

Extraction et purification d'ADN

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.

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.

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 broyage 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 du nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

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.

Extraction/Précipitation

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

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.

Centrifugation

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante. À titre d'exemple, l'ultracentrifugation isopycnique en gradients de CsCl 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.

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.

Méthode d'extraction et de purification au CTAB

élaboré pour la première fois par Murray et Thompson en 1980 (Murray et Thompson, 1980), le protocole du test au cetyltriméthyl ammonium bromure (CTAB) a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues (Wagner et al., 1987). La méthode convient pour l'extraction et la purification d'ADN de végétaux et d'aliments tirés des végétaux et convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc la qualité. Cette procédure a été largement appliquée dans la génétique moléculaire des végétaux et a déjà été testée dans des essais de validation dans le but de détecter les OGM. Plusieurs autres variantes ont été élaborées dans le but d'adapter la méthode à une vaste plage de matrices alimentaires brutes et transformées.

Principes de la méthode au CTAB : lyse, extraction et précipitation

Des cellules végétales peuvent être lysées en utilisant le détergent ionique cetyltriméthyl 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. Nous décrirons dans cette partie les principes des trois principales étapes, à savoir la lyse de la membrane cellulaire, l'extraction de l'ADN génomique et sa précipitation.

Lyse de la membrane cellulaire : comme nous l'avons 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.

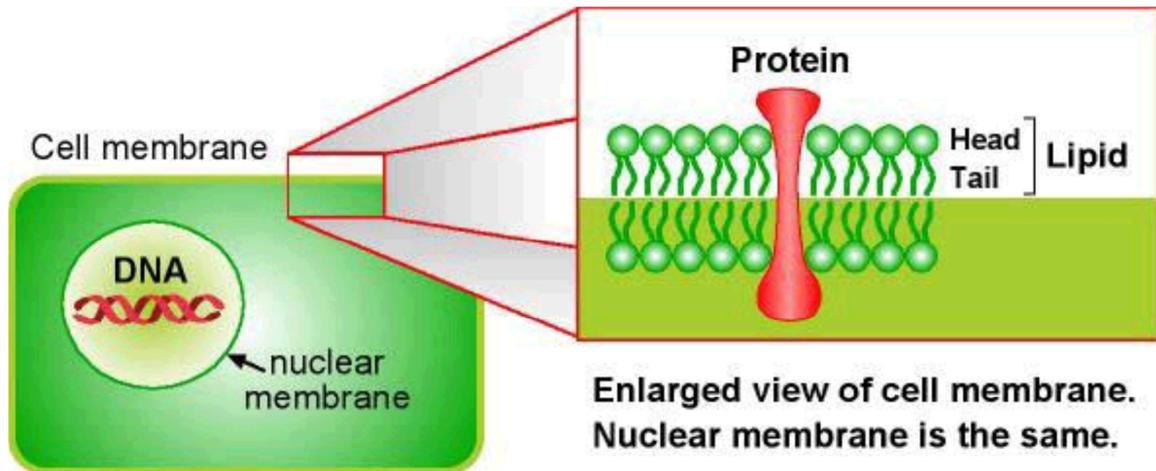


Figure 1. Représentation simplifiée des membranes cellulaires

Comme le montre la Figure 1, les molécules de lipides sont agencées sous forme de double couche continue dans laquelle les molécules de protéine sont « dissoutes ». Les extrémités des molécules de lipides se composent de « têtes » hydrophiles et de « queues » hydrophobes. Dans la méthode au CTAB, la lyse de la membrane est accomplie par le détergent (CTAB) contenu dans le tampon d'extraction. Comme la composition des lipides et celle du détergent sont semblables, le composant CTAB du tampon d'extraction a pour fonction de piéger les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléaire. Le mécanisme de solubilisation des lipides en utilisant un détergent est illustré dans la Figure 2.

