

Génétique :
Extraction ADN/ARN

En génétique moléculaire, on analyse les acides nucléiques = **ADN et ARN** que l'on va extraire de n'importe quelle **cellule nucléée**.

La première étape va être d'extraire l'acide nucléique à partir duquel on va travailler.

Dans la situation la plus fréquente, on travaille sur **l'ADN**.

Il va donc falloir l'extraire de tissus, de cellules amniotiques (en cas de diagnostic prénatal), de follicules pileux ...

Dans les pratiques médicales à partir de quoi c'est le plus courant d'extraire de l'ADN ?

*Le plus courant dans les pratiques médicales, c'est d'extraire cet
ADN à partir **de sang total**.*

Etape 1 : Prélèvement du sang total

Quelques mL (de 1 à 10mL) de sang total suffisent.

Ils sont prélevés sur anticoagulant (EDTA ou acide éthylène diamine tétracétique ++).

On ne peut pas faire d'analyse sur du sang prélevé sur héparine, car elle inhibe certaines étapes de biologie moléculaire.

!! On utilise de l'EDTA et pas de l'héparine +++++ !!

Etape 2 : Lyse des globules rouges (GR)

Etape 2 : Lyse des globules rouges (GR)

On lyse les GR car ce sont des cellules anucléées (= sans noyaux).

Ils ne possèdent pas de noyau et donc **pas d'ADN**.

Cette lyse se fait grâce à une **solution hypotonique**.

La solution hypotonique fait gonfler les GR jusqu'à les faire éclater.
On peut alors s'en débarrasser.

/>\ Seuls les globules blancs (= GB) nous intéressent dans ces prises de sang car les globules rouges n'ont PAS de noyau ++++ /

Etape 3 : Récupération des leucocytes

Grâce à une **centrifugation**, on récupère le culot au fond du tube à essai qui contient **uniquement les leucocytes** (Globules Blancs) qu'**on va laver** afin de finir d'enlever ce qu'il reste autre que les GB (plasma, hémoglobine, restes des GR précédemment lysés...).

Puis on va **re-suspendre** ces GB dans un mélange de **détergent** et de **Protéinases K**.

C'est une étape très importante : pour accéder à l'ADN, il faut accéder au **noyau de la cellule** et donc se débarrasser des membranes plasmique et nucléaire → grâce au détergent.

De plus, sur l'ADN **nous avons de nombreuses protéines** fixées notamment sur la chromatine, qu'il faut éliminer (via protéinases). Mais il faut également éliminer les DNase de notre ADN une fois la cellule lysée car elles peuvent dégrader notre ADN (**car DNase = enzyme pouvant cliver ADN/ARN**).

Etape 4 : **Extraction au phénol-chloroforme**

Cette étape consiste à extraire l'ADN grâce à une solution de Phénol-Chloroforme.

