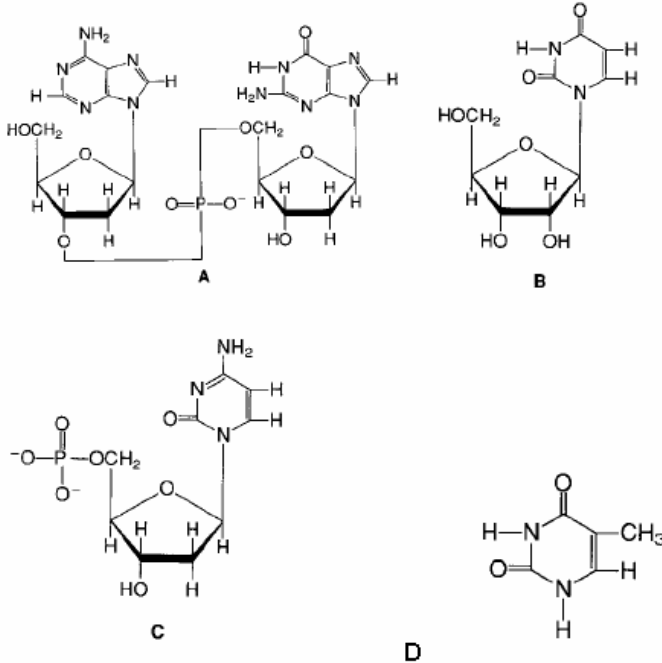


Exercice 1

1) Identifier les bases présentes dans les structures suivantes :

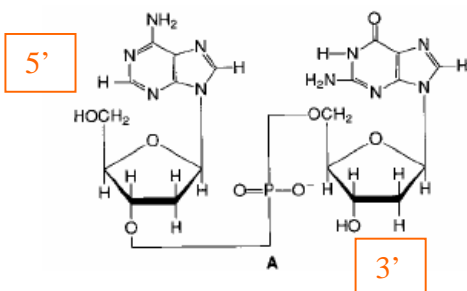


A = adénosine et guanine, B = uracile, C = cytosine, D = thymine

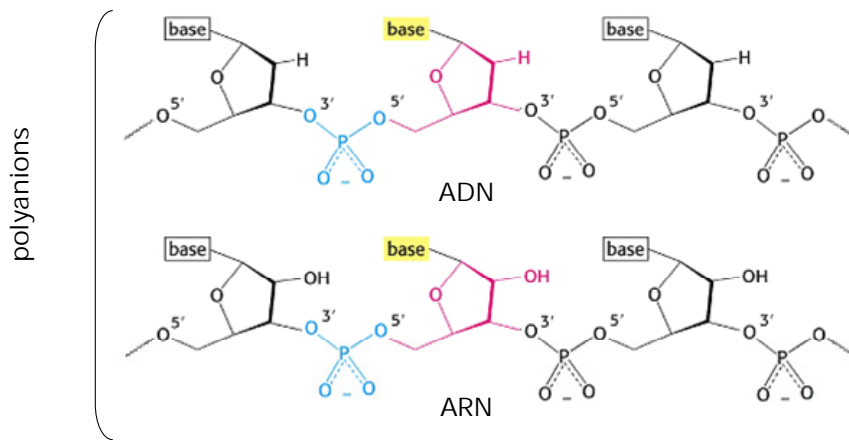
2) Parmi ces bases, lesquelles :

- | | |
|---------------------------------|---------------------|
| a) contiennent du ribose. | B |
| b) contiennent du désoxyribose. | A, C |
| c) contiennent une purine. | A |
| d) contiennent une pyrimidine | B, C, D |
| e) contiennent de la guanine. | A |
| f) sont des nucléosides. | B |
| g) sont des nucléotides. | A (dinucléotide), C |
| h) se trouvent dans l'ARN. | B |
| i) se trouvent dans l'ADN. | A, C, D |

3) indiquer les extrémités 5' et 3' de la molécule A



et ceci sur la base de la représentation schématique suivante de la structure de l'ADN :



Exercice 2

La séquence d'un ADN bicaténaire (double brin), correspondant à un gène, est partiellement reportée ci-dessous.

5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

1) Ecrire la séquence et l'orientation du second brin de ce fragment.

