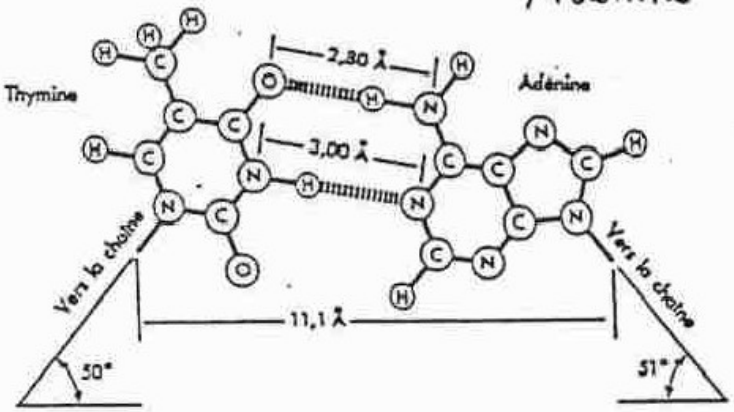
Les paires de bases à liaison hydrogène de l'ADN

T

Thymine

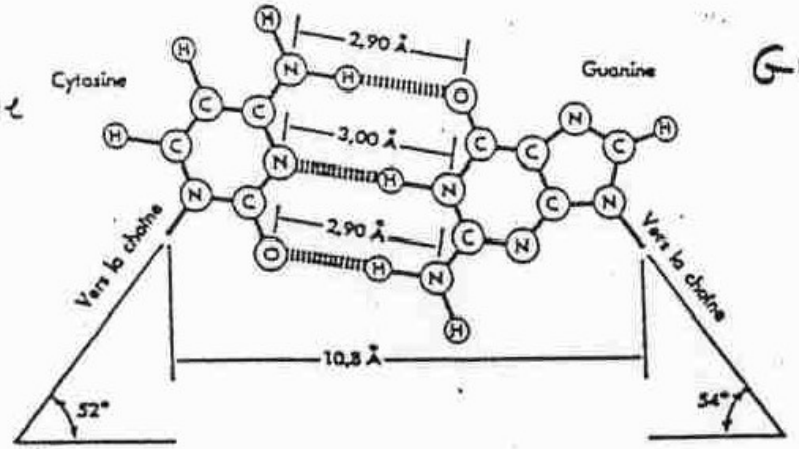
A

Adenine



cytosine

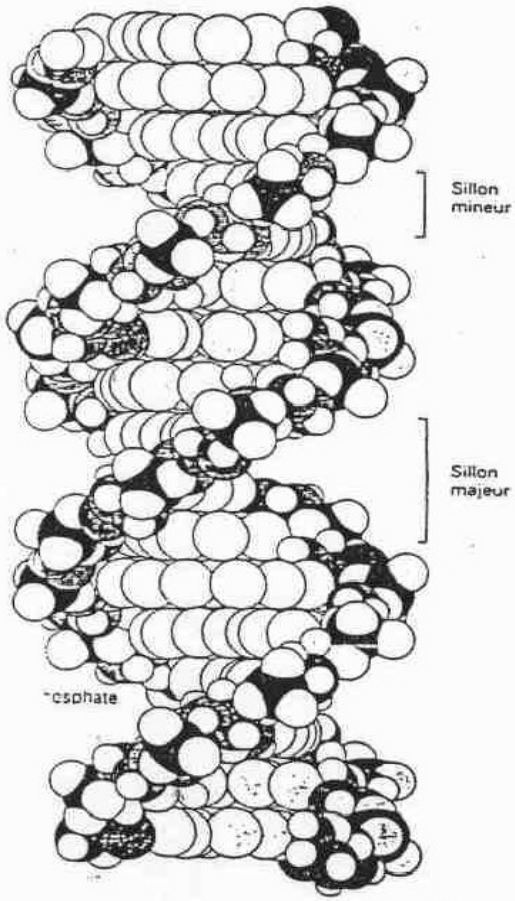
C

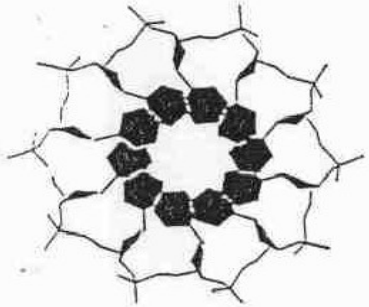


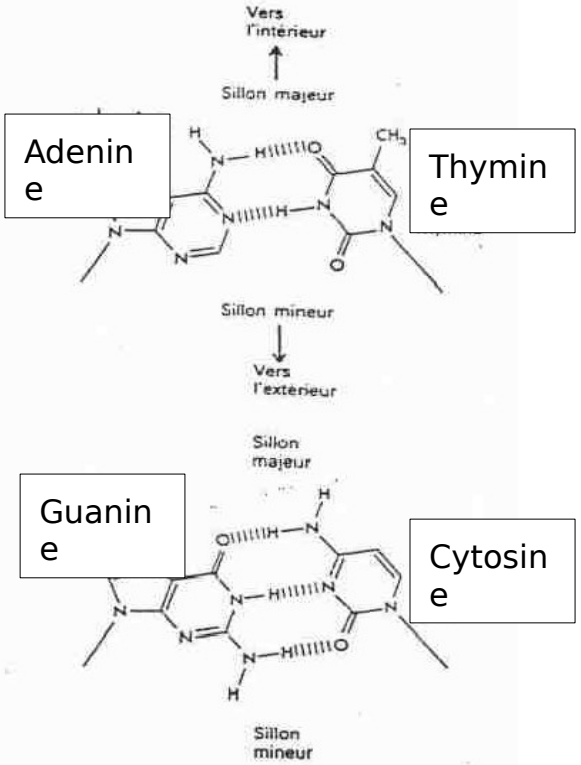
Guanine

G

LA MOLECULE D'ADN: STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE ET LIAISONS INTERCATENAIRES.







A — T

G — C

TRANSFORMATION DE L'INFORMATION GENETIQUE EN ACTIVITE FONCTIONNELLE.

Notion du codon: la plus petite *unité d'information d'un gène*. Le codon est composé de trois nucléotides adjacents, il code pour un acide aminé de la protéine *encodée par le gène* considéré.

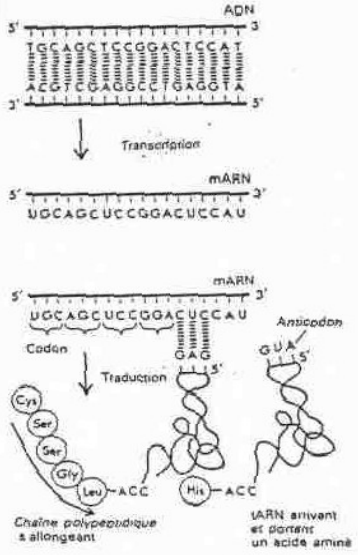


Figure 3-15
Transcription et traduction. Les nucléotides du mARN sont *assemblés pour former* une copie complémentaire d'un des brins d'ADN. Chaque groupe de trois nucléotides est un *codon, complémentaire* d'un groupe de trois nucléotides dans la région anticodon d'une molécule spécifique de tARN. *Lorsque l'appariement* des bases a lieu un acide aminé porté à l'autre extrémité de la molécule de tARN est ajouté à *la chaîne* protéique en croissance.

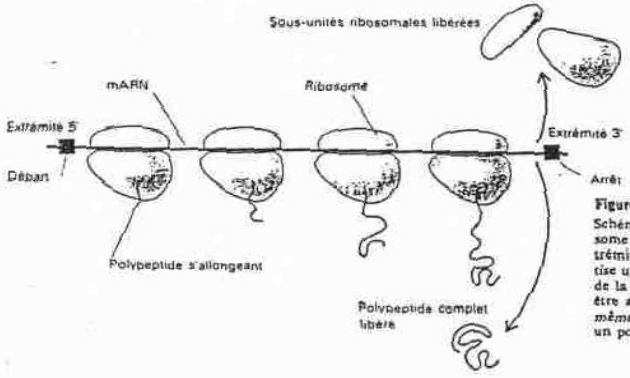


Figure 3-16
Schéma d'un polyribosome. Chaque ribosome s'attache à un signal de départ à l'extrémité 5' d'une chaîne de mARN et synthétise un *polypeptide alors qu'il avance le long* de la molécule. Plusieurs ribosomes peuvent être attachés à une molécule de mARN en *même temps;* tout cet assemblage est appelé un polyribosome.

