

*République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique*



*Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie*

---

Cours de

**Techniques en  
Biologie Moléculaire**

---

**Mr. AMIR Nadir  
(Maître de conférences classe B)**

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Quelques inhibiteurs de la PCR	<b>27</b>
<b>II</b>	Préparation de la gamme standard pour la PCR temps réel	<b>53</b>
<b>III</b>	Isotopes radioactifs utilisé pour le marquage des acides nucléiques	<b>56</b>

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Divers support utilisant le papier FTA	<b>19</b>
<b>02</b>	Schéma de l'extraction au phénol-chloroforme	<b>20</b>
<b>03</b>	Thermocycleur	<b>41</b>
<b>04</b>	Etape 1 de la PCR (Dénaturation de l'ADN)	<b>41</b>
<b>05</b>	Etape 2 de la PCR (Hybridation des amorces)	<b>42</b>
<b>06</b>	Etape 3 de la PCR (élongation)	<b>42</b>
<b>07</b>	Déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne	<b>43</b>
<b>08</b>	Reverse-transcriptase PCR	<b>49</b>
<b>09</b>	Mécanisme de quenching	<b>50</b>
<b>10</b>	Principe de la sonde Taqman	<b>51</b>
<b>11</b>	Le cycle seuil (threshold cycle Ct)	<b>52</b>
<b>12</b>	Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions.	<b>55</b>
<b>13</b>	Marquage interne par déplacement de coupure	<b>57</b>
<b>14</b>	Marquage par amorçage aléatoire	<b>58</b>
<b>15</b>	Marquage interne de l'ARN	<b>59</b>
<b>16</b>	Marquage en 5' de l'ARN	<b>61</b>
<b>17</b>	Structure de la fluorescéine	<b>63</b>
<b>18</b>	Biotine conjuguée à l'UTP	<b>64</b>
<b>19</b>	Digoxigénine conjuguée à l'UTP	<b>65</b>
<b>20</b>	Etapas du séquençage	<b>69</b>

	<b>Page</b>
Introduction et objectif	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Organisation d'un laboratoire de Biologie moléculaire</b>	<b>03</b>
I. Organisation du laboratoire	<b>03</b>
I.1. responsable du laboratoire	<b>03</b>
I.2. Règles de base	<b>03</b>
II. Matériel nécessaire et soins à apporter	<b>04</b>
<b>Chapitre II : extraction des acides nucléiques</b>	<b>09</b>
I. Introduction	<b>09</b>
II. Méthodes d'extraction	<b>09</b>
II.1. Lyse cellulaire	<b>09</b>
II.1.1. Lyse mécanique (Broyage ou lyse hypotonique)	<b>09</b>
II.1.2. Traitement chimique et enzymatique	<b>10</b>
II.1.2.1. Lyse des parois et membranes cellulaires	<b>10</b>
II.1.2.2. Dénaturation des protéines	<b>11</b>
II.1.2.2.1. Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique	<b>11</b>
II.1.2.2.2. Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotropique	<b>11</b>
II.1.3. Autres composants des solutions d'extraction	<b>12</b>
II.1.3.1. Les thiols	<b>12</b>
II.1.3.2. Les sels	<b>12</b>
II.1.3.3. EDTA	<b>12</b>
II.1.3.4. RNase	<b>13</b>
II.2. Élimination des débris cellulaires	<b>13</b>
II.3. Extraction de plasmide	<b>13</b>

II.3.1. Mini- et maxi-préparations d'ADN plasmidique	14
II.3.2. Protocole d'extraction de l'ADN plasmidique par Lyse alcaline	15
II.4. Extraction des ARN	16
II.4.1. Préparation d'ARN à partir de cultures cellulaires	17
II.5. Papier FTA	18
III. Méthodes de purification	19
III.1. Extraction/Précipitation	19
III.1.1. Purification au phénol-chloroforme	20
III.1.2. Précipitation/concentration par l'éthanol ou l'isopropanol	21
1. Précipitation à l'éthanol	21
2. Précipitation à l'isopropanol	22
III.3. Chromatographie	22
III.3.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice	23
III.3.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions	23
III.3.3. Chromatographie par affinité	24
III.4. Centrifugation	24
IV. Conservation de l'ADN	26
V. Choix du protocole en fonction des manipulations ultérieures	26
VI. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait	27
VII. Quantification de l'ADN	28
VII.1. Dosage colorimétrique de l'ADN	28
VII.2. Dosage par absorption U.V. de la concentration en ADN	28
VII.3. Dosage de l'ADN par fluorescence en présence de BET	29
VII.4. Dosage fluorimétrique classique de l'ADN	29

---

VII.5. Dosage par la PCR temps réel	29
VIII. Analyse de protocoles d'extraction	30
1. Protocole d'extraction d'ADN génomique de <i>Bacillus subtilis</i>	30
2- Protocole d'extraction d'ADN génomique bactérien (E. Coli)	32
3. Protocole d'extraction d'ADN plasmidique (pBR322) d'E.coli - Extraction par lyse alcaline	33
4. Protocole d'extraction à partir d'extraits végétaux	35
<b>Chapitre III : Amplification par PCR</b>	<b>39</b>
I. Introduction	39
II. PCR classique	39
II.1. L'ADN	39
II.2. Les deux amorces	39
II.3. DésoxyriboNucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	40
II.4. Taq polymérase	40
II.5. Milieu réactionnel	40
II.6. Déroulement de la réaction	40
II.6.1. Dénaturation	41
II.6.2. Hybridation des amorces	42
II.6.3. Elongation	42
II.5. Applications de la PCR	44
II.5.1. En Bactériologie	44
II.5.1.1. Recherche des facteurs de virulence	44
II.5.1.2. Identification des espèces	44
II.5.2. En agroalimentaire	45
II.5.2.1. Détection d'OGM dans les aliments	45

II.5.3. En médecine	46
II.5.4. En Histoire	47
II.5.5. En médecine légale	47
III. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)	48
IV. PCR quantitative en temps réel	49
IV.1. Principe de la méthode	49
III.1.1. Principe du Ct	52
III.1.2. Préparation de la gamme standard	52
III.1.3. Courbe standard	53
III.1.4. Echantillon inconnu	55
<b>Chapitre IV : Marquage des acides nucléiques</b>	<b>56</b>
I. Marquage radioactif	56
I.1. Les différentes techniques de marquage radioactif	57
I.1.1. Marquage interne	57
I.1.1.1. Déplacement de coupure (ou nick translation)	57
I.1.1.2. Marquage par amorçage aléatoire (Random priming)	58
I.1.1.3. Sondes ARN	59
I.1.2. Marquage aux extrémités	60
I.1.2.1. Marquage en 5' des ARN par polymérisation	60
I.1.2.2. Marquage en 5' des acides nucléiques	61
I.1.2.2. Marquage en 3' des acides nucléiques	62
II. Marquages non radioactif	62
II.1. Marquage par fluorescence	63
II.1.1. Fluorescéine et dérivés	63

II.1.2. Marquage à la biotine et à la digoxigénine	<b>64</b>
II.1.2.1. La biotine	<b>64</b>
II.1.2.2. La digoxigénine	<b>65</b>
<b>Chapitre V : Séquençage de l'ADN</b>	<b>66</b>
I. Méthode enzymatique ou méthode de Sanger	<b>66</b>
II. Séquençage haut débit	<b>70</b>
II.1. Pyrosequencing (Roche)	<b>70</b>
II.2. Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina)	<b>72</b>
II.3. Séquençage par ligation (Applied Biosystems)	<b>72</b>
III. Séquençage par hybridation	<b>72</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	

# **INTRODUCTION ET OBJECTIFS**

## **Introduction**

La biologie moléculaire est une discipline consacrée à l'étude des molécules porteuses de l'information héréditaire, de leur structure, synthèse, altération (mutations). Depuis la fin des années 1950 et le début des années 1960, les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes, notamment l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN).

Afin d'explorer les différents mécanismes moléculaires, les chercheurs en biologie moléculaire utilisent des techniques spécifiques pour la biologie moléculaire, qui sont souvent combinées avec d'autres techniques et idées provenant de la génétique et de la biochimie. Parmi ces techniques, La PCR est probablement l'une des découvertes scientifiques les plus importantes de la décennie. Grâce à cette technique devenue incontournable, la biologie moléculaire a accompli en quelques années des progrès sans précédent.

## **Objectifs**

Le présent polycopié constitue un support pédagogique d'une grande importance, destiné aux étudiants ayant dans leur cursus le module de Techniques en Biologie Moléculaire.

Ce support permettra aux étudiants de se familiariser avec certaines des techniques de biologie moléculaire ; de la méthodologie à l'interprétation des résultats. Ces techniques universelles sont rencontrées dans le domaine professionnel ainsi que dans le domaine de la recherche fondamentale et la recherche appliquée.

Dans un souci pédagogique, les cours sont simplifiés et structurés en trois chapitres : le premier concerne l'organisation d'un laboratoire de Biologie moléculaire, le second chapitre est consacré à l'extraction des acides nucléiques, qui traite de toutes les méthodes qui permettent d'extraire l'ADN à partir de différentes sources, le rôle et l'importance de chacun des réactifs utilisés, ce qui permettrait une

bonne analyse des résultats et d'apporter les solutions correctives nécessaires en cas d'échec de l'extraction. Le troisième chapitre concerne l'amplification de l'ADN extrait par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), ce chapitre traitera la PCR classique, la PCR quantitative en temps réel et la reverse transcriptase PCR avec diverses applications. Le quatrième chapitre est consacré aux techniques de marquage (radioactif et non radioactif) interne ou aux extrémités des acides nucléiques ADN et ARN. Les techniques récentes de séquençage de l'ADN seront abordées dans le quatrième.

## **Chapitre I : Organisation d'un laboratoire de Biologie moléculaire**

### **I- Organisation du laboratoire**

L'organisation physique du laboratoire doit être pensée en fonction des activités et des risques. On distingue deux grands types d'activités :

- les activités pré-PCR où l'on manipule de l'ADN non amplifié (extraction, purification, préparation des mix PCR, clonage d'ADN génomique)
- les activités post-PCR où l'on manipule de l'ADN amplifié (purification de produits PCR, réaction de séquence, clonage de produits PCR)

Cette séparation a pour but de réduire les risques de contaminations (l'ADN amplifié étant très contaminant pour l'ADN non amplifié). Tout échange de matériel entre ces deux zones est strictement proscrit (tout particulièrement les micropipettes qui sont une source importante de contamination). A l'intérieur de ces deux zones, les activités à risque doivent être le plus isolées possibles et être clairement identifiées (il faut assurer la formation et l'information des utilisateurs).

#### **I.1. responsable du laboratoire**

Pour la bonne marche du laboratoire, il est nécessaire de nommer une personne qui en sera responsable et qui veillera à son bon fonctionnement (la gestion des stocks, les commandes de consommables, l'entretien des équipements etc.). Le responsable est en charge de l'organisation et de la gestion du laboratoire. Il établit les règles d'hygiène et sécurité et les fait respecter. Il doit également mettre en place une démarche qualité (rédaction de procédures, métrologie etc.). Il doit en outre assurer la formation des nouveaux arrivants.

#### **I.2. Règles de base**

Dans un laboratoire de biologie moléculaire, comme dans tout autre laboratoire, un certain nombre de règles doit être respecté :

- ✓ respecter les règles d'hygiène et sécurité pour votre sécurité, celle des personnes travaillant à vos côtés et celle de l'environnement;

- ✓ respecter les autres manipulateurs, ce qui implique de nettoyer les paillasses et de faire la vaisselle après chaque manipulation, de ranger et de respecter les plannings de réservation;
- ✓ prendre soin du matériel;
- ✓ étiqueter correctement ce que vous voulez conserver. L'étiquette doit indiquer : le nom du préparateur, le nom du produit, sa concentration et sa date de fabrication (ou d'ouverture, ou de péremption);
- ✓ ne pas manipuler seul dans le laboratoire les soirs et week-end en dehors des heures d'ouverture du laboratoire.

## **II- Matériel nécessaire et soins à apporter**

Un laboratoire de biologie moléculaire nécessite un certain matériel, qui nécessite des soins réguliers pour assurer son bon fonctionnement et sa pérennité. Chaque dysfonctionnement d'un matériel ou endommagement doit être signalé pour engager les réparations ou de changer le matériel en question.

### **II.1. Micropipettes automatiques**

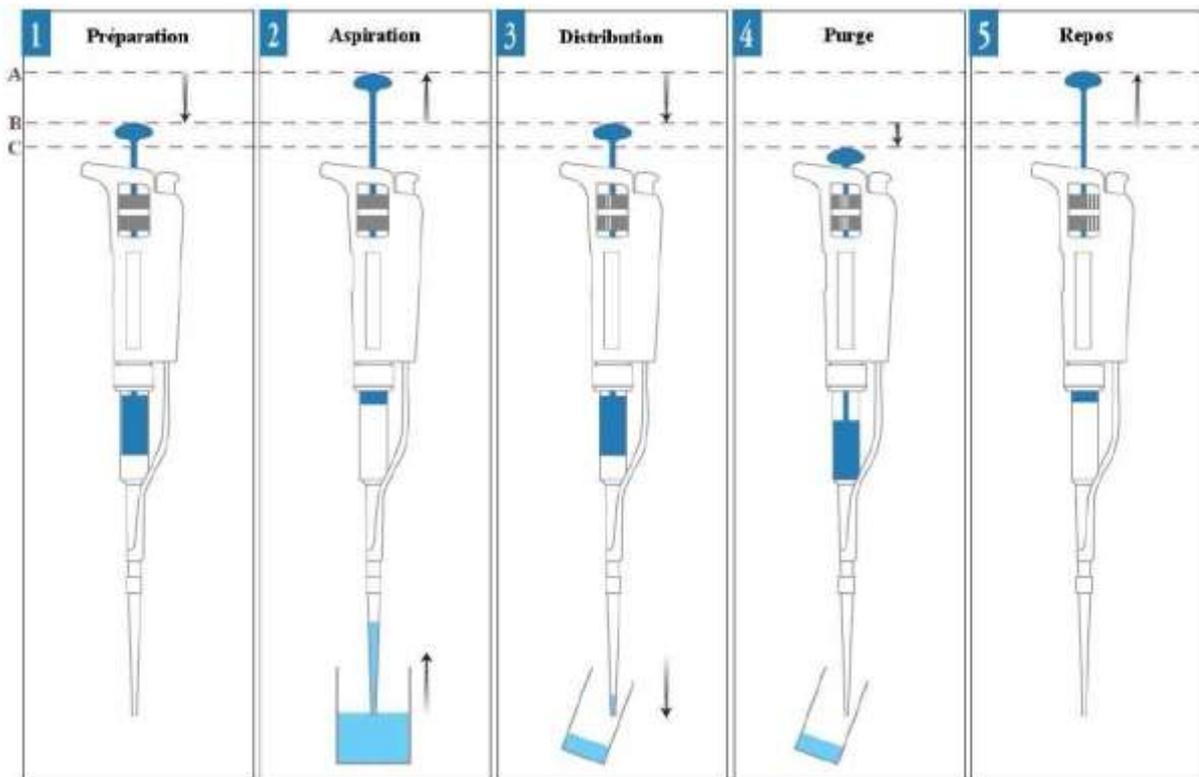
La fiabilité et la justesse du pipetage est la base d'une bonne expérimentation, ce qui implique la nécessité d'un soin particulier des micropipettes. Ci-après quelques conseils d'utilisation :

- ✓ Evitez de poser les pipettes automatiques à plat ;
- ✓ Evitez les chocs (cause de dérèglement) ;
- ✓ Rangez les pipettes sur leur portoir entre chaque utilisation.
- ✓ Pour ne pas endommager le mécanisme interne de la micropipette, ne forcez jamais le réglage du volume au-delà des limites spécifiées par le fabricant (ne pas pipeter 210 ul avec une P200 par exemple, mais utiliser une P1000...).
- ✓ Vérifiez que vous avez mis un cône au bout de la pipette avant de pipeter, cela vous évitera de tremper l'embout porte cône dans le liquide à pipeter ;
- ✓ Pré-rincez le cône avant le pipetage. Cela permet une plus grande uniformité de la distribution. Ce pré-rinçage est réalisé en aspirant avec le cône et en

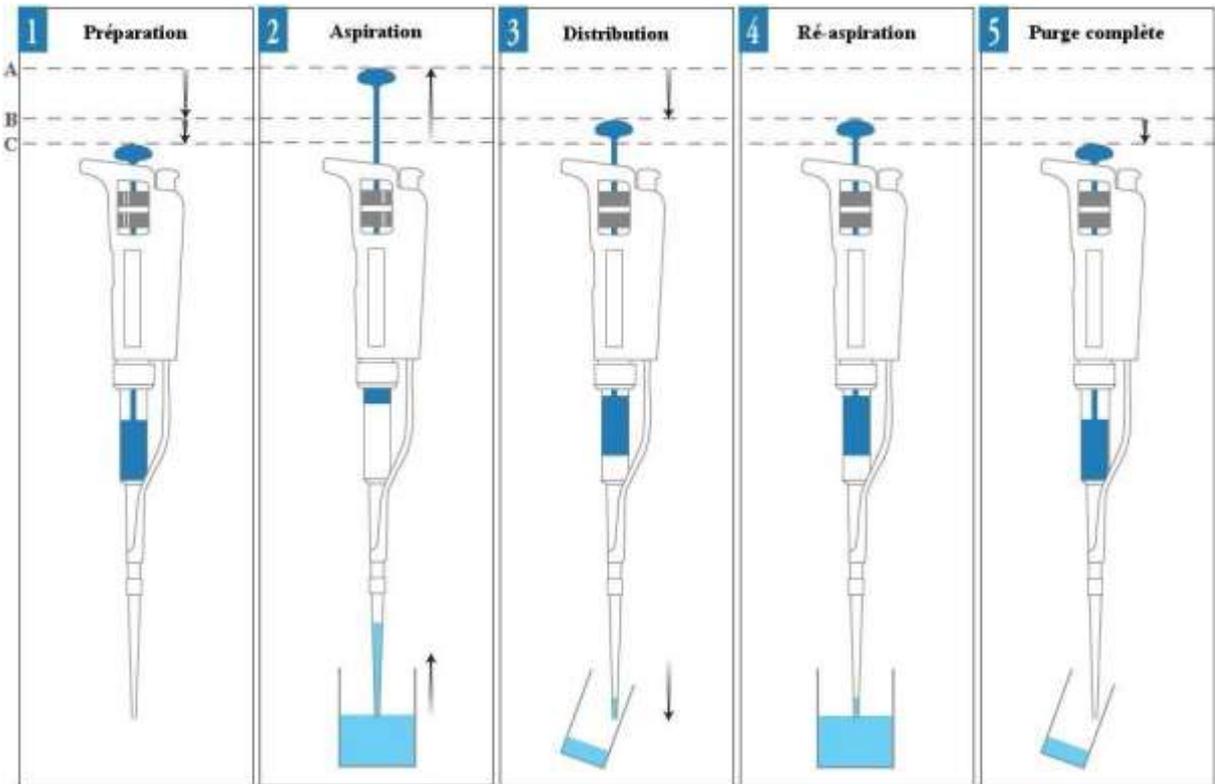
redistribuant le liquide dans le récipient d'origine. Il faut le faire à chaque changement de cône et à chaque augmentation de volume ;

- ✓ Lors du prélèvement, n'appuyez pas le bout du cône sur le fond du tube ;
- ✓ N'utilisez pas les pipettes pour prélever des acides forts (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etc.) car les vapeurs endommagent le piston (corrosion). Cela entraîne une perte de justesse du pipetage. Utilisez plutôt des pipettes jetables ;
- ✓ Nettoyez les pipettes régulièrement (extérieur et intérieur de l'embout porte-cône) ;
- ✓ changez les joints quand cela est nécessaire, re-calibrez les ou faites les re-calibrez une fois par an ;
- ✓ Respectez les techniques de pipetage en fonction de la nature du liquide

Technique de pipetage direct pour les liquides peu visqueux et non moussants



Technique de pipetage inversé pour les liquides visqueux et/ou moussants (glycérol, triton, tween 20, etc.)



