

Séance SvT7

Introduction et problématisation

Problématique initiale : comment peut-on réaliser une empreinte génétique ?

Extraction ADN de Panthère des neiges à la faculté de Poitiers avec Thierry BERGES, généticien de l'université de Poitiers

A/ Rappels du cours de seconde

Le vivant est constitué, en outre, de biomolécules : glucides, lipides, protides et acides nucléiques. L'ADN pour acide déoxyribonucléique fait partie des acides nucléiques au même titre que les ARN.

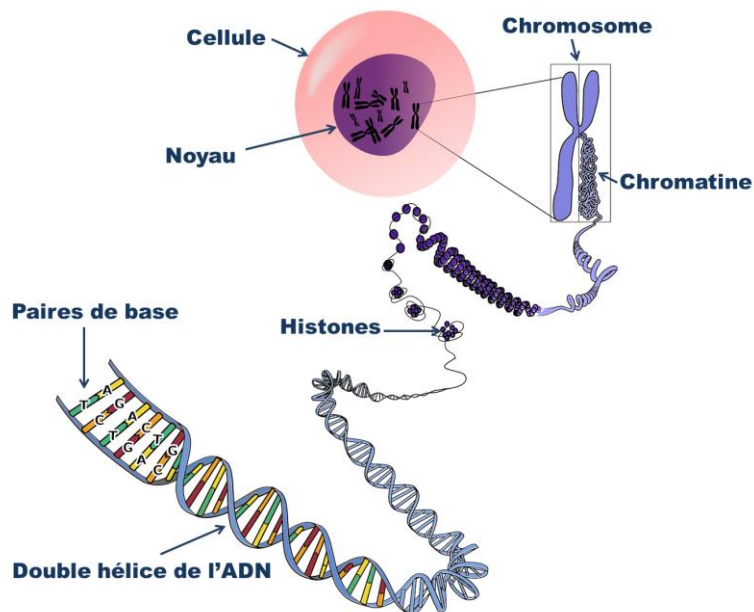
L'ADN est constitué d'une succession de nucléotides. On parle de polymère (molécule constituée de motifs moléculaires qui se répètent). Chaque nucléotide comprenant :

- un groupement phosphate (H_3PO_4)
- un sucre, le désoxyribose
- une base azotée (Adénine, Thymine, Cytosine ou Guanine)

L'ADN se présente sous la forme d'une double hélice, c'est-à-dire deux brins d'ADN complémentaires : un nucléotide A d'un brin est toujours associé à un nucléotide T sur le brin complémentaire et un nucléotide est toujours associé à un nucléotide G. Les deux brins sont maintenus grâce aux liaisons faibles, liaison hydrogènes entre les deux brins.

L'ADN sous forme décondensée est appelée chromatine et sous forme compactée, chromosome.

La chromatine est la double hélice qui s'enroule autour de protéines appelée histones.



B / Protocole et explications connexes

Dans les excréments de tout animal on retrouve des restes du repas donc des cellules étrangères à l'organisme dont on analyse les fèces et des cellules de l'individu (cellules du tube digestif notamment).

On trouve donc des cellules et donc de l'ADN appartenant :

- à l'organisme suivi (Panthère des neiges), espère-t-on ? car cela pourrait être des excréments d'une autre espèce très ressemblante (Loup, Ours...)
- issues de son alimentation principalement carnée mais également agrémentée d'un peu de végétaux,
- issues d'organismes ingérés avec leurs proies comme des champignons et bactéries microscopiques,

- une contamination possible sur le terrain et/ou plus tard.

Rechercher de l'ADN de Panthère doit déjà prendre en compte ces considérations !

1. Préparation de l'ADN

1.1 Extraction de l'ADN à partir de fèces

L'extraction de l'ADN des cellules nécessite 1H30.

La préparation de l'ADN est effectuée à l'aide du kit « QIAamp DNA Stool » selon les instructions du fabricant (QIAGEN).

Afin d'éviter toute contamination des échantillons, le port de gants (vinyle ou latex +/- poudrés en fonction de possibles réactions allergiques) est obligatoire.



