

Hybridation moléculaire

Définition : 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 (**ADN-ADN = Homoduplex**) ou (**ADN-ARN = Hétéroduplex**). 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**).

Les 2 séquences peuvent être **totalelement complémentaire**, on parle d'hybridation **homologue** et il n'y a alors pas de mésappariement et la séquence est alors **stable**. On peut également avoir des séquences **partiellement complémentaires**, l'hybridation est alors **hétérologue** et il peut y avoir des **mésappariements** dans la séquence qui est alors **instable**.

L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico chimiques précises. Le brin, dont on connaît au moins une partie de la séquence, est **une sonde**, l'autre brin, celui que l'on souhaite caractériser constitue **la cible**. L'un des deux brins est marqué par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal.

On distingue 2 types de techniques d'hybridation :

- techniques directes ou « in situ » : sans extraction de l'ADN
- techniques indirectes : nécessite l'extraction de l'ADN.

I. Rappels sur le principe de la réaction d'hybridation

I.1 Notion de température de fusion de l'ADN.

I.1.1. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

Lorsque l'ADN double brin est **chauffé** à une **température** dite de **fusion** ou **T_m** (melting temperature), les deux brins se **séparent** suite à la **rupture** des liaisons hydrogènes qui les maintiennent appariés. La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire.

La **T_m** ou la température de demi dénaturation est la température **à laquelle 50% de l'ADN est dénaturée** ou déroulée.

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 (Le passage de la forme bicaténaire à la forme monocaténaire s'objective très facilement par simple mesure de la variation de densité optique à 260 nm, le coefficient d'extinction de l'ADN monocaténaire étant sensiblement plus élevé que celui de l'ADN bicaténaire (**effet hyperchrome**). (La séparation des brins augmente fortement leur capacité à absorber les UV autour de 260 nm, **les simples brins absorbent beaucoup plus les UV que les doubles brins**, ce

phénomène résulte du fait que dans le DNA bicaténaire les bases sont parfaitement ordonnées dans des plans parallèles, par

conséquent les bases se chevauchent partiellement, ce masquage induit le phénomène du **quenching**, à l'inverse, le DNA simple brin n'a pas de structure ordonnée, les bases se masquent moins, le **quenching** est **minimal**, donc l'**absorbance** est **maximal**). Le **point d'inflexion** correspond à ce qu'on appelle la température de fusion (T_m).

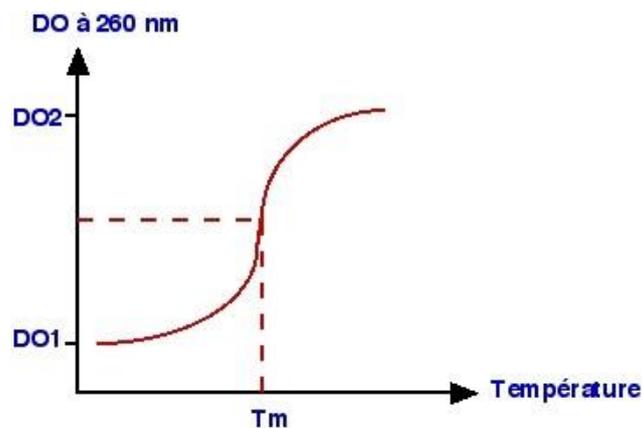
Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A : T et 4°C par couple G : C.

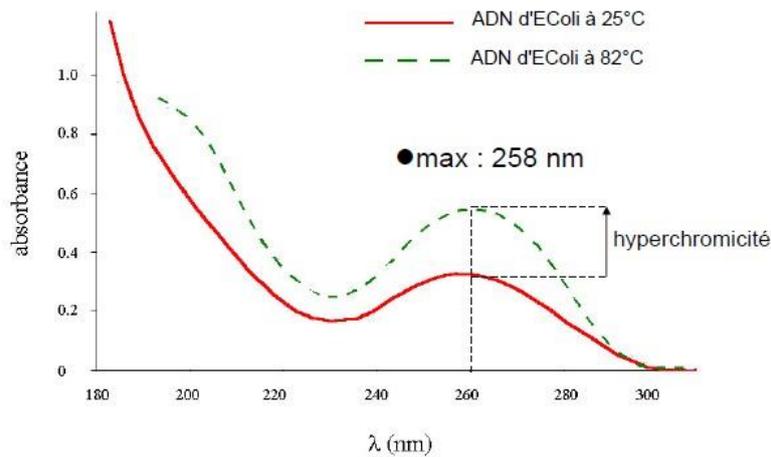
$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C).$$