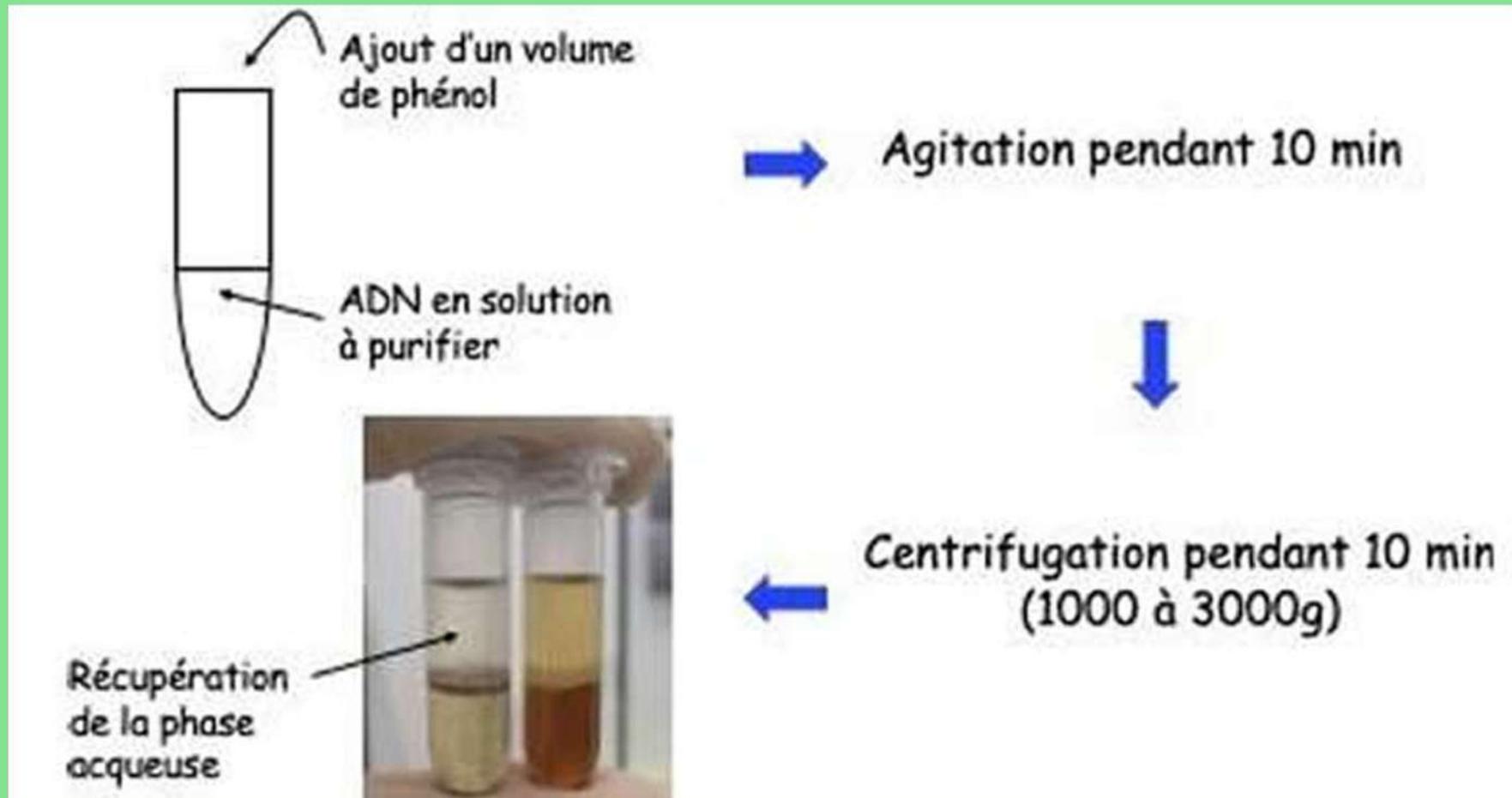
Cette solution permet **l'élimination définitive des protéines** en utilisant la solubilité différentielle des molécules (ADN vs Protéines) entre 2 phases non miscibles.

L'ADN à purifier est en solution dans un micro-tube. On y rajoute un volume de phénol, puis on agite pendant 10 minutes.

Ensuite, on centrifuge pour séparer les deux phases. On obtient in fine dans le tube 2 phases différentes séparées par une **galette de protéines dégradées** :

- **La phase supérieure : aqueuse, qui contient l'ADN**
- **La phase inférieure : phénolique**

Etape 4 : Extraction au phénol-chloroforme



Etape 5 : Précipitation éthanol

(+ re-suspension, quantification et conservation)

Il faut ensuite **précipiter l'ADN** grâce à de **l'éthanol** : on rajoute à cette phase aqueuse **2,5 volume d'éthanol à 95° froid (-20°)** en présence de sels.

Il faut que la température soit basse pour que l'ADN précipite.

Lors de cet ajout apparaît une « **Méduse d'ADN** », sorte de flocculat blanc qui correspond à notre ADN purifié.

On centrifuge et récupère cet ADN qu'on va **laver à l'éthanol 70° pour le nettoyer**, enlever les sels et tout ce qui pourrait changer ou inhiber les réactions suivantes, qui n'aurait pas déjà été éliminé lors des étapes précédentes.

Une fois récupéré, l'ADN est **re-suspendu** dans une solution de **T10E1** (Tris 10 mM E1 mM → tampon un peu particulier avec du Tris et de l'EDTA), pour protéger l'ADN des éventuelles nucléases qui auraient persisté.