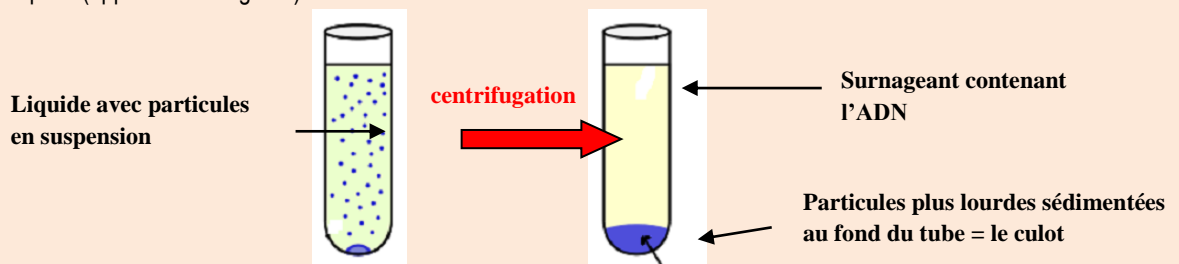
PORT DE GANTS et D'UNE BLOUSE OBLIGATOIRE pour éviter toute contamination des échantillons.

1. **Prendre** un tube Eppendorf de **2-mL stérile**. Avant de le **peser, tarer** la balance. **Reporter** votre nom (initiales) et la masse du tube sur votre Eppendorf.
2. **Allumer** le bec bunsen et travailler, dès lors, dans le cône de stérilité.
3. **Déposer** les fèces dans une boîte de Pétri stérile.
4. **Tremper** les instruments (scalpel et pinces) dans la Javel puis dans l'alcool avant de les **passer** rapidement dans la flamme afin de les stériliser.
5. Avec le scalpel et les pinces stérilisés **gratter** l'extérieur des fèces afin de récupérer $\frac{1}{4}$ du tube Eppendorf. **Vérifier** que vous avez entre **200 et 300 mg de fèces**.
6. **Ajouter 1,4 mL (2 x 700 μ L) de tampon ASL**.

Rôle du tampon ASL : Contient un détergent (tensioactif) qui va déchirer (détruire) toutes les membranes (majoritairement constituée de lipides, c'est à dire de graisses) des cellules (membranes cytoplasmiques et membranes nucléaires mais aussi celles des mitochondries, des chloroplastes) **afin d'avoir accès à l'ADN** protégé dans le noyau des cellules. **On détruit alors toutes les cellules** (celles de l'individu et de tous les organismes mangés, en symbiose... végétaux, animaux mangés mais aussi bactéries).

7. **Mélanger** à la main et au vortex pendant au moins **2 min** afin d'homogénéiser l'échantillon. **Incuber** à 70°C pendant **5 min** dans un bain-marie. **Mélanger** au vortex pendant **1 min** puis **centrifuger** à ~20,000g pendant **1 min**.

Rôle de la centrifugation : procédé de **séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité** en les soumettant à une force centrifuge. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. Les particules les plus lourdes tomberont (sédimentent) au fond du tube, tandis que les plus légères (ici les molécules d'ADN) resteront en suspension dans le liquide (appelé le surnageant).



8. **Transférer 1,2 mL (2 x 600 μ L) de surnageant** dans un nouveau **microtube Eppendorf de 2-mL stérile** en veillant à ne mettre la pipette au contact du culot. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales.
9. **Ajouter une tablette InhibitEX dans votre échantillon** et **mélanger** à la main jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Rôle de la tablette InhibitEX: permet d'adsorber des composés qui pourraient interférer avec la réaction de PCR ou dégrader l'ADN.

10. **Centrifuger** à ~20,000g pendant **3 min** afin de faire sédimenter les particules de matrice InhibitEX.
11. **Transférer 500µL surnageant dans un nouveau microtube Eppendorf de 1,5-mL stérile**. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales.
12. **Centrifuger** à nouveau à ~20,000g pendant **3 min** afin de faire sédimenter les éventuelles particules résiduelles.
Mettre 15 µL de protéinase K dans un nouveau microtube Eppendorf de 1,5-mL stérile. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales. **Ajouter 200 µL du surnageant** de l'étape précédente. Enfin, ajouter **200 µL de tampon AL**.
13. **Mélanger** au vortex pendant **15 sec** jusqu'à obtenir une solution homogène. **Incuber** à 70°C pendant **10 min**.