A partir de $N = 20$, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au-delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) \times (1 + [(N-20)/20]).$$

Remarque ; On peut rompre les liaisons hydrogènes entre bases appariées d'une molécule d'ADN bicaténaire en chauffant la molécule (**Dénaturation thermique**) ou en manipulant les conditions de milieu : solutions **alcalines à pH 12,5** avec NaOH, solutions concentrées **d'urée ((NH₂)₂CO)** ou de **formamide (HCONH₂)** (**Dénaturation chimique**).





I.2. Facteurs influençant la température de fusion

La température de fusion T_m dépend de deux facteurs principaux :

1) Nombre de liaisons hydrogènes (H) : Le nombre de liaisons H lui-même dépend de :

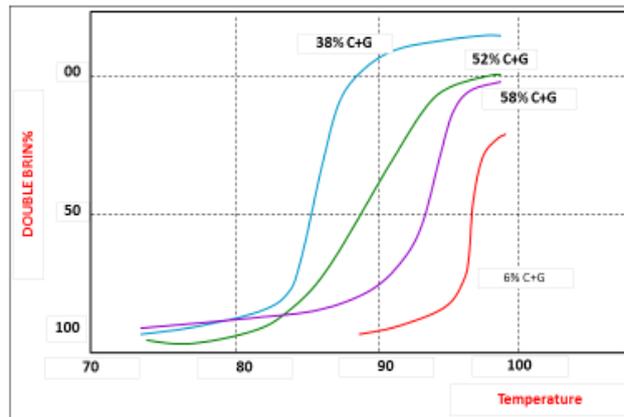
A) La longueur du fragment : plus l'ADN est long plus il y a d'interactions hydrogène à rompre, Toutefois, Il en résulte que **la température de fusion sera d'autant plus grande** que l'ADN sera plus **long**. le nombre de liaisons H est important en dessous de 150 à 200 liaisons. Au-delà, la dénaturation devient principalement un **phénomène coopératif** (c'est-à-dire qu'il y a un effet d'amplification de la dénaturation lorsque l'ADN commence à être dénaturé), et le nombre de bases n'est plus important. **On tiendra donc compte de la longueur des fragments principalement pour l'hybridation d'oligonucléotide** (l'effet de longueur n'est important que pour les petits fragments ce qui résulte caractère coopératif du phénomène de fusion d'ADN).

Pour des ADN suffisamment longs (> 200 pb), la T_m peut être estimée par la relation suivante :

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% G+C).$$

B) La composition en bases : **l'augmentation de la proportion en GC augmente la T_m .** Comme on a dit précédemment qu'il y a 3 liaisons H entre les bases G et C et 2 entre les bases A et T. Donc plus la proportion en GC est importante, plus T_m sera élevée. Les régions riches en AT qui sont les premières à fondre puis celles riches en GC.

- ADN des mammifères a une concentration de GC (39 à 40) %, $T_m = 87^\circ\text{C}$.
- Pneumococcus a une concentration de GC ~ 40 %, T_m de 85°C .
- E. Coli (une bactérie) a une concentration de GC % = 50, $T_m = 92^\circ\text{C}$.
- Micrococcus phlci (bactérie) a une concentration de GC % = 70, $T_m = 98^\circ\text{C}$.



Tm Vs pourcentage G:C

Remarque : l'emploi de chlorure de **tétraméthyl-ammonium (substance chaotrope)** rend le Tm indépendant des pourcentages d'AT et de CG.

C) la présence de mésappariements : Les mésappariements abaissent la Tm, puisqu'au niveau du mésappariement, il n'y a pas de liaison H (Lorsqu'il existe des mésappariements il faut soustraire de la Tm calculée autant de degrés °C que le pourcentage de séquence non-appariée de l'oligonucléotide.).

