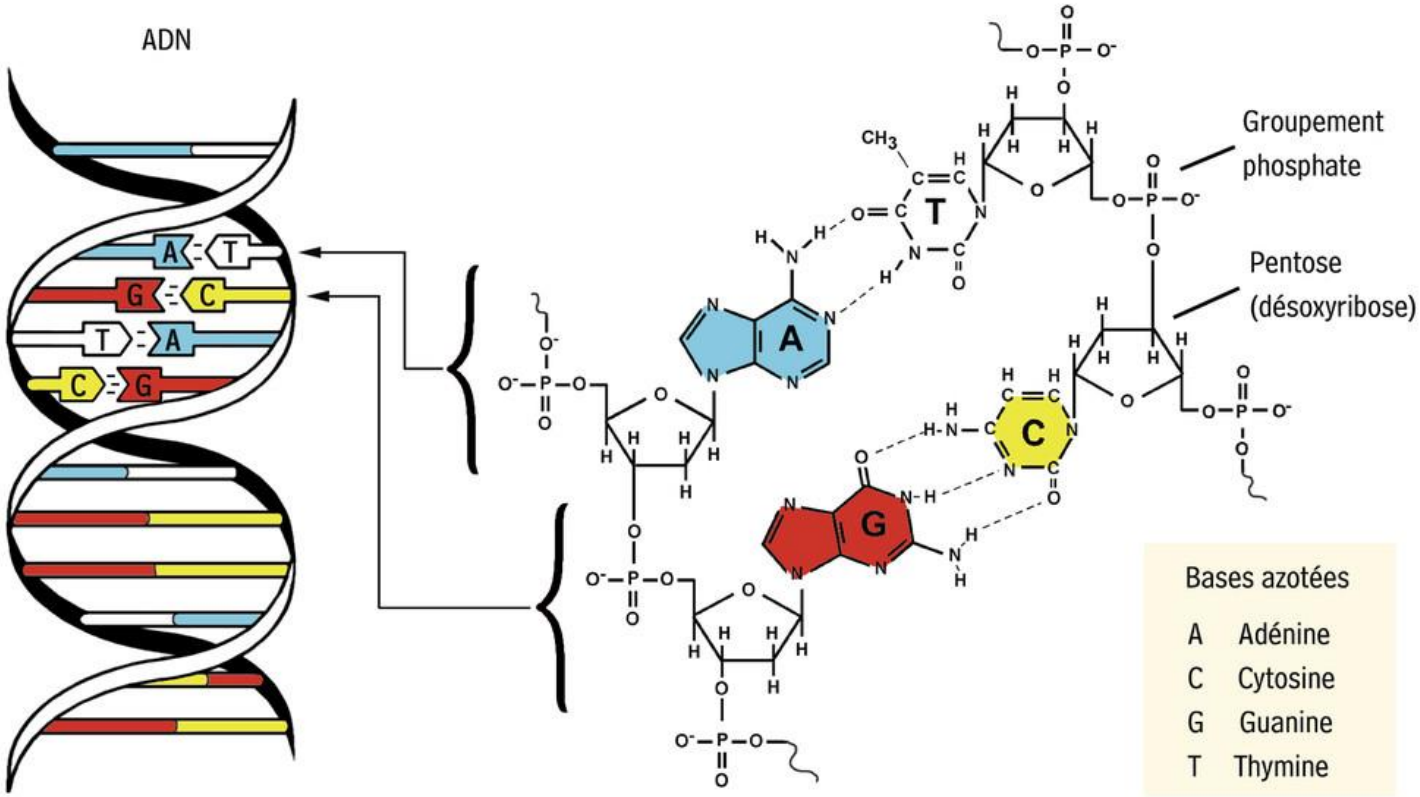
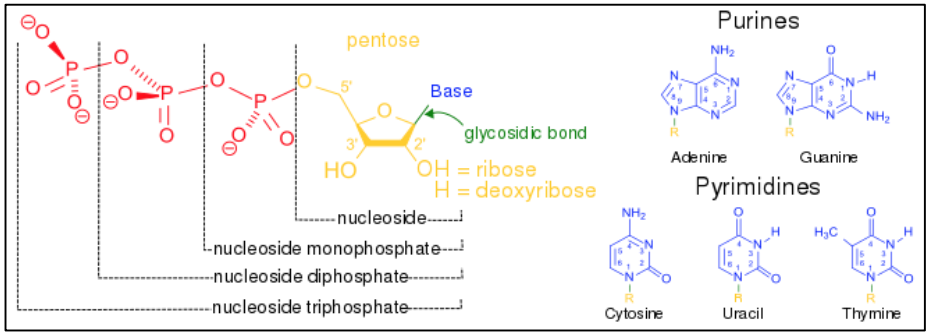
