

TD 01 : Exemples sur la technique d'extraction d'ADN

1. Extraction d'ADN à partir du sang humain

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies musculaires des malades ou des biopsies de villosités chorales ou des cultures de cellules amniotiques (amniocytes, fibroblastes...). Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction de l'ADN doit être adaptée à l'échantillon biologique, à la nature du génome, au nombre de copie dans l'échantillon et aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement

Au cours de l'extraction certaines précautions doivent être prises comme l'utilisation de gants, la stérilisation du matériel, l'utilisation de pipettes spécialisées, l'usage de produits consommables jetables comme des pointes à filtre stériles.....

Les principaux procédés d'extraction de l'ADN diffèrent et peuvent se classer en trois principaux types :

- 1- Les méthodes utilisant des solvants organiques.
- 2- Les méthodes utilisant des solvants non organiques.
- 3- Les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.

☐ Méthode d'extraction au NaCl

- **La lyse des globules rouges et préparation du culot de leucocytes :**

Le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges.

Les solutions de lyse des globules rouges sont nombreuses et variées. Par exemple : Tris 10 mM /EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) 10 mM. La lyse est en général réalisée à 4 °C pendant 20 à 30 minutes.

Le lysat est centrifugé (15 min, 1 500 g) et le surnageant est éliminé.

- **Lyse des leucocytes, dénaturation du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN**

le culot cellulaire contenant les leucocytes est repris dans une solution saline (NaCl /EDTA) et est traité par une solution de lyse des globules blancs contenant du l'SDS (sodium dodecyl sulfate) .

L'ADN nucléaire libéré dans le milieu est alors le plus souvent traité par une protéinase très active, qui est la protéinase K elle a pour but de digérer les protéines qui lui étaient associées (18 h à 37 °C).

- **Extraction et purification de l'ADN: méthodes utilisant des solvants non organiques : le NaCl**

Traiter uniquement le lysat cellulaire (produit résultant d'une lyse) par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines en ajoutant 1 ml de NaCl 4M et centrifugeant 15 min à 2500 tours/min.

- **Précipitation de l'ADN**

La précipitation est le plus souvent réalisée par de l'éthanol absolu à froid et à haute concentration. La pelote d'ADN se forme, puis se précipite sous forme de filament visible à l'œil nu. Le précipité est ensuite lavé et redissolu dans l'eau ou du tampon TE : 10 :1 .

2. Extraction d'ADN à partir des végétaux : méthode CTAB

Parmi les procédés les plus utilisés, Méthode d'extraction et de purification au CTAB (cétyltriméthyl ammonium bromure). Etabli pour la première fois par Murray et Thompson en 1980 (Murray et Thompson, 1980), le protocole du test au cétyltriméthyl ammonium bromure (CTAB) a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues. Cette méthode convient pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc la qualité. Le principe de la méthode repose sur trois étapes **lyse, extraction et précipitation**.

Des cellules végétales peuvent être lysées en utilisant le détergent ionique cétyltriméthyl ammonium bromure (CTAB), qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels. Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol. Les principes des trois principales étapes, à savoir la lyse de la membrane cellulaire, l'extraction de l'ADN génomique et sa précipitation sont décrits ultérieurement.

Lyse de la membrane cellulaire : comme il a été mentionné précédemment, la première étape de l'extraction d'ADN est la rupture de la cellule et de la membrane nucléaire. À cette fin, l'échantillon homogénéisé est tout d'abord traité avec le tampon d'extraction contenant de l'EDTA, du Tris/HCl et du CTAB. Toutes les membranes biologiques ont une structure générale commune comprenant des molécules de lipide et de protéines maintenues ensemble par des interactions non covalentes.

L'extraction : dans cette phase, les polysaccharides, les composés phénoliques, les protéines et les autres lysats cellulaires dissous dans la solution aqueuse sont séparés du complexe acide

nucléique / CTAB. L'élimination des polysaccharides, ainsi que des composés phénoliques est particulièrement importante en raison de leur capacité à inhiber un grand nombre de réactions enzymatiques. Dans une concentration à faible teneur en sels ($< 0,5 \text{ M NaCl}$), les contaminants du complexe d'acide nucléique ne précipitent pas et peuvent être enlevés par l'extraction hors de la solution aqueuse au moyen de chloroforme. Ce dernier dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuses et organiques. L'acide nucléique aura, en outre, tendance à se dissoudre dans la phase organique si le pH de la solution aqueuse n'a pas été équilibré comme il se doit à une valeur de pH comprise entre 7,8 et 8,0. Au besoin, l'extraction au chloroforme est répétée deux ou trois fois afin d'enlever complètement les impuretés de la couche aqueuse. Une fois que le complexe d'acide nucléique a été purifié, la dernière étape de la procédure peut être accomplie.

Précipitation : à ce stade final, l'ADN génomique est libéré du détergent. À cette fin, la solution aqueuse est tout d'abord traitée à l'aide d'une solution de précipitation composée d'un mélange de CTAB et de NaCl à concentration élevée ($> 0,8 \text{ M NaCl}$). Le sel est indispensable à la formation d'un précipité d'acide nucléique. L'acétate de sodium peut être préféré au NaCl pour sa capacité de tamponnage. Dans ces conditions, le détergent, qui est plus soluble dans l'alcool que dans l'eau, peut être élué, tandis que l'acide nucléique (ADN) précipite. Le traitement successif par 70% d'éthanol permet une purification ou élution supplémentaire des sels résiduels.

