

Brin codant (ou sens) brin d'ADN qui contient la même séquence que celle transcrite en ARN par opposition au brin non codant.

L'ADN et l'ARN peuvent être :

Circulaire	Linéaire	Segmenté
------------	----------	----------

En fonction du nombre de brin :

monocaténaire	bicaténaire
---------------	-------------

Rmq. : tous les combinaisons d'ARN et d'ADN sont possibles chez les Virus.

Comparaison de l'ADN entre les procaryotes et les Eucaryotes :

Type de cellules	Bactéries	Eucaryotes
Type d'ADN	circulaire, bicaténaire	Linéaire, bicaténaire
Nbre de chromosomes	Unique	Plusieurs
ADN annexe	Plasmides	

Rmq. : L'ADN des mitochondries et des chloroplastes a la même structure que celui des Bactéries.

Structure de l'ADN

Un nucléotide est composé de :

Un ou plusieurs phosphates	Un pentose (sucre) : ribose (ARN) ou désoxyribose (ADN)	Une base azotée
----------------------------	---	-----------------

Rmq. : Le désoxyribose est un ribose ayant perdu un groupement OH sur le carbone 2.

Les bases se classent en deux catégories en fonction de leur précurseur :

Pyrimidiques (cytosine, uracile, thymine).	Puriques (adénine, guanine).
--	------------------------------

Conformation de l'ADN

Chez les Bactéries, le chromosome peut avoir deux conformations :

relâchée	super enroulée
----------	----------------

Chez les Eucaryotes, l'ADN est accompagné de protéines qui permet sa compaction dans la cellule. Ils forment un complexe qui prend la forme d'un chromosome appelé ADN génomique. L'ADN est :

1. est enroulé autour d'histone de façon répétitive qui forme une alternance entre un solénoïde et un nucléosome.
2. Boucles de chromatine • Rosettes de boucles

L'ARN est soumis à un appariement spontané et local de type :

Linéaire	Pseudo nœud	Épingle à cheveux	Tire-boucle
----------	-------------	-------------------	-------------

À partir de son ADN, une cellule produit quatre types d'ARN :

T de transfert	R ribosomaux	M messager	sn pour petits nucléaires
----------------	--------------	------------	---------------------------

Informations générales à connaître

Un tour d'hélice d'ADN est formé par 10 bases d'ADN et mesure 3.4nm de hauteur.

Masse molaire des nucléotides (g.mol⁻¹) :

	ARN	ADN
Monophosphate	340	330
Triphosphate	500	490

Du code génétique à la protéine

Élongation progression du ribosome le long du brin d'ARNm

C'est l'ARNt qui sert de clés de traduction entre les codons et les acides aminés. Il possède une petite portion variable, appelée anticodon, qui assure la correspondance entre le codon et l'aa.

L'ARNt est associé par son extrémité Béta par une liaison covalente à l'acide aminé correspondant à son anticodon, grâce à l'aminoacyl-ARNt synthétase pour former un complexe appelé aminoacyl-ARNt.

Traduction

Les étapes de la traduction sont :

1. La petite sous unité se positionne sur le brin d'ARNm.
2. Elle se déplace sur l'ARNm jusqu'à la séquence consensus.
3. Le recrutement de la grande sous unité.
4. Ajout des aa grâce à l'aminoacyl-ARNt.
5. Arrêt de la traduction lors que le codon stop est détecté. Le facteur de terminaison s'associe à l'ARNm et provoque la dissociation du ribosome.

Il existe moins d'anticodons que de codons. Plusieurs codons codent pour un acide aminé à cause :

- L'inosine, une base modifiée capable d'interagir avec A, C ou U
- Un appariement G et U.

Ce type d'appariement est dit bancal. Il permet de restreindre le nombre d'ARNt nécessaire pour traduire les codons et ainsi augmenter l'efficacité de la traduction.

Phase ouverte de lecture (ORF en anglais) séquence de codon traduite en acide aminé. Elle contient le codon initiateur et stop.

Manipulation de l'ADN

Objectif :

- faire synthétiser une enzyme par un autre organisme pour, par exemple, étudier ses effets.
- Réaliser des copies d'une séquence d'ADN

Pour pouvoir étudier les effets d'une séquence d'ADN, il faut :

1. Isoler la séquence d'intérêt.
2. Créer un vecteur de clonage avec la séquence d'intérêt.

3. L'insérer dans un autre organisme.
4. Vérifier la présence de la séquence et sa réplication.

L'objectif du cours étant d'être capable d'élaborer un protocole pour étudier une séquence d'ADN particulière.

Banque introduction d'une multitude de fragments pour déterminer ultérieurement le gène d'intérêt.

