

Extraction & observation d'ADN

L'ADN est présent partout, dans toutes les cellules vivantes. **Il est le même partout**, dans toutes les cellules, les nôtres, les cellules animales ou végétales !

Vu qu'il est le même partout et bien qu'il soit microscopique, il est facile de l'isoler à partir d'un très grand nombre de cellules.

Il est donc possible d'extraire de l'ADN à partir d'aliments divers, faciles à trouver, tels que les petits pois, les bananes ou bien encore les œufs de poisson. Nous utiliserons lors de nos expérimentations des **kiwis** comme matière première ou des **oignons**.

(L'expérience est aussi faisable à partir de vos propres cellules buccales)

INTRODUCTION DE LA SEANCE

Discussion avec les élèves pour tester ce qu'évoque pour eux la notion d'ADN.

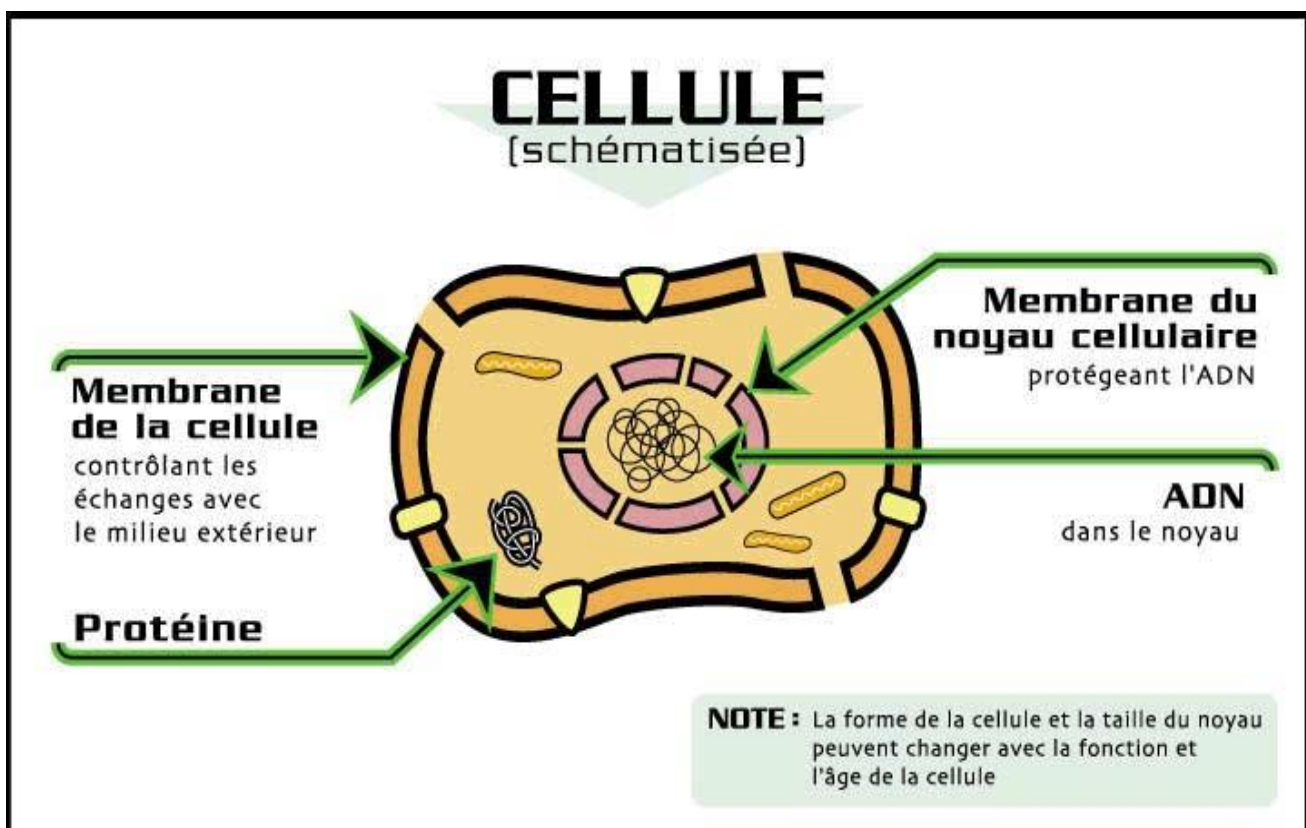
ADN, c'est quoi ?

Nature chimique : **A**cide **D**ésoxyribo **N**ucléique

Nucléique, cela évoque quoi ?

Le noyau de la cellule, qui contient l'ADN.

Schéma très simplifié d'une cellule eucaryote (qui contient un noyau protégé par une membrane) :



Quel est le rôle de l'ADN ?