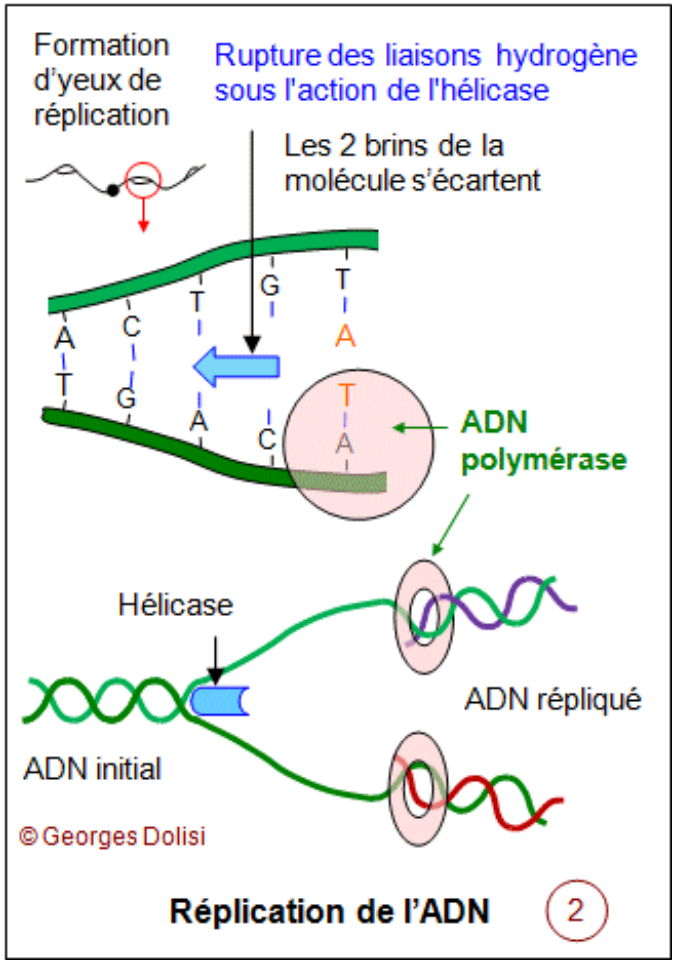

