

mini Manuel

de

biologie moléculaire

Cours + QCM/QROC

Abderrahman Maftah

Professeur à l'université de Limoges

Jean-Michel Petit

Professeur à l'université de Limoges

Raymond Julien

Professeur émérite à l'université de Limoges

4^e édition

DUNOD

Les illustrations de cet ouvrage ont été réalisées par Sébastien ARICO.

Directeur d'ouvrage

Raymond JULIEN

Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.

Le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements

d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour

les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée. Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).



© Dunod, Paris, 2007, 2011, 2015, 2018

11, rue Paul Bert, 92210 Malakoff

www.dunod.com

ISBN 978-2-10-077369-5

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Table des matières

1	Structure de l'ADN et de l'ARN	1
1.1	Les composants des acides nucléiques	1
	La structure des nucléotides	3
	La structure des polynucléotides	5
1.2	La structure en double hélice de l'ADN	5
	La règle de Chargaff et les appariements complémentaires	5
	Les différentes formes d'ADN	8
	Dissociation et réassociation des brins d'ADN	9
	Les surenroulements de l'ADN	11
1.3	Le nucléosome, la chromatine et les chromosomes	13
	La structure du nucléosome	13
	La structure et le remodelage de la chromatine	15
	La structure des chromosomes et le cycle cellulaire	16
1.4	La structure des génomes	19
	Qu'est-ce qu'un génome ?	19
	La taille des génomes	19
	Les génomes viraux	21
	Les génomes procaryotes	21
	Les génomes eucaryotes	21
	Les génomes d'organites	22
1.5	Les différents types d'ARN	23
	Structure et fonction	23
	Qu'est-ce qu'un ARN non codant ?	25
	Qu'est-ce que l'ARN interférence ?	26
	Points clefs	28
	QCM - QROC	29
	Réponses	31

2	Réplication, réparation, recombinaison et transposition de l'ADN	33
2.1	Les mécanismes de réplication de l'ADN	33
	La chimie de synthèse cellulaire des polydésoxyribonucléotides	34
	L'action de l'ADN polymérase	35
	La fourche de réplication	36
	Les autres enzymes et protéines de la réplication	37
	Les différentes ADN polymérases	40
	Les différentes étapes de la réplication	41
2.2	Les erreurs de réplication de l'ADN et leur réparation	46
	Les altérations de la structure de l'ADN	47
	Les mécanismes de réparation	48
2.3	Les détériorations environnementales de l'ADN et leur réparation	50
	L'hydrolyse spontanée et les détériorations physico-chimiques	50
	Les agents intercalants	51
	La réparation des détériorations	51
2.4	La recombinaison et la transposition de l'ADN	54
	Les mécanismes de recombinaison homologue	54
	La recombinaison en des sites spécifiques et la transposition	61
	Points clefs	69
	QCM - QROC	70
	Réponses	72
3	La transcription de l'ADN	75
3.1	Les mécanismes de la transcription	75
	Les ARN polymérases	75
	Les différentes étapes de la transcription	77
3.2	La transcription chez les bactéries	78
	Les promoteurs bactériens	78
	Le démarrage de la transcription	79
	La phase d'allongement	79
	L'arrêt de la transcription	81

3.3 La transcription chez les eucaryotes	82
Les promoteurs eucaryotes et la polymérase II	82
Le démarrage : facteurs de transcription et complexe médiateur	83
Les phases d'allongement et d'arrêt	86
Les modifications des transcrits	86
Les deux autres polymérases eucaryotes	89
3.4 L'épissage de l'ARN	90
Le mécanisme général	90
Le spliceosome	93
L'épissage alternatif et sa régulation	93
Exemples de rôles biologiques de l'épissage alternatif	95
3.5 L'« editing des transcrits »	96
Points clefs	99
QCM - QROC	101
Réponses	102

4 La traduction des ARN messagers	105
4.1 Le code génétique	106
Le code génétique est dégénéré	106
Le code a été établi expérimentalement	108
Le code est lu sur l'ARN messenger dans le sens 5'-3'	108
Les codons ne sont pas chevauchants	109
Les mutations modifiant le sens des codons	109
Le code génétique est universel	111
4.2 Les principaux acteurs de la traduction	111
Les ARN messagers	112
Les ARN de transfert	112
Le ribosome	116
4.3 La traduction des ARN messagers bactériens	120
Le démarrage (initiation) de la traduction	120
L'étape d'allongement (élongation) de la chaîne polypeptidique	122
L'arrêt de la synthèse (terminaison)	125

