

Séquençage de l'ADN

Définition

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.

C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie.

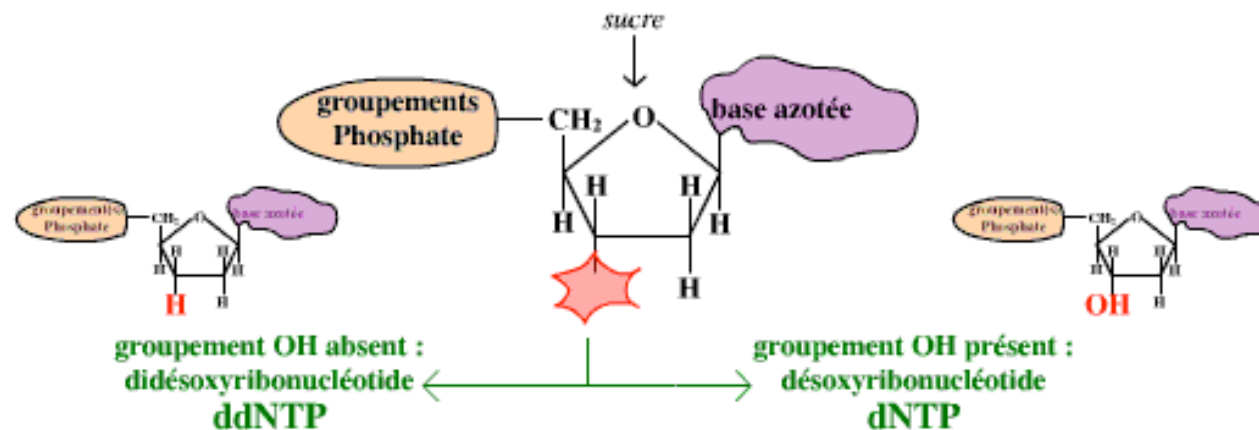
Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

Le séquençage selon la technique de Sanger

Les ADN polymérase sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (**ddNTP**) au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP).

Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

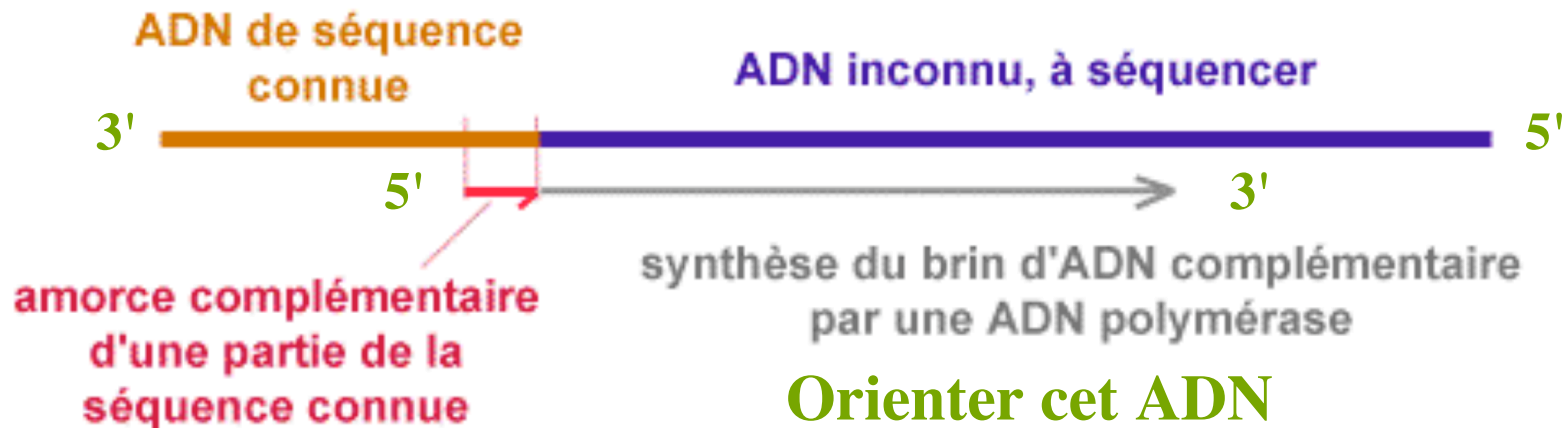


Deux types de nucléotides triphosphates

Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer = **amorce**
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



15-25 nt

L'ADN polymérase synthétise dans le sens 5' vers 3'.

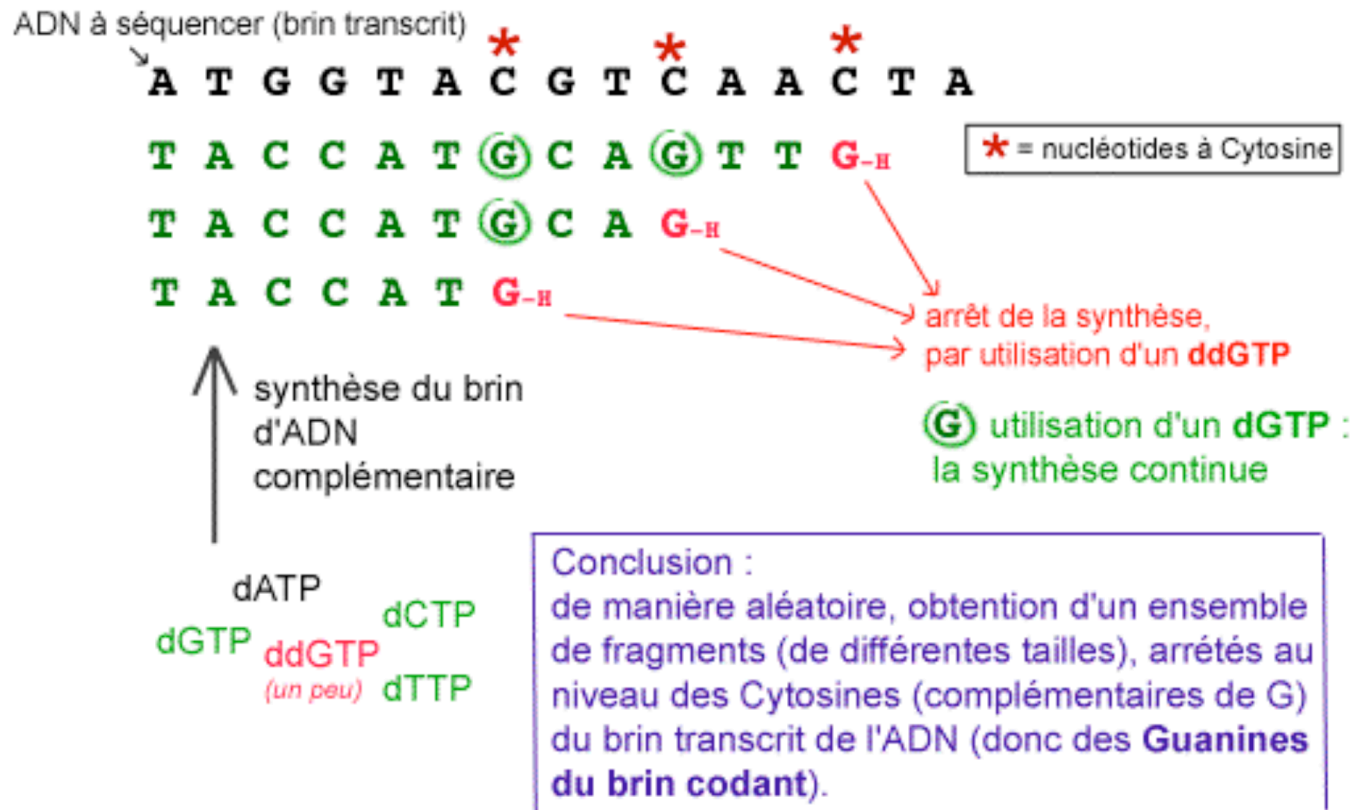
Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

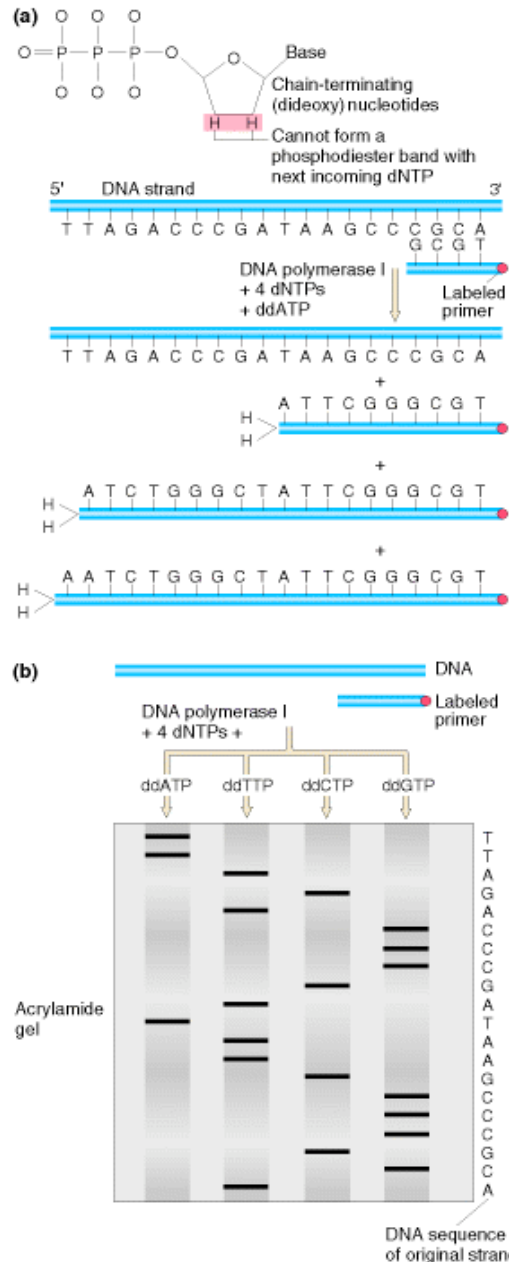
- le fragment qui doit être séquencé
 - un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer
 - les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
 - l'ADN polymérase
 - dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif
- > son incorporation aléatoire stoppant la synthèse
- On obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné

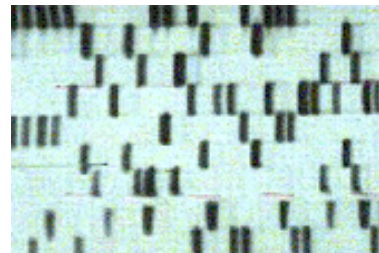
NB synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine sur la séquence



Lecture de la séquence -séquençage "à la main"-



- Électrophorèse sur gel d'acrylamide.
- Détection des fragments d'ADN, soit en regardant la fluorescence, soit en exposant un film photographique au gel selon le marquage du ddNTP
- Suivant la taille des gels la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ



L'automatisation du séquençage

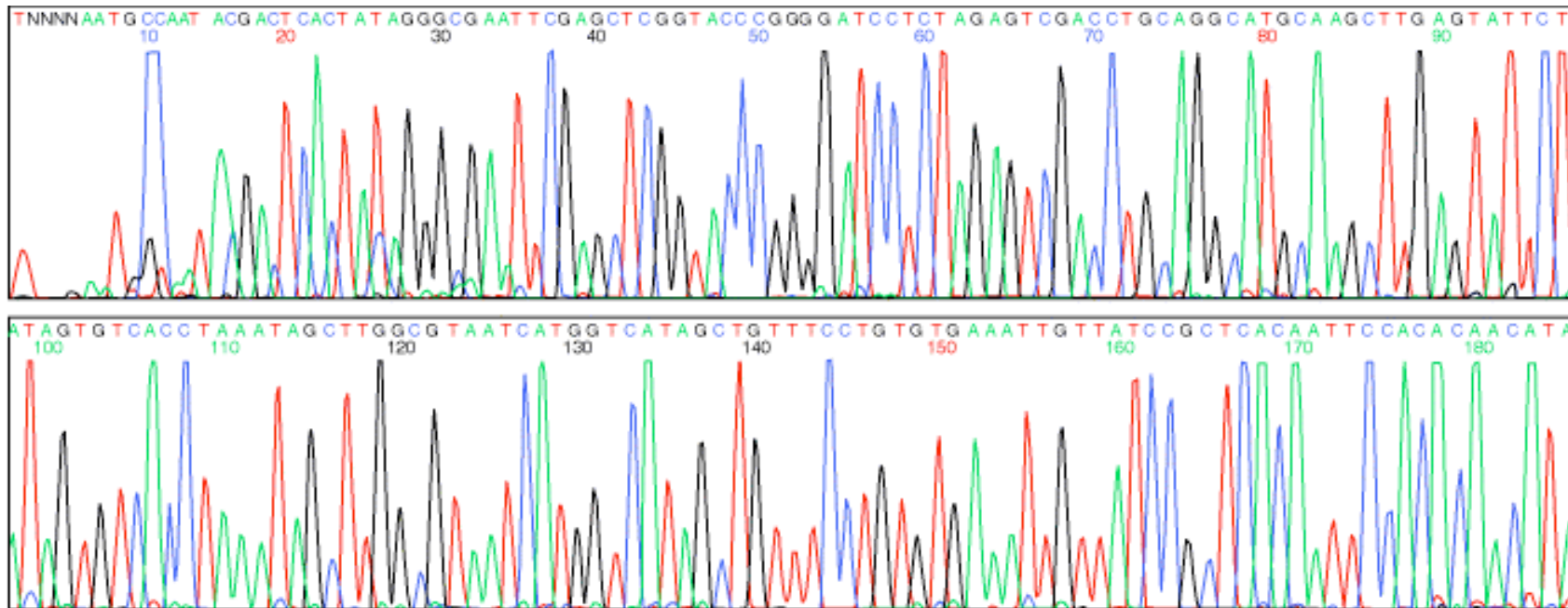


↑ Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

Séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire.

Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique



Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants !

Sondes et hybridation

Les différents types de blots (transferts)

✗ Définition

✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage

✗ Principe de l'hybridation

✗ Différents types d'hybridation

Hybridation *in situ*

Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

Hybridation sur coupe de tissu

✗ Southern-blot

✗ Northern-blot

✗ Dot-blot

✗ Puces à ADN (microarray)

✗ Western-blot

Hybridation d'acides nucléiques (AN) ou de protéines

1. Notion de complémentarité: reconnaissance moléculaire
complémentarité de séquence -AN- ou de structure -protéine-

2. Complexe sonde-cible (hybride)

✗ ADN-ADN (sonde= complémentaire antiparallèle)

✗ ADN-ARN

✗ protéine-protéine (complexe Ac/Ag)

3. Hybridation - est spécifique (sonde /cible)

- a lieu même en présence d'un large excès de
molécules similaires mais non identiques

--> **détection d'une molécule d'ADN ou d'ARN, ou de protéine dans un mélange en contenant des milliers de similaires "trouver une aiguille dans une meule de foin"**

✗ Définition

✗ **Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage**

✗ Principe de l'hybridation

✗ Différents types d'hybridation

Hybridation *in situ*

Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

Hybridation sur coupe de tissu

✗ Southern-blot

✗ Northern-blot

✗ Dot-blot

✗ Puces à ADN (microarray)

✗ Western-blot

Les sondes d'acides nucléiques

✗ fragment d'ADN ou ARN marqué

sonde radioactive (incorporation de nucléotides radioactifs)

sonde froide

✗ générée *in vitro* avec une séquence complémentaire de la séquence recherchée

fragment de restriction

produit PCR

synthèse "commerciale"

Les sondes radioactives -chaudes- (1)

✗ sondes mono ou double brins

✗ Phosphate³² (radio-isotope le + utilisé), Soufre³⁵, H³ (tritium)

✗ Incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués

--> **marquage en 5'**: T4 polynucléotide kinase ajoute un P³² en 5' (sonde peu radioactive)

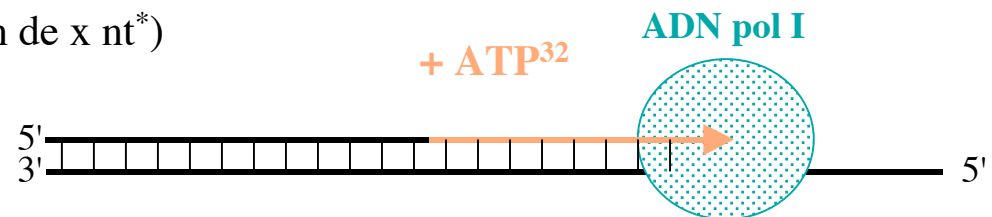
--> **marquage en 3'** :

*avec une ADN polymérase: ADN pol I ou T4, Taq pol(PCR)

(sondes très radioactives car incorporation de x nt*)

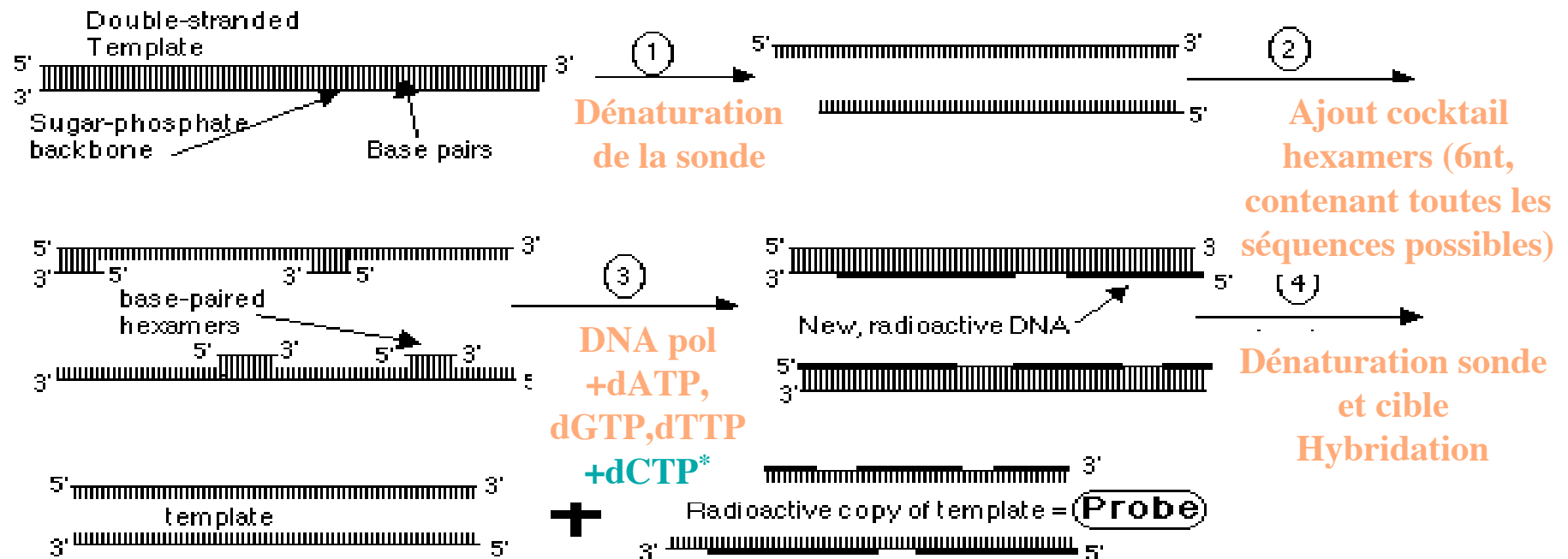
*avec une exonucléase

*avec une terminal transférase



Les sondes radioactives (2)

--> par amorçage au hasard (Random Priming)



--> marquage par "translation de coupure" (Nick Translation): DNaseI (conditions ménagées) pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt, puis ADN pol.I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nt radioactif.

