

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'**ADN** (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.



Principales étapes

Classiquement, les principales étapes de l'extraction de l'ADN sont les suivantes :

⇒ Destruction des tissus afin de libérer l'ADN du noyau (et de la mitochondrie)

↳ Un fragment de nageoire, une écaille ou un bout de muscle de poisson est lacéré (ou broyé), et mis en solution pour permettre l'homogénéisation des tissus et la solubilisation à venir des cellules.

↳ Afin de lyser (« détruire ») les tissus et les cellules, sont ajoutés et agissent pendant plusieurs heures :

- un **détergent** et un **tensioactif**¹ qui permettent la dissolution des lipides des membranes cellulaires et leur solubilisation
- une **enzyme*** qui hydrolyse les protéines (coupure des liaisons peptidiques...)
- des **agents de chélation** qui capturent les ions (comme le calcium) pour faciliter leur élimination ultérieure

⇒ Elimination des protéines et des peptides

↳ Du **phénol** et du **chloroforme** sont, par exemple, ajoutés à la solution afin de faire précipiter les protéines (les protéines se rassemblent sous une forme insoluble). L'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par **centrifugation**².

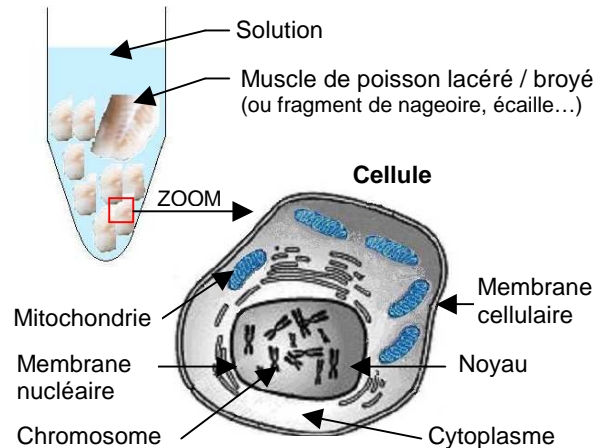
⇒ Précipitation de l'ADN et purification

↳ A la phase aqueuse obtenue est ajouté de l'**alcool pur** (éthanol à 100%) qui précipite l'ADN sous la forme d'une « pelote » récupérée par centrifugation².

↳ L'ADN obtenu est lavé à plusieurs reprises à l'aide d'**alcool** (éthanol à 70%) qui solubilise toutes impuretés indésirables.

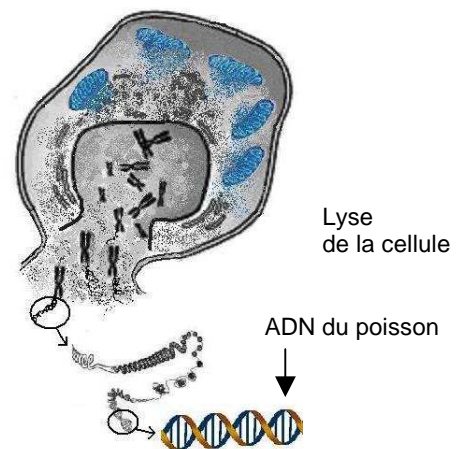
↳ L'ADN purifié est mis en solution tampon afin d'être conservé, à 4°C ou à -20°C, avant d'être analysé.

Préparation de l'échantillon



Ajout des réactifs (détergent, tensioactif, enzyme, agents de chélation)

Lyse de la cellule & libération de l'ADN

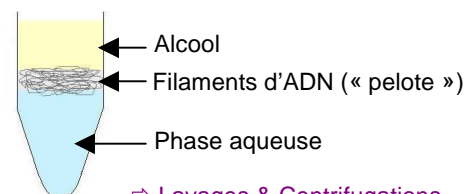


Ajout du phénol et du chloroforme

Elimination des protéines ⇒ Centrifugation

Ajout de l'alcool pur à la phase aqueuse

Précipitation de l'ADN et purification



⇒ Lavages & Centrifugations

Solubilisation de l'ADN purifié

¹ Molécules présentant deux parties de polarité différente : une lipophile qui capte les lipides, et une autre hydrophile qui est soluble dans l'eau ; ce qui permet de « solubiliser » les lipides dans l'eau.

² Technique utilisant la force centrifuge, mouvement de rotation très rapide, pour séparer par exemple un solide en suspension dans un liquide.



Autres méthodes

Il existe de nombreuses autres méthodes d'extraction de l'ADN. Par exemple :

⇒ La technologie des billes magnétiques

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution.

⇒ Les cartes FTA[®]

Une carte de papier Whatman FTA[®] est imprégnée d'un traitement chimique qui permet, lorsqu'un échantillon est déposé sur celle-ci, la destruction cellulaire et l'immobilisation de l'ADN dans la carte. Pour récupérer l'ADN, la zone correspondante de la carte est prélevée à l'aide d'un emporte-pièce et lavée dans une solution spécifique. L'ADN immobilisé dans le papier est ainsi prêt à être amplifié par PCR¹ par exemple.

Bibliographie

Ifremer (2006). Fiche interne méthode de laboratoires: « Extraction / purification de l'ADN par la méthode phénol / chloroforme / isoamyle » BM-EX 1.0 - 16 février 2006

Rasmussen R. S., Morrissey M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive reviews in food science and food safety. **7**: 280-295

¹ Cf. Fiche « en savoir plus » sur le principe de l'amplification par PCR