**1. Préparation** : Maintenir la pipette automatique verticalement (augmente la justesse du pipetage), appuyer doucement sur le bouton-poussoir jusqu'à la deuxième butée (position C).

**2. Aspiration** : Immerger le cône de 1 à 5 mm maximum dans le liquide à prélever (augmente la justesse du pipetage), relâcher lentement le bouton-poussoir sans à-coup jusqu'à la position de repos (position A) (cela permet d'éviter une remontée de liquide dans l'embout porte-cône) et attendre 1 seconde de sorte que la totalité du liquide puisse remonter dans le cône. Retirer le cône du liquide et vérifier qu'aucune gouttelette ne reste accrochée à l'extérieur de la pointe, dans le cas contraire, appuyer l'extrémité du cône sur la paroi du récipient (augmente la justesse du pipetage).

**3. Distribution** : Positionner la pointe du cône contre la paroi du récipient en inclinant légèrement la pipette automatique de 10 à 45° par rapport à la paroi du

tube récepteur. Appuyer doucement et sans à-coup sur le bouton-poussoir jusqu'à la première butée (position B). Attendre 1 seconde.

**4. Ré-aspiration** : Si le cône doit être réutilisé pour une nouvelle aspiration du même liquide, maintenir le bouton-poussoir dans la même position intermédiaire (position B) et recommencer à partir de l'étape 2.

**5. Purge complète** : Si le cône ne doit pas être réutilisé, appuyer le bouton-poussoir jusqu'à la deuxième butée (position C) au dessus du récipient pour déchets. Ejecter le cône.

## II.2. Balance

- ✓ La balance elle ne doit pas être utilisée en dehors des limites spécifiées par le fabricant (problème de dérèglement donc de justesse de la pesée).
- ✓ Nettoyez la balance et la paillasse autour après utilisation.

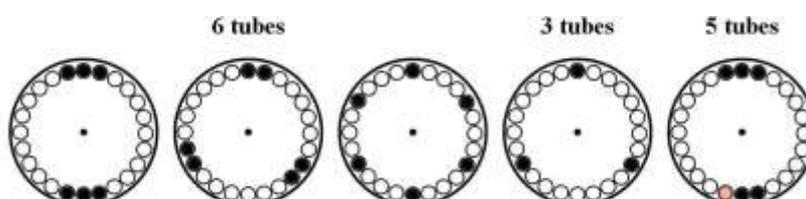
## II.3. Thermocycleur

Lors de la programmation, entrez une température de 10°C et non de 4°C en fin de programme, cela permet d'augmenter la durée de vie de la machine. De la même façon, il est préférable de ne pas démarrer une PCR le vendredi soir, pour éviter que le thermocycleur reste en marche tout le week-end. Faites les contrôler une fois par an par une société de maintenance.

## II.4. Centrifugeuse

La partie la plus fragile d'une centrifugeuse est l'axe du rotor. Pour ne pas le fausser, il faut impérativement équilibrer le rotor, c'est-à-dire répartir les tubes de façon homogène de part et d'autre de l'axe central (en partant du principe que tous les tubes ont le même poids, sinon les peser et les associer deux à deux de même poids de part et d'autre de l'axe de rotation).

Quelques exemples pour un rotor 24 tubes :



Dans la dernière configuration (5 tubes), il faut en ajouter un sixième de même poids (en rouge sur le schéma).

- ✓ Certaines centrifugeuses (de marque Eppendorf par exemple) possèdent un couvercle qui s'ajuste directement sur le rotor : n'oubliez pas de le mettre avant de démarrer la centrifugation.
- ✓ Pensez également à laisser le couvercle des centrifugeuses ouvert quand elles sont éteintes pour éviter la condensation et l'apparition de moisissures (surtout les centrifugeuses réfrigérées).

## **II.5. Bain-marie**

- ✓ Il est nécessaire d'ajuster le niveau d'eau avant utilisation.
- ✓ Couvrir la cuve pour éviter l'évaporation car certains bains-marie n'ont pas de système de sécurité et continuent à chauffer même sans eau. Ceci a été la cause de plusieurs incendies dans différents laboratoires.
- ✓ Changez l'eau de la cuve (eau trouble, dépôts sur le fond).

## **II.6. Réfrigérateurs et congélateurs**

- ✓ Bien refermer les réfrigérateurs et congélateurs.
- ✓ Ne pas stocker inutilement.
- ✓ Etiquetez de façon lisible (nom, nom du projet ou de l'encadrant, date, contenu, etc.).

## **II.7. Table UV**

- ✓ Eteignez les tables UV après visualisation d'un gel d'agarose coloré au BET.
- ✓ Nettoyez la surface de la table UV avec de l'eau.

## **II.8. Cuve d'électrophorèse**

- ✓ Ne laissez pas les sels s'accumuler sur les électrodes de la cuve d'électrophorèse. Cela provoque un mauvais ajustement du couvercle qui empêche le contact de se faire, donc le courant électrique de passer et par conséquent la migration dans le gel ne se fait pas.
- ✓ Procéder au nettoyage et changer le tampon de migration (TBE).
- ✓ Ne coulez pas les gels avec de l'agarose trop chaud, cela déforme les moules.

## **Chapitre II : extraction des acides nucléiques**

### **I. Introduction**

Pour que l'ADN soit disponible pour les réactions enzymatiques, il convient qu'il soit libéré du corps de la bactérie après lyse de la membrane bactérienne et éventuellement de la paroi et de la membrane externe de la cellule. Dans un deuxième temps, l'ADN ainsi libéré peut être purifié des protéines, lipides, glucides constituant le corps de la cellule.

L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma.

### **II. Méthodes d'extraction**

L'extraction d'acides nucléiques contenus dans des cellules eucaryotes ou procaryotes nécessite plusieurs étapes: la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires.

#### **II.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 :

##### **II.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.

##### ***Exemple : lyse des cellules sanguines***

La lyse des cellules sanguines met en jeu l'intervention de détergents ioniques qui désorganisent la double couche de phospholipides des membranes cellulaires. Le Sang recueilli sur EDTA (éviter l'héparine qui inhibe la Taq poly) ou

fraichement décongelé est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les hématies dépourvues de noyaux. Les leucocytes sont alors récupérés par centrifugation suivie d'un lavage avec la même solution hypotonique. Ils sont ensuite traités par un mélange de détergent, comme le **SDS** (Sodium Dodécyl Sulfate) qui permet de désagréger les membranes cellulaires et de libérer les contenus cytoplasmiques et nucléaires. En biochimie classique et pour d'autres applications, il faut d'abord séparer les noyaux du contenu cytoplasmique et de ces organites cellulaires. Un traitement par la protéinase K (une protéase) permet de libérer le DNA nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans les chromosomes eucaryotes.

L'élimination des protéines non digérées et des lipides se réalise par des précipitations et des extractions sélectives. Le mélange phénol-chloroforme permet de dénaturer les protéines car non miscible à l'eau et de densité supérieure à cette dernière. Les acides nucléiques n'y sont pas non plus solubles et restent dans le surnageant aqueux. Pour les tissus, il est conseillé de les désagréger par les techniques courantes de biochimie comme le broyage ou les ultrasons. Une congélation préalable permet de transformer les tissus en une masse solide qui se prête alors à un concassage par les techniques courantes de broyage. L'extraction et la purification suivent alors le même protocole (Bienvenu *et al.*, 1999).

### **II.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 :

#### **II.1.2.1. Lyse des parois et membranes cellulaires**

Pour les cellules à paroi, on peut utiliser des hydrolases spécifiques comme le lysozyme pour fragiliser la paroi (Ranjard *et al.*, 1998). 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 constituants 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.

### **II.1.2.2. Dénaturation des protéines**

La déprotéinisation des extraits peut se faire par plusieurs procédés :

#### **II.1.2.2.1. Déprotéinisation par hydrolyse enzymatique**

On utilise le plus souvent une endoprotéase non spécifique comme la protéinase K (Primrose *et al.*, 2004), 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.

#### **II.1.2.2.2. Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope**

Les ions, dans la série de Hofmeister, ont tendance à dénaturer les protéines, ainsi : l'anion chlorate ( $\text{ClO}_3^-$ ), le Thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ),  $\text{I}^-$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , et  $\text{Ba}^{2+}$  sont des chaotropes, on peut ajouter à cette liste l'ion guanidine ( $\text{Gu}^+$ ) (Voet et Voet, 2005). Un agent chaotrope est un ion qui modifie la solubilité des molécules (protéines ou acides nucléiques) et qui peut provoquer leur précipitation. Certains sont dénaturants (le perchlorate de sodium ( $\text{NaClO}_4$ ), le thiocyanate de guanidine (TCG), l'iodure de sodium ( $\text{NaI}$ ) et le chlorure de lithium) d'autres pas (le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) à forte concentration).

- L'agent chaotrope peut agir en neutralisant certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité.
- Il peut également agir en interférant dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau ce qui modifie la solubilité des protéines. L'eau se lie préférentiellement à l'agent chaotrope ce qui prive les protéines des molécules d'eau et provoque leur précipitation.

- 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).

### **II.1.3. Autres composants des solutions d'extraction**

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

#### **II.1.3.1. 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 hydroyle, -OH, d'un alcool par un atome de soufre. Le groupe fonctionnel ainsi obtenu est nommé mercapto, -SH (Kiel, M. 2004).

Lorsqu'on utilise les agents chaotropiques 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.

#### **II.1.3.2. Les sels**

L'ajout d'une forte concentration de sels (NaCl 0,15 mol/L) 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 de contre-ions autour de la double hélice : les ions  $\text{Na}^+$  s'associent avec les groupements phosphate  $\text{PO}_4^-$  ce qui diminue les forces de répulsion qui s'exercent entre les deux brins d'ADN. Le citrate de sodium et l'acétate de sodium aussi utilisés dans les tampons d'extraction jouent le même rôle

#### **II.1.3.3. EDTA**

L'Ethylène diamine tétraacétique (EDTA) est un chélateur d'ions divalents comme le magnésium qui est un cofacteur des DNases et RNases. Ceci permet d'aider à préserver les acides nucléiques par inhibition des nucléases (Borel et Randoux, 1997).

#### **II.1.3.4. 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.

#### **II.2. Élimination des débris cellulaires**

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

#### **II.3. Extraction de plasmide**

Le principe de l'extraction est connu sous le nom de lyse alcaline. Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN des plasmides contenus dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

Le principe de cette méthode consiste à effectuer la lyse des cellules au moyen d'un détergent SDS (dodécyl sulfate de sodium) en présence de soude à pH 13. A ce pH très alcalin, l'ADN est dénaturé, les groupements phosphate sont tous chargés négativement à pH basique et les forces de répulsion entre les deux brins sont à leur maximum.

La solution est ensuite rapidement neutralisée, ce qui provoque la renaturation brutale (réappariement des brins du duplex de l'ADN). L'ADN chromosomique, très long (quelques Méga ( $10^6$  pb), ne parvient pas à se réappairer complètement et forme des enchevêtrements insolubles. L'ADN plasmidique, court ( $\sim 10^3$  paires de base), parvient à se reformer et reste en solution.

Les deux entités sont séparées alors par centrifugation. Les protéines précipitées, sont également éliminées avec le détergent et l'ADN chromosomique. La solution plasmidique obtenue ne contenant que très peu d'ADN chromosomique et de protéines est appelée lysat.

Selon l'utilisation souhaitée de la préparation d'ADN, une extraction sans purification peut suffire. Si une préparation entièrement dépourvue de contaminants salins ou cellulaires est nécessaire, une étape de purification supplémentaire s'impose.

### **II.3.1. Mini- et maxi-préparations d'ADN plasmidique**

Une culture de nuit de 1,5ml en milieu TB (1,2% tryptone, 2,4% yeast extract, 0,4% glycérol, 17 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 72 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et antibiotique), inoculée la veille par une colonie bactérienne, est centrifugée à 13000 rpm. Le culot est suspendu dans 150 $\mu\text{l}$  de solution I (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris/HCl pH8) froide. Les cellules sont lysées dans 300 $\mu\text{l}$  de solution de lyse II (0,2N NaOH, 1% SDS). L'ADN génomique est ensuite précipité à l'aide de 225 $\mu\text{l}$  de solution III de neutralisation (3M acétate de potassium, 28,5% acide acétique). Après une centrifugation à 13000rpm, l'ADN plasmidique double-brin contenu dans le surnageant est récupéré et précipité à l'éthanol 100%. Le culot est rincé dans 1ml d'éthanol 70%, lyophilisé (Speed Vac Concentrator Savant SVC 100H) et resuspendu dans 30 $\mu\text{l}$  de  $\text{T}_{10}\text{E}_1$  (Tris 10mM, EDTA 1mM) (pH8) contenant de la RNase pancréatique (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). L'ADN plasmidique ainsi obtenu peut être conservé à  $-20^\circ\text{C}$ .

La maxi-préparation d'ADN plasmidique (kit Marligen, Biosciences) permet de préparer de grandes quantités d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne. La séparation de la fraction plasmidique est basée sur le principe de la lyse alcaline des bactéries qui permet une dissociation relativement aisée entre l'ADN chromosomique bactérien et les petits plasmides de structure circulaire. De plus, la purification est améliorée par la fixation des ADN sur une résine échangeuse d'anions en présence de faible concentration saline. Cette étape permet une meilleure élimination des contaminants (ARN, protéines). L'ADN plasmidique est élué de la colonne à l'aide d'un tampon salin avant d'être précipité à l'isopropanol, centrifugé, rincé et resuspendu dans 500 $\mu\text{l}$  de tampon  $\text{T}_{10}\text{E}_1$ . Sa concentration est évaluée par mesure de la densité optique.

### **II.3.2. Protocole d'extraction de l'ADN plasmidique par Lyse alcaline des cellules et filtration sur colonne de silice**

D'après notice technique SIGMA du GenElute Plasmid Miniprep Kit.

Une colonie bactérienne transformée a été prélevée et mise en culture, une nuit à 37°C, dans 5 mL de bouillon LB additionné d'antibiotique. Les bactéries résistantes à l'antibiotique qui se sont développées contiennent le plasmide, porteur du gène de résistance et du gène d'intérêt, que l'on cherche à isoler et récupérer...

#### **II.3.2.1. Récolter les bactéries transformées**

Prélever, dans un micro-tube, 1,5 mL de la culture bactérienne et centrifuger. Un dépôt bactérien se forme au fond du tube. Vider délicatement, avec une micropipette 200 µL, le surnageant pour ne conserver que le dépôt. Recharger le tube avec 1,5 mL de la culture bactérienne et renouveler l'opération.

#### **II.3.2.2. Lyser les structures cellulaires et éliminer les grosses molécules**

Déposer dans le tube, au fond duquel il ne reste que le dépôt bactérien, 200 µL de solution de re-suspension (glucose, EDTA, Tris pH8, RNase). Utiliser l'agitateur vibrant pour remettre en suspension les cellules bactériennes. Déposer dans le tube 200 µL de la solution de lyse (SDS, NaOH). Mélanger doucement en retournant 6 fois le tube : la suspension cellulaire s'éclaircit et devient visqueuse, puis laisser réagir 5 minutes.

Déposer dans le tube, 350 µL de la solution de neutralisation (Acétate de sodium). Mélanger doucement en retournant 4 fois le tube : un précipité blanc apparaît. Centrifuger ensuite pendant 10 minutes. (*L'acétate de sodium précipite protéines et ADN chromosomique. Ce précipité et les débris cellulaires sont séparés par centrifugation du surnageant qui contient, entre autres, l'ADN plasmidique*).

#### **II.3.2.3. Filtrer l'ADN plasmidique sur une colonne de silice**

Placer sur un micro-tube une colonne de filtration. Ajouter dans la colonne 500 µL de solution de préparation (Silice), centrifuger 1 min et jeter le liquide recueilli (*La silice qui se fixe dans la colonne présente une grande affinité pour l'ADN et va pouvoir l'adsorber au cours de la filtration*).

Replacer ensuite la colonne sur le micro-tube et transférer délicatement, à la micro-pipette, le surnageant issu de l'étape 4 dans la colonne de filtration. Centrifuger l'ensemble 1min et jeter le liquide recueilli.

#### **II.3.2.4. Purifier par lavage l'ADN adsorbé**

(Replacer la colonne sur le microtube et ajouter 500 µL de solution de prélavage dans la colonne. Centrifuger 1min et jeter le liquide recueilli.). Replacer la colonne sur le microtube et ajouter 750 µL de solution de lavage (Ethanol 95%) dans la colonne. Centrifuger 1min et jeter le liquide recueilli (*L'éthanol va dissoudre et libérer la majorité des molécules adsorbées dans la colonne à l'exception de l'ADN plasmidique insoluble dans l'éthanol*). La colonne sur replacée dans le microtube et centrifuger à sec 1min pour éliminer l'éthanol.

#### **II.3.2.5. Recueillir l'ADN plasmidique par élution**

Transférer la colonne de filtration sur un micro-tube propre. Ajouter 100µL de la solution d'élution. Centrifuger 1min, le liquide recueilli dans le micro-tube contient l'ADN plasmidique. Le conserver au congélateur.

### **II.4. Extraction des ARN**

Les ARN sont plus difficiles à étudier parce qu'ils sont très sensibles aux ribonucléases (RNase A) qui sont très actives et présentes même sur les doigts du manipulateur. Elles peuvent résister à un traitement à 90°C pendant une heure. Les tissus ou les cellules sont homogénéisés dans un tampon acétate contenant :

- Un détergent puissant (SDS ou sarcosyl)
- Un agent dissociant (thiocyanate ou guanidine)
- Un agent réducteur (DTT ou 2-mercaptoéthanol)

Ce type de tampon permet d'inhiber les RNases endogènes, de dénaturer les acides nucléiques et de dissocier les protéines. Après une centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, les ARN sont extraits suivant plusieurs techniques.

La technique par précipitation différentielle de l'ARN et de l'ADN en fonction du pH et de la concentration en éthanol donne de très bons rendements.

L'ultracentrifugation peut être également utilisée. Le culot est récupéré, lavé avec le tampon acétate et précipité à l'éthanol. Il peut se conserver congelé à  $-70^{\circ}\text{C}$  pendant un an.

#### **II.4.1. Préparation d'ARN à partir de cultures cellulaires**

Tous les tampons (sauf le Tris) sont traités par 0,1% diéthylpyrocarbonate (DEPC) la nuit, puis autoclavés 20 min à  $121^{\circ}\text{C}$ . Pour le traitement au DEPC, porter des gants en butyle ; se placer sous la sorbonne aspirante ; laisser l'aspiration en route toute la nuit. Le lendemain décontaminer éventuellement le plan de travail avec de l'eau de Javel. Les flacons de DEPC de 5 ml permettent de traiter 5 litres de tampon ; une fois le flacon ouvert, l'utiliser entièrement; avant l'ouverture, percer le septum en butyle avec une aiguille pour relâcher l'éventuelle surpression due à la décomposition du DEPC. La verrerie est passée au four à  $200^{\circ}\text{C}$  2 heures. Le plastique est autoclavé 30 min  $121^{\circ}\text{C}$ . Porter des gants en permanence.

