

Biologie Moléculaire



I. Généralités

La biologie moléculaire utilise des outils/techniques variées

Les outils de Biologie moléculaire permettent d'**identifier** et d'**analyser** les gènes, voire de les **remplacer** !

A. Ils permettent de manipuler l'ADN

Couper : Les **endonucléases de restriction** coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques.

- **Copier** : Les **polymérases** constituent une famille d'enzymes chargée de copier, comme l'ADN Polymérase pour la **réplication**, ou la Polymérase delta/epsilon pour la **transcription**. Il existe aussi des **vecteurs de clonage**.

- **Coller** : Les **ligases** relient entre eux des fragments d'ADN.

- **Rechercher** : Les **sondes d'hybridation** (de courtes séquences d'ADN ou d'ARN couplées à un **marqueur**) repèrent une **cible** dans le **génome** et déclenchent un **signal** en s'y **hybridant**.

I - Outils de base et comparaison de génomes

B. Ils permettent d'analyser et de lire des séquences génomiques

Quand on veut travailler sur de l'ADN, il est systématiquement nécessaire d'**amplifier** les **séquences génomiques**, car elles sont trop **petites** pour identifier une éventuelle **mutation** : le risque de **contamination** de l'échantillon est **trop élevé**, la modification de la séquence ne serait **pas visible**.

Amplifier un gène consiste à faire un grand nombre de **copies** d'une même séquence d'ADN pour ensuite la manipuler.

Nous avons à notre disposition **deux méthodes** pour **amplifier** une portion d'ADN :

- **Technique de clonage d'ADN dans un vecteur** (ex. plasmide).
- **Technique de PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) qui peut être suivie d'un **séquençage**.

Une autre méthode permet uniquement de **déterminer la séquence** nucléotidique d'une portion d'ADN :

- **Séquençage haut débit**, puis le séquençage de nouvelle génération **NGS** (*Next Generation Sequencing*)

II. 2 Techniques majeurs permettent l'amplification de l'ADN

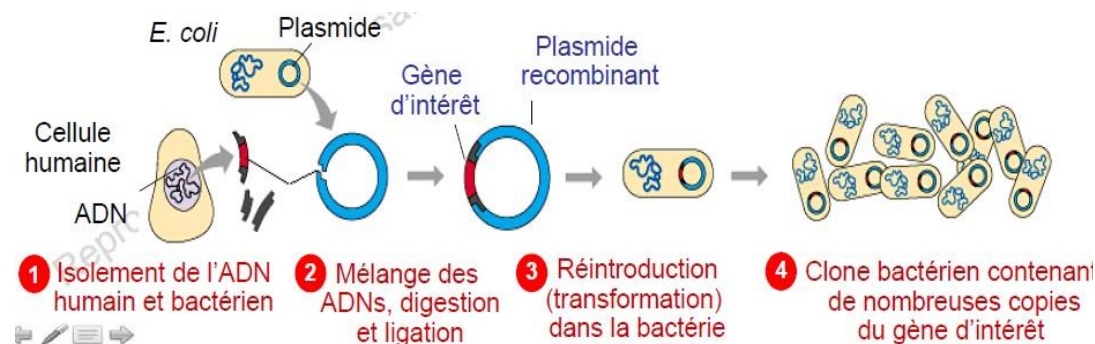
1. Clonage par vecteur

La technique de clonage utilise un vecteur (~ 1970)

Un **vecteur** est une molécule d'ADN qui permet l'introduction d'ADN **étranger** dans une cellule, sa **réplication** voire son **expression** !

Ex : **plasmide** bactérien.

- Le **gène d'intérêt**, ou **insert** (en **rouge**) est introduit dans un plasmide après **digestion** (= coupure) des ADNs par des **enzymes de restriction** et **ligation**.
- Le **plasmide recombinant** est introduit dans des bactéries par **transformation**.
- Les bactéries prolifèrent et « **amplifient** » le **plasmide** et le **gène d'intérêt**.