Protéine de fusion combinaison de séquences de gènes pour former une protéine chimérique.

Les OGN sont interdits car il existe des risques probables pour la santé. Leur culture est interdite car les gènes d'OGN peuvent contaminer lors de fécondation avec des espèces non modifiées, par exemple lorsque les champs sont proches.

Extraire la séquence d'ADN d'intérêt

L'extraction et l'identification de la séquence d'ADN d'intérêt nécessite :

1. Extraire et purifier l'ADN de la cellule.
2. Extraire la séquence d'intérêt.

Insert séquence d'ADN d'intérêt.

Extraire l'ADN d'une cellule

Pour pouvoir récupérer l'ADN d'une cellule, il faut procéder à :

1. Libérer l'ADN des cellules en utilisant des détergents et des protéinases.
2. Purifier l'ADN génomique avec du phénol ou du chloroforme pour éliminer les protéines associées à l'ADN.
3. Précipiter l'ADN pour le concentrer. La précipitation a lieu en utilisant de l'éthanol ou de l'isopropanol.

Reconnaitre et sélectionner le fragment d'intérêt

Pour déterminer le fragment d'intérêt, il est possible de procéder :

- En utilisant une sonde d'hybridation avec la séquence étudiée.
- Par sélection fonctionnelle en synthétisant la protéine.

Sonde d'hybridation courte séquence complémentaire de celle étudiée.

Vecteur d'expression vecteur de clonage avec un promoteur bactérien.

L'organisme modèle eucaryote utilisé est la levure. Elle offre l'avantage d'être facile à cultiver et est de posséder la capacité de pouvoir utiliser les plasmiques, une capacité rare chez les eucaryotes.

Couper la séquence d'intérêt

Une séquence d'ADN peut être couper par l'utilisation d'enzymes soit :

Endonucléase	exonucléase
--------------	-------------

L'ADN peut être coupé à un endroit particulier en utilisant une endonucléase de restriction. Ce type d'enzyme reconnaît un palindrome.

Rmq : Contrairement aux autres endonucléases, les enzymes de restrictions coupent l'ADN au niveau de la zone de reconnaissance.

Enzyme de restriction enzyme qui reconnaît et supprime des séquences d'ADN. Elles sont par les bactéries. Elle fait partie des mécanismes de défense des bactéries contre les virus.

Palindrome séquence reconnue par l'endonucléase de restriction. Elle ne dépend pas du brin.

Site de clonage site reconnu par l'enzyme de restriction.

Les enzymes de restriction se composent de deux sous unités (dimère). Elle réalise deux types de coupe :

Franche, les deux brins sont coupés au même niveau.	Cohésive, la séparation a lieu à des endroits différents sur les deux brins.
---	--

Lorsque les extrémités sont cohésives, il faut préciser l'extrémité sortante 5' ou 3'. *Exemple : Enzyme II (G/ATC) coupe au premier nucléotide du palindrome : G-ATC et CTA-G.*

Rmq : Deux enzymes différentes peuvent produire des extrémités complémentaires.

Extraire l'ADN de la chaîne peptidique de cellules eucaryotes

Chez les eucaryotes, l'épissage complique l'extraction du gène lorsque l'on souhaite le faire exprimer par une bactérie car ce processus est absent chez ces dernières. Il faut récupérer la séquence composée uniquement des exons. Pour cela, il faut :

1. Extraire l'ARNm mature c-à-d après l'épissage du gène d'intérêt.
2. Rétro transcrire ARNm en ADN avec une transcriptase, une enzyme d'origine virale.
3. Supprimer le brin d'ARN avec une Rnase H.
4. Ajouter une amorce TTTTTT appelée, oligo T. Elle vient se fixer sur la queue poly A de l'ARNm.
5. Ajouter un ADN polymérase pour synthétiser le brin complémentaire.

Rmq : la transcriptase synthétise le brin non codant et l'ADN polymérase le brin codé appelé ADN complémentaire.

Attention les modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes ne sont pas réalisables dans les Bactéries.

Fabrication d'un vecteur de clonage

Un vecteur (ou véhicule) de clonage est plasmide qui possède :

- un site d'origine de réplication qui permet la réplication autonome du vecteur c-à-d indépendamment de la cellule.

- Un site de multiclonaage (appelé aussi polylinker ou MCS) est la zone d'intégration de la séquence d'intérêt. Elle contient plusieurs sites de restriction uniques. Une seule ouverture est possible par enzyme de restriction.

Très souvent, on ajoute :

- Un agent de sélection c-à-d un caractère sélectif.
- Un promoteur en amont de MCS si on cherche à faire exprimer le gène.

Vecteur de clonage plasmide ayant reçu une séquence d'ADN extérieure.