Cette étape permet d'éliminer les protéines, et en particulier celles qui sont associées à l'ADN dont les histones.

Rôle du tampon AL: permet d'ajuster le pH du mélange réactionnel pour **favoriser l'action de la protéinase K**, et il contient des sels qui **permettront de faire précipiter l'ADN** après l'addition de l'éthanol à l'étape suivante).

14. **Centrifuger brièvement** les tubes afin d'éviter de perdre de l'eau condensée dans le bouchon à l'issue de l'incubation à 70°C. **Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%)** et **mélanger** au vortex pendant **quelques sec**.
15. **Sortir une micro-colonne avec son tube, de son emballage. Ouvrir le bouchon.**
16. **Déposer à l'aide d'une micropipette de 650 µL l'intégralité du mélange de l'étape précédente sur la micro-colonne constituée de silice**. Après avoir remis le bouchon, **centrifuger** à ~20,000g pendant **1 min**

Au cours de cette étape, **l'ADN** a précipité et s'est complexé aux sels du tampon AL. Il **est ensuite retenu sur la silice de la colonne alors que tous les résidus cassés, fragmentés par l'action du pH, du tampon, traversent le filtre en silice**.

17. **Placer la colonne dans un nouveau tube de 2-mL**. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales. **Ajouter 500 µL de tampon AW1**, remettre le bouchon sur la colonne, et **centrifuger** à ~20,000g pendant **1 min**
18. **Placer la colonne dans un nouveau tube de 2-mL**. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales. **Ajouter 500 µL de tampon AW2**, remettre le bouchon sur la colonne, et **centrifuger** à ~20,000g pendant **3 min**.

L'ADN est toujours retenu sur la colonne. Ces étapes permettent de le **laver en enlevant les éventuelles molécules résiduelles**.

20. **Jeter le liquide** contenu dans le tube de 2-mL et **centrifuger** à nouveau (~20,000g pendant **1 min**) afin d'éliminer tout liquide résiduel.
21. **Placer la colonne dans un microtube Eppendorf de 1,5-mL stérile**. Annoter le tube avec le N° d'échantillon et vos initiales. **Placer 150 µL de tampon AE** au fond de la colonne. **Remettre** le bouchon sur la colonne et **laisser agir le tampon 5 min** à température ambiante puis **centrifuger** à ~20,000g pendant **1 min**

Rôle du tampon AE: solution aqueuse tamponnée mais qui ne contient plus de sels de sorte que l'ADN n'est plus retenu sur la colonne. Il est entraîné avec le liquide dans le tube de 1,5-mL. On pourra ainsi le récupérer.

22. **Rajouter 50 µL de tampon AE** au fond de la colonne et **centrifuger** à nouveau **1 min** (le volume final de la préparation est donc de l'ordre de 200 µL).
23. **Jeter** la colonne et conserver le microtube Eppendorf. La préparation doit être **conservée sur la glace** jusqu'à la PCR.

Remarque: on ne travaillera que sur l'ADN mitochondriale puisque des marqueurs spécifiques (Cytochrome B) de la Panthère des neiges se trouvent dans cette partie de l'ADN. Le cytochrome B est une protéine au niveau des mitochondries, qui permet la respiration cellulaire c'est-à-dire la transformation du glucose en H₂O et CO₂ le tout accompagné d'une libération d'énergie (Adénosine Tri-Phosphate).

1.2 L'amplification de l'ADN

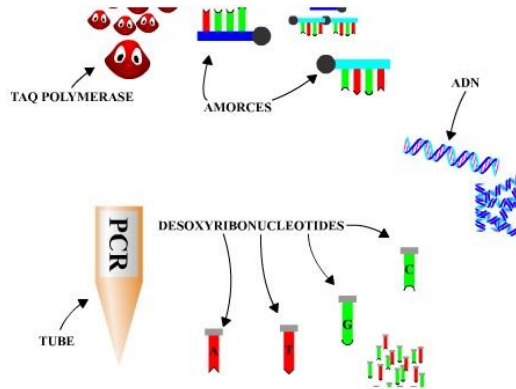
L'ADN obtenu compte 3 milliards de nucléotides ou paires de bases/ cellule.

