



HAL
open science

SPV 1: Extraction de la fraction d'ADN, libre de nucléosomes, contenant les gènes actifs du testicule ou du foie de verrat / SPV 2: Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction)

Marine Beranger

► **To cite this version:**

Marine Beranger. SPV 1: Extraction de la fraction d'ADN, libre de nucléosomes, contenant les gènes actifs du testicule ou du foie de verrat / SPV 2: Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction). 2014, 28 p. hal-01601509

HAL Id: hal-01601509

<https://hal.science/hal-01601509>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



INRA
SCIENCE & IMPACT

UMR1388-GenPhySE
INRA
Centre de recherches d'Auzeville

24 Chemin de Borde-Rouge - CS 52627
31326 CASTANET-TOLOSAN CEDEX

BERANGER Marine

**SPV 1 : Extraction de la fraction d'ADN,
libre de nucléosomes, contenant les gènes
actifs du testicule ou du foie de verrat**



**SPV 2 : Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR
(Polymérase Chain Reaction)**

Stage de 12 semaines en 2014
Dans le cadre du BTSA Anabiotech
(Fin de 1ère année)
Maître de stage : ROBIC Annie

SOMMAIRE

Remerciements	4
SPV 1 : Extraction de la fraction d'ADN, libre de nucléosomes, contenant les gènes actifs du testicule ou du foie de verrot	5
Résumé	7
Abréviations	8
Introduction	1
Étude bibliographique	2
1. Extraction de l'ADN	2
1.1. Méthode classique-1	2
1.2. Méthode classique-2	3
1.3. Electrophorèse de l'ADN	3
1.4. Dosage de l'ADN	3
2. Présentation de la méthode pour préparer de l'ADN-FAIRE-	4
Matériel et Méthodes	6
1. Broyage des échantillons	6
2. ADN-FAIRE	6
2.1. Échantillons	6
2.2. Fixation et lavages	6
2.3. Lyse des cellules et préparation des noyaux	6
2.4. Lyse des noyaux	7
2.5. Sonication	7
2.6. Extractions phénoliques	7
2.7. Précipitation à l'éthanol	8
3. Electrophorèse sur gel d'agarose	8
Résultats et Discussion	10
1. Etape de fixation : choix et conséquences	10
2. Préparation des noyaux et lyse	10
3. Mise au point du protocole de sonication	10
4. Tentatives de préparations d'ADN-FAIRE	12
5. Retour sur la fixation	13
6. Retour sur la préparation des noyaux et leur lyse	15
7. Protocole proposé	18
Conclusions	19
SPV 2 : Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction)	20
Références bibliographiques	

Références bibliographiques

- [1] Gaulton, K. J., Nammo, T., Pasquali, L., Simon, J. M., Giresi, P. G., Fogarty, M. P., Panhuis, T. M., Mieczkowski, P., Secchi, A., Bosco, D., et al. (2010). A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat Genet* 42, 255-259.
- [2] Giresi, P. G., et Lieb, J. D. (2009). Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). *Methods* 48, 233-9.
- [3] Jones, E. A., Brewer, M. H., Srinivasan, R., Krueger, C., Sun, G., Charney, K. N., Keles, S., Antonellis, A., Svaren, J. (2012). Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum Mol Genet* 21, 1581-1591.
- [4] Kennedy-Darling, J., et Smith, L. M. (2014). Measuring the formaldehyde Protein-DNA cross-link reversal rate. *Anal Chem* 86, 5678-81.
- [5] Simon, J. M., Giresi, P. G., Davis, I. J., et Lieb, J. D. (2012). Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 7, 256-67.
- [6] Simon, J. M., Giresi, P. G., Davis, I. J., et Lieb, J. D. (2013). A detailed protocol for formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE). *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21, Unit21 26.
- [7] Smith, A. J., Howard, P., Shah, S., Eriksson, P., Stender, S., Giambartolomei, C., Folkersen, L., Tybjaerg-Hansen, A., Kumari, M., Palmén, J., et al. (2012). Use of allele-specific FAIRE to determine functional regulatory polymorphism using large-scale genotyping arrays. *PLoS Genet* 8, e1002908.
- [8] Waki, H., Nakamura, M., Yamauchi, T., Wakabayashi, K., Yu, J., Hirose-Yotsuya, L., Take, K., Sun, W., Iwabuchi, M., Okada-Iwabuchi, M., et al. (2011). Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 7, e1002311.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Xavier Fernandez, responsable de GenPhySE, pour m'avoir accepté en stage.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon maître de stage Annie ROBIC, qui m'a suivie durant ces 12 semaines de stage. Elle m'a accordé sa confiance et son temps pour que je puisse réaliser ce travail. Au près d'elle, j'ai pris confiance en moi et j'ai beaucoup appris lors de cette première expérience en laboratoire.

Mes remerciements vont aussi à Katia FEVE qui m'a guidée sur le plan technique et professionnel pendant ces 12 semaines.

Je remercie aussi Francis, Juliette, Suzanne, Maguy, Sophie et toutes les personnes du laboratoire pour m'avoir permis de m'intégrer rapidement, pour leur aide, leur gentillesse et leur patience durant ces 3 mois.

**SPV 1 : Extraction de la fraction d'ADN,
libre de nucléosomes, contenant les gènes
actifs du testicule ou du foie de verrat**

**SPV 2 : Contrôle de 16 couples
d'amorces par PCR (Polymérase
Chain Reaction)**

Résumé

Durant mon stage de 12 semaines, j'ai travaillé sur la mise au point de la préparation de l'ADN-FAIRE qui permet de récupérer l'ADN libre de nucléosomes. L'ADN est entouré de protéines et les régions qui sont libres de nucléosomes et de protéines de la chromatine sont accessibles pour la transcription : l'ADN-FAIRE contient donc les gènes actifs.

J'ai réalisé l'adaptation du protocole proposé par Simon et al. (2013) [6]. Ce protocole comprend : une fixation des protéines sur l'ADN des cellules, une préparation des noyaux, une sonication du produit de lyse des noyaux, une élimination des protéines (et de l'ADN fixé aux nucléosomes) par des extractions phénoliques pour purifier des fragments d'ADN libre. Nous avons changé la fixation au formaldéhyde par une fixation au formaldéhyde-ultrapur, sans pouvoir en mesurer les conséquences pour la préparation de l'ADN-FAIRE. Nous avons obtenu de l'ADN-FAIRE mais le plus souvent en très faible quantité et masqué par des ARN nucléaires. A l'évidence, nous avons un problème de lyse des noyaux. Aussi, nous sommes revenus sur la préparation des noyaux et nous avons enfin réussi à obtenir une lyse complète de ceux-ci et donc une meilleure quantité d'ADN. En conséquence, il nous faudra de nouveau travailler sur le nombre de cycles de sonication pour optimiser la taille des fragments obtenus, mais l'essentiel du protocole de préparation de l'ADN libre de nucléosomes paraissait au point, avant l'ultime test réalisé lors de ce stage. Néanmoins, nous sommes à peu près convaincus de connaître l'origine de ces noyaux non « lysables » : le formaldéhyde-ultrapur est connu pour être un fixateur beaucoup plus puissant que le formaldéhyde.

Abréviations

Etablissement :

GenEpi : Génétique et épigénétique moléculaires

GenPhySE : Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LGC : Laboratoire de Génétique Cellulaire

SAGA : Station d'Amélioration Génétique des Animaux

TANDEM : Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme

Unités de mesure

C° : degré Celsius

g : force de gravitation

h : heure

Hz : hertz

kb : kilobases

nm : nanomètre

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

pb : paire de bases

rpm : rotation par minute

s : seconde

µl : microlitre

Produits et techniques :

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide ribonucléiques

BET : Bromure d'Ethidium

dNTP : Désoxyribo-Nucléotide Tris-Phosphate

DNase : enzyme dégradant l'ADN

EDTA : acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EGTA : acide Ethylène Glycol Tétra-Acétique

FAIRE : Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

KOH : hydroxyde de potassium

MgCl₂ : chlorure de magnésium

Na : sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

PBS : Tampon phosphate (phosphate buffer saline)

PCR : Polymerase Chain Reaction

RNase : enzyme dégradant les ARN

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TBE : tampon Tris Borate EDTA

TE : Tris (10mM) EDTA (1mM)

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

Triton : Triton X-100

UV : ultraviolet

Divers

Centri. : centrifugation

et al. : *et alii* (et les autres en latin)

Lav. : lavage

Prep. : préparation

Trait^t : traitement

Introduction

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), est un établissement public à caractère scientifique et technologique. L'INRA développe des connaissances scientifiques et accompagne l'innovation économique et sociale dans les domaines de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement.

J'ai effectué mon stage de 12 semaines au sein de l'Unité de Recherche de Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE) ; elle regroupe, depuis le 1^{er} janvier 2014, trois unités de recherches : la SAGA (Station d'Amélioration Génétique des Animaux), le LGC (Laboratoire de Génétique Cellulaire), et TANDEM (Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Écosystème et Métabolisme). GenPhySE est rattaché au département *génétique animale*, et *physiologie animale* de l'INRA.

Cette unité travaille sur l'évolution et la gestion des populations animales (ovins, caprins, lapins, porcs, canard) et aussi à l'évaluation et la conception de systèmes d'élevage plus durables. Elle s'organise selon les priorités scientifiques comme *la structure et l'organisation fonctionnelle du génome ; la sélection génomique ; les mécanismes d'élaboration des phénotypes ; les effets du milieu sur l'expression des gènes*. Pour ce stage j'ai passé 12 semaines dans l'équipe du *Génétique et Épigenétique moléculaires des espèces animales utilisées en croisement* (GenEpi). Cette équipe, animée par Juliette Riquet, comprend 4 chercheurs et 5 ingénieurs/techniciens (4 avec une activité laboratoire et 1 biostatisticien) et travaille sur des problèmes de génétique moléculaire chez le porc, le lapin, le canard et la caille.

J'ai travaillé, plus précisément, sur le problème des odeurs sexuelles dans les viandes issues de verrats. En effet, le gras des viandes issu de ces porcs non castrés, peut à la cuisson dégager des odeurs très désagréables. Ce problème est principalement dû à deux composés, le scatol et l'androsténone, et est très lié au développement sexuel. Trois organes sont particulièrement intéressants à étudier :

1. le testicule car il est responsable de la synthèse de l'androsténone et des autres hormones sexuelles
2. le foie qui dégrade le scatol fabriqué par les bactéries intestinales et l'androsténone
3. le gras qui stocke l'androsténone et le scatol.

Des études précédentes ont montré que le gras avait un rôle plutôt passif.

En 2014, l'équipe a obtenu un financement pour un projet comprenant notamment l'étude et la caractérisation des gènes différentiellement actifs dans le foie et dans le testicule d'animaux extrêmes en androsténone (avec un développement sexuel identique). On souhaite extraire l'ADN « libre » et pour cela, la technique de FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements) a été retenue. Cette technique a été proposée par Giresi et Lieb (2009) [2].