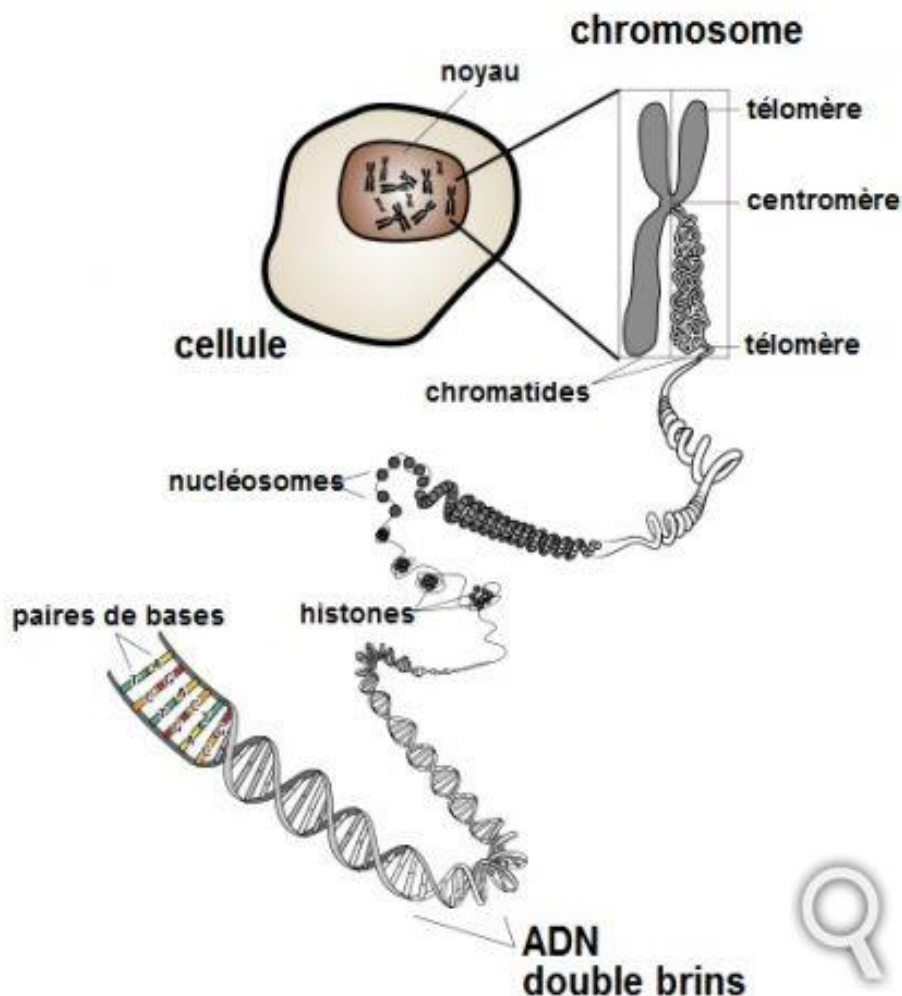
L'ADN constitue la molécule support de **l'information génétique héréditaire**. On pourrait le comparer au disque dur de la cellule.

A quoi sert l'information portée par l'ADN ?

A assurer l'ensemble des fonctions cellulaires et permettre à la cellule de se reproduire. Dans un organisme supérieur, que ce soit un végétal ou un animal, aussi simple soit-il, il y a plusieurs types de cellules, voire beaucoup de types de cellules, avec des aspects différents, des métabolismes différents (une cellule nerveuse n'est pas une cellule musculaire) mais **elles ont toutes le même ADN !**

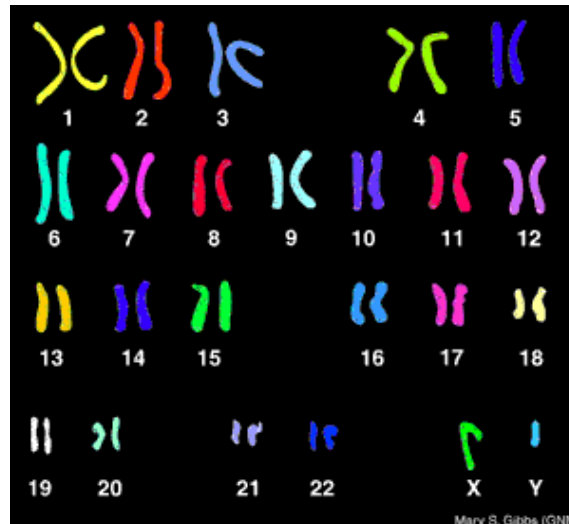
Comment se structure l'ADN dans le noyau ?

Dans le noyau, l'ADN forme une **double hélice**, comme le montre le schéma ci-dessous. Cette hélice s'entoure de protéines, les **histones** pour former des **nucléosomes**. Ces nucléosomes forment des « chapelets de perles » qui s'enroulent de manière compacte pour former le **chromosome** :



Donc : les cellules ont toutes le même ADN mais... suivant l'espèce, elles n'ont pas le même nombre de chromosomes.