2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'autre technique majeure est la technique de PCR (~1980)

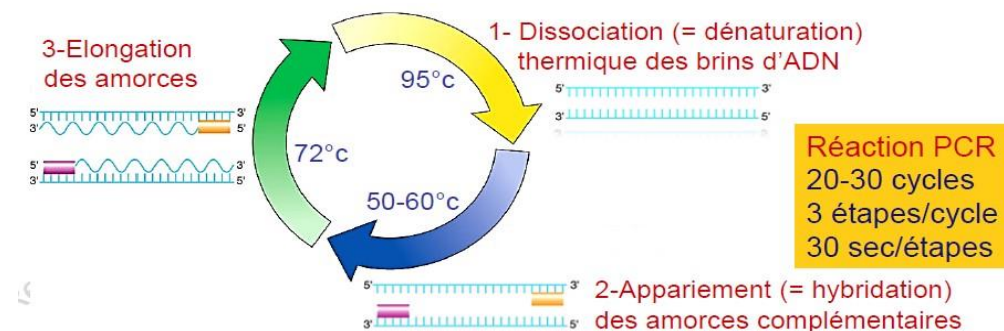
La PCR permet l'**amplification exponentielle** d'une **séquence spécifique** d'ADN.

La réplication *in vitro* d'une copie sur **n cycles** donne **2 puissance n** copies de la cible !

- **Thermocycleur** : Appareil faisant varier la **température** de façon **cyclique**.
- **Réactifs** : ADN contenant la cible, **ADN Polymérase thermostable** (**Taq Polymérase**), **dNTPs** et **primers** (= amorces de synthèse) encadrant la cible.

Etapes de la PCR :

1. **Dénaturation** (dissociation des brins d'ADN) à **95°C**.
2. **Hybridation** (appariement des amorces) à **50-60°C**.
3. **Elongation** des amorces à **72°C**.



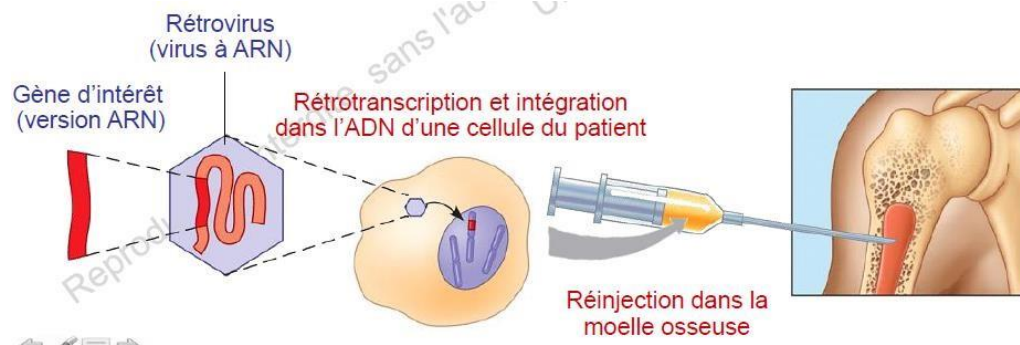
3. Applications

A) Applications du clonage :

Les applications du clonage sont nombreuses

En médecine, il est utilisé à **des fins thérapeutiques** :

- Production de médicaments recombinants, de vaccins...
- Insuline, hormone de croissance, facteurs de coagulation...
- Thérapie génique (leucémies...)
- Un virus utilisé comme vecteur peut introduire un gène dans une cellule et remplacer un gène défectueux ou la rendre sensible à un médicament



B) Applications de la PCR :

L'analyse d'ADN après PCR à de multiples applications

○ Diagnostic génétique des maladies héréditaires :

- Diagnostic post-natal, prénatal (interruption de grossesse), préimplantatoire (fécondation *in vitro*) avec analyse sur quelques cellules seulement.

○ Diagnostic en virologie, parasitologie, bactériologie, criminologie, etc...

- Détection et quantification de virus, parasites, ou bactéries.
- Identification de coupables par l'ADN retrouvé sur les scènes de crime...

C) Séquencer le génome :

Ces techniques ont permis de lire la séquence du génome

Ex : Séquençage Sanger par PCR et électrophorèse capillaire (1990)