<b>Solutions</b>	pour 50 ml	
<b>Tampon A</b> EDTA pH : 8,0	10mM	1 ml 0,5M
SDS	0,5%	2,5 ml 10%
<b>Tampon B</b> NaAc pH : 5,2	100mM	1,6 ml 3M
EDTA pH : 8,0	10mM	1 ml 0,5M

1. Pour une boîte de Pétri de 10 cm ou un flacon de 75 cm<sup>2</sup> (T75) à semi-confluence.
2. Rincer deux fois avec 7 ml PBS froid.
3. Lyser les cellules dans 2 ml **tampon A** (température ambiante).
4. Gratter les cellules avec un grattoir stérile (très visqueux) ; transférer dans un tube en polypropylène stérile de 15 ml (Falcon).
5. Rincer la boîte avec 2 ml de **tampon B**. Ajouter à l'extrait précédent.
6. Ajouter 4 ml de phénol (*cf. infra*). Agiter doucement en retournant. L'ADN chromosomique doit précipiter en un flocon blanchâtre. S'il ne précipite pas, c'est que le milieu n'est pas assez acide (pas de changement de couleur). Essayer

alors de rajouter 50 µl de NaAc 2M pH : 4,0. Une fois que le flocon d'ADN est formé, on peut agiter plus fort (vortex). Agiter 2 min.

7. Centrifuger 4000 rpm, 10min, 4°C.
8. Ajouter au surnageant : 440 µl Tris 1M pH :08, 180 µl NaCl 5M et 9ml éthanol.
9. Garder à 0°C au moins 30 min. Centrifuger à 4°C, 4000 rpm au moins 30 min.
10. Reprendre dans 200 µl TE. Reprécipiter dans un tube Eppendorf 1,5 ml avec 20µl NaAc 3M pH : 5,2 ; 600 µl éthanol.
11. Resuspendre le précipité d'ARN dans 200 µl TE stérile. Dilution 1/80 et spectre. On obtient en général de 150 à 300 µg d'ARN total.(25 DO260 = 1mg/ml).
12. Ajouter à l'ARN 600 µl EtOH et garder à -80°C. Au moment de l'emploi, prélever le volume désiré et ajouter 1/40 vol. NaAc 3M pH : 5,2. Centrifuger.

## **II.5. Papier FTA :**

Le papier FTA est une chimie brevetée de la société Whatman. Cette chimie sur matrice de cellulose (Figure 1), permet d'une part la lyse des membranes des cellules déposées et de leurs organelles suivie du largage des acides nucléiques qui seront enchâssés et protégés dans les fibres du support. D'autre part, elle inactive les phages, bactéries et virus rendant ainsi inertes (pour le manipulateur et pour les acides nucléiques) les échantillons collectés. Une fois secs, les acides nucléiques sont protégés de la dégradation enzymatique, microbienne, oxydative ou par les radicaux libres, et peuvent être conservés durant plusieurs années à température ambiante (Bou et al., 210).

Un prélèvement sur carte FTA consiste en la découpe, à l'aide d'un emporte-pièce, d'une rondelle (*punch*) de 1,2 mm de diamètre imprégnée de sang (ou de salive) séché. Le punch est lavé plusieurs fois puis séché à température ambiante et conservé transitoirement à 4°C ou utilisé directement en PCR.



**Figure 1** : Divers support utilisant le papier FTA (Bou *et al.*, 2010)

### **III. Méthodes de purification**

Les méthodes de purification des acides nucléiques à partir d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques suivantes :

- ✓ extraction/précipitation,
- ✓ chromatographie,
- ✓ centrifugation et
- ✓ séparation par affinité.

#### **III.1. Extraction/Précipitation**

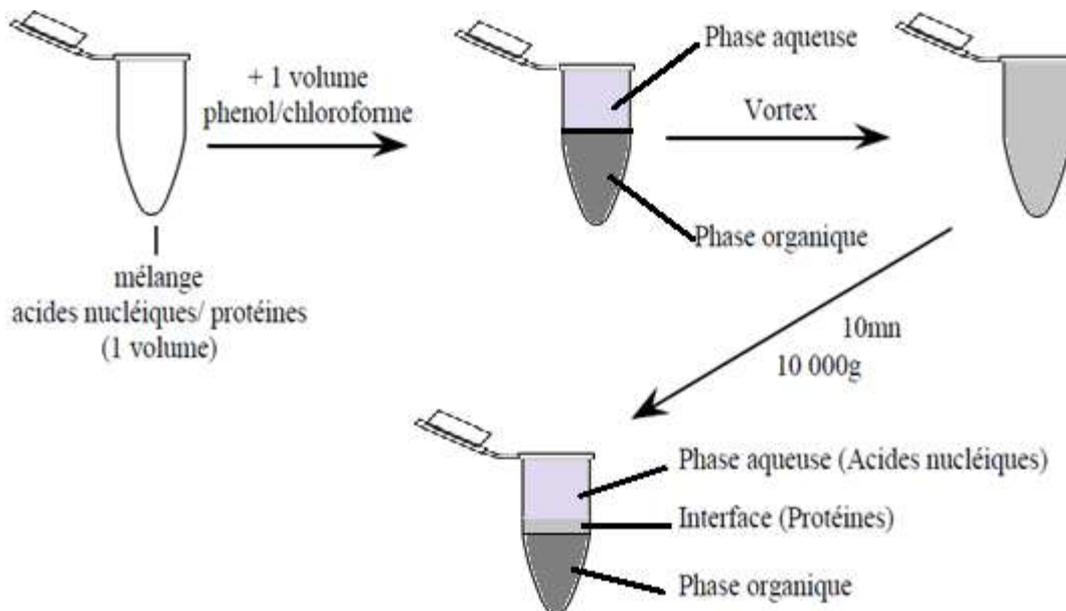
L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants de la préparation d'acides nucléiques. Une combinaison de phénol et de chloroforme sert fréquemment à supprimer les protéines. La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol est généralement utilisée pour concentrer les acides 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.

### III.1.1. Purification au phénol-chloroforme

Cette méthode utilise la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminants comme les protéines et les lipides) entre deux phases non miscibles (Figure 2). On mélange vigoureusement l'extrait d'acides nucléiques avec une phase hydrophobe. Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques.

On réalise deux extractions successives:



**Figure 2:** Schéma de l'extraction au phénol-chloroforme

➤ **Extraction phénolique** est utilisée pour débarrasser l'extrait d'acides nucléiques des protéines car le phénol est un déprotéinisant puissant. Les protéines précipitent, elles sédimentent au fond de la phase aqueuse mais et elles restent à l'interface c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Les débris membranaire lipidiques vont dans la phase

phénol. Le phénol doit être très pur et saturé en tampon (pH 8 pour extraire l'ADN). L'inconvénient du phénol réside dans son caractère très toxique et corrosif, c'est donc un produit qui nécessite un équipement particulier pour être manipulé (Hotte chimique, gants).

➤ **Extraction au chloroforme** complète toujours l'extraction au phénol pour éliminer toutes traces de phénol aqueux, pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple ) sur l'acide nucléique extrait . Le chloroforme est additionné d'alcool isoamylique (AIA = 3-méthyl-1-butanol =  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) qui est un agent anti-mousse stabilisant la séparation des phases (agent déstabilisant de l'émulsion) (Bastard *et al.*, 2002).

**Remarque** : lors de la préparation d'un extrait ADN, l'élimination de l'ARN peut être effectuée à la fin ou avant l'étape phénolique. S'elle est effectuée après l'étape phénolique, le traitement doit être suivi d'une deuxième déprotéinisation afin d'éliminer la RNase résiduelle.

### **III.1.2. Précipitation/concentration par l'éthanol ou l'isopropanol.**

#### **1. Précipitation à l'éthanol**

Avant l'ajout de l'éthanol, il faut ajouter à l'extrait d'acides nucléiques, une quantité importante de cations (apport de  $\text{Na}^+$  sous forme  $\text{NaCl}$   $3\text{mol.L}^{-1}$ ). Les cations  $\text{Na}^+$  neutralisent les groupements  $\text{PO}_4^-$  de l'ADN ou de l'ARN et forment un écran protecteur de contre-ions autour de la double hélice, l'acide nucléique devient moins soluble car il établit moins d'interactions avec l'eau.

La précipitation est réalisée par addition de l'éthanol moins polaire que l'eau. Il faut ajouter à un volume de solution, au moins deux volumes d'éthanol et placer l'extrait à froid (Jarrell *et al.*, 1992). Le culot d'ADN est obtenu après centrifugation à très grande vitesse.

Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 % pour se débarrasser des sels qui passent en solution dans les 30 % de la phase aqueuse de l'éthanol de lavage. Puis le précipité est séché. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité. Après le séchage, les acides

nucléiques pourront être resolubilisés dans un tampon adéquat (souvent tampon TE = Tris-EDTA pH 8).

## **2. Précipitation à 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 car non précipités. Dans ce cas, on procède à un mélange volume à volume. Le précipité sera également 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 (Jarrell *et al.*, 1992). Pour des études biochimiques fines de structure, il convient de procéder à d'autres purifications. Pour les analyses génétiques (application des diagnostics de routine), le DNA obtenu est de qualité suffisante.

**Remarque:** L'ADN génomique étant de haut poids moléculaire, il peut former de très longues fibres qui se répandent dans l'éthanol en formant une " méduse " d'ADN). On utilise l'affinité de l'ADN pour la silice pour enrouler ces fibres sur une baguette de verre. En enroulant les fibres de l'ADN autour de la baguette de verre, une grande partie de l'ARN peut être éliminée à ce stade car les molécules d'ARN, petites molécules, ne s'enroulent pas.

## **III.3. 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.

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. Un grand nombre de kits commerciaux qui proposent différentes variantes des méthodes décrites précédemment contiennent également des petites colonnes de résine chromatographique échangeuse d'anions ou de silice, permettant d'améliorer la pureté.

### **III.3.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice**

Le gel de silice est un polymère d'acide silicique  $\text{Si(OH)}_4$  préparé à partir de silicate de sodium. Il s'agit d'une chromatographie par adsorption. La fixation de l'ADN sur la silice fait intervenir des interactions hydrogène.

L'adsorption sélective d'acides nucléiques sur la membrane de gel de silice n'est obtenue que si l'on travaille dans les conditions suivantes :

- ✓ en présence de concentrations élevées d'agents chaotropiques ou à force ionique élevée
- ✓ et en présence d'alcool.

L'agent chaotropique intervient comme compétiteur dans les relations que l'ADN établit avec l'eau. L'agent chaotropique se lie à l'eau et l'ADN devient moins hydraté. L'ADN établit alors des liaisons avec la silice et se fixe au support de la colonne. La colonne est ensuite lavée par de l'éthanol, solvant moins polaire que l'eau qui ne risque pas de décrocher l'ADN.

L'ADN est ensuite élué par un tampon à basse force ionique. On peut utiliser un tampon avec une faible concentration en sels ou de l'eau pure, l'ADN va à nouveau établir des liaisons avec l'eau, s'hydrater et repasser en solution.

La silice peut être sous forme de gel sur colonne ou sous forme de billes :

- ✓ Dans le cas d'une colonne, la séparation est effectuée par centrifugation. Ce procédé est basé sur l'emploi de petites colonnes adaptées à des tubes de 1,5 à 2 mL.
- ✓ S'il s'agit de billes, ce sont des billes paramagnétiques recouvertes de silice qui sont utilisées et la séparation sera effectuée à l'aide d'un dispositif aimanté.

### **III.3.2. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions**

La chromatographie par échange d'anions est basée sur l'interaction entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives du support de chromatographie. On peut utiliser un échangeur d'anions de type DEAE

cellulose ou équivalents qui est un échangeur faible ou un échangeur d'anions de type Q-sepharose qui comporte un ion ammonium quaternaire  $R_4N^+$  qui est un échangeur fort.

Le dépôt du lysat sur la colonne de chromatographie est réalisé dans des conditions de basse concentration en sels pour que l'ADN expose de nombreuses charges négatives. L'ADN se fixe à la colonne à l'aide de liaisons ioniques. Ensuite, les protéines, les débris cellulaires et les autres molécules en solution sont éliminés par lavage à l'aide d'un tampon moyennement chargé en sels.

L'ADN est finalement élué à l'aide d'un tampon à haute force ionique (solution concentrée de NaCl). Afin d'éliminer les sels, l'ADN est précipité par de l'alcool.

### **III.3.3. Chromatographie par affinité**

Dans certaines circonstances, il peut être préférable d'extraire les ARN messagers polyadénylés (poly(A+)) et non les ARN totaux. En effet, dans une cellule de mammifère, les ARN messagers codant pour des transcrits spécifiques d'un type cellulaire donné représentent moins de 10 % des ARN totaux produits. Les 90 % restants correspondent aux ARN impliqués dans les étapes transcriptionnelles ou traductionnelles (ARN ribosomiaux (28S, 18S et 5S), ARN de transfert, ARN nucléaires et ARN mitochondrial). Cette approche permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la méthode en éliminant les ARN ribosomiaux et les ARN de transfert les plus abondants, notamment pour les transcrits faiblement exprimés. Elle est notamment utilisée pour la réalisation de *northern blot* lorsque les ARNm sont présents en faible quantité ; la réalisation de la technique de *RNA mapping* à l'aide de la méthode d'extension d'amorce dans le but de déterminer la position du site d'initiation de la transcription ; la construction de banque d'ADNc, pour l'étude de l'expression des gènes à l'aide de puces d'ADNc ; la réalisation de traduction *in vitro* ; la réalisation de la technique de *Rnase protection assay* consistant à utiliser une sonde ARN antisens partiellement complémentaire de l'ARN étudié protégeant l'ARN vis-à-vis des Rnases. Parce qu'il comporte une queue poly(A) d'environ 200 nucléotides pour les cellules de mammifères, l'ARN

messager peut être purifié par chromatographie d'affinité. Il se fixe sélectivement par complémentarité de séquence sur des colonnes d'oligo (dT). Deux approches peuvent être utilisées : soit les ARNm sont purifiés à partir des ARN totaux préalablement extraits, soit directement à partir du prélèvement source sans passage intermédiaire sous forme d'ARN total. Différents procédés sont utilisés :

1) par exemple, les Coffrets Sigma utilisent des oligo (dT)<sub>30</sub> liés de façon covalente à des billes de polystyrène de un micromètre pour capter par hybridation des ARN polyadénylés. Les polystyrènes donnent moins de liaisons non spécifiques que la cellulose et restent en suspension lors de l'hybridation avec les ARNm en l'absence d'agitation ;

2) les coffrets Clontech utilisent des billes de latex coatées par des oligo (dT). Dans des conditions très salines, les ARN poly(A) se lient aux particules de latex à 68°C. Les billes latex-ARNm sont remises en suspension dans un tampon de lavage et transférées sur un filtre permettant de recueillir facilement les billes de latex. Après deux lavages, les ARNm sont élués dans un tampon peu salin ou de l'eau *Rnase-free* ;

3) les coffrets Roche Diagnostics et Promega (PolyA Tract System 1 000®) utilisent des sondes oligo (dT)<sub>20</sub> marquées à la biotine et des billes magnétiques coatées à la streptavidine. La biotine et la streptavidine présentent l'une des affinités les plus fortes en biologie. Les hybrides sont ainsi capturés grâce aux billes magnétiques.

Il est par ailleurs possible d'obtenir des ARN amplifiés marqués. La technique d'Eberwine consiste en une étape de transcription inverse des ARN poly(A) avec des oligo(dT) qui contiennent le promoteur T7 polymérase. Le premier brin d'ADN est alors utilisé pour synthétiser le second brin grâce à l'ADN polymérase, l'ADN ligase et la Rnase H. L'ADNc double brin peut ensuite servir de matrice pour la transcription *in vitro* (Megascript®, Ambion) et obtenir des ARN amplifiés marqués ou non à la biotine.

### **III.4. Centrifugation**

La centrifugation sélective est une méthode de purification puissante . À titre d'exemple, l'ultracentrifugation isopycniqne en gradients de chlorure de césium (CsCl) à des forces gravitationnelles 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 à l'élution centrifuge pour purifier sélectivement un type d'acide nucléique.

### **IV. Conservation de l'ADN**

L'ADN peut être conservé dans un tampon (10mM Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C.

- A pH 8, la dégradation de l'ADN est plus faible qu'à pH 7.
- L'EDTA permet de chélater les ions divalents (et donc d'inhiber de nombreuses nucléases qui utilisent des ions  $Mg^{2+}$  comme co-facteurs)

L'ADN peut être conservé des années de -4°C à -80°C dans ce tampon mais des cycles successifs de congélation / décongélation entraînent des cassures des acides nucléiques de grande taille (>10kb). D'où la nécessité de réaliser des fractions aliquotes.

### **V. Choix du protocole en fonction des manipulations ultérieures**

Pour plusieurs réactions la qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques. A titre d'exemple pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), plusieurs contaminants sont susceptibles de l'inhiber. Certains sont listés dans le Tableau I.

**Tableau I** : quelques inhibiteurs de la PCR.

Inhibiteur	Concentration inhibitrice
SDS	>0.005%
Phénol	>0.2%
Ethanol	>1%
Isopropanol	>1%
Acétate de sodium	>5mM
Chlorure de sodium	>25mM
EDTA	>0.5mM
Urée	>20mM
Hémoglobine	>1mg/ml

## VI. 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  $R = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  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.

Les ARN étant en simple brin, le coefficient moyen d'absorption d'un nucléotide est supérieur à celui du même nucléotide dans la double hélice à cause de l'hypochromisme.

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

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

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

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.

Le système de rétention NanoDrop (Produits Thermo Scientific NanoDrop) combine les fonctions technologiques des fibres optiques et les propriétés naturelles de tension de surface pour capturer et retenir des quantités infimes d'échantillon indépendant de l'appareil de confinement traditionnel tel que les cuvettes ou capillaires. Le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte dans une large gamme de mesures de concentration d'acide nucléiques, éliminant la nécessité d'effectuer des dilutions. Le volume réduit d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique facilite également l'inclusion d'autres étapes de contrôle qualité tout au long de nombreux flux moléculaire, augmentant l'efficacité et conduisant finalement à une plus grande confiance dans les résultats en aval.

## **VII. Quantification de l'ADN**

### **VII. 1. Dosage colorimétrique de l'ADN**

Il est basé sur la réaction spécifique des 2-désoxyntoses avec la diphénylamine. En milieu acide à chaud, le 2-désoxyribose des nucléotides puriques peut être libérés et former un composé bleu dont le maximum d'absorption se situe à 595 nm. C'est la méthode classique pour mesurer des quantités importantes de DNA (de l'ordre de quelques milligrammes).

### **VII.2. Dosage par absorption U.V. de la concentration en ADN**

A 260 avec un trajet optique de 1 cm, une unité d'absorbance correspond à une concentration d'ADN double brin de 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Une unité d'absorbance correspond à 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNA ou d'ADN simple brin.

Malheureusement, cette méthode est peu sensible pour manipuler des concentrations d'ADN inférieures à 250 ng/ml

### **VII.3. Dosage de l'ADN par fluorescence en présence de BET**

Le Bromure d'Ethidium (BET) interagit avec l'ADN en s'y intercalant et une fois intercalé, le rendement de fluorescence du colorant devient cent fois plus important. Le principe de la quantification consiste à comparer à l'œil nu (estimation), ou mieux après photographie, l'intensité de la fluorescence émise par l'ADN sur un gel d'électrophorèse. La quantification exacte consiste alors à établir une courbe d'étalonnage donnant l'intensité de fluorescence d'une solution de BET à laquelle on ajoute des quantités croissantes de DNA de concentration connue. (Gamme d'étalonnage). Par cette méthode on peut déceler des quantités de DNA de l'ordre de 50 ng/ml.

