

Corrigé Type

Exercice 1 (6 pts):

Vous disposez d'un brin d'ADN à séquencer (matrice), d'une amorce, d'ADN polymérase, des quatre désoxyribonucléotides (dNTP) et d'un jeu des différents didéoxyribo-nucléotides (ddNTP). 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.

1. Indiquez la technique concernée (1 pt)

Il s'agit de la méthode enzymatique (méthode de Sanger) de séquençage de l'ADN.

2. Résumez brièvement le principe de la technique en indiquant le rôle du didéoxyribonucléotides (1 pt)

Le principe consiste à ajouter des didéoxynucléotides (ddNTP) aux désoxynucléotides lors de la polymérisation. Ainsi, si on ajoute du dNTP la polymérisation continuera et s'arrêtera lorsqu'on ajoute un ddNTP en raison de l'absence du groupement OH, nécessaire à l'extension. On aura une série de molécules plus ou moins longues.

3. Complétez le tableau en indiquant la composition des différents tubes réactionnels et, pour chaque tube, le type et la taille des fragments néosynthétisés (4 pts) (0.25 pt/ réponse)

Composition des tubes			
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
ADN matrice, amorce, 4 <u>dNTP</u> , ADN polymérase.	ADN matrice, amorce, 4 <u>dNTP</u> , ADN polymérase.	ADN matrice, amorce, 4 <u>dNTP</u> , ADN polymérase.	ADN matrice, amorce, 4 <u>dNTP</u> , ADN polymérase.
+ <u>ddATP</u>	+ <u>ddGTP</u>	+ <u>ddCTP</u>	+ <u>ddTTP</u>
Composition des fragments néosynthétisés			
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
- <u>GCGA</u>	- <u>G</u>	- <u>GC</u>	- <u>GCGAT</u>
- <u>GCGATTA</u>	- <u>GCG</u>	- <u>GCGATTAC</u>	- <u>GCGATT</u>
	- <u>GCGATTAC</u>		- <u>GCGATTACG</u>

Exercice 2 (4 pts):

Deux fragments d'ADN dont la longueur est de 18 base :

Fragment A : 5'CCCCGTTCTATCACCAGG3'

Fragment B : 5'CCTATATCTACATATTCC3'

1) Calculez la Tm pour chaque fragment

$T_m = 2x(A+T) + 4x(C+G)$ (1 pt)

Fragment A : 5'CCCCGTTCTATCACCAGG3' (n<20)

$T_{mA} = 2x(7) + 4(11) = 14+44=58\text{ }^\circ\text{C}$ (1 pt)

Fragment B : 5'CCTATATCTACATATTCC3' (n<20)

$T_{mB} = 2x(12) + 4(6) = 24+24=48\text{ }^\circ\text{C}$ (1 pt)

2) Expliquez l'obtention de deux Tm différentes (1 pt)

La différence entre les T_{mA} et T_{mB} est attribuable à la différence en pourcentage de bases. En effet, l'augmentation de la proportion en GC augmente la Tm. Il y a 3 liaisons H entre les bases G et C et 2 entre les bases A et T. Donc plus la proportion en GC est importante, plus Tm sera élevée. Les régions riches en AT qui sont les premières à fondre puis celles riches en GC. Le fragment A contient plus CG (11 couples CG) par rapport le fragment B (6 couples CG), ce qui explique que Tm pour Le fragment A est supérieur a Tm pour le fragment B.

Exercice 3 : Parmi les propositions suivantes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte (s) (5 pts)

1) La digestion enzymatique de l'ADN (1 pt)

A. Nécessite des enzymes de restriction ;

B. Ces enzymes de restriction sont des exonucléases bactériennes ;

C. Les séquences reconnues sont palindromiques ;

D. La coupure peut être de 3 types : à bout franc, à bout cohésif et à bout adhésif ;

E. Il existe 3 types d'enzymes de restriction mais en biologie moléculaire celles de types III sont le plus utilisées.

2) L'hybridation de l'ADN (1 pt)

A. Les sondes et les amorces s'hybrident toujours sous forme d'ADN simple brin ;

B. Les sondes nucléotidiques utilisées en Southern blot sont généralement plus courtes que les amorces utilisées en PCR ;

C. Les sondes sont dites « chaudes » lorsqu'elles sont radiomarquées ;

D. Une amorce est une séquence ADN double brin ;

E. Toutes les propositions précédentes sont fausses.

3) Le Southern-Blot... (1 pt)

A. Est une hybridation ADN-ARN ;

B. Permet de réaliser l'analyse des ARNm ;

C. Nécessite absolument de réaliser une électrophorèse sur gel avant un transfert sur un support solide ;

D. Contient une étape d'hybridation entre une sonde marquée et des acides nucléiques immobilisés sur gel.

4) Un ADNc est : (1 pt)

- A. Une séquence fabriquée *in vitro* pour des besoins expérimentaux ;
- B. Une séquence ne contenant aucune information autre que celle qui est présente dans un ARN messager mature ;
- C. Une séquence contenant l'ensemble des exons et des introns ;
- D. Une séquence dont on peut déduire une séquence polypeptidique ;
- E. Une séquence naturellement présente dans le génome humain.

5) Quels sont les réactifs nécessaires à l'amplification d'un segment d'ADN par la méthode de la PCR ? (1 pt)

- A. Une molécule d'ADN qui sert de matrice ;
- B. Un mélange de désoxyribonucléosides monophosphates (dNMP) ;
- C. Deux amorces complémentaires l'une de l'autre ;
- D. Une ADN polymérase thermorésistante ;
- E. Un mélange de didéoxynucléosides triphosphates (ddNTPs).

Exercice 4 : Répondez par vrais ou faux (5 pts) (0.5 pt/ réponse)

1. La première étape de la PCR est la dénaturation de l'ADN. (vrai)
2. Au cours de la PCR, l'ADN est exposé à trois températures différentes. (vrai)
3. L'ADNc est copié à partir d'ARN messager grâce à l'action d'une ADN ligase. (faux)
4. L'endonucléase EcoRI dont la coupure sur un ADN circulaire dont 4 fragments, est en faveur de la présence de 4 sites de restriction. (vrai)
5. L'hybridation d'un ADN par une sonde exige une similitude de séquences entre les deux composantes. (~~Faux~~)
6. La quantité d'ADN dans un tube peut être appréciée en mesurant l'absorbance à 280 nm. (faux)
7. Lors du clonage, l'ADN ligase joint les extrémités cohésives du fragment de l'ADN avec les extrémités cohésives de plasmides. (vrai)
8. En génie génétique on peut identifier un gène sur un fragment d'ADN en utilisant une sonde moléculaire radioactive. (vrai)
9. La séparation des acides nucléiques utilise couramment l'électrophorèse. (vrai)
10. Une banque génomique correspond à l'ensemble de gènes caractéristiques d'une espèce, constitués uniquement d'exons et codant pour des protéines fonctionnelles. (faux)