Re-suspension = dissolution de l'ADN qui était sous forme de précipité visible blanc solide.

On va ensuite **quantifier** l'ADN grâce à un **spectrophotomètre**, en sachant que : *1 unité de Densité Optique de 260 nm (1DO) = 50 ug/mL d'ADN.*

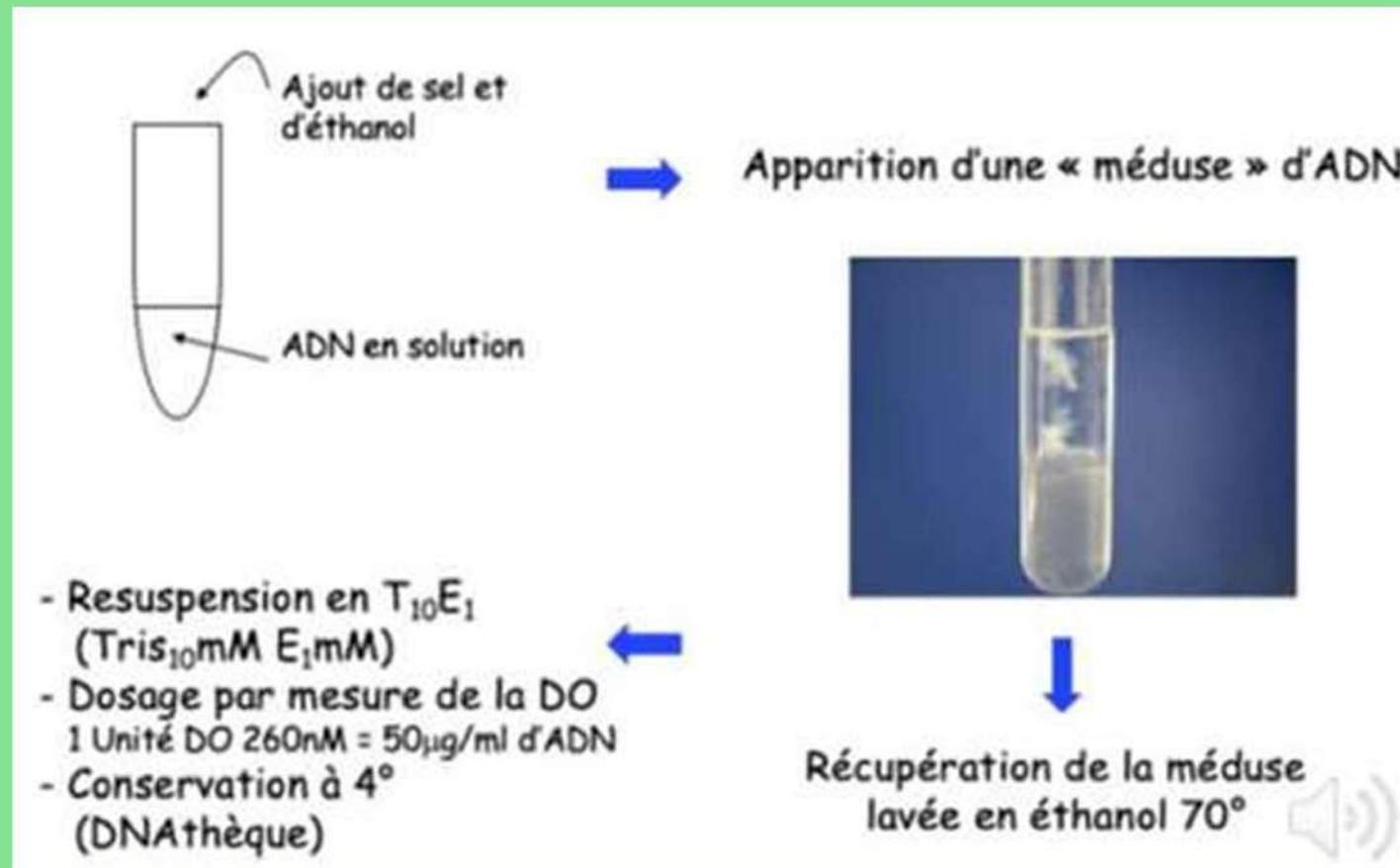
Grâce au dosage d'un petit échantillon de la suspension obtenue, on connaît la concentration de notre ADN génomique.