### **VII.4. Dosage fluorimétrique classique de l'ADN**

On utilise un spectrofluorimètre pour mesurer l'intensité de la fluorescence d'une solution d'ADN en présence d'un excès de BET. On compare ensuite les valeurs de ces intensités avec celle d'une solution d'ADN standard (courbe standard). Le BET peut être remplacé par un autre colorant pour augmenter la sensibilité de la mesure. Cette méthode permet de mesurer des quantités d'ADN de l'ordre de quelques picogrammes.

### **VII.5. Dosage par la PCR temps réel**

La PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. L'appareil de PCR en temps réel n'est autre qu'un thermocycleur classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence, il mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles (cette technique sera détaillée ultérieurement).

## **VIII. Analyse de protocoles d'extraction**

### **1. Protocole d'extraction d'ADN génomique de *Bacillus subtilis* par lyse chimique et enzymatique - Purification par solvant.**

Le but de cette analyse de protocole est de comprendre l'utilité de chaque réactif dans un protocole, ce qui permettrait, en fonction des résultats de l'extraction, d'apporter les correctifs nécessaires.

- **Réactifs** :- Culture de 18h agitée 37°C de *B. subtilis* en milieu BO

#### **- Tampon Hoffman:**

- détergents : Triton X-100 2% (m/v), SDS 1% (m/v)
- Tampon : Tris 10 mM pH 8
- Inhibiteur de nucléases : EDTA 0.1 mM piège Mg<sup>2+</sup>
- Milieu légèrement hypotonique : NaCl 100 mM ( environ 6 g/L )
- Juste avant utilisation: ajouter du lysozyme à 20 mg/mL final
- Proteinase K à 20 mg/mL
- RNase à 5 mg/mL
- NaCl 3M
- Ethanol 100 %
- Ethanol 70%
- TE (Tris EDTA) 1X = Tris/HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM pH 8

**Avant toute manipulation, lire l'absorbance à 600nm de la culture bien homogénéisée contre le milieu LB**

1. Introduire, environ 1,5mL de culture d'une nuit de *B.subtilis* en milieu BO dans un tube conique (ependorf).
2. Centrifuger 5 min à 5000 g. (7500 rpm)
3. Eliminer soigneusement le surnageant..
4. Reprendre complètement le culot dans 0,2 mL de tampon "Hoffman".

5. Ajouter 10  $\mu\text{L}$  de protéinase K à 20 mg/mL.
6. Incuber 30 min à 56°C.
7. Centrifuger 3 min à 12 000 g.
8. Transférer le surnageant dans un nouveau tube conique (ependorf) (en estimant le volume V).
9. Ajouter, **sous hotte et avec des gants**, un volume V (200  $\mu\text{L}$ ) du mélange PCI (25 : 24 : 1 v/v/v).
10. Vortexer 10 s après avoir bien fermé le tube.
11. Centrifuger 3 min à 12 000 x g.
12. Transférer sous hotte, la phase supérieure dans un nouveau tube conique de 1,5 mL.

**Ne pas chercher à prélever la totalité de la phase supérieure afin de ne pas prendre de solvants.**

13. Ajouter 10  $\mu\text{L}$  de RNase à 5 mg/mL et vortexer
14. Incuber 10 min à 37°C.
15. Ajouter 20  $\mu\text{L}$  ( 0,1 V ) de NaCl 3M
16. Ajouter 2 à 3 V ( 500  $\mu\text{L}$  ) d'éthanol 100%(v/v) glacial.
17. Mélanger par retournement et placer le tube 15 min dans la glace.
18. Centrifuger 5 minutes à 12 000 g à 4°C.
19. Eliminer le surnageant :le culot contient l'ADN précipité.
20. Ajouter 1 mL d'éthanol à 70 % (v/v) glacial
21. Centrifuger 5 minutes à 12 000 g à 4°C
22. Repérer le culot et éliminer complètement et au maximum le surnageant (sécher les bords au moyen de papier Joseph).
23. Sécher le culot près du bec électrique ou à l'étuve à 80°C : il devient totalement translucide

24. Bien resuspendre le culot dans 50  $\mu$ L de tampon TE.

## **2- Protocol d'extraction d'ADN génomique bactérien (E. Coli)**

### **1. Lyse cellulaire et dénaturation des protéines**

1. Dans un tube à centrifuger en polypropylène, introduire 3mL de culture d'E.coli de 18 à 37°C en milieu riche. Centrifuger 5 minutes à 150 g.
2. Retirer le surnageant et redissoudre le culot dans 2,5mL de tampon S.E (saline-EDTA, pH=8).
3. Ajouter 0,15mL de solution de lysozyme (10mg/mL)
4. Incuber 30 minutes à 37°C puis ajouter 0,2mL de SDS
5. Mélanger doucement par retournements et incuber 10 minutes à 60°C.
6. Refroidir dans la glace jusqu'à température ambiante.
7. Ajouter lentement 0,60mL de NaClO<sub>4</sub>.
8. Bien mélanger par agitation douce.

### **2 . Extraction au phénol**

9. Ajouter dans le même tube un volume (soit 3,5mL) de phénol saturé.
10. Fermer hermétiquement le tube.
11. Mélanger par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion
12. Centrifuger 5 minutes à 1600g à température ambiante de manière à obtenir 2 phases bien séparés et à l'interface, les protéines précipitées.
13. Transférer avec précaution la phase aqueuse (phase supérieure contenant les acides nucléiques) dans un tube propre en veillant à ne prélever ni la phase organique (phénolique), ni les protéines précipitées.
14. Procéder à une nouvelle extraction par le mélange phénol/chloroforme :
  - a. Ajouter 3,5mL de phénol/chloroforme, (a)
  - b. Fermer hermétiquement le tube, (b)
  - c. Mélanger par retournements successifs pendant 5 minutes de manière à maintenir une émulsion (c)
  - d. Centrifuger 5 minutes à 1600 g à température ambiante, (d)

- e. Transférer avec précaution la phase aqueuse dans un tube propre en veillant à ne prélever ni la phase organique, ni les protéines précipitées (e)
15. Ajouter 100µg deRNase par mL de solution aqueuse.
16. Incuber le mélange 15 minutes à 37°C
17. Procéder à une nouvelle extraction par le mélange phénol/chloroforme : étapes a, b, c et d précédentes
18. Transférer la phase aqueuse dans un tube propre.
19. Ajouter à la phase aqueuse le même volume d chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol
20. puis répéter les étapes b, c et d.

### **3. Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol**

21. Transférer la phase aqueuse dans un tube propre : déterminer approximativement le volume prélevé.
22. Ajouter: 2,5volumes d'éthanol à 95% et un volume V d'acétate de sodium.
23. Mélanger et laisser séjourner 30 minutes à -20°C.
24. Centrifuger 15 minutes à 12000 g et éliminer avec précaution le surnageant.
25. Laver le culot par une solution d'éthanol à 70%.
26. Centrifuger à nouveau 5 minutes à 12000 g et éliminer le surnageant.
27. Sécher le culot afin d'éliminer les traces d'éthanol (évaporateur relie à un dessiccateur).
28. Dissoudre le précipité dans 0,5mL de Tampon d'élution.

### **4. Protocole d'extraction d'ADN plasmidique (pBR322) d'E.coli - Extraction par lyse alcaline**

#### **Réactifs**

- ✓ Culture "pBR322" de la nuit de E.coli pBR322 en milieu LB+AMP (100 µg/ml) (1 erlen / groupe)
- ✓ TE (autoclavé) = Tris-HCl 10 mM pH 8 et EDTA 1 mM pH8
- ✓ Tampon TEG = 25 mM de Tris HCl pH 8, 10mM EDTA, 50 mM glucose
- ✓ Solution de lyse : 0,2 M NaOH, SDS 1% m/v à garder à température ambiante

- ✓ Solution de neutralisation: 3 M acétate de sodium, pH ajusté à 4,8 en ajoutant de l'acide acétique glacial.
  - ✓ éthanol 100%, éthanol 70%
  - ✓ RNase à 20 mg/mL
1. Introduire environ 1,5 mL de culture de nuit d'E. coli à 37°C en milieu LB+ ampicilline (100µg/mL) dans un tube conique (eppendorf). Centrifuger 2 minutes à 14000 rpm.
  2. Eliminer soigneusement le surnageant à la pipette automatique puis renouveler l'opération précédente pour ajouter du matériel bactérien.
  3. Eliminer soigneusement le surnageant à la pipette automatique puis reprendre soigneusement le culot dans 200 µL de tampon TEG (25 mM de Tris HCl pH 8, 10mM EDTA, 50 mM glucose). Agiter au vortex.
  4. Ajouter 200 µL de solution de lyse NaOH/SDS (0,2 M NaOH, SDS 1% m/v). Mélanger immédiatement et doucement en retournant 6-8 fois le tube. Laisser reposer à température ambiante moins de 3 minutes. La suspension cellulaire s'éclaircit et devient visqueuse. Ne pas agiter au vortex.
  5. Ajouter 300 µL de solution de neutralisation (3 M acétate de sodium, pH 4,8). Mélanger doucement en retournant 4-6 fois le tube: un précipité blanc apparaît.
  6. Laisser agir 5 minutes dans la glace.
  7. centrifuger 10 min à 14000 rpm.
  8. Transférer le surnageant dans un tube eppendorf propre ou plusieurs tubes eppendorf.
  9. Ajouter un volume 2V d'éthanol 100% glacé. Incuber au moins 15 minutes à -20°C.
  10. Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.
  11. Eliminer le surnageant par aspiration. Attention à la position du culot +/- translucide.

12. Rincer le culot avec 500  $\mu$ L d'éthanol à 70%. Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.
13. Eliminer le surnageant à la pipette puis au papier filtre. Bien laisser sécher le culot (au bec électrique ou à l'étuve).
14. Resuspendre le culot dans 30  $\mu$ L d'eau distillée qualité biologie moléculaire ou tampon tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8)
15. (Ajouter 2  $\mu$ L de RNase et laisser agir 20 minutes à 37°C).

#### **4. Protocol d'extraction à partir d'extraits végétaux**

La méthode consiste en une série de traitements avec le CTAB (Bromure de Cétyl Triméthyl ammonium), détergent non ionique, pour lyser les cellules et purifier les Acides nucléiques (AN). L'acide nucléique est récupéré par précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol inclus dans la dernière solution de CTAB.

Le CTAB libère les acides nucléiques cellulaires totaux et forme un complexe insoluble avec eux (CTAB-AN) quand la concentration initiale en NaCl est  $<0,5$  M. On élimine ainsi la majorité des contaminants cellulaires. Le complexe CTAB-AN est seulement soluble en présence de fortes concentrations en sel. Le détergent est alors éliminé et l'acide nucléique est récupéré par précipitation. Le CTAB résiduel est lavé par l'éthanol 80%.

Pour diminuer l'activité nucléasique, le tissu pourra être congelé rapidement et décongelé seulement en présence du tampon d'extraction qui contient le détergent et une forte concentration en EDTA. Le rendement est de l'ordre de : 100 à 500  $\mu$ g d'ADN par gramme de tissu frais de plantes. La méthode décrite ci-dessous peut s'appliquer à tous types de tissus végétaux. Quelques mg de tissus suffisent.

#### **Matériel**

#### **Solution d'extraction CTAB**

Conservation à t° ambiante, plusieurs années

2% (w/v) CTAB

100 mM Tris HCl pH : 8 ,0

20 mM EDTA pH : 8,0

1,4 M NaCl

**Solution de CTAB/NaCl**

10% de CTAB dans 0,7 M de NaCl

Dissoudre 4,1 g de NaCl dans 20 ml d'eau

Ajouter lentement 10 g de CTAB, en chauffant et en remuant

Si nécessaire chauffer à 65°C pour dissoudre

Ajuster à 100 ml avec de l'eau

**Solution de précipitation CTAB**

Conservation à t° ambiante, plusieurs années.

1%(w/v) CTAB

50 mM Tris HCl pH : 8 ,0

10 mM EDTA pH : 8,0

**2% (v/v) β-mercaptoéthanol (β-ME)**

**Tampon TE high salt**

Conservation à t° ambiante, plusieurs années.

100 mM Tris HCl pH : 8 ,0

0,1 mM EDTA pH : 8,0

1 M NaCl

24:1 (v/v) chloroform/alcool isoamyl

Ethanol 80% ou isopropanol

Mixeur ou pilon et mortier ou moulin à café

## **Protocole**

### **Extraction de l'ADN**

1. Ajouter le  $\beta$ -Me à la solution d'extraction CTAB pour obtenir une concentration finale de 2% (v/v). Environ 4 ml de solution d'extraction CTAB- $\beta$ -Me par gramme de tissu frais. Dilution 1:1 de cette solution avec de l'eau stérile pour des tissus déshydratés. Utiliser le  $\beta$ -Me sous hotte chimique.
2. Chauffer cette solution et la solution de CTAB-NaCl à 65°C (0,4 à 0,5 ml par gramme de tissu frais).
3. Si possible, refroidir le broyeur (-80°C ou azote liquide).
4. Broyer le tissu de plante en une fine poudre et transférer dans tube résistant aux solvants organiques. Utiliser du tissu jeune et éviter les pédoncules et les veines les plus larges pour un rendement en ADN et une faible contamination en polysaccharides.
5. Ajouter la solution d'extraction CTAB- $\beta$ -Me chaude sur le tissu broyé et mélanger.
6. Incuber 10 à 60 min à 65°C en mélangeant de temps en temps. Le rendement est fonction du temps d'incubation.
7. Extraire l'homogénat avec un volume égal de 24:1 chloroforme/alcool isoamyl.
8. Bien mélanger par retournement. Centrifuger 5 min à 4°C 7500 g. 10 000 rpm en microcentrifugeuse pour des petits échantillons < à 150 mg de tissu de départ.
9. Récupérer la phase aqueuse (phase supérieure).
10. Ajouter 1/10 vol. de la solution CTAB-NaCl à 65°C à la phase aqueuse récupérée.
11. Bien mélanger par retournement. Ajouter 1 vol. égal de chloroforme/alcool isoamyl pour extraire.
12. Mélanger. Centrifuger 5 min à 4°C à 7500g (ou 10 000 rpm si microcentrifugation) et récupérer la phase aqueuse (phase supérieure).

### **Précipitation des ADN**

13. Ajouter exactement 1 vol. de solution de précipitation CTAB.

14. Bien mélanger par retournement. Si la précipitation est visible passer à l'étape suivante. Sinon incuber 30 min à 65°C.

15. Centrifuger 5 min à 500g 4°C (2700 rpm si microcentrifugation). En absence de culot, rajouter de la solution de précipitation CTAB (jusqu'à 1/10 du vol. total), incuber entre 1 h et la nuit à 37°C. Centrifuger 5 min à 500g à 4°C.

16. Enlever mais ne pas jeter le surnageant. Resuspendre le culot dans du tampon TE high-salt (0,5 à 1 ml de TE-high salt par gramme de matériel de départ). Si le culot est difficile à suspendre, incuber 30 min à 65°C. Répéter jusqu'à dissolution.

Lecture au fluorimètre du surnageant et jeter le culot si les AN sont dans le surnageant.

17. Ajouter 0,6 vol. éthanol 100% pour précipiter. Bien mélanger . Centrifuger 15 min 7500g 4°C

18. Laver le culot avec l'éthanol 80%.

19. Sécher et resuspendre dans un volume min de TE (0,1 à 0,5 ml de TE par gramme de matériel de départ).

### **Purification plus approfondie**

20. Protéinase K ou RNase A.

## **Chapitre III : Amplification par PCR**

### **I. Introduction**

En 1983, Kary Mullis, de la Cetus corporation, a conçu une nouvelle technique dont l'utilisation s'est largement répandue pour l'amplification d'un fragment d'ADN sans passer par des cellules bactériennes. Cette technique est la réaction en chaîne de la polymérisation (polymerase chain reaction, ou PCR).

Il existe de nombreux protocoles différents de la PCR destinés à une multitude d'applications différentes et à l'amplification de populations très diverses d'ADN. Il est facile d'adapter l'amplification par PCR aux ARN servant de modèles en les transformant d'abord en ADN complémentaires grâce à la transcriptase inverse (Karp, 2010).

### **II. PCR classique**

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. Chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

La réaction de polymérisation en chaîne comprend :

#### **II.1. L'ADN**

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser. Puis, cet extrait purifié, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

#### **II.2. Les deux amorces**

Ce sont des fragments courts d'ADN généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides, capables de s'hybrider de façon spécifique, par complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Dans la réaction, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

Lorsque vous choisissez une paire d'amorces pour la PCR, les règles de base sont:

- Choisir des amorces qui contiennent environ 50% de GC.
- Concentrer la partie riche en GC à l'extrémité 5'.
- Selon certaines études un T à l'extrémité 3' donne plus souvent d'appariements non spécifiques que les bases A, G ou C.
- Les températures d'appariement des deux amorces doivent être similaires ou identiques. La réaction de PCR a plus de chances de donner des produits spécifiques à des températures élevées, donc, la température d'appariement des amorces ne doit pas être très basse.
- Faire des recherches "BLAST" avec les séquences des amorces contre la banque de données GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

### **II.3. DésoxyriboNucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**

Les dNTPs (Désoxyribonucléosides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la *Taq* polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

### **II.4. Taq polymérase**

L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce. La *Taq* polymérase est extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C, avec une température optimale d'action à 72°C.

### **II.5. Milieu réactionnel**

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la *Taq* polymérase, un tampon et des ions magnésium (MgCl<sub>2</sub>). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

### **II.6. Déroulement de la réaction**

La PCR est une technique automatisée. En effet, la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur (figure 3). L'appareil contient un bloc chauffant où l'on

insère les tubes contenant notre mélange pour la réaction de PCR et où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C.

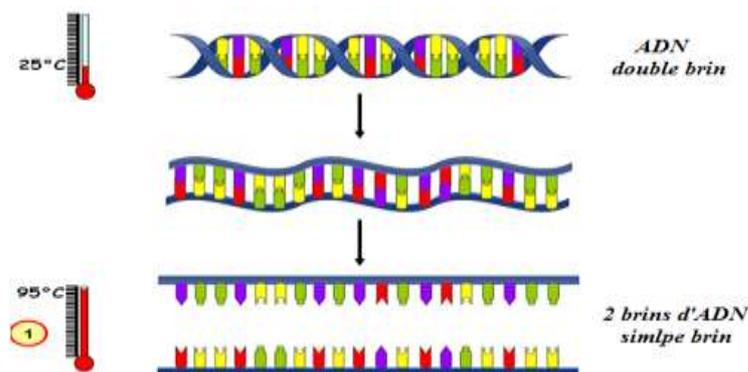
Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces.



**Figure 3 :** Thermocycleur

### **II.6.1. Dénaturation**

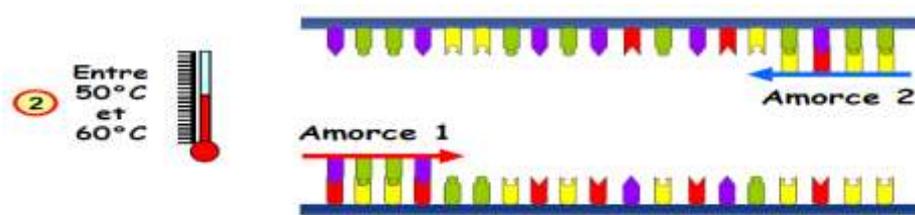
La température dans le tube est réglée à 95°C environ 01min. A ce moment là, l'ADN se dénature. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette température. L'ADN double-brin est dénaturé en deux ADN simple brin (Figure 4).



**Figure 4 :** Etape 1 de la PCR (Dénaturation de l'ADN)

## II.6.2. Hybridation des amorces

Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C environ 50 secondes et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces donc leur température de fusion  $T_m$ . Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN (Figure 5).