ADN
Groupement phosphate
Pentose (désoxyribose)
Bases azotées
A Adénine
C Cytosine
G Guanine
T Thymine

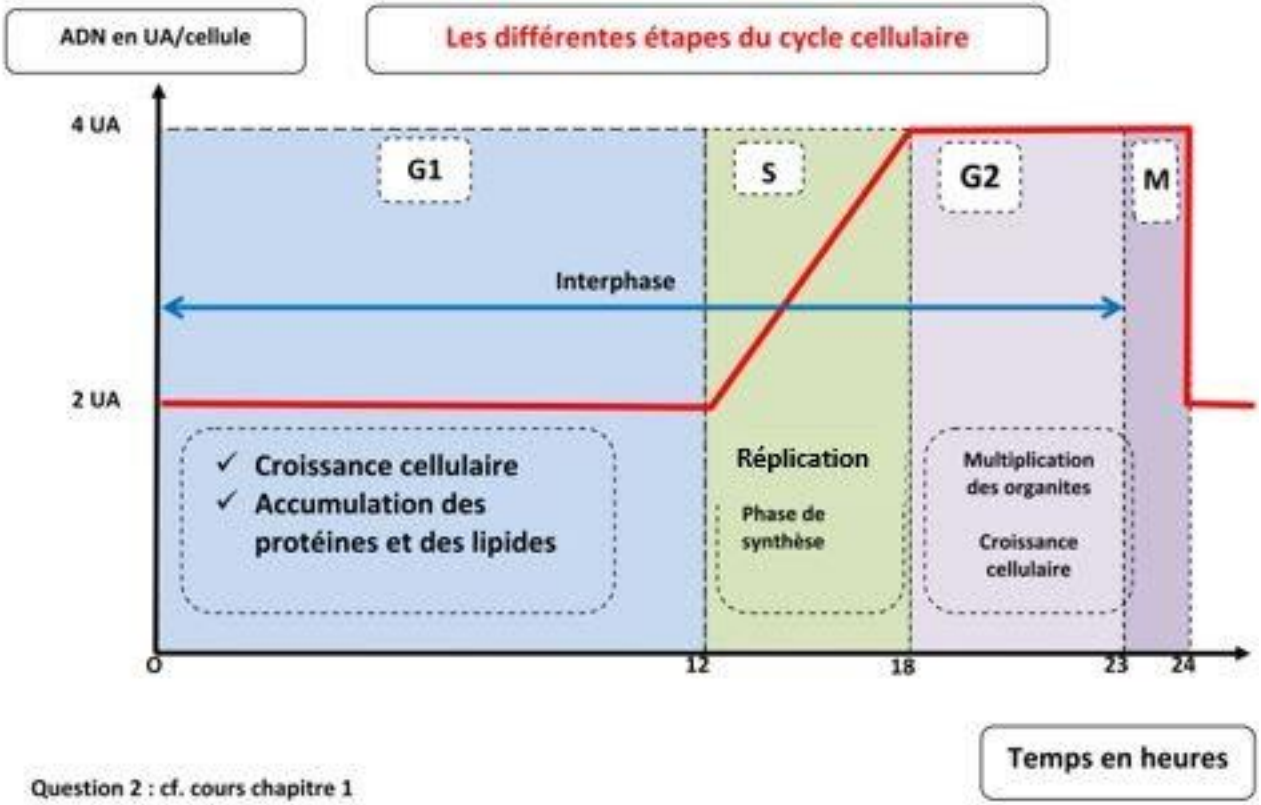

pentose
Base
glycosidic bond
HO
OH = ribose
H = deoxyribose
nucleoside
nucleoside monophosphate
nucleoside diphosphate
nucleoside triphosphate
Purines
Adenine
Guanine
Pyrimidines
Cytosine
Uracil
Thymine

PCR

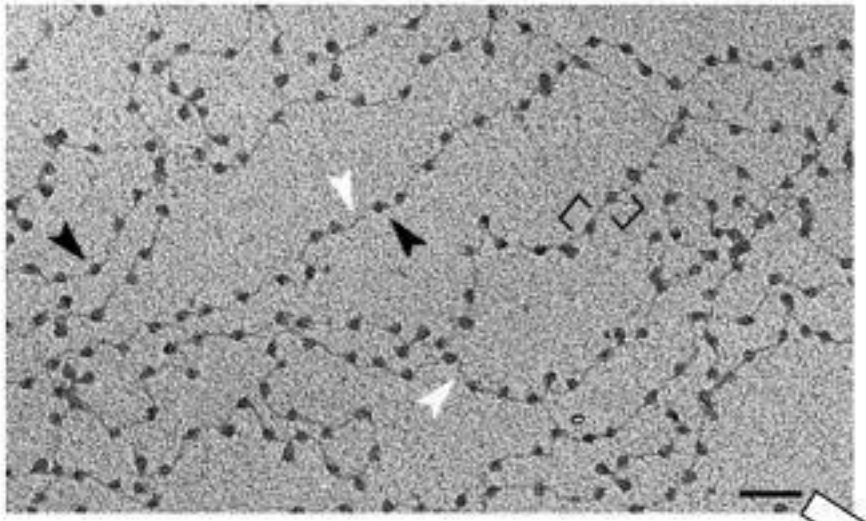
Objectif : amplifier in vitro de l'ADN en tirant parti du mode normal de synthèse de l'ADN in vivo