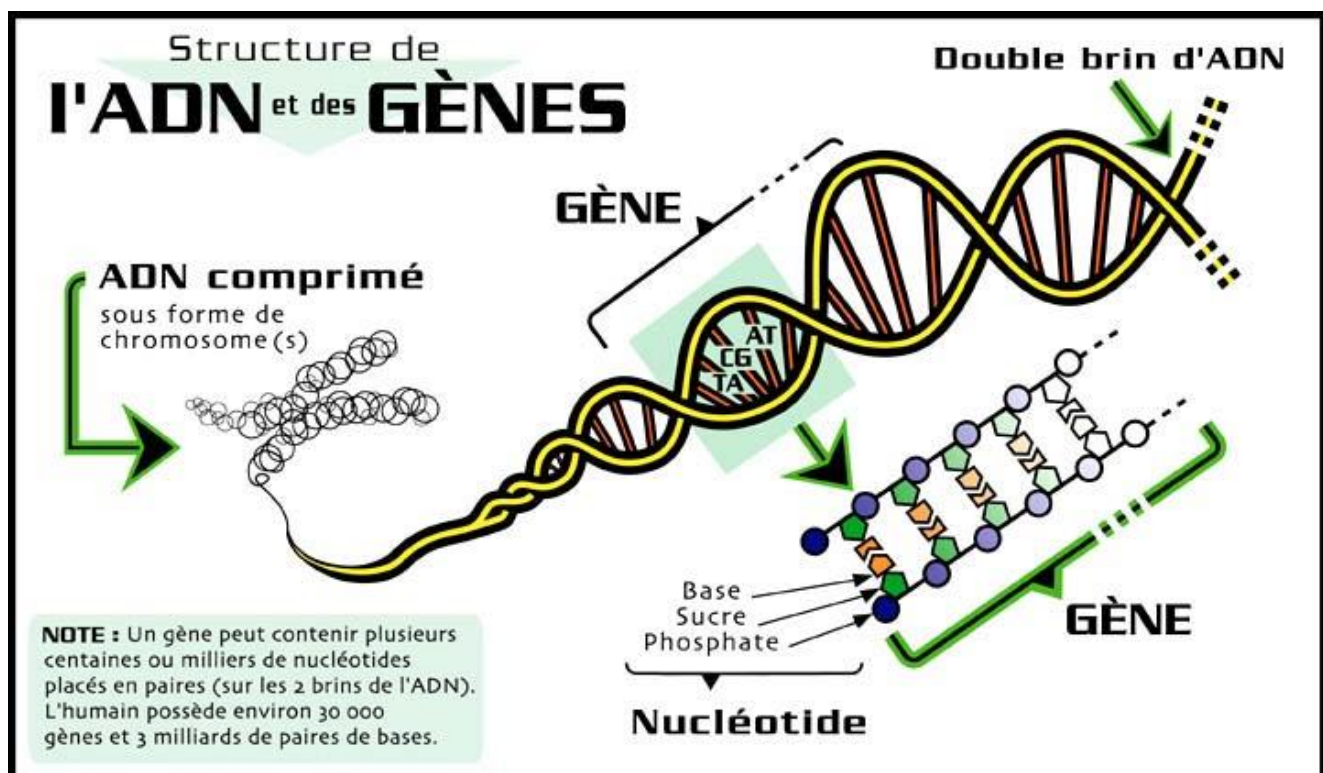
Par exemple, nos cellules contiennent 46 chromosomes :



Et les cellules d'oignon contiennent 16 chromosomes !

Allons encore plus loin : qu'est-ce qu'un gène ?

Un gène est un segment de chromosome :



Les gènes sont les unités responsables de l'**hérédité**. Ils contrôlent les caractères et aptitudes propres à un organisme. Le nombre de gènes humains est estimé aux alentours de 32000 gènes.

Comment ça marche ?

Les gènes contiennent l'information pour fabriquer les protéines (principaux constituants de la cellule) grâce à un code : le **code génétique** qui est universel à tout le monde vivant.

Pour résumer, on peut voir l'ADN comme le plan de montage de l'organisme. Un peu comme un disque dur d'ordinateur, il contient toutes les informations nécessaires à la fabrication et la survie d'un organisme.

Aujourd'hui, nous allons procéder à l'extraction de l'ADN des cellules d'oignon et de kiwi. Une cellule est microscopique ; l'ADN l'est aussi !

Comment allons-nous procéder pour voir quelque chose?

Pour obtenir des quantités manipulables d'ADN, nous allons prendre beaucoup de cellules car elles ont toutes le même ADN !

EXTRACTION DE L'ADN ET OBSERVATION (activité d'environ 60 minutes)



Matériel & équipement nécessaire pour chaque groupe (3 élèves max)

Oignon, banane ou kiwi : 1 (+/- 100 g)
Eau distillée : 100 ml
Sel de cuisine : 3 g
Produit vaisselle : 10 ml
Alcool (Éthanol 95 %) froid : 3 ml
Bleu de méthyle : quelques gouttes
Couteau & planche à découper
3 pipettes pasteur de 3 ml
1 tube à essai
1 porte tube à essai
1 entonnoir
1 filtre à café
1 erlenmeyer de 250 ml
1 béchers de 400 ml
2 verres de montre
1 cuillère en plastique
1 pince fine

A partager :

1 microscope + lame & lamelle
1 balance de précision
Stock sel
Stock produit vaisselle
Stock Alcool (Ethanol 95%) froid
Stock Bleu méthyle

Mode opératoire

Remarque préliminaire : pour pouvoir procéder à l'extraction de l'ADN à partir de kiwi ET de cellules buccales au cours de la même séance de laboratoire, il faut commencer l'expérience avec un végétal (éplucher, hacher, mélanger avec l'eau, ajouter de détergent et laisser agir). Pendant que le mélange repose, on peut recommencer l'opération avec les cellules buccales.