**Figure 5 :** Etape 2 de la PCR (Hybridation des amorces)

## II.6.3. Elongation

Puis la température est réglée à 72°C pendant environ 02min, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel (Figure 6). Au cycle suivant de chaque cycle, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN (Figure 7).

En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée.



**Figure 6 :** Etape 3 de la PCR (élongation)

Le nombre de cycles de la PCR est fonction du protocole de PCR. A partir d'une copie d'ADN cible, on pourra donc obtenir 1 milliard de copie d'ADN cible.

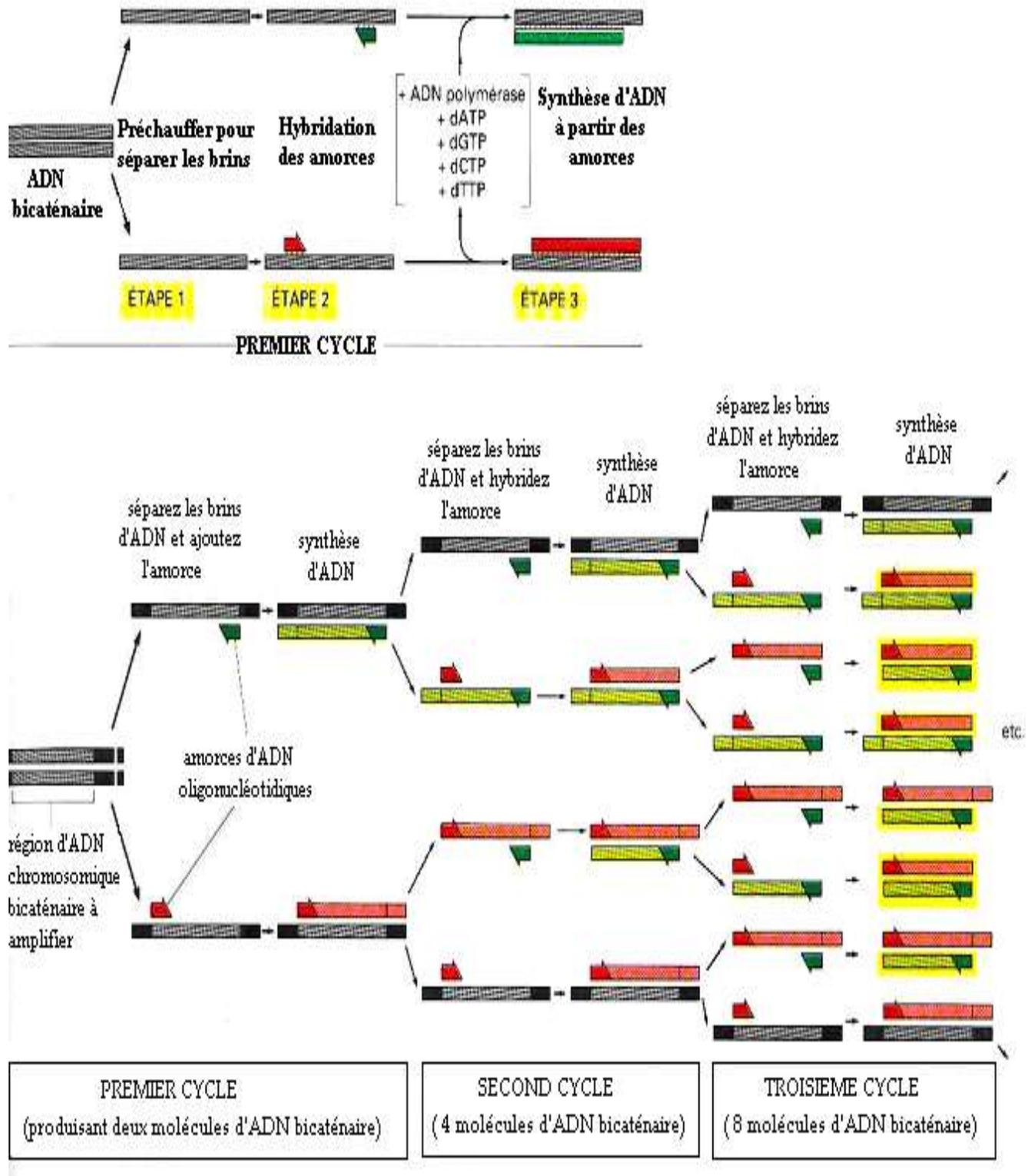


Figure 7 : Déroulement de la réaction de polymérisation en chaîne

## **II.5. Applications de la PCR**

La PCR est très couramment utilisée dans de nombreux domaines:

### **II.5.1. En Bactériologie**

#### **II.5.1.1. Recherche des facteurs de virulence**

Une des stratégies pour l'identification des gènes codant pour des facteurs de virulence est l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés pour l'amplification du gène cible et le séquençage direct du produit de PCR (DOP-PCR pour Degenerated Oligonucleotide Primer-PCR). Cette méthode est notamment bien adaptée à la caractérisation de gènes codant pour des protéines très conservées comme les protéines de stress. Les limites de cette méthode sont que les séquences homologues du gène cible doivent être disponibles dans les banques de données et surtout que ce gène doit être supposé a priori comme étant impliqué dans la virulence.

#### **II.5.1.2. Identification des espèces**

La PCR permet d'identifier une bactérie dans un produit pathologique ou une culture. Le principe sur lequel elle repose consiste à amplifier un gène entier ou non, avec des amorces spécifiques, qui peut être ultérieurement révélé par électrophorèse sur gel ou capillaire, par hybridation, ou encore séquencé et comparé avec des séquences déposées dans des banques de données (par exemple, EMBL, NCBI, BiBi, Genebank). Ainsi, il existe deux principales approches de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) :

- une approche ciblée sur un microorganisme, utilisant des amorces spécifiques ;
- une approche large spectre, en ciblant un gène commun à toutes les bactéries, le gène ARNr 16S, puis séquençage et comparaison aux banques de données pour identifier la bactérie en cause.

Le gène 16S, code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) et est essentiellement utilisé en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries. En effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour le séquençage de ce

gène, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (espèce, genre, famille). Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est fiable : les résultats obtenus par séquençage du gène 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier.

Les avantages des techniques de biologie moléculaire par rapport aux techniques bactériologiques classiques sont un gain de sensibilité, un gain de temps important et/ou un gain de spécificité, pour l'identification des germes inhabituels à partir des cultures.

### **II.5.2. En agroalimentaire**

La PCR est très largement utilisée dans le domaine agroalimentaire :

- ✓ Pour identifier des variétés ou des espèces végétales et animales ;
- ✓ Pour sélectionner de nouvelles variétés de fruits et légumes, comme la tomate ;
- ✓ Pour le contrôle de la qualité des produits agroalimentaires, détecter la présence d'OGM dans un aliment par exemple.

#### **II.5.2.1. Détection d'OGM dans les aliments**

Un OGM est un organisme génétiquement modifié. C'est un organisme dont le patrimoine génétique a été modifié par ajout d'un gène ou plusieurs gènes particuliers, conférant ainsi à l'organisme de nouvelles caractéristiques (par exemple le gène de résistance à un herbicide ou à un parasite). Ces gènes ajoutés sont appelés des transgènes.

Des laboratoires se sont spécialisés dans la recherche d'OGM dans de nombreux produits à la base de notre alimentation (maïs, soja, farine, semoule, gluten, amidons et dérivés, extrait protéique, sirop de glucose, lait de soja, etc ...). Les cibles de la PCR sont les séquences insérées sous forme d'une construction, c'est-à-dire :

- ✓ des promoteurs : le plus utilisé est le 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)
- ✓ un ou plusieurs transgènes, y compris le gène marqueur qui sert à cribler les plantes transformées ;
- ✓ des terminaisons, le plus souvent la séquence NOS, une partie du gène de la nopaline synthétase provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* (Branger et al., 2003)

Après avoir extrait l'ADN des produits ciblés, ils font plusieurs PCR en utilisant différents couples d'amorces spécifiques pour un transgène connu. Si le transgène n'est pas présent dans le produit, les amorces ne s'hybrident pas sur l'ADN et la PCR est négative. Au contraire, si le transgène est présent, il sera détectable par l'obtention d'un produit d'amplification et la PCR est positive.

### **II.5.3. En médecine**

L'utilisation de la PCR dans les laboratoires de diagnostic moléculaire se fait de manière routinière pour diagnostiquer des maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, etc), des infections virales (SIDA, Hépatite C, SRAS), bactériennes (tuberculose) ou parasitaires (toxoplasmose), mais aussi des cancers.

En cancérologie, le but est de détecter des mutations connues dans certains gènes spécifiques du cancer. Cette technique de diagnostic sous-entend que l'on connaisse le gène qui est déficient, les différentes mutations possibles, qui sont alors responsables d'un type de cancer.

Par exemple de nombreuses recherches ont été faites sur le cancer du sein (gènes BRCA1 et BRCA2) (Antoniou et al., 2007), de la prostate ou de la thyroïde. On sait maintenant que les mutations dans le gène BRCA1 sont les plus fréquentes et prédisposent à la majorité des cancers familiaux du sein et de l'ovaire. Les mutations du gène BRCA2 sont plus fréquentes dans les populations anglo-saxonnes et nordiques. La recherche de mutations dans ces gènes se fait dans le cadre de dépistage de cancer dans des familles à risque, sinon cela revient beaucoup trop cher.

En effet, après extraction de l'ARNm à partir du sang prélevé sur le patient, puis d'une étape de reverse transcription de cet ARNm en ADN dit complémentaire on peut faire une PCR pour détecter la présence de ce marqueur de tumeur ARN. Cette technique utilise, avant l'étape de PCR, une enzyme capable de transcrire l'ARN en ADN comme le fait la reverse transcriptase du virus de SIDA. Cette technique est pour le moment très peu utilisée en routine, car elle est difficile à mettre au point.

#### **II.5.4. En Histoire**

L'ADN prélevé sur des restes anciens de plantes et d'animaux est appelé ADN fossile. En général, l'extraction d'ADN fossile pose de nombreux problèmes. L'ADN fossile est un matériel très fragile et soumis à différentes contraintes environnementales, qui a pour conséquence sa dégradation.

Mais l'ADN peut-être sauvegardé dans différents tissus. L'ADN est extrait à partir de tissus mous issus de restes momifiés ou de spécimens naturalisés (Ludes et al, 1994). La conservation des tissus mous peut résulter de processus naturels comme la congélation en milieu froid (dans le cas d'Otsi, l'homme des glaces, retrouvé dans les Alpes à la frontière entre l'Italie et l'Autriche) ou la dessiccation dans les déserts chauds et secs. Les tissus mous peuvent aussi être conservés de façon artificielle (momies, spécimens conservés dans l'alcool). Il est également possible aujourd'hui d'extraire de l'ADN à partir de tissus durs (os et dents) (Hänni, 1994).

#### **II.5.5. En médecine légale**

La médecine légale a fait un bond de géant depuis l'avènement de la technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne. En effet en criminalistique l'ADN est le plus souvent retrouvé dans les scènes de crime en très faible quantité ou en état de dégradation. La quantité de cet ADN peut être considérablement amplifiée par PCR permettant son analyse afin :

- d'identifier une des individus suspects par l'analyse d'un certain nombre de marqueurs polymorphes (empreinte génétique), dans le cadre d'une enquête judiciaire (Doutremepuich *et al.*, 2003).
- d'effectuer des recherches de paternité ou de maternité (Mansuet-Lupo *et al.*, 2007).
- d'identifier les victimes de catastrophes de différentes origines (Ponseel *et al.*, 2011).

### **III. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)**

La RT-PCR se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé (Figure 8).

Dans la première phase, l'ARN messenger à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme de ADNc simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension. L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique.

La technique RT-PCR a permis de montrer que la transcription de tous les gènes s'effectuait dans tous les tissus et ceci même pour les gènes qui présentent une très grande spécificité tissulaire. On parle dans ces conditions de transcription illégitime. Il est évident qu'avant les techniques d'amplification génique, la sensibilité des méthodes classiques n'avait pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

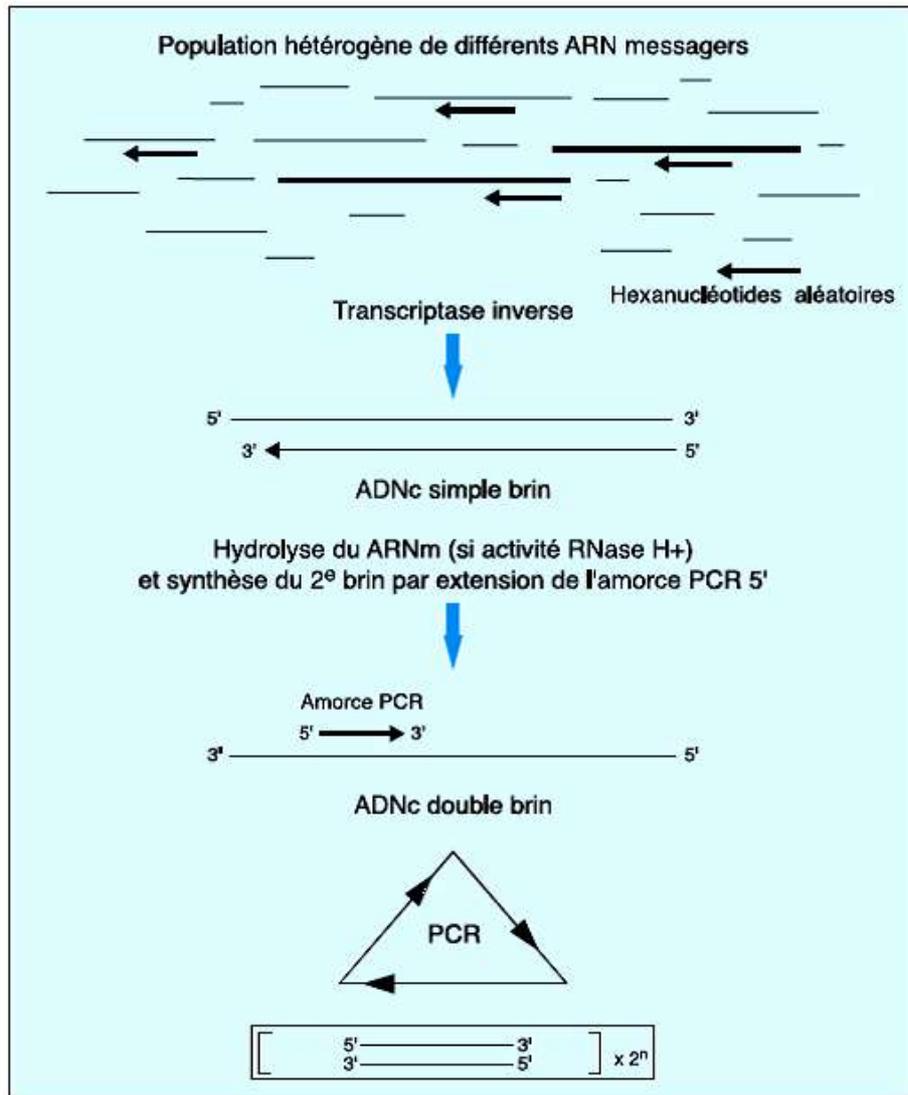


Figure 8 : Reverse-transcriptase PCR

#### IV. PCR quantitative en temps réel

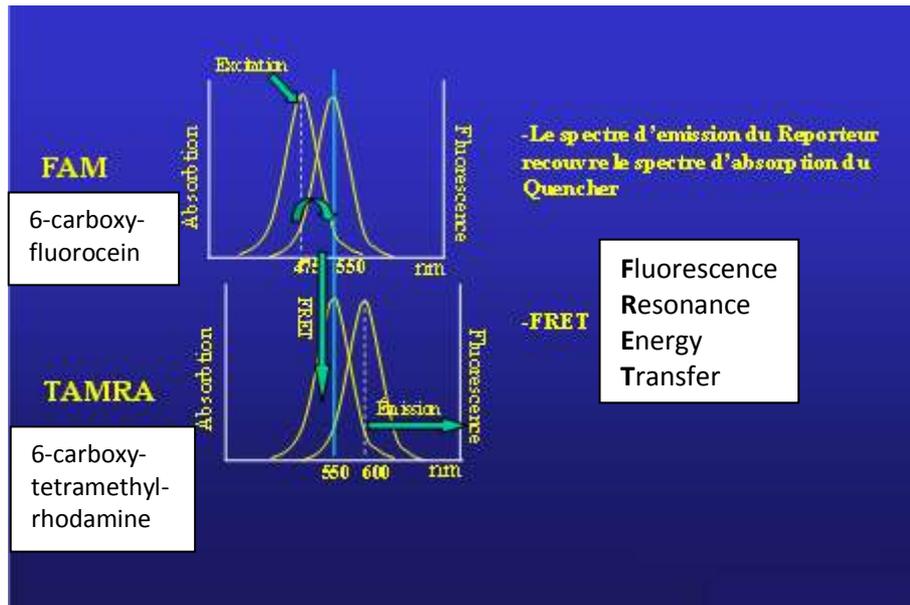
Cette technique permet d'estimer la quantité d'ADN présente dans un échantillon et renseigne également sur son état de dégradation ainsi que sur la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR.

##### IV.1. Principe de la méthode

La technologie de la PCR en temps réel détecte et mesure l'accumulation du produit amplifié au cours de l'amplification. Cette technologie mesure de manière précise la quantité initiale de la cible. Plusieurs chimies de détection existent : elles utilisent soit des molécules se liant à l'ADN (SYBR® Geen I), soit des sondes moléculaires spécifiques de la cible amplifiée (TaqMan®, Molecular Beacon,...).

Les résultats sont enregistrés et analysés par un logiciel sous forme de graphes d'amplification, de tableaux de données et de rapports (Joëlle Broutin, 2007).

Les sondes Taqman sont des oligonucléotides à l'extrémité 5'P desquels est attaché un groupe fluorescent émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocein), et, à l'extrémité 3'OH, un groupe supprimeur qui absorbe la fluorescence du premier (quencher), (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) (Figure 9).

