

TD 3: Biologie moléculaire

Exercice 1 :

Une enzyme présente dans le foie de rat possède une chaîne polypeptidique de 192 résidus d'aminoacides. Elle est codée par un gène possédant 1440 pb. Expliquer la relation entre le nombre de résidus d'aminoacides de l'enzyme et le nombre de paires nucléotidiques du gène.

Exercice 2 :

Le séquençage du génome de *Bacillus subtilis* a été achevé en 1997. Il a une taille de 4214814 paires de bases Et contiendrait 4225 gènes, dont 4107 coderaient pour des protéines. Le pourcentage de a guanine et cytosine (%G+C) de ce génome est de 60%.

- 1-quel est l'intérêt de déterminer le pourcentage de guanine et cytosine ?
- 2- déterminer le pourcentage de chacune des bases constitutives de cet ADN.
- 3- Estimer la masse molaire moléculaire de cet ADN.
- 4- quelle est la masse, exprimée en pg, d'une telle molécule d'ADN ?
- 5- quelle est la quantité d'ADN, exprimée en µg, pouvant être extraite à partir de 1 ml d'une suspension bactérienne à 10^9 cellules.ml⁻¹ ?

Sachant que : nombre d'Avogadro N= $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules par mol.

Exercice 3 :

La molécule d'ADN d'*E. coli* comporte approximativement $2,6 \times 10^6$ pb et pèse $2,66 \times 10^{-15}$ g.

- Calculer la masse d'un segment d'ADN de longueur de 0,1nm en gramme et en dalton.

Exercice 4 :

La masse moléculaire de l'ADN d'*E coli* est de $2,5 \cdot 10^9$ daltons. La masse moléculaire moyenne d'une paire de nucléotides est de 660 Da.

1. **Calculer :** -le nombre de paires de bases. Le nombre de tours d'hélice de cette molécule d'ADN.
- la longueur de l'ADN. Comparer cette longueur aux dimensions cellulaires. Comment peut-elle entrer ?
2. On supposera qu'une protéine comprend en moyenne 400 acides aminés. Quel est le nombre maximal de protéines qui peut être codé par une molécule d'ADN ?
3. Si 80% du chromosome codent pour des protéines, combien de protéines d'une masse moléculaire moyenne de 60000 Da pourront être automatiquement synthétisées ?
4. Après l'hydrolyse totale d'un ADN, le dosage des bases puriques est fait. Le rapport A/G=1,5.
 - a) Quel est le rapport A/T ?
 - b) Quel est le rapport (A+T)/(G+C) ?
 - c) Quel est le rapport spécifique de l'espèce ?

Exercice 5:

Quel est le nombre minimum de paires nucléotidiques dans le gène d'une enzyme eucaryote de 125 amino-acides ?

-Calculez la longueur du fragment d'ADN codant cette protéine.

-Calculez la masse moléculaire de ce fragment d'ADN double brin.

-Pourquoi le nombre de paires nucléotidiques peut-il être beaucoup plus important que votre réponse ? Justifier votre réponse

Exercice 6

Soit une molécule d'ADN double brin de 3000 pb codant une enzyme procaryote.

Calculez la masse de ce fragment d'ADN.

- Quel est le poids moléculaire de cette enzyme si 60% de l'ADN représente des introns?
- Une solution de cet ADN a une absorbance de 2.30 à 260 nm et 1.29 à 280 nm. Calculer la concentration et la pureté de cette solution d'ADN.

Sachant que la masse moléculaire moyenne d'un acide aminé est de 110, est celle d'un nucléotide est de 330.

TD 4: Biologie moléculaire

Q1)

Le fragment de DNA suivant :

5'AGTGCTGCTGATCAGCAGAATCGCATCCTA3'
3' TCACGACGACTAGTCGTCTAGCGTAGGAT5'

Contient-il un segment palindromique ?

Q2)

Considérant que deux fourches de réPLICATION partent d'une origine unique.

Quelle est la durée, en minute de la réPLICATION du chromosome d'*E. coli*, sachant que la vitesse de réPLICATION par ADN polymérase III est d'environ 1000nt/sec et la taille du génome d'*E. coli* est d'environ 5×10^6 pb.

- Quels sont les facteurs qui permettent d'assurer la fidélité de la réPLICATION au cours de la synthèse d'ADN ?

Q3)

Un polyribonucléotide de synthèse est réalisé à partir d'un mélange d'uracile et de cytidine (5U pour 1C). Si l'incorporation, au cours de la synthèse, est aléatoire, préciser la fréquence des différents codons réalisée.

