

Introduction

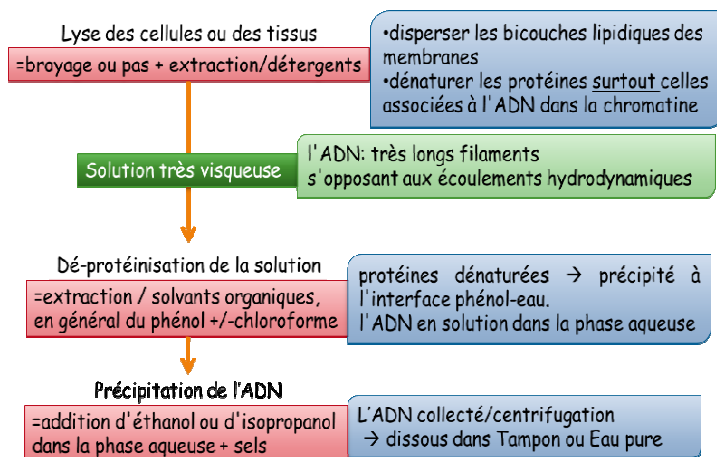
Le génie génétique Ensemble de techniques permettant de modifier le patrimoine héréditaire d'une cellule par la manipulation de gène in vitro. C'est encore l'utilisation de techniques in vitro pour l'isolement, la manipulation, la recombinaison, et l'expression des gènes, ainsi le développement d'OGM.

I. Méthodes d'extraction et de purification du matériel génétiques

La purification des acides nucléiques constitue l'étape clé de toutes les études de génétique moléculaire. Selon le type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et selon le matériel de départ (cellules, organes,...) la première étape a pour objectif l'extraction. Par la suite une série de méthodes adaptées au type d'acides nucléiques (ADN génomiques ou plasmidiques, ou ARN) est appliquée à l'extrait.

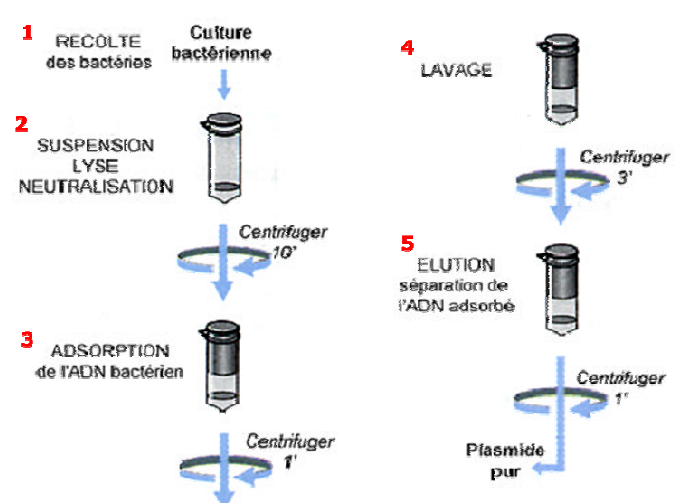
1.1. Extraction de l'ADN : technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire. Différents protocoles pour extraire l'ADN avec même schéma de principe : •Lyse des cellules •Elimination des protéines •Elimination des autres acides nucléiques (ARN...) •Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Fig.1 : Préparation d'ADN génomique



Pour éliminer les ARNs → Traitement par l'ARNase.

Fig.2 : extraction des plasmides



1.2. Extraction de l'ARN : L'ARN extrait → hybridation (Northern blot), banques ADNc, RT-PCR...

Différents critères pour extraire l'ARN

- Lyse cellulaire mécanique (congélation, billes de céramique ou détergents) ou enzymatique (lysozyme)
- Protection des ARN de l'action des ARNases.

- Les différences de propriétés physico-chimiques ARN/protéines (agents de dénaturation de protéines)

NB : Parmi les acides ribonucléiques extraits des cellules, les ARN messagers = ARNm = classe la plus étudiée : chromatographie d'affinité entre la queue poly(A) et une colonne dont la phase fixe est pourvue de fragments d'oligo(dT) de quelques dizaines de nucléotides qui peuvent s'hybrider avec les RNA poly(A).

1.3. Extraction de plasmides (voir figure 2)

II. Dosage des acides nucléiques

1. Dosage quantitatif : Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à **260 nm** pour évaluer la quantité de l'ADN et l'ARN.

2. Dosage qualitatif : le rapport $R = A_{260nm}/A_{280nm}$ constitue un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN ou ARN par les protéines.

L'ADN pur : $R \approx 1.8$ / L'ARN pur : $R \approx 2.0$

III. Séparation des acides nucléiques

1. Electrophorèse sur gel : technique de séparation de molécules chargées (ici Acides nucléiques) en les soumettant à un champ électrique. La séparation se fait en fonction de taille (AN chargés négativement).

- ❖ Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur.
- ❖ Les principaux polymères utilisés : agarose et polyacrylamide. Le réseau de mailles constituant le gel forme un tamis moléculaire à l'intérieur duquel les molécules d'ADN ou d'ARN migrent en fonction de leur poids moléculaire. La taille des mailles varie selon la concentration du polymère ce qui définit la gamme de taille des acides nucléiques à séparer.

2. Les différents types d'électrophorèse des acides nucléiques

- ❖ **Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose** : permet de séparer l'ADN génomique et les fragments d'acides nucléiques de taille moyenne, ex : contrôle de qualité, Southern et northern blot, marqueurs moléculaires...

Le Contrôle de qualité des AN a lieu après la purification et a pour but de vérifier l'intégrité de l'acide nucléique.

- ❖ **Electrophorèse verticale sur gel de polyacrilamide** (PAGE, *poly-acrylamide gel electrophoresis*) permet de séparer les fragments d'ADN de petite taille (de 1 à 1 000 nucléotides), ex. séquençage

- ❖ **Electrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé** (PFGE) permet de séparer des fragments d'ADN double brin dont la taille peut varier de 220 000 à 2 500 000 paires de bases. (PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis).

3. Le suivi de migration des AN dans le gel se fait à l'aide des marqueurs de mobilité (colorants visibles : ex : bleu de bromophénol) et des marqueurs de taille pour l'identification (dans le puits de référence).

4. La révélation des acides nucléiques en fin de séparation se fait par du bromure d'éthidium (BET) : un agent chimique intercalent de l'ADN qui devient cent fois plus fluorescent sous illumination ultra-violette lorsqu'il est lié à l'ADN.