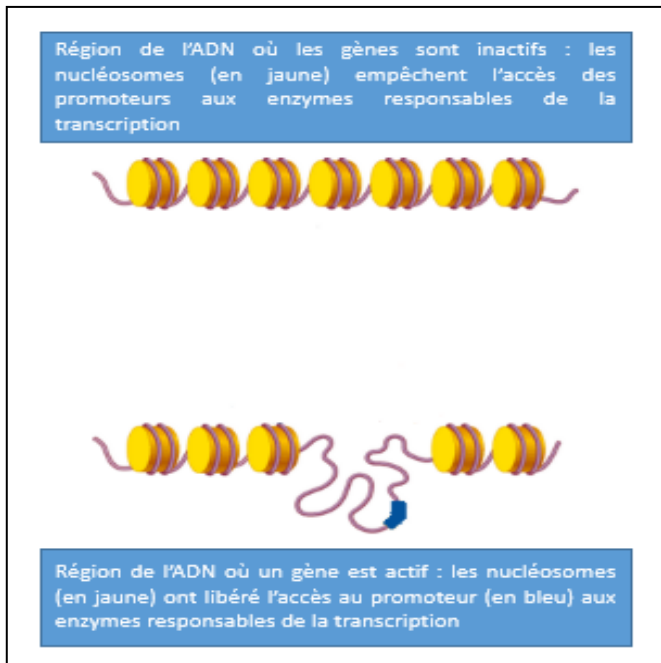
Durant mon stage, j'ai donc travaillé sur la mise au point de la préparation de l'ADN-FAIRE qui permet de récupérer l'ADN libre de nucléosomes. Les gènes actifs sont accessibles pour la transcription car ils sont dans une zone de l'ADN libérée des nucléosomes et des protéines de la chromatine.

Dans un premier temps, je vous parlerais des extractions d'ADN par différentes méthodes utilisées classiquement pour préparer l'ADN total. Puis je vous présenterais la méthode pour préparer de l'ADN-FAIRE. Le protocole proposé par Giresi et Lieb (2009) [2] était surtout adapté aux cellules issues de cultures *in vitro* et même s'ils proposaient une adaptation aux tissus animaux, il nous fallait adapter le protocole à nos tissus et au matériel disponible au laboratoire.

Après une étude bibliographique, où je vous présenterais le principe des différentes préparations d'ADN et des techniques que j'ai utilisé pour évaluer les différents protocoles de préparation de l'ADN-FAIRE, je vous présenterais les protocoles proprement dits. Enfin, je vous parlerais de quelques résultats obtenus.

Étude bibliographique

En 2014, l'équipe a obtenu un financement pour un projet comprenant notamment l'étude et la caractérisation des gènes différemment actifs dans le foie et dans le testicule d'animaux extrêmes en androsténone (avec un développement sexuel identique). Un gène est dit actif quand il a une activité transcriptionnelle, c'est-à-dire que son promoteur est accessible aux enzymes responsables de la transcription.



Dans le cas général, l'ADN est recouvert de protéines : les régions intergéniques comme les régions contenant des gènes. Seuls les gènes actifs dans une situation donnée (tissu, âge) sont libres de nucléosomes (Figure-1). Pour extraire spécifiquement ces régions de l'ADN nucléaire, la technique FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements) a été retenue. Cette technique a été proposée par Giresi et Lieb (2009) [2].

Figure-1 : ADN et nucléosomes

Avant de vous expliquer les particularités de cette technique, je vais vous exposer deux techniques d'extraction de l'ADN génomique, classiquement utilisées au laboratoire.

1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN permet d'isoler l'ADN, de cellules ou de tissus, qui est localisé dans le noyau des cellules, on parle d'ADN génomique ou d'ADN total. Il faut donc récupérer l'ADN et se débarrasser des membranes cellulaires, des protéines et des ARN plutôt cytoplasmiques. Cet ADN ainsi récupéré peut être séquencé, amplifié par PCR, pour pouvoir être étudié par la suite.

1.1. *Méthode classique-1*

Cette technique est mise en œuvre au laboratoire pour préparer l'ADN à partir de sang (globules blancs pour les mammifères, globules rouges pour les oiseaux), ou à partir d'un fragment de queue ou d'oreille de cochons. Cette technique permet de travailler sans produits chimiques dangereux et sa mise en œuvre est compatible avec le traitement de séries d'échantillons importantes. Cette technique fait l'objet de trois étapes clés :

➤ Lyses des membranes cellulaires

Cette étape utilise de la protéinase K, une enzyme active dès 25°C mais plus active à 56°C et un détergent, le SDS. Cette étape se fait avec une solution hypertonique (une solution fortement concentrée en sel) et avec un détergent qui va permettre de faire exploser les membranes cellulaires et solubiliser les protéines. On y ajoute aussi du tampon Tris-HCl pour permettre au pH de rester à 8 pour ne pas dégrader l'ADN et de l'EDTA pour bloquer les enzymes dégradant l'ADN (les DNases ont besoin de MgCl₂ et l'EDTA est un agent chélatant). L'enzyme, protéinase K, va permettre de digérer les protéines et en particulier celles qui sont liées à l'ADN.

➤ Précipitation des protéines

Une solution de NaCl saturée (>5M) est utilisée pour précipiter les protéines. Elles sont éliminées après une centrifugation.

➤ Précipitation de l'ADN

Pour précipiter l'ADN, on ajoute 2 volumes d'éthanol à 100% en présence de sels. L'ADN est rendu insoluble et forme un précipité blanc. Classiquement, cette « méduse » est récupérée avec une anse et mise dans un nouveau tube. Si la quantité d'ADN est insuffisante, il faut laisser à -20°C deux heures minimum et centrifuger. Le culot d'ADN est séché à l'aide d'un speed vac avant d'être remis en suspension dans du TE. Cette solution va permettre de conserver l'ADN dans de bonnes conditions.

1.2. *Méthode classique-2*

Cette technique est mise en œuvre au laboratoire pour préparer l'ADN en grande quantité et d'excellente qualité (fragments de grande longueur). Cette technique met en œuvre plusieurs produits chimiques dangereux et sa mise en œuvre n'est pas compatible avec le traitement de séries d'échantillons importantes. Cette technique fait l'objet de deux étapes clés :

➤ La préparation de noyaux

Pour faire exploser les membranes cellulaires tout en préservant les membranes des noyaux, il faut utiliser un détergent adapté : la saponine. Le passage par les noyaux permet de se débarrasser du cytoplasme et de son contenu.

Pour lyser ces noyaux cellulaires, il suffit d'utiliser du SDS pour faire exploser les membranes des noyaux.

➤ L'élimination des protéines et des ARN

Ici on utilise du phénol saturé en tampon Tris-HCl, c'est-à-dire un phénol de pH8, favorable à l'ADN. En général deux extractions au phénol (volume à volume) sont réalisées, suivies d'une dialyse pour éliminer le phénol et récupérer l'ADN sans précipitation à l'éthanol. Une autre alternative est de faire une extraction au phénol, suivie d'une autre extraction avec un mélange volume à volume de phénol et de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Le surnageant de cette extraction peut être précipité à l'éthanol comme décrit précédemment.

1.3. *Electrophorèse de l'ADN*

L'électrophorèse consiste à séparer les fragments d'ADN selon leurs poids moléculaires. L'ADN, étant chargé négativement, il migre, soumis à un courant électrique, du pôle négatif vers le pôle positif. Cette migration est réalisée dans une cuve horizontale, dans un gel d'agarose et dans du tampon TBE 1X. Pour réaliser les dépôts, un tampon de charge est ajouté à chaque échantillon. Pour observer cette migration, on introduit du Bromure d'Ethidium (BET), qui s'intercale dans les molécules d'ADN et qui le rend fluorescent sous lumière UV. Le BET peut soit être intégré directement dans la préparation du gel ou après migration des fragments, le gel est alors immergé dans le BET. Un marqueur de taille est aussi déposé pour la migration. Il existe plusieurs marqueurs de taille couvrant une gamme de poids moléculaires différents, il sera utile pour estimer la taille des fragments inconnus.

1.4. *Dosage de l'ADN*

Classiquement on dose l'ADN par spectrophotométrie en UV. Pour réaliser ce dosage en microquantité on utilise un Nanodrop. C'est un spectrophotomètre qui permet de travailler sur des microvolumes. Il crée une colonne avec la goutte déposée pour ensuite envoyer un courant et mesure l'intensité qui arrive à traverser la colonne. La mesure se fait à 260nm mais des mesures connexes sont faites à 230 et 280nm pour évaluer les contaminations protéiques et ARN. Néanmoins quand l'ADN a été préparé

avec des phénols, la méthode UV conduit à de grosses erreurs. Des méthodes adaptées existent mais elles ne sont plus/pas disponibles au laboratoire.

Nous ferons une évaluation comparative sur gel d'agarose avec un ADN génomique de porc correctement dosé. Comme il s'agit d'évaluer un smear (trainée d'ADN de différentes tailles), nous utiliserons cet ADN en le soniquant au préalable.

2. Présentation de la méthode pour préparer de l'ADN-FAIRE-

Nous avons choisi de suivre et d'adapter le protocole proposé par Giresi et Lieb en 2009 [2]: Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements est une technique qui permet d'isoler l'ADN libre de nucléosomes d'un tissu. En fait la même équipe a proposé 3 protocoles, qui divergent peu (Giresi et Lieb, 2009 [2] ; Simon et al., 2012 [5] ; Simon et al., 2013 [6]) mais le plus complet est le dernier paru. La fraction ADN-FAIRE caractérise les gènes actifs dans un tissu donné.

La préparation de l'ADN-FAIRE contient un certain nombre d'étapes (Figure-2, page 5), dont certaines ont déjà été décrites précédemment. Nous avons représenté la préparation de l'ADN-total (Figure-3, page 5).

➤ La fixation

La fixation permet de fixer les protéines à l'ADN. Giresi et Lieb (2009) [2] proposaient d'utiliser du formaldéhyde (solution commerciale à 37% avec 10 à 15% de méthanol, non disponible au laboratoire). Au laboratoire, cette étape de fixation est utilisée dans d'autres protocoles et après de nombreuses années de préparation de la solution de formaldéhyde à partir de paraformaldéhyde en poudre, l'équipe *Cytogen* utilise depuis quelques mois une solution commerciale ultrapure à 16%(sans méthanol). Nous avons opté pour cette solution qui était identifiée « paraformaldéhyde » sur le premier lot utilisé mais qui est maintenant vendu avec une étiquette « formaldéhyde ». La fin de la fixation est assurée par l'ajout de glycine.

➤ Préparation de noyaux et lyse des noyaux

La préparation des noyaux et leurs lyses permettent de libérer l'ADN recherché par l'utilisation de saponine déjà expérimentée sur des tissus porcins. De plus nous avons choisi les solutions tampons les plus simples.

➤ Sonication

La sonication permet de traiter un échantillon aux ultrasons. Cette technique permet de casser l'ADN en fragments (cassures mécaniques au hasard) dont la taille dépend des paramètres de sonication (volume à soniquer, temps de sonication, nombre de cycles). Cette sonication s'accompagne d'une montée en température de l'échantillon et il est préférable de faire plusieurs cycles de courte durée plutôt qu'une seule sonication de longue durée. Il faut mettre au point cette étape par essais successifs car le résultat dépend de l'appareil utilisé, du type de contenant, du tissu. Il nous faut obtenir des fragments de 200 à 400pb.

Dans notre solution d'ADN soniqué, on est censé trouver des fragments ADN-protéines et des fragments ADN (Figure-3).

➤ Purification-précipitation ADN

Nous pratiquons une extraction au phénol puis une seconde avec le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le phénol (saturé en Tris-HCl, pH8) va permettre d'extraire les protéines avec ou sans ADN. L'ADN libre de nucléosomes (phase aqueuse) peut être précipité avec deux volumes d'éthanol à 100%. Quand la quantité d'ADN est très faible, il est préférable d'ajouter un entraîneur de précipitation, nous utiliserons du glycoène.

