

Partie III :

Les techniques de base de la biologie moléculaire

CHAPITRE /10

A/ Extraction et purification de l'ADN

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.

I.1. 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 :

- La 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.

I.2. 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.

I.2.1. 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**.

I.2.2. 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

I.2.3. 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.

I.2.4. 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.

B/ Méthodes d'étude des acides nucléiques

II. 1. 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.

II. 2. 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 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.