

IV- Méthodes d'analyse des génomes et acides nucléiques

Rappel : La structure de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est composée de groupement phosphate lié à un sucre (le désoxyribose) qui est lui-même fixé à une des 4 bases azotées, A (adénine), C (cytosine), G (guanine), T thymine). Un groupe « phosphate-sucre-base azotée » constitue un nucléotide. Les nucléotides sont liés les uns aux autres pour former un brin d'ADN. L'ADN est donc un polymère de nucléotide. Deux brins d'ADN interagissent entre eux par les bases azotées formant une molécule d'ADN double brin. Cette molécule est similaire à une échelle dans laquelle les groupements phosphate-ribose constitueraient les montants et les bases azotées formeraient les barreaux. Les deux brins d'ADN dans cette échelle sont en orientation opposées (antiparallèle). Cette échelle est torsadée donnant la fameuse forme de double hélice à l'ADN double-brin.

1- Extraction et purification de l'ADN

1.1. Introduction

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques. Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases endogènes une fois la cellule lysée.

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. protéinase 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.

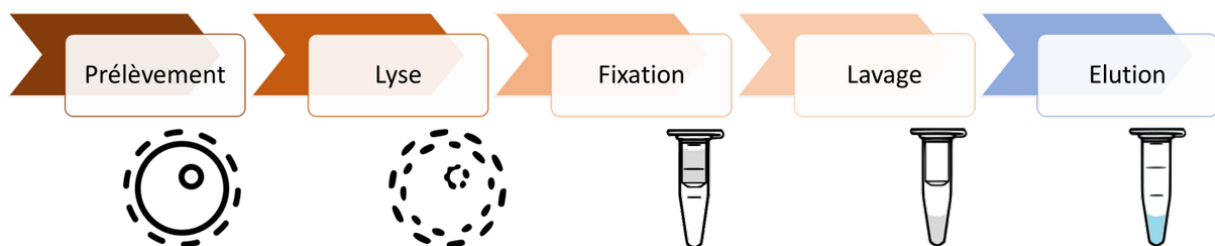


Figure 1 : les étapes d'extraction de l'ADN

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 élué 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. Elle consiste à séparer les composés d'une solution aux différentes densités en les exposants à une force centrifuge. Ce procédé de séparation des constituants d'un liquide permet d'isoler deux liquides, ou les particules solides d'un fluide.

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.

4. le spectrophotomètre

Spectrométrie et spectrophotométrie sont des méthodes d'analyse grâce auxquelles on parvient à déterminer le taux d'**absorbance d'une substance chimique**, c'est-à-dire sa capacité d'absorption de la lumière.

Pour procéder à un **dosage par spectrophotométrie**, on utilise un appareil spécial, le **spectrophotomètre** qui est capable d'évaluer le **spectre d'absorbance** d'une solution.

Le **principe de la spectrophotométrie** est simple : l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière qu'il reçoit, une fois celle-ci passée à travers un récipient transparent (cuvette dont la matière doit être adaptée à la longueur d'onde), contenant la solution à étudier. À partir de l'intensité de la lumière qui est émise (notée I_0) et d'après la mesure de l'intensité de la lumière transmise (I), l'appareil calcule l'absorbance (A). La formule algébrique de cette opération est : $A = \log(I_0/I)$.

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/ μ l pour l'ADN double brin
- 1 DO (à 260 nm) = 40 ng/ μ l pour l'ADN simple brin

