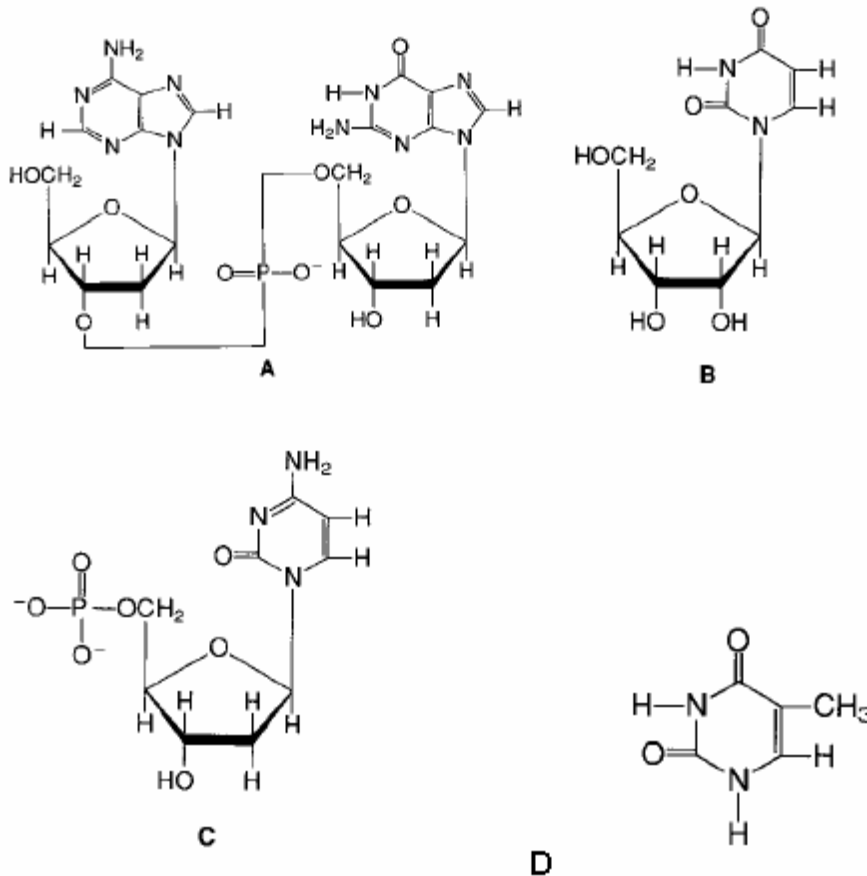


Exercice 1

1) Identifier les bases présentes dans les structures suivantes :



2) Parmi ces bases, lesquelles :

- contiennent du ribose.
- contiennent du désoxyribose.
- contiennent une purine.
- contiennent une pyrimidine
- contiennent de la guanine.
- sont des nucléosides.
- sont des nucléotides.
- se trouvent dans l'ARN.
- se trouvent dans l'ADN.

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

Exercice 2

La séquence d'un ADN bicaténaire, 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.

2) Donner le brin complémentaire d'ARN

3) Soient les enzymes de restriction *Bam*HI, *Pst* I, *Xho* I et *Mbo* I dont les sites reconnus sont :

*Bam*HI : 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.

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

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?

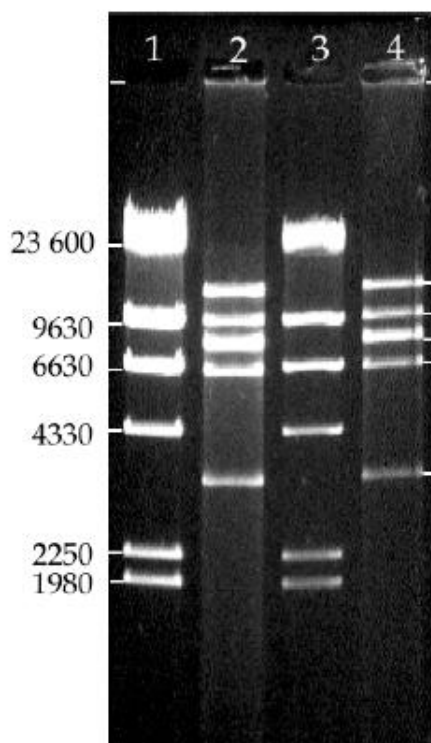
8) Voici la séquence d'une amorce (ou primer) : 5' - TTTCTGCA- 3'

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

Exercice 3

L'ADN d'un plasmide 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.



