

Chapitre 07

Méthodes d'études des génomes et acides nucléiques

7.1. Extraction et purification de l'ADN

1. Introduction

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques purifiés, tirés de sources diverses, afin de pouvoir mener une analyse spécifique de détection d'OGM en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visibles, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées.

Les contaminants susceptibles d'inhiber la réaction PCR sont énumérés dans le Tableau 1. Afin d'éviter un résultat « faux-négatif » du fait de la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon, il est vivement recommandé de réaliser une expérience de contrôle visant à tester l'inhibition de la PCR. On recourt généralement à cette fin à une analyse PCR spécifique pour les végétaux (eucaryotes ou chloroplastes) ou spécifique à l'espèce.

Tableau 1. Quelques inhibiteurs de la PCR

Inhibiteur	Concentration inhibitrice
SDS	> 0,005%
Phénol	> 0,2%
Ethanol	> 1%
Isopropanol.	> 1%
Acétate de sodium	> 5 mM
Chlorure de sodium EDTA	> 25 mM
Hémoglobine	> 0,5 mM
Héparine	> 1 mg/ml
Urée	> 0,15 i.m/ml
Mélange de réactifs	> 20 mM > 15%

Vu qu'il existe une grande diversité de méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques, le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants :

- L'acide nucléique cible,
- L'organisme source,
- Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.).
- Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.),
- L'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADNc, etc.)

Les principes de certaines des méthodologies les plus utilisées aujourd'hui pour extraire et purifier des acides nucléiques sont décrits dans les sections suivantes.

2. Méthodes d'extraction

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible.

Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- Le rupture mécanique (ex. broyage ou lyse hypotonique),
- Le traitement chimique (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols)
- et la digestion enzymatique (ex. proteinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation de la nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

3. Méthodes de purification

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques suivantes :

- Extraction/précipitation,
- Chromatographie,
- Centrifugation et séparation par affinité.

3.1. Extraction/Précipitation

L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants d'acides nucléiques,

- ✓ une combinaison de **phénol** et de **chloroforme** sert fréquemment à supprimer les **protéines**.
- ✓ La précipitation par l'**isopropanol** ou l'**éthanol** est généralement utilisée pour **concentrer** les acides nucléiques. Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (tel que le **glycogène**) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation.
- ✓ D'autres méthodes de précipitation des acides nucléiques incluent la précipitation sélective à l'aide de fortes concentrations de sel («relargage») ou la précipitation de **protéines** en utilisant les changements au niveau du **pH**.

3.2. Chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent utiliser différentes techniques de séparation, telles que la filtration sur gel, l'échange d'ions, l'adsorption sélective ou la liaison par affinité.

- ✓ La filtration sur gel exploite les propriétés du tamisage moléculaire de particules de gel poreuses. Une matrice avec des pores d'une taille définie permet aux petites molécules de traverser les pores par diffusion, tandis que les plus grosses molécules sont exclues et éluées. Les molécules sont donc éluées afin de diminuer la taille moléculaire.
- ✓ La chromatographie par échange d'ions est une autre technique qui a recours à l'interaction électrostatique entre une molécule cible et un groupe fonctionnel sur la matrice à colonne. Les acides nucléiques (polyanions linéaires à forte charge négative) peuvent être élués des colonnes d'échange d'ions grâce à de simples tampons de sel,
- ✓ Dans la chromatographie par adsorption, les acides nucléiques sont fixés sélectivement par adsorption sur des silices ou du verre en présence de certains sels (ex.: des sels chaotropiques), alors que d'autres molécules biologiques ne se fixent pas. Un tampon ou une eau faible en sels peut ensuite éluer les acides nucléiques et produire ainsi un échantillon à utiliser directement dans des applications en aval

3.3. Centrifugation

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante. A titre d'exemple, l'ultracentrifugation isopycnique en gradients de CSCI à des forces g élevées a été longtemps utilisée pour la purification de plasmides. La centrifugation est souvent combinée à une autre méthode. Un exemple d'une telle utilisation est la chromatographie à colonne rotative qui combine la filtration sur gel et la centrifugation afin de débarrasser l'ADN ou l'ARN des contaminants de plus petit format (sels, nucléotides, etc.), pour l'échange de tampon ou pour la sélection de taille. Certaines procédures

combinent l'adsorption sélective sur matrice chromatographique (cf. paragraphe ci-dessus « Chromatographie ») à l'élution centrifuge pour purifier sélectivement un type d'acide nucléique.