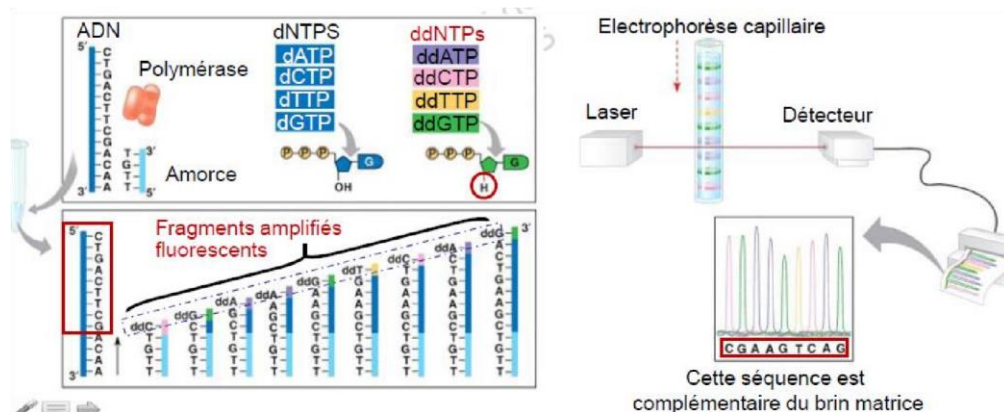
Cette technique utilise des **terminateurs de chaîne** (**dd**idésoxyribonucléotide, **dd**dNTP) fluorescents !

La réaction de PCR **s'arrête** à chaque incorporation possible d'un **ddNTP** (la polymérase ne pourra plus ajouter de nouveaux nucléotides après).

On obtient un **mélange de fragments** dont la taille diffère d'un nucléotide et dont la **fluorescence** indique chaque position d'un dNTP.

Chacun des **quatre types** de ddNTPs (dd**A**TP, dd**G**TP, dd**T**TP, dd**C**TP) possède une couleur de fluorescence qui lui est **propre**.

La séparation en taille des fragments par électrophorèse puis la lecture de la fluorescence nous permet de déterminer la séquence nucléotidique.



III. Génomique comparative

A. Généralités

Le génome humain contient 3 milliards de paires de bases

○ Le nombre de gènes est estimé entre **20-30 000** :

- La fonction de **plus de 50%** de ces gènes est **inconnue**.
- Les **séquences codantes** représentent **< 5%** du génome.
- La fonction de **95%** du génome est **non / mal connue**.
- Le génome de deux individus est identique à **99,9%** :
- Ces différences neutres appelées **polymorphismes** expliqueraient certaines différences entre individus.

Le génome de l'**homme** et du **chimpanzé** sont identiques à **98,6%** ! Mais la comparaison des génomes (**génomique comparative**) peut-elle expliquer les différences entre espèces ?

B. Les questions fondamentales de la génomique comparative

Quelle(s) différence(s) fondamentale(s) entre procaryotes et eucaryotes ?

Le nombre de gènes est **à peu près similaire**, il est donc **sans rapport avec la complexité d'un organisme** !

Et entre eucaryotes monocellulaires et pluricellulaires ?

Le rapport nombre de gènes / taille du génome **décroît** : **plus un organisme est complexe, moins son génome est riche en gènes** !

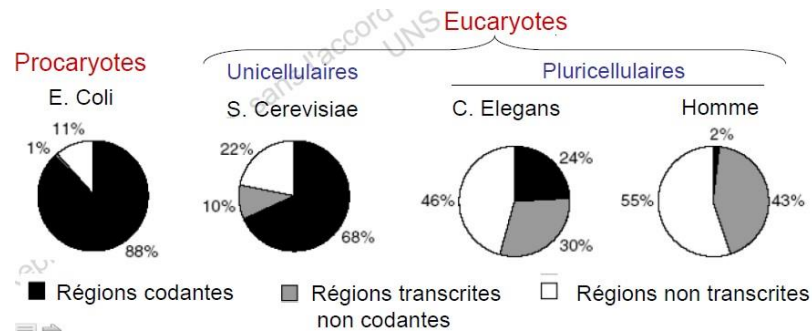
(les chiffres ne sont pas à apprendre ils sont là pour illustrer)

	Taille du génome (10 ⁶ bases)	Nombre Gènes	Nombre gènes / Taille du génome
Procaryotes (<i>E. coli</i>)	4.6	~ 4000	~ 1/1000 pb
Eucaryote monocellulaire (<i>S. cerevisiae</i>)	12	~ 6,000	~ 1/2000 pb
Eucaryote pluricellulaire (<i>C. elegans</i>)	100	~ 14,000	~ 1/7000 pb
Homme	3 000	~ 30,000	~ 1/100 000 pb

Quelle(s) différence(s) fondamentale(s) entre procaryotes / eucaryotes ?

Elle réside dans la proportion de séquences non codantes dans le génome :

Paradoxalement, plus un organisme est complexe, moins son génome contient de séquences codantes, plus il contient de séquences non codantes, transcrites ou non !



