

« Biologie moléculaire »

1- Donner un exemple des enzymes suivants : polymérase, ligase, isomérase, nucléase, et quelles sont les différentes applications des enzymes de restrictions ? **(5 Points)**.

- **Les polymérases** : Les enzymes polymérases (DNA polymérase, ARN polymérase) synthétisent les acides nucléiques de 5' vers 3' en utilisant des nucléotides triphosphates. La DNA polymérase 1 de *E.coli*.
- **Les ligases** : Les DNA ligases sont des enzymes qui sont capables de lier, souder 2 fragments d'ADN. On utilise les ligases, en présence d'ATP. Elles favorisent une liaison ester entre le carbone 3'OH et le phosphate 5'. (La DNA ligase d'*E. coli*).
- **Isomérase** : La topoisomérase 1 : coupure transitoire d'un seul brin d'ADN. Ce sont les enzymes relâchant qui supprime les super tours négatifs.
- **Nucléase S1** : est une enzyme isolée à partir d'un champignon, *Aspergillus oryzae*. C'est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin.
- **Les enzymes de restriction** : Ce sont des endonucléases qui sont capables de couper de l'ADN double brin à des sites spécifiques (palindromique) de 4 à 6 paires de bases (des fois plus). Ces enzymes sont isolés à partir de bactéries le plus souvent qui utilisent ces molécules pour se défendre contre une invasion d'ADN étrangers particulièrement d'origine virale.

2- Quelles sont les applications de la technologie de l'ADN recombinant ? et quels sont les différents types de vecteurs de clonage ? **(5 Points)**.

Applications de la technologie de l'ADN recombinant

- Détermination de la séquence d'ADN de ce gène en utilisant la technique de séquençage et également
- Introduire une mutation au gène cloné (mutagénèse) et le réintroduire dans son hôte d'origine afin d'étudier les propriétés fonctionnelles de ce gène, aussi utilisation et fabrication des sondes pour la cartographie ou le diagnostic génétique.
- Introduction du gène cloné dans un nouvel hôte afin de créer un organisme transgénique que l'on n'aurait pas pu obtenir facilement par les méthodes de croisements naturels et également la possibilité de modifier le métabolisme par génie génétique.
- Les séquences d'acides nucléiques peuvent être utilisées comme un outil de diagnostic et également pour la recherche de nouvelles thérapies pour les maladies génétiques.

Les vecteurs de clonage

1. Les plasmides (pBR322, pUC18, pUC19).
2. Les bactériophages (vecteurs viraux) (*Phage λ Lambda*, *Le phage M13*).
3. Systèmes hybrides (Phagemide : plasmide + M13) : Cosmide : plasmide + phage λ), λ Zap : plasmide + phage λ + phage M13).
4. Chromosomes (Les YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), Les BAC (*Bacterial artificial chromosome*), Les PAC (*P1 Artificial Chromosome*)).

3- Donner la composition du mélange réactionnel de la PCR, et quelles sont les étapes de cette technique ? **(5 Points)**.

- L'extrait d'ADN (ADN matriciel).
- Quelques microlitres de la Taq polymérase (ADN polymérase).
- Les amorces (simple brin de 15 à 30 bases), qui sont des oligonucléotides de synthèse, les séquences terminales 5' des deux brins du fragment d'ADN à amplifier doivent être connues.
- Les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon.

Principe de la PCR

- La dénaturation : la première période s'effectue à une température de 95 °C (30 à 90 secondes).
- L'hybridation : la deuxième période s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70 °C (30 à 60 secondes). La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux amorces de s'hybrider.
- L'élongation : la troisième période s'effectue à une température de 72 °C (30 à 120 secondes). À 72° C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaux amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel.
- Détection et analyse des produits PCR : Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide).

4- Quel est le rôle de l'ajout des didésoxyribonucléotide (ddNTP) lors de la technique de séquençage ? et quelles sont les étapes de cette technique ? **(5 Points)**.

Un didésoxynucléotide est un analogue structural du désoxynucléotide mais qui ne possède pas un groupement OH en 3', il peut être ajouté normalement à la chaîne au cours de la synthèse, mais l'extension est stoppée juste après son incorporation (les didésoxynucléotides sont des terminateurs de la réaction de polymérisation).

Principe de la technique

La réaction s'effectue en traitant de manière parallèle 4 tubes contenant chacun le mélange réactionnel.

- L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments plus ou moins longs d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné (selon qu'un dNTP ou ddNTP a été incorporé au hasard).
- Parallèlement, dans trois autres tubes on ajoutera aux dNTP du ddCTP, du ddTTP ou du ddGTP. On obtiendra ainsi des molécules s'arrêtant soit aux C soit aux T soit aux G en fonction du ddNTP utilisé.
- Dans les quatre tubes on a donc des molécules dont la taille dépend de la séquence. En plus, tous les fragments nucléiques seront radioactifs car ayant incorporé des dNTP radiomarqués au cours de leur synthèse.²
- Pour les séparer on peut faire un gel d'électrophorèse en condition dénaturante de façon à ne voir que les molécules néosynthétisées. Sur les 4 pistes d'un gel d'acrylamides, le contenu de chacun des 4 tubes est déposé.
- Les brins vont migrer sur un gel selon leur taille : le plus petit migre le plus vite. Plusieurs centaines de nucléotides peuvent être ainsi lus sur un gel.
- Les bandes d'ADN marquées (de 200 à 750 nucléotides environ) séparées par électrophorèse sont révélées par autoradiographie.