

Niveau : M1_Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Examen de Génomique et protéomique I –S1 – 2024

Question1 (6p) : Définir :

Les gènes codants :Un gène est dit « codant » lorsque sa traduction conduit à la formation d'une protéine.

Les gènes codant pour les protéines et Gènes codant pour des ARN

La **séquence codante** d'un gène (aussi appelée la région codante ou **CDS**, (*Coding DNA Sequence*), est la partie de l'ADN ou de l'ARN d'un gène, composée des exons, traduite en protéine. Elle ne représente donc qu'une partie du gène duquel elle provient, de même que de l'ARNm dans laquelle elle est inscrite.

Gènes Transposons

Les transposons sont des **éléments d'ADN** qui peuvent se **déplacer** d'un endroit à un autre sur un **même** brin d'ADN ou sur un **autre** brin. Pour faire de la transposition, aussi appelée recombinaison, un transposon a besoin **d'enzymes** spéciales telles une **intégrase** ou une **transposase** . C'est habituellement le transposon lui-même qui code pour ces protéines.

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

Transposition répllicative : 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.

- **La synténie** :est la présence simultanée sur le même **chromosome** de deux ou plusieurs **loci** , indépendamment de leur **liaison génétique**.

La notion de synténie est de plus en plus utilisée pour décrire la **conservation** de l'ordre des **gènes** entre deux **espèces** apparentées.

Les comparaisons entre espèces **phylogénétiquement** éloignées révèlent une augmentation de la perte de synténie.**Exemple**, la synténie entre le chromosome 20 de l'homme et une partie du chromosome 2 de la souris.

Question 2 (8p) :

La détection de **RFLP** repose sur la possibilité de **comparer** des profils de **bandes**, générées après **digestion** d'un ADN cible par des **enzymes** de restriction.

Les étapes expérimentales sont les **suivantes**:

Extraction de l'ADN

- L'ADN génomique total est extrait des cellules végétales
- Alternativement, l'ADN des chloroplastes ou mitochondries peut être utilisé

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

Complications:

- Cassures pendant l'extraction
- Dégradation de l'ADN par des nucléases
- Extraction conjointe de polysaccharides
- Extraction de métabolites secondaires végétaux

Digestion par enzyme de restriction et électrophorèse sur gel

L'ADN extrait est digéré avec des **enzymes de restriction spécifiques**, soigneusement choisies. Chaque enzyme de restriction, dans des conditions appropriées, va reconnaître et couper l'ADN de façon **prédictible**, produisant ainsi un ensemble de fragments d'ADN (les fragments de restriction) de **différentes longueurs**.

Les millions de fragments de restriction produits sont généralement **séparés** par électrophorèse sur **gel d'agarose**. Comme les fragments seraient vus comme une traînée continue par coloration au **bromure d'éthidium**, la coloration seule ne permet pas de détecter des polymorphismes. **L'hybridation** doit pour cela être utilisée pour détecter des fragments spécifiques.

Le transfert d'ADN est appelé '**Southern blotting**', en référence à **Southern (1975)**, qui inventa la technique.

Dans cette méthode, le **gel** est tout d'abord **dénaturé** dans une solution basique et placé dans un **bac**. Une **membrane** poreuse de nylon ou de nitrocellulose est étalée sur le gel, et un **poids** posé sur l'ensemble.

Tous les **fragments** de restriction présents dans le gel se **transfèrent** sur la membrane sous forme simple brin par **capillarité**.

La membrane avec l'ADN cible est incubée avec **la sonde ADN**.

Les **conditions d'hybridation** sont telles que si des brins sur la membrane sont **complémentaires de ceux de la sonde**, l'hybridation se produira et des **duplex marqués se formeront**.