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

Soit si l'on respecte les conventions d'écriture :

5' GGAATTTCTGCAGACGATCGAGAGCTCGGATCCCGTAT 3'

2) Donner le brin complémentaire d'ARN

L'uracile remplace la thymine

3' UAUGCCCUAGGCUCGAGAGCUAGCAGACGUCUUUAAGG 5'

Soit : 5' GGAAUUUCUGCAGACGAUCGAGAGCUCGGAUCCCGUAU 3'

3) Sur une représentation détaillée de l'enchaînement de deux nucléotides d'un brin d'ADN « du site *Bam*HI » dont les bases seront représentées par les lettres correspondantes, indiquer (à l'aide d'une flèche) quelle liaison est rompue sous l'action de l'enzyme *Bam*HI.

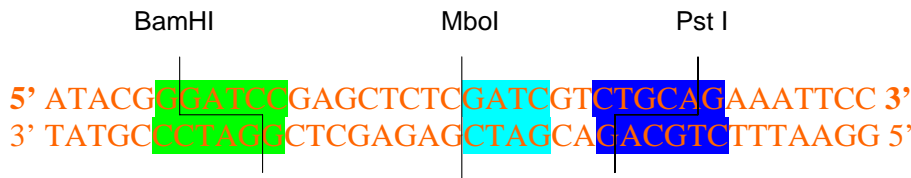


On rappelle que la spécificité des endonucléases de restriction est de :

- **Reconnaître** des séquences de bases spécifiques dans la double hélice d'ADN
 - 4 à 15 paires de bases
 - usuellement des palindromes
- **Cliver** les deux brins du duplex en des endroits très spécifiques par hydrolyse de la liaison phosphodiester pour obtention d'un fragment de restriction

4) Soient les enzymes de restriction **BamHI**, **Pst I**, **Xho I** et **Mbo I** dont les sites reconnus sont : **BamHI** : 5' G/GATCC 3' ; **Pst I** : 5' CTGCA/G 3' ; **Xho I** : 5' C/TCGAG 3' ; **Mbo I** : 5' /GATC 3'. Recopier la séquence de l'ADN et encadrer les sites de restriction en indiquant la position des coupures.

en surligné, les sites reconnus respectivement par les enzymes avec en noir, la coupure correspondante



BamHI : 5' G/GATCC 3'
 3' CCTAG/G 5'

Pst I : 5' CTGCA/G 3'
 3' G/ACGTC 5'

Xho I : 5' C/TCGAG 3'
 3' GAGCT/C 5'

Xho I ne reconnaît pas de site sur ce fragment d'ADN donc n'aura pas d'action (attention à l'orientation du fragment d'ADN)

Mbo I : 5' /GATC 3'.
 3' /CTAG 5'

5) Pour chaque enzyme, écrire les séquences des extrémités des molécules d'ADN digérées et préciser le type d'extrémités obtenu.

Pour BamHI (terminaisons à bouts collants)

<i>Fragment 1 :</i> 5' ATACGG 3' TATGCCCTAG	<i>Fragment 2 :</i> GATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3' GCTCGAGAGCTAGCAGACGTCCTTAAGG 5'
---	---

Pour Pst I (terminaisons à bouts collants)

<i>Fragment 1 :</i> 5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCA 3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAG	<i>Fragment 2 :</i> GAAATTCC 3' ACGTCCTTAAGG 5'
---	---

Pour Mbo I (terminaisons à bouts francs)

Fragment 1 :

5' ATACGGGATCCGAGCTCTC
3' TATGCCCTAGGCTCGAGAG

Fragment 2 :

GATCGTCTGCAGAAATTCC 3'
CTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

6) On mélange ce brin d'ADN apparié avec son brin complémentaire à un autre fragment d'ADN double brin. La solution est portée à une température supérieure à leurs T_m respectives, puis refroidie. Que peut-on attendre?

Les brins dissociés (dénaturés) d'ADN de chaque espèce vont se réappairier (se renaturer) avec leur séquence complémentaire sans mélange d'ADN des deux espèces. L'appariement des bases complémentaires est le plus stable énergétiquement.