Les sondes radioactives (3)

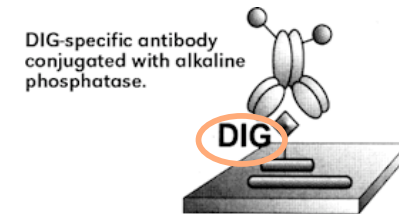
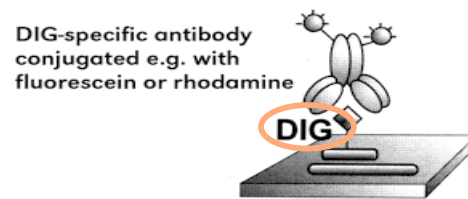
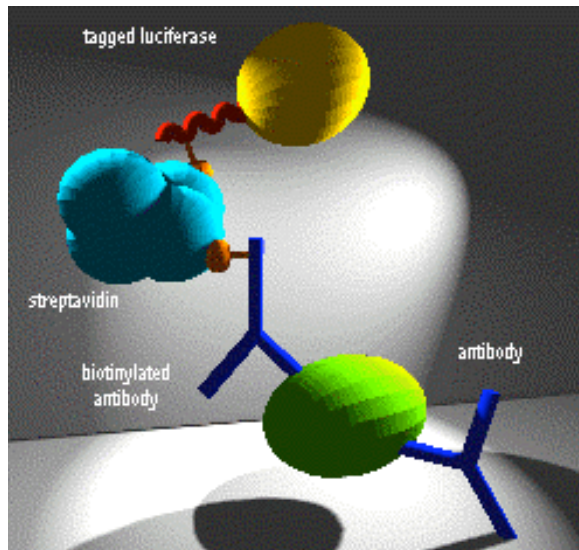
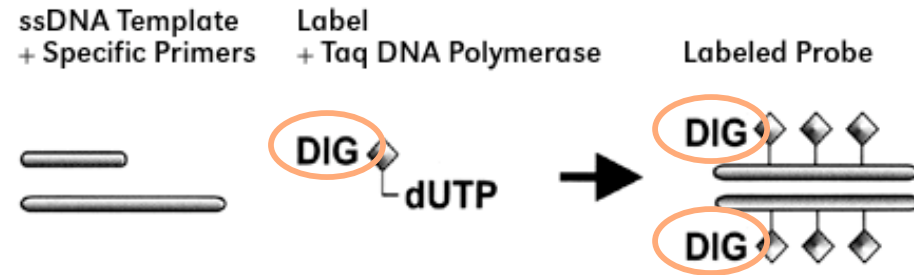
✕ sondes d'ARN (ribosondes) rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN, plus stables

Attention : les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

1. nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, maniement des sondes inconfortable
2. décroissance rapide du P^{32} , d'ou besoin de marquer les sondes fréquemment

Les sondes froides

✗ digoxigénine



✗ marquage par la biotine-streptavidine.

✗ fluorophore

Attention: problème de sensibilité --> leur utilisation ne fait pas toujours l'unanimité...

✗ Définition

✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage

✗ **Principe de l'hybridation**

✗ Différents types d'hybridation

Hybridation *in situ*

Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

Hybridation sur coupe de tissu

✗ Southern-blot

✗ Northern-blot

✗ Dot-blot

✗ Puces à ADN (microarray)

✗ Western-blot

Hybridation peut avoir lieu

✗ en solution

✗ support solide :

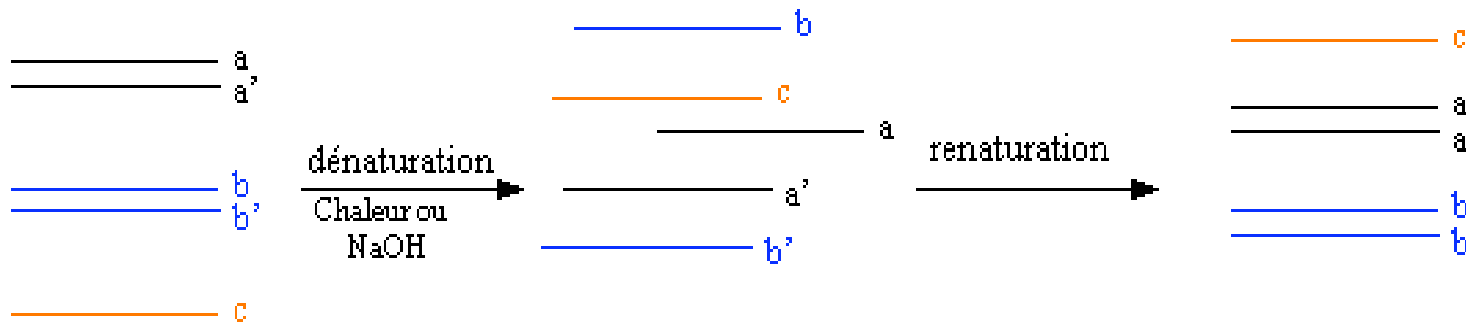
immobilisation sur membrane, sur verre
colonies bactériennes
chromosome
coupe de tissus...

Objectif : détecter la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l'utilisation d'une sonde complémentaire

Dénaturation-renaturation ADN

Principe: Dénaturation (séparation des brins par rupture des liaisons hydrogènes: T_m ou $pH > 12$) **d'ADN double brins de séquences différentes**

puis réassociation spécifique (conditions favorables de T_m et pH)
--> hybridation des ADN simple brin pour former les homoduplex originaux.

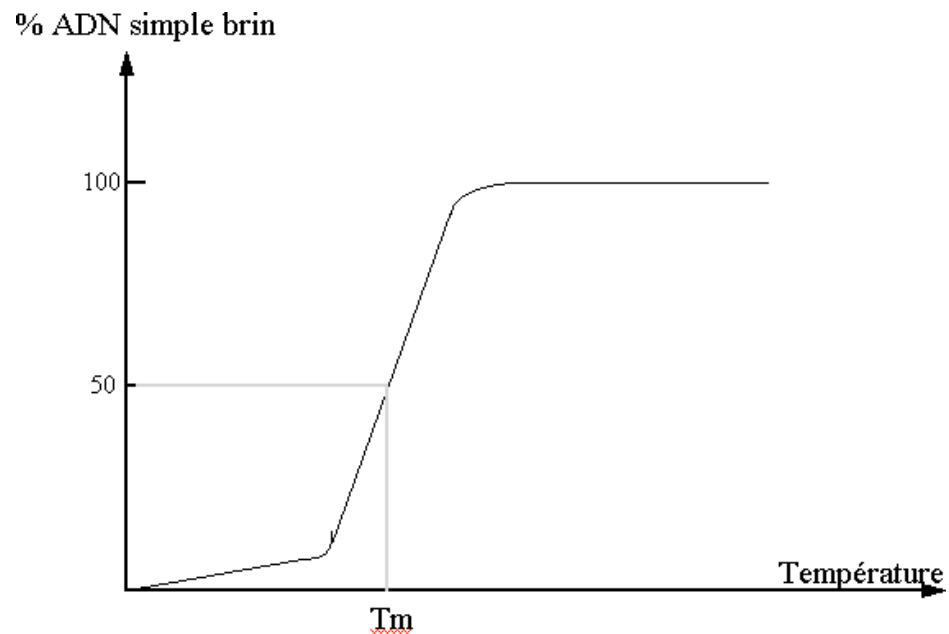


(a,a'), (b,b') = séquences double brin complémentaires

La température de fusion (T_m -melting temperature-)

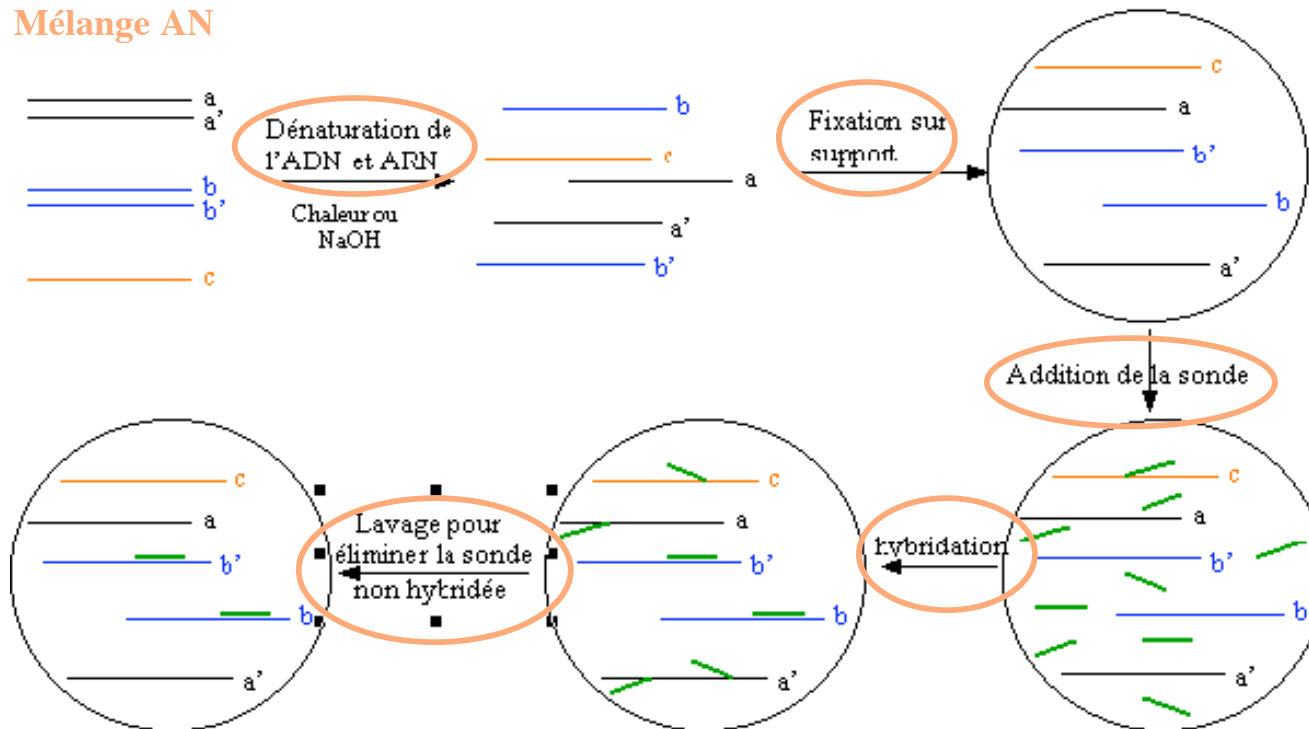
Un fragment d'ADN de séquence donnée a une T_m qui correspond à la température où 50% des fragments sont sous forme simple brin.