Q4)

Une cellule eucaryote contient approximativement 10^7 ribosomes et se divise en 24 heures.

1. Calculer le nombre de ribosomes devant être formés par seconde pour assurer aux cellules filles un stock complet de ribosomes.
2. Les ribosomes comprennent notamment deux types d'ARN : les ARN28S et 18S, synthétisés sous forme d'un ARN précurseur, l'ARN45S. La synthèse d'une molécule d'ARN 45S dure trois minutes. Sachant que le gène codant pour l'ARN 45S peut être transcrit à la fois par 100 molécules de transcriptase, combien de copies de ce gène le génome doit-il contenir pour assurer la synthèse de 10^7 ribosomes en 24 heures ?

Q5)

Quelle séquence d'ARN produirait la séquence d'ADN suivante (brin transcrit) :

5'G-T-T-C-G-T-T-G-A 3'

- A) (ARN: 5'-U-C-A-A-C-G-A-A-C 3')
- B) (ARN: 5'-C-A-A-G-C-A-A-C-U 3')
- C) (ARN: 5'-T-C-A-A-C-G-A-A-C 3')

Q6)

- Quels sont les points fondamentaux qui distinguent la transcription des eucaryotes et des procaryotes ?

- Comparer la réPLICATION de l'ADN dans les procaryotes et dans les eucaryotes.

Q7)

1- Soit une séquence présente sur un brin d'ADN (brin1)

.....-G-A-C-T-T-A-C-A-C-G-C-G-A-T-T-T-T-A-T-A-T-A-G-C-.....

- a. Recopiez cette séquence et écrivez la séquence du brin d'ADN complémentaire (brin2).
- b. Sachant que l'ARN issu de la transcription de ce fragment d'ADN code le début d'une protéine

Déterminez quel est le brin matrice (justifiez votre réponse) et écrivez la séquence de l'ARNm.

2- Soit le brin d'ADN antisens 5' CCGTAATGCTTAGGT 3', quelle est la séquence du brin transcrit et celle de l'ARN résultant (5'...3')?

Q8)

a) Combien y-a-t-il de codons ?

b) Combien y-a-t-il d'acides aminés ?

c) Quels sont les codons qui ne codent pas pour des acides aminés ? Pourquoi ?

Q9)

Donner le nom et la conséquence de la mutation.

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC.TAC.TTC.GAC.ACT5'

a- 3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC . **A** TC.GAC.ACT 5'

b- 3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC.TTC.GA **A** .ACT 5'

c-3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC.TTC.GAC.A **T** CT 5'

Q10)

L'allèle Y^+ dans l'opéron lactose d'*E.coli* produit la perméase qui indispensable pour le transport des galactosides de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Son allèle Y^- ne produit pas de perméase. La production de la galactosidase par l'allèle Z^+ est induite par la pénétration du lactose dans la cellule. Son allèle Z^- produit une enzyme inactive C_z . En présence d'un opérateur normal O^+ dites s'il y aura ou pas production de ces enzymes (P , β -gal, C_z), utilisant le signe + pour la production ou - pour la non production.

Génotype	Absence du métabolite			Présence du métabolite		
	P	β -gal	C_z	P	β -gal	C_z
(a) $I^+ Y^+ Z^-$						
(b) $I^+ Y^+ Z^+$						
(c) $I^- Y^+ Z^+$						
(d) $I^+ Y^- Z^+$						
(e) $I^- Y^- Z^-$						
(f) $I^- Y^- Z^+$						

Q11)

De quelle enzyme s'agit-il dans les énoncés suivants ?

-Est une endonucléase qui coupe l'ADN à des sites spécifiques :

-Elle catalyse la formation des liaisons phosphodiester entre deux segments d'ADN :

-Elle est responsable du déroulement de l'ADN :

-Elle intervient dans la correction directe des dimères de thymine :

TD 5: Biologie moléculaire

Exercice 1:

Les enzymes de restriction BamHI et PstI clivent respectivement les séquences suivantes : 5'-G/GATCC et CTGCA/G au niveau du site de clonage :

- a- Indiquer les extrémités 5' et 3' des molécules d'ADN clivé, soit par PstI, soit par BamHI.
- b- Comment les extrémités générées soit par PstI, soit par BamHI seraient-elles modifiées si les molécules clivées étaient incubées en présence d'une ADN polymérase et les quatre dNTP.
- c- Après la réaction de la question b, pourrait-on toujours rejoindre les extrémités BamHI par incubation avec l'ADN ligase de T4 ? Pourrait-on toujours rejoindre les extrémités PstI ?
- d- La jonction des extrémités (question c) restaure-t-elle le site BamHI ? Restaure-t-elle le site PstI ?