Procédure d'extraction :



- Éplucher et hacher l'oignon (ou le kiwi) en petits morceaux.

Pourquoi est-il nécessaire de hacher finement l'oignon ?

Hacher et mélanger l'oignon permet de briser et déchiqeter les tissus de l'oignon afin de faciliter les étapes ultérieures.

- Mélanger dans un bécher l'eau, le sel et les morceaux d'oignon.
- Ajouter le produit vaisselle et mélanger à nouveau.

Qu'observes-tu ? Et pourquoi ?

Les fragments d'oignon ramollissent progressivement car le liquide vaisselle dissout les membranes cellulaires et dénature les protéines.

En effet, pour extraire l'ADN, il faut que le noyau sorte de la cellule. Les sels et le savon à vaisselle contenus dans la solution dégradent la membrane des cellules d'oignon, la membrane nucléaire du noyau et les protéines qui seraient toujours liées à l'ADN.

- Laisser agir quelques minutes (~15 min.)

Si vous avez à disposition un bain marie : incuber le mélange à 60°C

L'augmentation de température accélère le processus de rupture des membranes et désactive certaines enzymes telles que la DNase qui dégrade l'ADN. Attention, chauffé trop longtemps et/ou à température trop élevée, l'ADN se fragmente → ne pas dépasser 15 min dans le bain marie.

- Écraser les morceaux d'oignon contre la paroi avec la cuillère.

Si vous avez utilisé un bain marie : refroidir le mélange sur de la glace

Maintenir le mélange à la température la plus froide possible permet de ralentir la destruction de l'ADN due à la température élevée (bain-marie).

- Placer le filtre à café dans l'entonnoir, verser le mélange et récupérer le jus dans l'erenmeyer.

Pourquoi filtre-t-on le mélange ?

Cette étape est nécessaire pour recueillir le liquide riche en ADN et le séparer des résidus cellulaires et autres tissus.

- Avec la seringue, prélever 3 ml de jus et les verser dans le tube à essai.
- Ajouter délicatement l'alcool froid (3ml) en le faisant couler contre la paroi du tube à essai.

Qu'observes-tu ?

Les deux solutions ne se mélangent pas et l'alcool forme une couche plus légère au-dessus du jus.

Pour quelle raison ?

La densité de l'alcool (éthanol 95% : 0,81) est plus faible que celle de la solution d'oignon (eau + sel + liquide vaisselle). L'alcool flotte donc au-dessus du mélange.

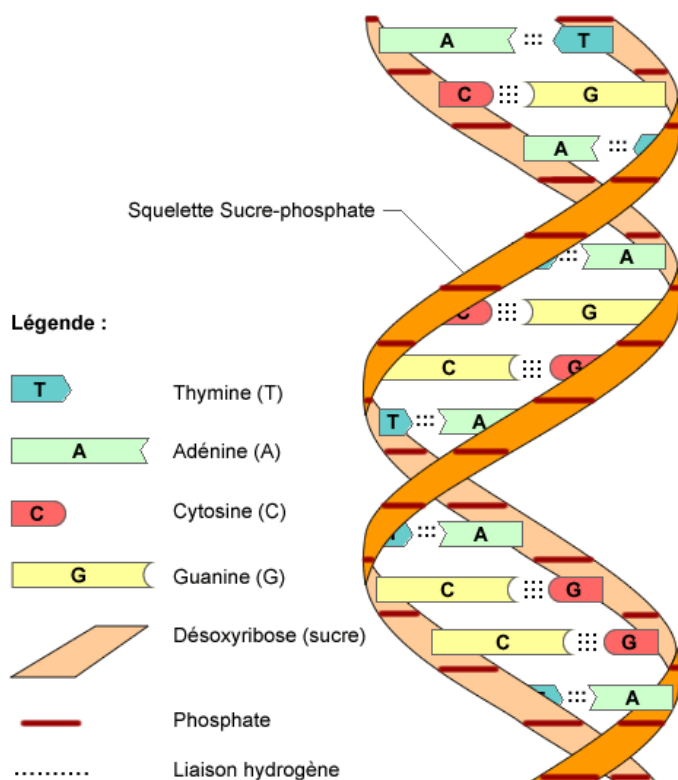
- Laissez reposer le tube à essai quelques minutes.

Qu'observes-tu ?

Une substance blanche se forme dans l'alcool dans la partie supérieure du tube à essai, on l'appelle la méduse d'ADN. **C'est l'ADN !**

L'ADN est insoluble dans l'alcool et précipite donc pour former ce que les biochimistes appellent la « méduse ».