Vecteur recombinant vecteur qui possède l'insert.

Caractère sélectif caractère exprimé par la cellule servant à identifier son génotype. Il s'agit souvent d'une résistance à un antibiotique.

Rmq. : Chez les Bactéries, les plasmides confèrent un avantage mais ne sont pas indispensables à la survie.

NB. : Le cours se limite à la présentation des plasmides. Ils sont capables d'accueillir des insertions ayant de maximum 10Kb

Cartographie de restriction

Une cartographie de restriction permet de connaître la structure du vecteur de clonage. Elle se présente sous la forme d'un cercle avec la position par rapport à une origine relative :

- Des sites de restriction des principales enzymes.
- De la séquence d'intérêt.

Pour la réaliser, il faut mesurer la taille et le nombre de fragments générés par chaque enzyme de restriction. Ces informations sont déterminées par électrophorèse.

Lier l'ADN

Une liaison entre deux extrémités d'ADN soit liée, il faut :

- Elles soient complémentaires.
- Utiliser une ligase, une enzyme qui fonctionne avec de l'ATP.

Pour que l'ADN ne se lie qu'entre les séquences désirées, il peut être utile de modifier les groupements phosphodiester avec :

Supprimer (phosphatase)	Ajouter (polynucléotide kinase)
-------------------------	---------------------------------

Modifier les extrémités de l'ADN

L'extrémité cohésive de brins d'ADN peut être modifiée par l'utilisation de :

	Présence de dNTP	Absence de dNTP
ADN polymérase I	Complète 5'-3'	Supprime 3'-5' et 5'-3'
Enzyme Klenow ou ADN polymérase T4	Complète 5'-3'	Supprime 5'-3'

Insérer le vecteur de clonage dans une cellule

Pour qu'un vecteur de clonage puisse entrer dans une cellule, il faut que cette dernière soit dans un état particulier, appelé état de compétence. Il peut être obtenu :

- Par électroporation qui consiste à appliquer un champ électrique.
- En le bombardant avec le vecteur de clonage.
- Par l'utilisation d'un autre organisme (virus).
- En l'insérant une aiguille.
- Un choc thermique.
- Des produits chimiques.

NB. : Un seul plasmide peut entrer par bactérie.

Transmutation application d'un choc thermique ou électrique pour rendre instable la membrane et permettre l'entrée du vecteur dans la bactérie.

Transduction processus de transfert de gènes dans une cellule eucaryotes en utilisant un virus. Par opposition à la transfection qui s'effectue sans.

Déterminer les cellules ayant reçu la vecteur de clonage

À l'issue de l'insertion du vecteur de clonage, toutes les cellules ne possèdent pas le vecteur recombinant. Pour détecter celles qui l'ont reçu, on peut :

- Utiliser des anticorps dirigés contre la protéine.
- En vérifiant la présence de la séquence avec une sonde qui possède des atomes radioactifs ou fluorescents.
- Utiliser un caractère sélectif avec le MCS à l'intérieur.

Les bactéries obtenues sont diluées suffisamment que l'on prélève la solution pour les déposer sur le gel, elles ne le sont qu'une par une. Elles sont ensuite cultivées.

Détection du vecteur par gène

La détection du vecteur recombinant peut être facilitée en utilisant un vecteur qui possède :

- Un caractère sélectif, par exemple, qui confère une résistance à une molécule.
- Un gène avec un promoteur qui contient le MCS. Lorsqu'il y a l'insert, le gène produit une protéine non fonctionnelle.

Exemple : Un vecteur qui possède :

- Un inducteur LacZ qui produit une protéine produit transforme le galactose en un produit de couleur bleu. Le caractère sélectif sous contrôle du promoteur de clonage
- Un caractère sélectif de résistance à la pénicilline.

Si les Bactéries :

- sans plasmide meurent si elles ne possèdent pas le vecteur.

MGG

- blanches si elles possèdent le vecteur recombinant.
- Bleues si elles possèdent le vecteur vide.

On peut ajouter un caractère sélectif sous contrôle du promoteur de clonage

Techniques complémentaires

Amplification en chaîne par polymérase ACP (ou PCR en anglais)

L'amplification en chaîne polymérase permet de dupliquer un grand nombre de fois des séquences d'ADN ou d'ARN à partir d'une faible quantité. Cela peut servir aussi bien dans les enquêtes criminelles ou pour obtenir le génome de momies ou de mammouths.

