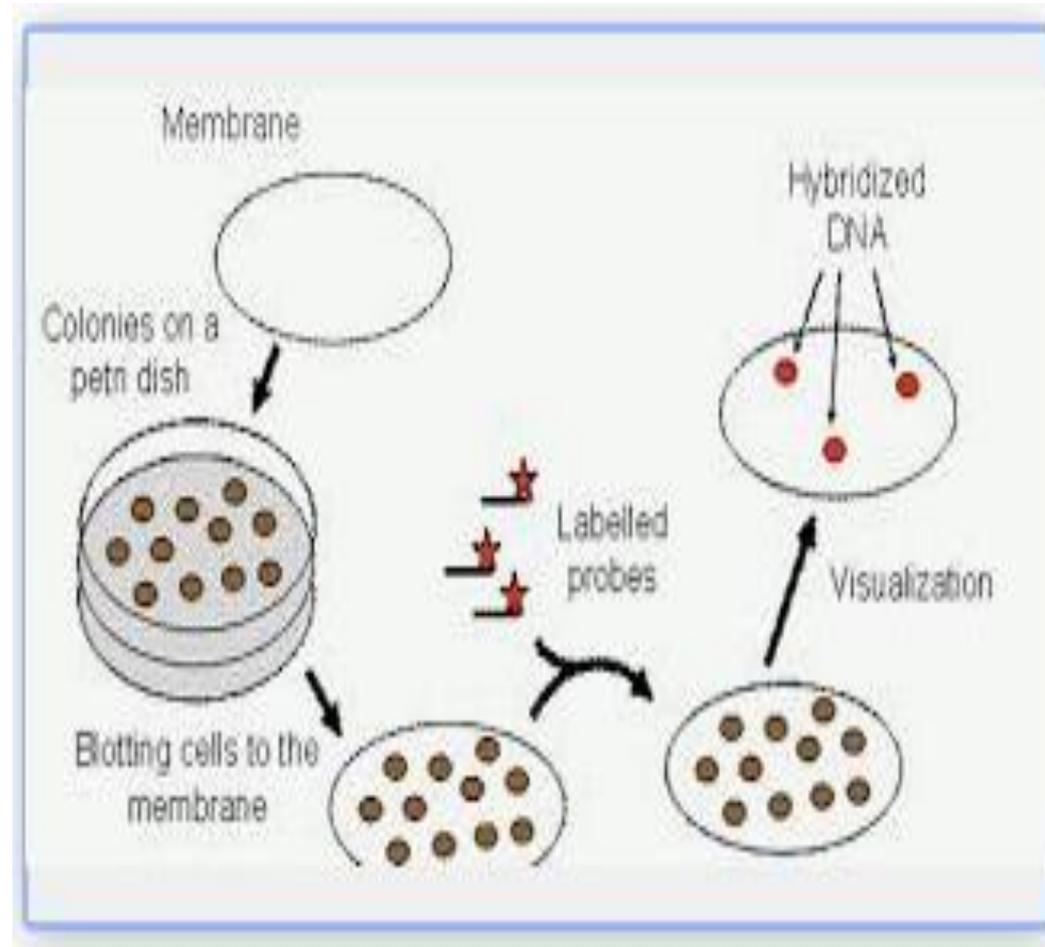
Identification du microorganisme (empreinte génétique)

# Hybridation in situ

## Exemples des techniques variantes



Caryotype obtenu par FISH



Hybridation sur colonies