

# 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.

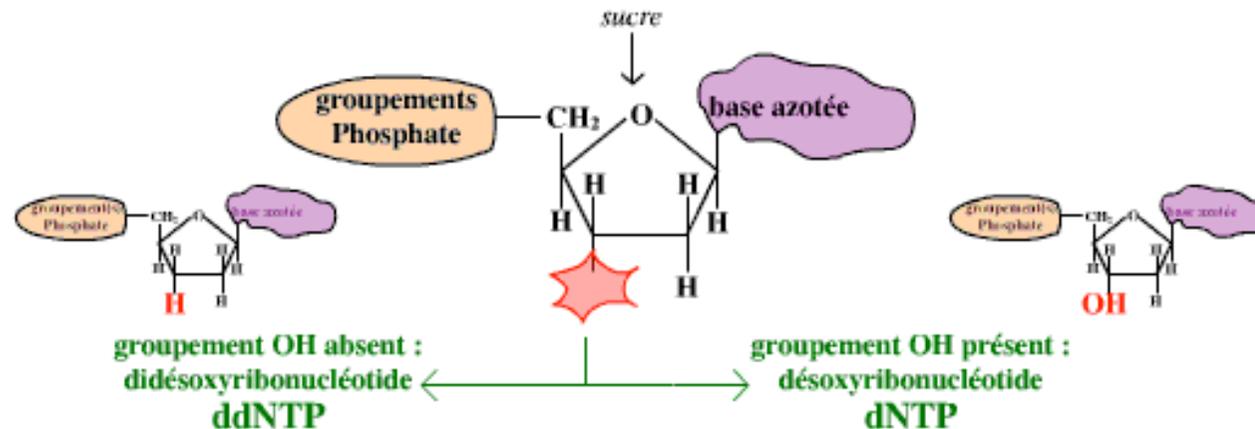
Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

# 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.

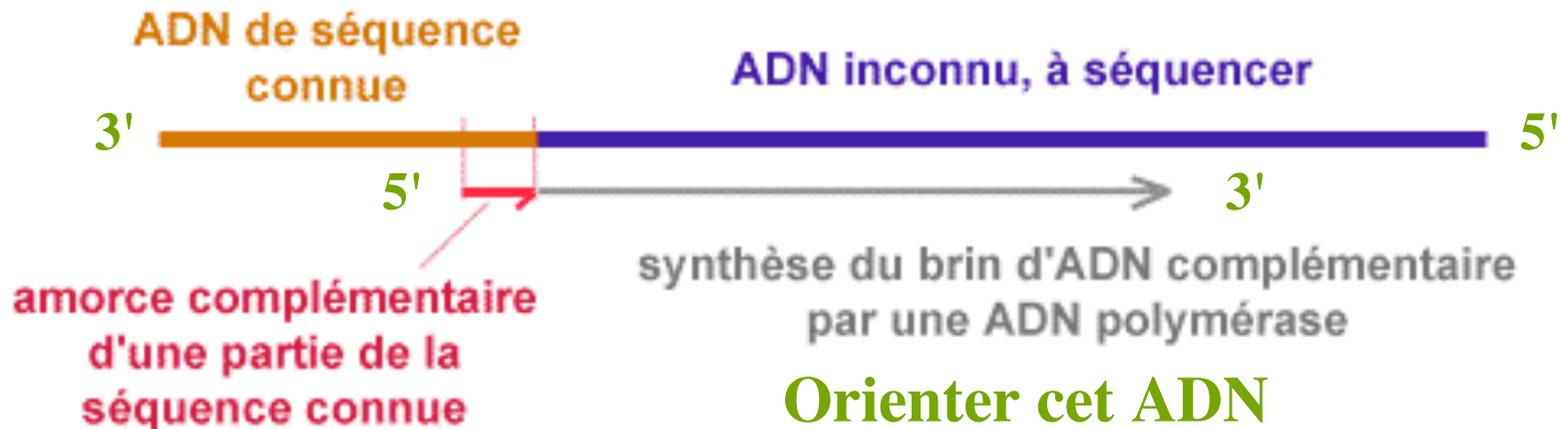


*Deux types de nucléotides triphosphates*

# 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'.

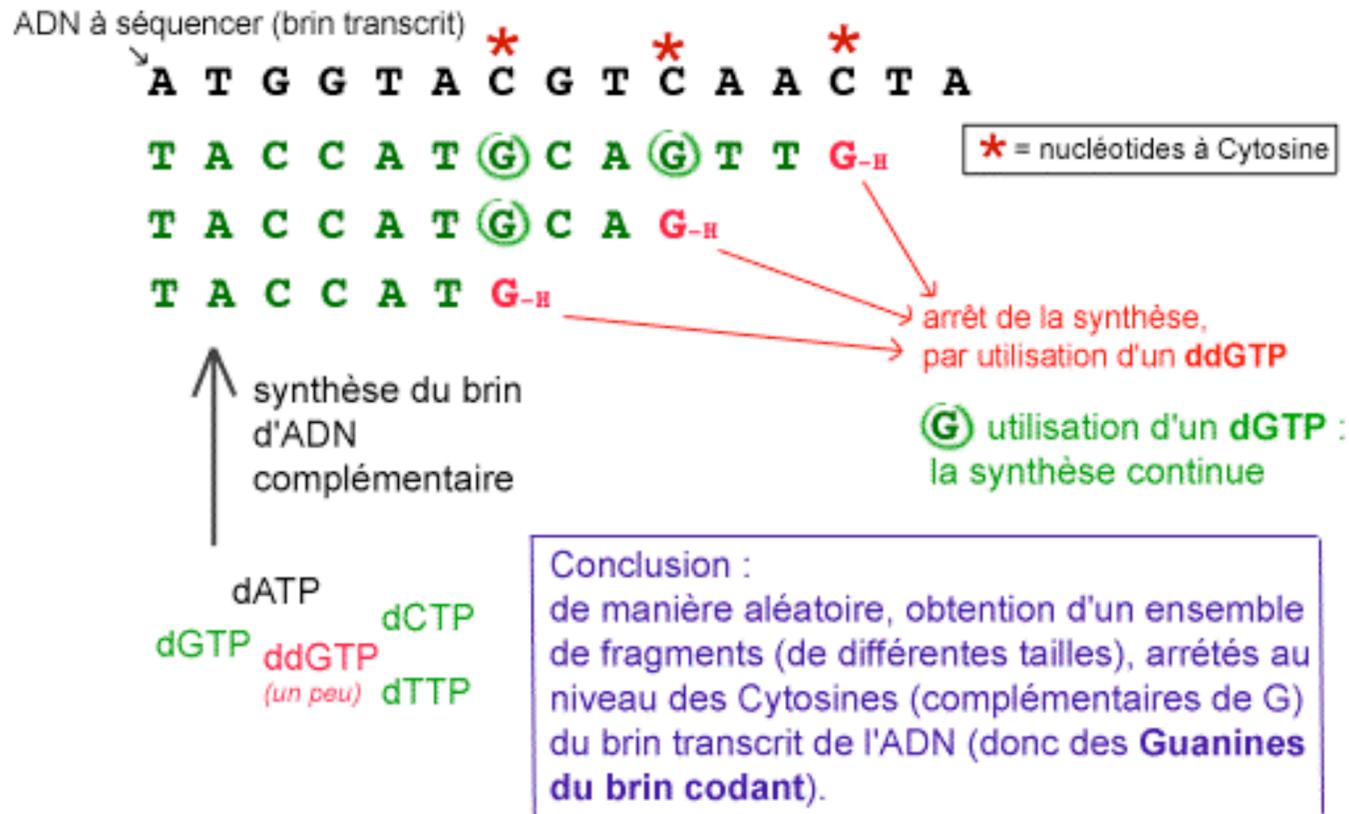
# Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

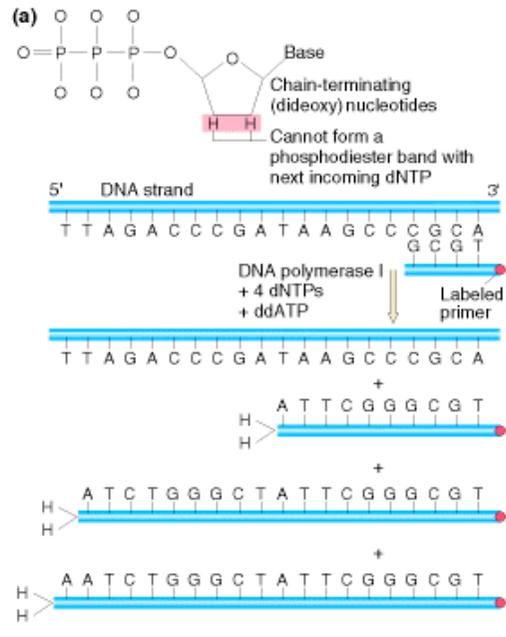
- le fragment qui doit être séquencé
  - un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer
  - les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
  - l'ADN polymérase
  - dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif
- > son incorporation 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

