



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

☉ Figer 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 enrichit 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 enrichit → 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 enrichit

!/\ 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.