T_m dépend de la longueur du fragment d'ADN, de sa composition en bases, de la présence de certains ions dans le milieu.



Hybridation d'acides nucléiques

Mélange AN



Les brins ne peuvent se renaturer entre eux, mais peuvent **s'hybrider avec une sonde marquée** s'il y a complémentarité

Températures d'hybridation et de lavage < à T_m sonde (≈ 5 à 10°C) --> favoriser et conserver l'association de la sonde sur sa cible et défavoriser les mésappariements de la sonde avec une séquence homologue.

- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation

- ✗ **Différents types d'hybridation**

 - Hybridation *in situ*

 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

 - Hybridation sur coupe de tissu

- ✗ Southern-blot
- ✗ Northern-blot
- ✗ Dot-blot
- ✗ Puces à ADN (microarray)
- ✗ Western-blot

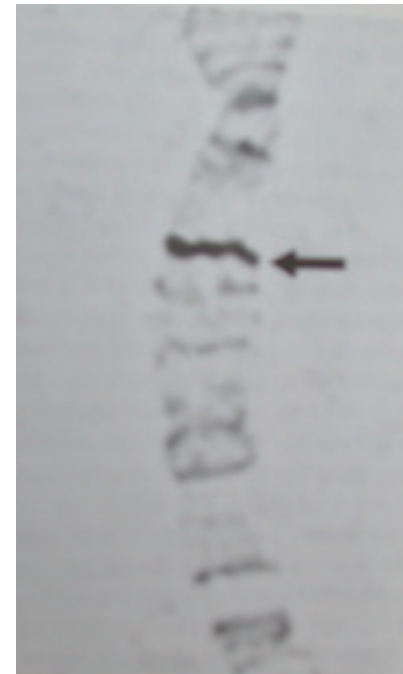
Hybridation *in situ* sur chromosome

✕ **Objectif** : déterminer sur quel chromosome et dans quelle région se trouve le gène dont on possède la sonde.

✕ **En pratique:**

- préparation des chromosomes
- hybridation directement sur les préparations fixées sur lame
- Sonde marquée au tritium (H^3): rayonnement très court, donne donc une localisation fine de la zone émettant la radioactivité.
- résultat lu sous microscope : les signaux positifs apparaissent sous forme de grains noirs disposés sur les chromosomes.

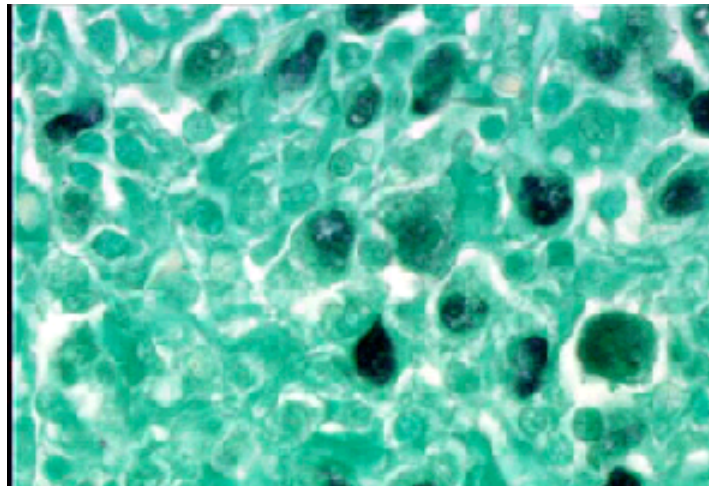
**Détection d'un
gène de Drosophile**



Hybridation *in situ*

✕ **Détection du virus d'Epstein-Barr** à l'aide d'une sonde reconnaissant l'ARN (= génome) du virus

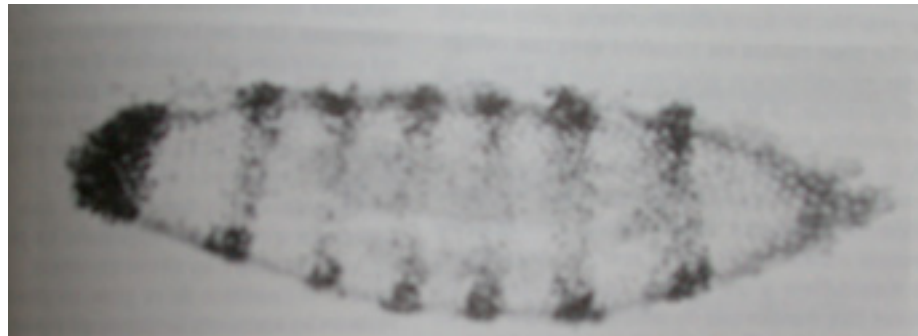
- coloration nucléaire bleu foncée des noyaux infectés
- contre coloration verte des autres noyaux



Indications: Syndromes lymphoprolifératifs et lymphomes

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)

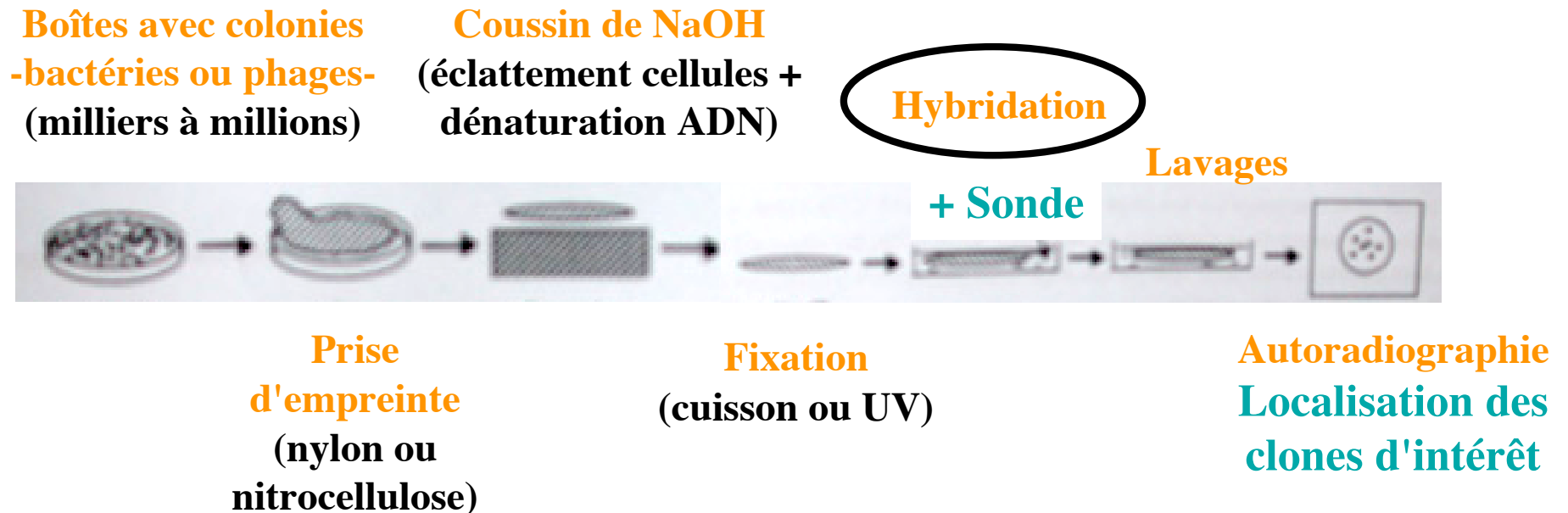


Coupe d'embryon de Drosophile qui a subi une hybridation avec une sonde d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire

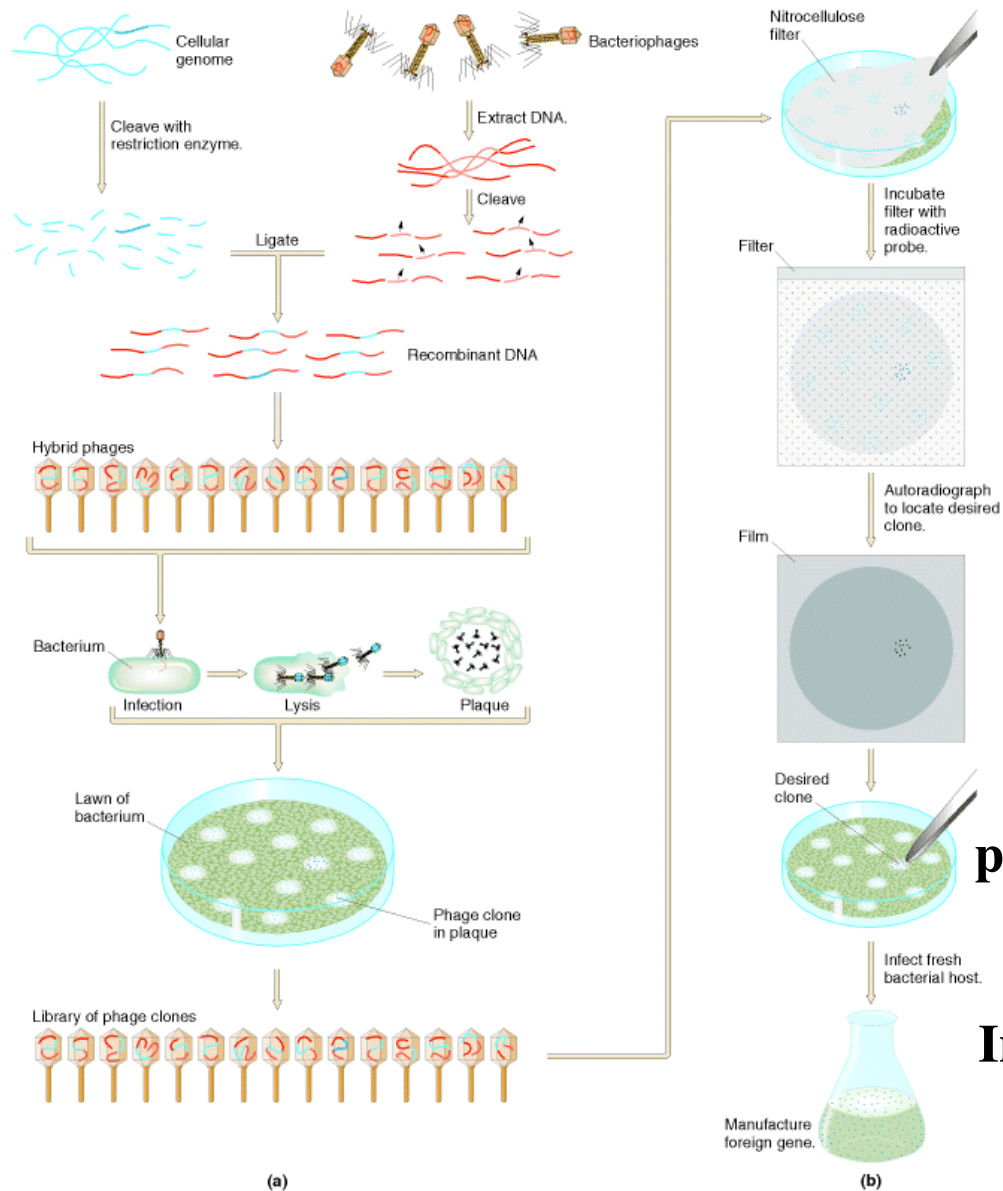
Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