Or, aujourd'hui, malgré les outils ultra sophistiqués que la recherche possède, cette quantité d'ADN, ce nombre de bases est trop faible pour être détecté. Il faut donc amplifier, in vitro (dans un tube à essai), l'ADN extrait afin d'obtenir

une quantité d'ADN suffisante pour être analysée. Mais attention, amplifier l'ADN signifie obtenir la même information génétique mais en plus grande quantité, il faut donc répliquer, copier, l'ADN existant, pas en créer de nouvelles molécules supplémentaires !

La technique qui permet une telle amplification est la PCR (Polymérase Chain Reaction) ou technique de répllication ciblée de l'ADN in vitro.

La PCR consiste à mettre dans un tube à essai l'ADN que l'on cherche à amplifier avec des enzymes capables de construire par complémentarité de bases le brin d'un ADN que l'on souhaite compléter. On obtient aujourd'hui environ 1 million de copies en quelques heures.



<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>

Une PCR classique se déroule dans un petit tube lui même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur se contente de placer le tube aux températures voulues pendant les durées programmées... et de recommencer en effectuant des cycles. Chaque cycle de PCR comprend trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation (ou anelage) et l'élongation (ou extension des amorces). La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

Avant la réaction, tous les « acteurs » de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides spécifiques du segment d'ADN voulu (ou amorces ; les amorces sont de tous petits bouts d'ADN qui reconnaissent le début des fragments à copier et s'apparie à celui-ci), de l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase) et enfin un mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN (contenant les 4 bases azotées A, T, C et G). Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

1. Premier cycle

Dénaturation

Pour copier le fragment d'ADN il faut commencer par ouvrir l'ADN afin d'obtenir deux brins séparés.

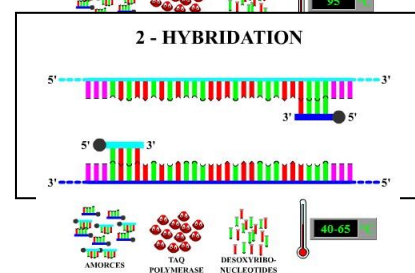
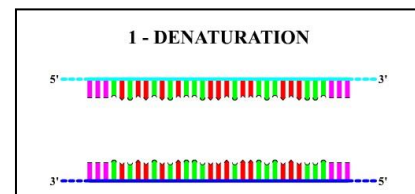
Pour cela l'ADN est alors chauffé à 95 °C. A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

Hybridation

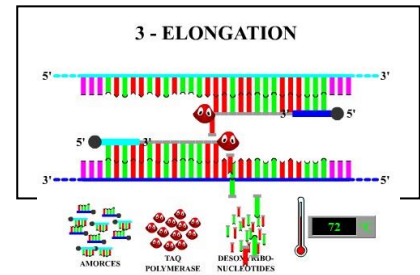
Afin de ne copier que les fragments qui nous intéressent, on aura au préalable synthétisé des « amorces » qui s'hybrideront avec les brins d'ADN à copier, grâce à des bases complémentaires. Dans le cas de la Panthère des neiges, la partie de l'ADN spécifique est d'une longueur de 150 paires de base.

Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. Elle est comprise entre et 45-65°C. La température d'hybridation est, de toutes façons, inférieure à la température de dénaturation.