Il faut une amorce pour la séquence à amplifier. La méthode consiste à répéter un grand nombre de fois les étapes suivantes :

1. Dénaturer en chauffant. L'ADN est dénaturé en étant soumis à une température de 95°C.
2. Hybridation avec la sonde. Reformation des liaisons d'hydrogène avec une amorce pour chaque brin par une baisse de la température qui correspond à la température de fusion -2°C.
3. Réplication. On ajoute l'amorce avec des polymérases et des nucléotides pour que l'élongation ait lieu. L'ADN polymérase résistante à la chaleur pour polymériser les séquences. L'ADN polymérase utilisé est issu d'une bactérie vivante dans des sources chaudes. L'élongation a lieu à la température de 72°C et à la vitesse de 1 Kb/min.

Sonde séquence d'ADN courte et complémentaire du monobrin d'intérêt.

Dénaturation de l'ADN

La température de fusion est donnée par $2x(A+T) + 4x(G+C)$.

Stringence ensemble des conditions de température, pH et de concentrations de ions permettant l'hybridation. Plus les conditions sont favorables à une hybridation plus sa valeur est élevée.

L'utilisation de sels neutralisent les charges et baisse la stringence.

PCR analyse jusqu'à l'épuisement du dNTP

La PCR analyse est une technique qui permet d'estimer le nombre de matériel de départ (nombre de séquences initiales). Cela est utile, par exemple, pour connaître le niveau d'expression d'une protéine.

1. La quantité de nucléotides est fixée au départ.
2. Les cycles sont réalisés jusqu'à épuisement des nucléotides.

Plus il y a de séquences au départ, plus la phase de réplication aura lieu prématurément.

Séquençage : déterminer la séquence de nucléotides

Pour déterminer la suite de nucléotides, on utilise la technique de terminaison. L'ADN, monobrin, est polymérisé avec des nucléotides fluorescents. Le code de la séquence est lu grâce à un laser.

Auparavant, on utilisait :

- Le séquençage chimique. Le brin d'ADN est clivé par des molécules qui clivent chaque base de manière spécifique par petits fragment.
- La copie de la séquence avec des nucléotides appelé ddbase avec un H à la place du groupement 3-OH ce qui empêche la liaison appelée terminateur de chaîne. Le brin monocaténaire amorce puis le fragment est testé avec chaque type de ddbase en faible proportion en DNTP.

Électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel permet de séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur taille et leur charge. Les morceaux d'ADN ou

d'ARN sont déposés sur un gel de polymère comme de polysaccharide (agarose). Ils migrent du - cathode vers le + (anode).

La taille est déterminée à l'aide d'une gamme de référence. Les séquences migrent d'autant plus lentement à travers le réseau de fibre de gel qu'elles sont longues.

Buvard de Southern

Le buvard de Southern se déroule :

1. Électrophorèse sur gel.
2. Transfert sur buvard en utilisant une solution alcalin (basique). Le buvard est posé sur le gel.
3. Hybridation avec une sonde radioactive complémentaire du gène pour les visualiser

Buvard de Nothern buvard avec ARN transcription inverse puis d'une amplification en chaîne polymérase ou RT-PCR.

On peut augmenter la fidélité de l'hybridation de la sonde lors d'un Southern blot en augmentant la température et en diminuant la teneur en sels (ce qui a pour effet de neutraliser les charges et ainsi de limiter les liaisons d'hydrogène).

Le clonage

Clonage obtention d'organisme génétiquement identique

Il existe de trois types de clonage :

- D'organisme qui consiste à substituer le génome d'un organisme par un autre notamment celle d'un zygote (cellule œuf).
- Moléculaire (introduction d'un morceau d'ADN dans un autre organisme).
- Cellulaire lié à la reproduction par exemple chez les Bactéries.

Totipotente cellule capable de se différencier. La plupart des cellules végétales dispose de cette capacité contrairement aux cellules animales.

Par exemple, les cellules de la moelle ne sont capables que de donner nombre limité de type cellulaire.

Clonage des Animaux

Des recherches sur le clonage de cellules animales sont menées notamment dans le but de développer des traitements pour soigner des maladies par le clonage thérapeutique. L'objectif est de produire des cellules souches c'est-à-dire des cellules peu spécialisées capables de se diviser et de se différencier en d'autres types de cellules.

Le clonage ne donne pas un individu identique à l'original. Cela a permis de démontrer que l'activation de certains gènes durant le développement embryonnaire se produit aléatoirement.

Une façon de réaliser le clonage d'un animal est de transplanter le noyau d'une cellule de l'animal à cloner dans un ovocyte. Plus vieux le donneur sera, moins il y aura de chance que le développement embryonnaire se déroule normalement. Cette faible efficacité est liée à de nombreuses anomalies et changements épigénétiques qui se traduisent par l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Chez les animaux, seules les cellules souches embryonnaires issues du blastocyte sont capables de donner tous les types cellulaires. Des recherches sont menées pour rendre les cellules pluripotentes appelées cellules souches pluripotentes induites.