

Chapitre III.

Extraction et purification des acides nucléiques

Extraction des acides nucléiques

L'extraction et la purification des acides nucléiques contenus dans des cellules eucaryotes ou procaryotes sont essentielles pour un grand nombre d'études en biologie moléculaire.

Il existe quatre étapes principales pour extraire les acides nucléiques et les purifier :

1. La lyse cellulaire
2. La dénaturation des protéines et des complexes nucléoprotéiques
3. L'inactivation des nucléases et La purification des acides nucléiques (ADN ou ARN) (séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires)

1- Lyse cellulaire

La procédure de lyse idéale doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ, mais également suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Il existe différentes procédures de lyse cellulaire :

1-1- Lyse mécanique (Broyage ou lyse hypotonique)

Cette méthode est particulièrement préconisée lors des extractions à partir des cellules sans paroi. Il est également possible d'utiliser cette méthode sur des cellules procaryotes ou des levures en ajoutant des microbilles ou du sable (de fontainebleau, qui contient 95% de silice) pour faciliter la destruction des parois. Néanmoins, ce procédé est de plus en plus délaissé.

1-2- Traitement chimique et enzymatique

Le traitement chimique et enzymatique implique l'utilisation de détergents, d'agents chaotropiques, la protéinase K..., il se fait en plusieurs étapes :

1-3- Lyse des parois et membranes cellulaires

Pour les cellules à paroi, on peut utiliser des hydrolases spécifiques comme le lysozyme pour fragiliser la paroi. En effet les lysozymes coupent les liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ de l'acide N-acetylmuramique (NAM) et la N-actylglycosamine (NAG) du polysaccharide où alterne NAM et NAG constituant les peptidoglycanes de la paroi bactérienne. Afin de désorganiser les membranes, on utilise le plus souvent des détergents comme le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), le triton X100 et le sarcosyl qui solubilisent les lipides

membranaires sous forme de micelles. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules. Suivant leur force, les détergents vont aussi plus ou moins dénaturer les protéines membranaires.

2- Dénaturation des protéines

La déprotéinisation des extraits cellulaires peut se faire par plusieurs procédés :

2-1- Dénaturation par hydrolyse enzymatique

On utilise le plus souvent une endoprotéase non spécifique comme la protéinase K, active jusqu'à 65°C. Cette digestion est souvent conduite en présence d'un détergent dénaturant comme le SDS, qui facilite l'action de la protéinase K car il déploie les chaînes protéiques.

2-2- Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope

Un agent chaotrope est un ion qui modifie la solubilité des molécules (protéines ou acides nucléiques) et qui peut provoquer leur précipitation en neutralisant certaines charges ioniques requises en surface. Il peut également agir en interférant dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau ce qui modifie la solubilité des protéines. Ou en dénaturant les protéines par exemple, par rupture des liaisons hydrogènes qui maintiennent leur structure tertiaire entraînant ainsi le démasquage des régions hydrophobes. Les régions hydrophobes ont tendance à s'agréger et les protéines précipitent (défécation). Exemples des agents chaotropes : L'anion chlorate (ClO_3^-), le Thiocyanate (SCN^-), Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , et Ba^{2+} , le perchlorate de sodium (NaClO_4), le thiocyanate de guanidine (TCG), l'iodure de sodium (NaI) et le chlorure de lithium).

3- Autres composants des solutions d'extraction

En fonction des protocoles d'extraction d'autres composés peuvent être rencontrés dans les solutions d'extraction :

3-1- Les thiols

Les thiols sont des composés soufrés pouvant être considérés en tant qu'analogues des alcools, car ils sont obtenus par remplacement de l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle, -OH, d'un alcool par un atome de soufre. Le groupe fonctionnel ainsi obtenu est nommé mercapto, -SH.

Lorsqu'on utilise les agents chaotropes pour éliminer les protéines par précipitation, on ajoute quelque fois dans le tampon d'extraction des thiols pour empêcher la reformation de ponts disulfures des protéines qui restent ainsi à l'état dénaturé.