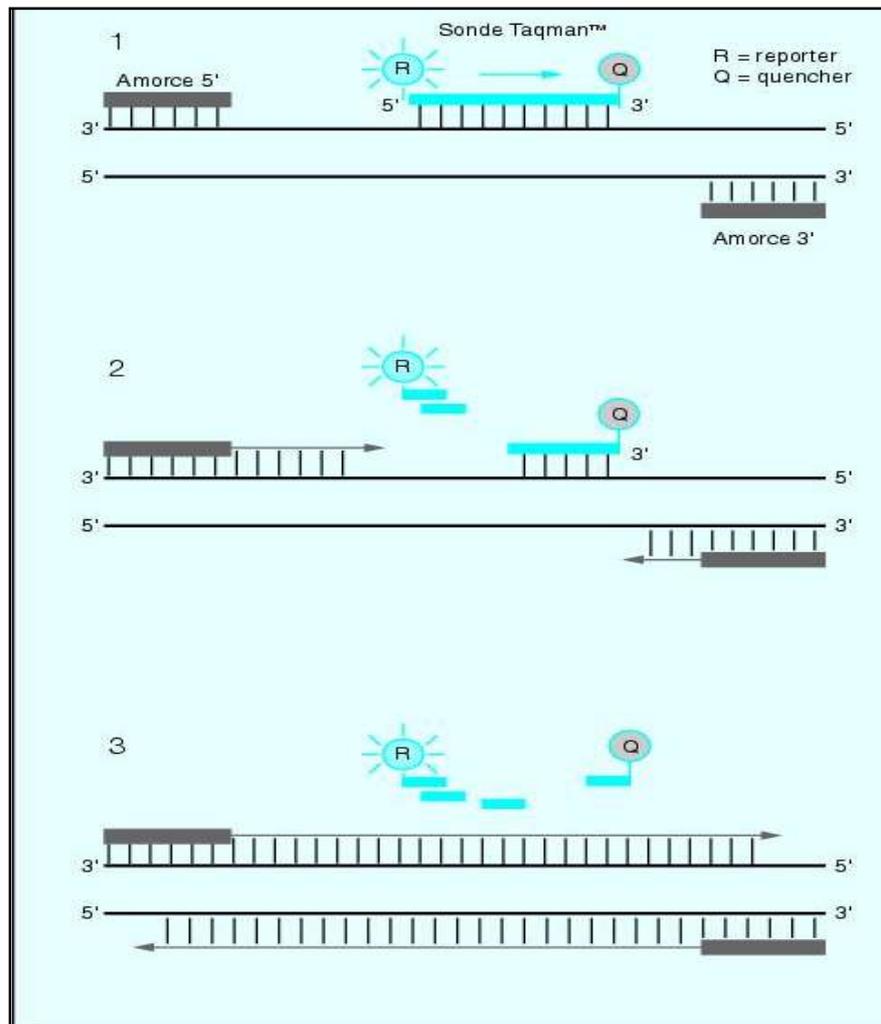


**Figure 9:** Mécanisme de quenching

La quantification de l'ADN combine deux analyses, la première cible l'ADN humain et la seconde est un contrôle interne de la PCR (IPC : Internal PCR control). L'analyse de l'ADN humain nécessite deux amorces pour l'amplification, et une sonde TaqMan®MGB marqué avec le fluorochrome FAM pour la détection du produit amplifié. La cible de cette sonde est le gène de la reverse transcriptase de la télomérase humaine (hTERT : Human Telomerase reverse transcriptase gene) localisé au niveau de 5p15.33.

Le contrôle interne de la PCR, consiste en une séquence d'ADN synthétique inexistante dans la nature, deux amorces pour son amplification, et une sonde TaqMan®MGB marquée avec le fluorochrome VIC pour la détection du produit amplifié. La sonde TaqMan®MGB contient un groupe reporter (FAM ou VIC) à l'extrémité 5'P, à l'extrémité 3'OH, un supprimeur de fluorescence NFQ (non

fluorescent quencher) et un groupement (MGB : minor groove binder), cette modification augmente la température de fusion  $T_m$ . Lorsque stimulé et stabilise la sonde, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. La sonde s'hybride à un site de la séquence-cible situé en aval de celui d'une des amorces. Pendant l'élongation de l'amorce, l'activité nucléase de 5'P vers 3'OH de la polymérase Taq clive la sonde et sépare le groupe fluorescent rapporteur du groupe suppresseur, ce qui provoque une augmentation du signal. L'activité nucléase dégrade la sonde, permettant ainsi à la polymérisation de se poursuivre jusqu'à l'extrémité du brin cible (Figure 10).

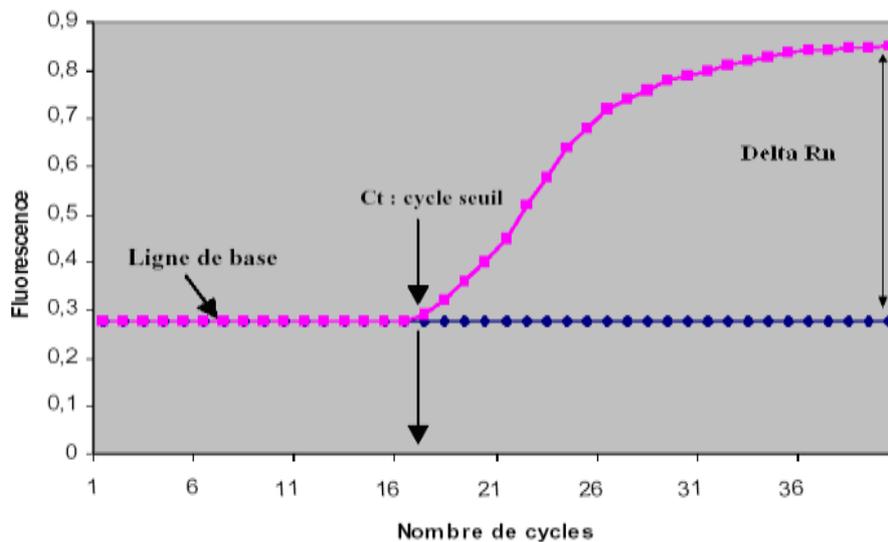


**Figure 10:** Principe de la sonde Taqman

Des molécules fluorescentes sont détachées de leurs sondes à chaque nouveau cycle, ce qui génère un accroissement d'intensité de la fluorescence proportionnel à la quantité d'ADN amplifié. Le marqueur fluorescent ROX™ permet de normaliser les variations de fluorescence non reliées à la PCR (fluorescence des plaques ou tubes, contamination du bloc PCR,...)

### III.1. 1. Principe du Ct

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représente la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaît au début de la phase exponentielle (figure 11). Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la productivité de la technique.



**Figure 11:** Le cycle seuil (threshold cycle Ct)

### III.1.2. Préparation de la gamme standard

Il faut d'abord réaliser une série de dilutions, allant par exemple de 50ng/μl jusqu'à 0,023ng/μl à partir d'un ADN standard de 200 ng/μl selon le tableau suivant :

**Tableau II:** Préparation de la gamme standard pour la PCR temps réel

Standard	Concentration ng/ $\mu$ l	Dilution	Facteur de dilution
Std.1	50	10 $\mu$ l (200ng/ $\mu$ l AND)+ 30 $\mu$ l Tampon T10E0.1	4X
Std.2	16,7	10 $\mu$ l std.1 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.3	5,56	10 $\mu$ l std.2 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.4	1,850	10 $\mu$ l std.3 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.5	0,62	10 $\mu$ l std.4 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.6	0,21	10 $\mu$ l std.5 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.7	0,068	10 $\mu$ l std.6 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X
Std.8	0,023	10 $\mu$ l std.7 +20 $\mu$ l Tampon T10E0.1	3X

### III.1. 3. Courbe standard

La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard (Figure 12). La droite obtenue présente une pente (P) de -3,045935, qui est une valeur correct du fait qu'elle est incluse dans l'intervalle [-2,9, -3,33], et un facteur de corrélation supérieur à 0.98 ( $R^2 = 0.998665$ ) :

Une pente de 3.32 représente une efficacité de 100% ( $E = 2$ ) ( $1+Eff$ ).

Une pente de 3.4 représente une efficacité de 97% ( $E = 1.9$ )

Une pente de 3.5 représente une efficacité de 93% ( $E = 1.9$ )

Une pente de 3.6 représente une efficacité de 90% ( $E = 1.9$ )

Une pente de 3.7 représente une efficacité de 86% (E = 1.9)

Une pente de 3.92 représente une efficacité de 80% (E = 1.8)

$$E = 10^{(-1/P)} - 1.$$

Le nombre de copie à chaque cycle est calculé par la formule :

$$y = x ( 1+E ) ^ n$$

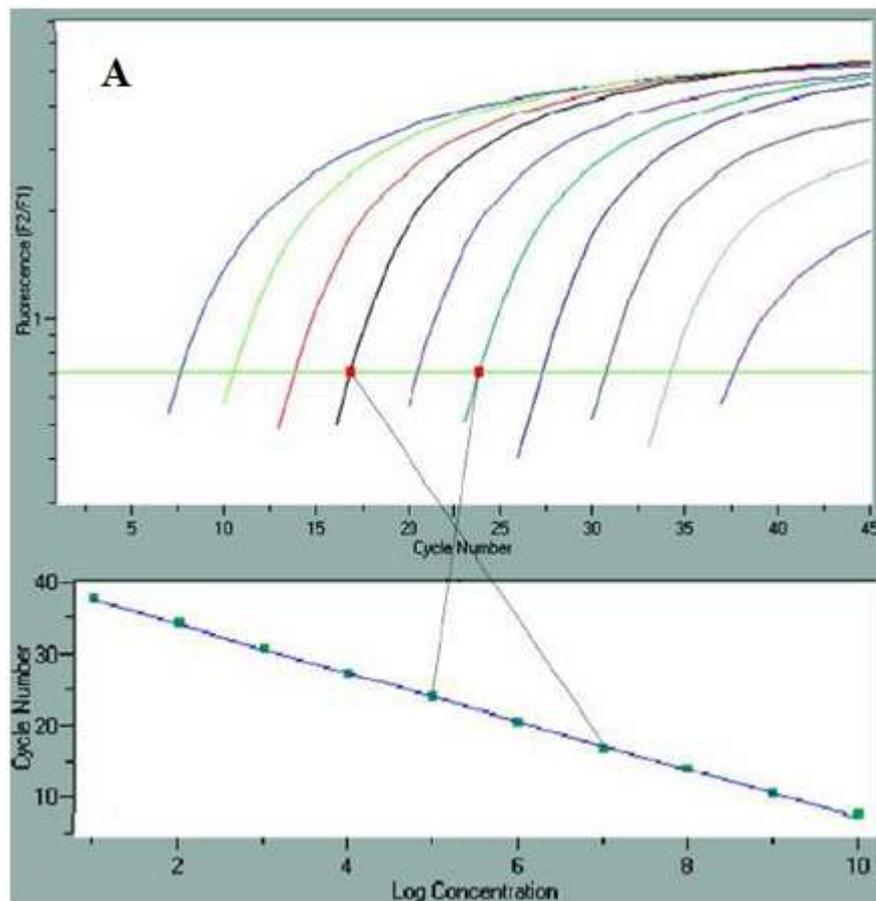
Où y = nombre de copie, x = nombre de copie initiale

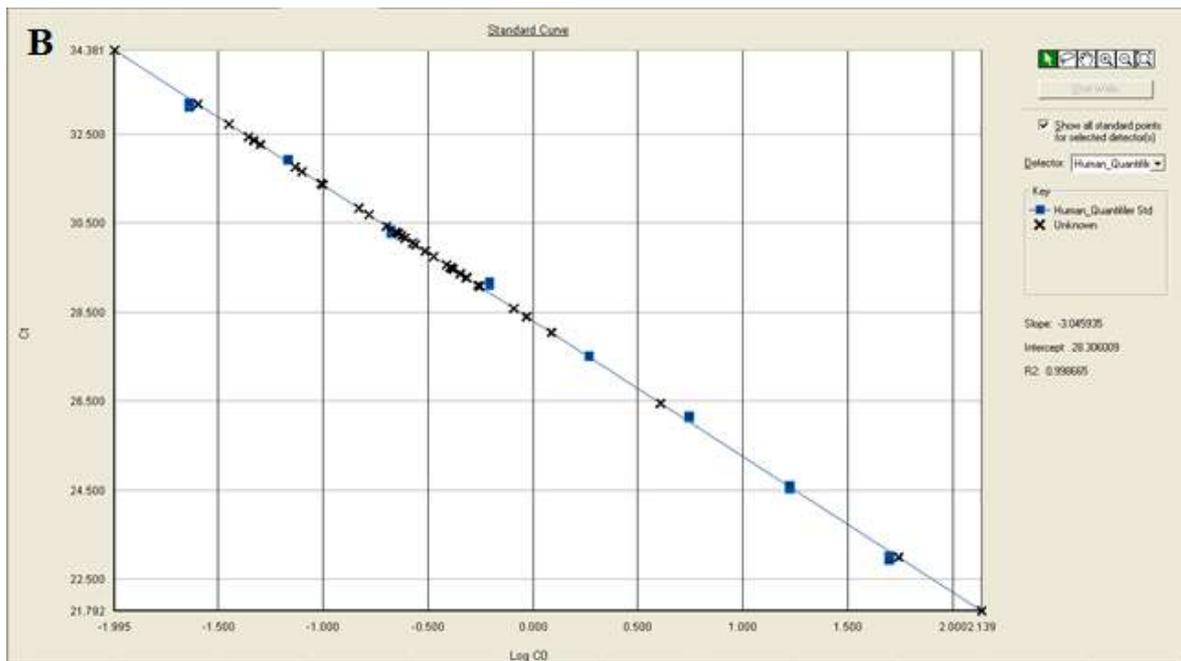
E = efficacité

n = nombre de cycles

Si l'efficacité de la PCR est de 100%, l'équation devient :

$$y = x . 2^n$$





**Figure 12:** Courbe standard tracée à partir du Ct en fonction du logarithme décimal de la quantité d'ADN dans les différentes dilutions.

### III.1. 4. Echantillon inconnu

Le Ct obtenu à partir d'un échantillon inconnu ( $Ct_i$ ) permettra, lorsqu'il sera reporté sur le droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon.

## Chapitre IV : marquage des acides nucléiques

Certains types d'expériences (Southern, northern, hybridation *in situ*, ...) nécessitent de visualiser une hybridation. Pour cela, il est nécessaire de marquer un acide nucléique (ADN ou ARN simple brin) qui prendra le nom de sonde.

### I. Marquage radioactif

On dispose de plusieurs isotopes radioactifs qu'on pourra incorporer dans la sonde (Tableau III).

**Tableau III:** Isotopes radioactifs utilisés pour le marquage des acides nucléiques

Isotope	demi-vie	énergie
$^{32}\text{P}$ $\beta^-$	14,3 jours	1.7 MeV
$^{35}\text{S}$ , $\beta^-$	87.2 jours	0.17 MeV
$^{14}\text{C}$ , $\beta^-$	5700 ans	0.16 MeV
$^3\text{H}$ , $\beta^-$	12.3 ans	0.02 MeV

Le soufre n'est normalement pas présent dans les acides nucléiques mais comme il est proche de l'oxygène on peut faire des analogues soufrés des nucléotides dans lesquels un oxygène est remplacé par un soufre. Le choix de l'isotope dépendra de l'utilisation de la sonde. On emploiera un rayonnement fort pour une détection sur un filtre, et un rayonnement moins énergétique pour une détection en microscopie.

La détection des radioisotopes peut se faire de plusieurs manières :

- en utilisant un compteur à scintillation,
- par radioautographie (film sensible ou émulsion)
- par un scanner spécial, le phosphoimager.

## I.1. Les différentes techniques de marquage radioactif

Les méthodes enzymatiques sont les plus employées, on incorpore le nucléotide modifié à l'aide d'une enzyme.

### I.1.1. Marquage interne

Marquage de l'ADN. Deux méthodes peuvent être utilisées, le déplacement de coupure et l'amorçage aléatoire.

#### I.1.1.1. Déplacement de coupure (ou nick translation)

Un fragment d'ADN est digéré par la DNase I de *E. coli* qui coupe après les pyrimidines, mais d'une façon ménagée de façon à ne faire que quelques coupures au hasard sur le fragment (figure 13). Ces coupures sur un seul des brins sont appelées des nicks, elles libèrent des extrémités 5' OH à l'intérieur du fragment. On utilise ensuite l'ADN polymérase I d'*E. coli* qui présente plusieurs activités dont une activité 5'-3' exonucléase et une activité 5'-3' polymérase. (Il y a en plus une activité 3'-5' exonucléase moins rapide que l'activité polymérase en présence de nucléotides). Les deux brins sont ainsi marqués sur toute leur longueur à l'exception de leur extrémité 5'.

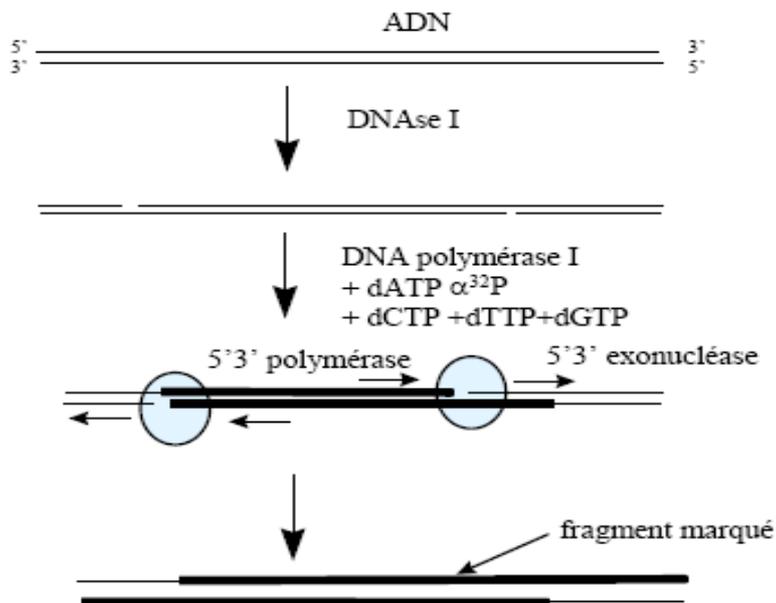
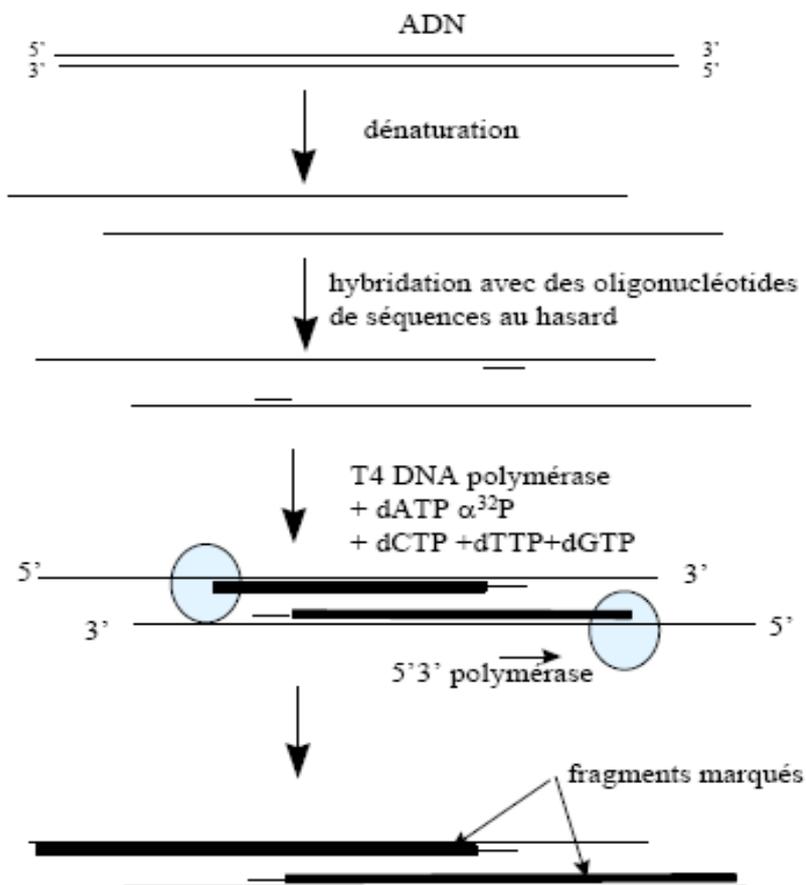


Figure 13: Marquage interne par déplacement de coupure

La difficulté de cette méthode est de réaliser la digestion ménagée pour initier la polymérisation. Si la digestion est trop forte, il y a trop de nick, certains se trouvent à proximité l'un de l'autre sur les deux brins et on obtient uniquement des petits morceaux d'ADN, si elle est trop faible, un grand nombre de molécules ne sont pas marquées. De plus l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I attaque le fragment d'ADN par l'extrémité et on obtient un raccourcissement du fragment (Popescu, 1998). Cette méthode « historique » n'est plus utilisée et a été remplacée par le « Random priming ».

### **I.1.1.2. Marquage par amorçage aléatoire (Random priming)**

Un mélange d'hexanucléotides de séquence aléatoire est utilisé comme source d'amorces pour la synthèse in vitro à partir d'une molécule d'ADN bicaténaire préalablement dénaturé par la chaleur (figure 14).