1) Tracer la courbe étalon : $\text{Log taille(pb)} = f(\text{distance de migration})$.

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).

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

4) Le bromure d'ethidium 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 ?

Exercice n° 4 : La séquence d'ADN ci-dessous vient de vous être fournie.

5'ATCGGTGATCTGCAGTCCCGATCGGGCACCCGGGTTAGCGATCGTTTAATGGGTCGGCCCGGGGATCCCGGGCCTGGACTGATCTGACATGGTGTTCAGTCAGTTTCTC 3'

Q1 : Pouvez-vous fragmenter cette molécule avec les endonucléases de restrictions suivantes :

BamHI (G/GATCC), HpaII (C/CGG), PvuII (CGAT/CG), Sau3A (/GATC), SmaI (CCC/GGG), XbaI (T/CTAGA) ?

Q2 : Placez les sites existants et schématisez les extrémités 5' et 3' après coupure pour chaque enzyme.

Q3 : Que deviennent ces extrémités lorsque les fragments obtenus après coupure sont incubés en présence de l'ADN polymérase Klenow en présence de dNTPs ?

Q4 : Après cette modification, vous faites agir une ligase. Avez-vous régénéré l'ensemble des sites ?

Exercice n° 5 : Un plasmide circulaire possède un site de coupure par l'enzyme *XhoI* et deux sites de coupures pour l'enzyme *SmaI*. Ces deux sites pour l'enzyme *SmaI* sont situés de part et d'autre du site *XhoI*, à égale distance de ce site. Lorsque vous effectuez une électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de ce plasmide digéré par l'enzyme *XhoI* ou par *SmaI* en présence de bromure d'éthidium, on estime la taille des fragments obtenus à 3 kb ou à 1.5 kb respectivement. Lorsque vous effectuez la double digestion *XhoI* et *SmaI*, la somme des fragments obtenus fait 2.25 kb. Tracer la carte de restriction de ce plasmide en positionnant les sites *XhoI* et *SmaI*.

Exercice n° 6 : Un fragment d'ADN HindIII-HindIII de 1kb est digéré par l'enzyme EcoRI en un fragment de 300 pb et un fragment de 700 pb. Si le fragment de 300 pb est purifié et digéré par l'enzyme PstI, il donne deux fragments : l'un de 100 pb et l'autre de 200 pb. Si le fragment de 700 pb est traité de la même façon, il produit deux fragments : l'un de 500 pb et l'autre de 200 pb. Lorsque le fragment HindIII-HindIII est digéré directement par l'enzyme PstI on obtient trois fragments : 100, 200 et 700 pb. Expliquez ces résultats à l'aide de schémas. Qu'obtiendrait-on en effectuant la double digestion EcoRI et PstI sur le fragment de 1kb ?

Exercice n° 8 : Un chromosome linéaire de phage est marqué au ³²P à ses deux extrémités et digéré par EcoRI. Une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de Bet permet de mettre en évidence des fragments de 2.9 – 4.5 – 6.2 – 7.4 et 8 kb. Après Southern blot et autoradiographie, seuls les fragments de 6.2 et de 8 kb sont détectés. Avec l'enzyme BamHI la taille des fragments obtenus est de 6.0 – 10.1 – 12.9 kb. Et, dans ce cas, le marquage est associé aux fragments de 6,0 et 10.1 kb. La double digestion EcoRI et BamHI permet d'obtenir les fragments de 1.0 – 2.0 – 2.9 – 3.5 – 6.0 – 6.2 et 7.4 kb. Déterminer la carte de restriction de ce chromosome.

Exercice n° 9:

Parmi les séquences oligonucléotidiques suivantes lesquelles vous paraissent susceptibles d'hybrider avec le fragment d'ADN ci apres.