3.4. Séparation par affinité

Ces dernières années, un nombre croissant de méthodes de purification ont combiné l'immobilisation par affinité d'acides nucléiques à la séparation magnétique. À titre d'exemple, des poly(A) + mARN peuvent être liés à des particules magnétiques revêtues de streptavidine par des oligo(dT) marqués à la biotine et le complexe de particules peut être extrait de la solution (et des contaminants non liés) à l'aide d'un aimant. Cette technique à phase solide simplifie la purification de l'acide nucléique, étant donné qu'elle peut remplacer plusieurs étapes de la centrifugation, de l'extraction organique et de la séparation de phase par une opération de séparation magnétique unique et rapide.

7.2. Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN par lecture au spectrophotomètre :

Une lecture au spectrophotomètre en ultraviolet permet de vérifier la pureté de l'ADN. Le rapport des DO (densités optiques) 260 nm/280 nm est normalement voisin de 1,8. Un rapport supérieur indique une contamination par des ARN. S'il y a contamination par des protéines (280 nm) ou du phénol (270 nm), le rapport sera très inférieur à 1,8. Lorsque l'ADN est pur, la quantité d'ADN peut être appréciée par lecture à 260 nm :

- 1 DO (à 260 nm) = 50 ng/μl pour l'ADN double brin;
- 1 DO (à 260 nm) = 40 ng/μl pour l'ADN simple brin.

1. Électrophorèse des acides nucléiques

Les acides nucléiques peuvent être séparés en fonction de leur taille par **électrophorèse** sur gel **d'agarose** ou de **polyacrylamide**. Une tension est appliquée au travers du gel, qui est constitué d'un réseau microscopique de pores. Parce qu'ils sont **chargés négativement**, les acides nucléiques migrent vers l'électrode positive (anode), à une vitesse qui est inversement à leur taille. Pour visualiser les bandes, la migration a lieu en présence de **bromure d'éthidium** (BET), un colorant qui se lie aux acides nucléiques et qui émet une fluorescence très vive en lumière ultraviolette.

L'ARN total extrait de cellules ou tissus analysés par cette technique, permet de visualiser essentiellement deux bandes correspondant aux ARN majoritaires de la cellule, les ARNr 28S et 18S.

L'ADN (que ce soit l'ADN génomique humain, un ADNC ou un ADN plasmidique) est en général soumis à une fragmentation par des enzymes de restriction (décrites ci-après), avant séparation des fragments par électrophorèse.

Le gel de polyacrylamide est plutôt utilisé pour séparer (par migration verticale) des petits fragments d'ADN (< 500 pb), alors que l'agarose est utilisé pour séparer (par migration horizontale) des fragments de 0,2 à 50 kpb. Le pouvoir de résolution du gel de polyacrylamide est supérieur à celui du gel d'agarose.

Chaque bande identifiée par électrophorèse représente un ensemble de fragments dont la taille est identique. Dans l'exemple représenté figure 1, plusieurs échantillons d'ADN différents digérés par l'enzyme de restriction **Hha I** ont été déposés dans des puits séparés. Un des puits de dépôt contient des fragments d'ADN de tailles connues, servant de marqueurs de taille. On ajoute dans les dépôts deux colorants :

- du bleu de méthylène visible sur le gel qui va migrer très rapidement avant les fragments d'ADN pour visualiser le front de migration;
- du bromure d'éthidium qui se fixe spécifiquement à l'ADN quelle que soit la séquence et qui émet une fluorescence mauve lorsqu'on examine le gel sous lumière ultraviolette à 254 nm, ce qui permet de visualiser et éventuellement de photographier les fragments d'ADN digéré.