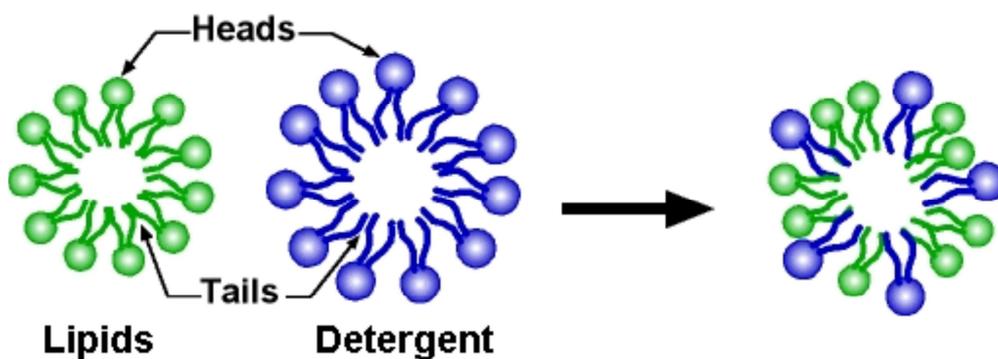


Figure 2. Solubilisation des lipides

La Figure 3 montre comment le détergent piège les lipides et les protéines, autorisant ainsi la libération de l'ADN génomique, lorsque la membrane cellulaire est exposée au tampon d'extraction au CTAB. Dans une concentration saline (NaCl) spécifique, le détergent forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques. L'EDTA est un composant de chélation qui lie le magnésium, entre autres métaux. Le magnésium est un cofacteur pour la DNase. En liant le Mg à l'EDTA, l'activité de la DNase présente est diminuée. La combinaison Tris/HCl donne à la solution une capacité d'atténuation du pH (un pH faible ou un pH élevé endommage l'ADN). Il est important de souligner qu'étant donné le risque de dégradation aisée des acides nucléiques à ce stade de la purification, le temps écoulé entre l'homogénéisation de l'échantillon et l'ajout de la solution tampon au CTAB devrait être limité. La purification de l'ADN est réalisée dès que la cellule et les membranes de l'organelle (comme celles qui entourent les mitochondries et les chloroplastes) sont séparées.

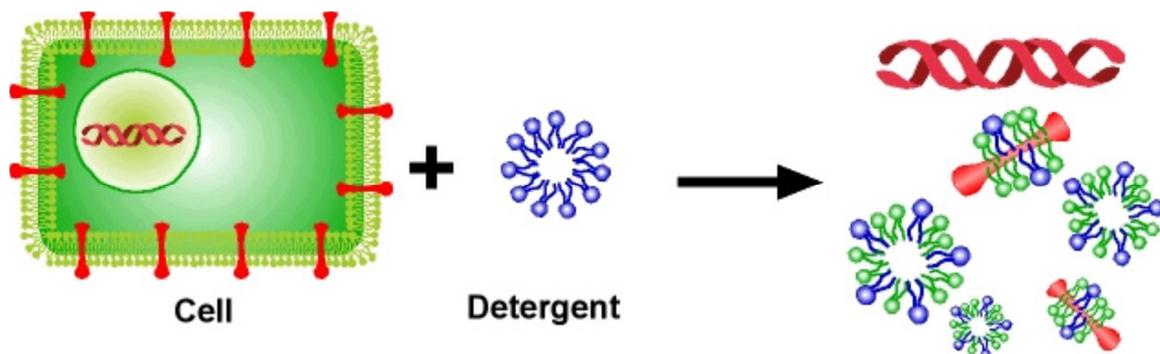


Figure 3. Rupture de la membrane cellulaire et extraction de l'ADN génomique

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 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. Normalement, la phase aqueuse constitue la phase supérieure. Mais si la phase aqueuse est dense, en raison de sa concentration en sels ($> 0,5 \text{ M}$), elle constituera la phase inférieure. 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. Pour parvenir à la meilleure récupération possible de l'acide nucléique, une rétro-extraction de la phase organique peut être réalisée à l'aide d'une solution aqueuse qui est ajoutée ensuite à l'extrait précédent. Une fois que le complexe d'acide nucléique a été purifié, la dernière étape de la procédure peut être accomplie. Il s'agit de la précipitation.

Précipitation : à ce stade final, l'acide nucléique 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 précipite. Le traitement successif par 70% d'éthanol permet une purification ou élution supplémentaire des sels résiduels.

Quantification de l'ADN par spectrophotométrie

L'ADN, l'ARN, les oligonucléotides et même les mononucléotides peuvent être mesurés directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption A (également définie comme étant la densité optique, DO) en lumière ultraviolette (mais aussi dans le spectre visible). Si l'échantillon est pur (autrement dit, s'il ne contient pas de quantité significative de contaminants tels que des protéines, du phénol ou de l'agarose), la mesure spectrophotométrique de la quantité de rayons ultraviolets absorbés par les bases est une opération facile et précise. L'idéal pour cette méthode sont

des tampons aqueux à faibles concentrations ioniques (par exemple, un tampon TE). La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ». L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 2,2.

Une méthode alternative, en l'occurrence la méthode de la plaque d'agarose au bromure d'éthidium, est utile lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités d'acide nucléique. La quantité d'acide nucléique peut être estimée par comparaison à une gamme de concentrations en utilisant l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium lorsque celui-ci est irradié par la lumière UV.

Principes de la détermination spectrophotométrique de l'ADN

Un spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d'un soluté à l'intérieur de la solution. L'appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d'une longueur d'onde connue traverse un échantillon et où la quantité d'énergie lumineuse transmise est mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique placée de l'autre côté de l'échantillon.