12/01/2009

Base	Ribonucleoside	Ribonucleotide (5′-monophosphate)
Adenine (A)	Adenosine	Adenylate (AMP)
Guanine (G)	Guanosine	Guanylate (GMP)
Uracil (U)	Uridine	Uridylate (UMP)
Cytosine (C)	Cytidine	Cytidylate (CMP)

Base	Deoxyribonucleoside	Deoxyribonucleotide (5′-monophosphate)
Adenine (A)	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate (dAMP)
Guanine (G)	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate (dGMP)
Thymine (T)	Deoxythymidine	Deoxythymidylate (dTMP)
Cytosine (C)	Deoxycytidine	Deoxycytidylate (dCMP)

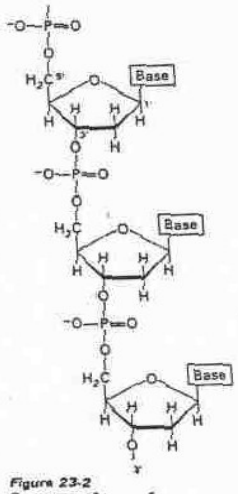
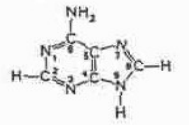
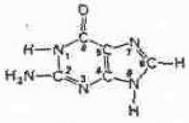


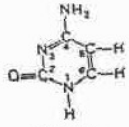
Figure 23-2
Structure of part of a DNA chain.



Adenine
(A)



Guanine
(G)



Cytosine
(C)

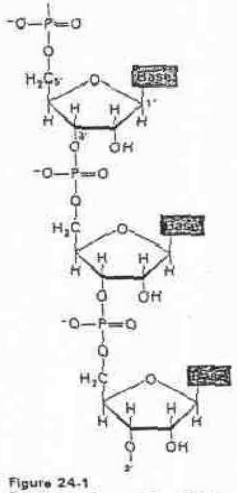
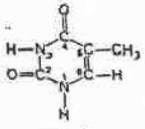
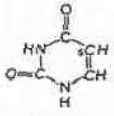


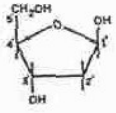
Figure 24-1
Structure of part of an RNA chain.



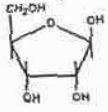
Thymine
(T)



Uracil



2-deoxyribose



Ribose

LE CODE GENETIQUE

qui est la correspondance quasi-universelle entre l'ordre des trois nucleotides d'un codon et l'acide aminé ainsi codé.

On notera que le premier codon d'une phase *codante est toujours* ATG, *ce qui correspond à une méthionine*; le dernier codon est toujours l'un des trois codons STOP.

Amino Acid Symbols

Amino Acid	Three-Letter Symbol	One-Letter Symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Asn and/or Asp	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Gln and/or Glu	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H

Amino Acid	Three-Letter Symbol	One-Letter Symbol
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

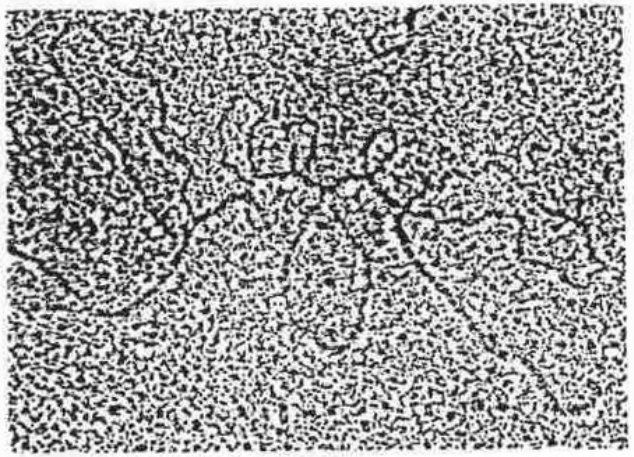
The Genetic Code

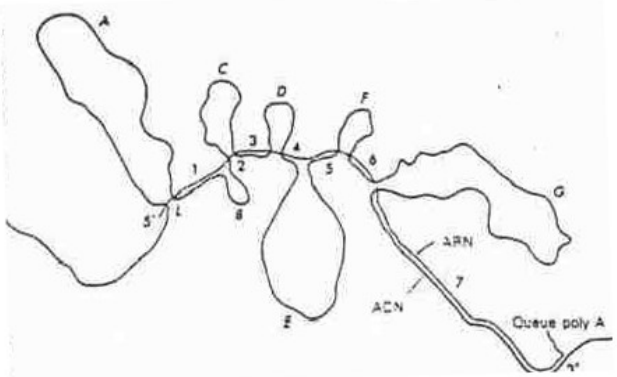
Second Position

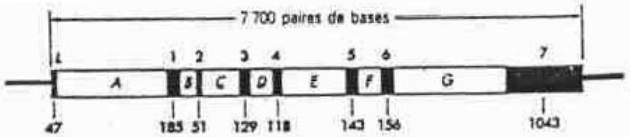
First Position (5' end)	U		C		A		G		Third Position (3' end)
U	UUU UUC	Phe	UCU UCC UCA UCG	Ser	UAU UAC	Tyr	UGU UGC	Cys	U C
	UUA UUG	Leu			UAA UAG	Stop Stop	UGA UGG	Stop Trp	A G
C	CUU CUC CUA CUG	Leu	CCU CCC CCA CCG	Pro	CAU CAC	His	CGU CGC CGA CGG	Arg	U C A G
					CAA CAG	Gln			
A	AUU AUC AUA	Ile	ACU ACC ACA ACG	Thr	AAU AAC	Asn	AGU AGC	Ser	U C
	AUG	Met			AAA AAG	Lys	AGA AGG	Arg	A G
G	GUU GUC GUA GUG	Val	GCU GCC GCA GCG	Ala	GAU GAC	Asp	GGU GGC GGA GGG	Gly	U C A G
					GAA GAG	Glu			

Figure 20-5

L'organisation du gène d'ovalbumine de poulet. On a fait s'hybrider l'ADN contenant le gène avec du mARN d'ovalbumine dans des conditions de formation de boucle R. Les huit exons (L, 1-7) du gène s'apparient avec les régions complémentaires de l'ARN et les sept introns (A-G) forment une boucle extérieure à l'hybride ADN-ARN. Les extrémités 5' et 3' du mARN sont indiquées ainsi que la queue poly A. [D'après P. Chambon, *Sci. Amer.* 244 (1981) : 60-71.]





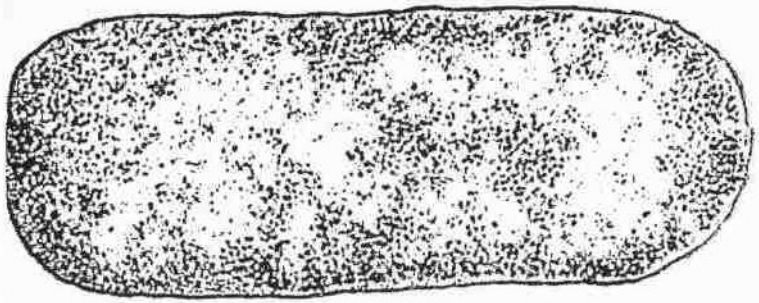


DE NOMBREUX GÈNES SONT CONSTITUÉS DE PLUS D'INTRONS QUE D'EXONS[18, 19, 20]

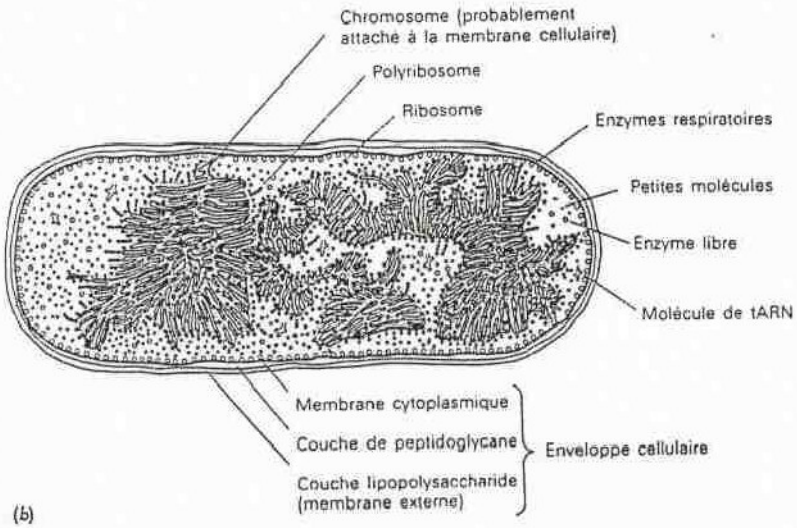
L'analyse des séquences permit ensuite de définir l'étendue exacte ainsi que la nature de ces discontinuités dans les gènes de l'ovalbumine et de la β-globine. Des régions non représentées dans le mARN sont appelées *introns* ou *séquences intercalaires*. Les segments qui spécifient le mARN sont appelés des *exons* (parce qu'ils sont exprimés). Les exons ne comprennent pas seulement les séquences de codage de protéines d'un gène, mais également les extrémités 5' et 3' non traduites du mARN. Il faut se rappeler que la queue poly A du mARN n'est pas codée dans le génome mais ajoutée après la transcription (chapitre 18).