8) Voici la séquence d'une amorce (ou primer) : 5' - TTTCTGCA- 3'

Où cette amorce se fixera-t-elle sur la séquence d'ADN ? Quelle séquence obtiendra-t-on après élongation par la DNA-polymérase ?

3' -ACGTCTTT- 5'
5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

En vert, site reconnu par l'amorce

En turquoise, l'amorce

La DNA polymerase permet l'ajout d'un dNTP (nucléotides triphosphates) à l'extrémité hydroxyle en 3' de l'ADN :

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTTAAGG 5'

3' TATGCCCTAGGCTCGAGAGCTAGCAGACGTCTTT- 5'
5' ATACGGGATCCGAGCTCTCGATCGTCTGCAGAAATTCC 3'

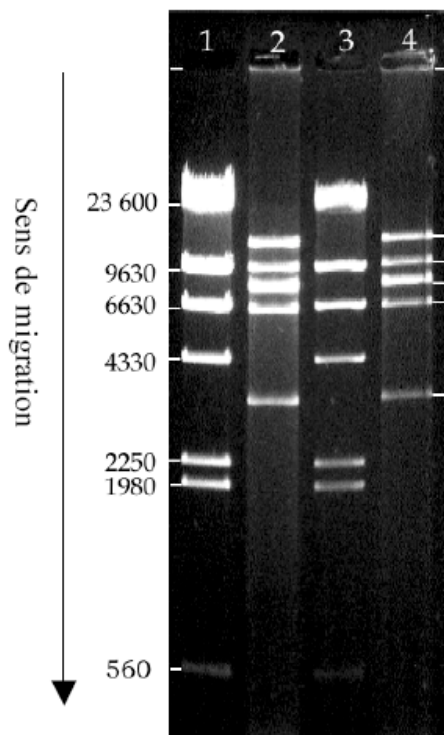
En rose, séquence obtenue après élongation

Exercice 3

L'ADN d'un cosmide recombinant* de 48,6 kpb a été hydrolysé par l'enzyme de restriction Sal I. Cet ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (pistes 2 et 4). Un marqueur de taille (l'ADN du phage lambda hydrolysé par l'enzyme de restriction Hind III) est déposé dans les puits 1 et 3. Ce marqueur de taille est un mélange équimolaire de fragments d'ADN de tailles connues. La quantité d'ADN total déposé dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. Après coloration par le bromure d'ethidium**, l'image suivante est obtenue.

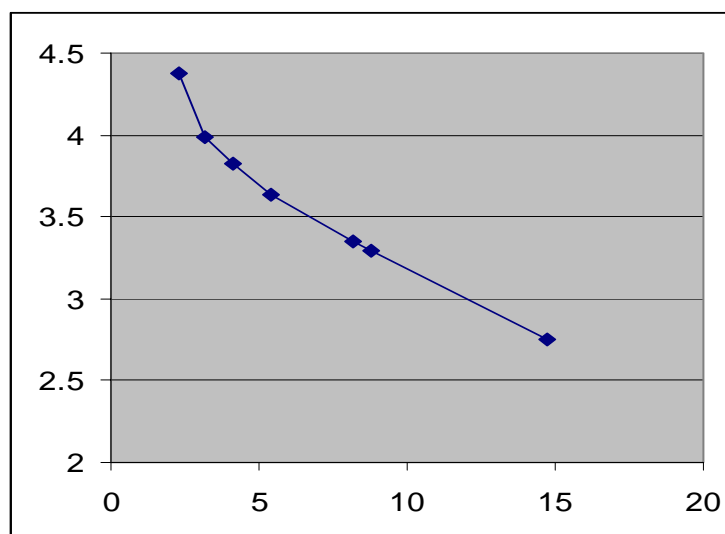
* On rappelle qu'un cosmide est un vecteur artificiel constitué d'un plasmide auquel a été ajouté le site COS du bactériophage lambda. L'intérêt des cosmides réside dans le fait qu'ils permettent le clonage de fragments d'ADN de grande taille soit environ de 45kpb.

** Le bromure d'éthidium (BET) une molécule aromatique plane qui s'intercale entre les paires de bases de la double hélice et devient fluorescent. Il suffit ensuite d'éclairer le gel avec une lumière ultra-violette (vers 310 nm) pour voir la fluorescence orange du complexe ADN-BET dans les bandes.