En pratique, comme la composition en base, ce phénomène n'a d'application pratique que pour les petits fragments (<50pb).

2) La composition du milieu

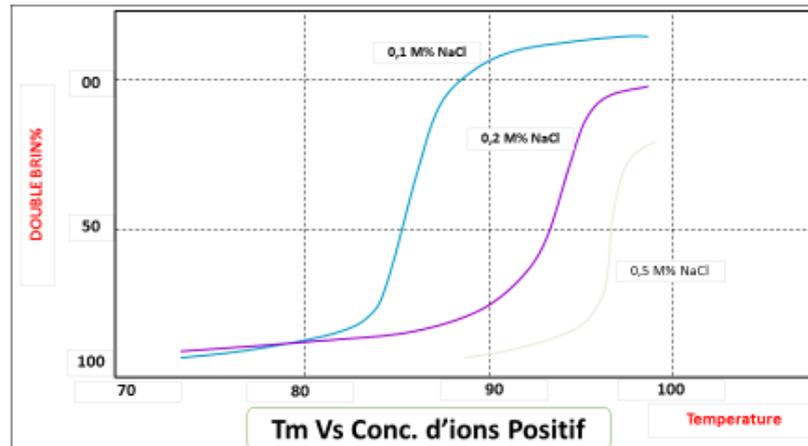
A) La force ionique : il faut tenir compte la concentration en sodium du tampon d'hybridation. L'augmentation de la concentration en cations monovalents tel que le Na-Cl joue sur la Tm. Le NaCl masque les charges négatives des phosphates et ainsi diminue les forces de répulsion électrostatique entre les deux brins. Ainsi **moins il y a de sel**, plus les forces de répulsion sont importantes, **plus la Tm est bas**.

Les cations stabilisent ainsi la double hélice. Quand la concentration en NaCl est **faible**, l'ADN est **moins stable**, il faudra **moins** chauffer pour provoquer la dissociation des deux brins).

Dans ces circonstances où la force ionique est faible, on parle de conditions stringentes. L'intérêt de réaliser une hybridation dans ces conditions, c'est qu'un simple mésappariement entre le sonde et la séquence ciblée empêche que l'hybridation ait lieu. La meilleure spécificité d'hybridation est donc obtenue dans des conditions stringentes.

A haute concentration (>1M), les cations monovalents sont sans effets notable.

(1M NaCl)



B) Le pH est aussi important : La Tm diminue quand le pH augmente. A pH alcalin tous les groupements phosphates exposent une charge négative, les forces électrostatiques de répulsion augmentent, la structure bicaténaire est moins stable, les deux brins se séparent facilement à température ambiante, on utilise souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.

C) Certains composés tels que la formamide ou l'urée abaissent le Tm : Ces composés dénaturant forment des liaisons H avec les bases et donc entrent en compétition avec les liaisons interbases. Les deux chaînes sont alors moins fortement associées, les deux brins se séparent plus aisément.

Lorsqu'on travaille en présence de formamide, il faut encore diminuer la Tm en fonction de la concentration de l'amide donc : $T'm = Tm - 0,6(\% \text{ formamide})$.

La concentration habituellement utilisée est de **50%**, ce qui correspond à un abaissement de Tm de 30 C° environs.

Dans tous les cas l'ensemble des paramètres affectant la température de fusion doit impérativement être pris en compte sous peine de résultats erronés, une formule empirique relie l'ensemble de ces paramètres à la Tm :

$$Tm = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [Na^+]) + 0,41(GC\%) - \% \text{ mismatch} - (675/N) - 0,65(\% \text{ de formamide})$$

D'où N est la longueur en base (pb).

II) La renaturation ou l'hybridation

La dénaturation thermique de l'ADN **peut être renversée** par le refroidissement de la solution, dans ce cas la **vitesse du refroidissement** influe sur le **résultat**. Ainsi, si la séparation des brins de l'ADN est suivie d'un refroidissement **progressif et lent**, il y aura **réassociation progressive** des deux brins complémentaires de l'ADN (**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 d'ADN monobrin si celle-ci lui est complémentaire**) : c'est le phénomène de **l'hybridation**. Cette réassociation peut s'effectuer entre des séquences d'ADN et d'ARN ce qui permet d'obtenir des **hybrides ADN/ARN**.