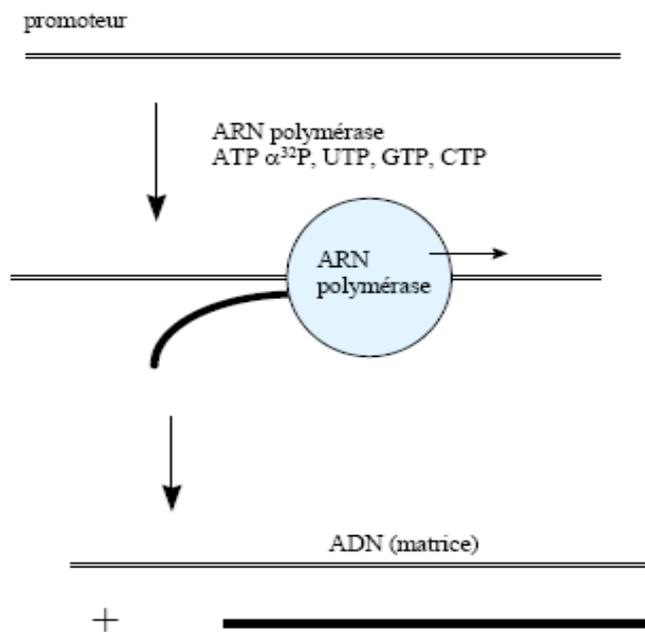
**Figure 14:** Marquage par amorçage aléatoire

Si le mélange d'haxanucléotides est suffisamment hétérogène, il se forme des hybrides sur n'importe quelle séquence de l'ADN matrice rendu monocaténaire. Ces structures hybrides servent de point d'ancrage à une ADN polymérase (le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* ou de plus en plus souvent une *Taq* polymérase) qui copie le brin complémentaire. L'utilisation de nucléotides marqués permet la synthèse d'une molécule d'ADN radioactive. Les sondes obtenues ont une radioactivité spécifique très élevée de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{10}$  cpm/ $\mu$ g (Tagu et Moussard, 2003).

Dans les deux cas, les deux brins sont marqués et la sonde est double brin. Il faudra donc la dénaturer avant de s'en servir dans une hybridation.

### I.1.1.3. Sondes ARN

Pour obtenir une sonde spécifique d'un seul brin on utilisera plutôt une sonde ARN synthétisée *in vitro*. Pour réaliser une transcription *in vitro*, on aura besoin d'un ADN linéaire double brin servant de matrice positionné en aval d'un promoteur, d'une ARN polymérase reconnaissant ce promoteur, de nucléotides dont un est marqué en  $\alpha$  (figure 15).



**Figure 15** : Marquage interne de l'ARN

Le promoteur peut être présent dans un vecteur ou placé en amont du fragment à marquer par PCR.

Le nucléotide marqué est généralement en quantité limitante, à une concentration de l'ordre de 3 à 5  $\mu\text{M}$  ce qui a pour effet de ralentir la polymérisation. Ce ralentissement n'est pas important sauf pour les 8-12 premières bases. Pour obtenir un bon rendement on placera en début de transcription une séquence dépourvue de A si on utilise de l'UTP marqué.

Cette méthode de marquage donne de meilleures sondes que la méthode d'amorçage au hasard. En effet l'ADN matrice peut être éliminé à l'aide d'une DNase à la fin de l'expérience. Il n'y a donc qu'un seul brin si bien que la sonde n'a pas tendance à s'hybrider sur elle-même. L'inconvénient est qu'il s'agit d'ARN et l'ARN est plus difficile à manipuler que l'ADN (il est facile d'éliminer les DNases par un traitement thermique, par contre la plupart des RNases sont thermostables et il est difficile de les éliminer).

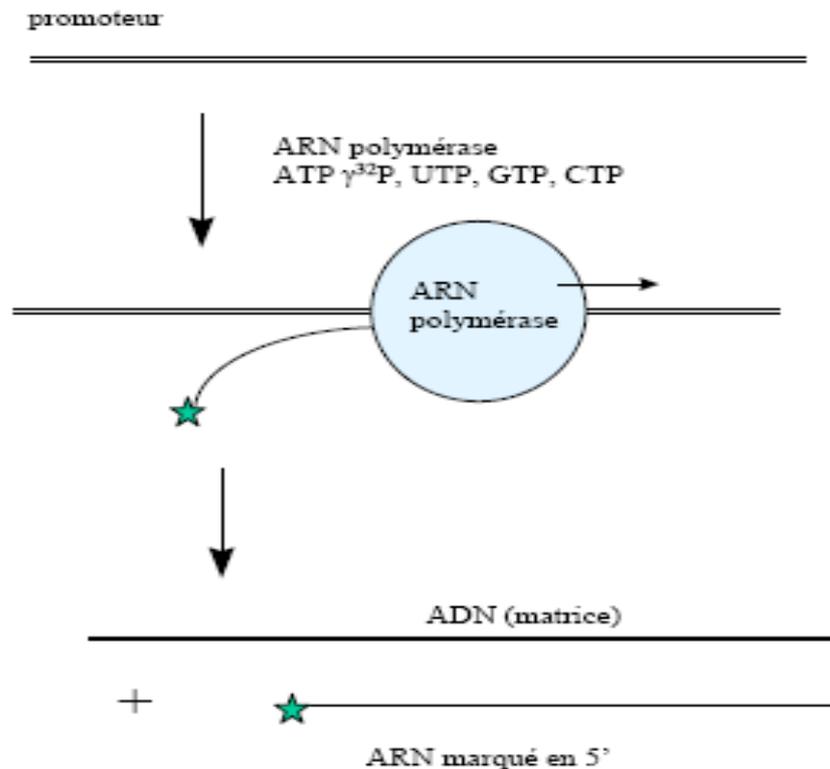
### **I.1.2. Marquage aux extrémités**

Dans certains cas on a besoin que la sonde soit marquée uniquement à une extrémité. On peut marquer soit l'extrémité 5', soit l'extrémité 3'. Ce type de marquage est utilisé pour les petites molécules de quelques dizaines de nucléotides, comme un oligonucléotide. Cette technique est également utile lorsqu'on désire une polarité du marquage comme pour les empreintes à la DNase I. La limite de ce marquage est l'introduction d'un seul atome marqué par molécule d'ADN, d'où une activité spécifique assez faible (Tagu et Moussard, 2003). C'est la seule méthode de marquage utilisable pour les oligonucléotides, ils sont en effet trop petit pour envisager un marquage interne.

#### **I.1.2.1. Marquage en 5' des ARN par polymérisation**

La première base des ARN est généralement une adénine. Lorsqu'une transcription est effectuée *in vitro* en présence de  $\gamma\text{ATP}^{32}\text{P}$  (ou  $\beta\text{ATP}^{32}\text{P}$ ), le seul A marqué sera celui qui est en 5'. Les autres adénines incorporées dans l'ARN

néosynthétisé ne seront pas marquées, puisque seul le phosphate en  $\alpha$  restera dans le polymère (Figure 16).



**Figure 16** : Marquage en 5' de l'ARN

### I.1.2.2. Marquage en 5' des acides nucléiques

A partir d'une extrémité 5'OH, un phosphate marqué est ajouté à l'aide de la T4 Polynucléotide kinase et de  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP. Il faudra au préalable obtenir l'acide nucléique avec un 5'OH. Pour les oligonucléotides synthétisés chimiquement, la synthèse s'effectue de 3' vers 5' et l'extrémité 5' est OH. Aucun traitement préliminaire n'est alors à faire. Pour les ADN obtenus par digestion par une endonucléase de restriction, l'extrémité est 5' phosphate. Ce phosphate peut être éliminé à l'aide d'une phosphatase laissant une extrémité 5'OH. La phosphatase est par la suite détruite (chauffage, extraction phénolique par exemple), avant de faire agir la T4 PNkinase sur le produit de la réaction.

Pour les ARN messagers eucaryotes qui ont un cap en 5', il faut détruire ce cap, par action d'une pyrophosphatase puis laisser agir la phosphatase sur le phosphate restant. Cette méthode est généralement employée pour les

oligonucléotides pour lesquels les marquages internes ne sont pas possibles du fait de leur petite taille.

### **I.1.2.2. Marquage en 3' des acides nucléiques**

Dans le but d'effectuer un marquage en 3' des acides nucléiques, un ou plusieurs nucléotides sont ajoutés à l'extrémité 3' de la sonde. Pour les ARN, une ARN ligase est utilisée en présence d'un nucléotide monophosphate et d'ATP source d'énergie. Le nucléotide sera ajouté en 3' OH. Un nucléotide avec une extrémité 3' bloquée par exemple par un phosphate pour permettre l'ajout d'un seul nucléotide. Pour les ADN, une deoxynucléotidyl terminal transférase peut être utilisée avec un  $\alpha$   $^{32}\text{P}$  nucléotides. Il y a alors ajout de plusieurs nucléotides en 3'. Un didésoxynucléotide marqué à la place d'un désoxynucléotide bloquera la polymérisation après l'ajout du premier nucléotide, évitant l'ajout de plusieurs nucléotides.

Une autre méthode consiste à utiliser l'activité terminale transférase des polymérases. La plupart des polymérases présente en effet une activité terminale transférase lorsqu'elles ont comme matrice un ADN double brin. Comme l'activité est spécifique du double brin, un seul nucléotide est rajouté en 3' même un desoxynucléotide est utilisé (en effet ensuite la matrice devient simple brin). C'est une adénine qui est préférentiellement ajoutée, donc le marquage est effectué avec du dATP  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ .

## **II. Marquages non radioactif**

De plus en plus, les nucléotides radioactifs sont remplacés par des nucléotides marqués à l'aide de molécules non radioactives (d'où le terme de « sondes froides » par opposition aux « sondes chaudes »). Différents types de marquage existent, avec parfois une sensibilité de détection supérieure à celle des sondes radioactives, notamment grâce à l'utilisation de fluorochromes. Les différentes molécules associées aux nucléotides sont, entre autres, la digoxigénine, la biotine et la fluorescéine ou tout autre fluorochrome. Les principes de marquage sont les mêmes que ceux décrits précédemment ; seules les techniques de détection diffèrent d'un type de marquage froid à l'autre. Par exemple, la digoxigénine est détectée à l'aide

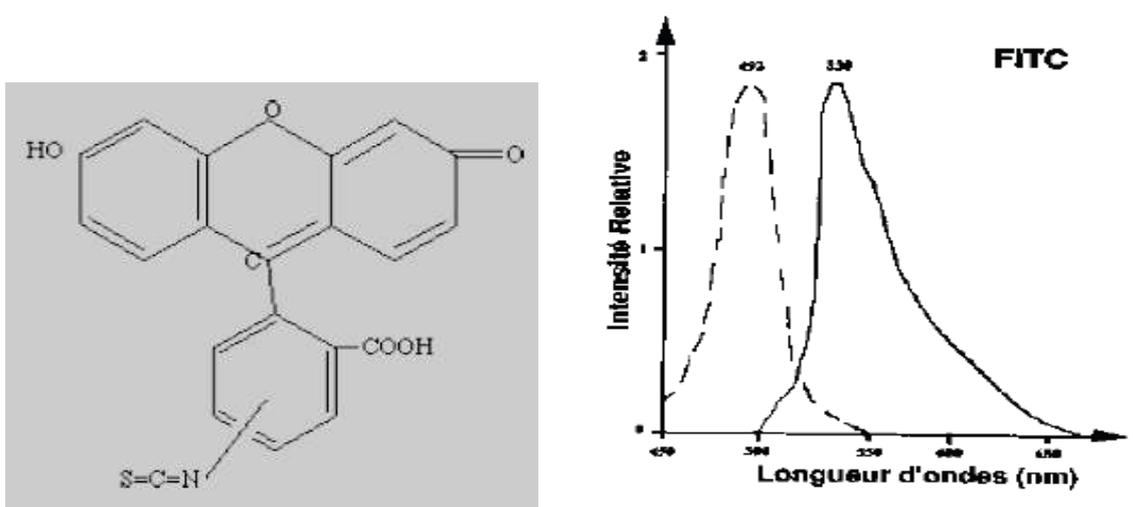
d'anticorps spécifiques et la biotine à l'aide de la streptavidine (Tagu et Moussard, 2003).

## II.1. Marquage par fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée. Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer sous forme de lumière fluorescente. De nombreux fluorophores sont disponibles commercialement (La Fluorescéine, le Vert Oregon, la Rhodamine, le Rouge Texas, le Bodipy, la Cyanine et ses dérivés...).

### II.1.1. Fluorescéine et dérivés

La fluorescéine ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ) est une substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui-même relié à un acide benzoïque (figure 17). Cette substance dérivée du xanthène, acide, verte-fluorescente par réflexion de la lumière du jour, émet une lumière réfléchie de fluorescence lorsqu'elle est excitée sous les ultraviolets. La fluorescéine permet d'obtenir un marquage fluorescent vert.



Excitation : 495nm      Emission : 525 nm

**Figure 17 :** Structure de la fluorescéine

Le principe de fluorescence est utilisé, entre autres, dans les microscopes confocaux à balayage laser, les microscopes à fluorescence et les spectrofluoromètres

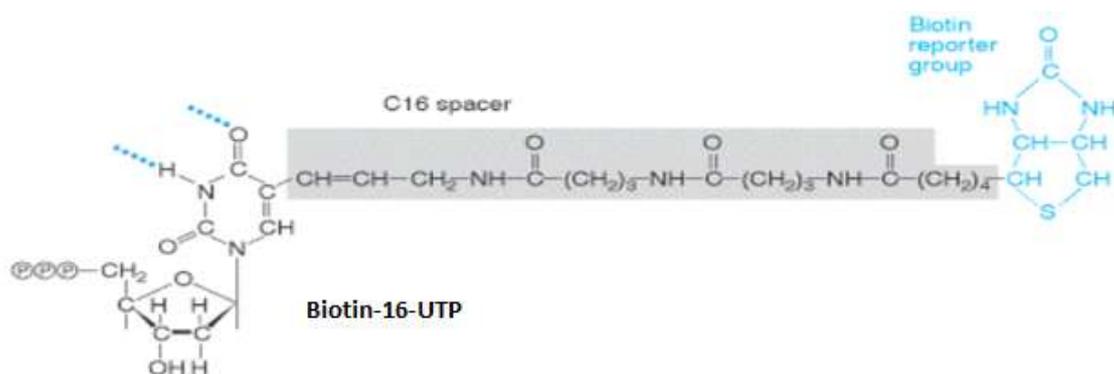
### II.1.2. Marquage à la biotine et à la digoxigénine

Le radical libre du nucléotide est substitué par la digoxigénine ou la biotine attachée au bout d'une chaîne carbonée de longueur variable selon le fabricant. La digoxigénine et la biotine sont révélées par un système d'amplification de type immunochimique.

#### II.1.2.1. La biotine

La biotine (La vitamine B<sub>8</sub> encore souvent appelée vitamine H), est une vitamine hydrosoluble. La biotine est une coenzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub>. On la trouve notamment dans les céréales complètes, le foie, les œufs et le lait. Elle est souvent utilisée en biochimie expérimentale du fait de son affinité très élevée pour la streptavidine ainsi que pour l'avidine.

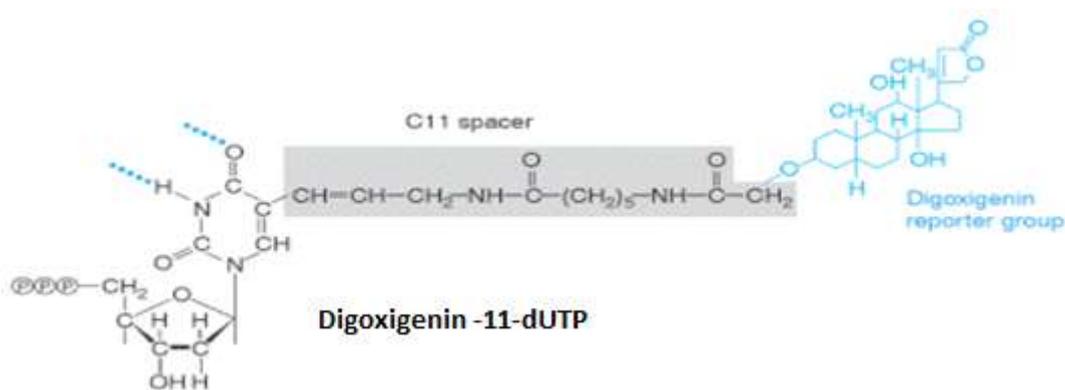
La biotine (Figure 18) se lie étroitement à la protéine tétramère avidine (ou streptavidine isolé de la bactérie *Streptomyces avidinii*), avec une constante de dissociation K<sub>d</sub> de l'ordre de 10<sup>-15</sup> moles/L, qui est l'une des plus connue des interactions non covalente protéine-ligand.



**Figure 18:** Biotine conjuguée à l'UTP.

### II.1.2.2. La digoxigénine

La digoxigénine (DIG) est un stéroïde naturellement présent dans les inflorescences et les feuilles de certaines digitales telles que *Digitalis purpurea* ou *Digitalis lanata*. La taille relativement petite de cette molécule et la facilité avec laquelle elle peut être liée à des molécules biologiques, ainsi que la disponibilité d'anticorps ciblant cette molécule en font un outil utile en biologie moléculaire et en biochimie. La digoxigénine est conjuguée à un nucléotide, le plus souvent à de l'uridine triphosphate (figure 19), qui peut être incorporée par les ARN et ADN polymérase lors de la synthèse *in vitro* de brins complémentaires (dans le cas d'ADN polymérase, le DIG-UTP s'incorpore à la place de la désoxythymidine).



**Figure 19:** Digoxigénine conjuguée à l'UTP

La digoxigénine révélée par un anticorps anti-digoxigénine couplés à une activité enzymatique facilement détectable: Phosphatase alcaline ou peroxydase par exemple.

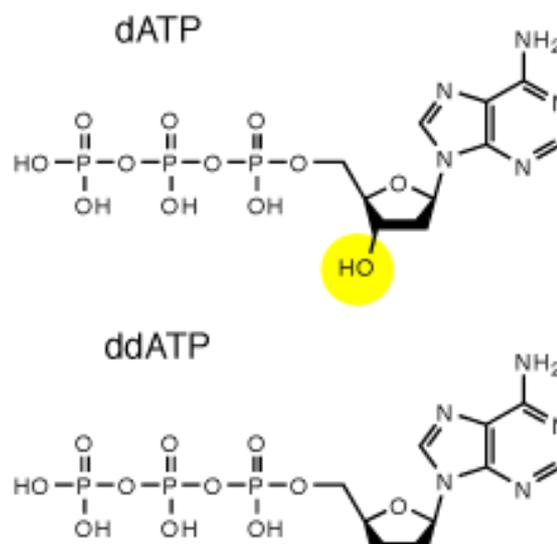
## Chapitre V : Séquençage de l'ADN

Le séquençage est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Il est devenu indispensable dans les domaines de la recherche de base, de la biotechnologie, de la médecine légale et du diagnostic médical. Le séquençage permet donc, d'expliquer et guérir les maladies génétiques, de détecter les agents infectieux, d'étudier l'évolution, d'étudier la spéciation, de lier le protéome au génome, d'étudier l'épissage...etc.