1) À l'aide des valeurs du tableau I, tracer la courbe étalon :
 $\text{Log taille(pb)} = f(\text{distance de migration})$.

Type de courbe à obtenir :



2) À partir de cette courbe, déduire la taille des fragments issus de la digestion par l'enzyme de restriction Sal I de l'ADN du cosmide recombinant (pistes 2 et 4).

Migration (cm)	Taille (pb)
2.8	14692
3.2	11434
3.6	9165
4.1	7179
6.5	3021
SOMME	45490

3) La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ?

La somme est plus faible. Cela peut être dû notamment aux incertitudes qui peuvent être importantes en particulier pour les fragments de grande taille (voir allure courbe) ou à deux bandes très proches qui n'auraient pas été différenciées à la lecture.

4) Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ADN de manière uniforme sur une molécule d'ADN linéaire. Étudiez attentivement la photo du profil de restriction, que remarquez-vous ? Qu'en déduisez-vous ?

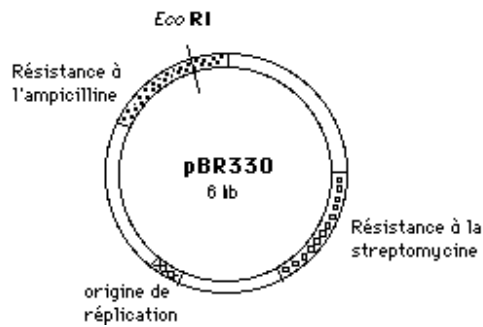
La fluorescence des bandes 1 et 2 est plus intense. Or la quantité d'ADN total déposé dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. La lecture du gel permet donc, au travers de l'intensité de la fluorescence émise, d'obtenir une information semi-quantitative et de comparer de manière relative les quantités d'ADN au niveau de chaque bande.

Tableau I :

Phage lambda digéré par <i>Hind</i> III pistes 1 et 3		ADN cosmique digéré par Sal I pistes 2 et 4	
Migration en cm	Taille en pb	Migration en cm	Taille en pb
2,3	23 600	2,8	
3,2	9 630	3,2	
4,1	6 630	3,6	
5,4	4 330	4,1	
8,2	2 250	6,5	
8,8	1 980		
14,7	560		

Exercice 4 : Clonage et analyse de l'ADN recombinant

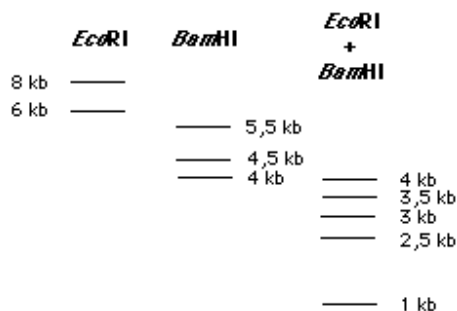
On souhaite étudier la fonctionnalité d'un gène M d'une bactérie. Pour cela, on essaie de cloner au site *Eco* RI du vecteur plasmidique pBR330 (voir schéma) un fragment *Eco* RI-*Eco* RI d'ADN génomique de la bactérie d'intérêt :



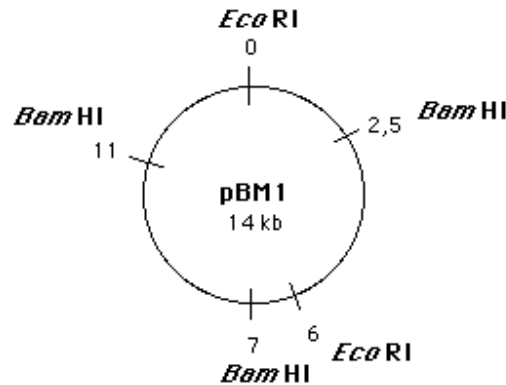
a- Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones recombinants.