Protocole d'extraction à partir de feuilles sèches : ce protocole est valable pour beaucoup d'espèces végétales notamment *Medicago truncatula* et le pois chiche.

1. Récolter de jeunes feuilles (3 à 4): on choisit les jeunes feuilles parce que à ce stade, le taux des protéines et d'autres substances organiques est faible.
2. Si l'extraction se fait juste après la récolte des feuilles, on les met dans des tubes eppendorfs de 2ml avec 8 billes en métal et on met les tubes (couvercle ouvert) à l'étuve pour le séchage à 65°C pendant une nuit.
3. Si l'extraction ne se fait pas tout de suite, on peut conserver les feuilles dans des sachets en papier (étiquetés) et on les mets dans le gel de silice (gel desséchant). Le jour de l'extraction enlever les feuilles des sachets et les mettre dans les tubes eppendorf avec 8 billes et les passer pendant quelques minutes à l'étuve à 65°C (toujours le couvercle ouvert).

Remarque : les tubes doivent être numérotés avec un marqueur indélébile pour savoir la provenance de l'ADN extrait

4. Une fois les tubes sont enlevés de l'étuve, il faut les refermer immédiatement pour éviter qu'ils s'humidifient de nouveau.

5. Réduire les feuilles en poudre soit en les vortexant soit en utilisant le genogrinder.
6. Mettre les tubes dans un portoir.
7. Ajouter 1ml de tampon d'extraction autoclavé en utilisant une micropipette de 1 ml.
8. Incuber 20 minutes au bain marie allumé le matin à 65°C.
9. Ajouter 600 µl de chloroforme et agiter vigoureusement à la main pendant 15 minutes à température ambiante.
10. Centrifuger 10 minutes à vitesse maximale (13 000 tr/min).
11. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube à la pipette sans entrainer l'interface.
12. Ajouter 600 µl d'isopropanol et centrifuger immédiatement 20 secondes à vitesse maximale (cette étape est pour enlever le chloroforme et l'ADN va se rassembler en petite pelote).
13. Jeter le surnageant.
14. Ajouter 500 µl d'éthanol 70 %.
15. Centrifuger 10 minutes vitesse maximale et jeter le surnageant
16. Faire sécher sous la hotte ou sur la paillasse
17. Re-suspendre le culot dans 50 µl d'eau distillée stérile
18. Rajouter 5µl d'ARNasa (2.5 mg/ml) et laisser une nuit à 4° c.

Tampon d'extraction (pour 100 ml):

- 2g de CTAB
- 10 ml de Tris-HCl 1M pH8
- 28 ml de NaCl 5M
- 4 ml d'EDTA 0.5 M pH8
- 0.5 ml bêtamercapto-éthanol (à ajouter après autoclavage).

NB : Le tampon peut être conservé pendant 3 mois.

3. Extraction d'ADN à partir des plasmides

1. Les plasmides : Rappel

- Petites molécules d'ADN habituellement circulaire
- Existant indépendamment des chromosomes de l'hôte
- Présents chez nombreuses bactéries (quelques levures et mycètes)
- répllication autonome (=réplicons) indépendamment des chromosomes
- Portent un nombre de gènes très réduit (≤ 30)
- A information génétique non-essentielle pour l'hôte

En nombre variable:

- Plasmide à copie unique (1 seul/cellule hôte)
- Plasmides à copies multiples (40 ou + /cellule hôte)

2. Purification par Lyse alcaline :

C'est Parmi les techniques les plus courantes de la biologie moléculaire, consistant à une préparation sélective de l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien selon les étapes suivantes :

- Lyse des cellules par le détergent (SDS) en présence de soude (pH 13) donnant une dénaturation de l'ADN total,
- Neutralisation rapide par acétate de potassium (pH 5,5) donnant une renaturation de l'ADN plasmidique et une précipitation de l'ADN Chromosomique,
- Concentration de l'ADN plasmidique par précipitation à l'alcool et récupération de l'ADN par centrifugation,
- Suspension de l'ADN plasmidique dans TE ou Eau pure et élimination des ARN par ribonucléases (hydrolyse sélective des ARN/ ADN intact).

3. Purification par Gradient de chlorure de césium :

Les acides nucléiques sont séparés par ultracentrifugation isopycnique en chlorure de césium (CsCl). Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de 1.9 g/mL à 7.5mol/L. Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage.

Un gradient de densité stable est réalisé par ultracentrifugation du CsCl en présence d'un agent intercalant le Bromure d'éthidium ou BET reposant sur l'affinité du BET pour les différentes formes d'ADN. La densité moyenne de l'ADN chromosomique bactérien et d'un plasmide sont différents en présence de BET. Les molécules d'ADN se séparent en fonction de leur densité indépendamment de leur taille ou de leur masse : elles se stabilisent en cours

de centrifugation au point où leur densité est égale à celle du milieu environnant. Cette technique, appelée centrifugation isopycnique (à l'équilibre de densité), est utilisée pour la purification en grande quantité les plasmides bactériens.