12/01/2009

L'ORGANISATION D'UNE CELLULE PROCARYOTE.



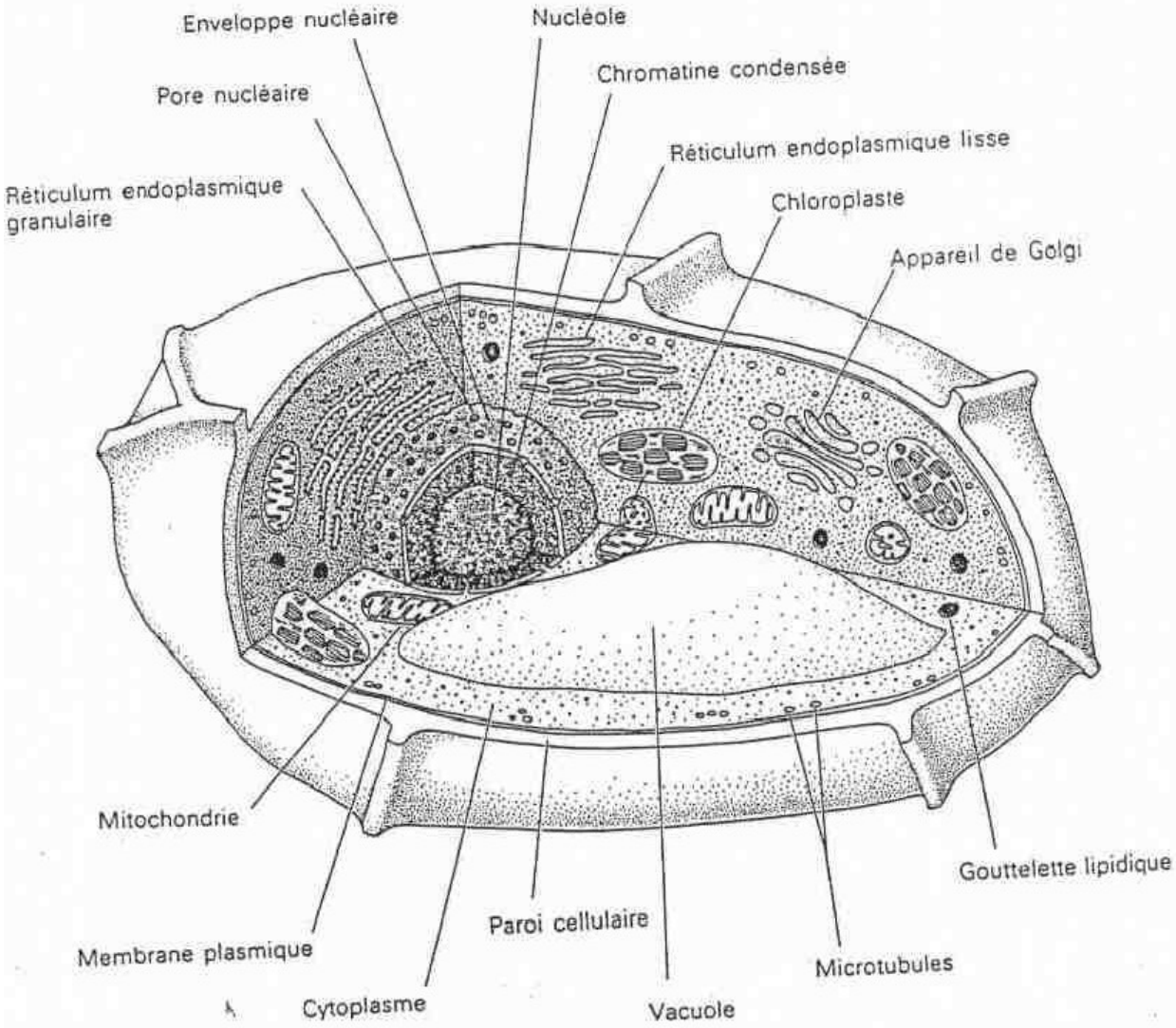
(a)



(b)

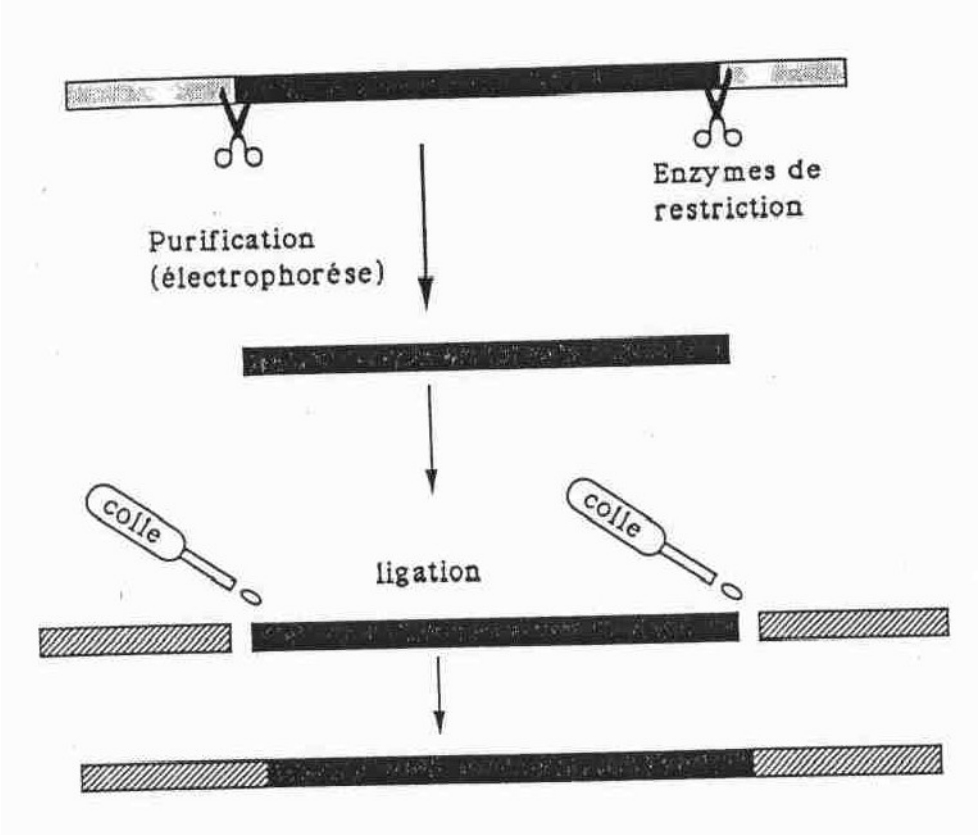
(a) Photographie au microscope électronique d'une cellule d'*E. coli* B préparée par substitution en congélation sans traitement préalable (gracieusement fourni par J.A. Hobot et al., *J. Bacteriol.* 162 (1985) : 964). (b) Schéma de cette cellule faisant ressortir les régions nucléoïdes (couleur) et montrant divers autres composants cellulaires (pas à l'échelle). La plus grande partie de l'ADN se trouve dans la région nucléoïde relativement libre de ribosomes, qui se trouve en étroite association avec les ribosomes, théoriquement pour fournir une efficacité optimale dans la traduction.