- **Préparation de l'insert:** Extraction d'ADN génomique de la bactérie. Digestion partielle de cet ADN par l'enzyme de restriction *Eco* RI, de manière à générer des fragments de 5 à 10 kb. Electrophorèse préparative pour purifier sur gel les fragments de 5 à 10 kb.
- **Préparation du vecteur:** Digestion complète de pBR330 par *Eco* RI. Déphosphorylation des extrémités.
- **clonage:** ligature des inserts et des vecteurs. Transformation de cellules d'*E. coli*. Recommencer les étapes précédentes jusqu'à avoir 10×10^6 colonies transformées indépendantes.
- **Sélection:** sélection des colonies transformées sur milieu contenant de la streptomycine. Pour estimer le taux de colonies qui ont reçu un plasmide contenant de l'ADN génomique de la bactérie étudiée, repiquage d'environ 500 colonies sur milieu contenant de l'ampicilline: seule les colonies qui ont reçu un plasmide ne contenant pas d'ADN génomique de la bactérie étudiée poussent.
- **Sélection des clones contenant le gène d'intérêt:** transfert des 10×10^6 colonies sur filtre et hybridation moléculaire avec une sonde appropriée (technique dite de "l'hybridation sur colonies").

b- Un des plasmides recombinants contenant le gène M (appelé pBM1) est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium, on obtient les profils de restriction suivants:



Donnez la carte de restriction du plasmide recombinant pBM1.



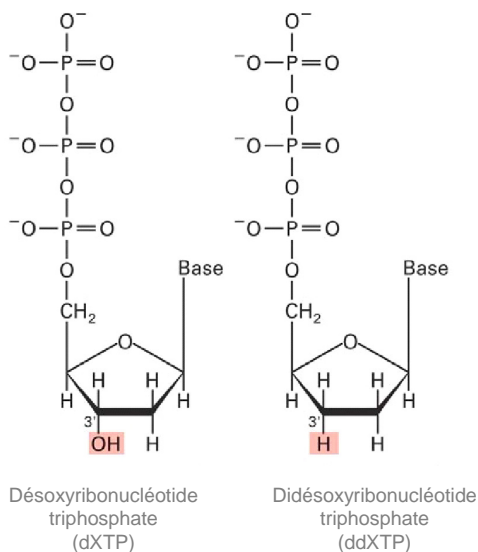
Exercice 5 : Séquençage

Vous disposez d'un brin d'ADN à séquencer (matrice), d'une amorce, d'ADN polymérase tronquée*, des quatre 2'-désoxyribonucléotides (dXTP) et d'un jeu des différents 2',3'-didésoxyribo-nucléotides (ddXTP). L'amorce est radiomarquée par du phosphore radioactif ^{32}P . L'ADN matriciel à séquencer ACGTAATCGC---- comporte, à son extrémité 3', une séquence supplémentaire (représentée ici par un segment de droite en pointillé) sur laquelle l'amorce va s'hybrider, créant ainsi le site d'initiation de l'ADN polymérase.

*l'enzyme est constituée de plusieurs domaines dont l'un est responsable de la destruction " programmée " de l'amorce ; après élimination de ce domaine, la fraction restante, désignée " fragment de Klenow ", conserve l'activité ADN polymérase.

1 — Résumez brièvement le principe de la méthode en indiquant le rôle du didésoxyribonucléotide.

L'originalité du ddXTP (fluorescent ou radioactif) dans la méthode utilisée (Méthode de Sanger) est qu'il stoppe la progression de la synthèse (absence du groupement OH)



Rappel de la méthode :

1 — la réplication (ou duplication) de l'ADN nécessite la présence d'un brin modèle (matrice), d'une amorce complémentaire d'un fragment d'ADN qui jouxte la région à séquencer, des 4 nucléotides dXTP, d'ADN polymérase.

2 — la synthèse du brin complémentaire se faisant dans la direction 5'P vers 3'OH, le brin matriciel a l'orientation inverse ; l'amorce se lie du côté 3' de l'ADN matriciel ; l'ADN polymérase parcourt ce brin dans sa direction 3'-5' pour allonger l'amorce dans la direction correcte 5'-3'.

3 — lorsque l'ADN polymérase identifie A sur le brin modèle, elle place T sur le brin en cours de synthèse (de même pour C et G).