4.4 La traduction des ARN messagers eucaryotes	125
Le démarrage de la traduction eucaryote	125
Les étapes d'allongement et d'arrêt de la traduction eucaryote	128
Traduction et demi-vie des ARN messagers eucaryotes	128
Points clefs	131
QCM - QROC	132
Réponses	135

5 Régulation de l'expression des gènes 139

5.1 Principes généraux	139
Les protéines régulatrices : activateurs et répresseurs	139
Le recrutement des ARN polymérases	140
Autres exemples de facteurs de régulation	141
5.2 Régulation chez les procaryotes	142
L'exemple historique : l'opéron lactose	142
Autres exemples	147
La régulation complexe du cycle vital du bactériophage λ	151
5.3 Régulation chez les eucaryotes	156
Les régulateurs transcriptionnels	157
Le contrôle des régulateurs transcriptionnels	161
Le contrôle de l'épissage alternatif des transcrits ARN	164
5.4 Régulation traductionnelle de l'expression des gènes eucaryotes	165
Éléments de structure des ARN messagers influençant la traduction	166
Le contrôle général par la phosphorylation des facteurs de démarrage	167
Les mécanismes spécifiques régulant l'attachement du ribosome à l'ARN messenger	169
Les mécanismes de régulation plus tardifs	170
Les mécanismes de régulation de la traduction par les micro-ARN	170

L'irrésistible ascension de l'ARN comme régulateur de l'expression des gènes	174
--	-----

Points clefs	177
---------------------	-----

QCM-QROC	179
-----------------	-----

Réponses	182
-----------------	-----

6 Techniques de biologie moléculaire 185

6.1 La création de molécules d'ADN recombinant 185

Couper l'ADN : les enzymes de restriction	185
---	-----

Ligaturer l'ADN	187
-----------------	-----

6.2 Les vecteurs de clonage 189

Les plasmides	190
---------------	-----

Les vecteurs viraux	193
---------------------	-----

Les cosmides	193
--------------	-----

Les chromosomes artificiels bactériens	194
--	-----

Les vecteurs pour levures	194
---------------------------	-----

Les vecteurs pour les eucaryotes supérieurs	196
---	-----

6.3 Les banques d'ADN 196

Les banques d'ADN génomique	196
-----------------------------	-----

Les banques d'ADN complémentaire	197
----------------------------------	-----

6.4 Les techniques d'analyse de l'ADN 197

Le séquençage des acides nucléiques	197
-------------------------------------	-----

Les nouvelles techniques de séquençage	201
--	-----

Application au séquençage de l'ARN	203
------------------------------------	-----

Application à la métagénomique	205
--------------------------------	-----

Une nouvelle révolution dans le séquençage	207
--	-----

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	210
---	-----

La PCR quantitative en temps réel	210
-----------------------------------	-----

Les techniques d'hybridation des acides nucléiques	213
--	-----

Les techniques de localisation des sites de liaison à l'ADN	215
---	-----

6.5 Le criblage de cellules recombinées 217

Criblage par PCR	217
------------------	-----

Criblage à l'aide de sites de restriction	218
---	-----

6.6 Les applications de la technologie de l'ADN recombinant 219

La mutagenèse 219

Le système double-hybride 223

Transfert et expression de gènes eucaryotes
chez les procaryotes 224

Transfert et expression de gènes dans les levures 228

Génie génétique et cellules eucaryotes supérieures 229

Utilisation de vecteurs rétroviraux pour la transfection
des cellules 231

Les gènes rapporteurs et études des séquences promotrices 232

Un nouvel outil remarquable d'ingénierie des génomes :
le système CRISPR-Cas 9 235

Les techniques d'analyse de l'épigénome 239

Points clefs 241**QCM-QROC 243****Réponses 246****Glossaire 249****Index 259**



Structure de l'ADN et de l'ARN

PLAN

- 1.1 Les composants des acides nucléiques
- 1.2 La structure en double hélice de l'ADN
- 1.3 Le nucléosome, la chromatine et les chromosomes
- 1.4 La structure des génomes
- 1.5 Les différents types d'ARN

