

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)	Une base azoté
	Ribose (ARN) Désoxyribose (ADN)	Bases pyrimidiques <ul style="list-style-type: none"> • Cytosine • Uracile • Thymine Bases puriques : <ul style="list-style-type: none"> • Adenine • Guanine

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

Conformation de l'ADN

Chez les Bactéries, le chromosome peut avoir deux conformations :

relachées	superenroulée
-----------	---------------

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 apparément spontané et local de type :

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

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

T de transfert	R ribosomaux	M messenger	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 moléaire des nucléotides (g.mol⁻¹) :

	ARN	ADN
Monophosphate	340	330
Triphosphate	500	490

Manipulation de l'ADN

Vocabulaire

Ne pas utiliser le terme tache. On parlera de

Bande ou spot.

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

1. isoler la séquence d'intérêt.

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

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

La manipulation de l'ADN fait intervenir deux types d'enzymes :

Couper (nucléase)	Lier (ligase)
-------------------	---------------

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.

Extraire la séquence d'ADN 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 reconnaît 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

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 cohésives et complémentaires.

Pour éviter 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 la séquence d'ADN

L'insertion de la séquence d'ADN nécessite deux étapes :

1. Fabrication et modification d'un plasmide. L
2. Insertion du plasmide dans une cellule.

Les vecteurs (ou véhicule) de clonage

Un vecteur de clonage est

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

Les vecteurs de clonage sont classés en fonction :

Type de cellules	Du nombre de copies génétiques	La taille maximale de l'insertion
------------------	--------------------------------	-----------------------------------

Exemple de vecteurs de clonage : phage, plasmide.

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

Déterminer les cellules ayant reçu la séquence

Toutes les cellules n'ont pas reçu le

Réplication autonome grâce à un site d'origine de réplication

Un site de clonage zone d'intégration

Caractère sélectif expression par la cellules qui possèdent le vecteur.

Caractère sélectif lutte antibiotique décès des autres cellules

1 ouverture du vecteur

Déphosphorylation empêche la ligase de 3' refermer la boucle

MGG

Ligase + ATP plus brin

4 connexion des groupements par les enzymes de réparations

Réplication du vecteur

5 transformation du procaryote

Introduction du vecteur recombinant

T

Multiplication des copies

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

Ter 1 annulé lorsqu'il y a une in

AmpR annulé résistance

Élimination via Ampr

Émulation

Rôle du polylinker ou site multiple de clonage

Choix du site de restriction dans le polylinker unique pour n'avoir qu'une seule ouverture.

Permet le clonage orienté

Séquence codante qui est celle d'intérêt

Clonage orienté (opposition à non orienté)

1 seul sens d'orientation pour que le promoteur engendre la production les deux sites de restrictions sont différents.

Réplication des cellules

Détection du vecteur

Deux étapes

Empreinte

Supprimer ces 2 étapes gène Lac dans le vecteur

Inducteur IPTG gène inductible substrat qui produit une couleur bleu en mangeant

Si le gène est coupé pas d'expression

Les bactérie d'inrête apparaissent blanches

Et vivantes

Resistance à la molécule

Vecteur vide (vecteur recombinant)

Vérifier le vecteur recombinant

Analyse par cartographie de restriction

Purifier l'ADN plasmide

Digestion de

Électrophorèse uniquement de l'électrophorèse pour les fragements linéaires)

Électrophorèse :

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

MGG

Attention il y peut y avoir plusieurs fragments dans une bande. Il faut torujours 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 fragements pour un gène d'intérêt.

Reconnaitre et sélectionner le fragment d'intérêt

Les étapes pour reconnaitre 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

Faire exprimer un gène eucaryote dans une bactérie

La

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

Transfection cellulaire ADN dans le noyau des cellules eucaryotes.

ADN pro polycitronnique unité de transcription.

ADN complémentaire d'une gène ensemble deans un pro

1 ARN m transcription reverse de l'ARNm en ADN grâce à une enzyme d'orgine virale, transcriptase.

Amorce TTTTTTT appelé oligo T qui vient se fixer sur la queue poly A de l'ARNm

ADN polymérase

Rnase H enzyme élimine l'ARN

ADN polymérase le brin synthétiser est le brin codant.

Utilisation d'anticorps pour reconnaître la prod

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