✕ **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**



Criblage d'une banque phagique



Identification du clone d'intérêt

Isolement du phage recombinant sur boîte mère

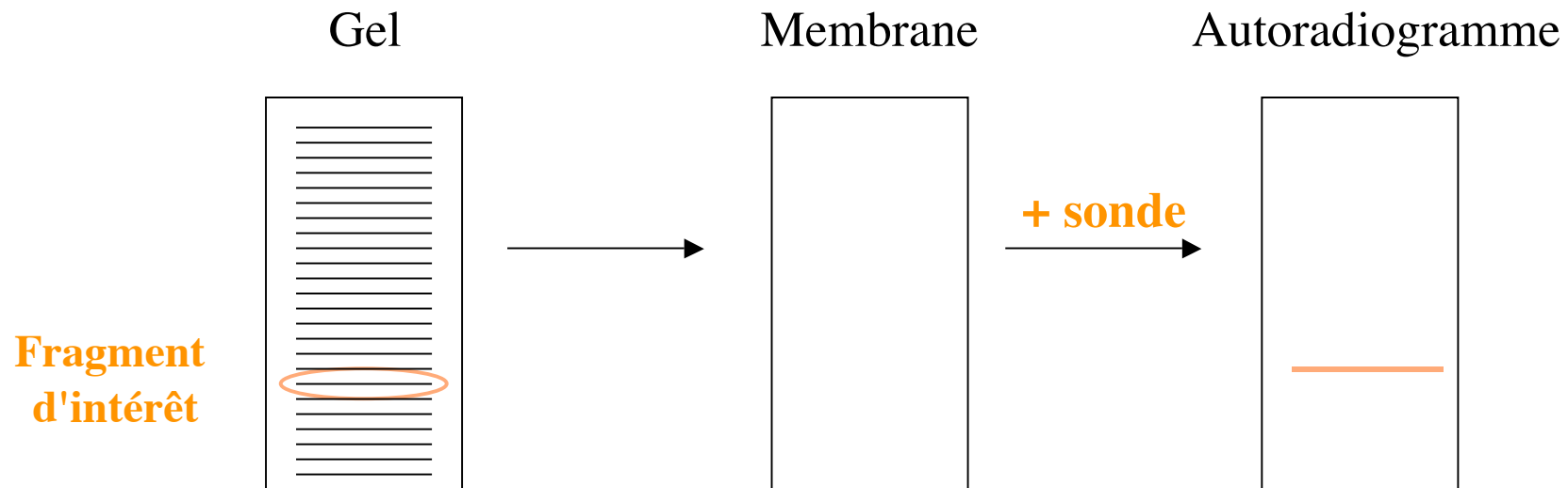
Infection de bactérie pour production massive du clone recombinant

- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
 - Hybridation *in situ*
 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
 - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ **Southern-blot**
- ✗ Northern-blot
- ✗ Dot-blot
- ✗ Puces à ADN (microarray)
- ✗ Western-blot

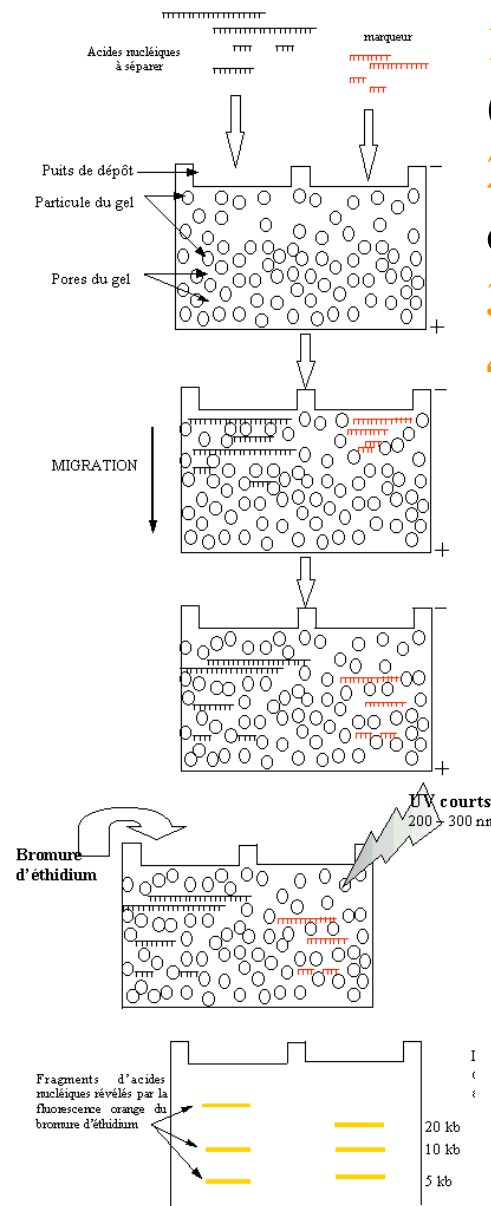
Southern-Blot

But: Détecter la présence de séquences d'ADN spécifiques dans un mélange

Edwin Southern eut l'idée de transférer des fragments de restriction séparés dans un gel, sur une membrane susceptible de subir le traitement d'hybridation



Electrophorèse



1. Mélange d'AN à séparer

(chargés négativement)

2. Dépôt sur gel d'**agarose** (0,5 à 20kb) ou **polyacrylamide** (< 1000b) (%)

3. Marqueur (tailles connues)

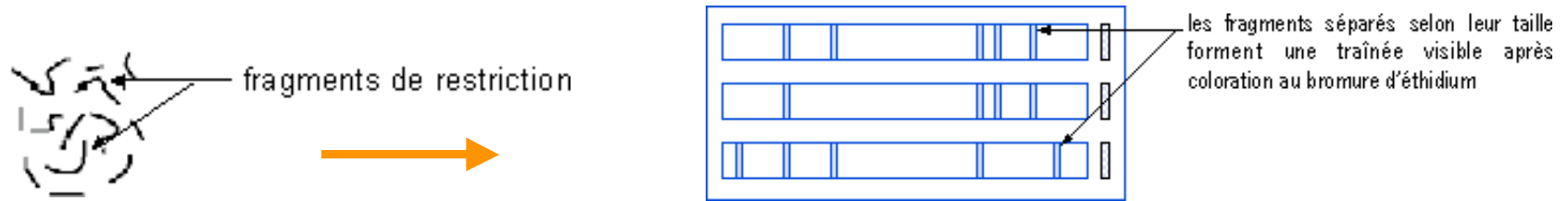
4. Champs électrique

5. **Migration**: les molécules chargés négativement migrent vers l'anode par les pores du gel, à une vitesse inversement proportionnelle à leur masse moléculaire (nb de bases)

6. Visualisation des AN: **bromure d'éthidium** s'intercale entre les bases des AN et émet une fluorescence orange après excitation aux UV

7. Estimation de la taille et quantité des fragments par comparaison avec le marqueur (seuil de détection: qq ng)

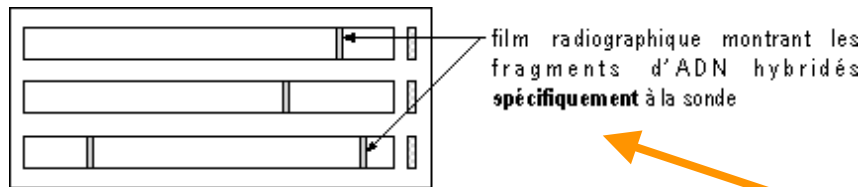
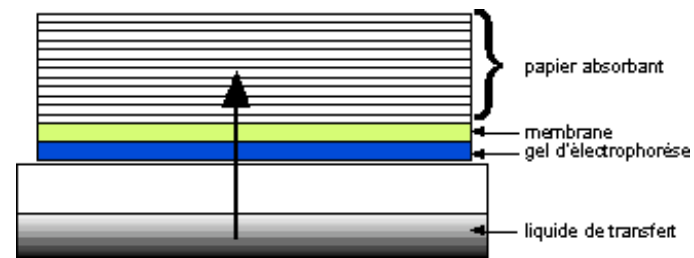
**électrophorèse sur gel d'agarose
+dénaturation dans le gel des
fragments de restriction (NaOH)**