3-2- Les sels

L'ajout d'une forte concentration de sels (NaCl 0,15 mol/L ; citrate de sodium ; acétate de sodium) dans le milieu d'extraction ne contenant pas d'agents chaotropiques empêche la séparation des deux brins de l'ADN en formant un écran protecteur pour la double hélice.

3-3- EDTA

L'Ethylène diamine tétra-acétique (EDTA) est un chélateur d'ions divalents comme le magnésium qui est un cofacteur des DNases et RNases. il permet la préservation des acides nucléiques par inhibition des nucléases.

3-4- RNase

Les extraits acellulaires bruts contiennent les deux types d'acides nucléiques : ADN et ARN. Pour diminuer la concentration en ARN, on utilise une RNase « DNase free », c'est-à-dire dépourvue d'activité DNase ; pour cela les DNases contaminant éventuellement les préparations de RNase du commerce sont dénaturées par chauffage (par exemple 5 min à 100°C). La RNase est une enzyme particulièrement thermostable qui résiste à ce traitement. La RNase peut être ajoutée dès le début de l'extraction-purification car c'est une enzyme très stable.

4- Élimination des débris cellulaires

Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtration ou centrifugation.

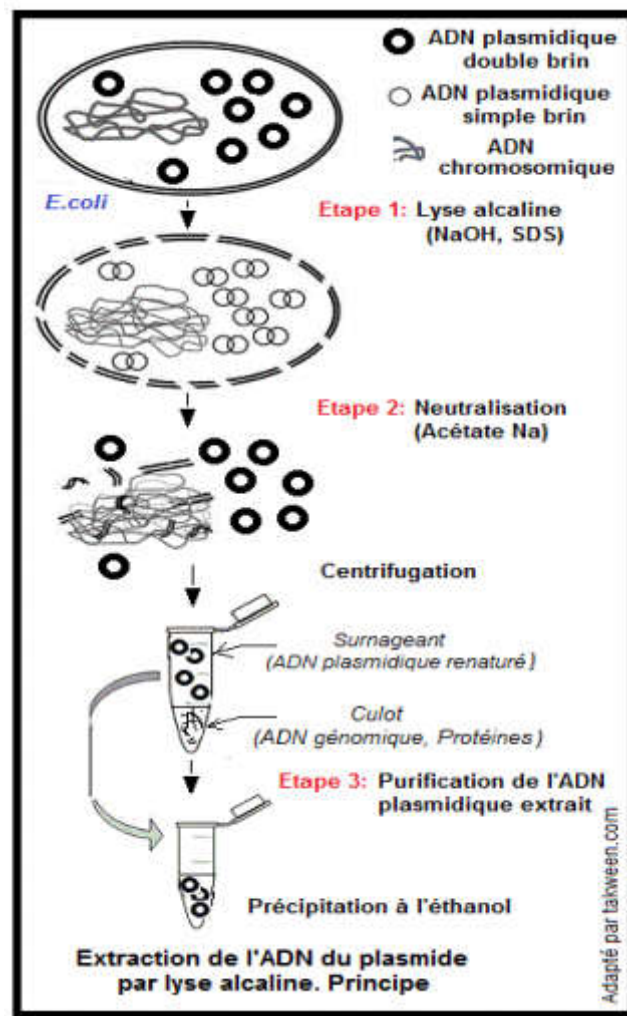


Figure 1 : Principe d'extraction de L'ADN du plasmide par lyse alcaline

4- Purification des acides nucléiques

La purification des acides nucléiques à partir d'extraits cellulaires est généralement réalisée par la combinaison entre deux ou plusieurs techniques des techniques suivantes :

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

4-1- Extraction / Précipitation

L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants de la préparation d'acides nucléiques. Ainsi plusieurs méthodes de précipitation des acides nucléiques peuvent être utilisées pour les purifier

4-1-1- Purification au phénol-chloroforme

Une combinaison de *phénol et de chloroforme* sert fréquemment à purifier les acides nucléiques et d'éliminer les protéines. On mélange vigoureusement l'extrait d'acides nucléiques avec une phase hydrophobe. Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques.