Pour vérifier la taille des fragments obtenus, nous utiliserons une électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

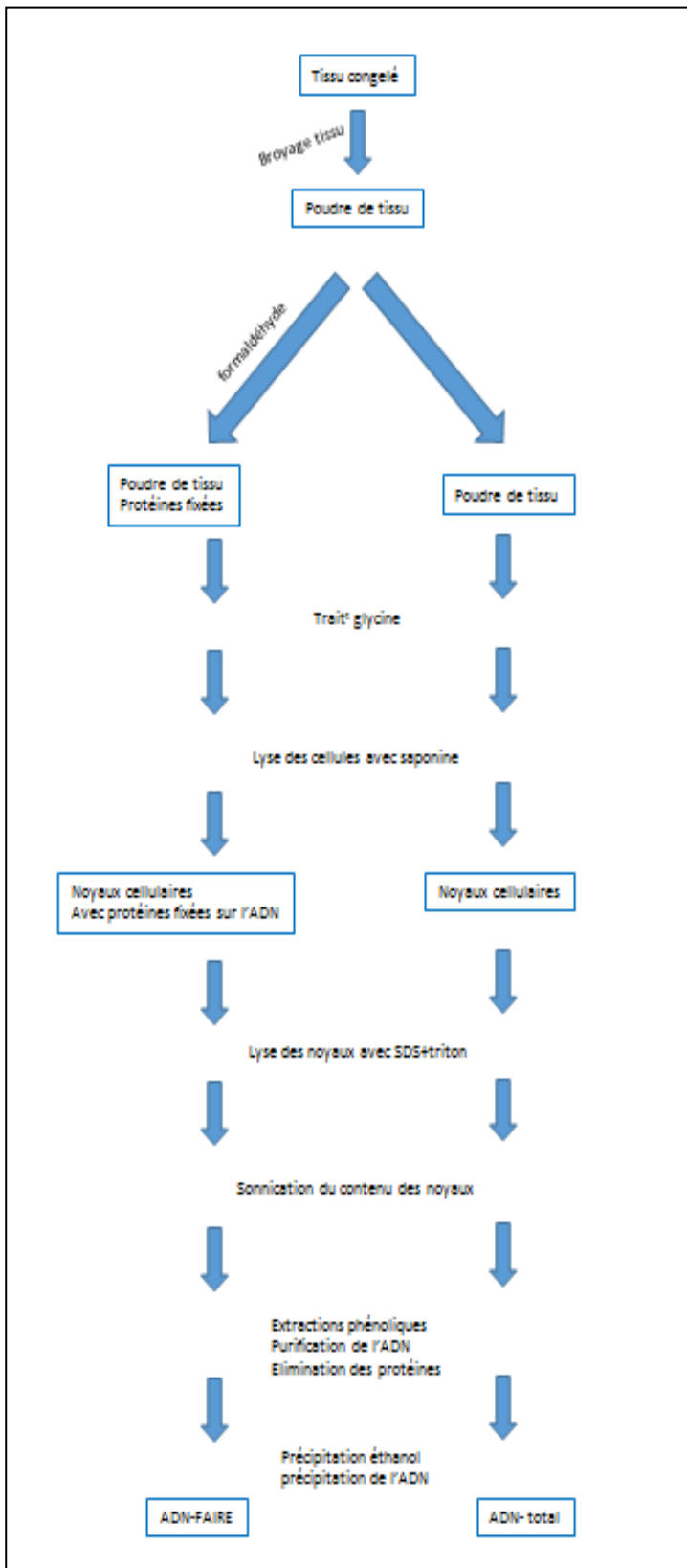


Figure-2 : Les étapes de la préparation de l'ADN-FAIRE et de l'ADN total.

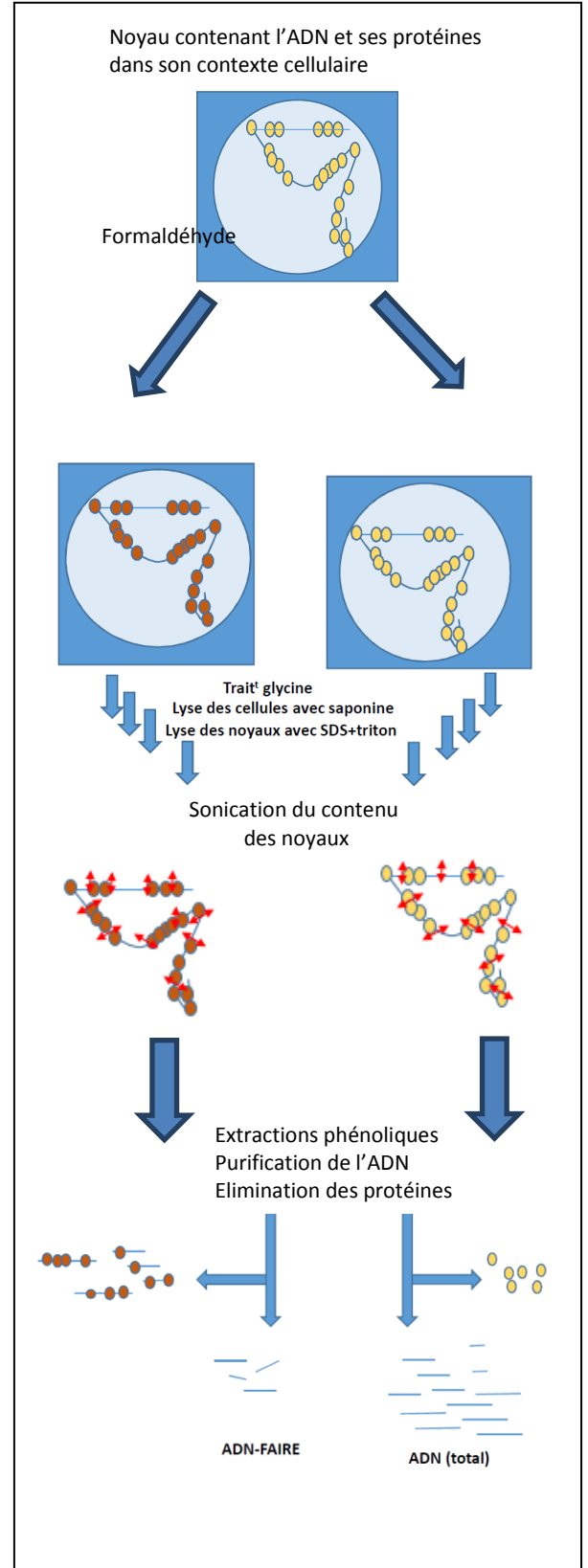


Figure-3 : Visualisation des étapes clés de la préparation de l'ADN-FAIRE et de l'ADN, au niveau moléculaire

Matériel et Méthodes

Dans cette partie, je vais décrire le protocole pour réaliser la préparation de l'ADN-FAIRE (Figure-5, page 9).

1. Broyage des échantillons

Les échantillons ont été prélevés en abattoir, puis découpés en morceaux avant d'être congelés dans de l'azote liquide (-195°C) puis conservés à -80°C à Rennes. Une centaine d'échantillons nous ont été envoyés, transportés en carboglace.

Après avoir identifié tous les échantillons reçus, nous sélectionnons ceux retenus pour ce protocole. Les échantillons retenus sont ensuite broyés puis mis en poudre. La poudre sera conservée dans un tube identifié par un code barre, rangé dans une boîte identifiée par un deuxième et enfin la boîte sera rangée dans un rack d'un congélateur -80°C identifié par un troisième code barre. Les échantillons non broyés seront laissés dans leur sachet initial et mis dans une boîte « code-barrée ».

Pour l'obtention des poudres, nous travaillerons dans l'azote et nous utiliserons un broyeur à billes de type MM400. Il permet de réduire en poudre de petits morceaux de tissus congelés par une agitation de deux plots en inox fermés contenant chacun 5 ou six petits fragments de tissus et une bille en inox. Toutes les manipulations se font à une température la plus basse possible et, nous utiliserons les plots refroidis préalablement dans l'azote liquide. Il faut faire attention à travailler vite pour éviter le réchauffement de l'échantillon. La conservation des poudres est assurée par un congélateur à -80°C.

2. ADN-FAIRE

2.1. *Échantillons*

Nous avons décidé de travailler sur 300mg de tissus. Cette étape consiste à peser ces 300mg en faisant toujours attention de travailler dans l'azote pour ne pas décongeler les échantillons. Classiquement le rendement est supérieur à 1µg d'ADN total par mg de tissu.

2.2. *Fixation et lavages*

Pour procéder à la fixation, nous avons introduit 10ml de PBS dans les tubes contenant la poudre pesée pour ensuite travailler sur un lit de glace. Nous fixons tout d'abord les protéines à l'ADN avec 625µl de formaldéhyde-ultrapur (acheté en ampoule 10ml à 16% pour permettre une meilleure conservation), de façon à avoir une concentration de 1% finale, durant 15 min. Pendant ces 15 min, nous agitions le contenu des tubes par quelques retournements avant de les redéposer sur la glace. Puis nous ajoutons 500µl de la glycine à 2.5M (concentration finale de 250 mM) pour bloquer cette fixation (agitation-glace-5min). Nous effectuons ensuite 3 lavages avec 10ml de PBS : 3 centrifugations successives durant 5min à 300g (1400rpm) à 4°C pour récupérer les cellules fixées. Cette étape se réalise dans la glace : la fixation pouvant être levée par la chaleur.

Le formaldéhyde (ou formol) est un produit dangereux notamment par inhalation et contact, aussi toutes ces manipulations sont réalisées sous sorbonne et avec des gants. De plus, les déchets contenant ce produit seront gérés et évacués pour une destruction adéquate.

2.3. *Lyse des cellules et préparation des noyaux*

Le culot de l'étape précédente est repris par 7ml d'une solution tampon constituée de 10 mM de Tris-HCl pH7.5, 10 mM de NaCl, et 3 mM de MgCl₂. Il faut remettre en suspension les cellules avant d'ajouter 700µl de saponine blanche à 2% pour obtenir une concentration en détergent de 0.2% finale.

Ajouter le détergent après la remise en suspension a au moins deux intérêts : la remise en suspension n'est pas gêné par la mousse et la saponine en solution ne se conserve pas plus d'une semaine. Cette lyse se réalise en une dizaine de minutes à 4°C avec une agitation douce. Puis nous centrifugeons à 900g (2300rpm) à 4°C pour enlever le surnageant et obtenir un culot de noyau. Cette étape se réalise dans la glace.

2.4. Lyse des noyaux

Le culot de noyaux est repris par 2ml d'une nouvelle solution tampon constitué de 150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 8, 10% de glycérol et 1mM d'EDTA. Puis nous ajoutons 200µl d'une solution de triton à 20%, et 200µl d'une solution de SDS à 10%. Cette lyse se réalise en une dizaine de minutes à 4°C avec une agitation douce (« roue » d'agitation). Une centrifugation éventuelle permet de d'éliminer les débris cellulaires. Cette étape se réalise dans la glace ou à 4°C.