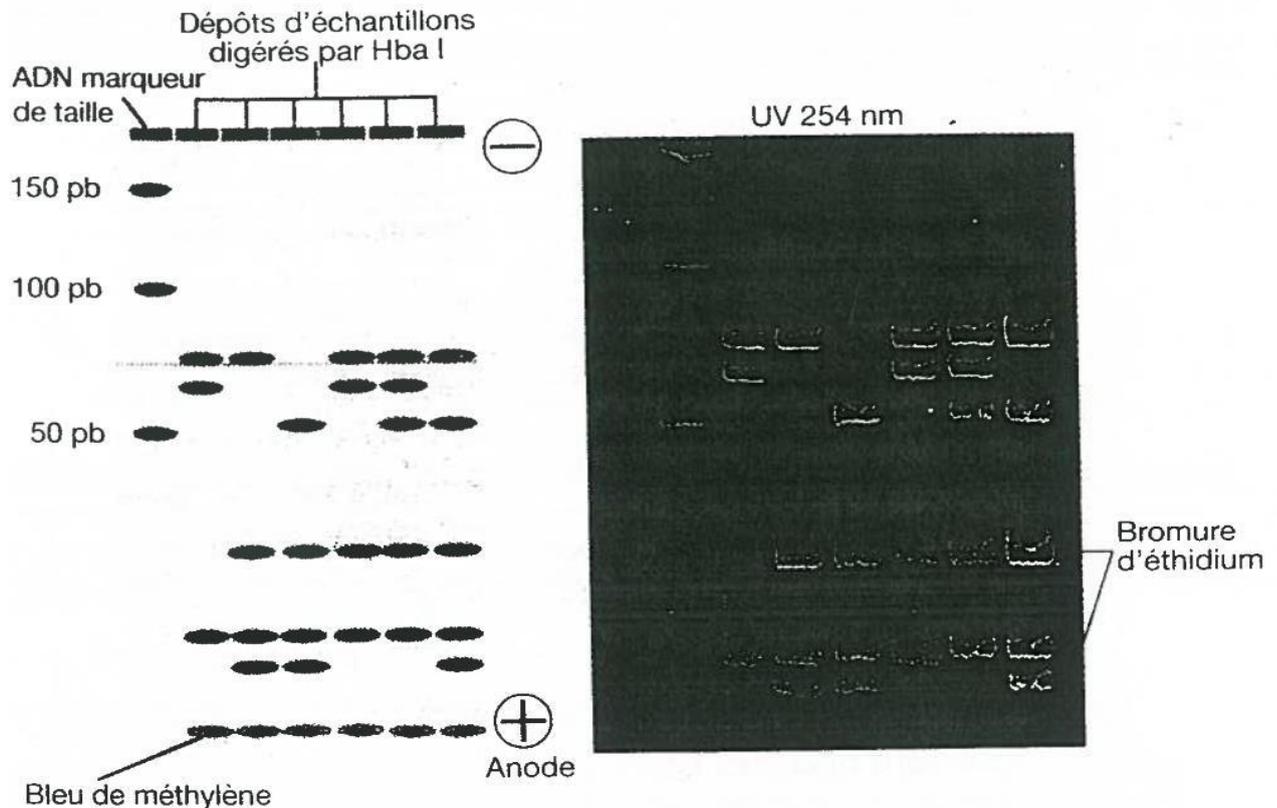


Fig 3. Exemple d'électrophorèse de l'ADN.

L'autoradiographie est une méthode alternative pour visualiser les bandes d'ADN. Avant la coupure par des enzymes de restriction, l'ADN a été marqué par le radio-isotope $p32$. Les particules β émises par le $p32$ vont impressionner un film photographique, qui révélera la position de toutes les bandes d'ADN au développement.

7.3. Les enzymes utilisées pour l'étude des acides nucléiques

A. Les nucléases

Les enzymes qui hydrolysent les liaisons phosphodiester d'un acide nucléique (selon la réaction représentée figure 10.4a) sont appelées nucléases. Les exonucléases hydrolysent les liaisons phosphoesters aux extrémités 5' ou 3' de la chaîne, alors que les endonucléases hydrolysent - des liaisons phosphoester à distance des extrémités.

1. Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des enzymes de type endonucléase qui réalisent des coupures de l'ADN double brin, en des sites spécifiques, déterminés par une courte séquence de quatre à huit paires de nucléotides. La réaction se produit en présence de $MgCl_2$ (10 mmol/L), l'ion Mg^{2+} étant un cofacteur et est, en général, irréversible. Les séquences cibles existeront donc par le seul fait du hasard dans n'importe quelle séquence d'ADN longue. On peut ainsi estimer qu'un site de 6 bp se rencontrera environ toutes les 4^6 (soit 4 096) bp, ce qui générera des fragments ayant en moyenne 4,1 kb.