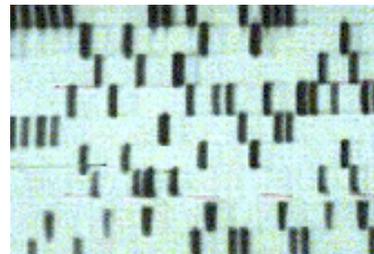
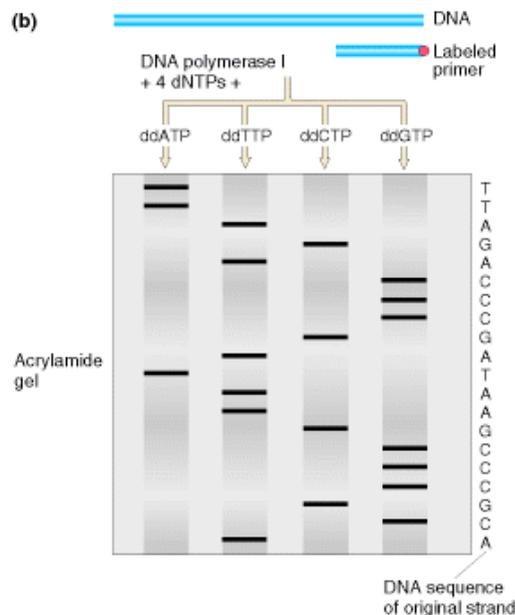
**NB** synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine sur la séquence



# 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

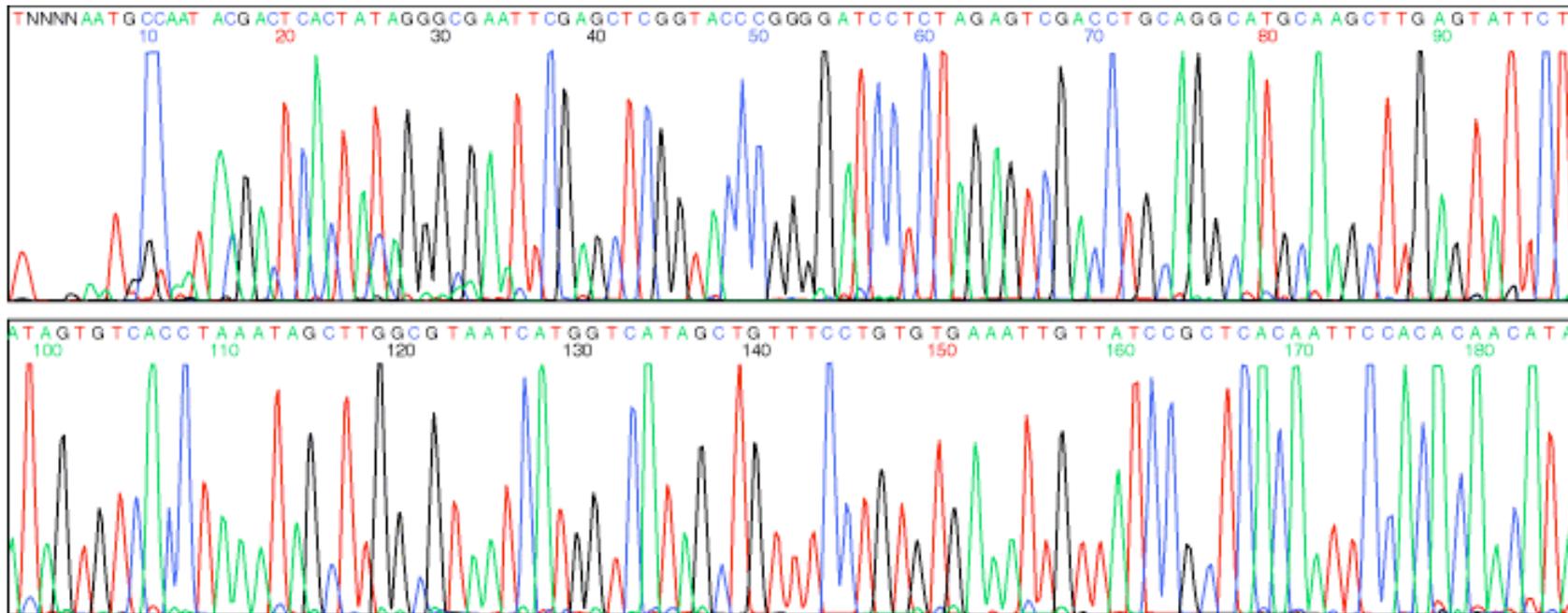


↑ Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

**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

✗ Phosphate<sup>32</sup> (radio-isotope le + utilisé), Soufre<sup>35</sup>, H<sup>3</sup> (tritium)

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

--> **marquage en 5'**: T4 polynucléotide kinase ajoute un P<sup>32</sup> en 5' (sonde peu radioactive)

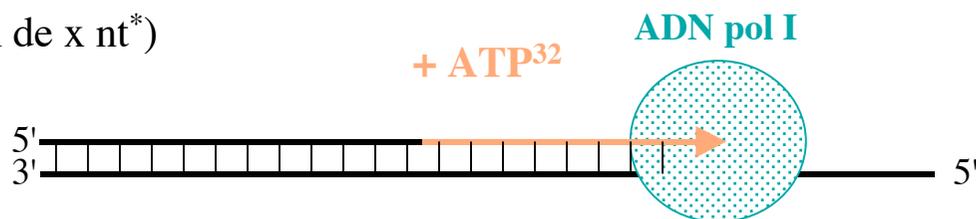
--> **marquage en 3'** :

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

(sondes très radioactives car incorporation de x nt\*)

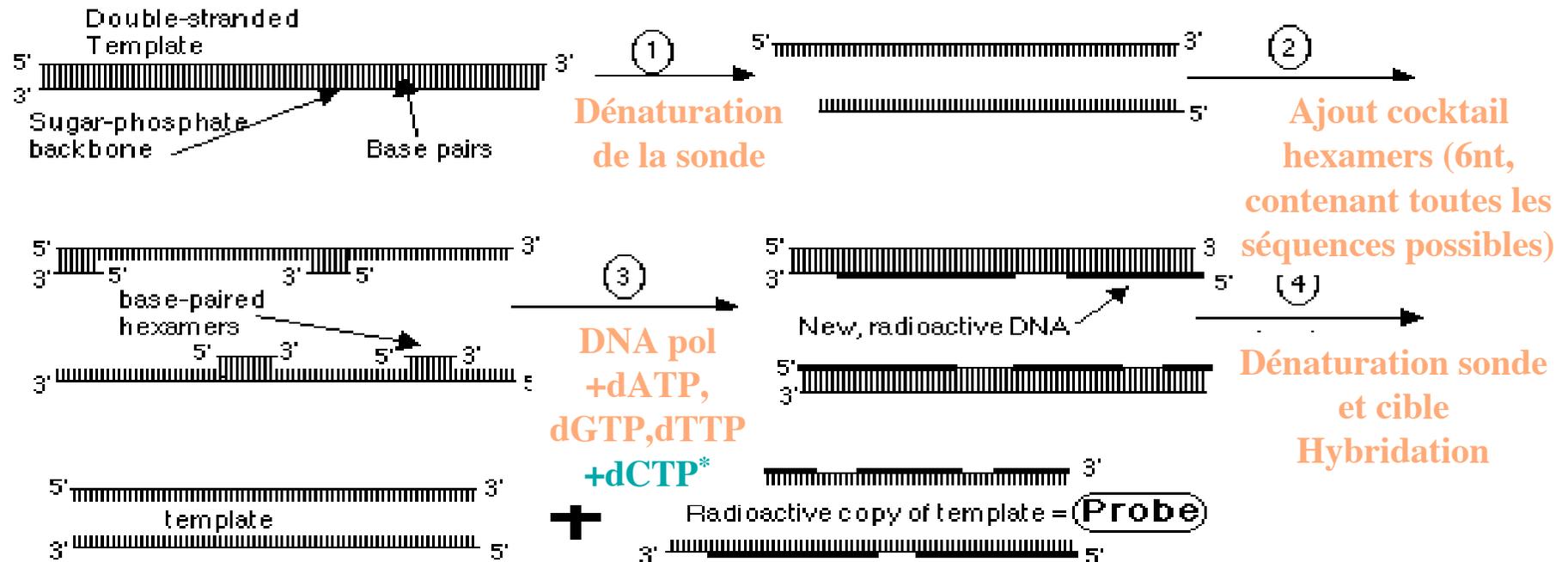
\*avec une exonucléase

\*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)