2.5. Sonication

La sonication est réalisée avec l'appareil bioruptor UCD200Tm (*Diagenode*). Cet appareil permet d'envoyer des ultrasons dans une cuve pour casser l'ADN. Cette cuve doit être remplie d'eau froide avant d'y introduire les tubes d'échantillons. La sonication se fait à raison de cycles de 30 secondes ON et 30 secondes OFF (30s/30s)

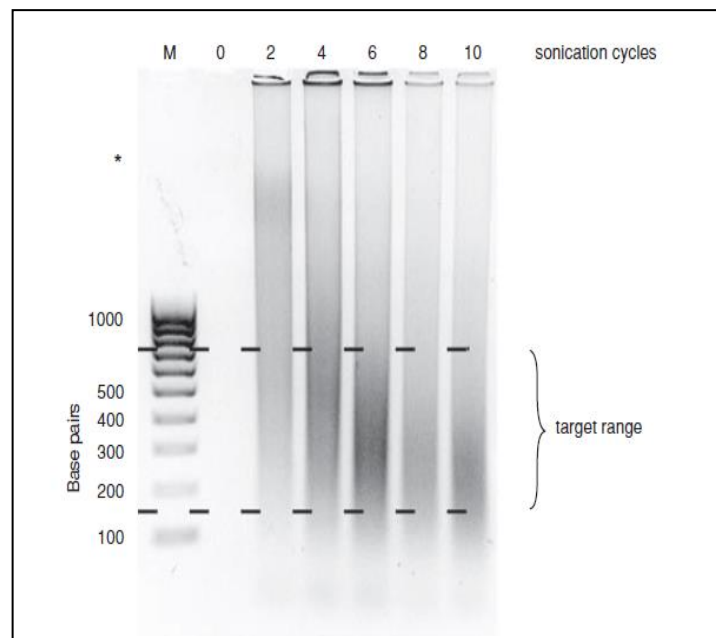


Figure-4 : Visualisation sur gel d'agarose du résultat des cycles de sonication d'après SIMON et al. 2012 [5] / 2013 [6]

SIMON et al. (2012, 2013) [5 ; 6], montrent le résultat de la sonication (Figure-4). Dans leurs conditions, nous pouvons observer que 4 et 6 cycles de sonication donnent les meilleurs résultats : l'ensemble des fragments sont compris entre 150pb et 800pb. Nous souhaitons obtenir un résultat similaire. Pour ce faire, nous serons obligés de tester de nombreuses conditions. Pour réaliser ces tests, l'ensemble de l'ADN (2ml) sera soniqué à un nombre de cycles « minimal » puis nous conduirons une fraction de 300µl jusqu'au terme du protocole pour juger l'effet des paramètres choisis. Ensuite si la sonication constatée est insuffisante, on peut poursuivre la fragmentation sur le reste de l'échantillon congelé.

2.6. Extractions phénoliques

Cette phase se réalise à température ambiante. Les volumes indiqués ici concernent la purification de 300µl d'ADN soniqué.

Nous ajoutons du phénol (saturé en tampon Tris-HCl, pH8) volume à volume à l'ADN, puis après une phase d'agitation douce de 10 min, l'ensemble est centrifugé (15min à 300g à 20°C). Nous récupérons le surnageant dans un nouveau tube. Nous rajoutons 200µl de TE (10mM-1mM) au phénol du premier tube utilisé afin de perdre le minimum de matériel. Le nouveau surnageant obtenu est ajouté au premier. Nous ajoutons ½ volume du surnageant en phénol et ½ volume du surnageant en mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Après une agitation de 2min, une centrifugation de 5min à 300g (1300rpm) à 20°C permet de récupérer le surnageant en évaluant son volume. Nous ajoutons ensuite 1/10 du volume récolté d'acétate de sodium à 3M, pH5.2 et deux fois le volume récolté d'éthanol à 100%. Les échantillons sont placés à -20°C pendant au moins deux heures puis centrifugés 30min à 4°C à 300g (1300rpm) pour récupérer le culot. Il est ensuite mélangé dans 200µl d'éthanol à 70%, après une agitation de 5min et une centrifugation de 5 min à 4°C à 300g (1300rpm) pour obtenir un culot. Le culot est séché durant 20min au speed vac à 45°C. Enfin nous suspendons le culot dans du TE 10/1 une nuit à 4°C pour une dissolution parfaite.

Le phénol, le chloroforme et l'alcool isoamylique sont des produits dangereux notamment par inhalation et contact, aussi toutes ces manipulations sont réalisées sous sorbonne et avec des gants. De plus, les déchets contenant ces produits seront gérés et évacués pour une destruction adéquate.

2.7. Précipitation à l'éthanol

L'ADN d'une solution aqueuse (volume=V) peut être rendu insoluble par l'addition d'éthanol 96% (2V). Il faut au préalable ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH5.2). Le temps de précipitation est d'au moins deux heures à -20°C. Ensuite une centrifugation importante (12000g, 30min) à 4°C permet de récupérer un culot. Après lavage avec de l'éthanol 70% et séchage, le culot est remis en suspension dans un volume judicieusement choisi de TE. Il est souhaitable de laisser ce culot se remettre en suspension quelques heures avant utilisation.

Pour les précipitations de faibles quantités d'ADN réalisaient, nous ajoutons 1µl de glycogène à 20mg/ml.

3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Suivant la taille des fragments que nous voulons observer, la concentration en agarose du gel sera différente. Pour l'ADN-FAIRE, les fragments seront compris entre 50 et 800 pb. Nous préparons donc un gel à 2% d'agarose dans du TBE 1X. L'agarose est solubilisé dans le tampon par chauffage à ébullition. Après refroidissement partiel (50/60°C), nous ajoutons du BET, avant de couler le gel dans son support, contenant un peigne qui formera les puits quand on l'enlèvera après complet refroidissement. Avant de déposer les échantillons dans les puits, un tampon de charge est ajouté (contenant du sucrose ou du glycérol pour alourdir l'échantillon et un colorant pour visualiser le dépôt). A côté des échantillons on utilisera un puits pour déposer un marqueur de taille. Celui utilisé au laboratoire est un marqueur de taille *ExactLadder-100pb* (OZYME). Ce marqueur est constitué de fragments de 100, 200,300pb jusqu'à 1000 et un à 1500.

Nous mettons la cuve d'électrophorèse remplie de TBE sous tension (adaptée à la taille de la cuve) en branchant les fils dans le bon sens (l'ADN va migrer de la borne négative vers la borne positive). Quand la migration est suffisante pour séparer les différents fragments du marqueur de taille (de 1h30 à 2h30), nous retirons le gel de la cuve pour le placer sur une table à UV. Les UV vont permettre de visualiser le BET qui s'est intercalé dans l'ADN. Si nous avons beaucoup d'échantillons, nous pouvons utiliser un peigne compatible avec la plaque 96 puits et l'usage d'un pipetman multicanaux.

Le BET est un produit dangereux parce qu'il s'intercale dans l'ADN, et est donc cancérigène aussi toutes ces manipulations sont réalisées avec des gants. De plus, les déchets contenant ce produit seront gérés et évacués pour une destruction adéquate.

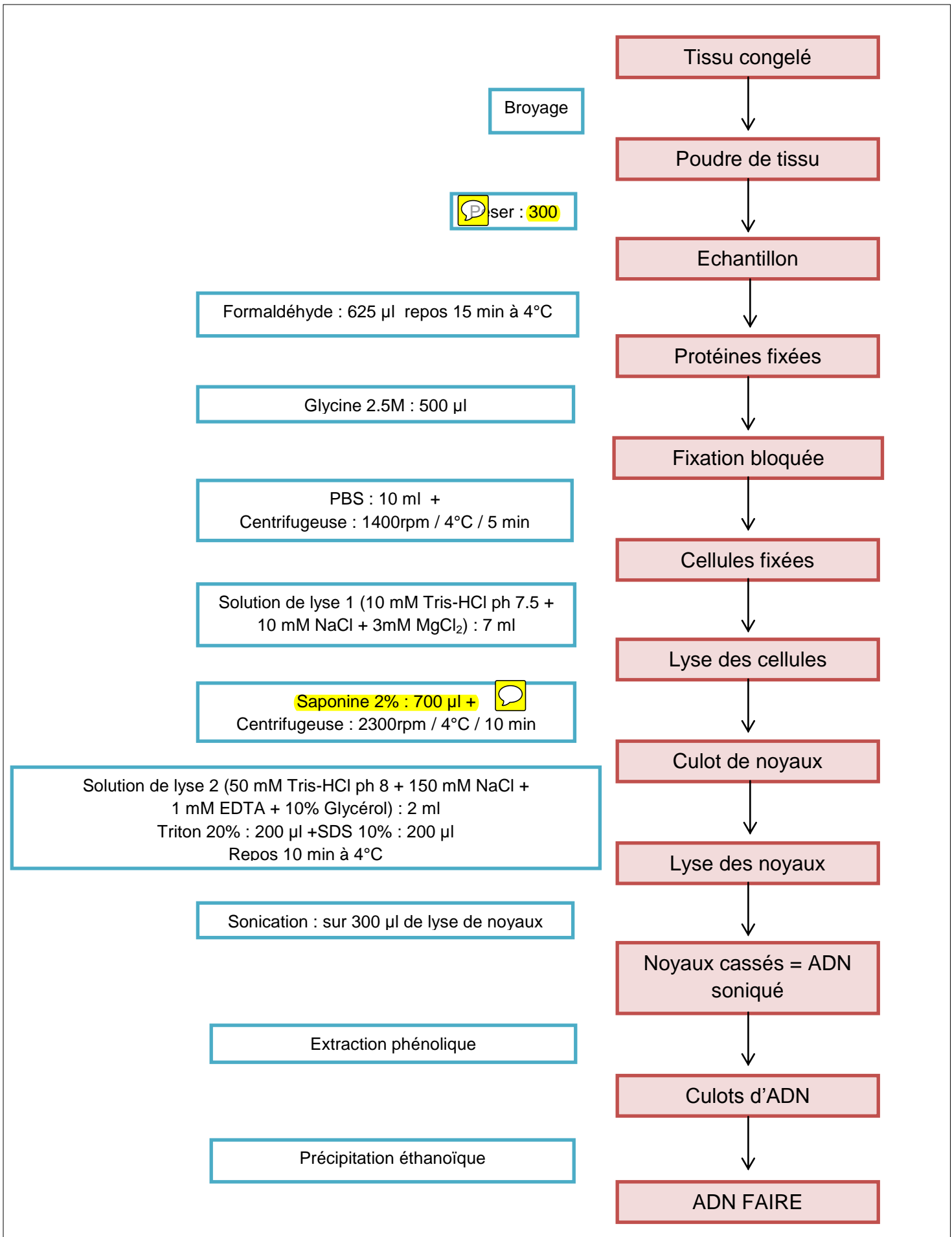


Figure-5: Les étapes de la préparation de l'ADN-FAIRE élaborer.

Résultats et Discussion

J'ai choisi de présenter les résultats dans l'ordre chronologique des essais réalisés. Il aurait été plus logique de replacer les paragraphes « retour sur la fixation, §5. » et « retour sur la préparation et la lyse des noyaux, §6. » dans l'ordre d'exécution du protocole complet mais leurs placements en fin de ce rapport illustrent bien le fait qu'en recherche, il est souvent nécessaire de revenir sur ce qui avait été considéré comme acquis.