C. Les réponses de la génomique comparative

La différence réside dans la proportion des séquences non codantes

1) Séquences non codantes transcrites :

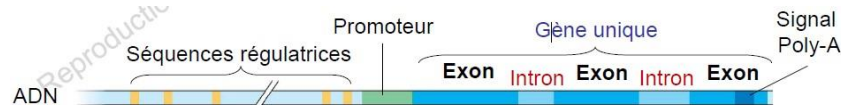
Les séquences **non codantes transcrites** correspondent aux **introns**.

Les gènes **procaryotes** sont regroupés en **opérons** et **dénués d'introns** !



Les gènes **eucaryotes** sont régulés **individuellement** et **morcelés** (introns).

Les introns sont **transcrits** avant d'être **éliminés** ce qui explique l'abondance de **séquences non codantes transcrites** des génomes eucaryotes.

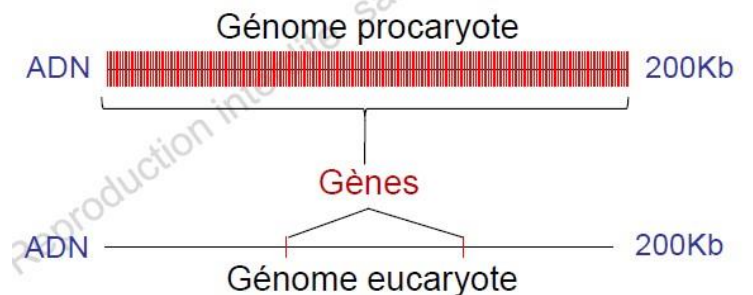


2) Séquences non codantes non transcrites :

Les séquences **non codantes non transcrites** sont les **régions intergéniques**.

Le génome **procaryote** est **très compact** (peu de régions intergéniques) : la **densité** de gènes est **élevée** (un gène toutes les 1000 bases) !

Le génome **eucaryote** contient de **vastes régions intergéniques** («désert») : la **densité** de gènes est **faible** (un gène toutes les 100 000 bases) !

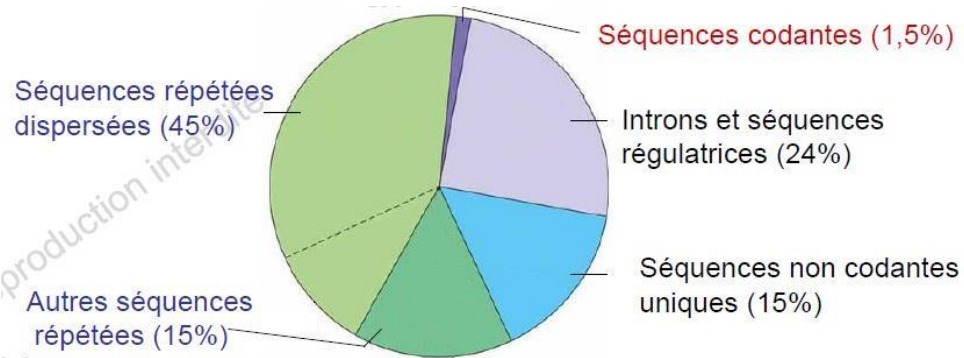


3) Séquences répétées du génome :

Les génomes eucaryotes et humains sont riches en séquences répétées

Les régions **intergéniques** sont **en majorité** des **séquences répétées** dont:

- Les **séquences répétées dispersées** (45% du génome humain)
- **Transposons** et **rétrotransposons** (séquences *L1* ou *Alu*)
- D'autres séquences répétées (15%) sont des séquences **répétées en tandem** (5%) ou des **duplications** de larges séquences génomiques (5%)



4) Cas des introns :