L'ORGANISATION D'UNE CELLULE EUCARYOTE



Les enzymes de restriction

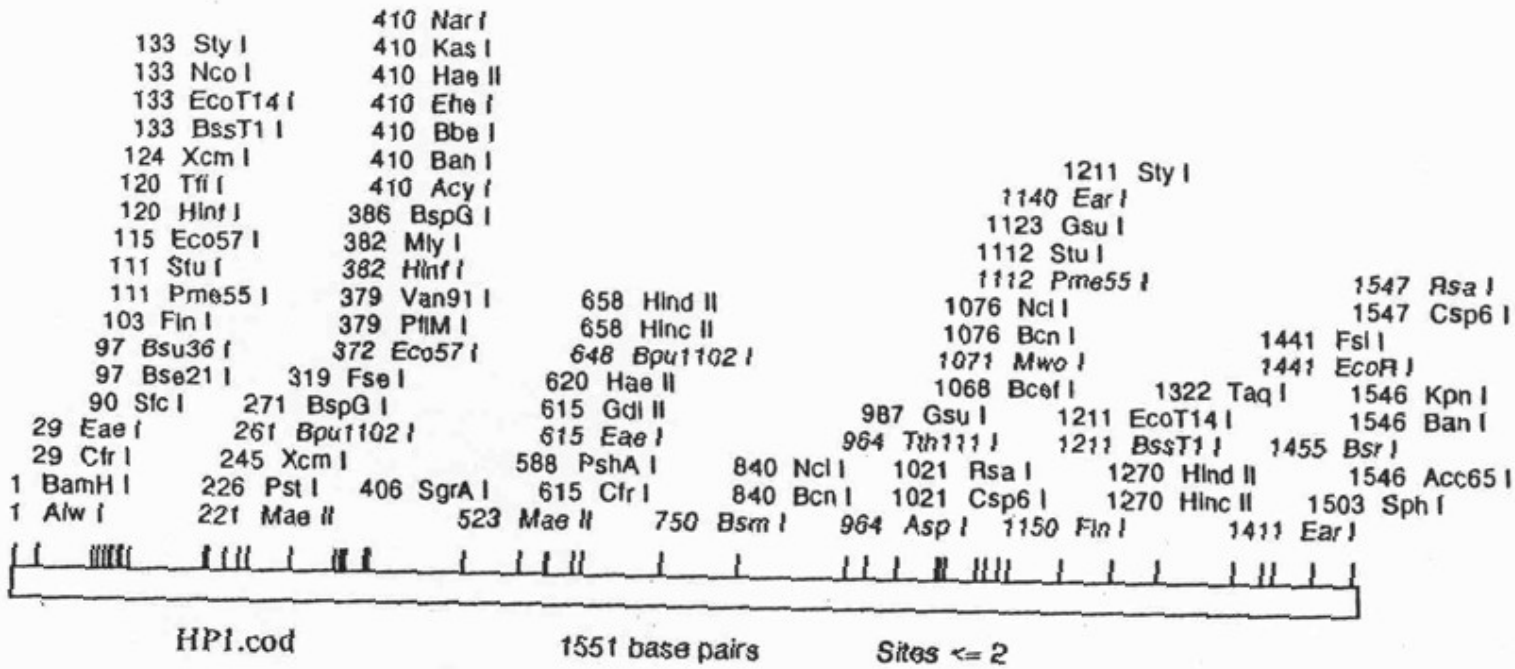
```
                BamHI
5'--TCCCGGGTGGATCCACTGCAGGCTT---3'
3'--AGGGCCCACCTAGGTGACGTCCGAA---5'
      SmaI          PstI
                 ↓
              BamHI
5'--TCCCGGGTG    GATCCACTGCAGGCTT---3'
3'--AGGGCCCACCTAG    GTGACGTCCGAA---5'

      SmaI
5'--TCCC    GGGTGGATCCACTGCAGGCTT---3'
3'--AGGG    CCCACCTAGGTGACGTCCGAA---5'

                          PstI
5'--TCCCGGGTGGATCCACTGCA    GGCTT---3'
3'--AGGGCCCACCTAGGTG    ACGTCCGAA---5'
```


Enzymes de
restriction
Purification
(électrophorése)
colle
colle
ligation

DNA Strider™ 1.2 ### Jeudi 12 Novembre 1992 20:25:22

P1.cod -> Graphic Map

NA sequence 1551 b.p. GGATCCATGCTT ... TCTTAGGGTACC linear



12/01/2009

Enzymes de restriction et méthylations chez E. coli.

Dam méthylase : site reconnu : GATC

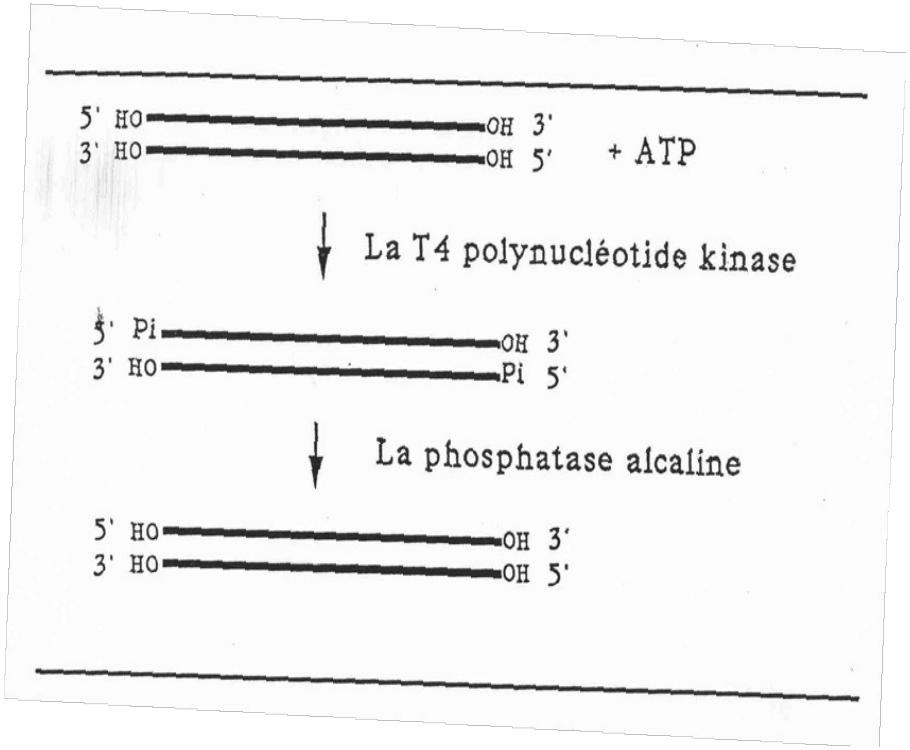
Activité : N (6) méthylation de l'adénine pouvant modifier la reconnaissance de l'ADN par certains enzymes de restriction.

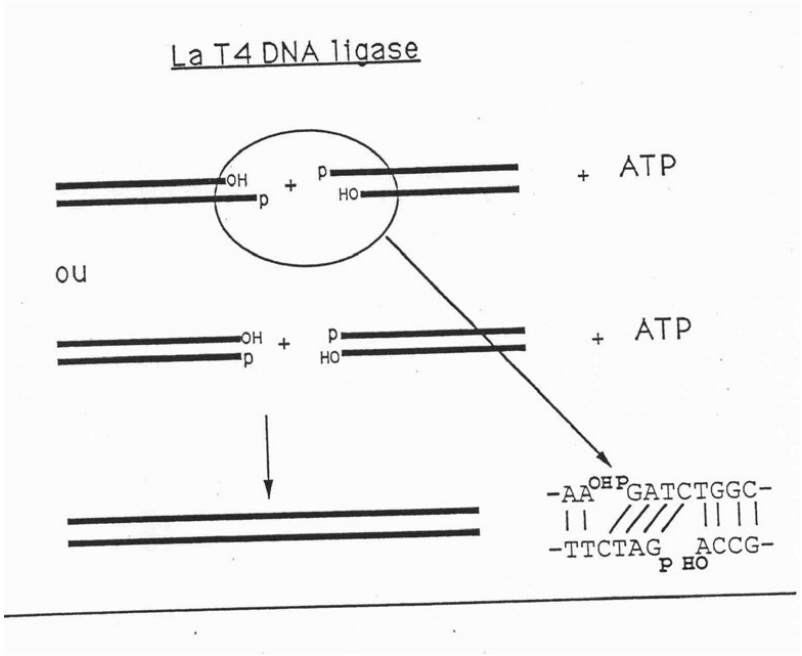
ClaI : ATCGAT	aatcgatcat	Ne coupe pas
	aatcgattta	Coupe
BclI : TGATCA	aatgatcagc	Ne coupe pas

Dcm méthylase : site reconnu : CC (A/T) GG

Activité : Méthylation du C (5) de la cytosine.

