Université Ibn khaldoun – Tiaret /Faculté SNV

Niveau : Niveau : M1_Génétique moléculaire et amélioration des plantes
Corrigé Type d'examen de Génomique et proteomique I –S1 – 2023

Question1 (6p) : Définir :

- Gènes de régulation :

- Gènes de **réplication** qui spécifient les sites d'initiation et de terminaison de la réplication de l'ADN - Gènes de **recombinaison** qui correspondent aux sites de reconnaissance par les enzymes impliqués dans la recombinaison

Gènes de **ségrégation** qui sont les sites d'attachement des chromosomes pendant la mitose ou la méiose

- **Gènes Paralogues** .En biologie de l'évolution, une **paralogie** est un lien évolutif entre deux gènes issus d'un évènement de duplication.

ils doivent être d'abord homologues, c'est-à-dire qu'ils descendent d'un même gène ancestral ; à la suite d'une duplication, les **deux copies** du gène divergent jusqu'à devenir deux gènes **paralogues**, dans une même espèce, ou dans deux espèces différentes (si la duplication est suivie par une **spéciation1).**

- **Marqueur génétique discriminant :**c'est à dire capable de **détecter** des différences entre individus proches apparentés.

Un **pseudogéne** correspond à un gène devenu **inactif**, généralement à la suite **de mutations** génétiques lui faisant perdre son aptitude à **coder** pour des **protéines** ou celle à être **exprimé** au sein d'une cellule . Il s'agit en général **d'anciens** gènes n'ayant pas eu une fonction vitale pour l'organisme, et donc non soumis à la sélection naturelle,

Transposition conservatrice : Une séquence d'ADN **est transférée** d'un site à un autre, entre un site donneur et un site accepteur

Transposition réplicative : l'élément transposable est **transféré** d'un site à un autre, tout en restant au site **original**. Cela conduit à une augmentation du nombre de copies de l'élément transposable.

Selon les éléments transposables, un mode ou l'autre, ou les deux seront employés.

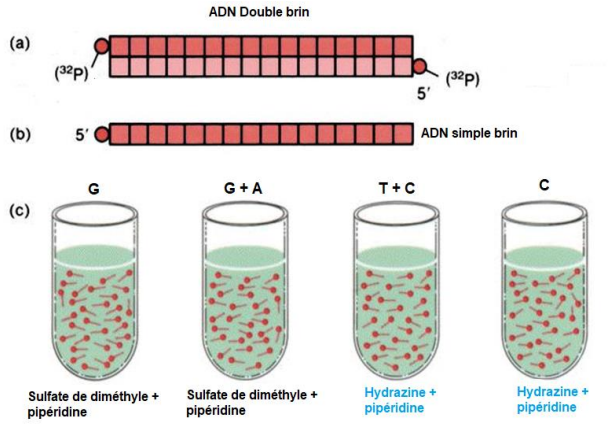
Question 2 (5p) : la méthode de séquençage d'ADN de MAXAM et GILBERT .

Cette méthode utilise des échantillons d'ADN double brin et ne nécessite donc pas le clonage de l'ADN dans un vecteur pour produire de l'ADN simple brin comme c'est le cas pour la méthode de Sanger. Cette méthode est

basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. Les réactifs sont résumés dans le tableau 1. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant.

- ✓ Des fragments de restriction (<200pb) sont purifiés à partir d'un gel et marqués à leurs extrémités 5' par [32P]-ATP.

- ✓ **1-Marquage**: Les extrémités des deux brins d'ADN à séquencer sont marquées par un traceur radioactif (32P). Cette réaction se fait en général au moyen d'ATP radioactif et de polynucléotide kinase.
- ✓ **2,Isolement du fragment d'ADN à séquencer**. Celui- ci est séparé au moyen d'une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Le fragment d'ADN est découpé du gel et récupéré par diffusion.
- ✓ **3,Séparation de brins**: Les deux brins de chaque fragment d'ADN sont séparés par dénaturation thermique, puis purifiés par une nouvelle électrophorèse.
- ✓ **4,Modifications chimiques spécifiques:** Les ADN simple-brin sont soumis à des réactions chimiques spécifiques des différents types de base. Walter Gilbert a mis au point plusieurs types de réactions spécifiques, effectuées en parallèle sur une fraction de chaque brin d'ADN marqué. Par exemple une pour les G (**alkylation**
- ✓ **par le diméthyle sulfate),** une pour G et les A (**dépurination)**, une pour les C et une pour les C et les T (**hydrolyse alkaline).** Ces différentes réactions sont effectuées dans des conditions très ménagées, de sorte qu'en moyenne chaque molécule d'ADN ne porte que zéro ou une modification.
- ✓ **5-Coupure.** Après ces réactions, l'ADN est clivé au niveau de la modification par réaction avec une base, la pipéridine.
- ✓ **6- Analyse.** Pour chaque fragment, les produits des différentes réactions sont séparés par électrophorèse et analysés pour reconstituer la séquence de l'ADN.