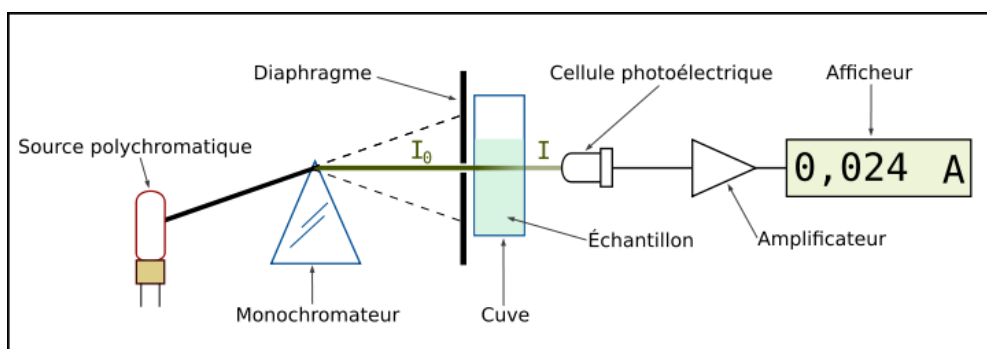


Figure 2 : Le spectrophotomètre

Source polychromatique : sont les lampes à décharge, éclairage public au sodium, elles sont constituées d'un ou plusieurs intervalles continues de longueur d'onde

Monochromateur : est un dispositif optique qui sépare la lumière polychromatique (telle que la lumière du soleil ou la lumière provenant d'une source lumineuse) en une gamme de longueurs d'onde individuelles (lumière monochromatique) et permet de sélectionner une bande étroite de ces longueurs d'onde individuelles.

Diaphragme : une simple fente fine, permet d'éclairer l'échantillon avec un faisceau de faible largeur, donc de bonne qualité monochromatique.

Le photodétecteur mesurant quant à lui l'intensité du rayonnement transmis après traversée de la solution échantillon.

5. L'électrophorèse des acides nucléiques

L'électrophorèse d'acides nucléiques sur gel est une technique de biologie moléculaire qui permet de séparer, d'identifier et de purifier des fragments d'ADN et d'ARN en fonction de leur taille et de leur charge. Elle consiste à séparer des molécules d'ADN et d'ARN en les soumettant à un champ électrique afin de faire migrer les acides nucléiques chargés négativement dans une matrice de gel d'agarose ou de polyacrylamide.

La matrice de gel fait office de tamis : les molécules courtes traversent les pores du gel plus rapidement que les molécules longues.

- 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.

Le bromure d'éthidium (BET) est une substance chimique couramment utilisée dans les laboratoires de biologie moléculaire et cellulaire comme marqueur non radioactif des acides nucléiques. Il permet d'identifier et de visualiser des brins d'ADN ou d'ARN dans les électrophorèses et dans d'autres méthodes de séparation.

- 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 bp), 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.

Les gels d'agarose sont utilisés pour des séparations de fragments de plusieurs centaines de bases, **les gels de polyacrylamide** permettent de séparer à la base près des fragments de plusieurs dizaines de bases

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.