EcoRII : CC(A/T)GG	Ne coupe pas
BstNI : CC(A/T)GG	Coupe

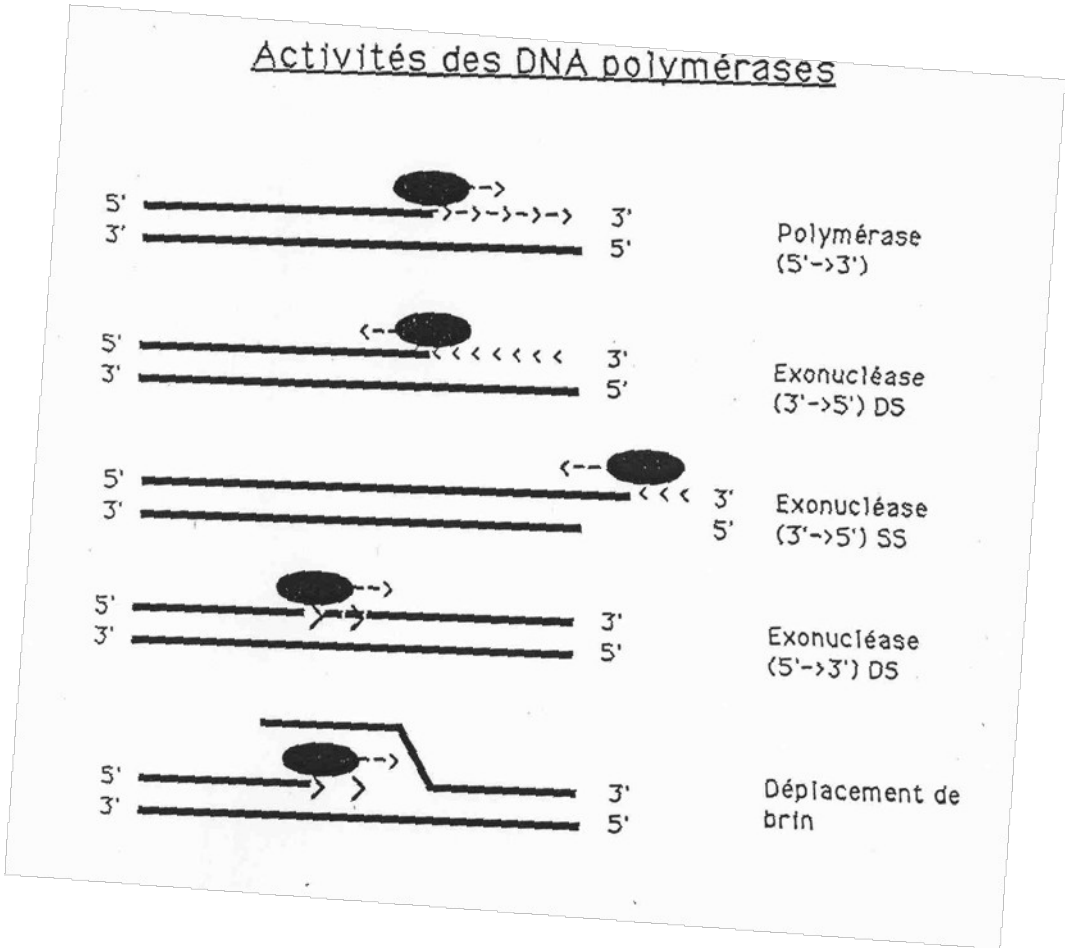

5' HO
OH 3'
3' HO
OH 5'
+ ATP
La T4 polynucléotide kinase
5' Pi
OH 3'
3' HO
Pi 5'
La phosphatase alcaline
5' HO
OH 3'
3' HO
OH 5'


La T4 DNA ligase
OH
p
+
p
HO
+ ATP
ou
OH
p
+
p
HO
+ ATP
-AA OH P GATCTGGC-
-TTCTAG P HO ACCG-

12/01/2009

Propriétés comparées des DNA polymérases

Activités	E. coli DNA Pol. I	DNA Pol I (Klenow)	T4 DNA Pol.	T7 DNA Pol.	T. aqu DNA Pol.	Rev. Transc
Polymérase (5'->3')	+	+	+	+	+	+
Exonucléase						
Simple brin (3'->5')	+	+	+	−	?	−
Double brin (3'->5')	+	+	+ +	−	−	−
Double brin (5'->3')	+	−	−	−	+	+
Déplacement de brin	+	+	−	−	−	−
RNAse H	+	−	−	−	−	+


Activités des DNA polymérases
5'
3'
3'
5'
Polymérase
(5'->3')
5'
3'
3'
5'
Exonucléase
(3'->5') DS
5'
3'
3'
5'
Exonucléase
(3'->5') SS
5'
3'
3'
5'
Exonucléase
(5'->3') DS
5'
3'
3'
5'
Déplacement de
brin

12/01/2009

```
5'--TCCCGGGTGGATCCACTGCAGGCTT---3'
3'--AGGGCCCACCTAGGTGACGTCCGAA---5'
```

BamHI

```
5'--TCCCGGGTG          GATCCACTG---3'
3'--AGGGCCCACCTAG          GTGAC---5'
```

DNA pol I (Klenow fragment)
+d NTP

```
5'--TCCCGGGTGGATC   GATCCACTG---3'
3'--AGGGCCCACCTAG   CTAGGTGAC---5'
```

```
5'--TCCCGGGTGGATCCACTGCAGGCTT---3'
3'--AGGGCCCACCTAGGTGACGTCCGAA---5'
```

PstI

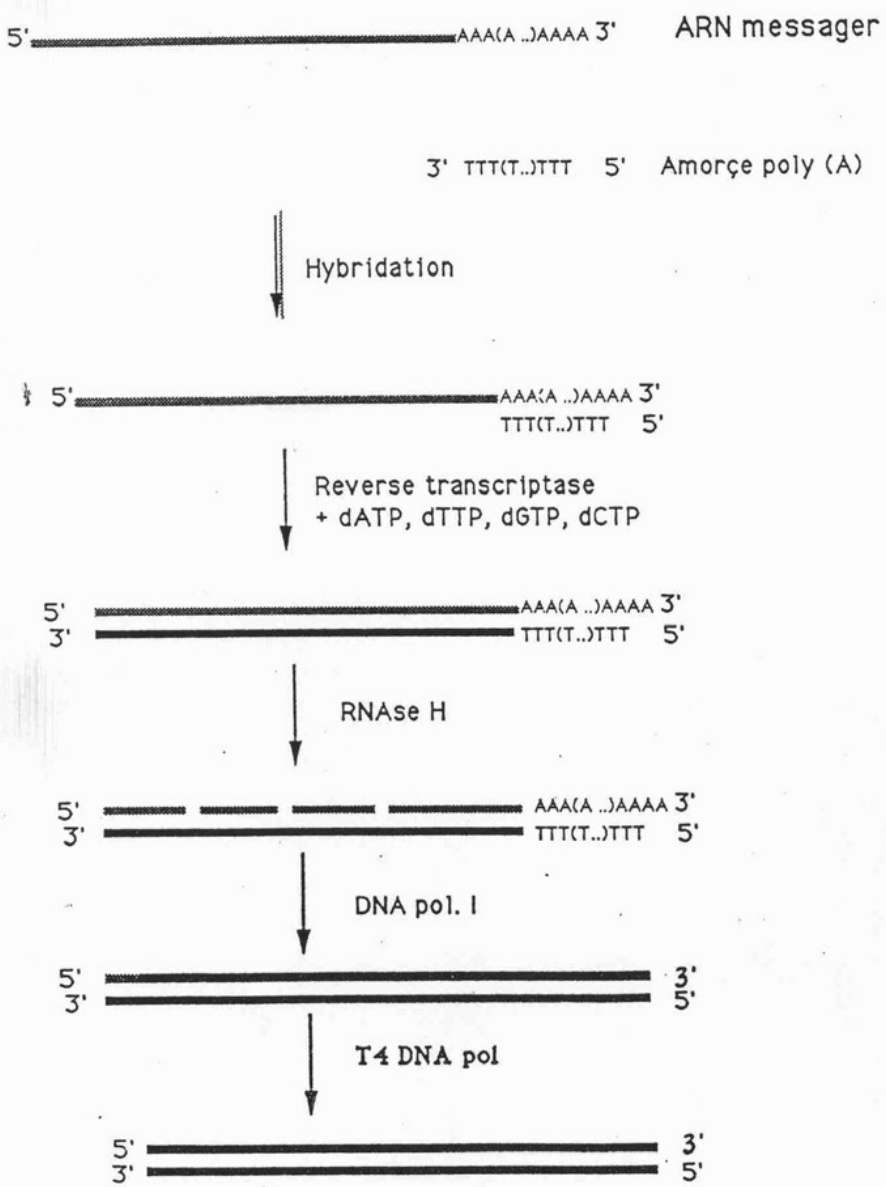
```
--ATCCACTGCA          GGCTT---3'
--TAGGTG            ACGTCCGAA---5'
```