L'ADN forme une double hélice qui présente à l'extérieur des molécules de phosphate et de sucre **hydrophiles (qui aime l'eau)** et à l'intérieur les bases A, T, C, G **hydrophobes (qui n'aime pas l'eau)**. **La molécule d'ADN est donc soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool où elle précipite :**

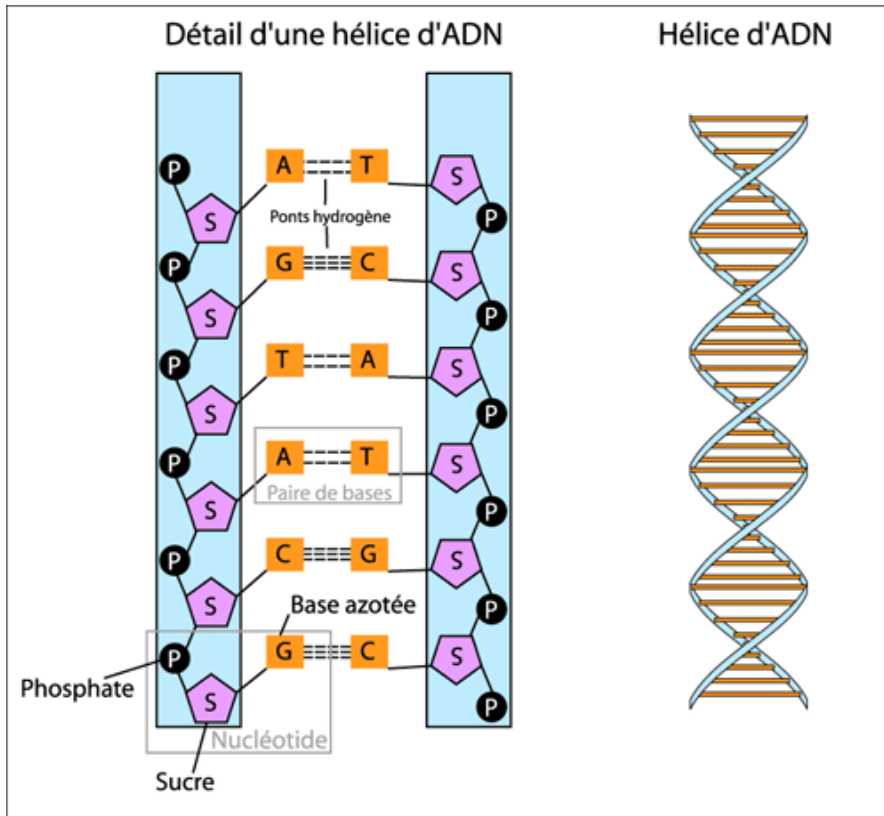


L'ADN plus en détail ...

L'ADN est composé de séquences de nucléotides ; on parle de polymère de nucléotides ou encore de polynucléotides. Chaque nucléotide est constitué de trois éléments liés entre eux : un **groupe phosphate** lié à :

un **sucre**, le désoxyribose, lui-même lié à :

une **base azotée**

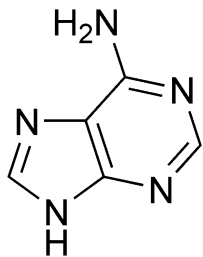


Il existe **quatre bases azotées** différentes: l'adénine (notée **A**), la thymine (notée **T**), la cytosine (notée **C**) et la guanine (notée **G**)

Ce sont les quatre bases azotées qui assurent la variabilité de la molécule d'ADN, ainsi que la complémentarité des deux brins.

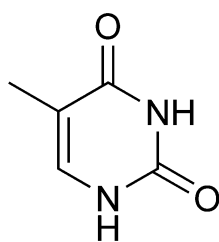
Les bases azotées sont complémentaires deux à deux, une purique s'associant toujours à une pyrimidique: l'**adénine** s'associe avec la **thymine** et la **guanine** avec la **cytosine**. Les bases azotées complémentaires sont reliées entre-elles par des liaisons hydrogène.

La thymine (T) et la cytosine (C) sont de la famille des pyrimidiques
L'adénine (A) et la guanine (G) sont de la famille des puriques.

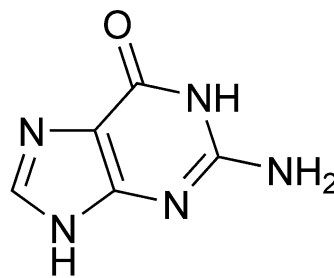


Adénine

+

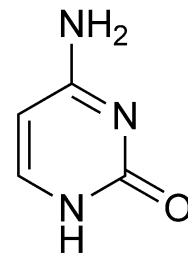


Thymine

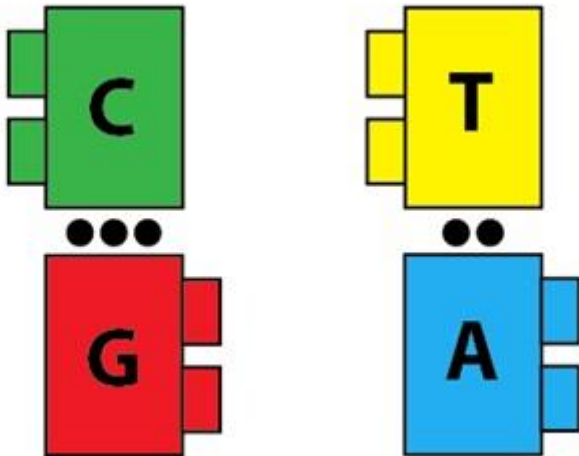


Guanine

+



Cytosine



L'ADN est donc composé de deux brins se faisant face, et formant une double hélice.