1. Etape de fixation : choix et conséquences

Dans le protocole initial, la fixation des protéines sur l'ADN était réalisée au formaldéhyde en solution 37%. Cette étape de fixation étant réalisée au laboratoire, les chercheurs de l'équipe *CytoGen* nous ont conseillé de travailler plutôt avec du formaldéhyde ultrapur à 16%. Nous n'avons pas observé de conséquence sur la préparation d'ADN-FAIRE, mais nous ne pouvions pas faire de test comparatif.

D'après Giresi et Lieb (2009) [2], la fraction libre de l'ADN (ADN-FAIRE) doit représenter moins de 1/20 de l'ADN total. Pour évaluer ce rapport, ces auteurs proposaient de préparer l'ADN total en réalisant la fixation des protéines et en l'enlevant par un traitement à la chaleur en présence de protéinase K. Cette levée de fixation est efficace avec une fixation réalisée avec du formaldéhyde (Kennedy-Darling et Smith, 2014). Après un premier essai de levée de la fixation par la chaleur sans succès, nous avons préféré préparer l'ADN total en supprimant l'étape de fixation, ou plutôt en supprimant l'ajout de formaldéhyde. Ce choix de réaliser la fixation formaldéhyde-ultrapur plutôt qu'au formaldéhyde classique aura peut-être plus de conséquences que nous le pensions à ce moment (voir plus loin).

2. Préparation des noyaux et lyse

De nombreuses compositions de préparation de noyaux existent, nous avons opté pour une solution de composition relativement simple (Waki et al., 2011 [8]) avec peu de NaCl comme dans le protocole utilisé précédemment au laboratoire sur des tissus de porc. Nous avons testé deux détergents (Triton X-100 à 0.5% et saponine à 0.2%) sans observer de différence, mais nous avons préféré utiliser la saponine car elle avait déjà été utilisée au laboratoire sur des tissus de porc. A cette étape nous avons toujours observé un culot de noyaux et jamais de lyse de ces noyaux.

De nombreuses compositions de solution de lyse existent, nous avons opté pour une solution proposée par Jones et al. (2012) [3], qui avait été utilisée pour lyser des cellules (et pas des noyaux) dans une préparation d'ADN-FAIRE. Contrairement au tampon utilisé communément au laboratoire pour lyser les noyaux, il incluait une forte concentration en NaCl et du glycérol. Deux détergents étaient utilisés, le SDS et le Triton X-100. Les personnes qui avaient déjà préparé des noyaux et de l'ADN à partir de tissus de porc étaient très étonnés de l'absence de viscosité du produit de la lyse des noyaux. De plus, j'ai été obligée d'éliminer des débris par centrifugation (ils ne disparaissaient pas après l'ajout de SDS), ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant au laboratoire, mais qui avait été relaté dans les protocoles de préparation d'ADN-FAIRE (Jones et al., 2012 [3]). La suppression du glycérol, ou l'ajout plus tardif n'a rien changé au résultat de lyse.

3. Mise au point du protocole de sonication

Selon le protocole de Simon et al. (2013) [6], il était prévu de réaliser la sonication des 2ml issu de la lyse des noyaux cellulaires dans un tube de 15ml. Au début de ce stage, nous n'avions pas le portoir du sonicateur adapté à ces tubes et les premiers essais ont été réalisés en divisant le résultat de la lyse des noyaux en 6 tubes Eppendorf de 2.2ml contenant environ 300µl. Dans une première expérience, nous avons comparé l'effet du nombre de cycles.

Trois échantillons ont été testés : ADN-FAIRE d'un échantillon de foie, ADN-FAIRE d'un échantillon d'un échantillon de testicule, l'ADN préparé antérieurement à partir de rate d'un porc (méthode classique-2 décrite dans le paragraphe *Etude bibliographique*).

Après sonication et extraction de l'ADN sur chaque échantillon avec un nombre de cycle de sonication, de 15 à 25 cycles (30s/30s), nous avons effectué une électrophorèse sur gel d'agarose (Figure-6). Nous avons choisi ces nombres de cycles importants suite aux expériences menées par l'équipe *CytoGen*.

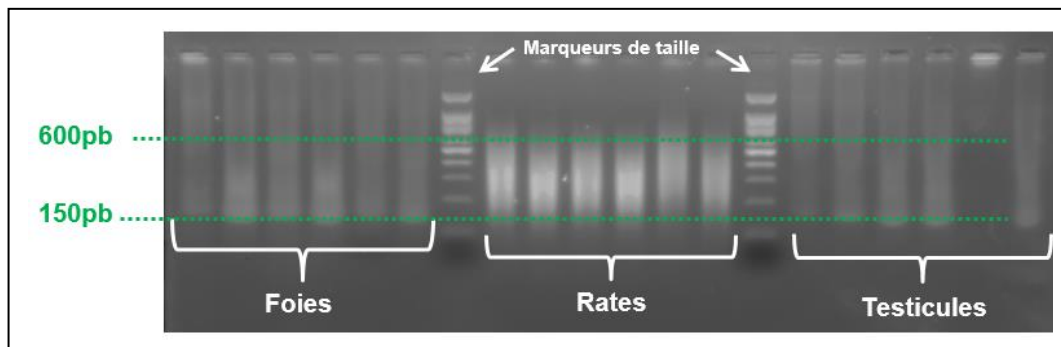


Figure-6 : Electrophorèse de l'ADN FAIRE d'un échantillon de foie, de l'ADN-FAIRE d'un échantillon de testicule, de l'ADN génomique préparé antérieurement à partir de rate : tous après sonication.

Les 6 puits successifs : 15 ; 17 ; 19 ; 21 ; 23 et 25 cycles de sonication (30s/30s). Gel d'agarose 2%.

Sur la figure-5, nous n'observons aucun effet du nombre de cycles de sonication. Nous en déduisons qu'au-delà d'un certain nombre de cycles, l'ajout de cycles de sonication supplémentaires n'a aucun effet. La fragmentation des ADN-FAIRE est ici un peu trop poussée par rapport à notre objectif, il va falloir opérer avec moins de cycles de sonication. L'ADN issu de rate soniqué lors de cette expérience présente un smear et nous connaissons sa concentration. Nous nous servirons désormais de cet ADN comme référence lors des prochaines électrophorèses pour évaluer les quantités d'ADN de smear.

Ayant reçu le portoir approprié pour des tubes de 15ml, nous avons réalisé de nouveaux tests de sonication. Dans les protocoles de Simon et al. (2012 et 2013) [5 ;6], le nombre de cycles de sonication proposé est de 4 à 6 cycles : nous avons le même appareil et maintenant les mêmes tubes. Néanmoins ces auteurs réservent la technique de sonication pour l'extraction de l'ADN-FAIRE de cellules issues de cultures in vitro. Pour les tissus, ils préconisent plutôt l'usage d'un agitateur à billes. Nous avons préféré rester sur la sonication, plus facilement compatible avec le fait que nous avons plusieurs échantillons à traiter en parallèle. Nous avons aussi choisi d'ajouter une centrifugation (1min à 4°C à 44g) avant la sonication pour n'avoir aucun débris qui pourrait compromettre la sonication. Après sonication et extraction de l'ADN sur chacun des échantillons avec quatre cycles de sonication (30s/30s), nous avons effectué une électrophorèse sur gel d'agarose.

Nous avons considéré quatre échantillons de foie issus de quatre animaux différents (Figure-7). Visiblement quatre cycles de sonication (30/30s) permettent d'avoir de l'ADN-FAIRE fragmenté. De plus les quatre échantillons paraissent homogènes en quantité. Néanmoins, on s'étonne de la quantité récupérée et de la présence de bandes à l'intérieur du smear et un smear placé un peu bas en taille. Nous avons réalisé la même expérience à partir de quatre testicules. Nous observons très difficilement le smear d'ADN-FAIRE (Figure-8) et nous sommes obligés de conclure que la quantité d'ADN-FAIRE est ici insuffisante pour pouvoir la visualiser correctement. Afin d'optimiser la précipitation de l'ADN, nous ajouterons désormais du glycogène (macromolécule qui va servir d'entraîneur) pour la précipitation à l'éthanol.

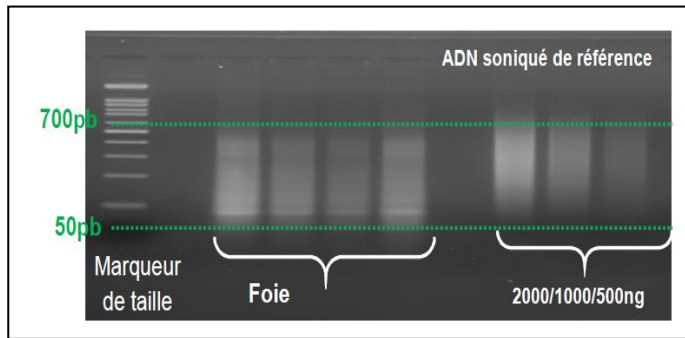


Figure-7 : Test de sonication avec 4 cycles (30s/30s) sur 4 échantillons de foie

Chaque dépôt correspond à l'ADN-FAIRE de 13.5mg de foie. Gel d'agarose 2%.

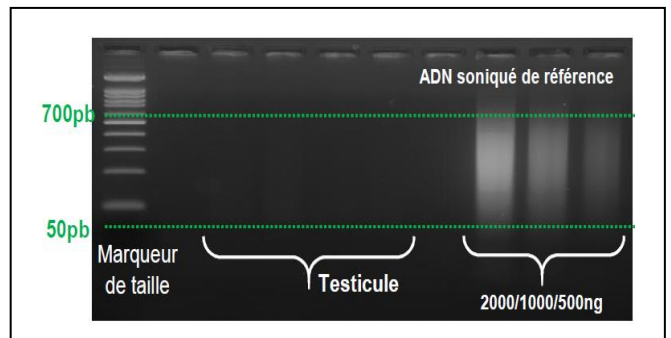


Figure-8 : Test de sonication avec 4 cycles (30s/30s) sur 4 échantillons de testicules

Chaque dépôt correspond à l'ADN-FAIRE de 13.5mg de testicule. Gel d'agarose 2%.

4. Tentatives de préparations d'ADN-FAIRE

A partir de maintenant, nous utiliserons les vrais échantillons sélectionnés. En effet, les expériences précédentes ont été réalisées avec des échantillons similaires, disponibles dans le congélateur -80°C, et avec du phénol qui était dans le frigo depuis plus d'un an. Nous avons racheté du phénol mais celui livré était saturé en eau, livré toutefois avec un kit pour le saturer en tampon Tris-HCl. Il faut savoir que le phénol saturé en eau (phénol acide) est utilisé pour préparer les ARN. Avant d'utiliser ce phénol, nous avons ajouté la solution proposée par le fournisseur mais aussi ajouté du tampon Tris-HCl pH8, 500mM et mis sous agitation pendant plusieurs heures.

Nous avons sélectionné 10 échantillons de foie et 10 de testicules : quatre échantillons de foie et de testicules devant servir pour le séquençage final, les autres échantillons sont destinés à faire des tests PCR.

Nous avons décidé de partir de 300mg de foie ou de testicule, de faire 4 cycles de sonication et de faire la purification de l'ADN-FAIRE sur une fraction de 300µl des 2ml du produit de sonication. Toutes les précipitations à l'éthanol seront réalisées avec du glycogène. L'ADN-FAIRE du foie sera repris dans 50µl de TE et celui du testicule dans 25µl, l'ADN total sera repris dans 250µl. Sur le gel d'agarose à 2%, 15µl de chaque échantillon seront déposés.