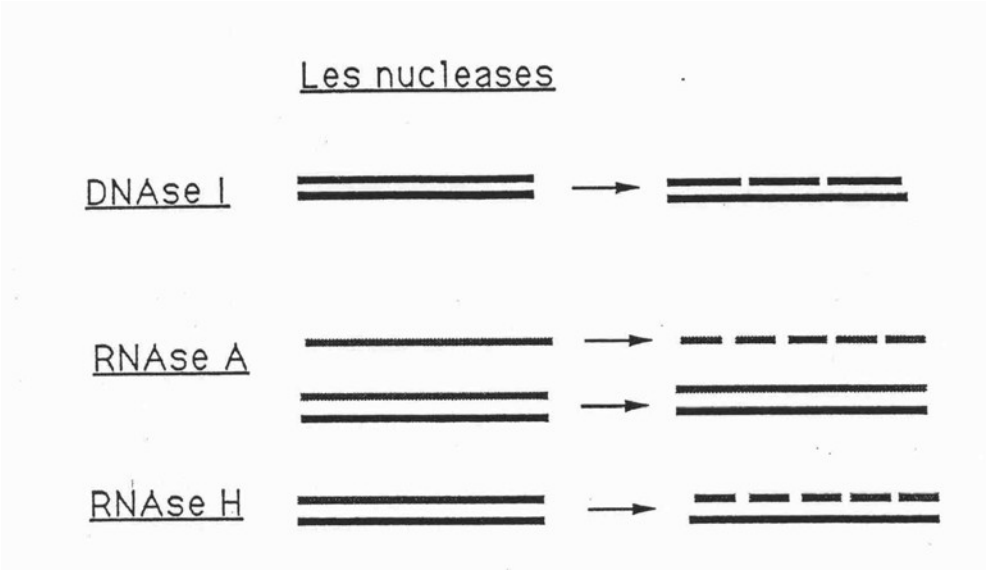
DNA pol I (klenow fragment)
+ dNTP

```
--TCCACTGCA          GGCTT---3'
--AGGTG            ACGTCCGAA---5'
```

12/01/2009

Synthèse d'ADN double brin à partir d'ARN

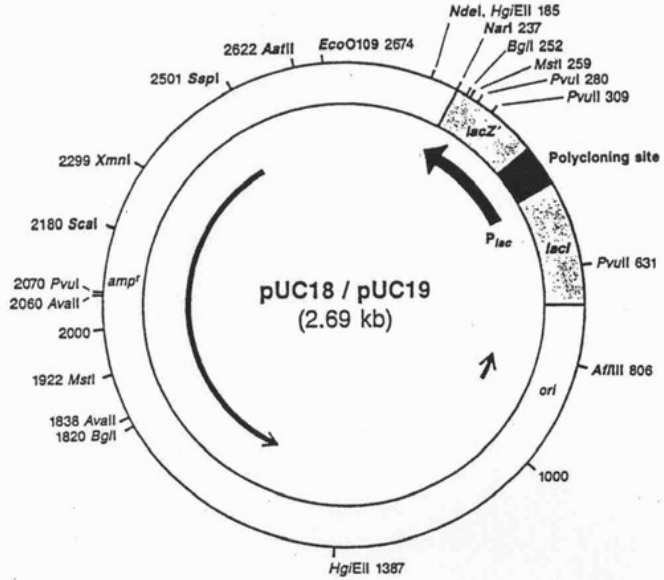




12/01/2009

These vectors are identical except that they contain polycloning sites arranged in opposite orientations. pUC plasmids lack the *rop* gene (see page 1.3), which normally is located close to the origin of DNA replication and is involved in the control of copy number. As a result, these plasmids replicate to a much higher copy number than do other plasmids that carry a pMB1 (or ColE1) origin. pUC vectors express the amino-terminal fragment of the *lacZ* gene product (β-galactosidase) and display α-complementation in appropriate hosts (see pages 1.8–1.9). Recombinants can therefore be identified by histochemical screening.

References: Messing (1983), Norrander et al. (1983), and Yanisch-Perron et al. (1985).



Polycloning Sites

pUC18

	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8
	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC

EcoRI, SacI, KpnI, SmaI / XmaI, BamHI, XbaI, SalI / AccI / HincII, PstI, SphI, HindIII

pUC19

	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8
	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC

HindIII, SphI, PstI, SalI / AccI / HincII, XbaI, BamHI, SmaI / XmaI, KpnI, SacI, EcoRI

LE VECTEUR

Un vecteur est une molécule d'ADN circulaire artificielle.

Si n'importe quelle molécule d'ADN double-brin peut transformer une bactérie (ou une cellule de levure), il faut nécessairement divers éléments d'information sur cette molécule pour que le clone issu de la bactérie transformée :

- contienne le vecteur amplifié,
- soit facilement repéré.

Un vecteur contient toujours au moins trois régions informatives qui sont essentielles pour son utilisation dans un clonage :

1/ une origine de réplication

qui va permettre au vecteur d'être répliqué en même temps que la bactérie-hôte se divise. Cette origine de réplication doit bien sûr être spécifique de l'hôte utilisé.

2/ un marqueur de sélection

qui procure à la cellule transformée un avantage métabolique décisif par rapport au large excès de cellules présentes qui ne sont pas transformées. En effet, la transformation est un processus à très bas rendement : sur 1000 bactéries présentes dans un mélange de transformation, seule 1 bactérie sera réellement transformées ! Il faut DONC pouvoir la repérer facilement en éliminant si possible les bactéries qui n'ont pas été transformées.

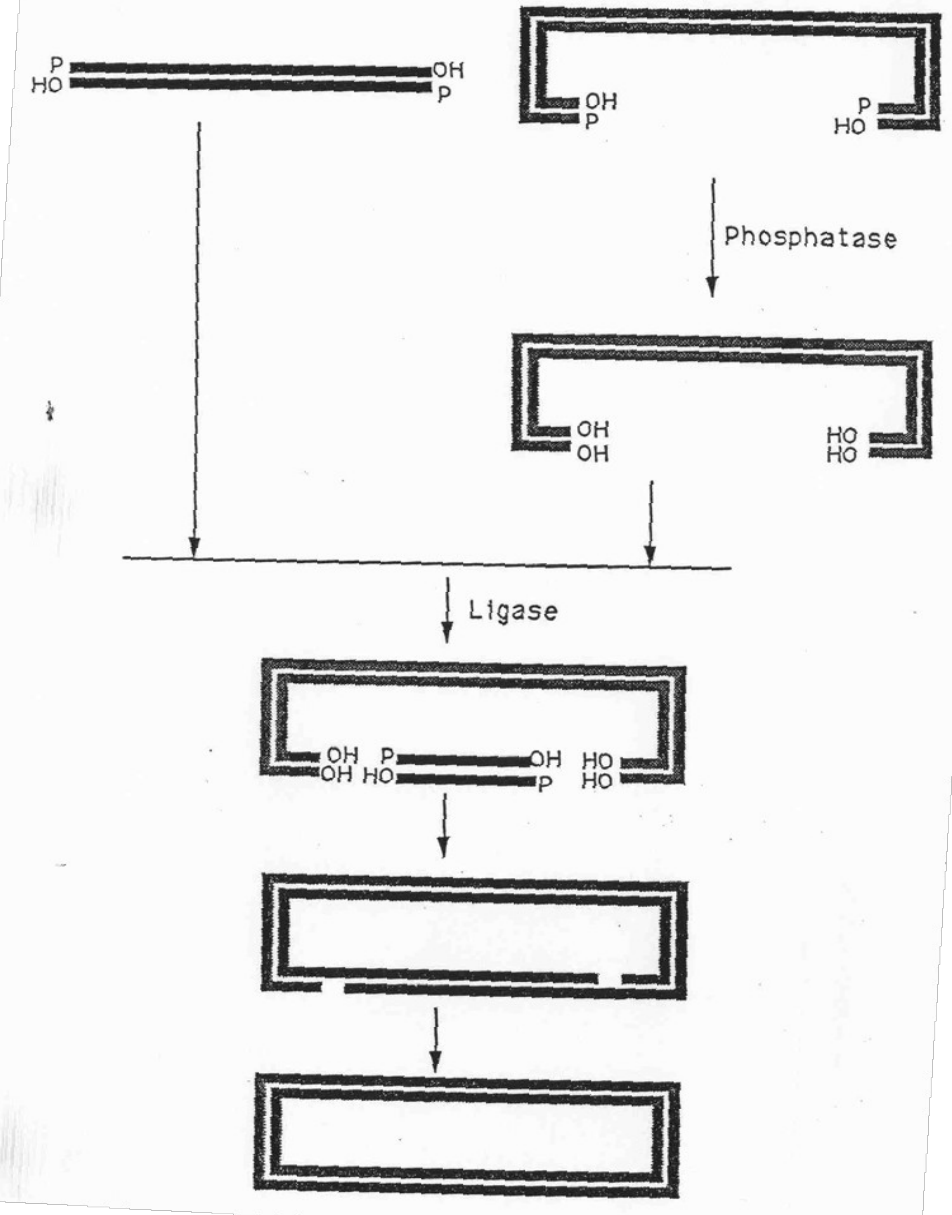
Le marqueur de sélection est, le plus souvent, un gène de résistance à un antibiotique dans le cas des bactéries (exemple : l'ampicilline), ou chez la levure un gène dont le produit rétablit une voie de biosynthèse normale d'une substance clé du métabolisme (exemple : biosynthèse de l'uracile, de la leucine, de l'adénine, du tryptophane, etc ...).

exemple : le gène *BLA* qui code pour une bêta-lactamase qui détruit l'ampicilline et donc confère à la bactérie trasnformée par le vecteur qui le porte le phénotype de résistance à l'ampicilline ou AmpR.

