



## Immunoprécipitation

**Objectif :** Savoir quel type de nucléosome est présent sur quelle partie du génome

Cette technique permet donc de cartographier les modifications de l'ADN

*On veut voir quels gènes sont exprimés en sélectionnant les acétylations des Lysines (K) 9 de l'histone 3 [ K9 H3 ]*

### I – Les étapes

☉ Figurer la cellule en formant des liaisons covalentes (Protéines/ADN, ADN/ADN) **RÉVERSIBLE** grâce à du formaldéhyde

☉ Fragmenter et purifier la chromatine. On obtient des petits fragments de chromatine avec des nucléosomes différents ( modifications post traductionnelles différentes )

☉ Acheter/Fabriquer des Anticorps (Ac) spécifiques d'une certaine modification d'histone ( capable de reconnaître et de fixer cette modification *Par exemple les acétylations de la Lysine K 9 de l'histone 3*

☉ On fait notre immuno précipitation :  
On va créer des **complexes immuns = Anticorps + la modification de la chromatine associée**

**/!\ On récupère uniquement ce qui a précipité /\!**

C'est-à-dire les **fragments d'ADN** associés aux nucléosomes repérés par les anticorps (spécifiques de **notre modification** ) que l'on a inclus.  
Les fragments de chromatine qui n'ont pas **K9 H3 acétylé** n'ont pas précipité, ils forment le **surchargeant** et on s'en débarrasse.

#### PETIT RÉCAP :

A ce moment on se retrouve donc avec notre ADN qui a précipité, c'est à dire plein de fragments de chromatine qui ont **TOUS**, entre autre la modification de la chromatine qui nous intéresse (*l'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3*).

En fait on a enrichi les fragments qui ont notre modification. Ici on enrichit *l'acétylation en K9 H3 !*

☉ On réverse le pontage (= la fixation) (T°) et on purifie l'ADN (= on enlève les anticorps )

L'ADN obtenu est différent de l'ADN de contrôle avant l'immuno précipitation.

**NB : Input = ADN de contrôle avant ImmunoP**

**En gros on a sélectionné l'ADN qui nous intéressait à partir des modifications post traductionnelles de ses nucléosomes.**

### II - La visualisation !!

☛ Hybridation :

On fabrique une **sonde** de la région que l'on a **immuno précipité**, une autre pour l'**Input** (= contrôle). On **compare la quantité de fluorescence** sur l'une par rapport à l'autre :

Si c'est la même, notre gène n'a pas été enrichi → il ne possède pas notre modification

☛ PCR :

Cette technique consiste en **l'amplification de séquences spécifiques d'ADN**  
Aspect quantitatif : on détermine quel % exact a été enrichi

**/!\ Il faut connaître la séquence de la portion étudiée /\!**

On séquence à la fois l'immuno précipitat et l'Input.

On peut calculer différents rapports (*et c'est là que ça devient des math*)

☛ **RIP = Quantité PCR de l'immuno précipitat / Quantité totale d'ADN**

☛ **RC = Quantité PCR de l'Input / Quantité totale d'ADN**

☛ **RIP/RC = Facteur d'enrichissement**

Plus la modification recherchée est présente, plus la quantité PCR est importante

**Si RIP > RC c'est qu'il y a bien enrichissement et le facteur d'enrichissement est supérieur à 1.**