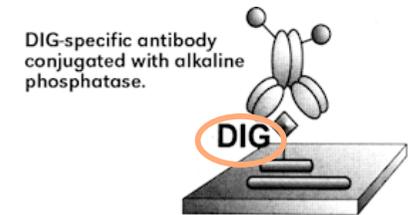
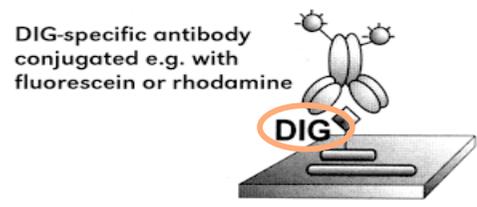
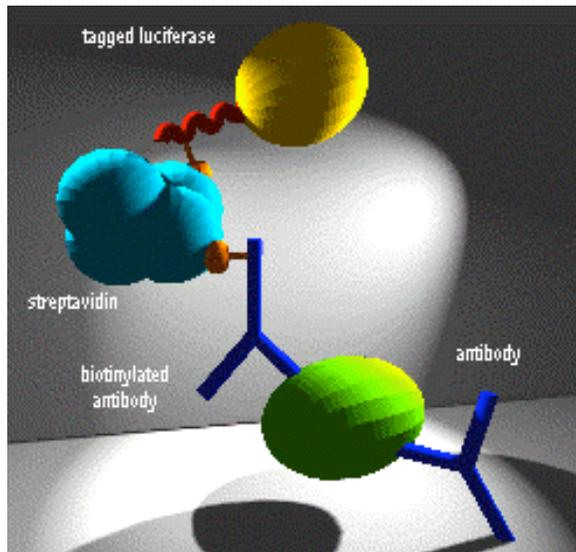
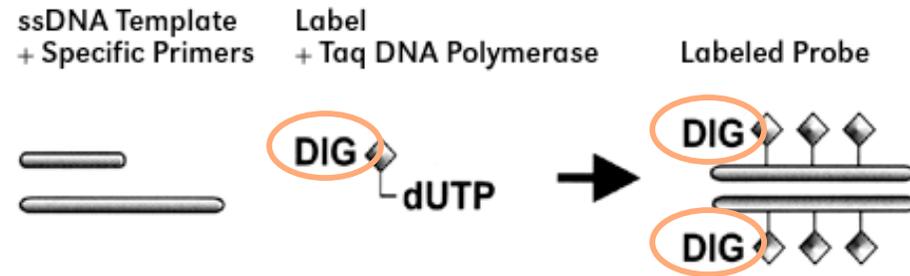
✕ sondes d'ARN (ribosondes) rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN, plus stables

**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 :

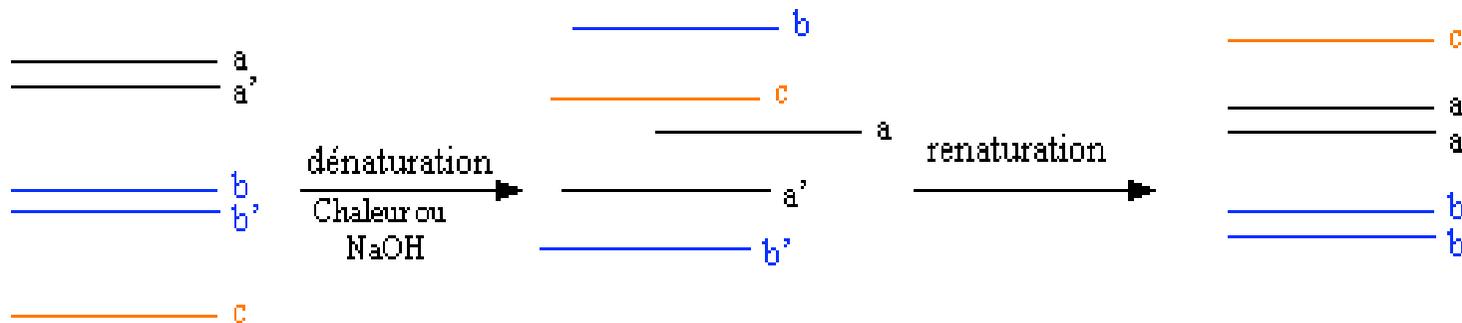
immobilisation sur membrane, sur verre  
colonies bactériennes  
chromosome  
coupe de tissus...

**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.**

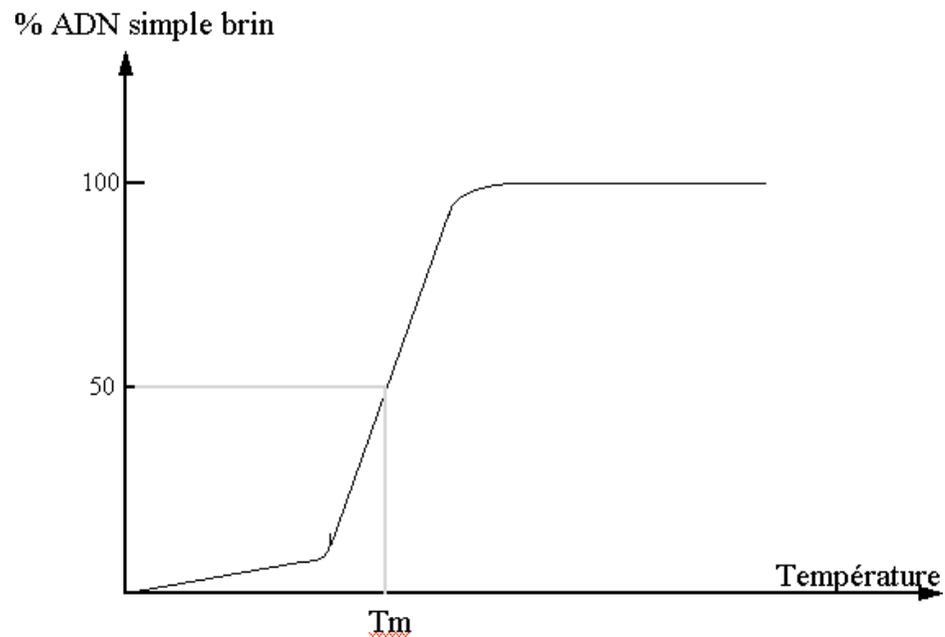


(a,a'), (b,b') = séquences double brin complémentaires

# La température de fusion ( $T_m$ -melting temperature-)

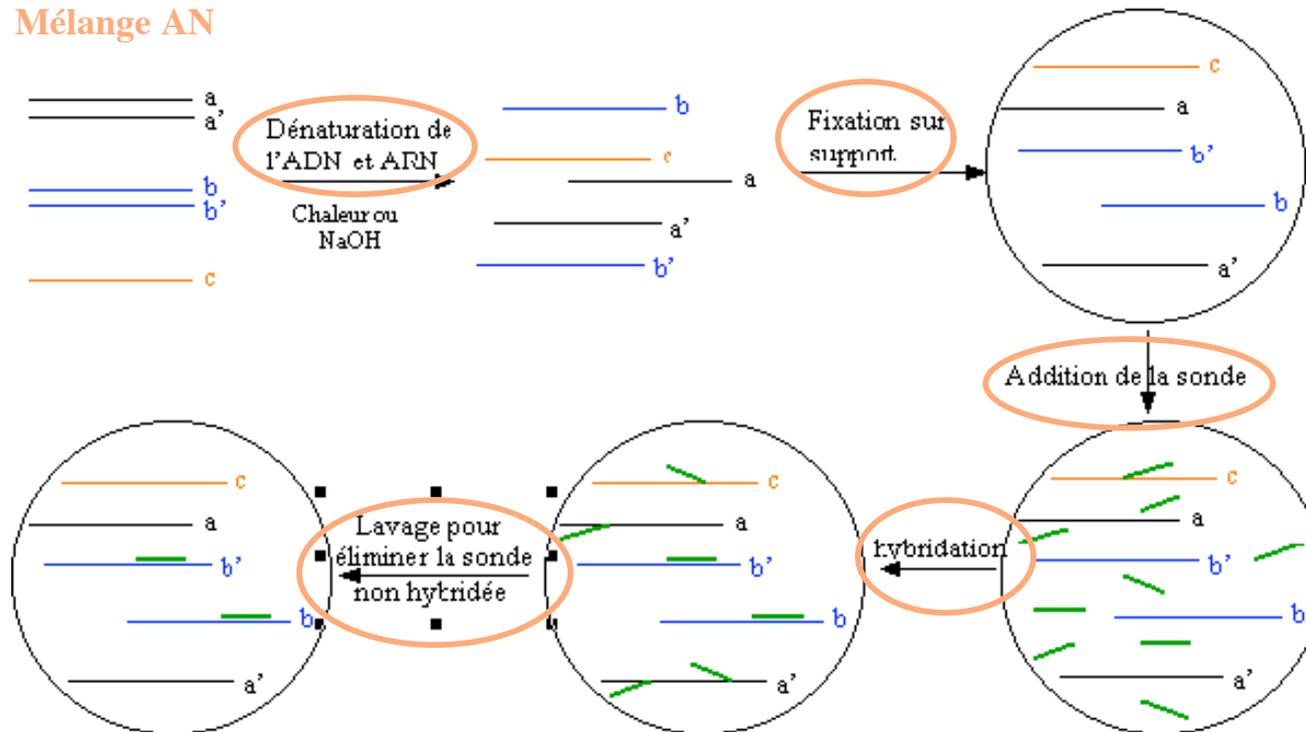
Un fragment d'ADN de séquence donnée a une  $T_m$  qui correspond à la température où 50% des fragments sont sous forme simple brin.