3/ un site de polyclonage

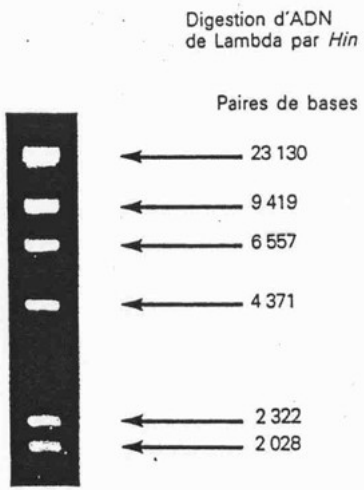
qui contient de très nombreux sites de restriction spécifiques d'enzymes rares qui permettent des clonages plus faciles (comme un jeu de Lego ...)

Clonage



12/01/2009

SÉPARATION DE FRAGMENTS D'ADN SUR GELS D'AGAROSE[86,87]



Séparation de fragments de restriction d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments plus petits se déplacent plus rapidement que les fragments plus grands; ainsi les tailles des fragments de restriction peuvent être estimées en comparant leur distance de déplacement dans le gel avec celle de molécules d'ADN de taille connue. (Aimablement communiqué par D. Helfman.)

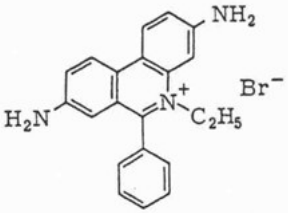
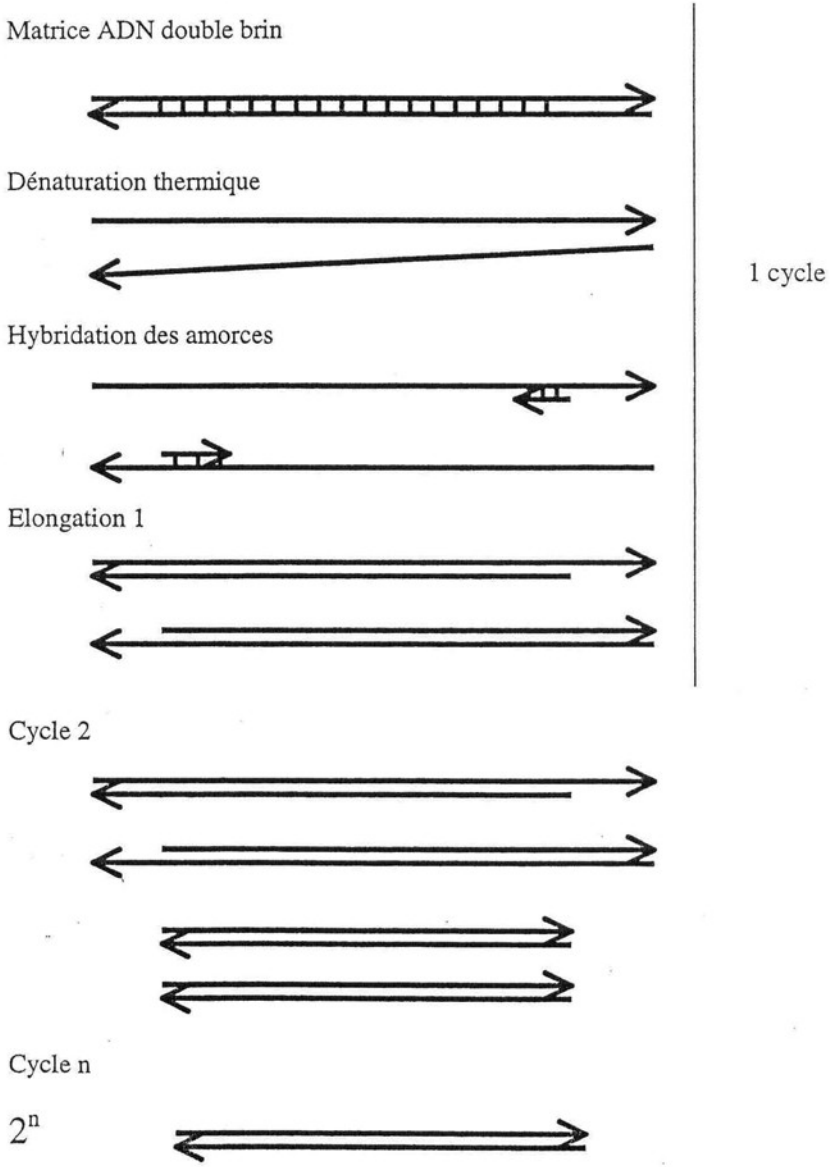


Fig. 2.1-7. Structure of ethidium bromide

Principe de la réaction de PCR



12/01/2009

Critères de choix des séquences d'amorces

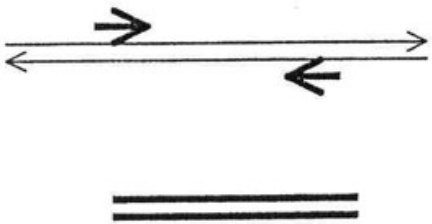
- Sommes (2*nombre de A/T + 3* nombre de G/C) similaires pour les deux amorces.
- Pas de large région en A/T exclusif.
- Pas de self-complémentarité sur elle-même ou avec l'autre amorce
- Pas plus de 5 bases consécutives de l'extrêmité 3'- de l'amorce complémentaires à des positions non souhaitées d'hybridation de la matrice.
- "Verrou CG" aux extrémités.
- Eloigner les sites de restriction d'au moins quatre bases des extrémités.

Polymérases thermostables

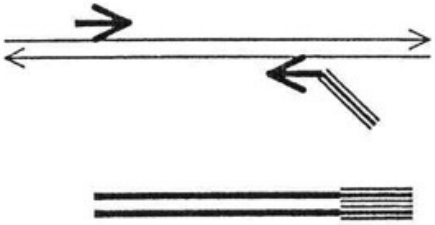
- taq polymérase :
  - marche en général bien
  - fait des erreurs
  - nucléotide supplémentaire aux extrémités
- pfu polymérase :
  - fonctionnement fantaisiste
  - fait moins d'erreurs
  - extrémités « bout franc »