7.4. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase. La découverte d'une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes (70 à 75 °C) du Yellowstone National Park, *Thermus aquaticus*, et l'utilisation par la suite de sa polymérase, stable jusqu'à des températures proches de 100 °C, est à l'origine du développement de cette technique.

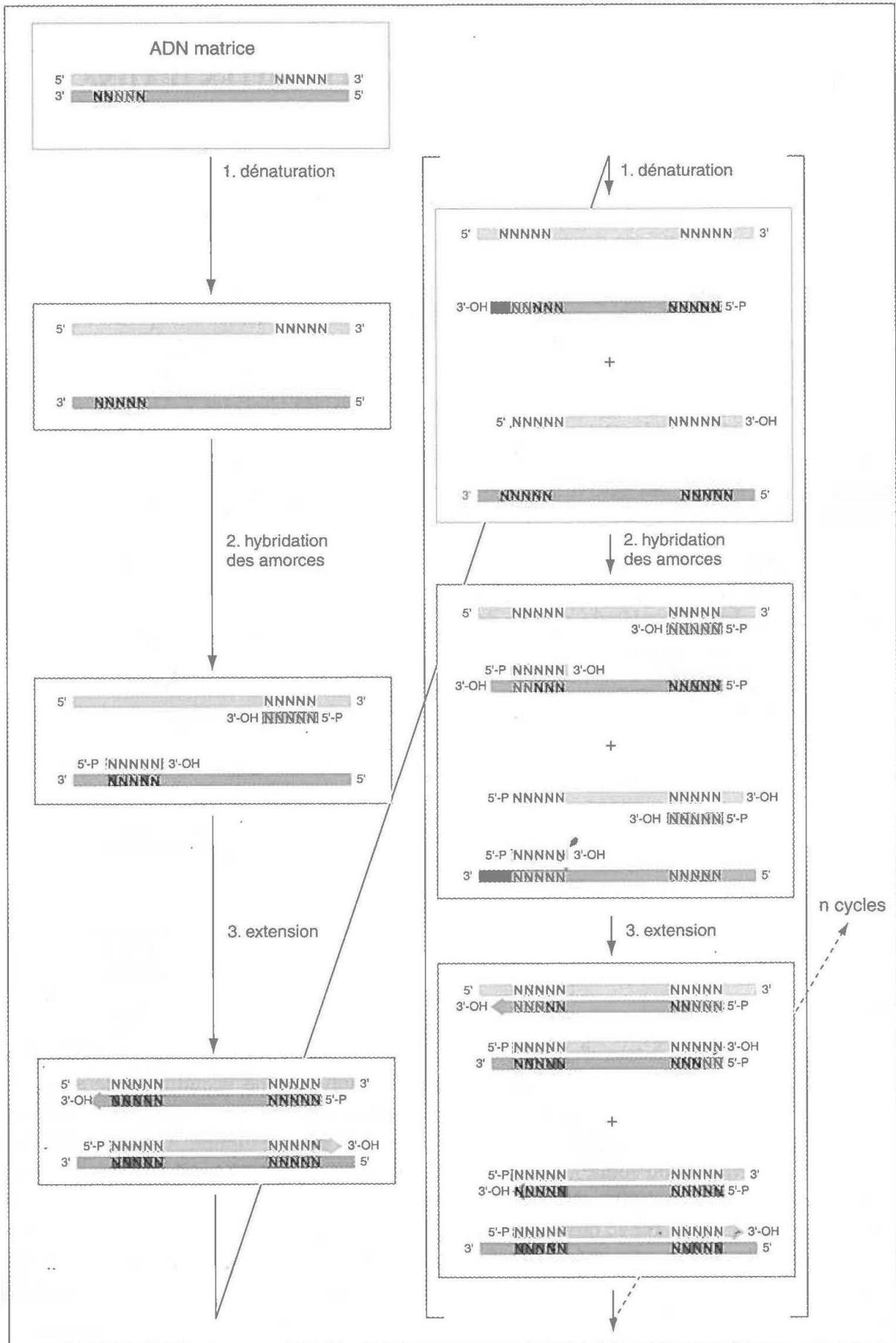
Principe

Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95 °C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares ;
- L'hybridation (*annealing*) d'amorces oligonucléotidiques (ou *primers*) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40 °C et 65 °C afin de permettre une bonne fixation des amorces) ;
- La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des amorces, réalisée à la température optimale de 72 °C.

Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé : 2^n molécules sont ainsi obtenues après n cycles, soit par exemple 1048576 molécules après vingt cycles.

Cette technique de PCR a littéralement révolutionné les recherches en biologie moléculaire et trouve de nombreuses applications aussi bien dans le clonage et l'étude de l'expression des gènes que dans la recherche d'un polymorphisme génétique.



7.5. SÉQUENÇAGE D'ADN

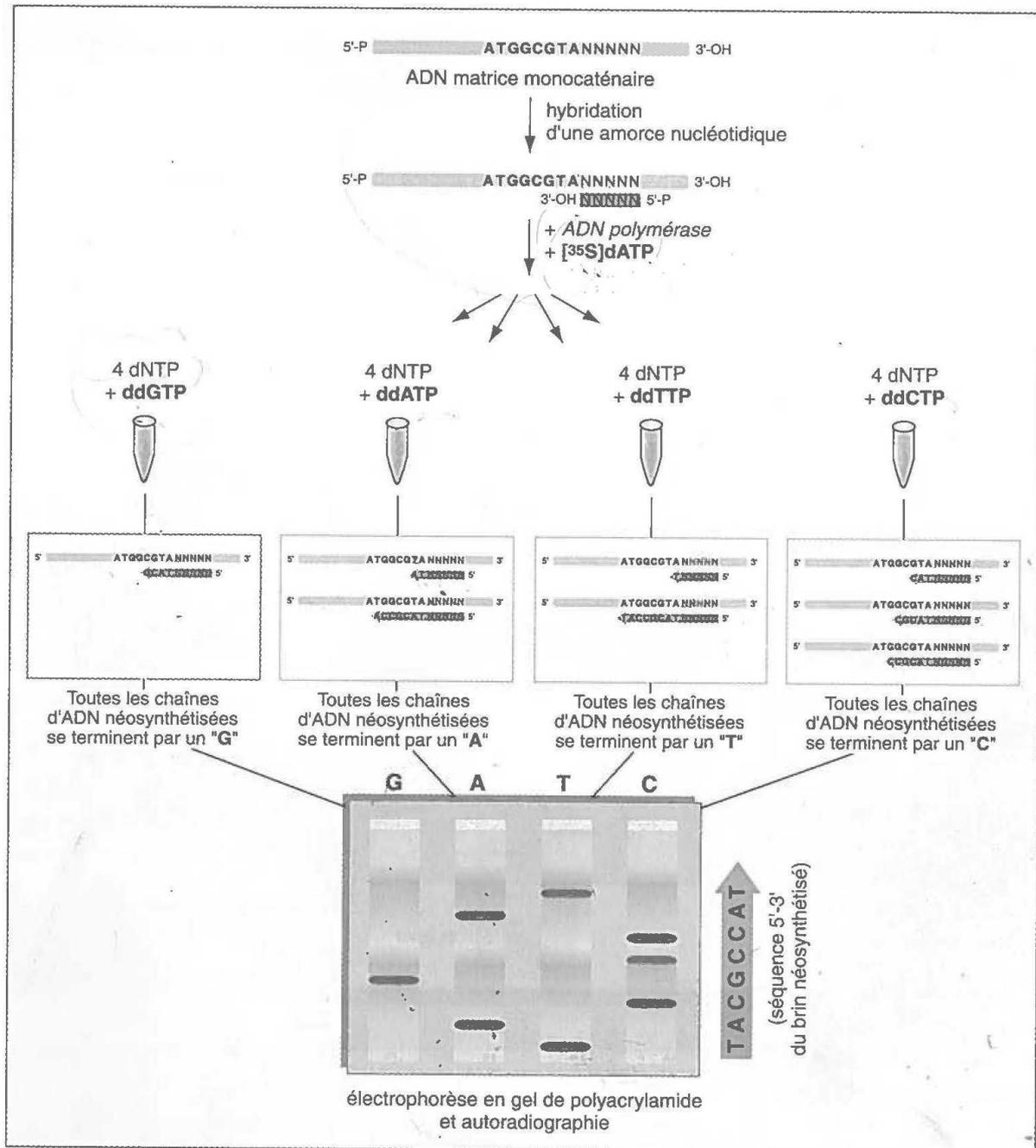
La caractérisation fine d'un gène passe par son séquençage, c'est-à-dire par la connaissance du nombre, de la nature et de l'ordre des nucléotides qui le composent. Cet agencement permet de connaître par exemple l'emplacement des différents sites de restriction du gène afin de mieux le manipuler. Enfin, la traduction *in silico* (par l'ordinateur) de la séquence nucléotidique en séquence d'acides aminés permet éventuellement de confirmer ou de proposer une fonction de la protéine codée par le gène.