Oligo 1 : 5' CGGGCACCCGGGTTA 3'

Oligo 2 : 5' CCCGGGGATCCCGGG 3'

Oligo 3 : 5' GACTGATCTGACATG 3'

Oligo 4 : 5' GAGAACTGACTGAC 3'

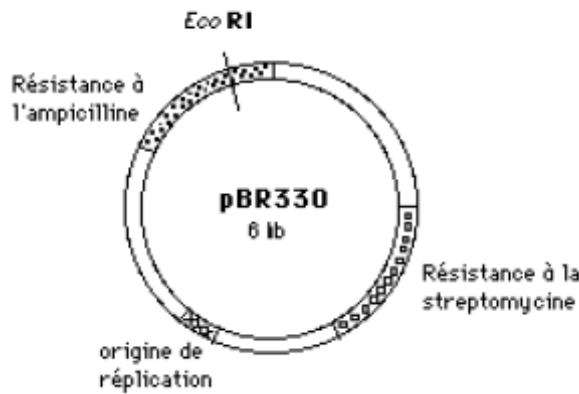
5'ATCGGTGATCTGCAGTCCCGATCGGGCACCCGGGTTAGCGATCGTTTAATGGGTCGGCCCGGGGATCCCGGGCCTGGACTGATCTGACATGGTGTTCAGTCAGTTTCTC 3'

Vous réalisez un séquençage de ce fragment d'ADN par la méthode de Sanger avec l'amorce oligonucléotidique simple brin suivante : 5' TCAGATCAGTCCAGG 3'.

Schématisez l'autoradiographie du gel de séquençage que vous devriez obtenir

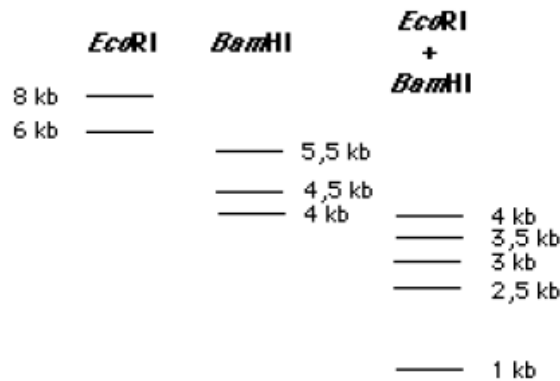
Exercice 10 : Clonage et analyse de l'ADN recombinant

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.

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:



Exercice 11 : Séquençage

Vous disposez d'un brin d'ADN à séquencer (matrice), d'une amorce, d'ADN polymérase, des quatre 2'-désoxyribonucléotides (dXTP) et d'un jeu des différents 2',3'-didésoxyribo-nucléotides (ddXTP). L'amorce est radiomarquée par du phosphore radioactif ³²P.

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

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

3- Schématisez le résultat de la migration des produits obtenus pour chaque mélange réactionnel. Utiliser une échelle un carreau pour une base.

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

Exercice 12:

1- Retrouver l'ORF dans le fragment d'ADN suivant:

```

TGACCAACAC CTGCTCTAAT TTTTACTCTA GGATCCCATT CCACAACCTG CCGTGCCCTC AACAGTCCTC GCTTCCGATC AAGAAGAATC GCACTTCGCC
ACTGGTTGTG GACGAGATTA AAAATGAGAT CCTAGGGTAA GGTGTTGAAC GGCACGGGAG TTGTCAGGAG CGAAGGCTAG TTCTTCTTAG CGTGAAGCGG
AATGCGTCTG TCCAGCTTCA TCGTCGTCGG CGCAGCTGTG GTCAATCTT TCACCAGCGG TAGCGTCGTC GTCGCAGCTT TCCCCCGTGT ATCGGATGTT
TTACGCAGAC AGGTGGAAGT AGCAGCAGCC GCGTCGACAC CAGTTAGAAG AGTGGTCGCC ATCGCAGCAG CAGCGTCGAA AGGGGGCACA TAGCCTACAA
TCGGCGATGG CAATTGCTCC GCATCGCATG GACCAAGGTG CTACTAACGG GGGCAAGAGA TTGTTGCGTT ACCACAGCAA CAATAACCGC GGTGGCGATG
AGCCGCTACC GTTAACGAGG CGTAGCGTAC CTGGTCCAC GATGATTGCC CCCGTTCTCT AACCAACGCAA TGGTGTGTT GTTATTGGCG CCACCGCTAC
AGGACATCGC AGAAGAAAGG GGGATTTTCG ACTTCAAGAA TCTGGAAATG CTTACGAATT TAGCCCGTTT GAACAAGCC AACGATCTGG ACTCCAGGCT
TCCTGTAGCG TCTTCTTCC CCCTAAAAGC TGAAGTTCTT AGACCTTTAC GAATGCTTAA ATCGGGCAA CTTGTTTCGG TTGCTAGACC TGAGGTCCGA
TGACGACTTT TTCCAAGCTT TGATAAAGGC TAAAGTCAAC CCTAGCAACA TCCACCACAC GCGGTTGGAT CAGGACGACT ACCTCGAACT CCGTCAGCTG
ACTGCTGAAA AAGGTTGAA ACTATTCCG ATTTCAAGTT GGATCGTTGT AGGTGGTGTG CGCCAACCTA GTCCTGCTGA TGGAGCTTGA GGCAGTCGAC
TTTGAACAT GGTACACCTT CTATCATCGA GCTTCGTAAG CTGTATTAAG AGTGACTCGG CTAATAACC ACCGAGCTAC ACAAGCTGAA CGAACGTGGT
AAAGCTTGTA CCATGTGAA GATAGTAGCT CGAAGCATT GACATAATT TCACTAGACC GATGATATGG TGCCCTGATG TGTTGACTT GCTTGCACCA
AAGACGGGCA CCGTGACAAT GGCCCCGACT ACCACGCCTT TGTAGAATCA CCGCTTTATT CGGTTTTGCA ACAATGTAAC TTTCAAATAC TACGTAGAGC
TTCTGGCCGT GGCAGTGTTA CCGGGGCTGA TGGTGGGAA ACATCTTAGT GCGGAAATAA GCCAAAACGT TGTTACATTG AAAGTTTATG ATGCATCTCG
AATCTTGCAT GGGCATC
TTAGAACGTA CCCGTAG

