L’ ADN et l’ARN peuvent être :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ciruclaire | Linéaire | Segmenté |

En fonction du nombre de brin :

|  |  |
| --- | --- |
| monocaténaire | bicaténaire |

Rmq : tous les combinaisons d’ARN et d’ADN sont possible chez les Virus.

### Bactérie

Bactérie ADN

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 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 est comme 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   * Cytosine * Uracile * Thymine   Bases puriques :   * Adenine * Guanine |

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

### Conformation de l’ADN

Chez les Bactéries, le chromosome peut avoir une conformation possible relachées ou 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. On retrouve

1. L’ADN est enroulé autour d’histone de façon répétivie 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 spontanné qui donne lieu à un conformation locale de type :

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

Type d’ARN :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ARN T  (transfert | ARN R  (ribosomaux) | ARN M (messager) | ARN sn  (petits nucléaires) |

### Informations générales à connaitre

Hauteur pour un tour d’hélice càd 10 bases d’ADN : 3.4nm.

Masse moléaire des nucléotides (g.mol-1) :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | ARN | ADN |
| Monophosphate | 340 | 330 |
| Triphostate | 500 | 490 |

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.
3. La concentration de l’ADN par précipiation avec de l’ethanol ou de l’isopropanol.

# Manipulation de l’ADN

L’objectif est de

Étudier les effets d’une séquence d’ADN.

Synthétiser une protéine

élaborer un protocole pour générer une séquence d’ADN particulière.

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

Les groupements phosphates peuvent être :

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

## Couper l’ADN

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

|  |  |
| --- | --- |
| Endonucléase | exonucléase |

L’ADN peut être couper à un endroit particulier en utilisant une endonucléase appelé endonucléase de restriction. Elle reconnait une séquence spécifique et réalise un coupure de l’ADN.

Rmq : Les endonucléases de restriction utilisés en génie génétique coupent à l’endroit de reconnaissance mais il en existe qui réalise une coupure

Enzyme de restriction enzyme reconnaisse des séquences d’ADN et qui les supprimes produit par les bactèries. Elle fait partie des mécasnimes 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 restritction.

Les enzymes de restriction se composaient de deux sous unité (dimère). La coupe est :

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

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

Une enzyme de restriction

2 protéine coupées extrémités cohésives on précise toujours l’extrémité sortante.

Complémentaire

Attention deux enzymes différente peuvent porduite des extrémités complémentaire

Extrémité franche couper au niveau du site de reconnaissance

Lié deux fragement d’ADN

Liaison phosphodiester

Fonctionne en dimère

Deux protéines coupées extrémité cohésives

## Lier l’ADN

Une liaison entre deux extrémités d’ADN peut être créer une ligase. Elle a besoin d’hydrolyser de l’ATP pour fonctionner.

Pour que deux extrémités puissent être liées, il faut que leur extrémité soit complémentaire.

### Modifier les extrémités de l’ADN

L’extémité cohésive de brins d’ADN peut être modifier 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’ |

Vecteur de clonage

Un vecteur de clonage est

1. Frabrication et modification d’un plasmide
2. Insertion du plasmide dans une cellule.

Vecteur transporter clonage

Classfication des vecteurs type de cellule/ nombre de copie génétique/ taille maximale de l’insertion

Exemple : phage, plasmide.

Le cours se limite à la présentation des plasmides. 10Kb)

Réplication autonome grâce à un site d’originie de lréplication

Un site de clonage zone d’intégration

Caractère sélectif expression par la celluls qui possèdent le vecteur.

Caractère sélectif lutte antibiotique déces des autres cellules

1 ovuerture du vecteur

Déphosphorilation emp^che la ligase de 3’ refermer la boucle

Ligase + ATP plus brin

4 connction des groupements par les enzymes de réparations

Réplication du vecteur

5 transormation du procaryote

Introduction du vecteur recombinant

T

Multiplcation des copies

Transmutation on applique un choc termique 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

Élimintation via Ampr

Émalioration

Role 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 a non orienté)

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