Conditions optimales : 72-74 °C et environ 1000 bp par minute

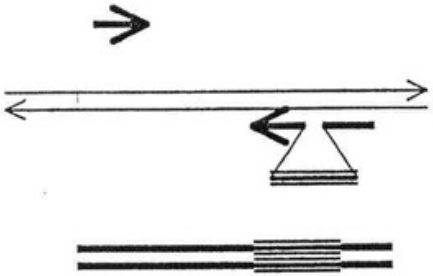
PCR simple



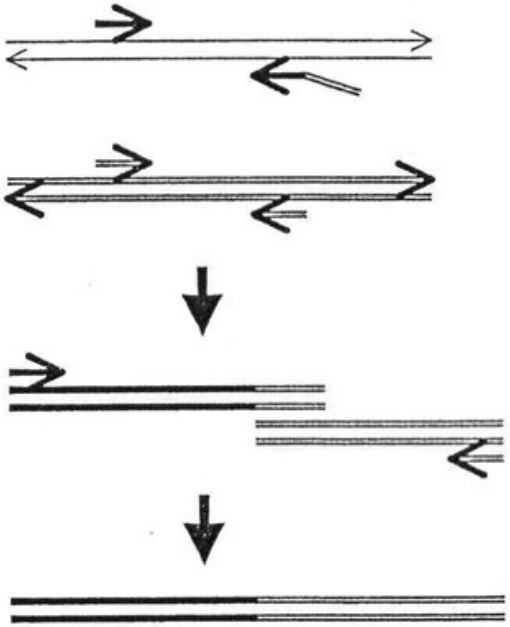
PCR avec bouts flottants

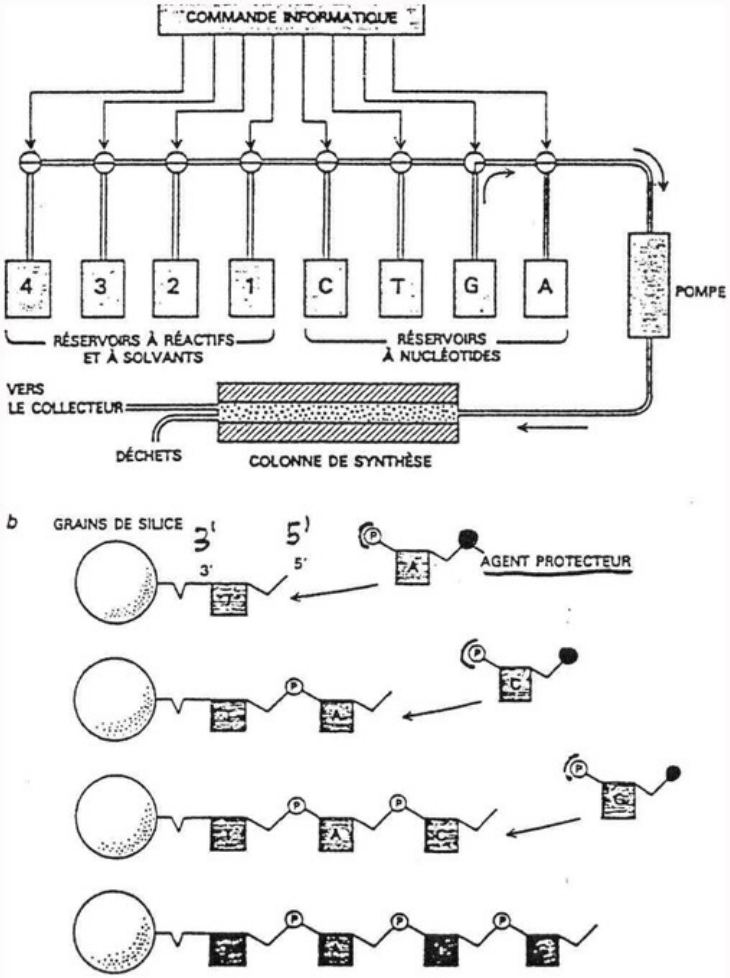


PCR mutation



PCR fusion





15. LES « MACHINES À SYNTHÉTISER LES GÈNES » dont il existe plusieurs types, synthétisent de courtes séquences d'un brin d'ADN automatiquement et rapidement. Elles sont commandées par un microprocesseur. La version construite par *Bio Logicals*, une société canadienne, est représentée en *a*. On commande la séquence de bases désirée en appuyant sur les touches d'un clavier. Le microprocesseur commande l'ouverture de soupapes qui permettent chacune l'envoi des nucléotides, des réactifs et des solvants nécessaires à la synthèse dans la colonne de synthèse. Cette colonne est pleine de grains de silice (d'une granulométrie à peu près identique à celle du sable). Chaque grain constitue le substrat où les molécules d'ADN sont assemblées. Pour constituer une séquence donnée (*b*), on fixe d'abord plusieurs milliers d'exemplaires du nucléotide (base plus sucre) sur chaque grain, le nucléotide étant à la terminaison 3' de la séquence (ici un *T* ou thymidine). Le microprocesseur commande l'envoi de millions d'exemplaires du nouveau nucléotide (*A* ou adénosine) dont l'extrémité 5' est protégée contre les réactions parasites : *A* se fixe sur *T*. On enlève ensuite l'agent protecteur et on fixe *C*, puis *G*, etc. ; on a ainsi synthétisé des chaînes de 40 nucléotides, un nucléotide toutes les demi-heures. Les chaînes terminées sont séparées des grains de silice et envoyées dans un collecteur.

12/01/2009

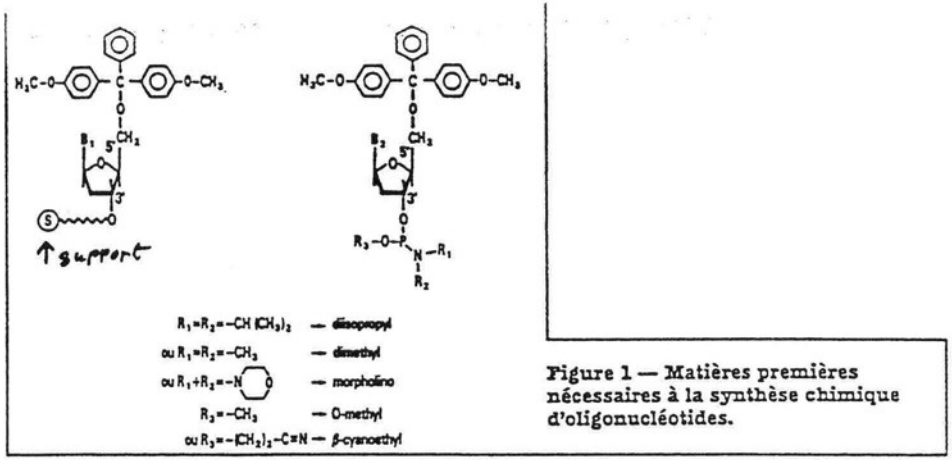


Figure 1 — Matières premières nécessaires à la synthèse chimique d'oligonucléotides.

Figure 2 — Détritylation et addition.

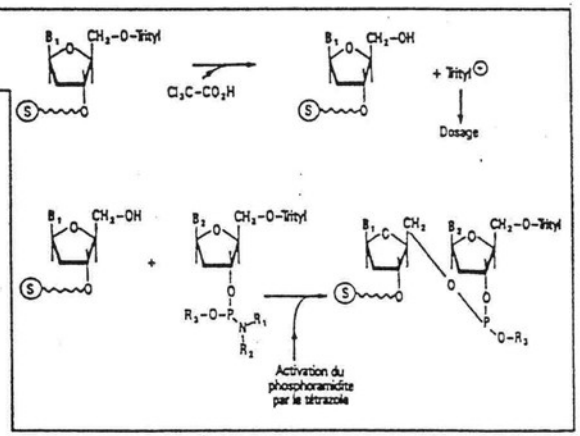


Figure 3 — Capping.

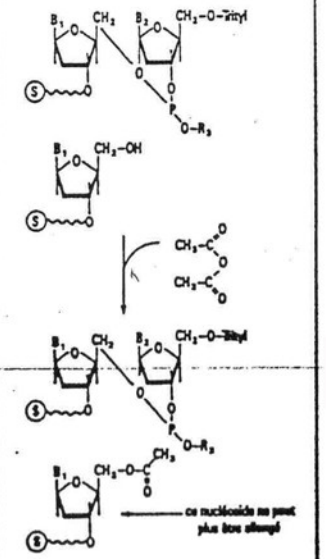
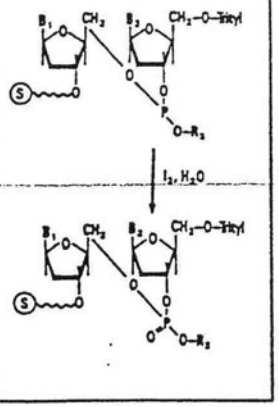
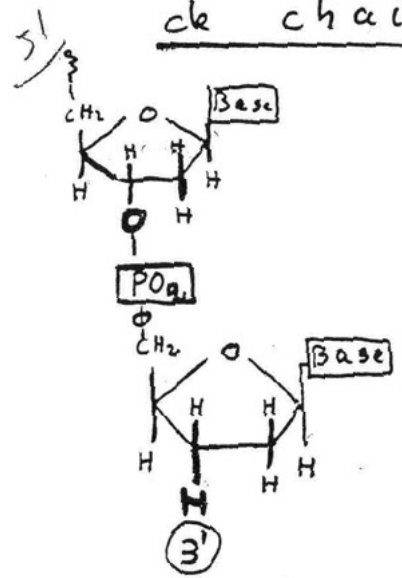


Figure 4 — Oxydation.

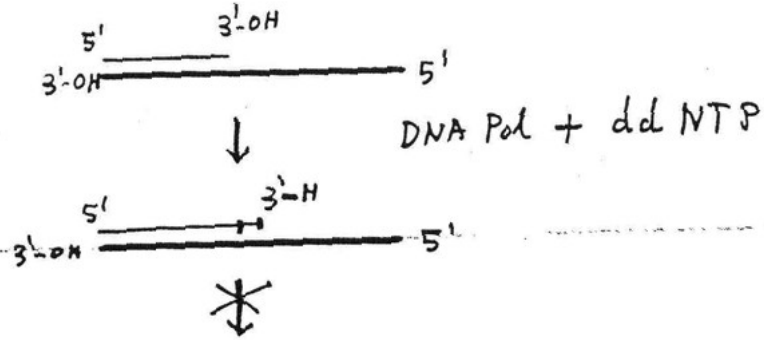


Sequence par termination de chaine.



dNTP : 3'-OH

dd NTP : 3'-H



12/01/2009