```

2- D'après le code génétique déterminez pour quelle protéine code cette ORF code :

A : mrlssfivvgaavvnlltsgsvvvaafprvsdvsamaiaphrmdqgatnggkrllrfksladiikhlddqdmkhvagianmddihhknvlakalesgritqknyd
daiaalqrtsk

B : myyggfivvgaavvnlltsgsvvvaafprvsdvsamaiaphrmdqgatnggkrllryhsnnnrggdediaeergifdfknlemltnlarlnkandlsrlddffq
alikalvnpnihhtrldqddylelrqlfrtgaafyhras

C : mrlssfivvgaavvnlltsgsvvvaafprvsdvsamaiaphrmdqgatnggkrllryhsnnnrggdediaeergifdfknlemltnlarlnkandlsrlddffqali
kavnpnihhtrldqddylelrqlfrtwtwyfyras

D : mrlssgyvgaavvnlltsgsvvvaafprvsdvsamaiaphrmdqgatnggkrllryhsnnnrggdediaeergifdfknlemltnlarlnkandlsrlddffqali
kavnpnihhtrldqddylelrpmsgtwtwyfyras

- 3- On rappelle que les introns sont bordés de séquences conservées correspondant à un dinucléotide GU à l'extrémité 5' et un dinucléotide AG à l'extrémité 3'. Retrouvez les introns insérés dans la séquence codante de la protéine que vous venez d'identifier

```

T N T C S N F Y S R I P F H N L P C P Q Q S S L P I K K N R T S P
D Q H L L F L L D P I P Q L A V P S T V L A S D Q E E S H F A
P T P A L I F T L G S H S T T C R A L N S P R F R S R R I A L R Q
TGACCAACAC CTGCTCTAAT TTTTACTCTA GGATCCCATT CCACAACCTG CCGTGCCCTC AACAGTCCTC GCTTCCGATC AAGAAGAATC GCACCTCGCC
ACTGGTTGTG GACGAGATTA AAAATGAGAT CCTAGGGTAA GGTGTTGAAC GGCACGGGAG TTGTCAGGAG CGAAGGCTAG TTCTTCTTAG CGTGAAGCGG
P M R L S S S F I V V G C K D D K L L P S G V V H K A Q L V S I F S P
N A S V Q L H R R R V Q R R Q I V A I R C C S Q S A A V V N L L T S
Q C V C P A S S S S G A K T T N C C H P V L F T K R S C G Q S S H Q
AATGCGTCTG TCCAGCTTCA TCGTCGTCGG GTGCAAAGAC GACAAATTGT TGCCATCCGG TGTGTTTCAC AAAGCGCAGC TGTGGTCAAT CTTCTCACCA
TTACGCAGAC AGGTCGAAGT AGCAGCAGCC CACGTTTCTG CTGTTTAAACA ACGGTAGGCC ACAACAAGTG TTTGCGCTCG ACACCAGTTA GAAGAGTGGT
A V A S S S Q L S P V Y R M F R R W Q L L R I A W T K V L L T G A R
S G S V V V A A F P R V S D V S A M A I A P H R M D Q G A T N G G K
Q R R R R R S F P P C I G C F G D G N C S A S H G P R C Y R G Q
GCGGTAGCGT CGTCGTCGCA GCTTCCCCC GTGTATCGGA TGTTTCGGCG ATGGCAATTG CTCGCGATCG CATGGACCAA GGTGCTACTA ACGGGGGCAA
CGCCATCGCA GCAGCAGCGT CGAAAGGGGG CACATAGCCT ACAAGCCGC TACCGTTAAC GAGGCGTAGC GTACCTGGTT CCACGATGAT TGCCCCGTT