$T_m$  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 ( $\approx 5$  à  $10^\circ\text{C}$ ) --> 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

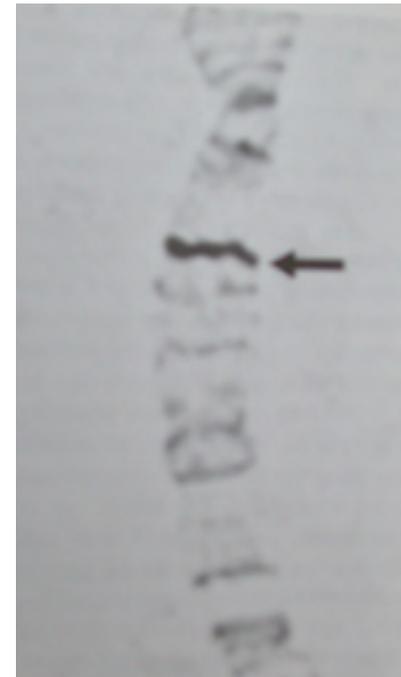
## Hybridation *in situ* sur chromosome

✕ **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.

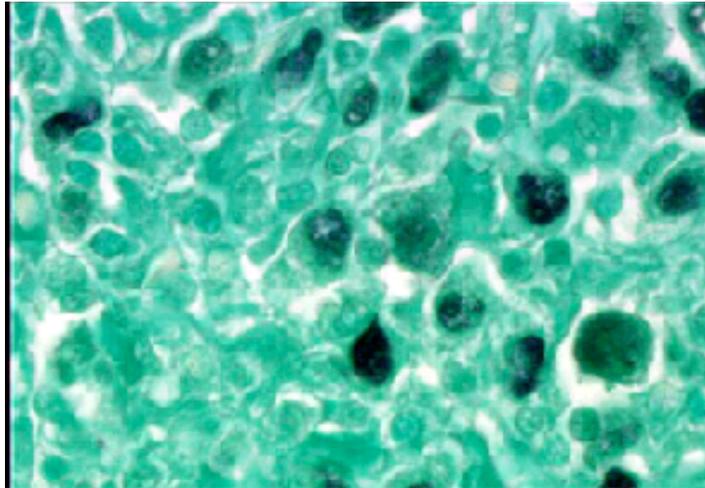
**Détection d'un  
gène de Drosophile**



## Hybridation *in situ*

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

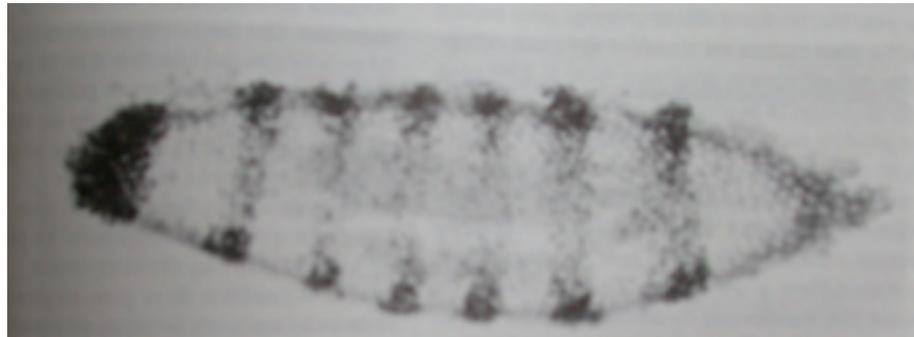
- coloration nucléaire bleu foncée des noyaux infectés
- contre coloration verte des autres noyaux



**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)

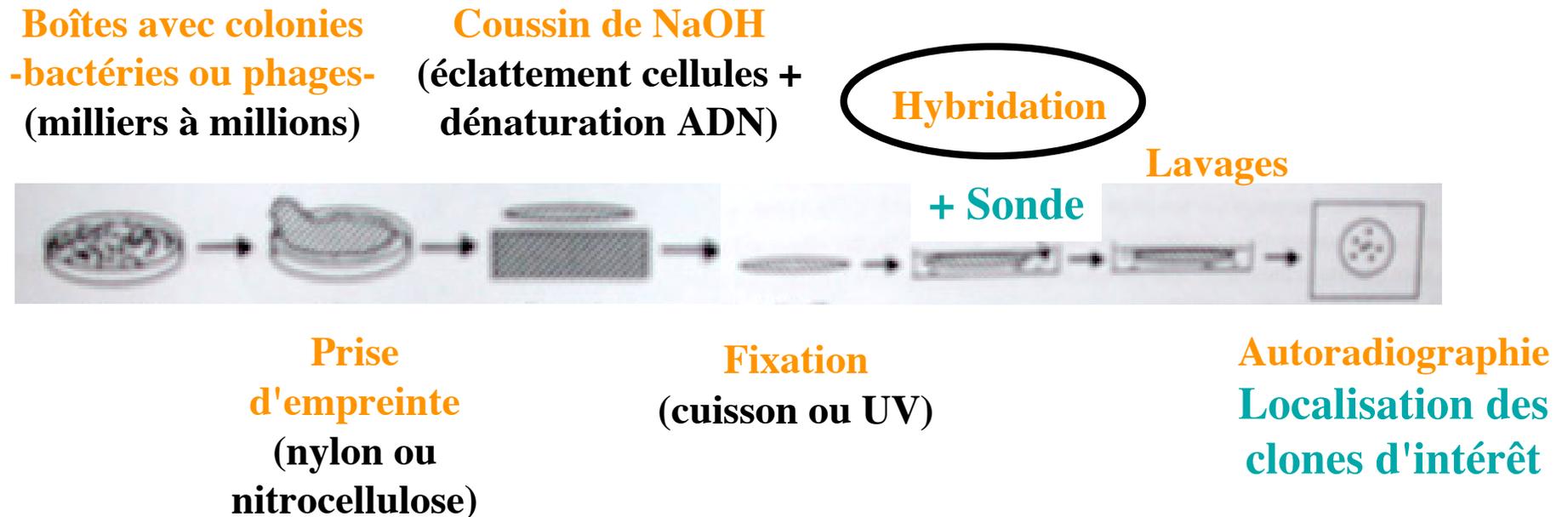


**Coupe d'embryon de Drosophile qui a subi une hybridation avec une sonde d'un gène impliqué dans le développement embryonnaire**

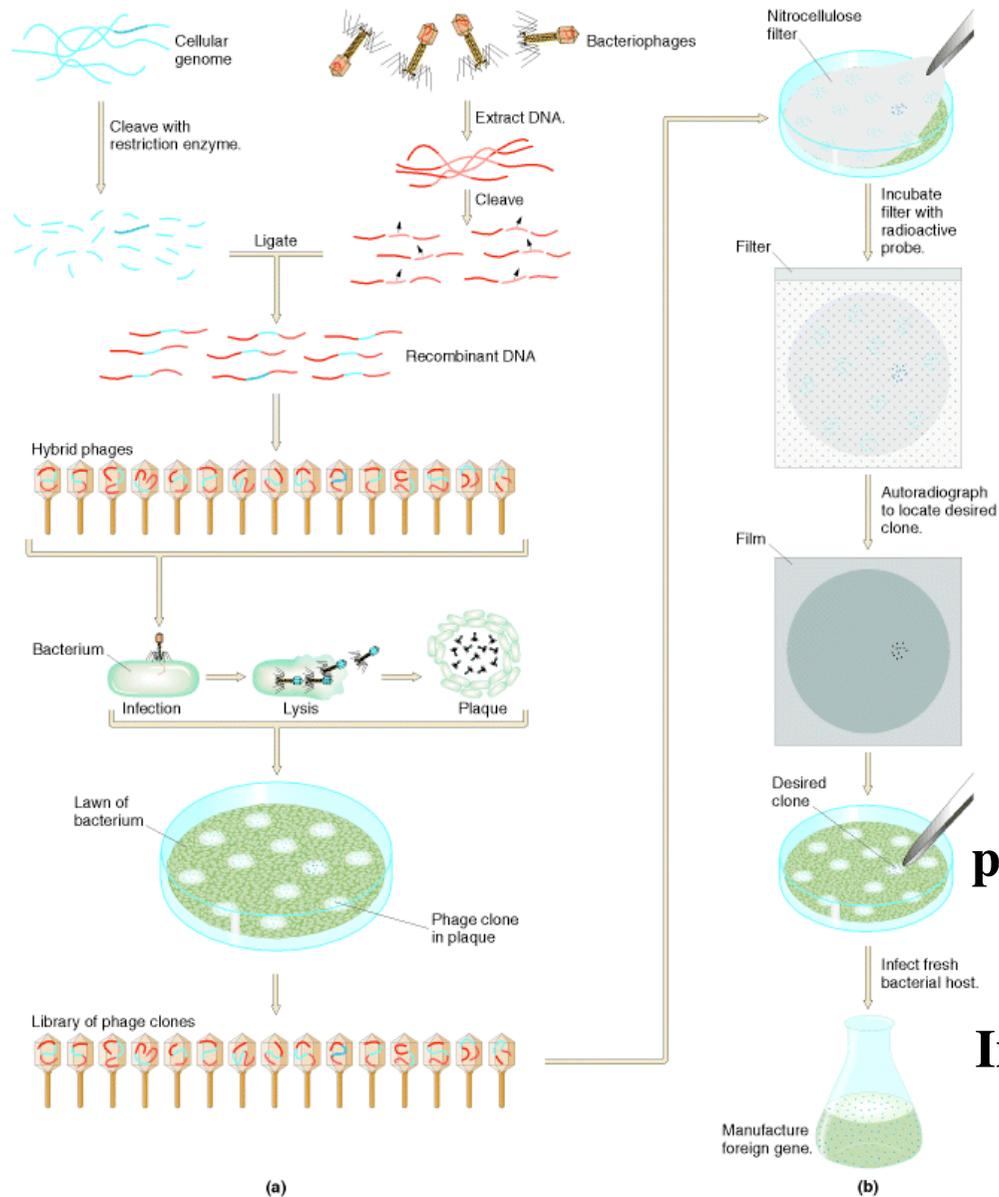
# Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse