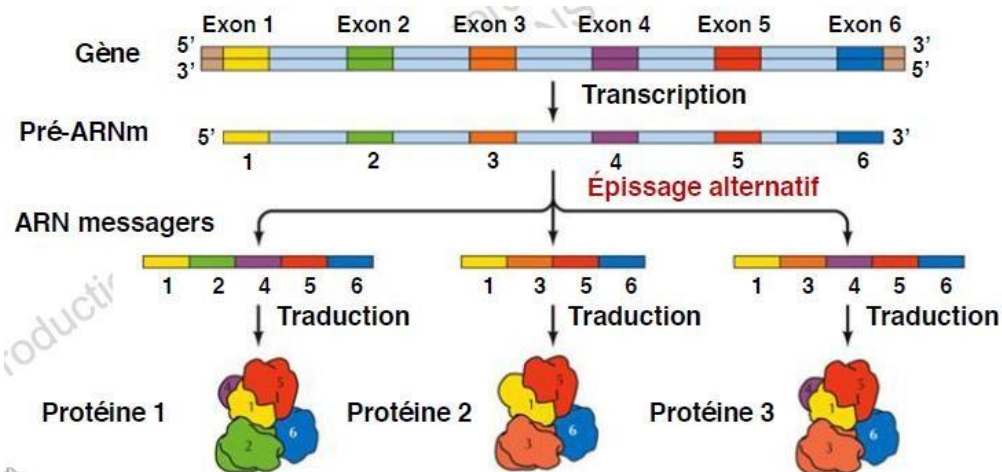
Les introns ont favorisé la complexification des espèces

Leur existence est à la base du phénomène **d'épissage alternatif**.

Ils permettent donc de produire **plusieurs protéines** à partir d'**un gène**.

Chez l'homme, **20-30 000 gènes** codent pour **200 000 protéines** différentes.

C'est le **nombre de protéines** d'un organisme qui reflète sa **complexité** !



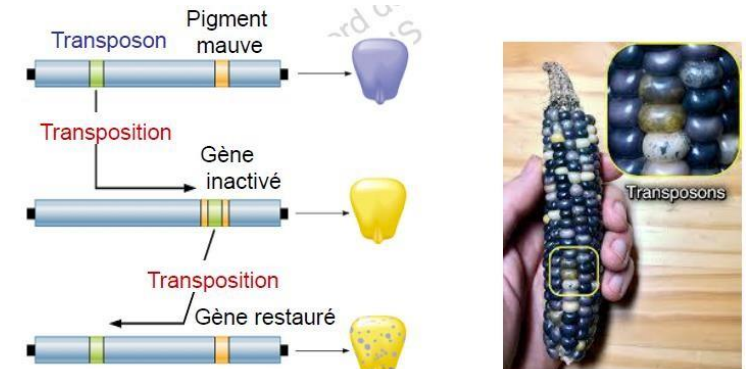
5) Cas des transposons :

Les transposons peuvent inactiver des gènes

Ils **se déplacent** et **se multiplient** dans le génome (gènes « **sauteurs** »).

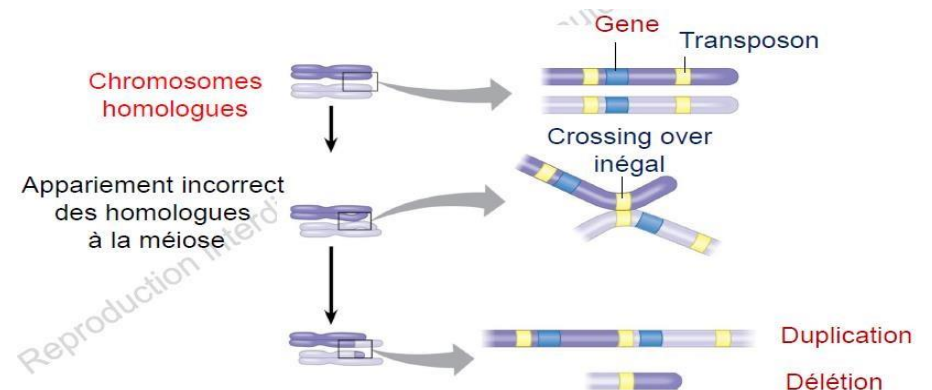
Ils peuvent **déplacer** des **exons** ou des **gènes entiers**, ou **inactiver** des gènes !

Exemple : Les variations de **couleur** des **grains de maïs** sont à l'origine de la **découverte des transposons** (Barbara McClintock, 1947).