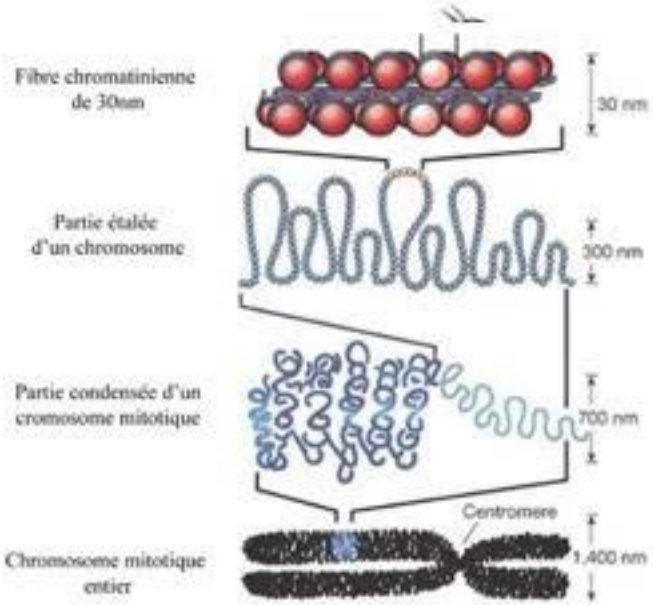

Manque amorce ARN sur le schéma et le sens 5'=> 3'




Question 2 : cf. cours chapitre 1

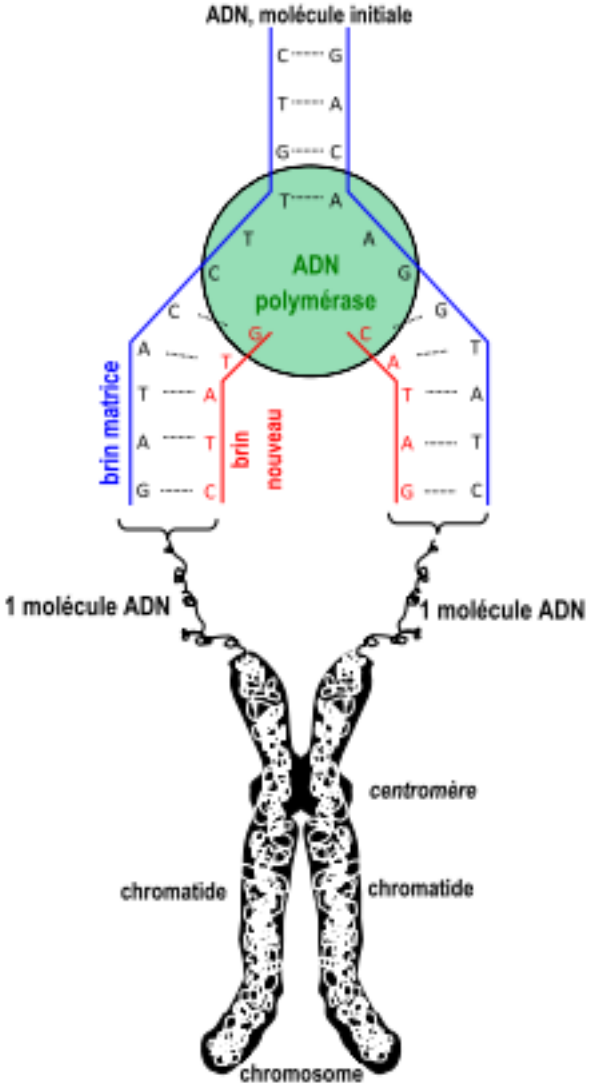


Au cours d'un cycle cellulaire les molécules d'ADN vont changer d'aspect.
En **interphase**, les molécules d'ADN sont dans un état **décondensé** et forment un amas diffus de filaments de 2 nm d'épaisseur. En réalité un filament comprend une molécule d'ADN enroulée autour de protéines cylindriques, les **histones**