Plusieurs techniques de séquençage d'ADN existent, mais nous ne décrivons ici que le principe d'un séquençage enzymatique par incorporation de didésoxynucléotides. Les didésoxynucleotides (ddNTPs) sont des désoxynucléotides modifiés, capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse, mais empêchant l'incorporation du nucléotide suivant.

Principe

Une amorce nucléotidique est hybridée au fragment d'ADN monocaténaire dont on veut déterminer la séquence. A partir de l'extrémité 3'-OH de l'amorce appariée, une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice en présence de désoxynucléotides. L'un des désoxynucléotides doit être marqué (radioactif ou fluorescent). Le mélange est ensuite réparti dans 4 tubes marqués A, C, G et T. Chacun de ces tubes contient, en plus des dNTP, le ddNTP correspondant. Dans chaque tube, le ddNTP ajouté est incorporé dans les fragments en cours d'élongation.

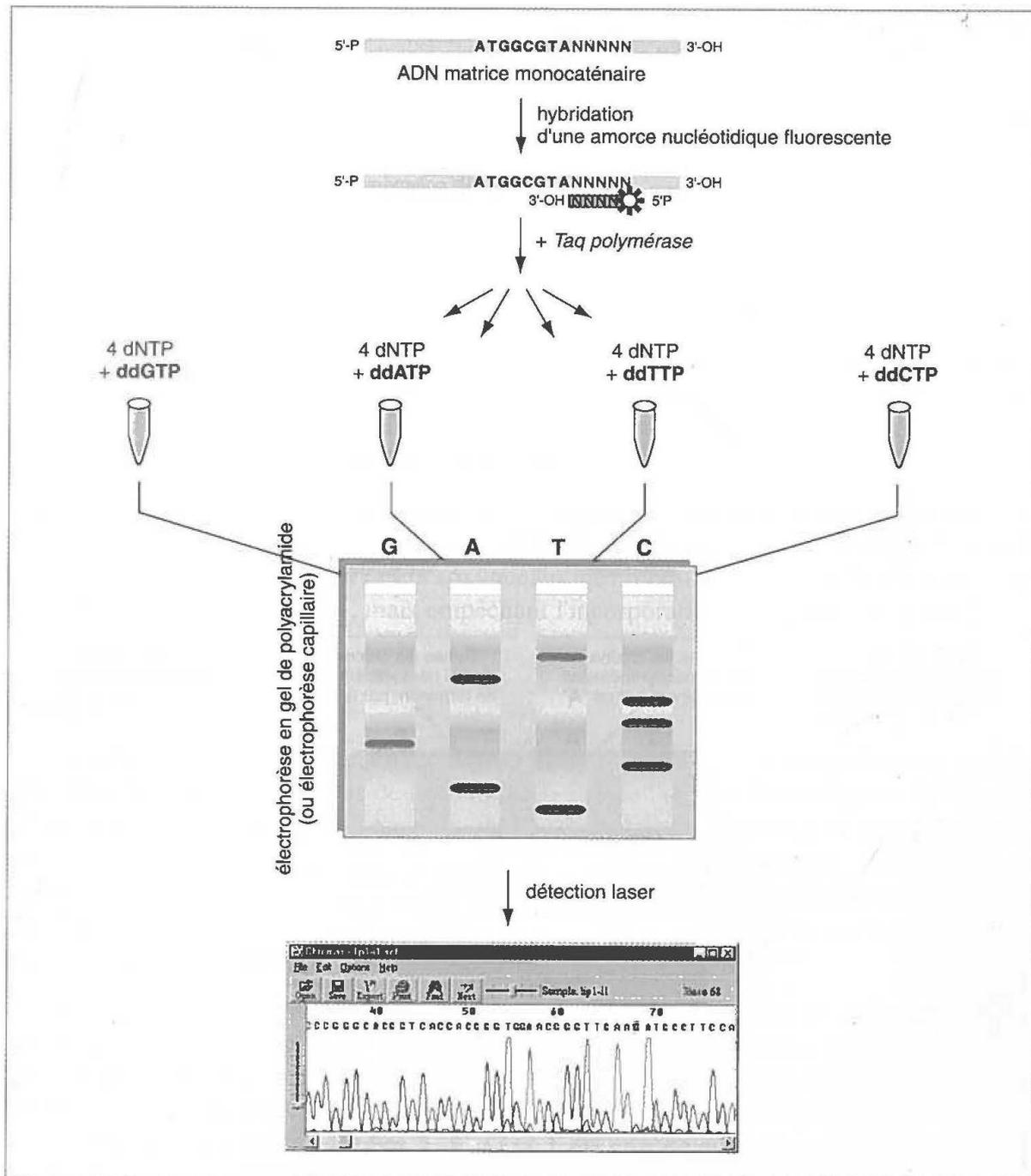
Chaque fois qu'un ddNTP est incorporé à une position, l'élongation de la chaîne est stoppée, ce qui génère un ensemble de molécules de tailles différentes, mais se terminant toutes par le même ddNTP. Si le dNTP et le ddNTP correspondant sont ajoutés en quantités adéquates, tous les fragments d'ADN synthétisés de novo et se terminant par ce ddNTP seront représentés. Le contenu des 4 tubes A, C, G et T est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (ou en électrophorèse capillaire). Les différents fragments marqués néosynthétisés migrent en fonction de leur taille et sont séparés à la base près. Une autoradiographie (cas des nucléotides radioactifs) ou une lecture en fluorescence (cas des nucléotides fluorescents) est réalisée après migration des molécules dans le gel. La séquence 5'-P → 3'-OH du brin néosynthétisé peut être lue du bas vers le haut, en comparant les positions relatives des bandes dans les 4 pistes.