✕ **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**

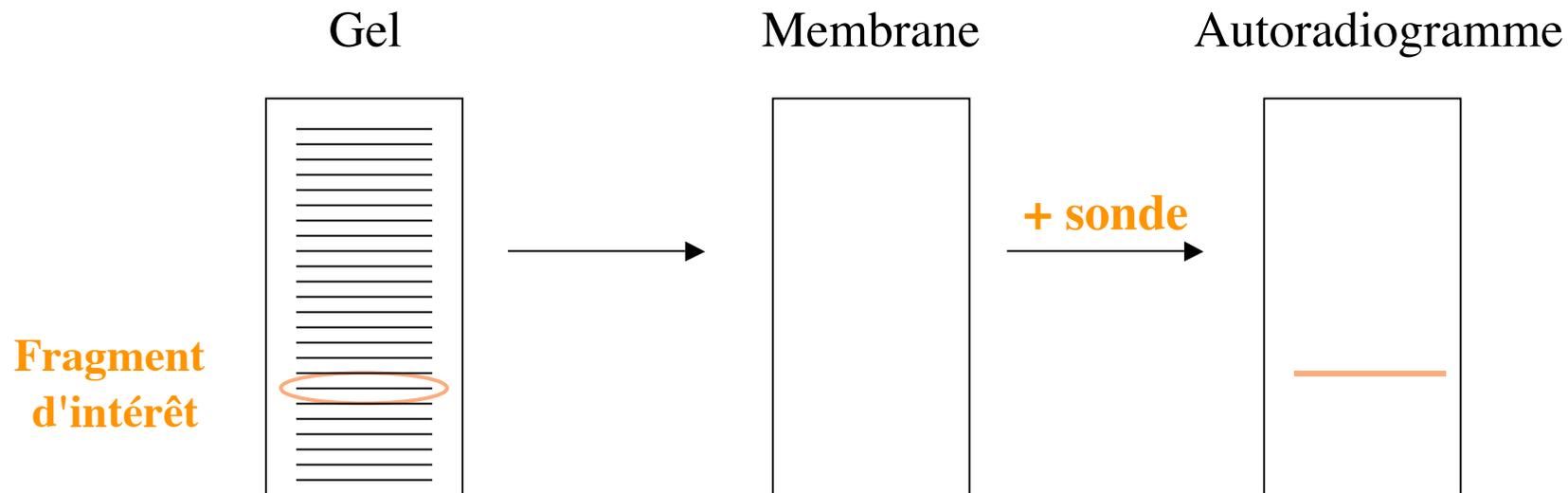
**Infection de bactérie pour production massive du clone recombinant**

- ✗ 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

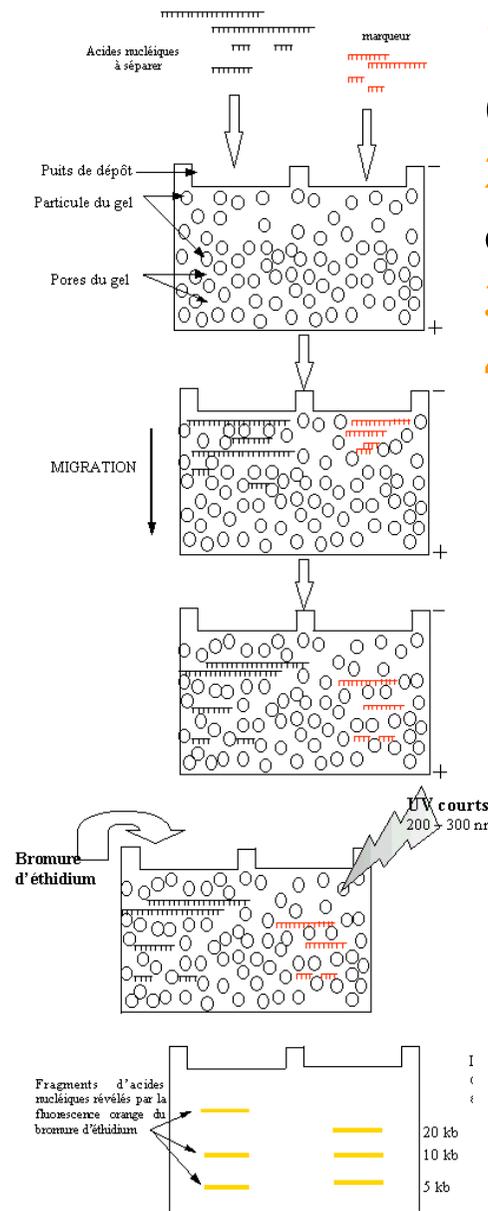
# Southern-Blot

**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)

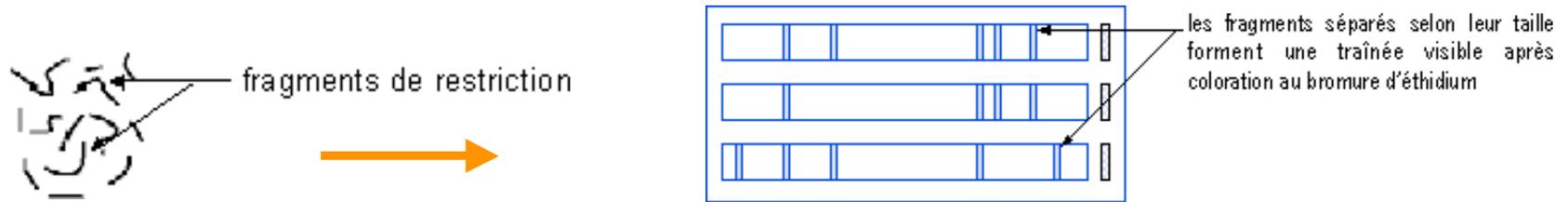
4. Champs électrique

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)

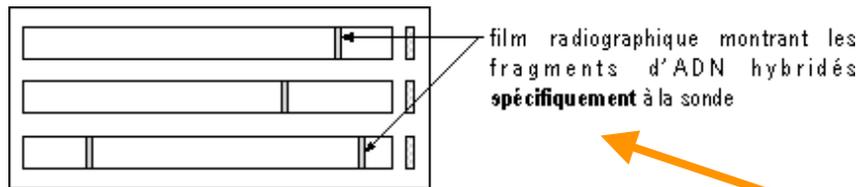
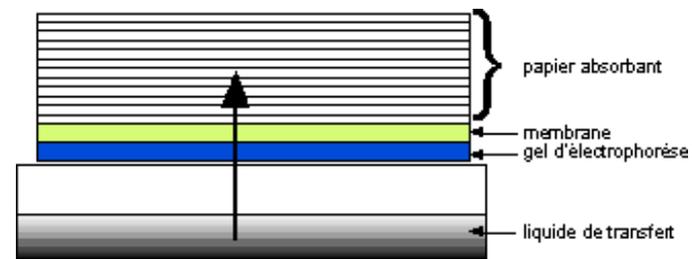
**électrophorèse sur gel d'agarose  
+dénaturation dans le gel des  
fragments de restriction (NaOH)**