4-1-2- La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol

Ces techniques sont utilisées pour concentrer les acides nucléiques.

4-1-2-1- La précipitation par l'éthanol

Est réalisée par addition de l'éthanol (un solvant moins polaire que l'eau) à l'extrait d'acides nucléiques (**v:v / 2:1**). Après refroidissement de l'échantillon, le culot d'ADN est obtenu suite à une centrifugation à une très grande vitesse. Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 % pour se débarrasser des sels qui puis sécher. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité.
NB :

- ✓ Avant l'ajout de l'éthanol, il faut ajouter à l'extrait d'acides nucléiques, une quantité importante de cations.
- ✓ Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (*le glycogène*) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation.

4-1-2-2- La précipitation par l'isopropanol

Le principe est le même que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés (non précipités). Dans ce cas, on procède à mélanges volume de l'isopropanol à volume identique de l'extrait nucléiques (**v:v / 1:1**). Après refroidissement et centrifugation le précipité est lavé pour éliminer les traces d'isopropanol puis séché. On obtient alors les acides nucléiques sous la forme de fibres solides que l'on récupère par centrifugation

4-2- Chromatographie

Plusieurs méthodes chromatographiques peuvent être utiliser telles que la filtration sur gel, chromatographie échangeuse d'ions, l'adsorption sélective ou la liaison par affinité. Mais les deux techniques les plus employées pour purifier les acides nucléiques sont la chromatographie sur colonne de silice et la chromatographie sur colonne d'échange d'anions.

4-3- Centrifugation

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante. À titre d'exemple, l'ultracentrifugation isopycnique en gradients de chlorure de césium (CsCl) à des forces gravitationnelles élevées, a été longtemps utilisée pour la purification de plasmides.

5- Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminant des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques. Le rapport $R = A_{260nm} / A_{280nm}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. Une contamination par les ARN se traduit par une augmentation du rapport R.

$$R = A_{260nm} / A_{280nm}$$

$$\text{ADN pur : } 1,8 < R < 2$$

$$\text{ADN contaminé par les protéines : } R < 1,7$$

$$\text{ADN contaminé par les ARN : } R > 2$$

En absence d'impuretés l'absorbance de la solution d'ADN à 320 nm doit être autour de zéro.

Hybridation des acides nucléiques

L'hybridation est une propriété fondamentale des acides nucléiques qui repose sur les règles de complémentarité. Il est possible d'apparier des brins d'ADN ou ARN avec des oligonucléotides qui reconnaissent spécifiquement des séquences sur les brins d'ADN de manière antiparallèle et complémentaire. Ces oligonucléotides sont appelés sondes nucléiques. Pour le cas de deux brins complémentaires de la même molécule d'ADN (brins homologues) on parle de renaturation (hybridation à 100%). Chaque 1% de non homologie diminue la température d'hybridation (T_h) de 1°C.

L'hybridation moléculaire est utilisée surtout dans la détection de l'homologie entre les molécules d'ADN de sources différentes. La complémentarité dépendra de la concentration en ADN et du temps. Ces deux derniers paramètres sont importants pour la rencontre entre les deux brins.