OBJECTIFS

- Définir les structures chimiques des acides nucléiques, notamment celle de la double hélice de l'ADN
- Étudier les assemblages complexes auxquels participe l'ADN (nucléosome, chromatine)
- Répertoire d'un point de vue structural et fonctionnel les différents types d'ARN

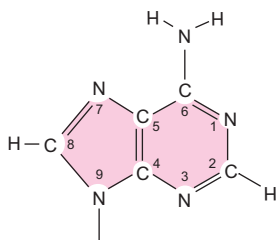
1.1 LES COMPOSANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules composées d'un enchaînement d'unités structurales appelées **nucléotides**. Ce sont donc des **polynucléotides**.

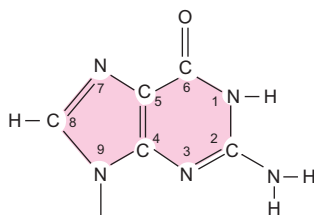
À l'état libre, chaque nucléotide est constitué :

- d'une base (Fig. 1-1), qui peut être une purine (composée de deux hétérocycles azotés) ou une pyrimidine (un seul hétérocycle azoté) ;
- d'un **pentose** (ose à cinq atomes de carbone, Fig. 1-2) ;
- d'un à trois groupes phosphate (Fig. 1-3).

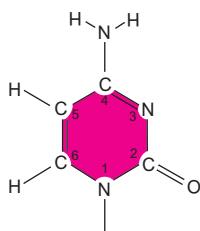
Les atomes des bases (C et N) portent les chiffres 1 à 6 pour les pyrimidines et 1 à 9 pour les purines, alors que les atomes C du pentose portent les chiffres 1' à 5'. Le signe prime ajouté à ces derniers les distingue de ceux des bases. L'ose, par son carbone 1', établit une **liaison N-glycosidique** avec l'azote 1 des pyrimidines ou l'azote 9 des purines. Par son carbone 5', il forme une liaison ester avec un premier groupe phosphate (désigné pour cette raison phosphate α). Ce dernier peut former des liaisons anhydride d'acide (Fig. 1-3) avec des groupes phosphate β et γ ou des liaisons ester avec un groupe OH porté par le carbone 3' du pentose précédent (Fig. 1-4).



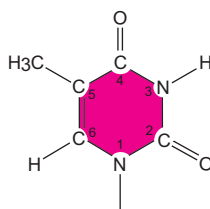
Adénine
(6 amino**purine**)



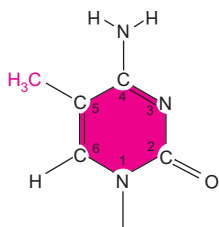
Guanine
(2 amino, 6 oxo**purine**)



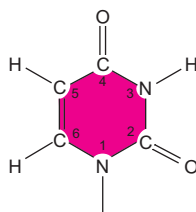
Cytosine
(2 oxo, 4 amino**pyrimidine**)



Thymine
(5méthyl-uracile)



5 méthyl-cytosine



Uracile
(2,4 dioxo**pyrimidine**)

Figure 1-1 Structures chimiques des bases puriques (Adénine, Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine, Thymine, Uracile) des acides nucléiques ADN et ARN. Des formes méthylées peuvent aussi être rencontrées (5-méthyl cytosine).

L'union d'une base et d'un pentose s'appelle un **nucléoside**. Dès qu'un groupe phosphate est présent, l'ensemble est désigné par le terme **nucléotide**. Il en résulte toute une nomenclature dont un exemple est donné (Fig. 1-3).

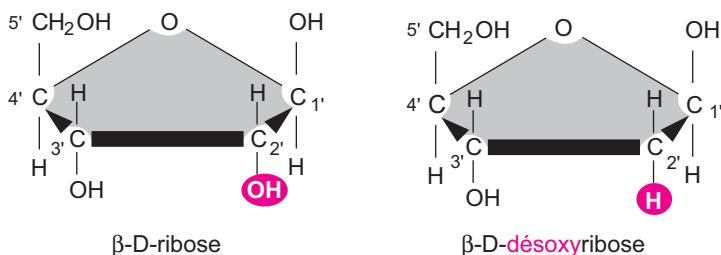


Figure 1-2 Les deux pentoses respectifs de l'ARN et de l'ADN.

