Brin codant (ou sens) brin d’ADN qui contient la même séquence que celle transcrite en ARN. Par oppositon 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  Uracile  Thymine | Adénine  Guanine |

### 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 connaitre

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 organsime 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’idenfication 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.

### 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.

### 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 reconnait 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 reconnaisse des séquences d’ADN et qui les supprimes 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 à lieu |

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

Rmq : Deux enzymes différentes peuvent produite des extrémités complémentaires.

Extrémité franche couper 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 chaine 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 récuperer la séquence composée uniquement des exons. Pour cela, il faut :

1. Extraire l’ARNm mature càd arpès l’épissage du gène d’intérêt.
2. Rétro transcrire ARNm en ADN avec avec une transcriptase, une enzyme d’origine virale.
3. Supprimer le brin d’ARN avec une Rnase H enzyme.
4. Ajouter une amorce TTTTTTT 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 ADN polymérase le brin codé.

Attention les modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes ne sont pas réalisable 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 càd indépendamment de la cellule.
* Un site de mulitclonage (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 chercher à faire exprimer le gène) avoir un promoteur en amont pour permettre la transcription du gène.

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

Vecteur recombinant vecteur qui possède l’insert.

Rmq : Chez les Bactéries, les plasmides confère un avantage mais ne sont pas indispensable 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 connaitre les

Une fois 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 créer 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 phosphodiesters. Pour cela, deux enzymes peuvent être utilisée :

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

### Modifier les extrémités de l’ADN

L’extrémité 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’ |

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 exprimer 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

### Déctection du vecteur par gène inductible

* Caractère
* Si le gène est coupé pas d’expression
* Resistance à la molécule

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

* Bactérie sans plasmide meurent.
* Bactérie possèdant le vecteur recombinant apparaissent blanches.
* Bactéries possèdant le vecteur vide apparaissent bleu.

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 reconnaitre la prod