Les résultats ont été très décevants et irréguliers : très peu ou trop d'ADN-FAIRE. Nous avons observé des smears qui étaient très lumineux et toujours aussi bas, même avec deux cycles de sonication (voir Figure-9).

Sur la Figure-8, l'ADN total n'apparaît pas suffisamment soniqué après deux cycles de sonication, il lui faudrait plusieurs cycles supplémentaires. Être obligé de soniquer 10 cycles l'ADN non fixé et faire moins de deux cycles pour l'ADN fixé n'est pas un résultat normal. Au moment de la sonication, nous avons la même quantité de matériel dans le tube issu de la fixation et celui qui n'a pas subi de fixation. Si on veut purifier la fraction 100/400pb, il faut que ces fragments soient générés. Il est difficile de croire que la fixation des protéines permette une meilleure accessibilité des ultrasons pour casser l'ADN. De plus, l'allure du smear d'ADN-FAIRE ne nous inspire pas confiance : n'y aurait-il pas de l'ARN dans ce smear ? Pourtant nous travaillons à température ambiante, à partir de noyaux, avec du phénol neutre, avec une précipitation à l'éthanol type ADN : tout normalement pour déplaire à l'ARN.

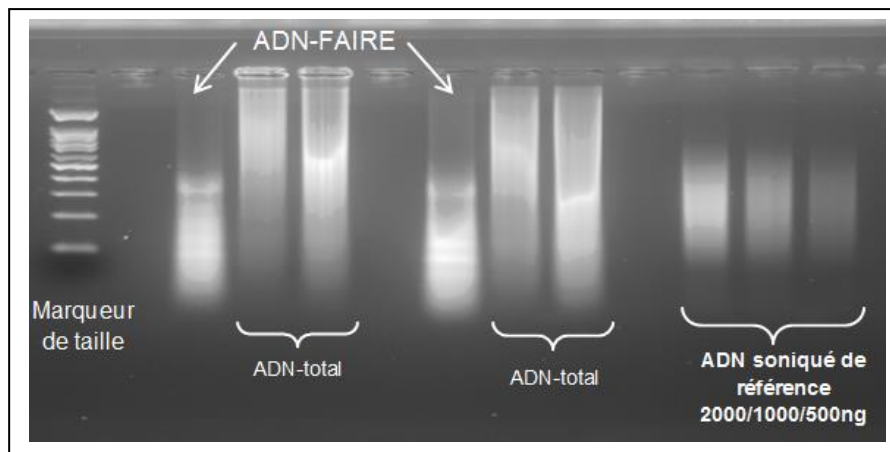


Figure-9 : Tentative de préparation de l'ADN-FAIRE et de l'ADN total, ici après deux cycles de sonication (30s/30s)

Ici on a déposé l'ADN-FAIRE (Foie) de 27mg de tissu et l'ADN total (Foie) de 0.9 et 2.7mg de tissu. Fixation 1% en formaldéhyde mais seulement deux cycles de sonication. Gel d'agarose 2%.

En référence : 2000, 1000 et 500 ng d'ADN issu de rate et soniqué

5. [Retour sur la fixation](#)

Pour tester ces différentes hypothèses nous avons travaillé à partir de 4 échantillons de foie du même animal, ils ont été traités avec quatre quantités de formaldéhyde (0, 0.4, 0.7 et 1% finale) sans modifier le temps de fixation de 15min. Le point zéro est similaire à de l'ADN total. Le point 1% correspond à ce que nous faisons précédemment pour l'ADN-FAIRE. Précédemment, nous avons introduit une centrifugation avant la sonication et dans la littérature, elle était placée après la sonication (Jones et al., 2012 [3]) et un ajout de triton était réalisé (Smith et al., 2012 [7]). Très honnêtement, depuis le départ, la lyse des noyaux ne nous satisfaisait pas : nous attendions un échantillon visqueux avant la sonication. Nous avons travaillé sur la quantité de détergent mais sans effet évident. Aussi nous avons décidé de tester ces deux alternatives avec zéro, deux et dix cycles de sonication (30/30s).

Pour ce faire, nous avons centrifugé le produit de la lyse des noyaux, trois tubes de 0.3ml de surnageant ont été prélevés, nous avons re-mélangé le produit de la lyse des noyaux et trois autres tubes de 0.3ml ont été prélevés. Les conditions de sonication ne sont plus identiques à ce que nous avons testé précédemment et le test sur le déplacement de la centrifugation après la sonication n'est pas très rigoureux, mais nous n'avons pas les moyens de faire autrement. Les précipitations ont été réalisées en présence de glycogène et tous les ADN-FAIRE du foie ont repris dans 50µl de TE (250µl pour l'ADN total). Après une nuit à 4°C, 25µl de chaque échantillon a été traité avec une RNase (1µl de RNase A à 10µg/µl) pendant 1h à 37°C. Nous avons diminué le pourcentage d'agarose du gel pour essayer de visualiser l'ADN insuffisamment cassé. Sur le gel d'agarose à 1%, 10µl de chaque échantillon ont été déposés.

Il faut préciser que même si nous avons travaillé à partir de la poudre de foie d'un seul animal, l'échantillon traité avec 0.7% de formaldéhyde a, tout le long de la préparation des noyaux, donné l'impression d'être plus riche (culot de noyaux beaucoup plus important).

L'analyse comparée de Figure-9A (sans RNase) et de la Figure-9B (après RNase) montre qu'une bonne partie des smears observés est en fait de l'ARN. Par contre la présence d'une bande de haut poids moléculaire (Figure-9A) dans certains échantillons alors qu'elle est absente dans ces mêmes échantillons après RNase, est sans doute due à l'hétérogénéité de ces échantillons.

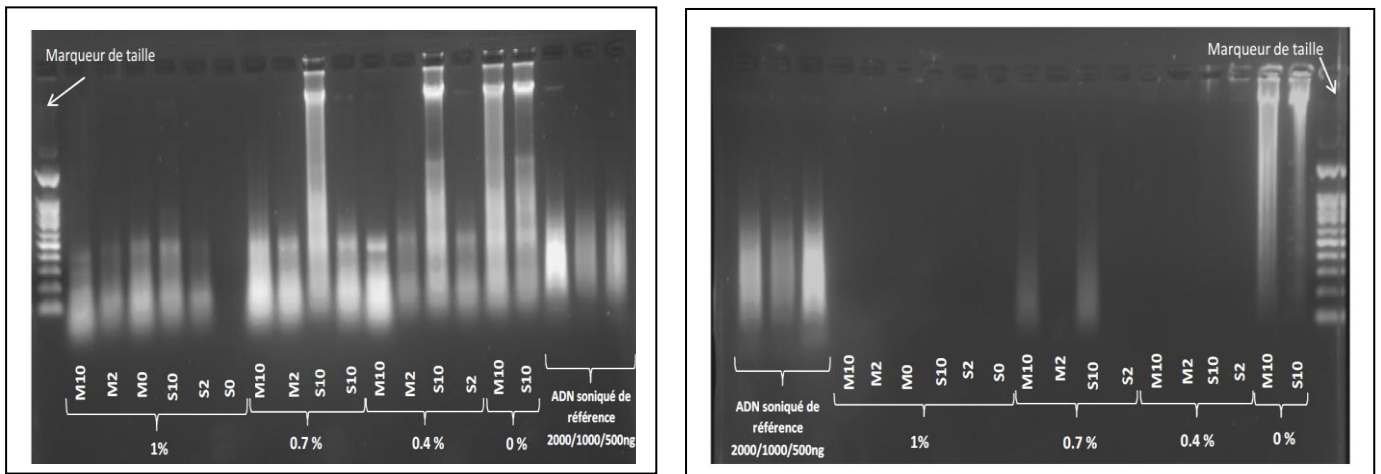


Figure-10 A et 10 B : Etude des conditions de fixations (% de formaldéhyde-ultrapur) et des conséquences sur la lyse des noyaux.

Dans chaque puit on a donc déposé l'ADN-FAIRE de 3/100 des 300mg de foie ou l'ADN total de 3/500 des 300mg de foie. Gel d'agarose 1%.

S : centrifugation avant sonication

M : centrifugation après sonication + ajout de Triton

Pour l'échantillon traité par à 0% de formaldéhyde : c'est l'échantillon non fixé, où nous sommes censés récupérer 100% de l'ADN :

- on voit bien que 10 cycles de sonication sont insuffisants : il reste encore de l'ADN qui a du mal à entrer dans le gel. (Figure-10B)
- Il ne faut pas conclure que la sonication est plus efficace sur le produit de la lyse des noyaux que sur le surnageant de cette lyse. Les échantillons sont trop hétérogènes (comparer 10A et 10B dans les hauts poids moléculaires) et le gel d'agarose 1% n'est pas adapté pour faire cette comparaison.

Pour l'échantillon à 0.7% :

- 10 cycles de sonication du surnageant (Figure-10B) de la centrifugation placée avant (0.7%-S10) ou du produit de la lyse des noyaux centrifugé après sonication (0.7%-M10) donne exactement le même résultat : le smear ne comporte plus de bandes et nous n'avons plus de matériel de taille inférieure à 100pb à l'intérieur du smear.
- Avec 10 cycles de sonication (Figure-10B), il est difficile d'être convaincu que l'on a 1/20 de l'ADN total (0%-M10) de 9mg de tissu (on attend $9\mu\text{g}/20$ soit 450ng et on a environ 150ng).
- 2 cycles de sonication (Figure-10B) ne permettent pas de libérer suffisamment de matériel FAIRE-DNA.

Pour les échantillons traités par 0.4 et 1% de formaldéhyde, la quantité de matériel déposée est insuffisante. Par chance l'échantillon 0.7% était biologiquement plus riche que les autres. La présence d'une bande de haut poids moléculaire, difficilement attribuable à des ARN (Figure 10A), dans les échantillons 0.4%-S10 et 0.7% -S10 est aussi une information intéressante : les régions libres de nucléosomes sont de petites régions de moins de 1000pb, aussi il est difficile d'imaginer que des fragments de la fraction FAIRE puissent avoir une taille de plusieurs kilobases. Les extractions au phénol n'ayant pas éliminé ces ADN, il s'agit vraisemblablement d'une fixation incomplète. Visiblement il n'y a pas lieu de diminuer la quantité de formaldéhyde lors de l'étape de fixation.

Nous avons donc essentiellement un problème de faible quantité d'ADN-FAIRE masqué trop souvent par de l'ARN.

Pourquoi nous avons maintenant de l'ARN dans nos préparations d'ADN-FAIRE ? Probablement à cause de l'introduction du glycogène lors des précipitations à l'éthanol. Nous aurions pu aussi incriminer le phénol, mais le changement de flacon ne coïncide pas avec les problèmes observés.

Lors d'un nouvel essai de préparation de l'ADN-FAIRE où nous avons l'intention de tester la sonication, nous avons observé une viscosité importante de l'échantillon non fixé. Nous avons préparés les noyaux pour deux tubes « fixé » et « non fixé » à partir de 300mg de foie (même animal). Après la lyse des noyaux, l'échantillon « non fixé » présentait une viscosité exceptionnelle et aucun culot après la centrifugation post-lyse. Cette viscosité et cette absence de culot était le témoin d'une lyse complète des noyaux. Depuis le départ nous avons l'impression que la lyse des noyaux était incomplète mais pourquoi pour cet échantillon, elle était maintenant optimale ?