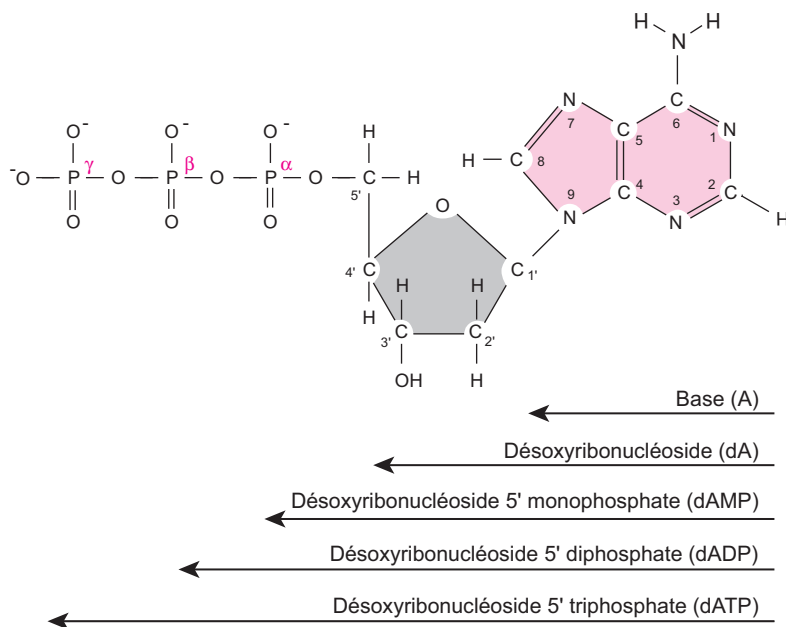


Figure 1-3 Structure détaillée d'un désoxyribonucléoside triphosphate. En remplaçant la lettre A (Adénine) par les lettres G, C, T/U et le désoxyribose par le ribose, la nomenclature est généralisable à tous les nucléotides de l'ADN et de l'ARN.

La structure des nucléotides

Dans l'ADN, l'ose est le **2'-désoxyribose** (Fig. 1-2) et les nucléotides sont des désoxyribonucléosides monophosphates (Fig. 1-4). Ils ne comportent qu'un seul groupe phosphate (le phosphate α) ;

- Les bases puriques de l'ADN sont l'**adénine** et la **guanine**.
- Les bases pyrimidiques de l'ADN sont la **cytosine** et la **thymine** (Fig. 1-1).