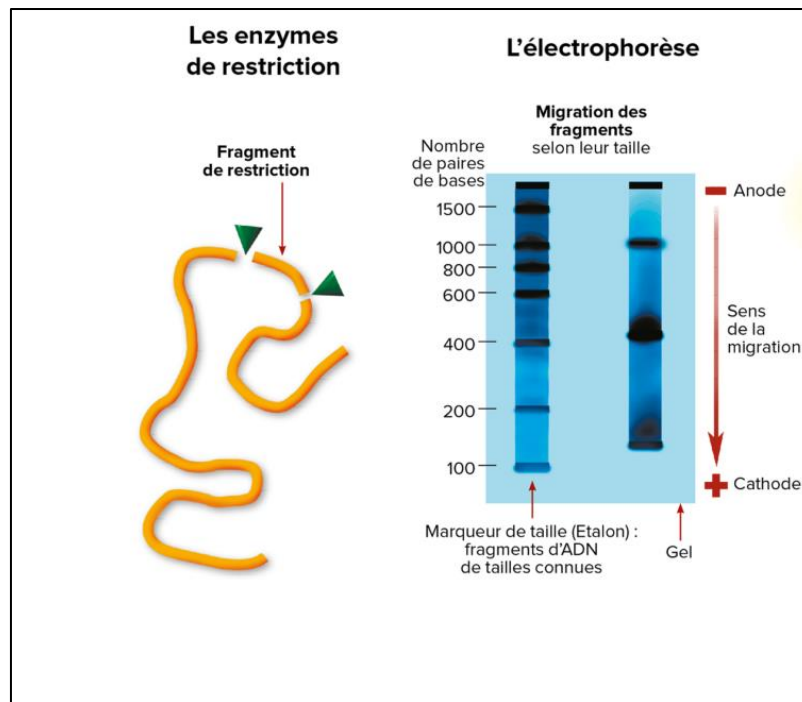


Figure 3 : La visualisation d'un fragment d'ADN

- **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. Les particules β émises par le p32 vont impressionner un film photographique, qui révélera la position de toutes les bandes d'ADN au développement.

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

6.1. Les nucléases

Les enzymes qui hydrolysent les liaisons phosphodiester d'un acide nucléique (selon la réaction représentée) 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.

Ces enzymes peuvent être de deux types : des **endonucléases**, qui créent des coupures à l'intérieur même des chaînes d'ADN ou d'ARN et créent de cette façon deux brins distincts ; **des exonucléases**, qui détachent les nucléotides situés aux extrémités des chaînes d'ADN ou d'ARN.

6.1.1. 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 enzymes de restriction sont issus de bactéries. Leur rôle est de couper l'ADN étranger des virus qui infectent les bactéries, les bactériophages. Ainsi, les enzymes de restriction empêchent les virus de se multiplier et permettent aux bactéries de survivre.

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 46 (soit 4 096) bp, ce qui générera des fragments ayant en moyenne 4,1 kb (kilo paires de base).

7. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.

7.1. Fonctionnement de la PCR

Une PCR se décompose en trois étapes :

A. Dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95 °C),

B. Hybridation : en abaissant la température (50-70 °C), des amorces constituées de courts fragments d'ADN viennent s'hybrider sur les brins d'ADN,

C. Elongation : une enzyme polymérase, **la Taq polymérase**, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction.

Les oligonucléotides sont de courts segments de chaînes d'acides nucléiques (ARN ou ADN) de quelques dizaines de nucléotides. Ils sont en général obtenus par synthèse chimique, sous forme de simple brin (modifié ou non modifié) se composant de groupes fonctionnels choisis pour leur intérêt.

Un thermocycleur, ou cycleur, permet d'automatiser la réaction PCR en programmant des cycles consécutifs de montée et de baisse de température.

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.