Interphase : ADN décondensé, chromosomes invisibles

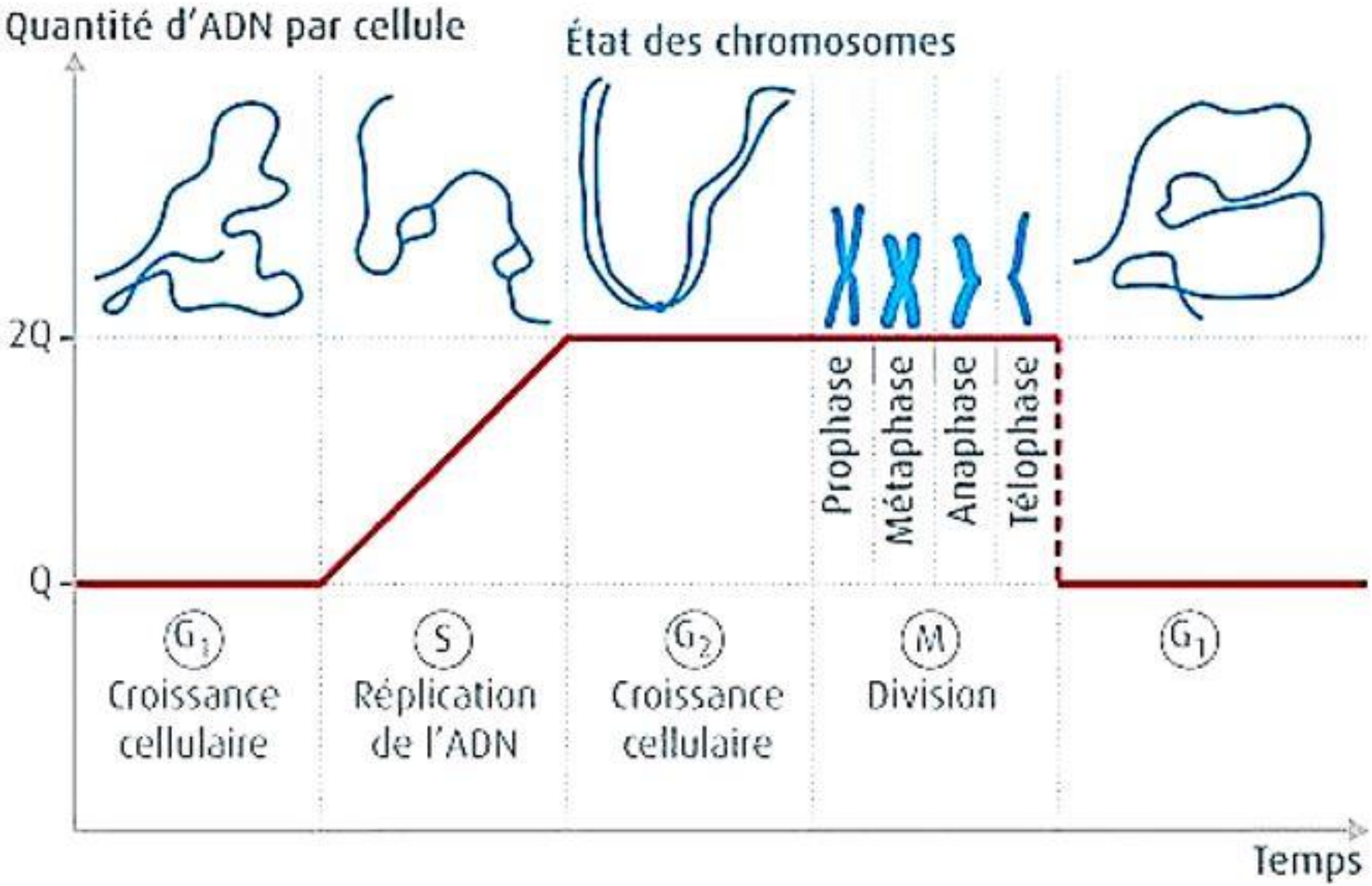
Mitose : ADN condensé, les chromosomes sont visibles