En face d'une adénine, il y a toujours une thymine; en face d'une cytosine, il y a toujours une guanine.

Exemple :

Pour un brin d'ADN possédant vingt nucléotides comme dans l'exemple suivant, on peut retrouver la séquence du brin complémentaire et reconstituer la double séquence de la double hélice :

5'-ATTGCCGTATGTATTGCGCT-3'
 3'-TAACGGCATAACGCGA-5'

Les deux brins antiparallèles d'ADN sont toujours étroitement reliés entre eux par des liaisons hydrogène (également appelées « ponts hydrogène » ou encore simplement « liaisons H » ou « ponts H ») formées entre les bases complémentaires A-T et G-C.

De l'ADN à la protéine...

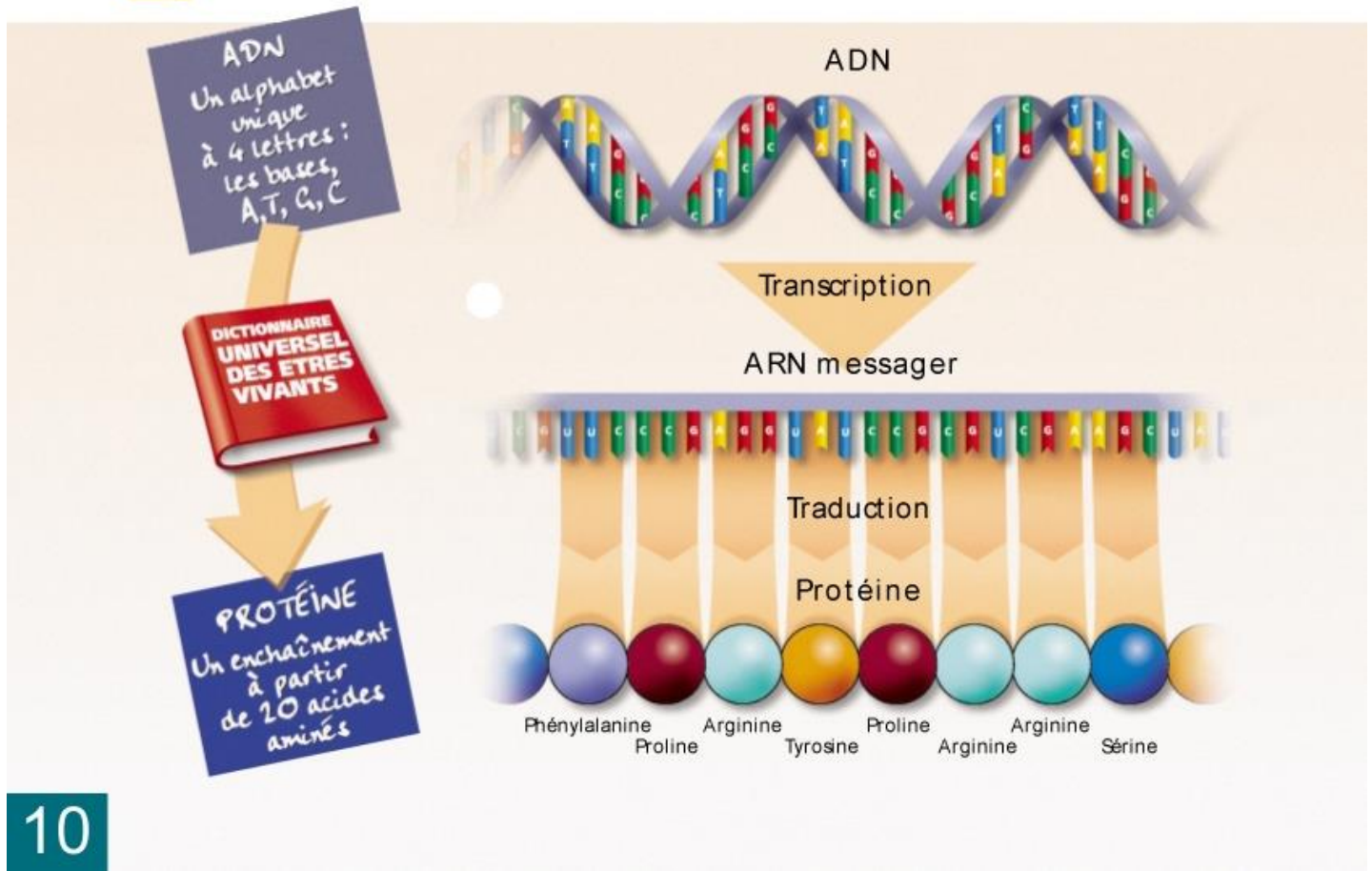
Grâce à l'alternance des 4 bases azotées A, C, T, G, toutes ces séquences constituent un message codé, portant les informations génétiques. En effet, l'ordre, la nature, et le nombre de nucléotides déterminent l'information génétique. Le lien entre l'information génétique, et les caractères de l'organisme (le phénotype), est gouverné par le code génétique.