R D C C V T T A T I T A V A M R T S Q K K G G F S T S R I W K C L R
K R L L R Y H S N I N N R G G D E D I A E E R G G I F D F K N L E M L T
E I V A L P Q Q Q P R V R G H R R R K G D F R L Q E S G N A Y E
GAGATTGTTG CGTTACCACA GCAACAATAA CCGCGGTGGC GATGAGGACA TCGCAGAAGA AAGGGGGATT TTCGACTTCA AGAATCTGGA AATGCTTACG
CTCTAACAC GCAATGGTGT CGTTGTTATT GGCGCCACCG CTACTCTGT AGCGTCTTCT TTCCCCCTAA AAGCTGAAGT TCTTAGACCT TTACGAATGC
R I P V T K R H L A I L L R Q W R S R I A Y S N D L D S R L D D
N L A R L N K A S P G D S T T P V A N R I Q Q R S G L Q A R L
E F S P F E Q S V T W R F Y Y A S G V V E S H T A T I W T P G L T T
AATTTAGCCC GTTTGAACAA AGCGTCACCT GCGGATTCTA CTACGCCAGT GCGGTAGTAG AATCGCATA CAGCAACGATC TGGACTCCAG GCTTGACGAC
TTAAATCGGG CAAACTTGT TCGCAGTGGG CCGCTAAGAT GATGCGGTCA CCGCATCATC TTAGCGTATG TCGTTGCTAG ACCTGAGGTC CGAACTGCTG
F F Q A L I K A K V N P S N I H H T R L D Q D D Y L E L R Q L F R T
L F P S F D K G S Q P Q H P H A V G S G R L P R T P S A V S N
T F S K L R L K S T L A T S T T R G W I R T T T S N S V S C F E
TTTTTCCAAG CTTTGATAAA GGCTAAAGTC AACCTAGCA ACATCCACCA CACGCGTTG GATCAGGAGC ACTACCTCGA ACTCCGTCAG CTGTTTCGAA
AAAAAGGTTT GAAACTATTT CCGATTTTCTG TTGGGATCGT TGTAGTGGT GTGCGCCAAC CTAGTCTCTG TGATGGAGCT TGAGGAGCTC GACAAAGCTT
T W Y T F Y H R A S A V L K V T R L L Y H G A T Q A E R T W D R
N M V H L L S S S F V S C I K S D S A T I P R S Y T S T N V V R P
H G T P S I I E L R K L Y K L G Y Y T T E L H K L N E R G K T G
CATGGTACAC CTTCTATCAT CGAGCTTCGT AAGCTGTATT AAAAGTACT CCGTACTAT ACCACGGAGC TACACAAGCT GAACGAACGT GGTAAAGCCG
GTACCATGTG GAAGATAGTA GCTCGAAGCA TTCGACATAA TTTTACTGTA GCCGATGATA TGGTGCCTCG ATGTGTTCTG CTTGCTTGA CCATTCTGGC
R H R D N G P D Y H A F V E S P L Y S V L Q Q C N F Q I L R R A I L
A P Q W P R L P R L C R I T A L F G F A T M L S N T T S N L A
G T V T M A P T T T P L N H R F I R F C N N V T F K Y Y V E Q S C
GCACCGTGAC AATGGCCCCG ACTACCACGC CTTTGTAGAA TCACCGCTTT ATTCGGTTTT GCAACAATGT AACTTTCAAA TACTACGTAG AGCAATCTTG
CGTGGCACTG TTACCGGGGC TGATGGTGCG GAAACATCTT AGTGGCGAAA TAAGCCAAAA CGTTGTTACA TTGAAAGTTT ATGATGCATC TCGTTAGAAC

```

```

H G H
A W A
C M G I
CATGGGCATC
GTACCGTAG

```