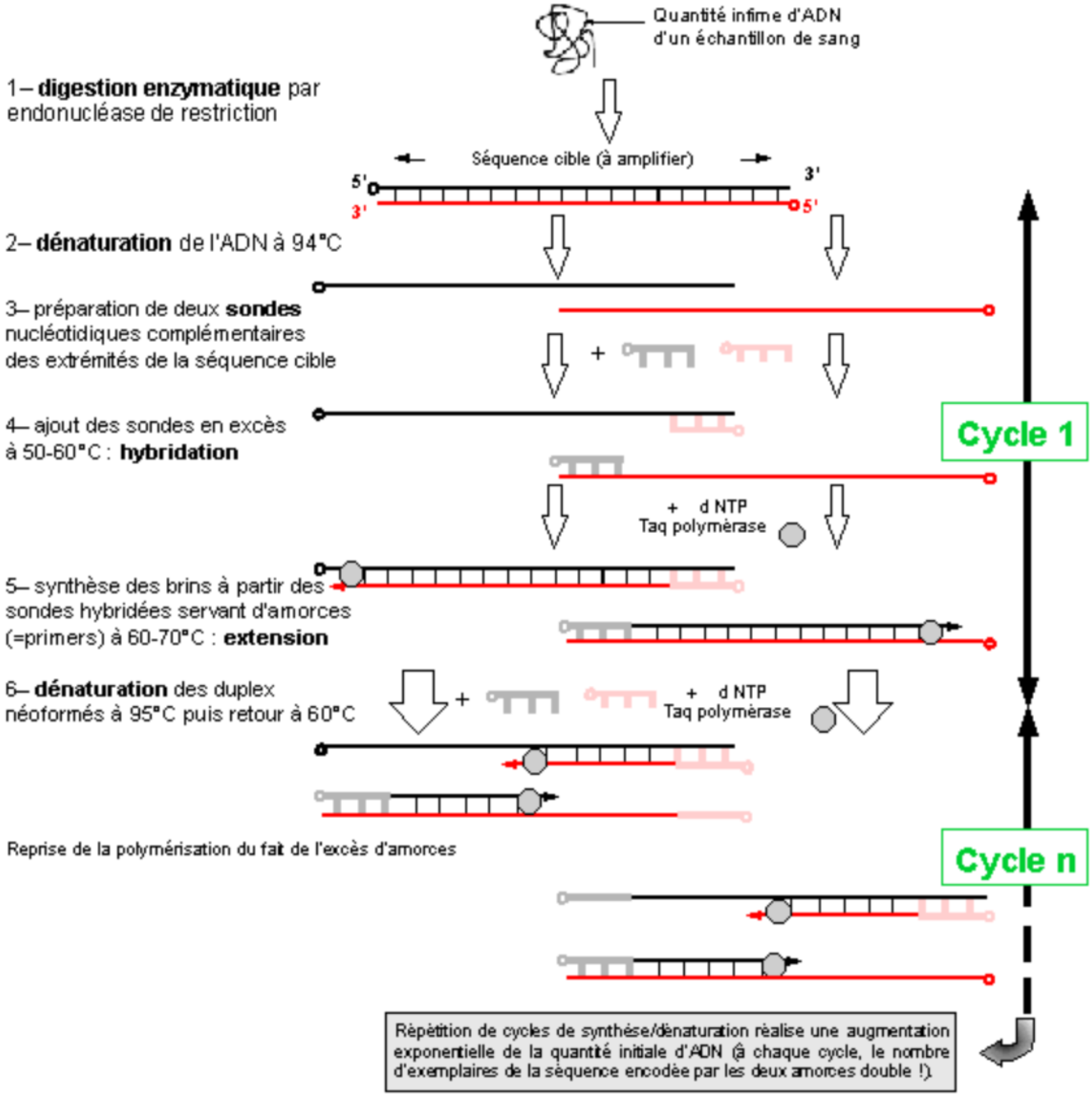

**REPLICATION DE L'ADN AU NIVEAU D'UNE FOURCHE DE REPLICATION**
(et duplication du chromosome)
***A comprendre***

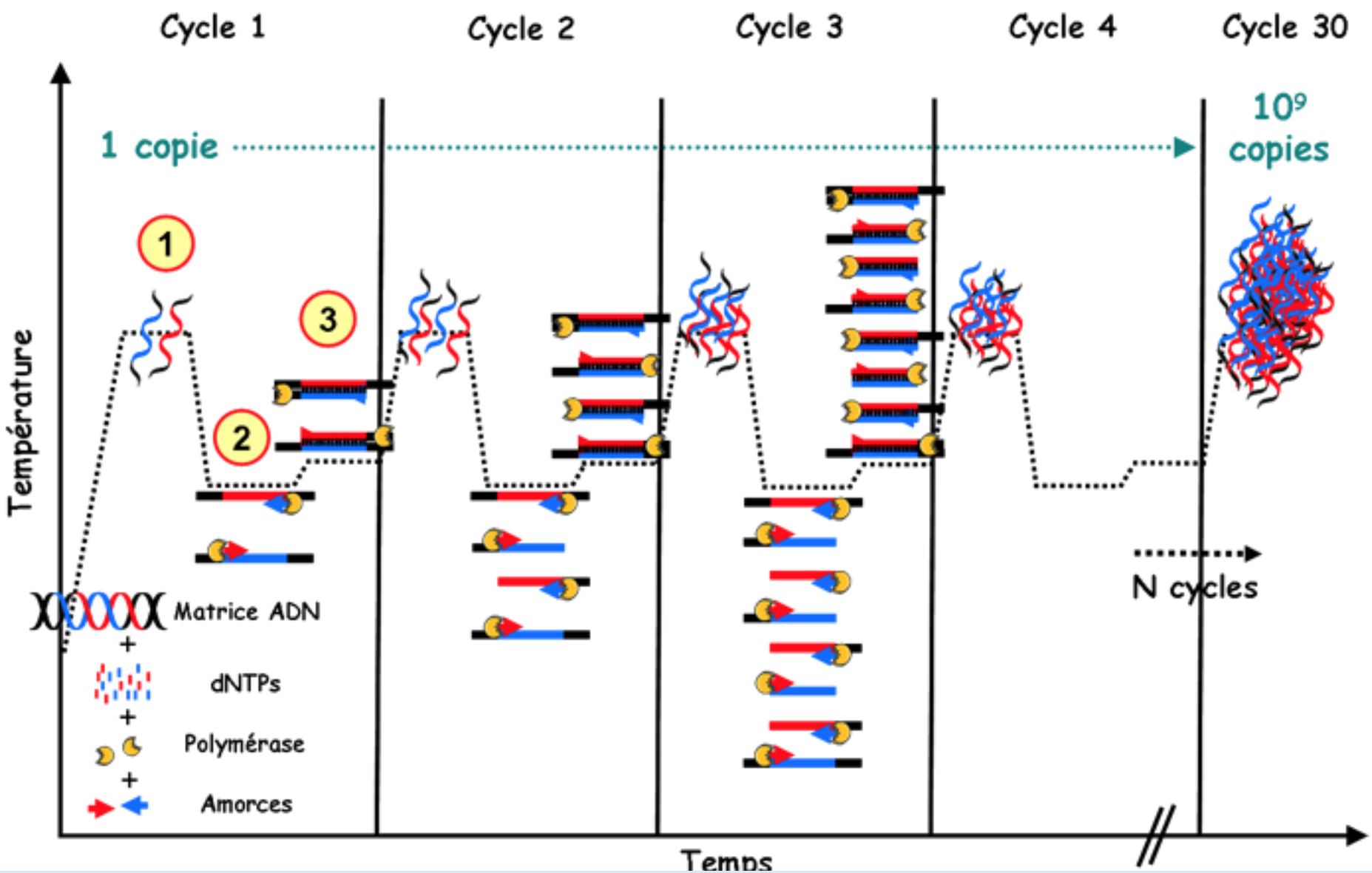
Pendant la phase S, chaque molécule d'ADN est répliquée de façon semi-conservative : chaque brin d'ADN (on parle d'ADN parental) sert de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire (le brin néo-formé). Cette synthèse est possible grâce à une enzyme l'ADN polymérase qui associe à chaque nucléotide du brin parental le nucléotide complémentaire. (rappel la base  Adénine s'associe à la base Thymine / Guanine s'associe à cytosine)

Il y a donc 2 chromatides en fin de phase S.




**Quantité d'ADN et état des chromosomes au cours du cycle cellulaire.**


Quantité infime d'ADN
d'un échantillon de sang
1– digestion enzymatique par endonucléase de restriction
Séquence cible (à amplifier)
5'
3'
3'
5'
2– dénaturation de l'ADN à 94°C
3– préparation de deux sondes nucléotidiques complémentaires des extrémités de la séquence cible
+
4– ajout des sondes en excès à 50-60°C : hybridation
Cycle 1
+ d NTP
Taq polymérase
5– synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces (=primers) à 60-70°C : extension
6– dénaturation des duplex néoformés à 95°C puis retour à 60°C
+
+ d NTP
Taq polymérase
Reprise de la polymérisation du fait de l'excès d'amorces
Cycle n
Répétition de cycles de synthèse/dénaturation réalise une augmentation exponentielle de la quantité initiale d'ADN (à chaque cycle, le nombre d'exemplaires de la séquence encodée par les deux amorces double !)