Un gène correspond à une région de l'ADN qui code la biosynthèse d'une protéine: « un gène, une protéine ». Cependant, les cellules n'expriment pas tous les gènes qu'elles possèdent. Pour leur simple survie, elles doivent exprimer au minimum les gènes codant les protéines nécessaires au fonctionnement de la cellule (protéines d'entretien ou de ménage).

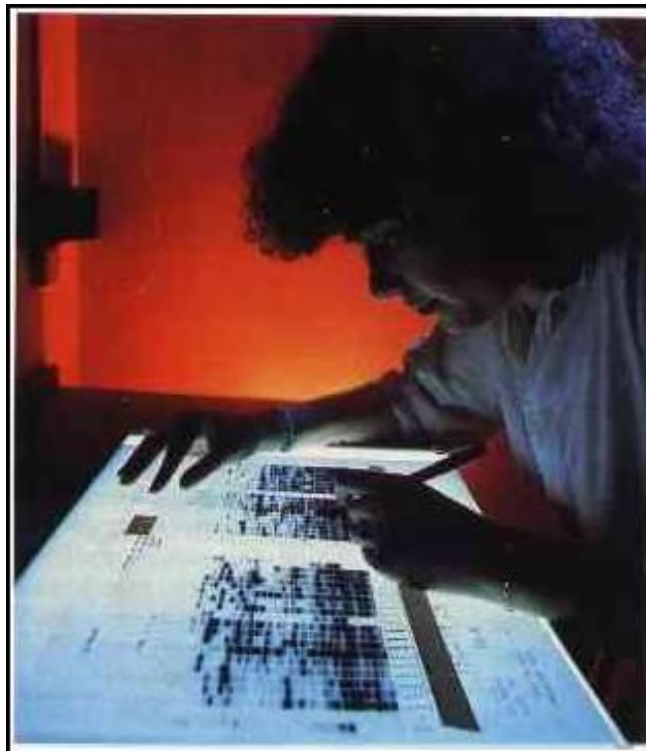
<http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-gene-proteine.html>



Du gène à la protéine



10



**L'empreinte
génétique
est un vrai
"code barre"
spécifique
à chaque
individu**

Le filament obtenu est-il vraiment de l'ADN ?

Comment peut-on montrer que c'est bien de l'ADN ?

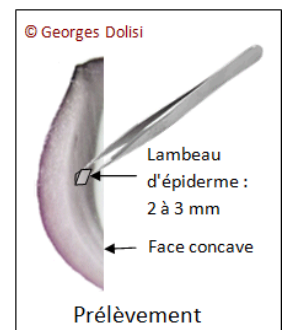
Il existe des colorants qui colorent spécifiquement l'ADN, c'est le cas du bleu de méthyle.

Notons que ce que nous observons ici n'est pas qu'une seule molécule d'ADN mais un grand nombre de molécules d'ADN. En effet, nous utilisons au départ un grand nombre de cellules et il y a plusieurs chromosomes dans chaque noyau. Mais les cellules contiennent aussi des mitochondries, lesquelles contiennent leur propre ADN ! Les cellules contiennent aussi de nombreuses molécules d'ARN.

Nous pouvons colorer les noyaux des cellules d'oignon : ils contiennent l'ADN.

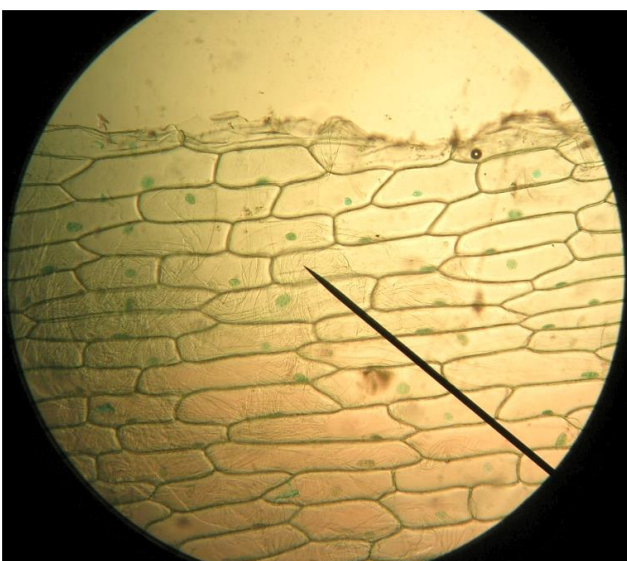
Procédure de coloration des noyaux des cellules d'oignon :

- Prélever avec une pince de l'épiderme d'oignon. L'épiderme est la fine peau qui recouvre la partie interne des diverses couches de l'oignon :
- Déposer le fragment d'épiderme dans un verre de montre avec quelques gouttes de bleu de méthyle et laisser agir 2 min.
- Rincer dans un autre verre de montre avec de l'eau distillée.
- Déposer le fragment coloré entre lame et lamelles et observer au microscope.