Si par contre le refroidissement est **brutale et rapide** (en trempant dans de l'eau glacée p. ex.) les **simples brins se replieront sur eux-mêmes**, engendrant des structures stables partiellement bicaténares.

II.1. Les facteurs affectant l'hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire dépend d'un grand nombre de facteurs :

1) concentration du DNA et le temps, notion de Cot et de Rot

Tout d'abord le temps : Plus le temps de réaction **est long**, plus la **probabilité** d'appariements pour des séquences complémentaires **augmente**.

Secondairement, la concentration en acides nucléiques. Plus la concentration en acides nucléiques est **élevée**, plus la **probabilité** de rencontres entre des séquences complémentaires est **élevée**.

En d'autres termes, **plus la concentration de l'ADN dans la solution est élevée et plus le temps de réaction est long, plus la probabilité que les séquences complémentaires s'hybrident**.

En pratique on introduit le produit **temps x concentration** en acides nucléiques. Ce paramètre est appelé **Cot** pour les hybridations entre fragments **d'ADN** et **Rot** pour les hybridations **d'ARN** et **d'ADN**. On utilise souvent les valeurs de **Cot 1/2** et de **Rot 1/2** qui correspondent respectivement à 50% d'hybridation dans le cas d'hybridation moléculaire d'ADN ou d'ADN-ARN.

Notion de la Stringence et l'hybridation spécifique :

On désigne par **stringence** le **degré d'empêchement des hybridations non spécifiques**.

Elle définit les conditions physico-chimiques d'une hybridation. Une **forte stringence** (forte température, faible salinité, 10% formamide) permet une hybridation entre des molécules **très homologues** et une faible stringence (faible température, forte salinité, 0% formamide) permet une hybridation entre des molécules peu homologues.

Autrement dit, la stringence est proportionnelle à la température et à l'inverse de la concentration en cations monovalents (Na^+ par exemple). Des conditions très stringentes (T° élevée, concentration en Na^+ faible) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais permettent une hybridation spécifique, tandis que des conditions peu stringentes (T° plus faible, concentration en Na^+ plus élevée) permettent une hybridation moins spécifique.

La stringence traduit le degré d'homologie des fragments à hybrider. Dans des conditions de forte stringence, n'hybrident que des fragments de DNA homologues,

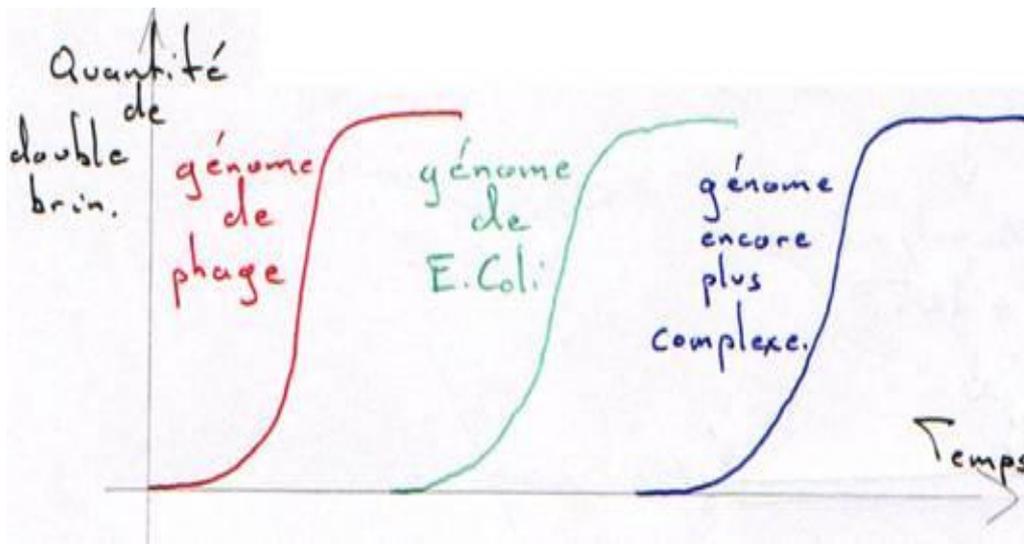
Augmentation de la stringence ↔ diminution de la concentration en NaCl et augmentation de la température ↔ hybridation spécifique.