La conception du spectrophotomètre à simple faisceau implique l'utilisation d'une source lumineuse, d'un prisme, d'un support d'échantillon et d'une cellule photoélectrique. Les mécanismes électriques ou mécanismes adéquats pour contrôler l'intensité d'éclairage, la longueur d'onde et la conversion d'énergie reçue au niveau de la cellule photoélectrique à diverses tensions sont reliés à chacun des composants. La fluctuation des tensions s'affiche ensuite sur une échelle exprimée en mètres ou est enregistrée sur un ordinateur à l'aide d'une connexion en vue d'un examen ultérieur.

Toutes les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l'équation suivante : $A = OD = \epsilon lc$,

où ϵ est égal au coefficient d'extinction molaire, c indique la concentration et l représente la longueur de parcours de la cuvette. Les protéines et les acides nucléiques absorbent la lumière dans la plage des ultraviolets dans des longueurs d'onde comprises entre 210 et 300 nm. Comme expliqué précédemment, l'absorbance maximale de solutions ADN et ARN est fixée à 260 nm, tandis que l'absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm. Dès lors, tant les solutions d'ADN que les solutions d'ARN absorbent partiellement la lumière à 280 nm, tandis que les solutions de protéines l'absorbent partiellement à 260 nm. Le ratio entre les valeurs à 260 nm et à 280 nm (A_{260}/A_{280}) fournit une estimation du degré de pureté des acides nucléiques. Des préparations pures d'ADN et d'ARN ont des valeurs à A_{260}/A_{280} de 1,8 et 2,0 respectivement. Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d'onde de 260 nm, l'absorption $A = 1$ correspond à environ 50 $\mu\text{g/ml}$ de dsADN, environ 37 $\mu\text{g/ml}$ de ssADN, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN ou environ 30 $\mu\text{g/ml}$ d'oligonucléotides. En cas de contamination par une protéine, le rapport A_{260}/A_{280} sera nettement inférieur aux valeurs données ci-dessus et une quantification précise de la quantité d'acide nucléique ne pourra être envisagée. Il est important de préciser ici que des impuretés dans les solutions d'ADN provoqués par l'ARN ne peuvent être identifiées de manière fiable par la spectrophotométrie. Une absorbance de 325 nm peut être utilisée pour indiquer la présence de débris dans la solution ou révéler que la cuvette elle-même est sale.

Détermination de la concentration en acides nucléiques

Choix de la cuvette : la quantité de solution d'acide nucléique utilisée pour mesurer l'absorbance A dépend de la capacité de la cuvette. Pour être adéquate, la cuvette devrait être sélectionnée en fonction du taux de concentration de l'échantillon, du facteur de dilution et du volume d'échantillon disponible. Dans la majorité des procédures utilisées pour détecter les OGM, le volume d'ADN génomique recueilli se situe entre 50 et 100 μl . Plusieurs types de cuvette à micro volume, d'une capacité comprise entre 5 et 70 μl , sont utilisés pour la quantification spectroscopique de petits volumes d'acides nucléiques.

Réglage : afin de calibrer le spectrophotomètre, il est essentiel de :

- sélectionner la longueur de chemin optique de la cuve,
- choisir le bon facteur (faire une sélection entre dsADN, ssADN, ARN),
- mesurer une solution vierge (référence) constituée soit d'eau, soit d'une solution tampon ($A_{260} = 0$),
- veiller à ce que la référence réglée soit renouvelée périodiquement,
- mesurer une quantité connue d'acide nucléique pur afin de contrôler la fiabilité de la référence fixée.

Mesure d'un échantillon inconnu : en fonction de la capacité de la cuvette utilisée, des quantités spécifiques de solution d'ADN sont utilisées afin d'évaluer la concentration (par exemple, pour une cuvette d'une capacité inférieure à 0,2 ml, on dilue 5 μl d'ADN dans 195 μl d'eau). Après étalonnage du spectrophotomètre et de la solution d'acide nucléique à ajouter, la cuvette est bouchonnée, la solution est mélangée et l'absorbance est mesurée. Afin de réduire les erreurs de pipetage, la mesure devrait être répétée au minimum deux fois en utilisant à chaque fois 5 μl de la solution d'ADN au minimum. Des valeurs A_{260} inférieures à 0,02 ou comprises entre 1 et 1,5 (en fonction de l'instrument utilisé) ne sont pas recommandées en raison du risque d'une marge d'erreur élevée.

La concentration c d'un acide nucléique spécifique présent dans une solution se calcule à l'aide des équations suivantes :

- ADN monobrin: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0,027$
- ADN à double brin: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0,020$
- ARN monobrin $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0,025$
- Oligonucléotide: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}100/1,5NA+0,71NC+1,20NG + 0,84NT$

où A_{260} désigne l'absorbance mesurée à 260 nm.

Un exemple de valeurs d'absorbance d'ADN dans un ris de veau (calf thymus) hautement purifié en suspension dans un tampon de TNE (1x) en partant du principe que l'ADN de référence est dsADN où $A_{260} = 1$ pour 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans une cuvette d'une longueur de parcours de 10 mm est illustré dans le Tableau 2. La concentration nominale de l'ADN était de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.