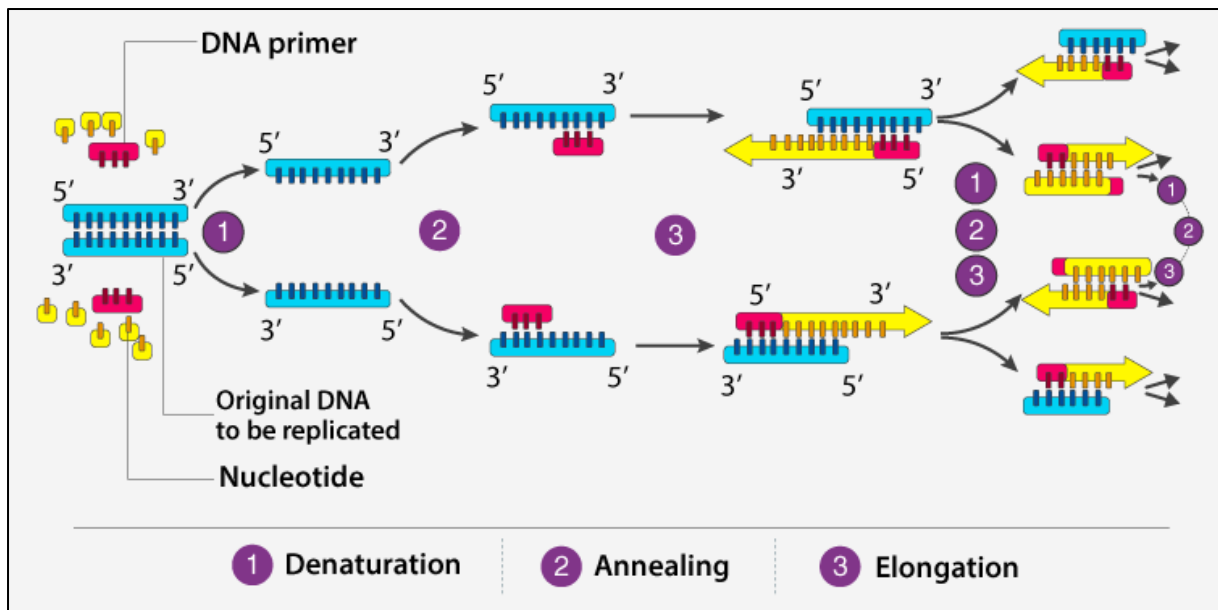


Figure 4 : Le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

7.2. Applications de la PCR

La PCR est notamment utile quand on dispose de matériel génétique en faible quantité ou en mauvais état. Elle trouve de nombreuses applications dans :

- le clonage et le séquençage génétique
- le diagnostic de maladies génétiques
- la détection de mutations
- le dosage protéique
- la détection des OGM
- l'identification d'individus (science médico-légale)
- la détermination de filiation
- la mutagenèse dirigée (à l'aide d'amorces mutées)
- le marquage de l'ADN (notamment pour la recherche fondamentale)
- l'étude des fossiles.

8. Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci.

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

8.1. Les différents acteurs du séquençage

- **L'ADN** provient des organismes dont on souhaite séquencer le génome. L'ADN, le plus souvent sous la forme double-brin, est dénaturé afin de séparer les deux brins. Celui qui sera séquencé s'appelle le brin « matrice » ;
- **Les nucléotides**, ou plutôt désoxynucléotides, sont les briques de l'ADN (A, C, G ou T). Ils sont attachés les uns aux autres grâce à des liaisons chimiques nécessitant la présence d'un groupement OH particulier (sur le carbone 3' du ribose) ;
- **Les didésoxynucléotides** sont des nucléotides privés du groupement OH en position 3'. Leur incorporation dans une chaîne d'ADN interrompt définitivement la synthèse de l'ADN ;
- **Une amorce** est un brin d'ADN très court (une vingtaine de nucléotide), qui peut s'hybrider à une séquence complémentaire spécifique ;
- **L'ADN polymérase** est une enzyme qui a pour rôle de copier l'ADN, en synthétisant un brin complémentaire au brin matrice. L'ADN polymérase ne fonctionne qu'en ajoutant des nucléotides à une amorce déjà présente, en fonction de la succession de nucléotides du brin matrice (un A est toujours positionné en face d'un T et un C toujours en face d'un G).

8.2. Les étapes du séquençage

1 - **Pour le séquençage**, tout se passe initialement dans un tube à essai, en présence des acteurs de la synthèse de l'ADN : de l'ADN à séquencer, des nucléotides, une amorce et de l'ADN polymérase. Chacun de ces acteurs est présent en grande quantité. La réaction de séquençage fait donc intervenir de multiples réactions.

2 - **L'ADN polymérase** utilise aléatoirement les nucléotides présents dans le milieu pour copier le brin (ou fragment, ou chaîne) matrice en synthétisant un ADN de séquence complémentaire, du moment que la base (A, C, G ou T) est respectée.

3 - Lorsque l'ADN polymérase choisit par hasard un didésoxynucléotide (ce qui est rare puisqu'il y en a moins que des nucléotides) et qu'elle l'incorpore dans la chaîne en synthèse, celle-ci s'interrompt prématurément. Puisque chaque didésoxynucléotide est marqué par un fluorochrome différent (A vert, T rouge, G jaune et C bleu), une chaîne qui se termine par exemple par un A sera verte.