6. Retour sur la préparation des noyaux et leur lyse

De nombreux protocoles existaient dans la littérature pour préparer des noyaux et aussi au laboratoire. Jusqu'à présent nous avons préféré utiliser un protocole déjà expérimenté pour la préparation de l'ADN-FAIRE. Néanmoins nous avons fait un mix avec une préparation de noyaux proposés par Waki et al. (2011) [8] et une lyse des noyaux par une méthode proposée pour la lyse des cellules.

Nous sommes donc retournés vers la littérature (Tableau-1) et nous avons répertorié un certain nombre de protocoles de préparation d'ADN avec ou sans préparation de noyaux. Jusqu'à présent nous avons préparé les noyaux avec de la saponine en présence d'une faible quantité de NaCl (10mM).

Lyse des cellules			
Gaulton et al. 2010	10mM Tris-HCl pH8 100mM NaCl 1mM EDTA	1 % Triton 0,1% SDS 0,1% Na deoxycholate	
Giresi and Lieb 2009 Simon et al. 2012 Simon et al.	10mM Tris-HCl pH8 100mM NaCl 1mM EDTA	2% Triton 1% SDS	
Jones et al. 2012	50mM Tris-HCl pH8 150mM NaCl 10% Glycérol	2% Triton 1% SDS	
Protocole utilisé au laboratoire rate porc	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	0,5% SDS	

	Préparation noyaux	Lavages noyaux	Lyse noyaux		
Gaulton et al. 2010	50mM HEPES-KOH pH8 140mM NaCl 1mM EDTA	0,1% SDS 0,1% Na deoxycholate	50mM HEPES-KOH pH8 140mM NaCl 1mM EDTA	1 % Triton 0,1% SDS 0,1% Na deoxycholate	
Smith et al. 2012 Giresi and Lieb 2009	50mM HEPES-KOH pH7,5 140mM NaCl 1mM EDTA 10% Glycérol	0,5% NP-40 0,25% Triton	10mM Tris-HCl pH8 200mM NaCl 1mM EDTA 0,5mM EGTA	10mM Tris-HCl pH8 100mM NaCl 1mM EDTA 0,5% LaurylSarcosine	
Waki et al. 2011	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 3mM MgCl2	0,5% NP-40		50mM Tris-HCl pH8 1mM EDTA ajout de NaCl après sonication	1% SDS
Protocole utilisé au laboratoire Hybrides cellulaires	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	0,2% Saponine		10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	0,5% SDS
Protocole utilisé lors de la première partie de ce stage	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 3mM MgCl2	0,2% Saponine essai comparatif Triton		50mM Tris-HCl pH8 150mM NaCl 1mM EDTA 10% Glycérol	2% Triton 1% SDS essai sans glycérol

Tableau-1 : Inventaire des protocoles de préparation de l'ADN (sans ou avec préparation de noyaux)

La lyse des noyaux a été faite en présence de glycérol 10% et d'une quantité importante de NaCl (150mM) avec deux détergents (SDS et Triton X-100). Quand on regarde l'expérience du laboratoire en matière de cellules et de noyaux, on comprend mieux pourquoi nous avons accordé peu d'importance à la composition des solutions de lyse et que nous nous étions focalisés sur le choix du détergent (§2.). Nous avons décidé de ne pas revenir sur le détergent utilisé pour préparer les noyaux (saponine) et sa quantité mais d'essayer l'introduction de lavages des noyaux afin d'éliminer la saponine. Par contre nous sommes revenus sur le détergent utilisé pour la lyse des noyaux : nous soupçonnions qu'une trop forte quantité de SDS pouvait déstructurer les protéines. D'autre part un protocole de préparation d'ADN-FAIRE à partir de noyaux, proposé par Smith et al. (2012) [7], utilisait le glycérol, non pas pour la lyse des noyaux mais pour la préparation de ceux-ci. Enfin, nous sommes revenus sur la présence de MgCl2 dans la solution de préparation des noyaux (Waki et al., 2011 [8]), qui nous a paru bien inopportune (activation des DNases !), les autres auteurs préférant mettre un agent chélatant (EDTA ou EGTA) pour éviter que les DNases soient fonctionnelles.

Nous ne pouvons pas tester toutes les possibilités aussi nous avons privilégié le protocole déjà utilisé au laboratoire (test-3) et celui proposé par Gaulton et al. (2010) [1]. Les différentes solutions utilisées sont présentées dans le Tableau-2. Les tests -1 et -2 ont en commun la préparation des noyaux et leurs lavages. Les quatre tests-1 et les quatre test-2 ont été faits à partir d'une seule préparation de cellules fixées, de même les huit tests-3. Les tests -2 et -3 ont en commun la lyse des noyaux. Pour le test-3, le tampon utilisé est commun aux trois étapes.

	Préparation noyaux		Lavages noyaux	Lyse noyaux	
Protocole utilisé lors de la première partie de ce stage	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 3mM MgCl2	0,2% Saponine		50mM Tris-HCl pH8 150mM NaCl 1mM EDTA 10% Glycérol	2% Triton 1% SDS
Protocole test-1	10mM Tris-HCl pH8 140mM NaCl 1mM EDTA 10% Glycérol	0,2% Saponine	10mM Tris-HCl pH8 200mM NaCl 1mM EDTA	50mM Tris-HCl pH8 150mM NaCl 1mM EDTA	Essais comparatifs 1% SDS +2% Triton T1-A 0,5% SDS T1-B 0,5% LaurylSarcosine T1-C 1% Triton T1-D
Protocole test-2	10mM Tris-HCl pH8 140mM NaCl 1mM EDTA 10% Glycérol	0,2% Saponine	10mM Tris-HCl pH8 200mM NaCl 1mM EDTA	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	Essais comparatifs 1% SDS +2% Triton T2-A 0,5% SDS T2-B 0,5% LaurylSarcosine T2-C 1% Triton T2-D
Protocole test-3	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	0,2% Saponine	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	10mM Tris-HCl pH8 10mM NaCl 10mM EDTA	Essais comparatifs 1% SDS +2% triton T3-A 0,5% SDS T3-B 1% SDS T3-2B 0,5% LaurylSarcosine T3-C 1% LaurylSarcosine T3-2C 1% Triton T3-D 2% Triton T3-2D 0,5% LaurylSarcosine + 0,5% SDS T3-BC

Tableau-2 : Description des solutions utilisées lors des tests de préparation de noyaux et de lyse.

Nous avons donc réalisé différents essais de préparation de noyaux et de lyse (Tableau-2) : à partir d'un même échantillon de foie, nous avons comparé la préparation des noyaux et leur lyse. Après la lyse des noyaux (après l'agitation de 15 min avec le détergent), nous avons regardé l'aspect de l'échantillon (visqueux ou liquide) pour évaluer la quantité d'ADN. Ces échantillons ont été conservés une nuit à 4°C puis agités de nouveau pendant 4h, toujours à 4°C, avant de regarder si la viscosité de l'échantillon avait évolué. Pour terminer, nous avons fait des cycles de sonication : après chaque série de deux cycles

(30s/30s), le tube était retourné 3 fois avant de regarder sa viscosité. Nous avons noté le nombre de cycles permettant d'observer la disparition de la viscosité.

		Après 15 min de lyse (avec détergent, agitation, 4°C)	Après une nuit (avec détergent, 4°C) et 4h (avec détergent, avec agitation, 4°C)	Nombre de cycles de sonication (30s/30s) nécessaires pour faire disparaître la viscosité												
Protocole utilisé lors de la première partie de ce stage		<table border="1"> <tr><th>Fixé</th><th>Non fixé</th></tr> <tr><td>liquide</td><td>le plus souvent liquide</td></tr> </table>	Fixé	Non fixé	liquide	le plus souvent liquide	<table border="1"> <tr><th>Fixé</th><th>Non fixé</th></tr> <tr><td></td><td></td></tr> </table>	Fixé	Non fixé			<table border="1"> <tr><th>Fixé</th><th>Non fixé</th></tr> <tr><td></td><td></td></tr> </table>	Fixé	Non fixé		
Fixé	Non fixé															
liquide	le plus souvent liquide															
Fixé	Non fixé															
Fixé	Non fixé															
Protocole test1		Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé									
	T1-A	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	4	4									
	T1-B	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	6	6									
	T1-C	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	VISQUEUX	4	4									
	T1-D	liquide	liquide	liquide	liquide											
Protocole test2		Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé									
	T2-A	VISQUEUX	VISQUEUX	liquide	liquide											
	T2-B	VISQUEUX	VISQUEUX	liquide	liquide											
	T2-C	VISQUEUX	VISQUEUX	liquide	liquide											
	T2-D	liquide	liquide	liquide	liquide											
Protocole test3		Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé	Fixé	Non fixé									
	T3-A	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		4									
	T3-B	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		6									
	T3-2B	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		4									
	T3-C	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		4									
	T3-2C	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		8									
	T3-D	liquide	liquide	liquide	liquide											
	T3-2D	liquide	liquide	liquide	liquide											
	T3-BC	liquide	VISQUEUX	liquide	VISQUEUX		6									

Les résultats sont présentés dans le Tableau-3.

Visiblement les noyaux issus de cellules fixées au formaldéhyde-ultrapur sont plus difficiles à lyser que les ceux issus de noyaux non-fixés. En effet alors que les conditions -3 permettent de lyser des noyaux issus de cellules non fixées (on retrouve les résultats déjà observés au laboratoire), elles ne permettent pas de lyser les noyaux issus de cellules traitées par le formaldéhyde-ultrapur. Avec des cellules ayant subies la fixation par le formaldéhyde-ultrapur, la présence d'une forte quantité de NaCl et/ou du glycérol lors de la préparation des noyaux paraît indispensable à moins que ce ne soit le lavage avec un tampon riche en NaCl. Il faut préciser que dans tous les cas, les noyaux sont obtenus, mais seules ces conditions de préparation et/ou de lavage permettent d'obtenir des noyaux « lysables ». Les cellules non fixées paraissent moins sensibles à ce problème.

Des essais comparatifs de conditions de lyse, nous pouvons déduire que le Triton X-100, même à 2%, n'est pas efficace (Tests T3-D et T3-2D non fixé) et que la composition du tampon de lyse des noyaux en Tris-HCl pH8 (50 ou 10mM) et/ou en NaCl (150 ou 10mM) n'a aucune influence (Tests T1 et T2) sur la lyse proprement dite. Par contre les conditions 2 ne permettent pas de préserver l'ADN obtenu. Les conditions 1 permettent d'obtenir des noyaux « lysables » et de préserver l'ADN. Les conditions -3 ne permettent d'obtenir les noyaux « lysables » qu'en l'absence de fixation mais elles permettent de préserver l'ADN quand la lyse a fonctionné. Les conditions -2 et -3 sont équivalentes pour les conditions de lyse mais la quantité de NaCl a toujours été basse lors des trois étapes des conditions 3 alors que

dans les conditions -2 la concentration de sels évolue de 140/200 puis 10mM. Dans les conditions -1, la quantité de NaCl est quasi stable (140/200/150mM).

Pour travailler, nous avons donc le choix entre les conditions T1-B et T1-C. Pour des raisons pratiques, nous choisissons les conditions T1-B avec du SDS, même si nous avons observé pour certains échantillons un précipité blanc de SDS, du au stockage à 4°C (précipité réversible), étape non nécessaire à la préparation de l'ADN.