✓

Question 3 (4.5p) :

Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)

Principales caractéristiques:

- ✓ Une combinaison des technologies RFLP et PCR
- ✓ Basée sur l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction d'un ADN digéré
- ✓ Peut être réalisée avec de l'ADN génomique total ou des ADNc

✓ Les étapes

✓ -L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction différentes;

✓ Des adaptateurs oligonucléotidiques sont liés aux extrémités des fragments d'ADN;

✓ Des sous-ensembles spécifiques des produits de digestion de l'ADN sont amplifiés, en utilisant des combinaisons d'amorces sélectives;

La détection du polymorphisme se fait avec des radioisotopes, des sondes fluorescentes ou une coloration à l'argent

Digestion de l'ADN et ligation

- ✓ -L'une des enzymes de restriction coupe fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 4 bases, p.e. MseI)
- ✓ La seconde enzyme de restriction coupe peu fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 6 bases, p.e. EcoRI)
- ✓ Différentes combinaisons enzymes/amorces peuvent être utilisées. MseI et EcoRI sont mieux utilisées pour des génomes riches en AT; elles donnent moins de fragments dans les génomes riches en GC.
- ✓ Des adaptateurs double-brin synthétiques, spécifiques de chaque site de restriction, sont attachés aux fragments d'ADN générés

✓ **PCR et détection**

-il y a addition aux extrémités des fragments de restriction d'adaptateurs nucléotidiques spécifiques des enzymes de restriction utilisées. Ils sont de séquences connues.

Les fragments sont ensuite amplifiés par PCR. On utilise comme amorce un oligonucléotide complémentaire de la séquence de l'adaptateur, prolongé de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3) appelés bases débordantes.

Seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires.

Il s'agit donc d'amorces sélectives permettant de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine : sans ces séquences débordantes, il y aurait amplification de milliers de fragments.

Les bandes sont visualisées par électrophorèse.

Les amorces ont généralement une longueur de 17 à 21 nucléotides, et s'hybrident parfaitement à leur séquence cible.

Question 4(4.5p)

La technique RAPD : est une méthode basée sur la PCR qui utilise une petite amorce (généralement 10 bases) pour amplifier des fragments anonymes d'ADN.

Avec cette technique, il n'y a pas d'ADN cible spécifique, alors chaque amorce particulière va adhérer à l'ADN matrice au hasard.

De ce fait, on ne connait pas la nature des produits obtenus. Les fragments d'ADN générés sont alors séparés et détectés par électrophorèse sur gel.

Les étapes du RAPD sont :

Extraction d'ADN

On peut utiliser de l'ADN total, chloroplastique ou mitochondrial

• De faibles quantités d'ADN sont suffisantes

• L'ADN doit être propre et de haut poids moléculaire

Si l'on n'obtient pas une qualité minimale d'ADN, la reproductibilité des résultats risque d'être difficile à assurer.

Réaction PCR

- ✓ - **Comp**osantes d'une PCR
- ✓ Les amorces (longues de 10 bases)
- ✓ On ajoute généralement du MgCl2
- ✓ Les cycles d'amorçage sont réalisés à faible température (environ 35°C)

Détection des produits RAPD :

Les RAPD peuvent être détectés en faisant migrer les produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Dans les deux cas, le gel est coloré au bromure d'éthidium.

La différence obtenue en faisant migrer les produits RAPD dans un gel d'acrylamide par rapport à un gel d'agarose réside dans le degré de résolution des bandes.

Interprétation des profils RAPD

Du fait de la nature des marqueurs RAPD, on peut seulement caractériser la présence ou l'absence d'une bande particulière.

Les critères de sélection des bandes interprétables sont les suivants:

- ➢ Reproductibilité : doit être répétable entre expériences
- ➢ Largeur des bandes
- ➢ Taille
- ➢ Ségrégation attendue dans une population de cartographie.