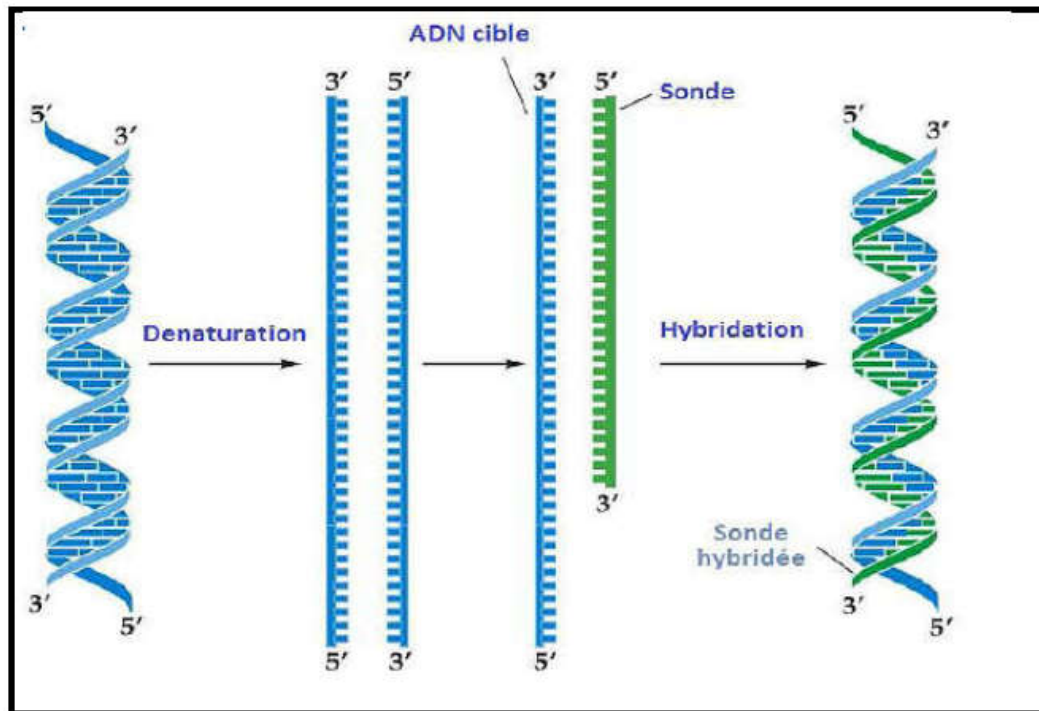


Figure 2: Hybridation des acides nucléiques

La **T_m** est estimée en utilisant plusieurs formules, cela dépend de la:

- Longueur du fragment (nombres de
- Composition du milieu
- Mis-appariement
- Le contenu en C+G

La formule de Wallace permet de déduire la **T_h** des petits oligonucléotides (Ex. Les amorces).

Formule de Wallace: **$T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$; $T_h = T_m$**

Pour les oligonucléotides avec N tenant compte la concentration du sel, les mésappariements et la concentration de formamide:

$$T_m = 16.6\log[Na+] + 0.41(\%(C+G)) + 81.5 - (675/N) - \% \text{mismatch} - 0.65\% \text{ de formamide}$$

Dans les conditions réactionnelles standards la **T_m** pour les longs séquences (>100):

$$T_m = 69.3 + 0.41(\%(C+G))$$

La formule globale:

$$T_m = 81.5 + 16.6\log[\text{sel}] + 0.41[\%(C+G)] - \% \text{ mis-appariement} - (500/N) - 0.65\%(\text{formamide}).$$

Facteurs influençant l'hybridation

- La concentration de l'ADN et le temps d'hybridation
- La température d'hybridation

- La force ionique
- La complexité des séquences

6.5.1 Types d'hybridation

L'objectif de l'hybridation est la détection de la présence d'un acide nucléique d'une séquence donnée par l'utilisation d'un fragment d'ADN complémentaire = sonde. Cela peut avoir lieu en solution ou sur support solide (immobilisation de la cible sur une membrane [nitrocellulose, nylon], sur verre, colonies bactériennes, chromosomes, plage de lyse ...etc.).

a. Hybridation d'ADN sur support solide : Southern blot

La procédure de ce type d'hybridation est résumée en sept étapes. On peut aussi révéler la présence des séquences spécifiques dans les ARN (Northern Blot) et des protéines (Western Blot) utilisant le même principe.