Cet ADN peut être **conservé à 4° dans une DNAtèque** pendant extrêmement longtemps car très stable à cette température.

En génétique, il nous arrive souvent d'utiliser des ADN préparés plusieurs années auparavant pour des études de maladies génétiques dans le cadre d'études familiales ou d'impasse diagnostic

Etape 5 : Précipitation éthanol

(+ re-suspension, quantification et conservation)



STOOOP !!!!

Quelles sont les étapes qu'on a vues ?

Extraction de l'ADN :

1 - Prélèvement du sang total

Extraction de l'ADN :

- 1 - Prélèvement du sang total
- 2 - Lyse des globules rouges (GR)

Extraction de l'ADN :

- 1 - Prélèvement du sang total
- 2 - Lyse des globules rouges (GR)
- 3 - Récupération des leucocytes

Extraction de l'ADN :

- 1 - Prélèvement du sang total
- 2 - Lyse des globules rouges (GR)
- 3 - Récupération des leucocytes
- 4 - Extraction au phénol-chloroforme

Extraction de l'ADN :

- 1 - Prélèvement du sang total
- 2 - Lyse des globules rouges (GR)
- 3 - Récupération des leucocytes
- 4 - Extraction au phénol-chloroforme
- 5 - Précipitation éthanol (+ re-suspension, quantification et conservation)

Extraction d'ARN :

On peut être aussi amené à étudier et donc extraire de l'ARN bien que cela reste **moins fréquent**.

Il est en effet plus difficile à étudier et à manipuler que l'ADN car **beaucoup plus instable et très sensible aux ribonucléases** (RNAse A) qui le dégradent très facilement et très rapidement.

Il nécessite une manipulation très stricte, dans des conditions bien particulières.

Il est peu utilisé en diagnostic de routine, mais reste très utile et informatif lorsque l'on veut tester la pathogénicité de mutations sur l'épissage ou analyser l'expression des gènes.

L'extraction se fait globalement de la même façon à la seule différence qu'on utilise **un phénol à pH acide** contre un phénol à pH neutre pour l'ADN pour une question de solubilité différentielle.

Donc on fait une homogénéisation des cellules ou des tissus dans un tampon qui va permettre la lyse des cellules :

- Inhiber les RNAses endogènes
- Dénaturer les acides nucléiques
- Dégrader les protéines

Puis l'extraction est réalisée avec un phénol à pH acide permettant l'extraction différentielle ARN/ADN (permettant de récupérer uniquement l'ARN).

La précipitation est ensuite réalisée avec de l'alcool éthylique absolu froid de manière classique.

FIN

QCM

A) On ne peut pas faire d'analyse sur du sang prélevé sur héparine, car elle inhibe certaines étapes de biologie moléculaire.

B) On peut être aussi amené à étudier et donc extraire de l'ADN bien que cela reste moins fréquent.

C) Il faut que la température soit haute pour que l'ADN précipite

D) En génétique moléculaire, on analyse les acides nucléiques = ADN et ARN que l'on va extraire de n'importe quelle cellule nucléée

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

A) VRAI !!!

B) FAUX : ARN pas ADN !!!

C) FAUX : Il faut que la température soit **basse** pour que l'ADN précipite

D) Vrai

E) Faux

- A) Il faut prélever beaucoup de sang pour pouvoir extraire de l'ADN
- B) On lyse les GR car ce sont des cellules anucléées (= sans noyaux)
- C) En génétique, il est interdit d'utiliser des ADN préparés plusieurs années auparavant
- D) On obtient à la fin de l'étape d'extraction au phénol chloroforme dans le tube 2 phases différentes séparées par une galette de protéines dégradées
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

A) **FAUX** : Quelques mL (de 1 à 10mL) de sang total suffisent !!

B) VRAI

C) **FAUX** : En génétique, il nous arrive **souvent** d'utiliser des ADN préparés plusieurs années auparavant

D) VRAI

E) **FAUX**