Les essais de sonication ne montrent pas de différence entre l'ADN issu de cellules fixées ou non. Néanmoins cette comparaison est très limitée puisqu'ici on ne regarde que les fragments de taille supérieure à 30kb. Nous devons reprendre ces essais de sonication avec le contrôle de la taille de l'ADN par une électrophorèse sur gel d'agarose. Les essais de sonication reportés dans le tableau-3 montreraient aussi que la quantité de détergent aurait une influence sur le nombre de cycles nécessaires à la disparition de la viscosité (T3-C et T3-2C ; T1-A et T1-B).

Plus il y a de détergent lors de la lyse, plus le nombre de cycles nécessaires à la disparition de la viscosité augmente, ce qui sous-entend que la quantité d'ADN augmente. Il est donc préférable de ne pas lésiner sur la quantité de détergent pour lyser tous les noyaux.

Les meilleures conditions pour préparer les noyaux, les laver et les lyser paraissent être les conditions 1, mais nous augmenterons la concentration de SDS à 1% pour être sûr de lyser tous les noyaux.

7. Protocole proposé

Voici le protocole retenu (Figure-11). L'optimisation de la sonication reste à faire. Nous proposons de faire au minimum 6 cycles de sonication (30s/30s).

Nous avons observé des résultats similaires lors des sonications de 300µl dans des tubes Eppendorf de 2.2ml et les sonications de 2ml dans des tubes de 15ml. Néanmoins nous éviterons d'essayer les conditions intermédiaires.

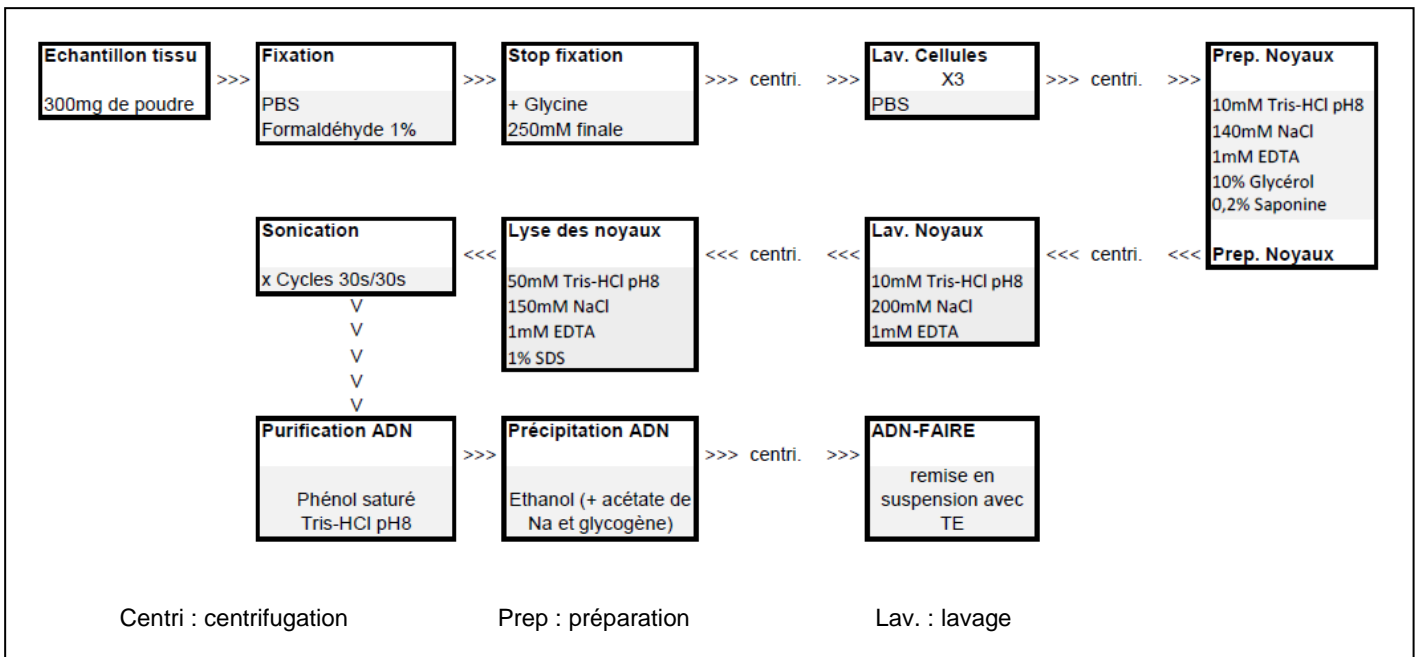


Figure-11 : Représentation schématique du protocole proposé pour la préparation de l'ADN-FAIRE

Conclusions

Alors que les protocoles proposés considéraient essentiellement des cellules issues de culture in vitro, nous avons dû adapter le protocole de préparation d'ADN-FAIRE à notre matériel biologique et nos conditions de travail.

Nous avons dès le départ choisi de travailler à partir de noyaux. Nous avons testé deux **détergents** mais nous sommes revenus à la saponine déjà utilisée au laboratoire. Nous nous sommes aussi intéressés au glycérol présent lors de la lyse des noyaux, qui est ici pour protéger les protéines, mais visiblement il n'empêche pas la lyse des noyaux. Au départ, nous nous étions donc polarisé sur le choix du détergent pour préparer les noyaux. Néanmoins, nous soupçonnions une lyse incomplète des noyaux préparés.

Nous avons dès le départ choisi de travailler à partir de noyaux mais nous avons fait l'erreur de penser que cela nous dispenserait de l'étape de RNase, déjà proposée dans les protocoles publiés. Les ARN présents dans nos préparations d'ADN-FAIRE sont probablement des ARN nucléaires. Le problème peut être résolu facilement avec l'ajout de la RNase en fin de préparation. Néanmoins pour obtenir un ADN propre, il faudra de nouveau faire des extractions phénoliques et une précipitation à l'éthanol.

La sonication reste à mettre au point, non seulement pour l'ADN-FAIRE mais aussi pour l'ADN total. Il nous faudra vérifier en particulier que ces deux types d'ADN réagissent de manière similaire aux cassures par les ultra-sons. Si une proportion de l'ADN ainsi fixé est insensible à la sonication, le fait de préparer l'ADN-total sans fixation plutôt que par levée de la fixation après la sonication va nous conduire à des rendements maximisés pour l'ADN total et surtout à une impression négative et diminuée du rendement de la préparation de la fraction de l'ADN-FAIRE.

Jusqu'à présent, nous avons eu l'impression que les rendements en ADN-FAIRE étaient plus faibles pour le testicule que pour le foie. Le volume des noyaux issus de 300mg de foie a toujours été beaucoup plus important que celui issu de 300mg de testicule.

La plupart de ces conclusions sont issues d'expériences réalisées avec une lyse des noyaux très partielle. Il reste à vérifier que les conditions de préparation et de lyse de noyaux mises au point seront applicables pour le foie et le testicule et donneront des résultats reproductibles. La quantité de cycles de sonication reste à mettre au point, nous avons déjà cerné les difficultés de cette étape et nous savons que nous devons donner la priorité à la taille des fragments de la fraction FAIRE plutôt qu'à la quantité. Pour les calculs de rendements, nous travaillerons certainement avec le même nombre de cycles de sonication pour la fraction FAIRE et l'ADN total, même si nous avons une sonication partielle. Pour la dernière partie du protocole, nous pensons que le fait d'avoir beaucoup plus d'ADN avant la sonication **ne devrait pas nous obliger à modification notre protocole post-sonication.**

Nous avons remplacé la fixation à 1% en formaldéhyde par une fixation à 1% en formaldéhyde-ultrapur. Nous n'avons pas noté de conséquence pour la préparation de l'ADN-FAIRE mais nous n'avons jamais réalisé d'essais comparatifs. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à lever cette fixation avec le protocole proposé pour le formaldéhyde classique, ce qui sous-entendait que cette fixation était plus forte que celle habituellement pratiquée.

Enfin, pour finir ce stage, j'ai essayé le protocole proposé sur un échantillon de foie et un autre de testicule : aucune lyse évidente des noyaux n'a été observée. Après discussion avec l'équipe *Cytogen* (qui rencontre aussi quelques difficultés à passer au formaldéhyde-ultrapur), il nous paraît évident qu'il serait intéressant de faire un essai comparatif de fixation avec du formaldéhyde classique. En effet le formaldéhyde-ultrapur (sans méthanol) est connu pour être un fixateur beaucoup plus puissant et plus rapide que le formaldéhyde classique.

Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction)

Lieu de la SPV : INRA- Laboratoire de génétique animale et physiologie animale (GenPhySE)

Durée : ½ journée

Acteurs : Annie ROBIC (maitre de stage) et moi-même

Description, mission réalisée, objectif :

Pour amplifier in vitro un fragment d'ADN pour ensuite pouvoir l'étudier, l'ADN est mélangé à un milieu réactionnel constitué des 4 dNTP, d'ion magnésium, de tampon nécessaire au fonctionnement de l'enzyme et de la Taq polymérase qui permet la synthèse du second brin. Cette synthèse se fait à partir de couple d'amorces. Le mélange réactionnel contient donc deux amorces permettant de sélectionner le fragment à amplifier. J'ai dû contrôler le bon fonctionnement de 16 couples d'amorces sélectionnés pour leurs utilisations sur des échantillons importants.

Détail des activités vécues :

- Préparer des échantillons avec du TE
- Préparer et diluer des couples d'amorces suivant l'intensité voulue
- Distribuer des amorces dans les puits de la plaque PCR
- Distribuer du mix PCR d'écrit précédemment dans chaque puits
- Distribuer des échantillons dans les puits
- Placer la plaque PCR dans un thermocycleur et lancer le séquençage
- Valider les résultats par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%

Analyse :

- De la mission :

Les acquis professionnels :

Cette manipulation m'a permis de m'interroger sur le principe de cette technique ainsi qu'à sa procédure. J'ai pu ainsi acquérir une meilleure connaissance et utilisation du thermocycleur. De plus j'ai pu observer l'efficacité de la traçabilité par code-barres pour retrouver les échantillons et les couple d'amorces.

Difficultés rencontrées et les moyens mis en œuvres pour les surmonter :

Lors de la lecture du gel d'agarose, nous avons constaté que plusieurs couples d'amorces ne fonctionnaient pas comme on le souhaitait. En effet, il n'amplifiait pas correctement l'ADN voulu.

Nous avons réfléchi à plusieurs solutions pour essayer de remédier à ce problème. Tout d'abord nous avons pensé à remplacer les couples d'amorces qui ne marchaient pas et en tester des nouveaux. Ensuite, nous nous sommes interrogés sur l'étape de l'hybridation qui consiste à séquençer les brins complémentaire grâce aux amorces et à modifier sa température. Et enfin, nous avons aussi réfléchi sur la concentration en $MgCl_2$ qui peut empêcher le séquençage de se faire avec certain couple d'amorces.

- Personnelle :

J'ai pu apprendre les gestes adéquates ainsi que le fonctionnement d'un thermocycleur qui m'aidera pour les TPs qui comprennent la technique de la PCR. Je dois essayer d'être plus minutieuse et plus précise sur la préparation des échantillons et amorces ainsi que sur les dépôts sur le gel d'agarose.

- Perspectives :

Mon maitre de stage ou un technicien de laboratoire  pourra maintenant sélectionner la solution pour surmonter le problème rencontré ainsi qu'utiliser les couples d'amorces fonctionnels.