Exercice 2:

Vous avez purifié l'ADN et vous désirez localiser les sites de restriction sur cet ADN. Après digestion par EcoRI, vous obtenez les fragments 1, 2, 3 et 4. Après digestion de chacun de ces fragments par HindII, vous constatez que le fragment 3 donne deux sous fragments (3₁ et 3₂) et que le fragment 2 en donne trois (2₁, 2₂ et 2₃). Après digestion de la molécule entière par HindII, vous récupérez quatre fragments : A, B, C et D.

Lorsque ces fragments sont traités par EcoRI, le fragment D produit les fragments 1 et 3₁, le fragment A produit 3₂ et 2₁ et le fragment B produit 2₃ et 4. Le fragment C est identique à 2₂.

- Dessinez la carte de restriction de ce segment d'ADN.

Exercice 3:

Construire la carte de restriction d'un plasmide circulaire en utilisant les données suivantes.

Enzyme de restriction	Longueur de fragments (kb)
EcoRI	4.0
HaeII	1.6, 2.4
PstI	1.9, 2.1
EcoRI et HaeII	0.7, 1.6, 1.7
EcoRI et PstI	0.8, 1.3, 1.9
HaeII et PstI	0.6, 0.9, 1.0, 1.5

Exercice 4:

Une molécule d'ADN circulaire (5 Kbp) est soumise à l'action des divers endonucléases de restriction. Les produits des digestions enzymatiques sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose. Les résultats sont comme suit :

- la digestion par une enzyme EcoRI donne une bande d'environ 5000 pb.
- la digestion par une enzyme HindIII donne deux bandes (4000 bp et 1000 pb).
- la digestion par les deux enzymes EcoRI et Hind III à la fois donne 3 bandes, les tailles des fragments d'ADN générés par l'action des ces deux enzymes sont 1000 pb, 820 pb et 3180 pb.
- schématissez le profil électrophorétique des résultats obtenus.
- schématissez les sites de restriction sur la molécule d'ADN.

Exercice 5:

Soit une molécule d'ADN double brin de 2100 pb codant une enzyme prokaryote.

a- Calculer la longueur du fragment d'ADN en nm puis en μ . Calculez la masse moléculaire de ce fragment d'ADN double brin.

b- Quel est le poids moléculaire de cette enzyme?

c- Une solution de cet ADN a une absorbance de 1.80 à 260 nm et 1.00 à 280 nm. Calculer la concentration et la pureté de cette solution d'ADN.

d- Énumérer les effets possibles d'une mutation provoquée par le remplacement d'une seule base sur un segment codant pour une enzyme d'un DNA d'eucaryote.

Sachant que la masse moléculaire moyenne d'un acide aminé est de 110, est celle d'un nucléotide est de 330.

e- Comment peut-on séparer les deux brins en laboratoire ? Que se passe-t-il de particulier ? Est-ce possible dans un organisme vivant ?

f- On se propose de déterminer la taille de ce fragment d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6%. La migration est effectuée dans un tampon à pH= 8,3

1- Rappeler le principe de cette technique et les paramètres affectant la migration de l'ADN.

2- Dans quel sens s'effectue la migration des fragments? Justifier la réponse

3- Quelle serait la vitesse de migration des molécules dans un gel d'agarose à 0,8 % par rapport à celle obtenue dans un gel d'agarose 0,6 %?

4- Après migration, le gel est imbibé dans une solution de bromure d'éthidium (BET). Expliquer le mode d'action de ce composé et les précautions à prendre quant à sa manipulation.

Exercice 6:

Une molécule d'ADN linéaire est soumise à l'action de diverses endonucléases de restriction. Les enzymes de restriction BamHI et PstI clivent respectivement les séquences suivantes : 5'-G/GATCC et 5-CTGCA/G.

La digestion de la molécule par PstI donne 3 fragments ayant les tailles suivantes : 0.8, 1.2 et 2.5

La digestion de la molécule par BamHI donne 3 fragments ayant les tailles suivantes : 1.5, 1.7 et 1.3

La double digestion par BamHI et PstI donne les fragments ayant les tailles suivantes : 0.8, 1.2, 0.5, 0.7 et 1.3

-Les produits des digestions enzymatiques sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose et ensuite à une analyse par Southern blot avec une sonde moléculaire marquée à son extrémité 5' par du ^{32}P qui reconnaît spécifiquement la région 0.8Kb qui se trouve à l'extrémité 5' de la molécule d'ADN.

1) Quelle est la longueur de cette molécule d'ADN en nm ?

2) Donner le profil électrophorétique des produits de la digestion par les enzymes.