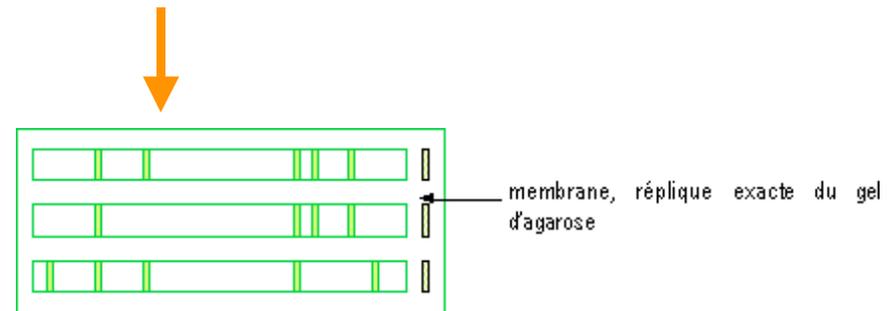
**transfert sur support  
solide par capillarité  
(buvardage = blot)**

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

**Southern-blot**

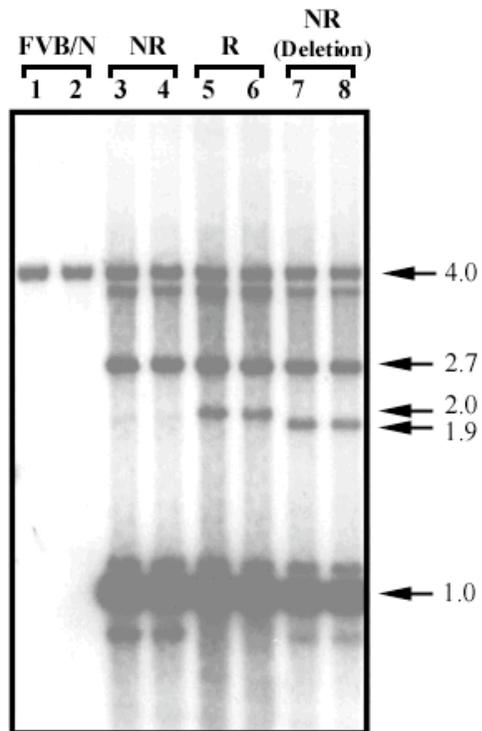


**hybridation avec une sonde  
marquée dénaturée**



# 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

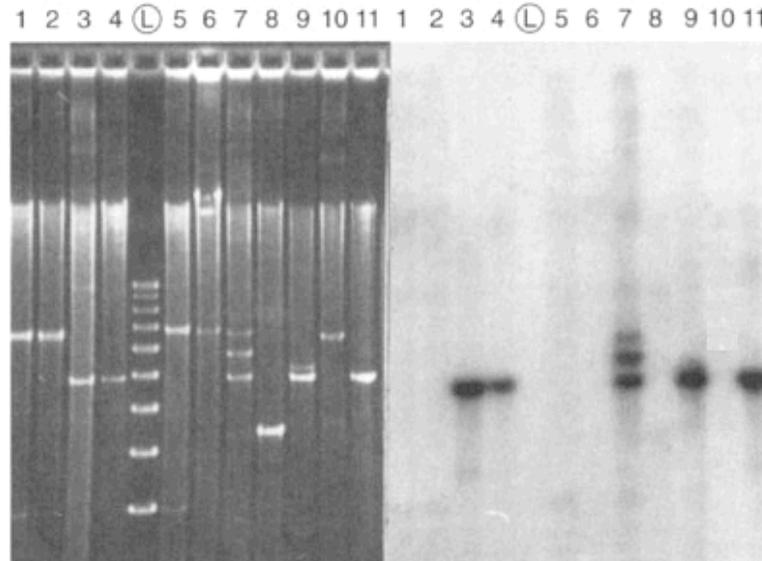
--> apparition de nouvelles bandes chez les transgéniques

**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

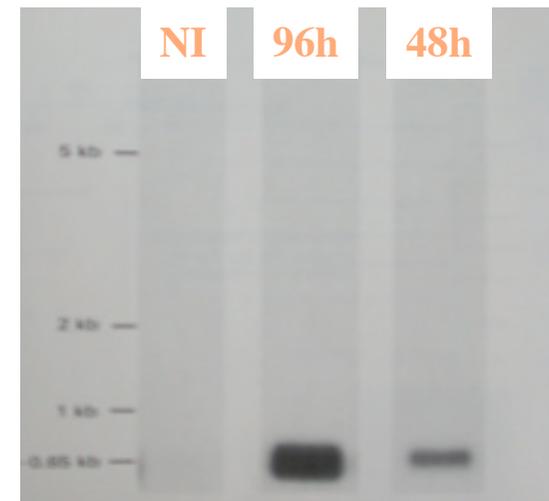
## Northern-blot

✕ 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 →

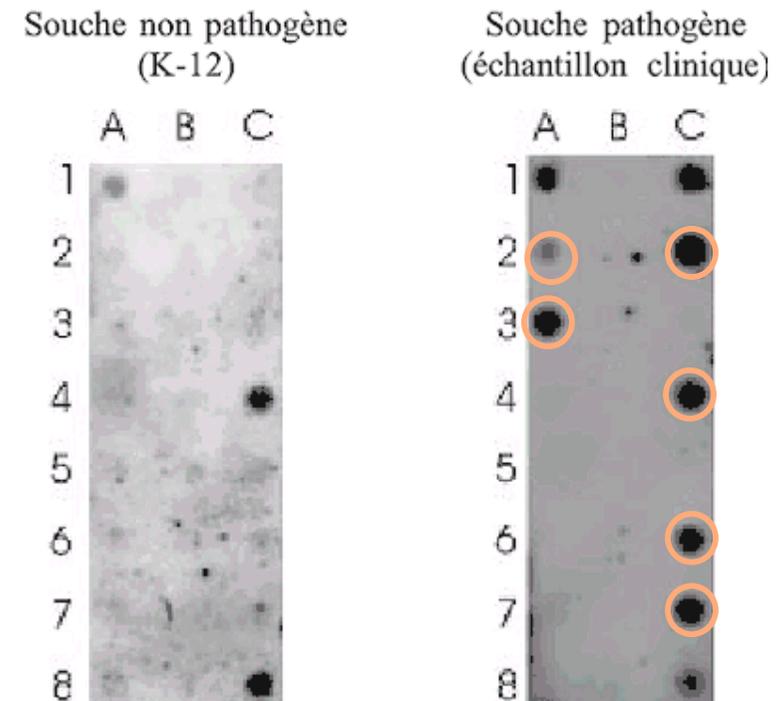


- ✗ Définition
- ✗ Les sondes d'acides nucléiques et leur marquage
- ✗ Principe de l'hybridation
- ✗ Différents types d'hybridation
  - Hybridation *in situ*
    - Hybridation sur colonie de bactéries, sur plage de lyse
    - Hybridation sur coupe de tissu
- ✗ Southern-blot
- ✗ Northern-blot
- ✗ **Dot-blot**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



- ✗ 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

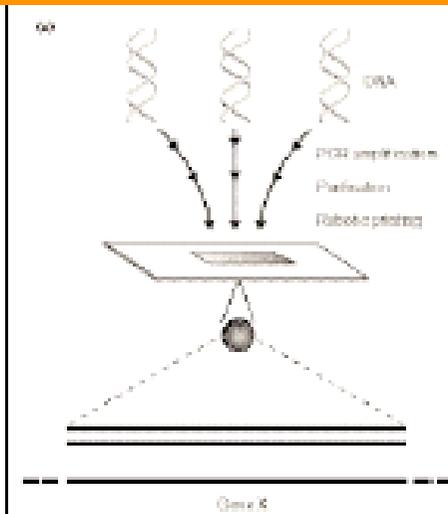
## Sptotted micro-arrays

ADN sb ou db (100<sup>aine</sup> de bases) déposé par un robot sur une lamelle de verre (1 spot = un gène)

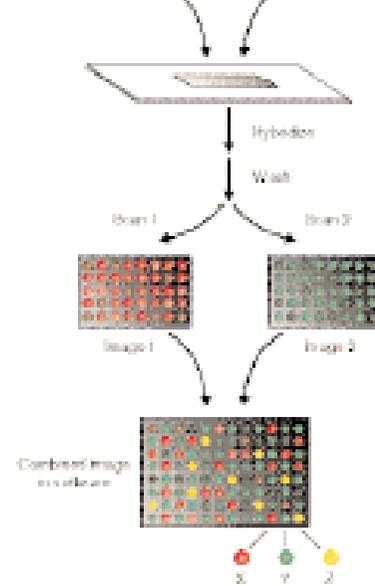
Une seule représentation →

**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**

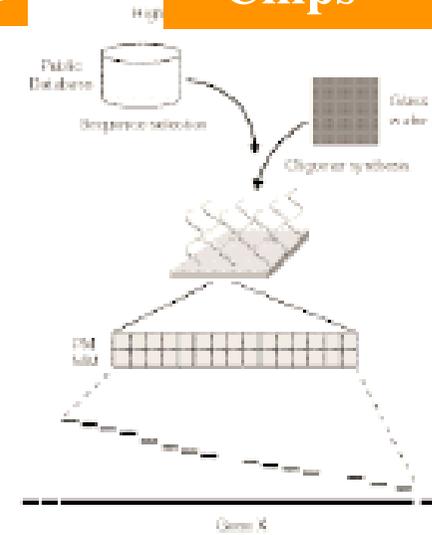


RNA 1 + fluor (red)      RNA 2 + fluor (green)