2) La température : elle favorise la rencontre des deux séquences complémentaires, donc la vitesse d'hybridation. On note que les meilleures vitesses d'association sont observées pour des **températures inférieures à 25% de la T_m** pour les grands fragments, pour les petits fragments on peut adopter la formule suivante la température d'hybridation = $T_m - 5^\circ\text{C}$.

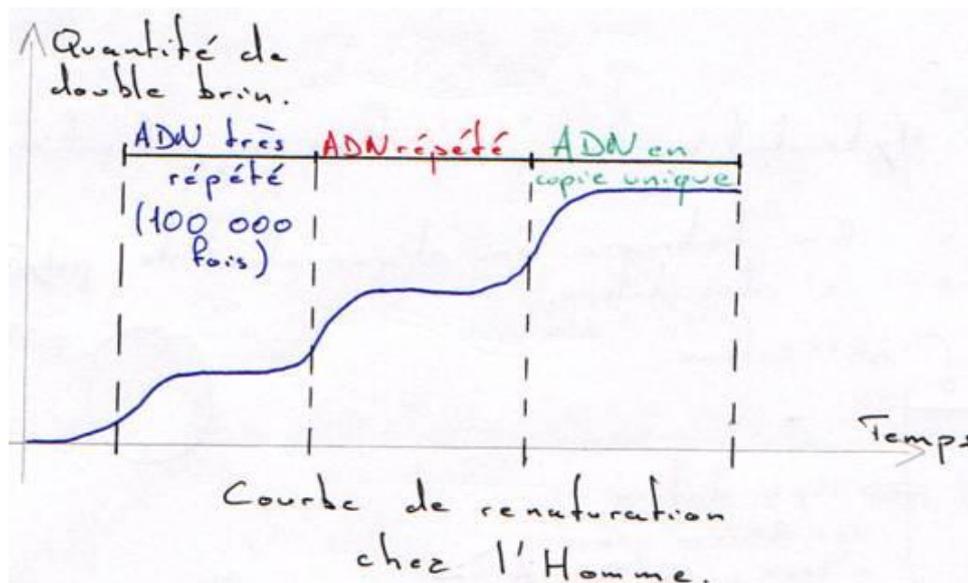
3) La taille du fragment nucléique : Dans le cas où les deux séquences complémentaires sont parfaitement identiques, la vitesse de réassociation de ces deux brins augmente proportionnellement avec la racine carrée de la longueur des fragments considérés.

4) La nature des acides nucléiques : La vitesse de réassociation dépend à la fois de la nature de l'hybride et de sa concentration. Si l'hybridation concerne un mélange ADN/ADN et si l'ADN est en excès par rapport à l'ARN, la vitesse d'hybridation ARN/ADN est 5 fois plus faible que la réassociation ADN/ADN. En revanche, si l'ARN est en large excès, la vitesse de réassociation sera identique à celle de ADN/ADN.

5) La complexité des séquences : plus la complexité de séquences est grande (c'est à dire plus la solution contient des séquences différentes) plus la probabilité de rencontrer la séquence complémentaire est petite, donc le temps de réassociation sera long.



La réaction de **renaturation** est **d'autant plus lente que l'ADN est long et complexe**. De même Au cours de l'hybridation, une séquence hautement répétée se réassocie plus rapidement qu'une séquence moyennement répétée. Cette vitesse de réassociation est proportionnelle au nombre de copies. Lors d'expériences de réassociation, les séquences uniques s'apparient en dernier, pour une valeur de Cot plus élevée.



6) La force ionique : la concentration en NaCl joue un rôle important dans les réassociations des segments complémentaires. Pour une concentration de NaCl qui avoisine 1M, la vitesse de réassociation peut être multipliée par un terme de 10. Jusqu'aux environs de 1,2M et au-delà, la force ionique sera sans effet.