3) Donner les étapes de la technique Southern Blot

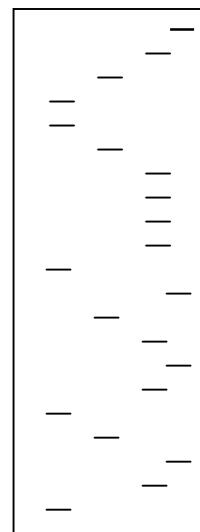
4) Donner le profil électrophorétique obtenu après Southern Blot avec la sonde.

5) Schématissez les sites de restriction sur la molécule d'ADN (la carte de restriction).

Exercice 7 :

L'autoradiogramme du séquençage d'un fragment d'ADN simple brin donne la séquence suivante.

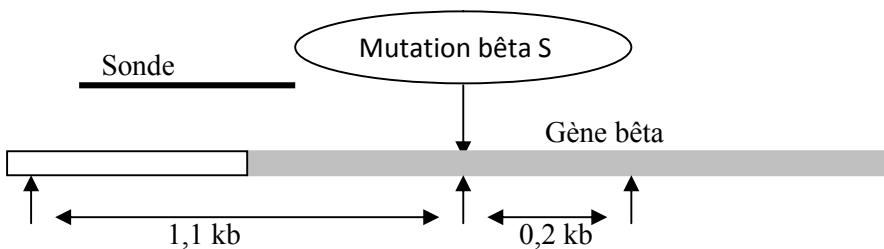
Établissez la séquence de ce fragment en l'orientant de 5' vers 3'. Justifiez votre raisonnement.



TD 6: Biologie moléculaire

Exercice 1 :

L'hémoglobine S de la drépanocytose est due à une substitution de l'acide glutamique par une valine en position 6 de la chaîne bêta de l'hémoglobine A. le codon numéro 6 normal GAG devient **GTC**. Cette mutation abolit un site de clivage par l'enzyme de restriction Mst II. Ci-dessous sont représentés schématiquement le gène bêta. La position des trois sites de clivage par Mst II (flèches), et celle de la mutation bêta S, la position de la sonde et la taille des fragments obtenus par coupure par Mst II.

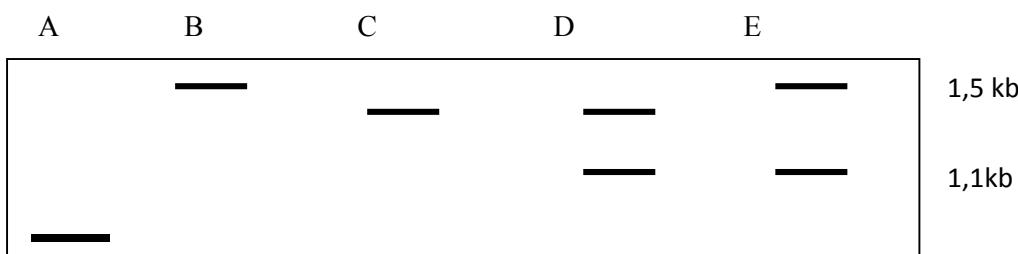


1- Sur la carte de restriction suivante, obtenue après clivage par Mst II, électrophorèse en agarose, et Southern Blot avec la sonde, indiquez dans l'ordre :

Un sujet normal.

Un sujet hétérozygote pour la mutation bêta S.

Un sujet homozygote pour la mutation bêta S.



2. Expliquer la technique de marquage radioactif de la sonde.

Exercice 3

Dans une expérience de biologie moléculaire, on est amené à insérer un fragment de 1kb dans le plasmide pUC18, après transformation d'une souche d'*E. coli* en présence d'ampicilline et de réactifs permettant de mettre en évidence la synthèse de β -galactosidase, on observe des colonies blanches et des colonies bleues.

- A quoi correspondent ces deux types de colonies ?

- Pourquoi opère-t-on en présence d'ampicilline ?

Exercice 4

Le plasmide pBR322 (vecteur de clonage) résistant à l'ampicilline et à la tétracycline est digéré par l'enzyme de restriction *PstI*, qui coupe dans le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide est ligaturé avec un fragment d'ADN étranger digéré par *PstI*. Le mélange est utilisé pour transformer *E. coli*.

a- Comment faire pour transformer *E. coli* par le vecteur ?

b- quel antibiotique devrait être ajouté au milieu pour sélectionner les cellules qui ont incorporé un vecteur ? Expliquer.

c- comment peut-on sélectionner les cellules qui ont incorporé des plasmides contenant des inserts (l'ADN étranger) ? Expliquer.