- 1- Extraction de l'ADN
- 2- Digestion enzymatique (par les enzymes de restriction)
- 3- Electrophorèse du produit de la digestion
- 4- Transfert sur membrane
- 5- Hybridation avec une sonde spécifique marquée.
- 6- Lavages
- 7- Révélation

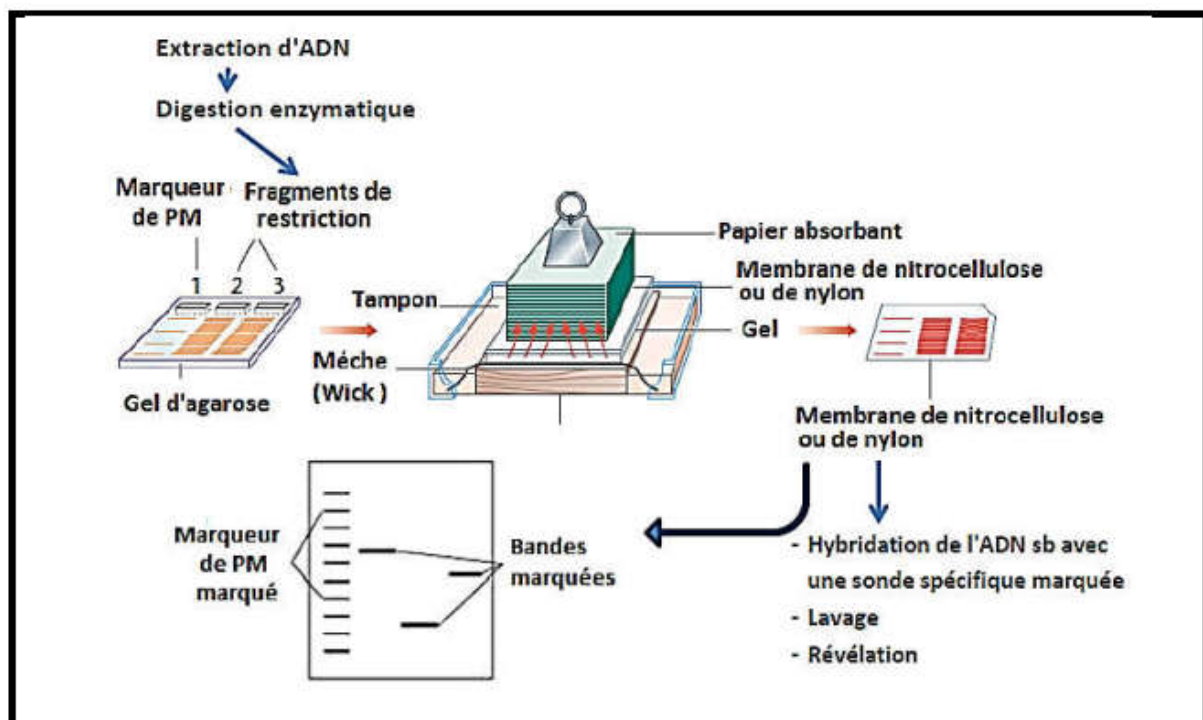


Figure 3: Southern Blot

b. Hybridation *in situ* (HIS)

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche, dans son principe, des Southern et des Northern blots et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern et Northern blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'HIS s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés.

c. Hybridation sur chromosomes (FISH)

La FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) repose sur la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La région à étudier (située sur un chromosome préalablement légèrement dénaturé par traitement chimique pour le débarrasser des protéines associées) est repérée grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire. Certains de ces nucléotides de cette sonde sont couplés à une molécule antigénique reconnue par un anticorps fluorescent.

En utilisant diverses sondes, greffées à des antigènes différents, on peut ainsi visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes. Technique permettant de déterminer la position d'un fragment d'ADN dans le génome ; le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p: bras court et q: bras long) et par rapport aux bandes (mises en évidence par la coloration Giemsa) du chromosome.

d. Hybridation sur colonie de bactéries, sur plaque de lyse

Ce type d'hybridation permet la détection parmi un grand nombre de bactéries ou de phages recombinants (plaque de lyse) celle ou celui qui contient le fragment d'ADN cible. La réalisation de cette technique passe par les étapes suivantes:

- Culture pure sur boîte de Petri (colonies ou plaque de lyse)
- Transfert sur membrane de nylon ou de nitrocellulose
- Lyse alcaline des bactéries et dénaturation de l'ADN
- Fixation par la chaleur ou les UV
- Hybridation avec une sonde marquée
- Lavage
- Autoradiographie
- Localisation des clones d'intérêt.