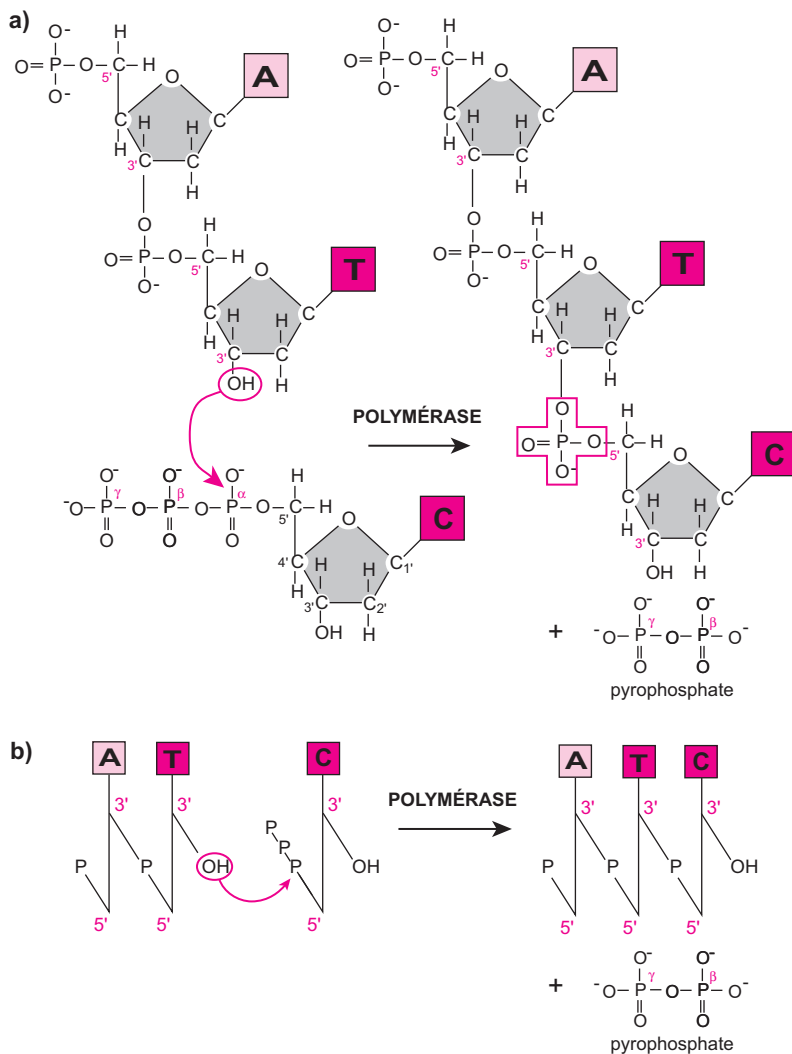


Figure 1-4 Principe de la formation d'un brin d'ADN par la polymérisation des nucléotides. Noter que le brin matrice qui est normalement copié n'est pas ici représenté. **a)** représentation développée ; **b)** représentation simplifiée.

Dans l'ARN, l'ose étant un **ribose** (Fig. 1-2), les nucléotides sont des ribonucléosides monophosphates. Dans l'ARN, l'**uracile** remplace la thymine. Dans l'ADN, la cytosine peut être méthylée sur le carbone 5 pour donner la **5-méthyl-cytosine** (Fig. 1-1). Les cytosines méthylées sont souvent présentes dans des régions de séquences ADN

riches en répétition de nucléotides à guanine et cytosine (les îlots à dinucléotides CpG).

La structure des polynucléotides

La structure d'un polynucléotide (polymère de nucléotides) repose sur la formation d'un nombre parfois élevé (plusieurs millions) de liaisons **phosphodiester** entre les nucléotides constitutifs (Fig. 1-4). Chaque liaison phosphodiester s'établit entre le groupe OH du carbone 3' d'un pentose et le groupe OH porté par le carbone 5' du pentose suivant. C'est la liaison phosphodiester 3'-5'. Il en résulte que l'orientation du polynucléotide se trouve définie par la position du groupe phosphate libre du premier nucléotide, généralement le phosphate porté par le carbone 5', et par le groupe OH libre porté par le carbone 3' du dernier nucléotide. On dit ainsi que le polynucléotide est orienté dans le sens 5' vers 3' (Fig. 1-4, voir aussi Fig. 1-6).

1.2 LA STRUCTURE EN DOUBLE HÉLICE DE L'ADN

La règle de Chargaff et les appariements complémentaires

L'ADN est un acide nucléique **bicaténaire**, c'est-à-dire constitué de deux brins associés par des **liaisons hydrogène** entre les bases. Les liaisons hydrogène s'établissent toujours entre une purine de l'un des brins et une pyrimidine de l'autre brin. Dans cet appariement complémentaire, l'adénine (A) est toujours associée à la thymine (T) par deux liaisons hydrogène et la guanine (G) interagit avec la cytosine (C) grâce à trois liaisons hydrogène (Fig. 1-5).

Règle d'Erwin Chargaff. Le nombre de thymines est égal au nombre d'adénines et celui des cytosines au nombre de guanines.

Ainsi, dans l'ADN, la quantité des purines (A+G) est égale à celle des pyrimidines (C+T). Par contre le rapport A+T sur G+C varie selon l'origine de l'ADN (Tableau 1-1). Le principe d'**appariement complémentaire** des bases a une grande valeur pratique : il permet au biologiste de déterminer avec exactitude la séquence nucléotidique d'un brin d'ADN dès lors qu'il connaît celle du brin complémentaire, qu'il s'agisse d'un brin ADN ou d'un transcrit ARN (voir chap. 3).

L'orientation d'un brin d'ADN est définie par la présence des groupes chimiques 5'-phosphate et 3'-OH portés par les carbones 5' et 3' des deux désoxyriboses extrêmes (Fig. 1-6 a). Dans la **double hélice**, les