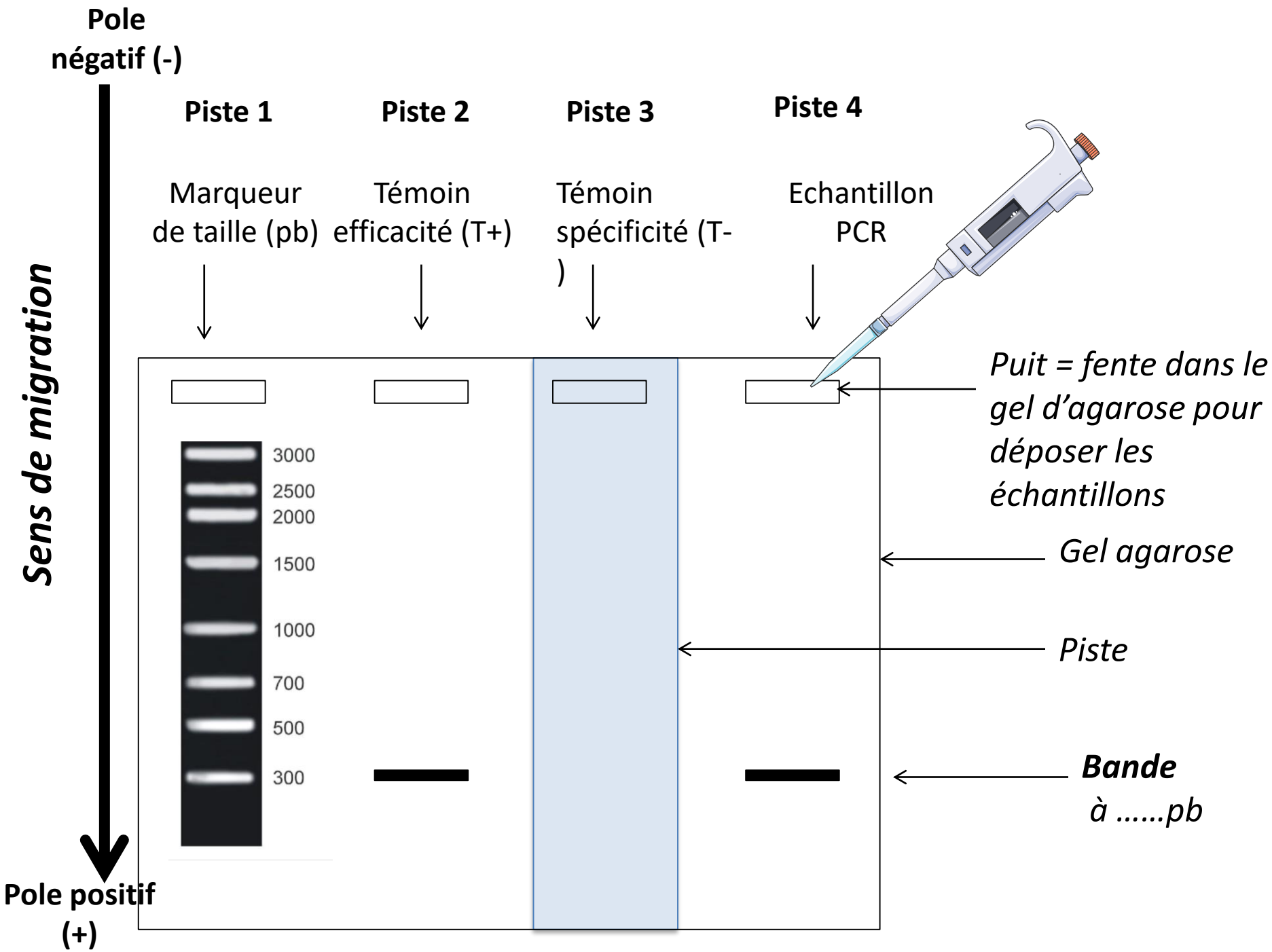



**Attention au choix des amorces oligonucléotidiques,de la température, durée des étapes.**

**Utilisations, très nombreuses.**

- analytiques : analyse qualitative de la présence, taille ou séquence de fragment d'ARN ou ADN. Analyse quantitative plus difficile (PCR en temps réel).

- aide au clônage en s'affranchissant des limites imposées par les enzymes de restriction
- création de mutants grâce à l'utilisation d'oligonucléotides dégénéré


Pole négatif (-)
Sens de migration
Pole positif (+)
Piste 1
Piste 2
Piste 3
Piste 4
Marqueur de taille (pb)
Témoin efficacité (T+)
Témoin spécificité (T-)
Echantillon PCR
3000
2500
2000
1500
1000
700
500
300
Puit = fente dans le gel d'agarose pour déposer les échantillons
Gel agarose
Piste
Bande à ……pb