Quand des ddXTP sont utilisés :

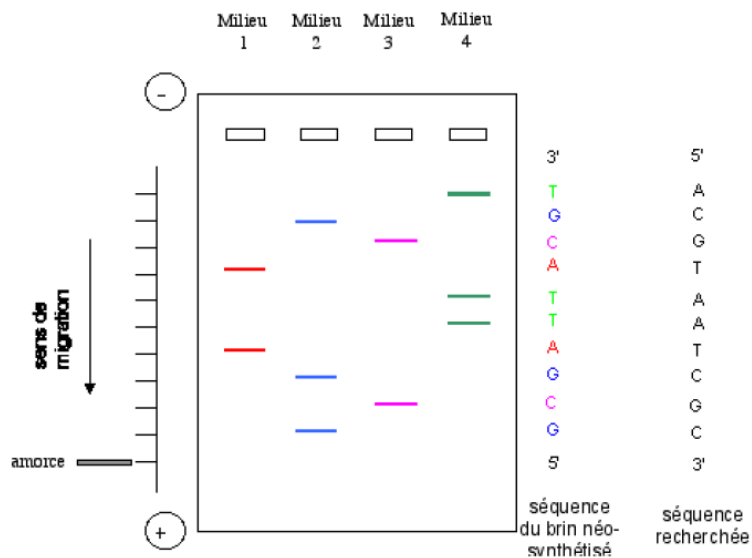
L'enzyme place soit 1 dXTP et l'élongation de l'amorce se poursuit, soit 1 ddXTP et la synthèse s'arrête. On obtient au final une série d'oligonucléotides de taille variable, tous terminés par ddX (X = A, G, C, T selon le milieu). Le résultat de l'électrophorèse des 4 milieux donne directement la séquence de l'ADN complémentaire à la séquence recherchée.

2 — Compléter le tableau en indiquant la composition des différents milieux réactionnels et, pour chaque milieu, le type et la taille des fragments néosynthétisés.

Composition des milieux			
Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4
ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺	ADN matrice, amorce, 4 dXTP, ADN polymérase, Mg ⁺⁺
+ ddATP	+ ddGTP	+ ddCTP	+ ddTTP
Composition des fragments néosynthétisés			
Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4
-GCGddA(4)	-ddG(1)	-GddC(2)	-GCGAddT(5)
-GCGATTddA(7)	-GCddG(3)	-GCGATTAddC(8)	-GCGATddT(6)
	-GCGATTACddG(9)		-GCGATTACGddT(10)

3 — Sur le gel ci-dessous, représenter la taille des fragments néosynthétisés dans chaque milieu réactionnel (utiliser l'échelle de taille représentée à gauche du schéma)

4 — Reporter, à droite, la séquence du brin synthétisé puis la séquence recherchée, en indiquant le sens de lecture des séquences établies.



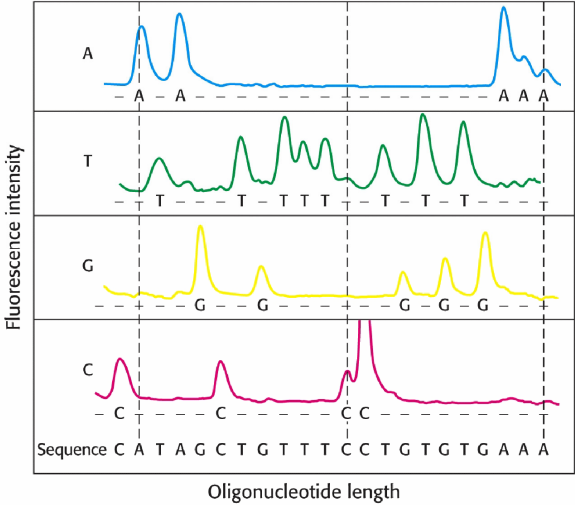
NB : Il est possible de repérer les différents oligonucléotides en marquant non pas l'amorce mais les ddXTP ; ceux-ci peuvent être marqués par un atome radioactif (^{32}P) ou par des réactifs fluorescents.

Exercice 6 : Séquençage

Un petit fragment d'ADN a été séquencé selon la méthode d'interruption des chaînes (méthode de Sanger). Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur automatique pourvu d'une source laser ou infra-rouge qui excite les fluorochromes portés par les ddNTP, détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en faite en terme de nucléotides Donner la séquence de l'ADN (la flèche sur le dessin indique le sens de migration)



*Des séquences de 300 nucléotides sont séquencées de manière correcte sur gel (« à la main »).
Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité*



et ceci jusqu'à 1000