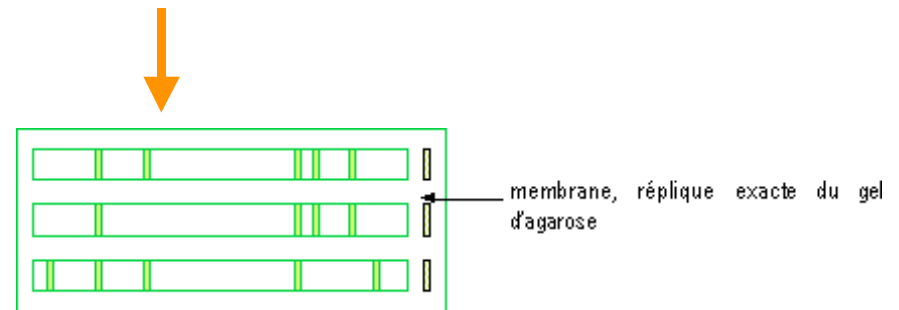
**transfert sur support
solide par capillarité
(buvardage = blot)**

**+ fixation de l'ADN sur la
membrane par cuisson
(nitrocellulose) ou exposition
U.V (nylon)**

Southern-blot

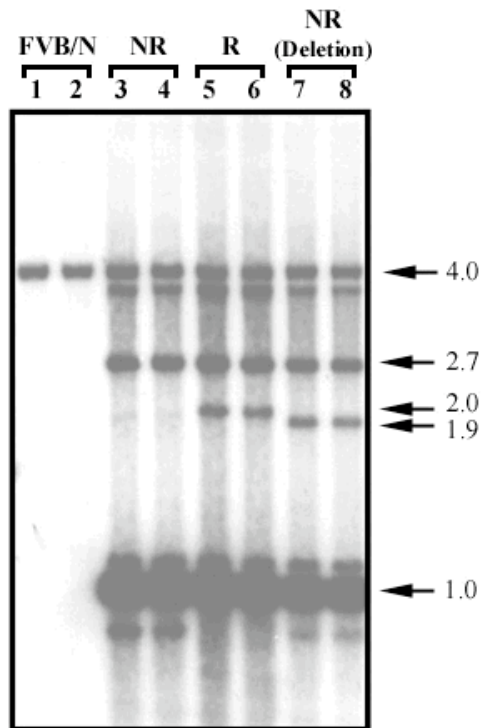


**hybridation avec une sonde
marquée dénaturée**



Applications du Southern-blot (1)

Carte de restriction d'un gène (utilisation de différentes enzymes): détection de ré-arrangements (délétions ou insertions)



ADN de la queue de souris non transgénique (1&2) et de 3 souris transgéniques (3 à 8) hybridés avec la même sonde selon la technique de Southern

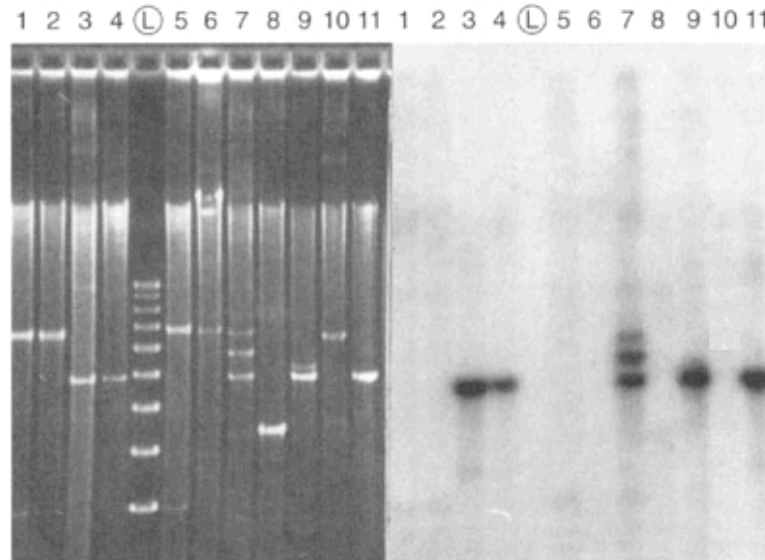
--> apparition de nouvelles bandes chez les transgéniques

Diagnostic prénatal: différencier forme sauvage et mutante d'un gène (hybridation avec sonde "sauvage" et "mutante") --> ADN fœtus anormal ne s'hybridera qu'avec la sonde "mutante"

Applications du Southern-blot (2)

Identification de gènes

Coloration au Bet
des fragments de
restriction de 11
souches bactériennes



Southern-blot avec une
sonde chaude spécifique
de la souche 11

--> hybridation avec les
souches 3, 4, 7 & 9

--> organisation différente
dans le clone 7?

Identification de gènes d'une parenté éloignée: hybridation à faible stringence (permet appariement même imparfait) --> nouvelle famille de régulateurs du développement embryonnaire chez la *Drosophile*, membres de cette famille présents chez l'homme

- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
 - Hybridation *in situ*
 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
 - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ Southern-blot
- ✗ **Northern-blot**
- ✗ Dot-blot
- ✗ Puces à ADN (microarray)
- ✗ Western-blot

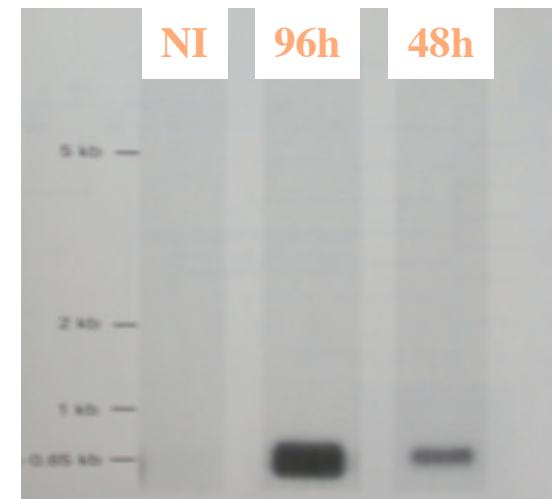
Northern-blot

✗ Même principe que le Southern-blot mais ici **ce sont les ARN qui sont étudiés** (pas de digestion préalable mais traitement au formaldéhyde pour casser structures secondaires)

✗ Applications:

- apprécier distribution d'un ARN dans les tissus, étudier son abondance relative
- déterminer la taille d'un ARN
- détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage de l'ARN

Détection maximale à 96h d'un ARNm particulier dans des globules blancs de patients atteints de leucémie et induit à différencier →



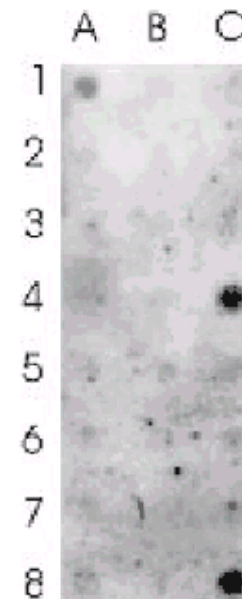
- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
 - Hybridation *in situ*
 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
 - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ Southern-blot
- ✗ Northern-blot
- ✗ **Dot-blot**
- ✗ Puces à ADN (microarray)
- ✗ Western-blot

Dot-blot

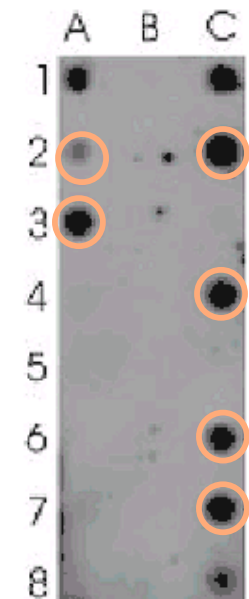
✗ Même principe que le Southern-blot mais sans séparation des AN (ADN ou ARN)

- 21 sondes spécifiques des gènes de virulence bactériens déposées en tâches (Dot)
 - A1, C4 et C8: contrôles s'hybridant à toutes les souches d'*E. coli*
 - hybridation avec l'ADN total des bactéries qui doivent être testées ainsi qu'un contrôle -
 - si ADN est complémentaire d'une sonde, reconnaissance, hybridation, et les tâches correspondantes sont alors marquées
- > échantillon: 6 gènes de virulence sont identifiés en plus des trois gènes contrôle**

Souche non pathogène
(K-12)



Souche pathogène
(échantillon clinique)



- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
 - Hybridation *in situ*
 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
 - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ Southern-blot
- ✗ Northern-blot
- ✗ Dot-blot
- ✗ **Puces à ADN (microarray)**
- ✗ Western-blot

Puces à ADN (Microarrays)

Fin des 90's (séquençage génomes bactériens):

AVANT étude expression d'un seul gène --> **AUJOURD'HUI** profil d'expression d'un maximum de gènes en une seule expérience

Mesure simultanée de l'expression de milliers de gènes en une seule réaction d'hybridation!

