

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

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 possible 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 azoté
		•

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

pyrimidiques	puriques
Cytosine	Adénine
Uracile	Guanine

Thymine	
---------	--

Conformation de l'ADN

Chez les Bactéries, le chromosome peut avoir deux conformations :

relâchées	super enroulée
-----------	----------------

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

1. L'ADN est enroulé autour d'histone de façon répétitive qui forme une alternance entre d'un solénoïde et d'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
Triphostate	500	490

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.

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.

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

Reconnaître et sélectionner le fragment d'intérêt

Les étapes pour reconnaître et sélectionner le fragment d'intérêt :

1. Digestion partielle du l'ADN.
2. Introduction de tous les fragments dans des vecteurs.
3. Clonage de l'ensemble des ADN complémentaires.
4. Sélection fonctionnelle.

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 appelé endonucléase de restriction. Elle reconnaît une séquence spécifique et réalise une coupure de l'ADN.

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

Enzyme de restriction enzyme reconnait des séquences d'ADN et qui les supprime produit 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). La coupe est :

Franche, les deux brins sont coupés au même niveau	Cohésive, la séparation a lieu
--	--------------------------------

Lorsque les extrémités sont cohésives, il faut préciser l'extrémité sortante 5' ou 3'.

Rmq.: Deux enzymes différentes peuvent produire des extrémités complémentaires.

Extrémité franche coupe au niveau du site de reconnaissance

Exemple : Enzyme II (G/ATC) coupe au premier nucléotide du palindrome : G-ATC et CTA-G.

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'est-à-dire après l'épissage du gène d'intérêt.
2. Rétro transcrire l'ARNm en ADN avec une transcriptase, une enzyme d'origine virale.
3. Supprimer le brin d'ARN avec une Rnase H enzyme.
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 codant et l'ADN polymérase le brin codé.

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 un plasmide qui possède :

- un site d'origine de réplication qui permet la réplication autonome du vecteur c'est-à-dire indépendamment de la cellule.
- Un site de multiclonage (appelé aussi polylinker). Ce sont les zones d'intégration possible. Le site contient plusieurs sites de restriction uniques pour n'avoir qu'une seule ouverture lors

Très souvent

- Agent de sélection
- (si on cherche à faire exprimer le gène) avoir un promoteur en amont pour permettre la transcription du gène.

MGG

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

Vecteur recombinant vecteur qui possède l'insert.

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 les

Une fois l'ADN du plasmide purifié et, on réalise une

Électrophorèse uniquement de l'électrophorèse pour les fragments linéaires)

Électrophorèse :

1. Digestion du plasmide par des enzymes.
2. Électrophorèse avec un standard étalon + coloration + UV
3. Le nombre de fragments

Attention il y peut y avoir plusieurs fragments dans une bande. Il faut toujours vérifier que la taille totale est égale à la somme de tous les fragments.

Le nombre de fragments équivaut au nombre de sites +1.

Carte de restriction carte sous forme de cercle qui montre l'emplacement des zones de restrictions.

Banque introduction d'une multitude de fragments pour un gène d'intérêt.

Lier l'ADN

Une liaison entre deux extrémités d'ADN peut être créée par une ligase. Elle a besoin d'hydrolyser de l'ATP pour fonctionner. Pour que deux extrémités puissent être liées, il faut qu'elles soient complémentaires.

Pour que l'ADN ne se lie qu'entre les séquences désirées, il faut modifier les groupements phosphodiester. Pour cela, deux enzymes peuvent être utilisées :

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	Complète 5'-3'	Supprime 5'-3'

Rmq : L'enzyme ADN polymérase T₄ fait la même chose que l'enzyme Klenow.

Insérer le vecteur de clonage dans une cellule

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

NB : Un seul plasmide peut entrer par 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 n'ont pas reçu le vecteur recombinant. Pour

Caractère sélectif caractère exprimé par la cellule servant à identifier.

Caractère sélectif résistance à un antibiotique. décès des autres cellules

Détection du vecteur

Deux étapes

- Empreinte

Supprimer ces 2 étapes gène Lac dans le vecteur
MGG

Détection du vecteur par gène inductible

- Caractère
- Si le gène est coupé pas d'expression
- Résistance à la molécule

Exemple : avec inducteur IPTG gène inductible substrat qui produit une couleur bleu en mangeant :

- Bactérie sans plasmide meurent.
- Bactérie possédant le vecteur recombinant apparaissent blanches.
- Bactéries possédant le vecteur vide apparaissent bleues.

Sélection fonctionnelle positive

Sélection négative dilution pour obtenir une concentration que d'une seule cellule pousse sans venin meurt sinon.

1. 1 choix des cellules
2. Type de vecteur expressions
3. ADN initial

Détection par anticorps

Utilisation d'anticorps pour reconnaître la prod