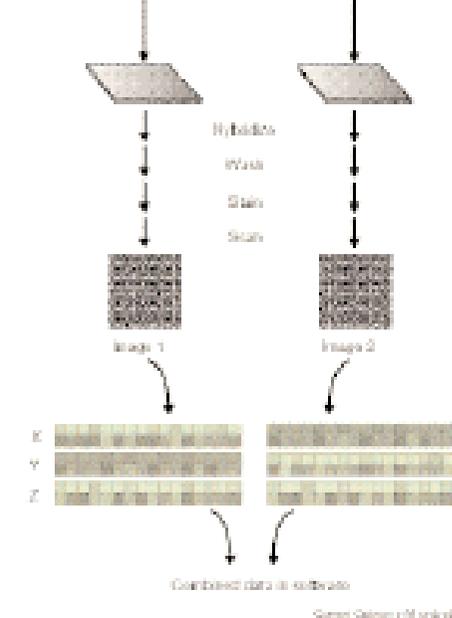


● = niveau similaire d'expression

## Chips



RNA 1 + biot (black)      RNA 2 + biot (black)



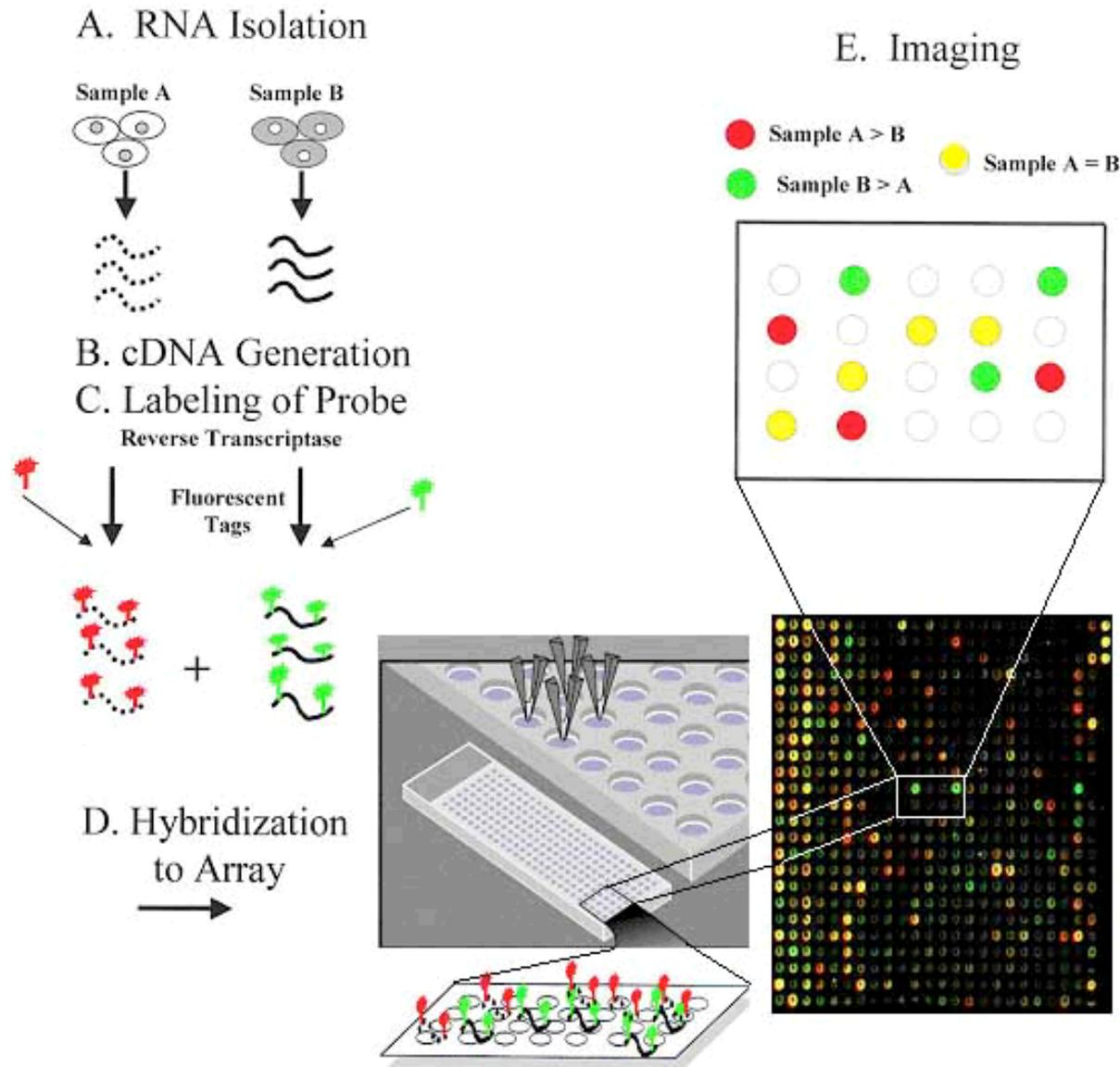
oligonucléotides synthétisés *in situ* sur lamelle de verre (1 gène = 15-20 oligont différents)

15-20 représentations

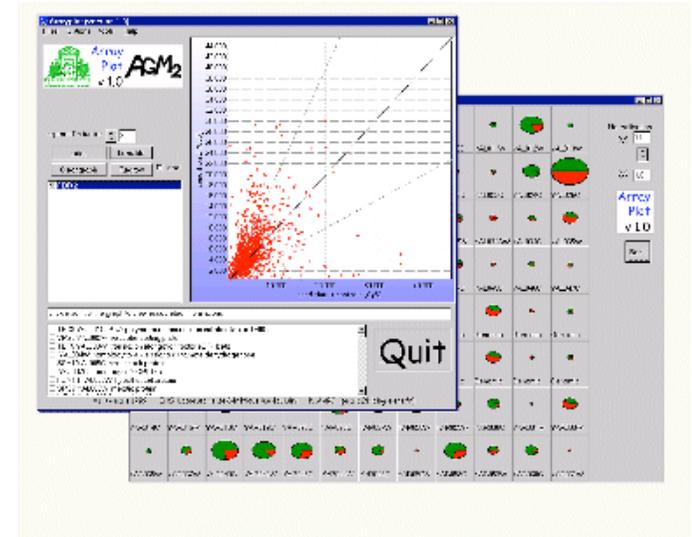
**Marquage ARN par biotinylation**

**2 hybridations** (sur 2 lames ≠)

# "Spotted micro-arrays" (1)



F. data analysis



## "spotted micro-arrays" (2)

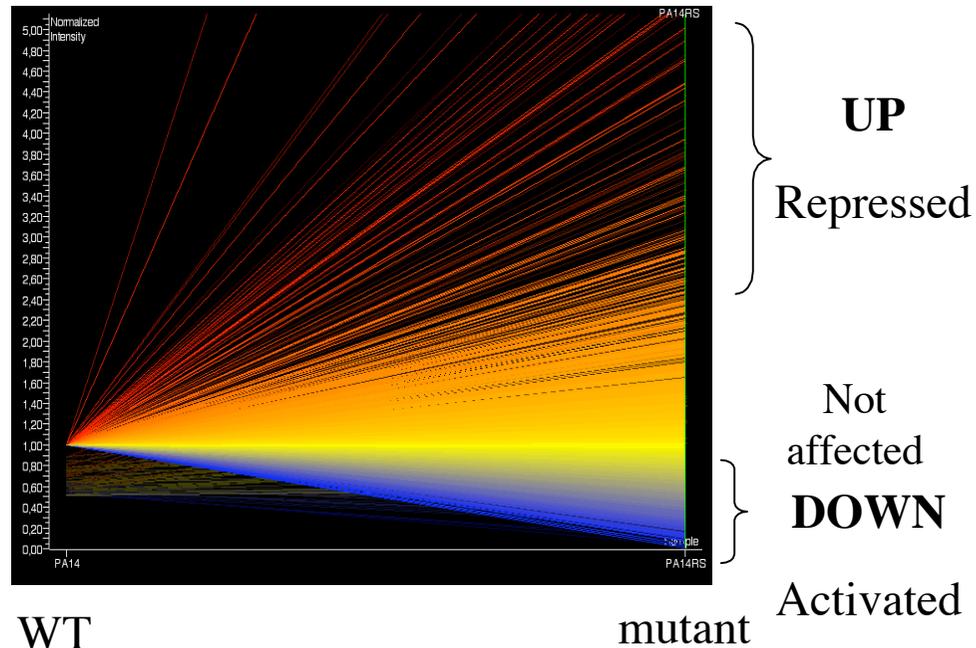
-*E. coli* cultivée en milieu riche ou minimal: suivi expression des 4290 gènes de son génome --> 225 gènes plus exprimés en milieu minimal (notamment codant pour protéines de tolérance au stress)