1. puces à ADN (représentatives d'un génome) hybridées avec des ARN ou ADNc fluorescents
2. détection signal par un laser (automate)
3. traitement informatique des données

Sptotted micro-arrays

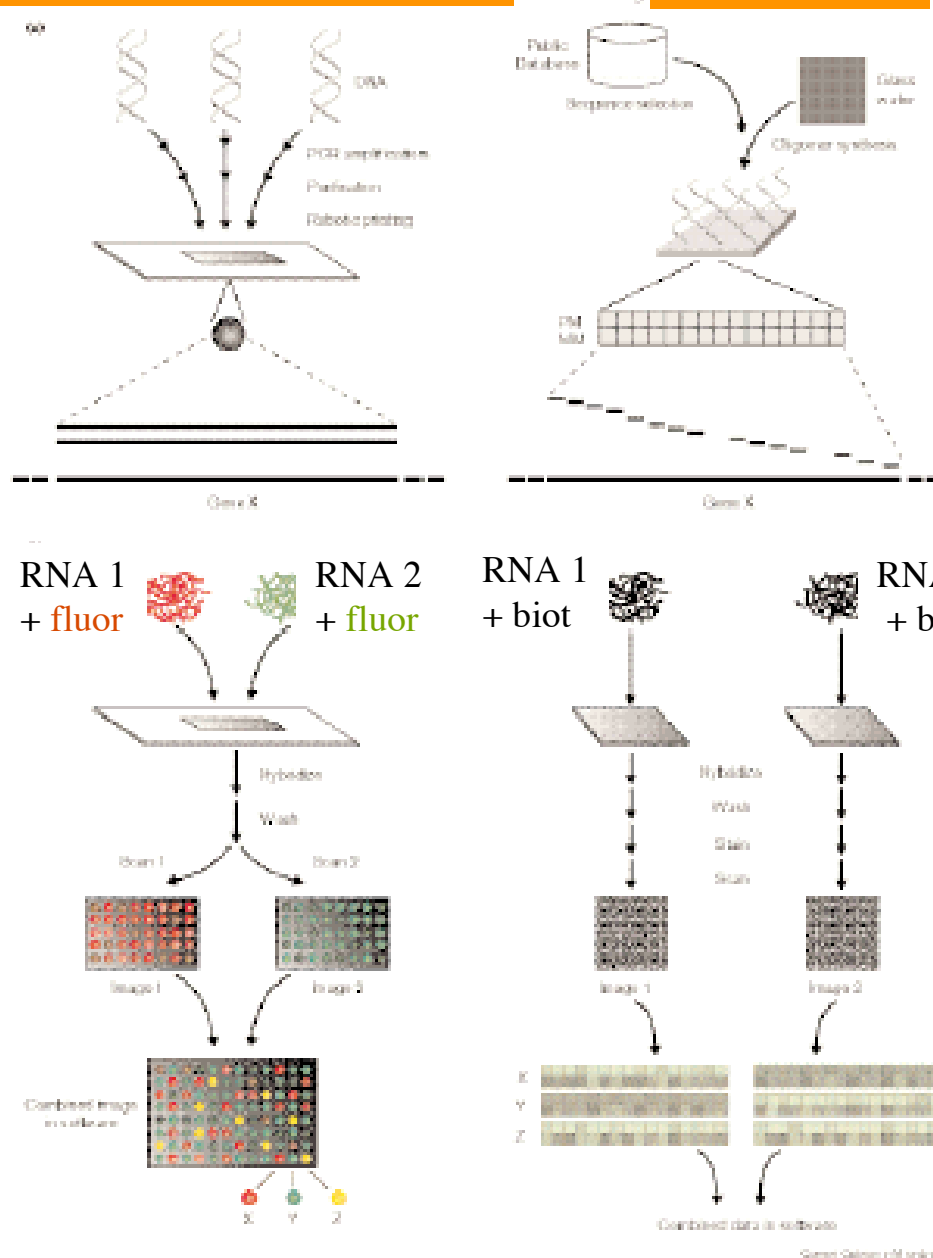
Chips

ADN sb ou db
(100^{aine} de bases)
déposé par un robot
sur une lamelle de
verre (1 spot = un
gène)

Une seule
représentation →

Marquage différentiel des sondes -contrôle et test- par incorporation nt fluorescents (Cy3- et Cy5-dUTP) par reverse transcription

Mélange des "sondes" et révélation d'un fluorophore puis de l'autre



● = niveau similaire d'expression

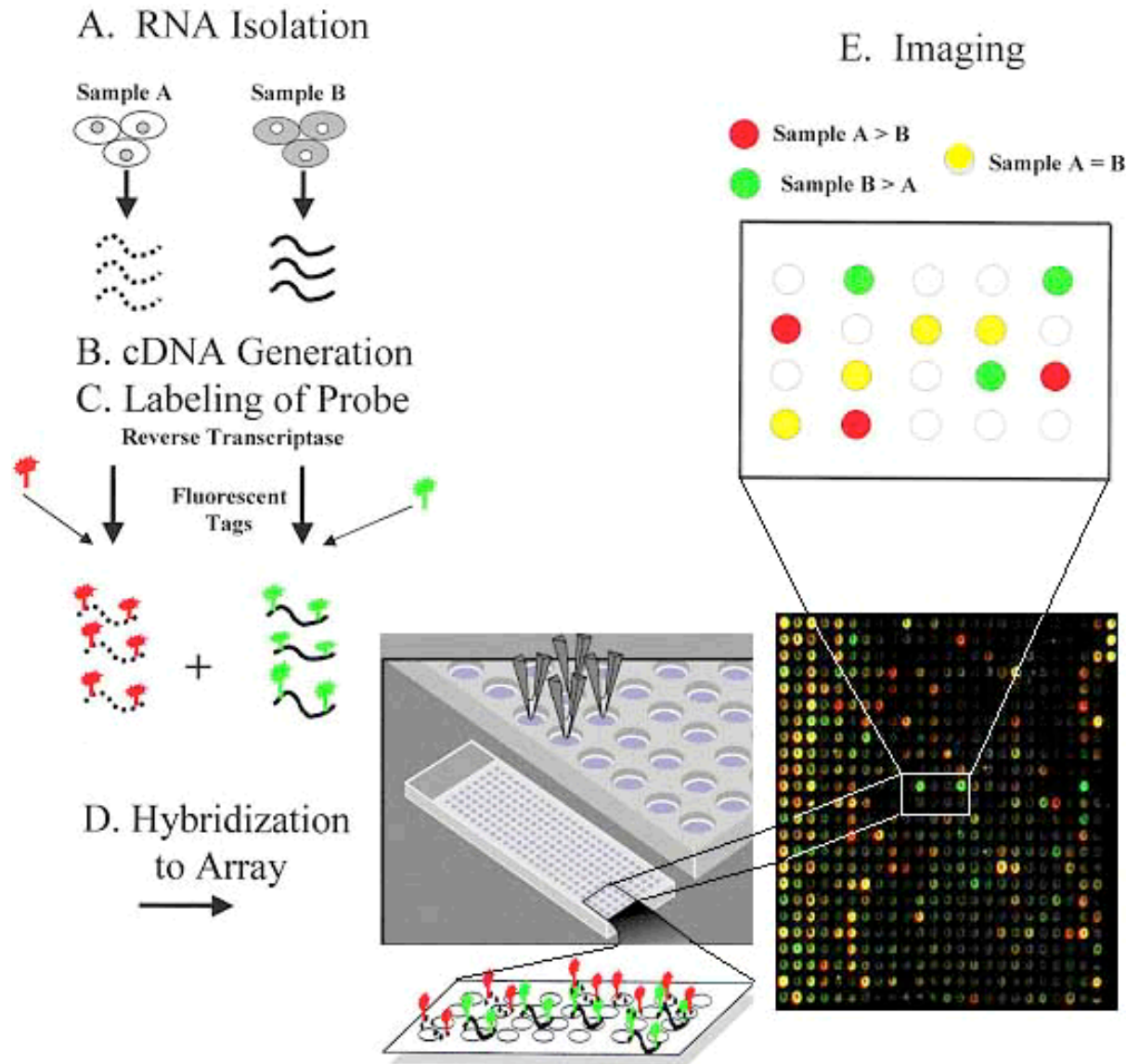
oligonucléotides
synthétisés *in situ*
sur lamelle de
verre
(1 gène = 15-20
oligont différents)

15-20
représentations

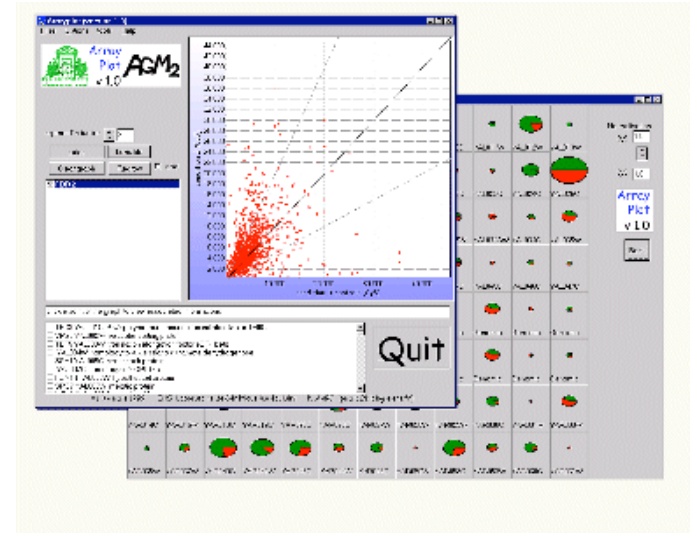
**Marquage ARN
par biotinylation**

**2 hybridations
(sur 2 lames ≠)**

"Spotted micro-arrays" (1)



F. data analysis



"spotted micro-arrays" (2)

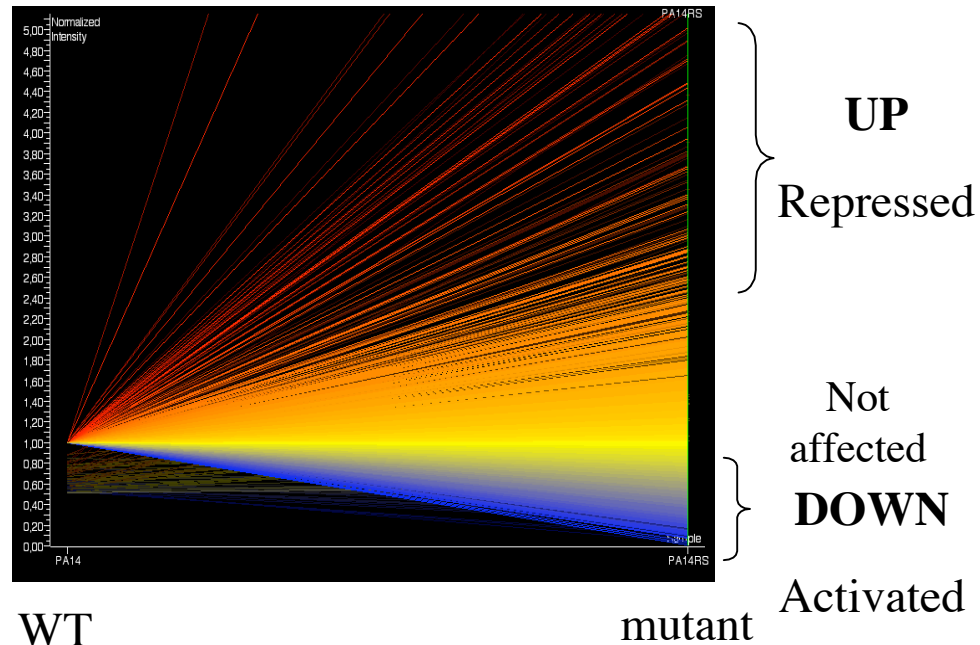
-*E. coli* cultivée en milieu riche ou minimal: suivi expression des 4290 gènes de son génome --> 225 gènes plus exprimés en milieu minimal (notamment codant pour protéines de tolérance au stress)