Séquençage automatique

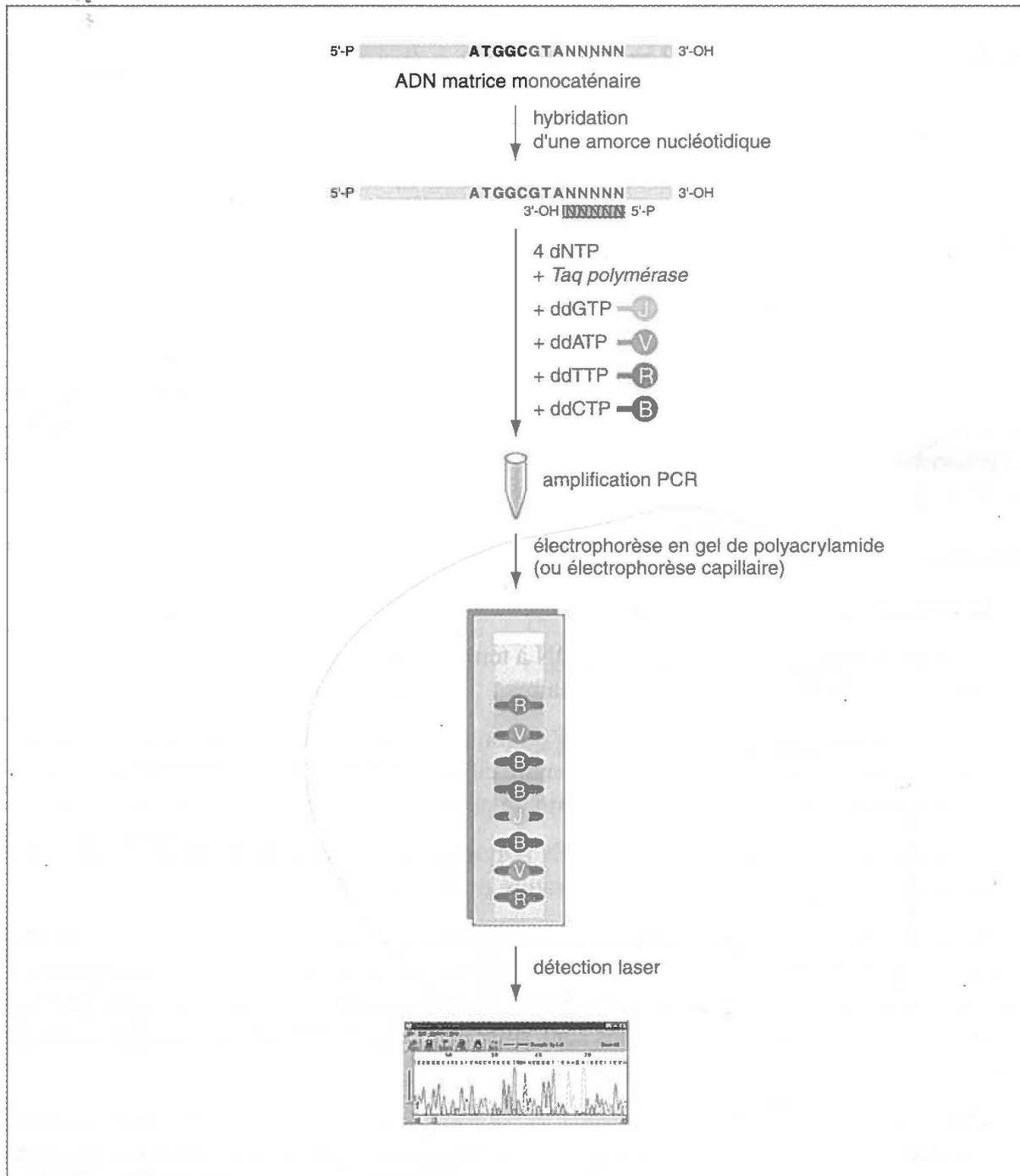
Lors de ces analyses, la lecture du gel et l'acquisition des données sont automatiques. Dans ce cas, le marquage des molécules se fait à l'aide de marqueurs fluorescents. Lors de la migration sur gel, les échantillons sont détectés à leur sortie par un laser qui identifie la molécule marquée. De nouveaux systèmes fondés sur l'électrophorèse capillaire permettent une meilleure automatisation du système : les échantillons sont préparés manuellement puis déposés sur un chargeur automatique. L'appareil prélève automatiquement l'échantillon et le place sur le capillaire. Il n'est plus nécessaire de préparer des gels d'acrylamide. Les séquenceurs

automatiques peuvent analyser en quelques heures jusqu'à 96 échantillons. L'automatisation peut également concerner la réaction de séquençage qui se fait de plus en plus par des robots couplés à des machines PCR.



Dans la méthode dite du *Dye primer*, l'amorce utilisée dans la réaction de séquence est marquée par un fluorophore (*dye*, colorant). La réaction est réalisée dans 4 tubes séparés, chacun contenant l'amorce couplée à un fluorophore en présence d'un ddNTP particulier correspondant. L'ADN polymérase utilisée pour la réaction est thermostable la polymérisation

se fait dans une machine de type PCR avec des cycles comprenant 3 étapes : dénaturation, hybridation et extension (voir Fiche 24). En fin de réaction, les fragments d'ADN dénaturés sont séparés sur un gel de polyacrylamide ou une matrice d'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN sont analysés automatiquement à la sortie du gel par un système laser permettant d'identifier le fluorophore. Les résultats sont transférés sur ordinateur et un programme informatique permet d'avoir accès au chromatogramme correspondant à la séquence.



Dans la méthode dite du *Dye terminator*, ce sont les ddNTP qui sont marqués chacun avec un fluorophore spécifique. Tout se déroule selon le même principe que pour la méthode dite du *Dye primer* à la différence près que la réaction se fait dans un seul tube. L'avantage de la méthode dite du *Dye terminator* est que l'on peut utiliser n'importe quelle amorce pour la réaction de séquence. Il est donc possible de séquencer un long fragment d'ADN cloné en choisissant l'amorce suivante à partir de la fin de la réaction de séquence précédente. C'est la méthode actuellement la plus utilisée.