4 - Puisqu'un grand nombre de réactions de synthèse ont lieu dans le tube, il existe statistiquement des chaînes de toutes les tailles (correspondant à un arrêt de la synthèse à chaque nucléotide) et beaucoup de fragments d'une même taille. Ces chaînes commencent toutes au même endroit sur l'ADN matrice (déterminé par l'amorce utilisée), toutes celles qui possèdent la même longueur se terminent donc par le même didésoxynucléotide marqué.

5 - Il est alors possible de séparer les chaînes d'ADN obtenues en fonction de leur taille, sur un gel d'acrylamide en présence d'un courant électrique. Plus les chaînes sont courtes, plus elles migrent loin et tous les fragments d'une même taille migrent à la même distance.

On obtient alors une succession de bandes colorées, chacune correspondant au dernier nucléotide incorporé. Il suffit alors de lire la succession des couleurs pour connaître l'ordre des nucléotides, c'est-à-dire la séquence de l'ADN, étape assurée automatiquement par les détecteurs du séquenceur.

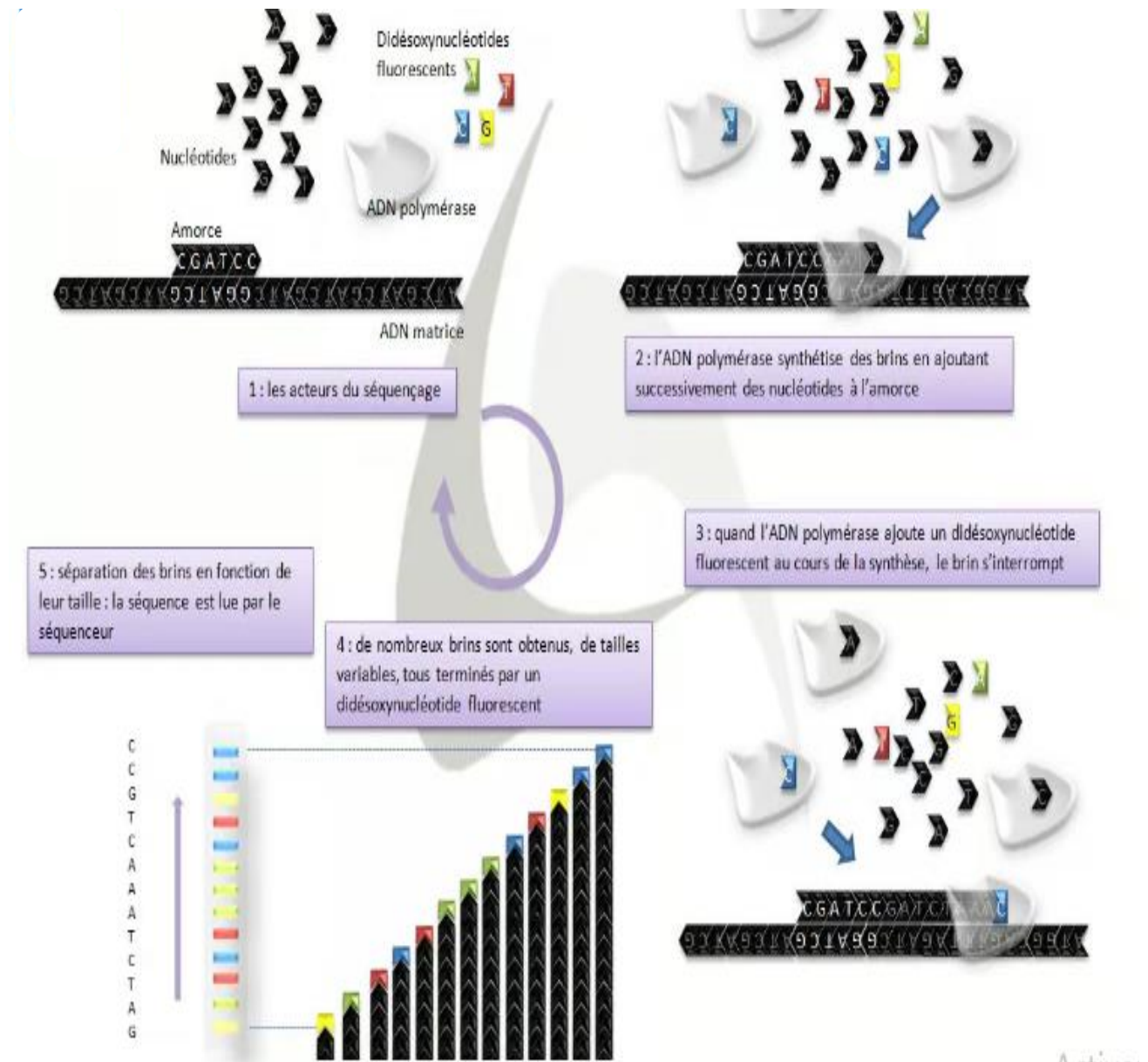


Figure 5 : les différentes étapes de séquençages

8.3. 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

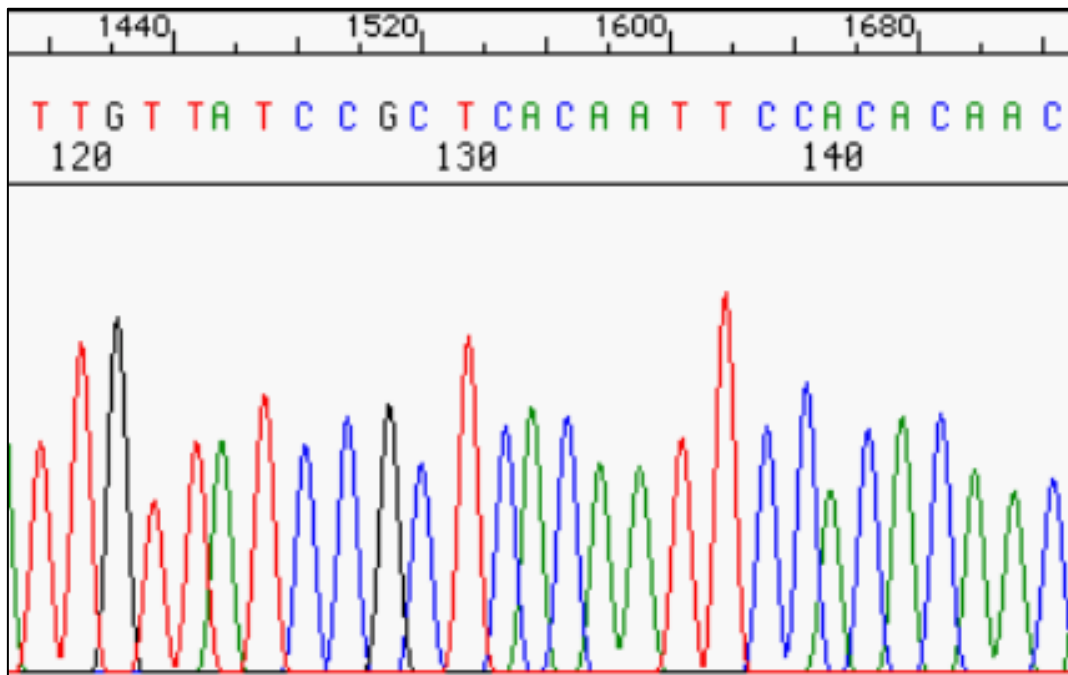


Figure 6 : séquençage automatique

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.

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.