-*Mycobacterium tuberculosis* changements d'expression suite au traitement antituberculeux --> identification des nouveaux gènes cibles de l'antibiotique

Affymetrix GeneChip[®]
P. aeruginosa Genome Array



ANALYSIS : "GeneSpring" software



"DNA Chips "

Génome de levure:

9337 données par réaction d'hybridation, soit pour une expérience type (5 échantillons dupliqués) 100 000 données --> analyse des données: normalisation, filtre puis détermination des profils

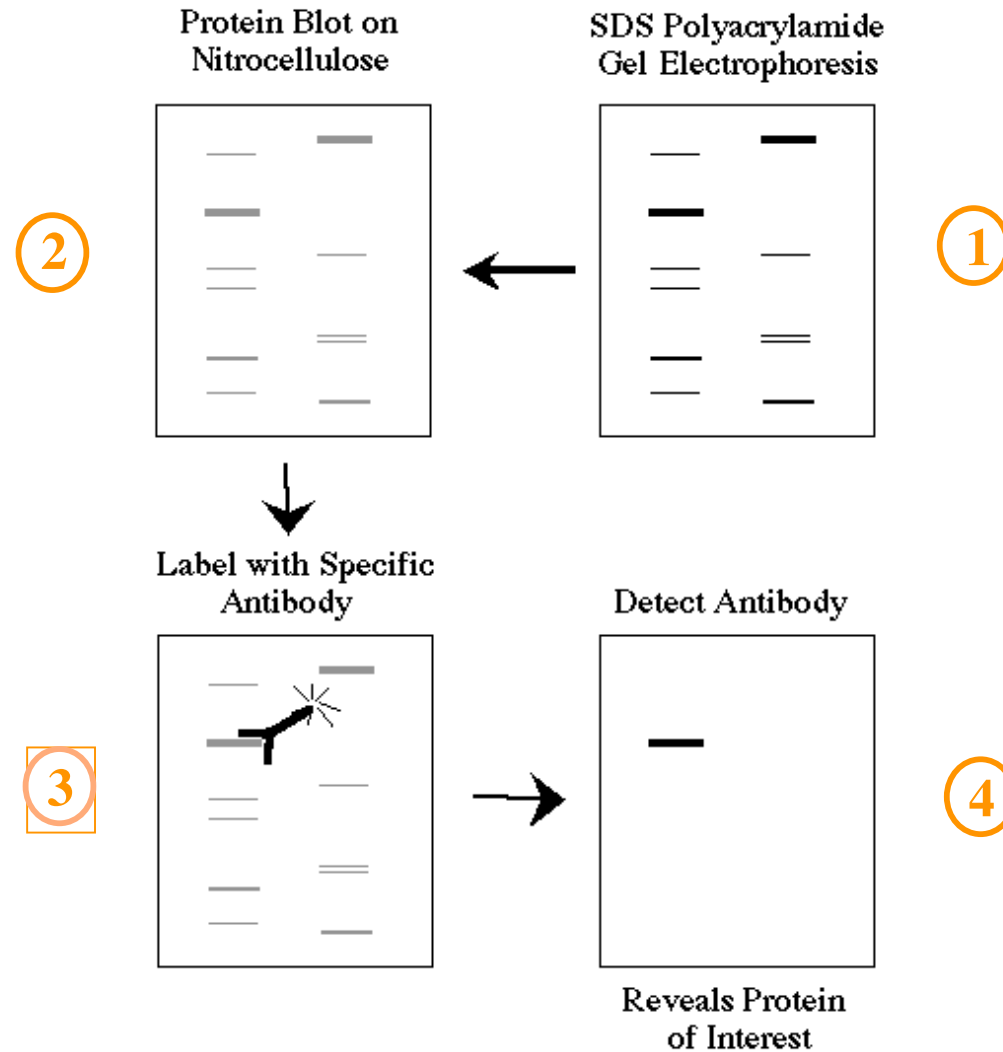
Il est impératif de mettre en synergie les forces en présence (biologistes, mathématiciens et informaticiens) pour traiter cette quantité de données!!!!

Les biopuces sont des outils de choix pour les chercheurs, qu'ils fassent du séquençage, du génotypage, de l'analyse de l'expression des gènes ou encore de la pharmacogénomique.

- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
 - Hybridation *in situ*
 - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
 - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ Southern-blot
- ✗ Northern-blot
- ✗ Dot-blot
- ✗ Puces à ADN (microarray)
- ✗ **Western-blot**

Western-blot

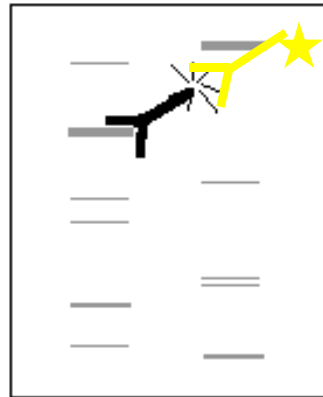
But: Détecter la présence d'une protéine dans un mélange grâce à un anticorps spécifique de celle-ci



Détection

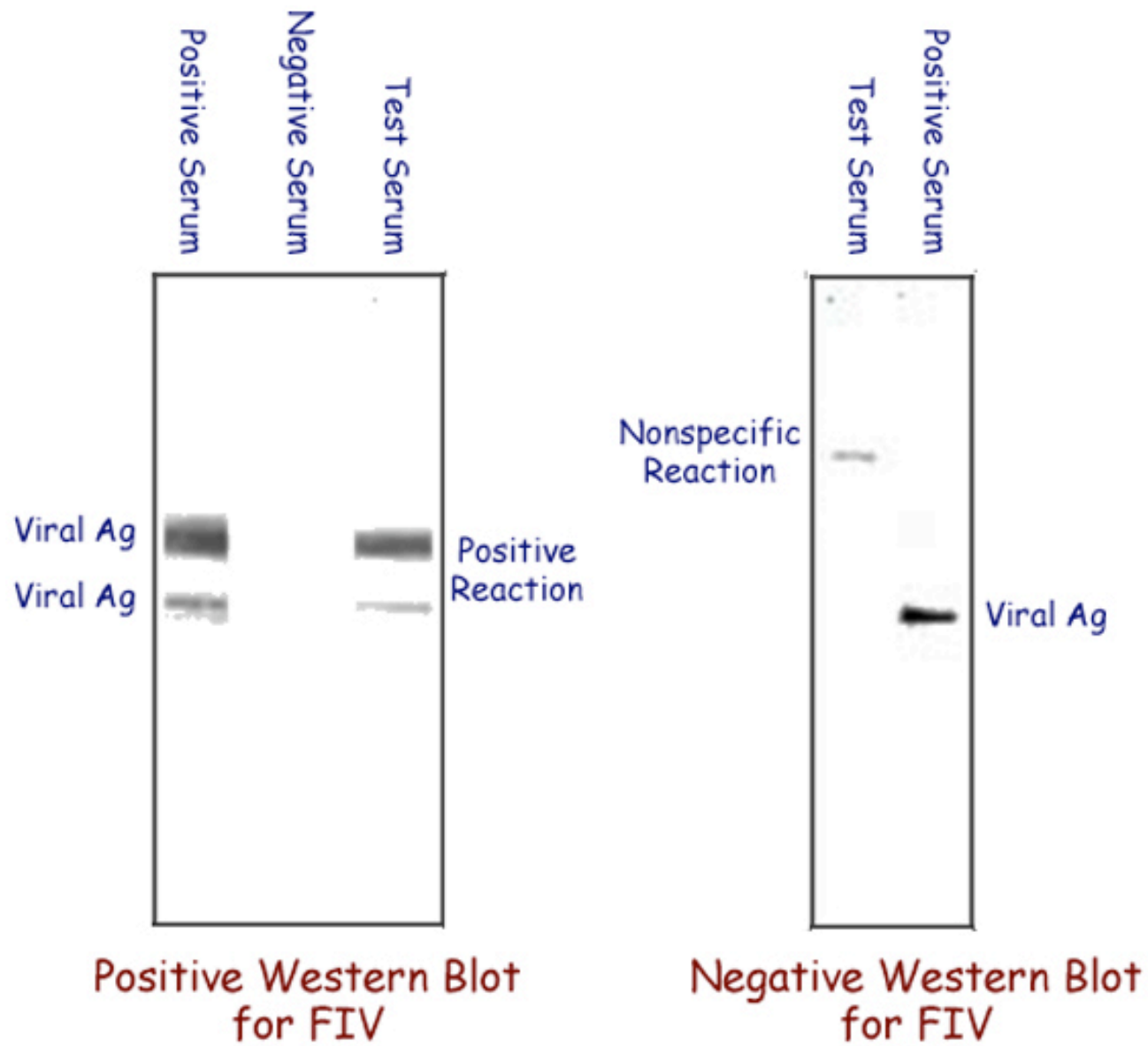
X Sandwich d'Ac

2^{ème} Ac reconnaît le 1^{er}



X Détection du signal

- 2^{ème} Ac radioactif --> autoradiogramme
- 2^{ème} Ac couplé à une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase) --> réaction colorée
- 2^{ème} Ac couplé à la biotine --> révélation par l'avidine



NB: "protein arrays" existent

Comparaison des différents blots