Ils favorisent les crossing-over inégaux entre chromatides

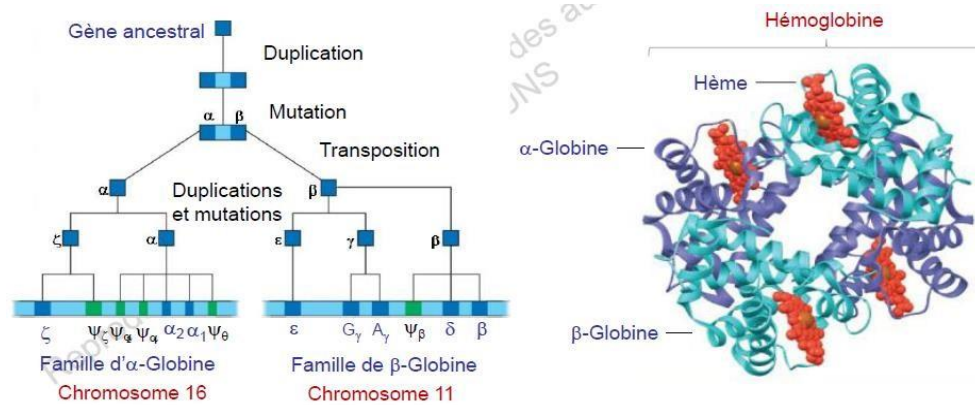
Le résultat est d'un côté un chromosome avec **délétion** d'une région et des gènes qu'elle contient, et de l'autre côté un chromosome avec **duplication** de cette même région.



Certains gènes ont été dupliqués et forment des familles multigéniques

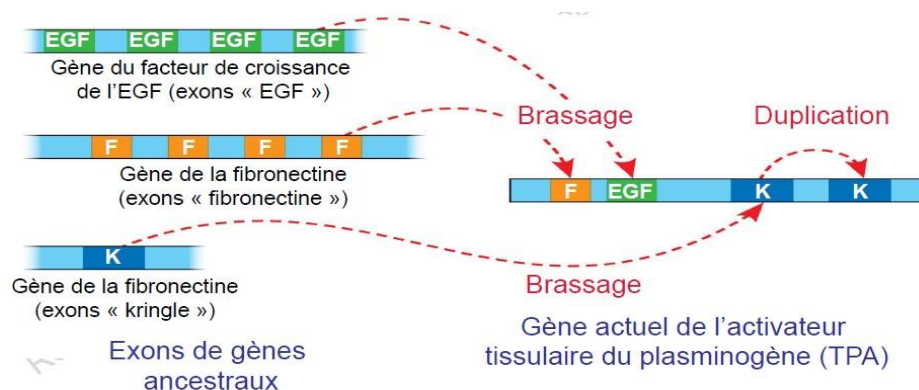
Elles sont issues de **duplications** et **mutations** à partir d'un gène ancestral.

Ex: Famille des gènes codant les chaînes de **globine** de l'hémoglobine (trois gènes de la famille **alpha**, cinq de la famille **bêta** et cinq **pseudo-gènes**).



Les transposons ont permis la création de nouveaux gènes

Un **exon** peut par exemple être **déplacé** d'un gène à un autre par l'intermédiaire des **transposons** qui l'**encadrent**.



D. Conclusion

Introns et séquences répétées ont favorisé l'évolution

A partir des **premières formes de vie** (nombre minimal de gènes), l'**évolution des génomes** a contribué à l'apparition de **nouvelles espèces**.

Séquences répétées et non codantes seraient à la base de l'évolution des espèces

Grâce aux **duplications**, **réarrangements**, **mutations**, **épissage alternatif**...

En contrepartie, elles peuvent favoriser l'apparition de **maladies génétiques**.

IV. Points clés

o Parmi les outils de la Biologie moléculaire

- La réaction de **PCR** est à la base de nombreux procédés de **diagnostic**.
- Elle permet de détecter des **mutations connues ou non** et est notamment une étape préalable au séquençage du génome.

o Grâce à ces outils, le génome de différents organismes est séquencé

- Les génomes **eucaryotes** et le génome **humain** contiennent **peu** de séquences **codantes** et de **nombreuses** séquences **non codantes**.
- Les séquences **non codantes introniques** favorisent la **diversité** et la **complexité** des organismes en permettant un **épissage alternatif**.
- Les **séquences répétées** (transposons, etc.) ont **favorisé l'évolution** du génome mais peuvent être la source de **mutations pathogènes**.

FAIM

« Dernière fiiiiiiiiiche »

« Oh non déjà ? »

« Et oui billy les meilleurs choses ont une fin »

« La tristesse m'accapare »

« Vois le bon côté tu n'auras plus à réviser cette matière »

« Mais c'était ma matière préféré ... »

« Bon comme t'es mignon mais t'es un tout p'tit breton je vais t'faire un cadeau »



CADREAU ICI