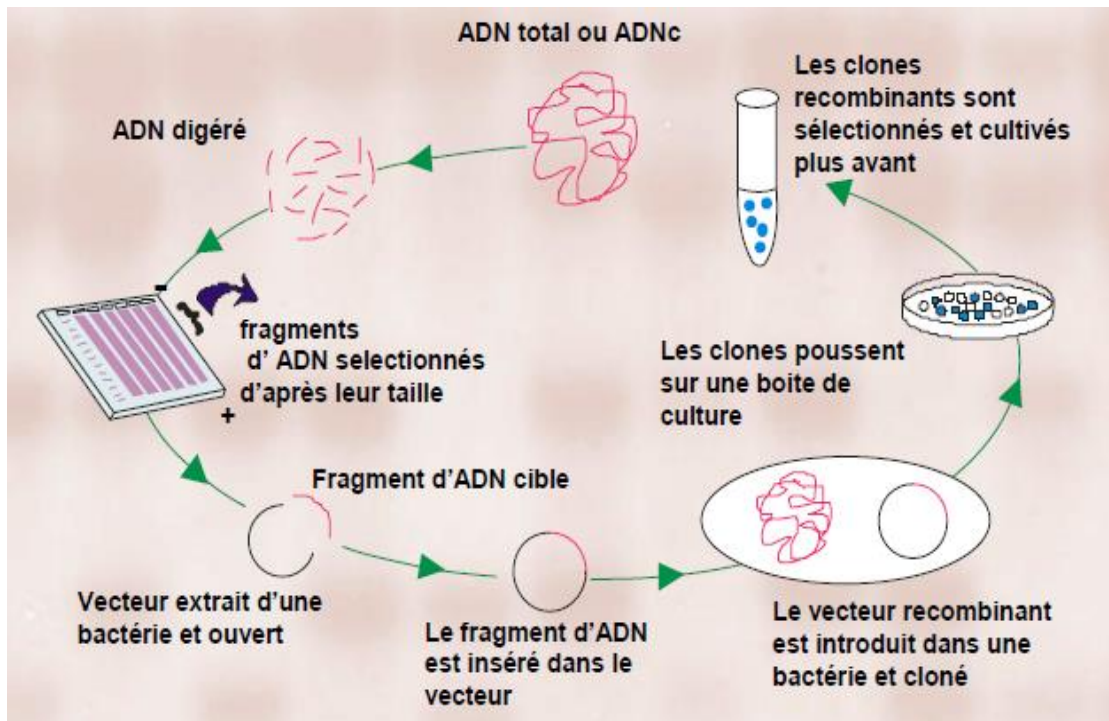
Quand les conditions sont très astringentes, l'hybridation avec des ADN très distants ou non homologues ne se produit pas. Ainsi donc, la sonde ADN **accroche** des séquences qui sont complémentaires et "**idéalement**" homologues à elle même, parmi les milliers ou millions de fragments non détectés qui migrent dans le gel.

Les fragments **désirés** peuvent être **détectés** après exposition simultanée de la membrane hybridée et d'un film **autoradiographique**.

Pour détecter un sous-ensemble de fragments d'ADN **d'intérêt** parmi tous les fragments générés par digestion enzymatique, il faut une sonde. La **sonde ADN** généralement provient d'une **banque d'ADN** (génomique ou ADNc), **collection de vecteurs** (par exemple des plasmides) qui contiennent une représentation d'une molécule d'ADN originale coupée en morceaux.

Les vecteurs peuvent être **transformés** dans des bactéries et **peuvent multiplier** le morceau d'ADN qu'ils contiennent plusieurs fois.

La sonde ADN est également convertie en une molécule simple brin, convenablement marquée, en utilisant une méthode standard (ex: la digoxigénine), et hybridée avec l'ADN cible, qui est fixé sur la membrane.



Question 3(6p) : Expliquez 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 le diméthyle sulfate), une pour G et les A (dépuration), une pour les C et une pour les C et les T (hydrolyse alcaline). 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.
- ✓ après G (Sulfate de diméthyle (Température élevée) + pipéridine),
- ✓ après A+G (Sulfate de diméthyle + pipéridine),
- ✓ après C+T (Hydrazine + pipéridine)
- ✓ après C (Hydrazine (en NaCl + pipéridine).
- ✓ **5-Coupage.** 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