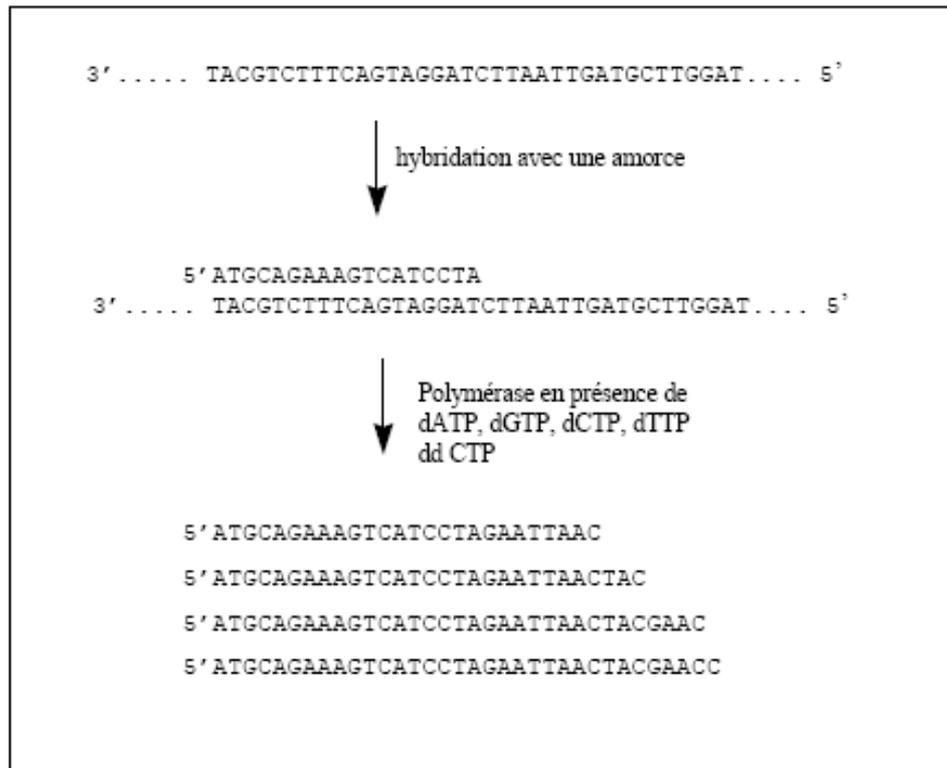
### I. Méthode enzymatique ou méthode de Sanger

La première étape de cette technique est l'obtention d'un ADN simple brin. L'ADN double brin est dénaturé par la chaleur ou par un traitement à la soude. La deuxième étape est l'hybridation d'une amorce sur l'ADN simple brin. La troisième étape est la polymérisation du brin complémentaire.

Le principe consiste à ajouter des didéoxynucléotides (ddNTP) aux désoxyynucléotides lors de la polymérisation. Ainsi, si on ajoute du ddATP, aux dNTP, la polymérisation s'arrêtera lorsque la polymérase ajoutera un ddATP, mais continuera lorsqu'elle ajoutera un dATP. On aura donc une série de molécules s'arrêtant toutes à un A, ces molécules seront plus ou moins longues.



Parallèlement, dans trois autres tubes on ajoutera aux dNTP du ddCTP, du ddTTP ou du ddGTP. On obtiendra ainsi des molécules s'arrêtant soit aux C soit aux T soit aux G en fonction du ddNTP utilisé.



Dans les quatre tubes on a donc des molécules dont la taille dépend de la séquence. La séparation peut être réalisée sur un gel d'électrophorèse en condition dénaturante de façon à ne voir que les molécules néosynthétisées.

La quantité d'ADN est faible et ne peut donc pas être directement visible sur le gel. Aussi pour le détecter, on marque le brin synthétisé en ajoutant un nucléotide radioactif lors de la polymérisation.

La plupart des ADN polymérases catalysent l'addition des ddNTP à environ 0.02 -0.1 % de la vitesse d'incorporation des dNTP. La T7 DNA polymérase est une exception. Elle incorpore les ddNTP plus efficacement, avec un taux de 20 % comparé aux dNTP.

Les ADN polymérases de la famille de l'ADN polymérase I de E. coli ne sont que peu processives et n'ajoutent à chaque évènement qu'une vingtaine de nucléotides. L'ADN polymérase T7 est, elle aussi peu processive, mais cette processivité est augmentée en ajoutant de la thioredoxine qui se complexe à cette

polymérase. Ce complexe ADN polymérase T7 -thiorédoxine a été nommé Sequenase.

A partir de cette technique, plusieurs variantes ont été développées :

a) Le marquage, à l'origine radioactif, peut aussi être fluorescent. On peut utiliser une amorce fluorescente (méthode du « dye primer »). La réaction est toujours faite dans quatre tubes différents. Pour chaque ddNTP on utilise une amorce marquée avec un fluorophore différent. Les réactions sont chargées sur un gel et les bandes sont détectées par un laser. On peut utiliser des ddNTP fluorescents (méthode du «dye terminator ») (Figure 20). Dans ce cas les réactions se font toutes dans le même tube. L'avantage de cette méthode par rapport au marquage de l'amorce est qu'on peut utiliser n'importe quelle amorce pour la réaction de séquence sans avoir à la modifier au préalable.

b) Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer la longueur des brins. A l'origine la détection se faisait après migration sur gel d'électrophorèse, on peut utiliser d'autres techniques comme l'électrophorèse capillaire ou la spectrométrie de masse.

c) Dans certains cas on observe des "compressions de bandes" qui sont dues à des structures secondaires intra-chaîne et qui ne sont pas complètement dénaturées lors de l'électrophorèse. La présence de ces compressions peut être diminuée en utilisant des analogues de nucléotides durant la polymérisation. Le 7-deaza dGTP ( $C^7$  dGTP) ou le dITP sont par exemple utilisés à la place du dGTP (Barr *et al.*, 1986).

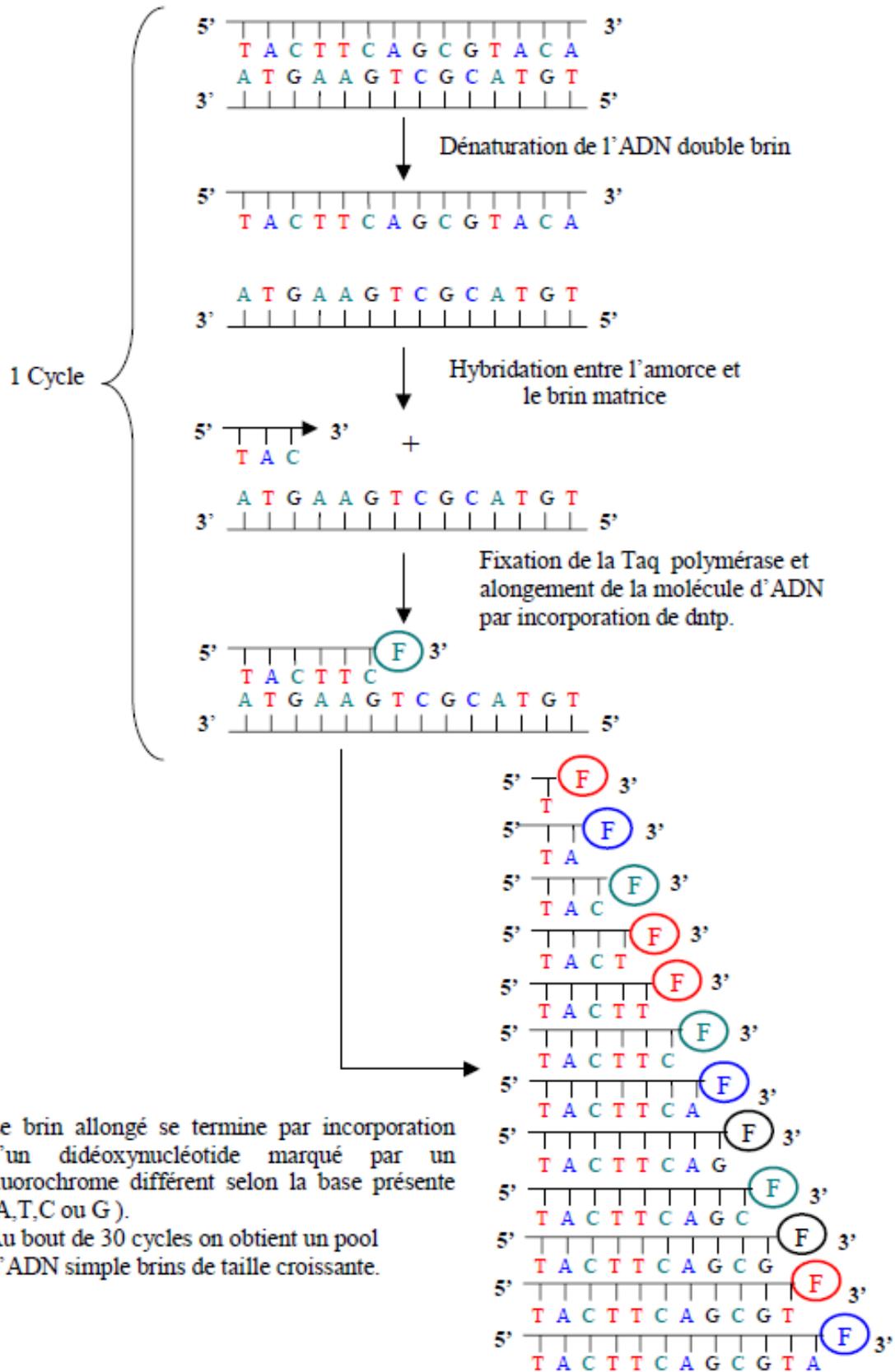


Figure 20 : Etapes du séquençage

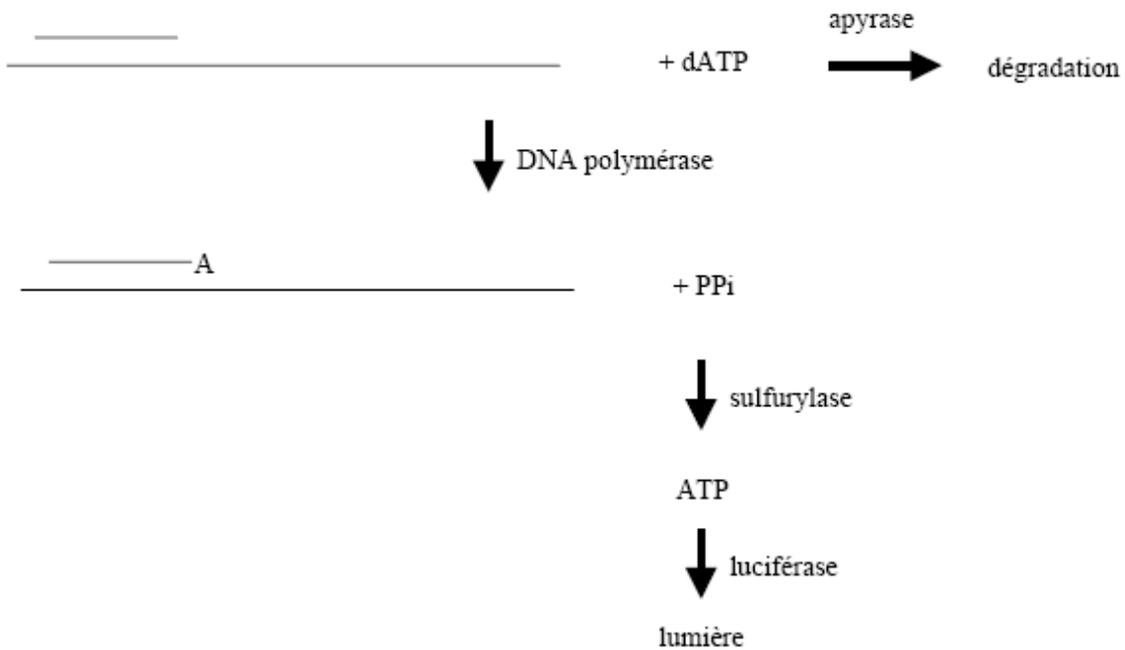
## **II. Séquençage haut débit**

Le champ d'application de ces nouvelles méthodes de séquençage est très vaste. En effet à partir du moment où il est possible d'obtenir une molécule d'ADN, le séquençage à haut débit peut-être utilisé. Grâce à la capacité de ces machines à fournir de grandes quantités de séquences ou de travailler sur un grand nombre d'échantillons en parallèle, ces outils permettent de couvrir plusieurs technologies différentes employées jusqu'à maintenant comme les puces à ADN, le séquençage classique de Sanger ou la PCR quantitative à haut débit. Les applications disponibles avec le séquençage à haut débit peuvent globalement se regrouper en 3 grandes catégories : le séquençage *de novo*, le reséquençage et les analyses fonctionnelles.

### **II.1. Pyrosequencing (Roche)**

Cette méthode est basée sur la détection du pyrophosphate lors de l'incorporation d'un nucléotide par une polymérase (Fakruddin *et al.*, 2012). Le fragment d'ADN d'intérêt (amorce hybridée à une matrice simple brin) est incubé avec une DNA polymérase, une ATP sulfurylase, une luciférase et une enzyme de dégradation des nucléotides telle que l'apyrase. Des nucléotides sont ensuite ajoutés par cycle, tout d'abord du dATP, puis du dTTP, du dGTP et du dCTP. Lorsque le nucléotide complémentaire est ajouté, il y a libération du pyrophosphate (PPi). Celui ci est dosé à l'aide de la luciférase qui produit de la lumière en présence d'ATP. Les nucléotides non incorporés sont dégradés entre chaque cycle par une apyrase, mais le temps de dégradation est plus long que celui de l'incorporation de façon à ne pas interférer avec la réaction de polymérisation (Figure 21).

Avec cette méthode, l'ADN subit après fragmentation une étape d'amplification par PCR. Cette PCR est réalisée en émulsion, ce qui permet d'effectuer plusieurs millions de réactions indépendantes dans un seul tube. Le mélange obtenu est ensuite déposé sur une plaque ou chaque emplacement ne peut contenir qu'une seule molécule d'ADN amplifiée. La réaction de séquençage par synthèse est alors initiée base par base. La lecture de chaque base incorporée est révélée à l'aide de la réaction chemoluminescente et détectée par une caméra CCD.



**Figure 21:** Etapes du pyrosequencing.

Cette technologie permet d'obtenir aujourd'hui jusqu'à 1 million de séquences pouvant atteindre jusqu'à 400 bases. Les erreurs de séquences détectées sont majoritairement des insertions/délétions dues aux régions homopolymères (répétitions identiques de la même base). En effet dans ce cas le signal est plus intense mais n'est pas directement proportionnel au nombre de bases. Cette méthode permet de séquencer uniquement des petits fragments, mais sa simplicité permet d'en séquencer un grand nombre en parallèle.

## II.2. Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina)

Pour cette technique, l'amplification de l'échantillon à analyser ne s'effectue pas en solution mais sur un support solide. La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié. Elle se déroule position après position en ajoutant un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Une lecture laser permet alors de détecter simultanément toutes les positions incorporées. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle. Cette méthode permet l'acquisition en

parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 100 bases de long. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre.

### **II.3. Séquençage par ligation (Applied Biosystems)**

La première étape d'amplification de la méthode de séquençage d'Applied Biosystems est identique à celle du pyroséquençage. Par contre, les séquences amplifiées sont fixées sur un support solide au lieu d'une plaque. La réaction de séquençage s'effectue ensuite par un système assez complexe de cycles de ligation et de clivage. Cette technique va permettre non seulement la lecture de la séquence mais inclut un système de correction des erreurs d'incorporations.

Grâce à cette méthode, il est possible de lire jusqu'à un milliard et demi de séquences en parallèle de 75 bases de long. Le système incorporé de correction d'erreurs associé à l'utilisation de la ligase rend cette technologie très fiable.

### **III. Séquençage par hybridation**

Cette méthode utilise les puces à ADN (DNA chips). Une puce à ADN est une petite surface sur laquelle on dépose une très grande quantité (plusieurs milliers) de molécules d'ADN. Dans le cas présent on dépose des oligonucléotides qui sont directement synthétisés sur la surface de silicium ou de polymère d'acrylamide. Le fragment d'ADN à séquencer est marqué à l'aide d'un fluorophore et on effectue une hybridation. La lecture de la puce est réalisée en liaison avec des lecteurs optiques qui balayent la surface des puces grâce à des techniques de micro-optique.

## Références Bibliographiques

- Antoniou, A. C., Sinilnikova, O. M., Simard, J., Léoné, M., Dumont, M., Neuhausen, S. L., Coupier, I. (2007). RAD51 135G→C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 81(6), 1186-1200.
- Bastard, J. P., Chambert, S., Ceppa, F., Coude, M., Grapez, E., Loric, S., Tse, C. (2002). Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. In *Annales de Biologie Clinique*, 60 (5), 513-23.
- Bienvenu, T., Meunier, C., Bousquet, S., Chiron, S., Richard, L., Gautheret-Dejean, A., Feldmann, D. (1999). Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de Biologie Clinique*, 57(1), 77-84.
- Borel, J. P., Randoux, A. (1997). *Biochimie dynamique*. De Boeck Supérieur, pp592.
- Bou, C., Bénali, L., Samot, J., Glock, N. (2010). Le recueil des indices pour les empreintes génétiques en odontologie légale. *Actualités Odonto-Stomatologiques*, (252), 393-404.
- Branger, A., Richer, M.M., Roustel, S. (2003) Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri editions. p121
- Doutremepuich, F., Beaufils, M., Morales, V., Doutremepuich, C. (2003). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire: Les analyses génétiques en pratique judiciaire. *Journal de la Société de biologie*, 197(4), 329-331.
- Fakruddin, M., Chowdhury, A. B. H. I. J. I. T., Hossain, M. N., Mannan, K. S., & Mazumda, R. M. (2012). Pyrosequencing-principles and applications. *Int J Life Sci Pharma Res*, 2, 65-76.
- Hänni, C. (1994). Utilisation de l'ADN ancien en anthropologie. *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 6(1), 5-28.
- Jarrell, K. F., Faguy, D., Hebert, A. M., Kalmokoff, M. L. (1992). A general method of isolating high molecular weight DNA from methanogenic archaea (archaeobacteria). *Canadian journal of microbiology*, 38(1), 65-68.

- Karp, G. (2010). *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments*. De Boeck Supérieur. p770.
- Kiel, M. (2004). *Chimie organique*. De Boeck Secundair, p 38.
- Ludes, B., Pfitzinger, H., Crubezy, E., Mangin, P., Janin, T., Midant-Reynes, B. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)-DQA1 oligonucleotide typing on bones of Egyptian Predynastic times (3400 to 3200 BC). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2. Sciences de la terre et des planètes*, 318(11), 1571-1575.
- Mansuet-Lupo, A., Rouger, P., Van Huffel, V. (2007). Les empreintes génétiques: état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. *Transfusion clinique et biologique*, 14(3), 334-342.
- Ponseel, G., Fillon, C., Schuliar, Y. (2011). Recommandations pour la prise en charge et l'identification des victimes décédées suite à une catastrophe de type nucléaire-radiologique-biologique-chimique (NRBC). *La Revue de Médecine Légale*, 2(3), 94-107.
- Popescu, P. (1998). Techniques de cytogénétique animale. *Editions Quae*. p 89.
- Primrose, S., Twyman, R., Robert, W. (2004). *Principes de génie génétique*. De Boeck Supérieur, p104
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Nazaret, S. (1998). A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *European journal of soil biology*, 34(2), 89-97.
- Tagu, D., Moussard, C. (2003). *Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée*. Editions Quae. p30-35.
- Voet, D., Voet, J. G. (2005). *Biochimie*. de Boeck Université, p265.

### Références numériques

- 1- [www.afssaps.fr](http://www.afssaps.fr)
- 2- [http://vminfotron-dev.mpl.ird.fr:8080/masto2\\_2/infos/021a.pdf](http://vminfotron-dev.mpl.ird.fr:8080/masto2_2/infos/021a.pdf)