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

Affymetrix GeneChip<sup>®</sup>  
*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

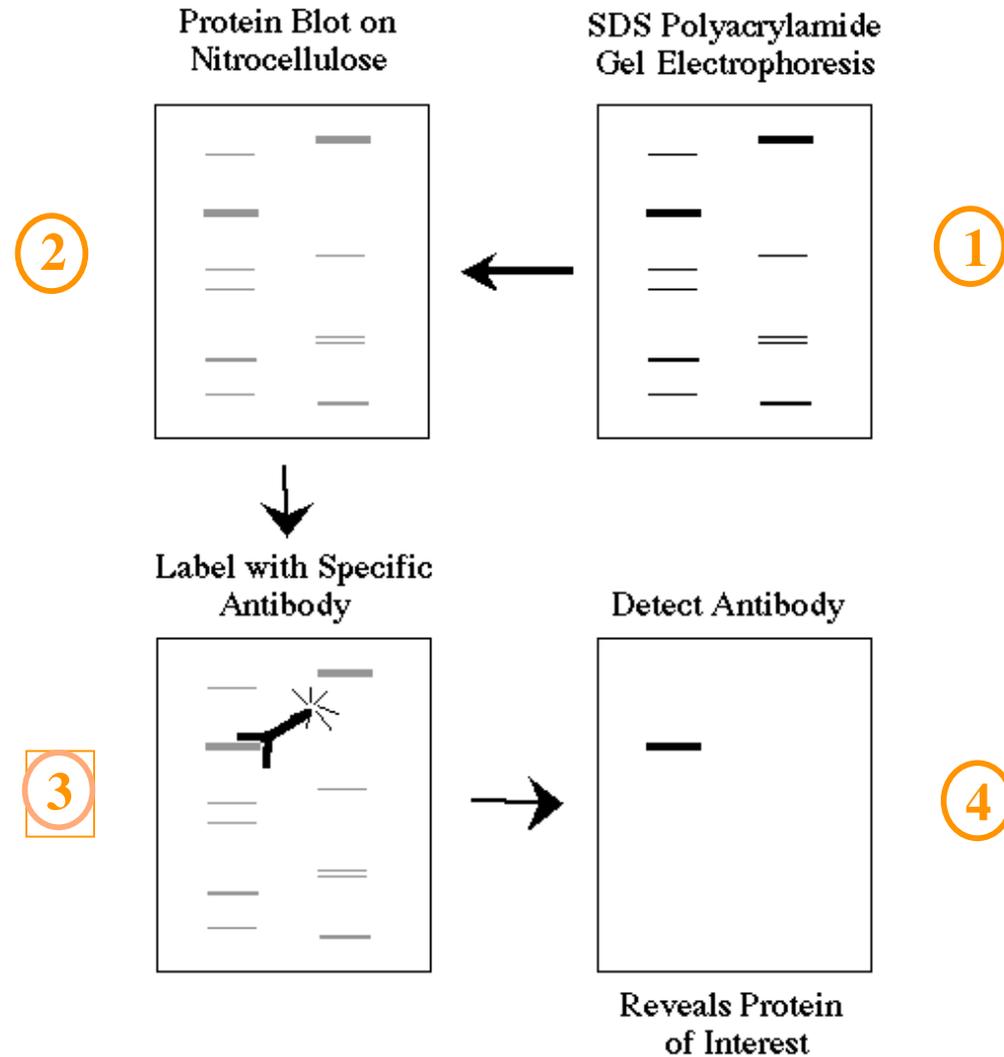
**Il est impératif de mettre en synergie les forces en présence (biologistes, mathématiciens et informaticiens) pour traiter cette quantité de données!!!!**

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

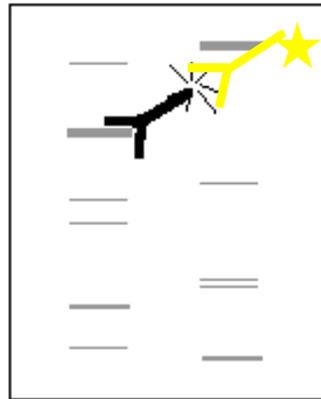
**But:** Détecter la présence d'une protéine dans un mélange grâce à un anticorps spécifique de celle-ci



# Détection

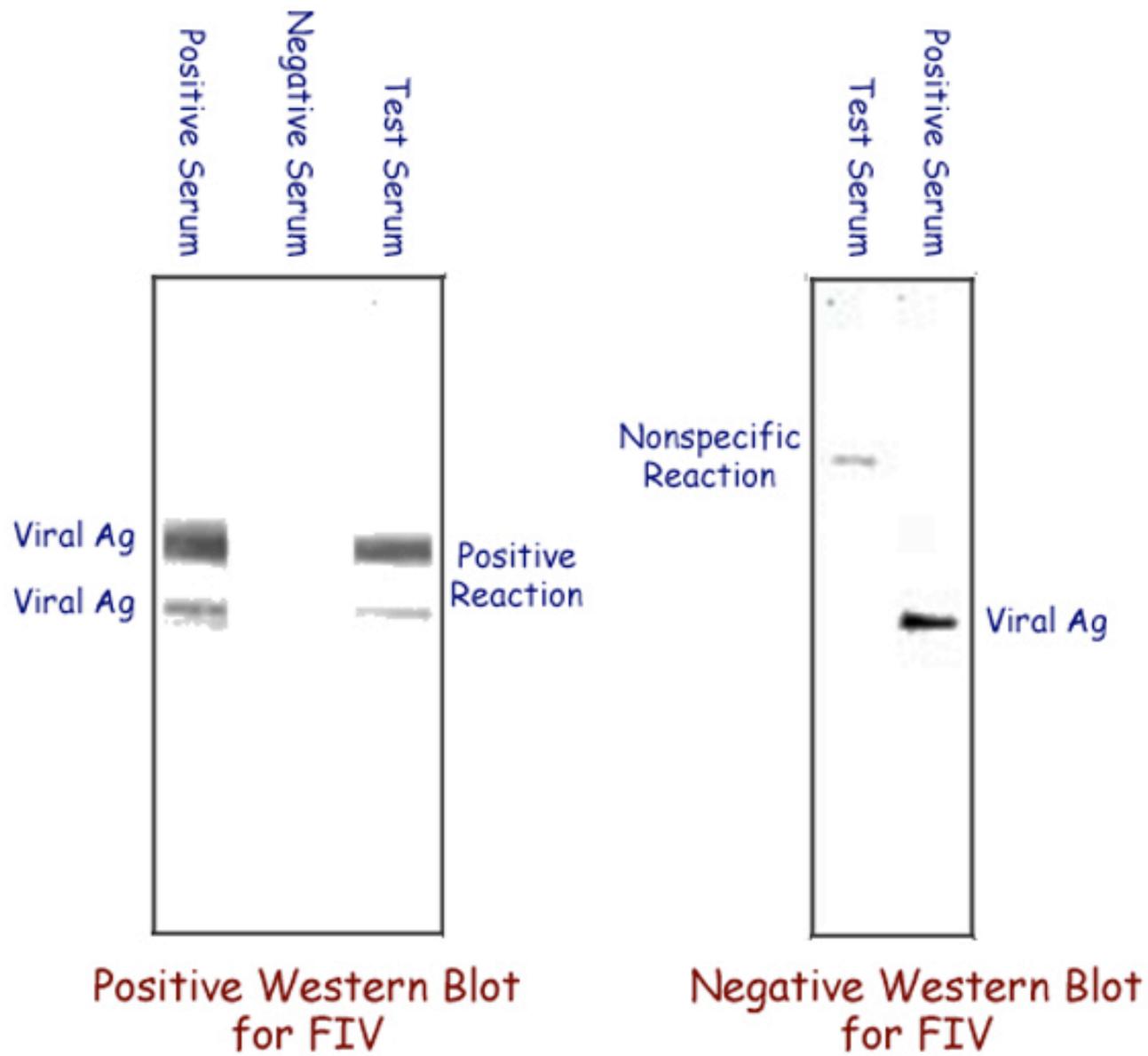
## X Sandwich d'Ac

2<sup>ème</sup> Ac reconnaît le 1<sup>er</sup>



## X Détection du signal

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



**NB: "protein arrays" existent**

# Comparaison des différents blots