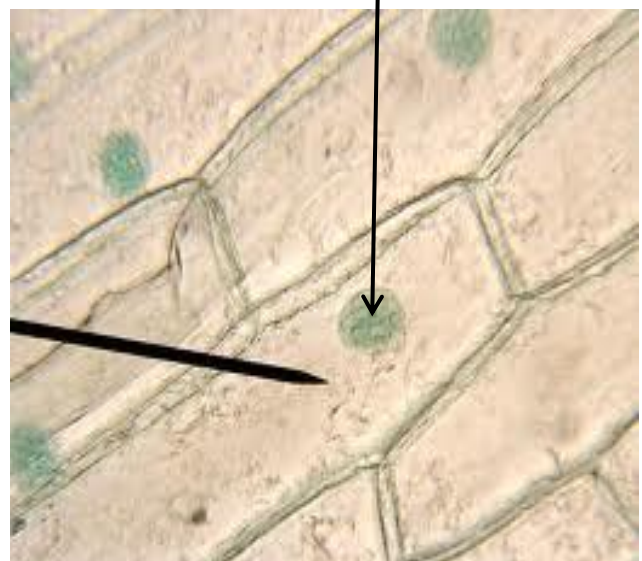


Qu'observes-tu ?

Nous observons les différentes cellules qui composent l'épiderme de l'oignon. Une cellule est entourée de sa membrane plasmique, contient un cytoplasme et un noyau. Le noyau est coloré par le bleu de méthyle car il contient l'ADN :



Grandissement X100

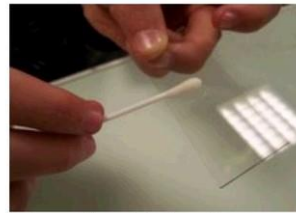


Grandissement X400

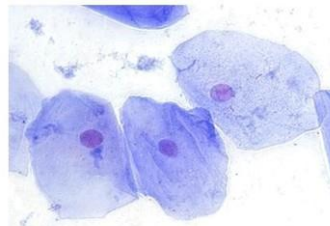
Nous proposons également aux élèves d'observer au microscope des lames préparées à l'avance de cellules humaines sanguines colorées, ou de cellules buccales :



Prélèvement de cellules buccales à l'aide d'un coton-tige



Étalement des cellules buccales sur une lame et coloration

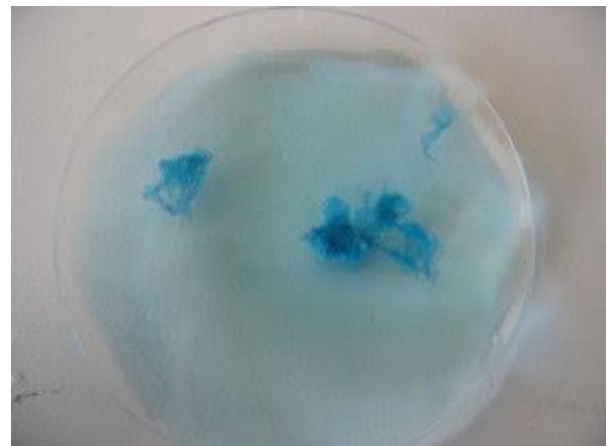
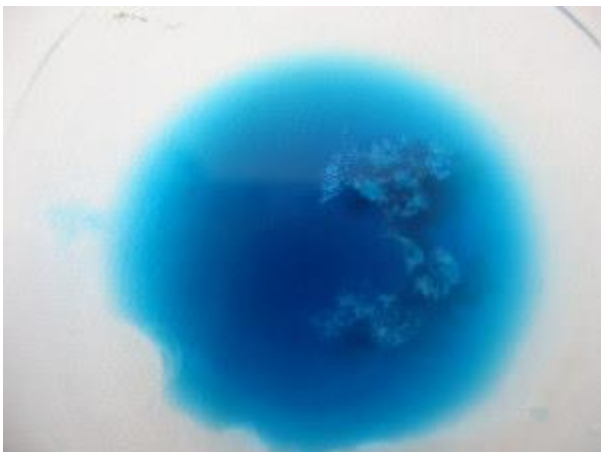


Résultat au microscope, grossissement X400

De la même façon qu'avec la mise en évidence du noyau des cellules d'oignons, vérifions que ce que nous avons extrait est bien de l'ADN.

Procédure de coloration de l'ADN provenant de l'extraction :

- Récupérer avec une pipette les filaments blancs précipités dans l'alcool du tube à essai, les placer dans le verre de montre contenant le colorant, laisser agir 2 min et rincer dans un autre verre de montre. Observer :



Ce que nous avons isolé à partir de l'oignon ou du kiwi est bien de l'ADN !