Elongation



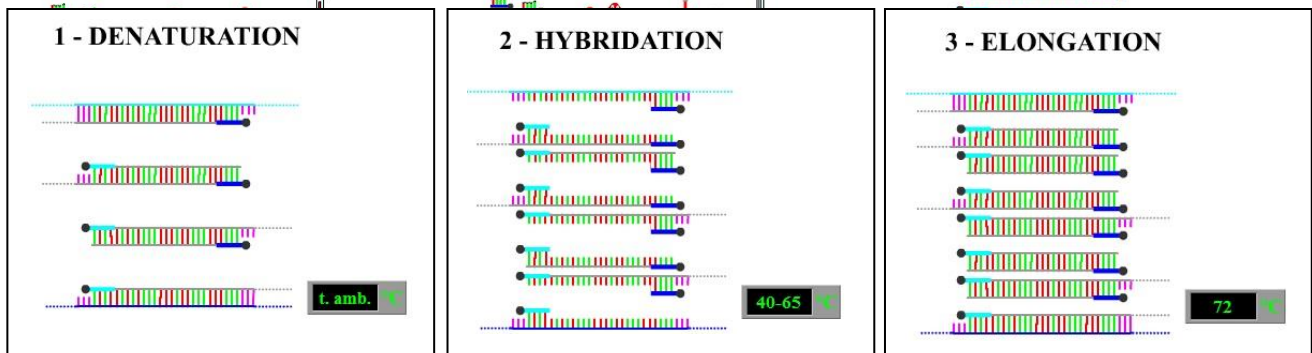
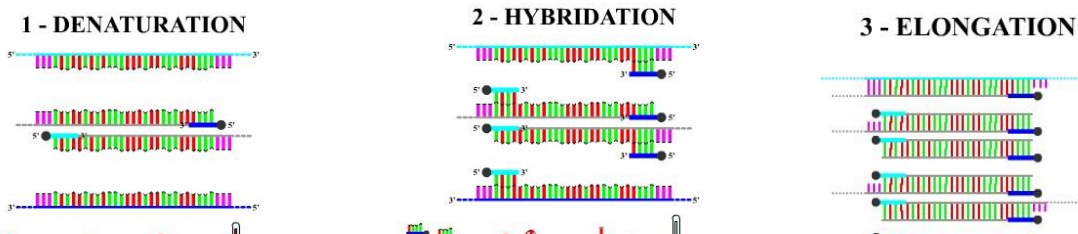
Une fois les deux monobrins d'ADN, complémentaires, obtenus, on rabaisse la température à 72°C. Les deux monobrins obtenus sont alors mis en présence d'outils moléculaires capables de construire les brins d'ADN complémentaires : ces outils moléculaires sont des enzymes appelées ADN polymérase (Taq Polymérase). Pour commencer à travailler sur le brin d'ADN à construire par complémentarité de bases, il faut aider l'ADN polymérase à amorcer son travail. Pour cela on ajoute une amorce (ou « primers » en anglais) sur le fragment d'ADN monobrin à répliquer, amorce qui permettra à l'ADN polymérase de savoir où elle doit débiter sa réplication. En fin de synthèse du brin complémentaire, on obtient donc deux brins d'ADN, un pour chaque monobrin déposé en début d'expériences.



2. Deuxième cycle, troisième cycle...

On chauffe à nouveau à 60°C les deux brins d'ADN obtenus pour obtenir désormais 4 brins d'ADN qui serviront, à leur tour, de matrice pour un nouveau cycle de fabrication d'ADN.

L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices (patron) pour les étapes suivantes. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est alors exponentielle.



2. La séparation des fragments d'ADN et leur analyse

2.1 L'électrophorèse

Les différents fragments d'ADN obtenus, ceux propres à la Panthère des neiges, propres à un sexe, propre à un individu doivent être séparés pour être comparés. Ces fragments d'ADN sont alors déposés dans un gel d'agar-agar et soumis à un champ électrique.

Les fragments (électronégatifs) migreront dans le gel en fonction de leur charge mais également en fonction de leur taille. Plus un fragment est chargé négativement plus il migrera vite vers la cathode (pôle positif). Plus il est grand moins il migrera vite. Charge globale et taille permettent ainsi de séparer des fragments de tailles très proches.

Pour rendre visible à l'œil ces fragments, on ajoute un agent intercalant fluorescent, le bromure d'éthidium. Ce dernier, sous UV, permettra de visualiser et comparer les fragments, et donc de caractériser l'espèce, le sexe et l'individu.

2.2 Identification de l'espèce et du sexe de l'individu, analyse des résultats des électrophorèses

Le repérage des bandes par rapport aux bandes références permettent de retrouver ou non, les bandes caractéristiques de l'espèce, en l'occurrence ici, des empreintes génétiques de Panthère des neiges ou non.

Emilie Dallet, Thierry Bergès et Samuel Remérand