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.

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   * 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 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 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 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 messager | sn pour petits nucléaires |

### Informations générales à connaitre

Un tour d’hélide 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 |
| Triphostate | 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’interet.
2. L’insérer dans un autre organisme.
3. 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.

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 précipiation a lieu en utilisant de l’ethanol 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 reconnait une séquence spécifique et réalise une coupure de l’ADN.

Rmq : Contraitement aux autres endonucléases, les enzimes de restrictions coupent l’ADN au niveaude la zone de reconnaissance.

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’.

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

## 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 qu’elles soient cohésines et complémentaires.

Pour éviter 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’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’ |

Rmq : L’enzyme ADN plymérase 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 fontion :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 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’originie 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

Déphosphorilation empêche 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 application d’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.

### 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

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’anticorp pour reconnaitre la prod

Sélection fonctionnelle positive

Sélection négative dillution pour obtenir une concetration que d’une seule cellule pousse sans venin meurt sinon.

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