

Formation Biologie Moléculaire

Dakar – Septembre 2006

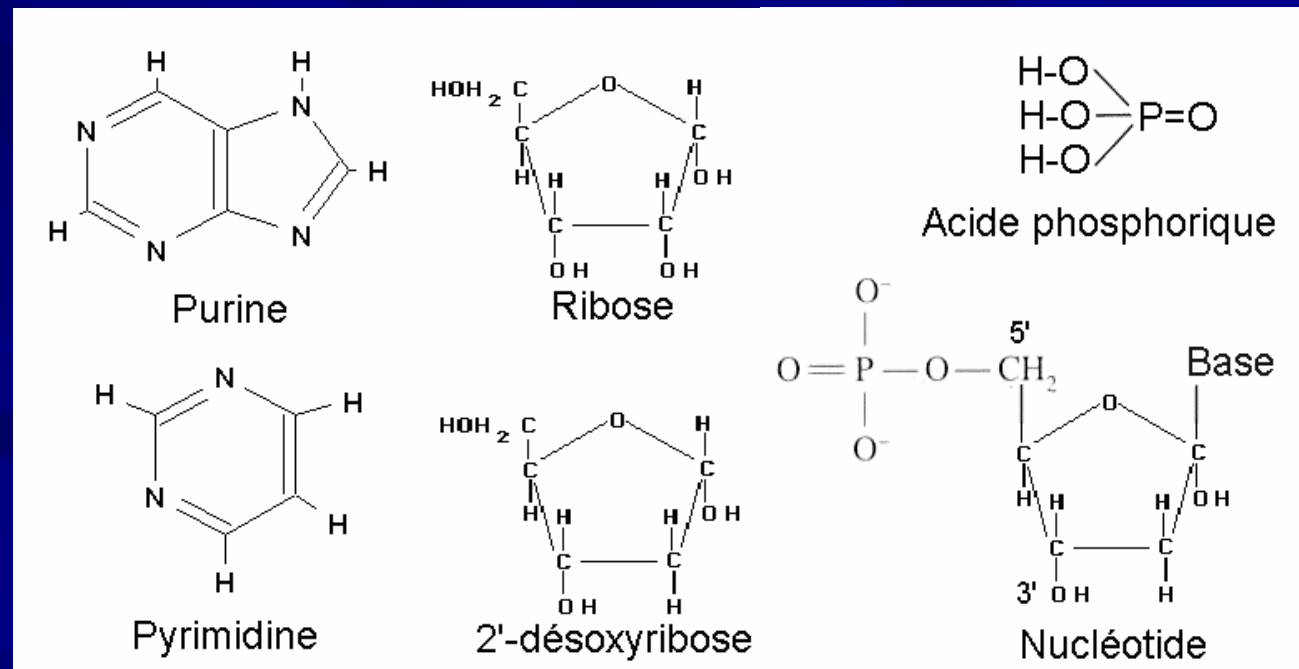
La naissance de la biologie moléculaire

- Les lois de l'hérédité (Mendel, 1866)
- La théorie chromosomique de l'hérédité (Morgan, 1910)
- Le codage des protéines par les gènes (Garrod, 1902)
- L'ADN, support biochimique de l'information génétique (Griffith, 1928; Avery 1944, Chargaff, 1950)
- La structure de l'ADN (Watson & Crick, 1953)

La structure des acides nucléiques

■ Les nucléotides

- Bases : purines A et G – pyrimidine C, T et U
- Ose (sucre) : ribose et désoxyribose
- Acide phosphorique



La structure des acides nucléiques

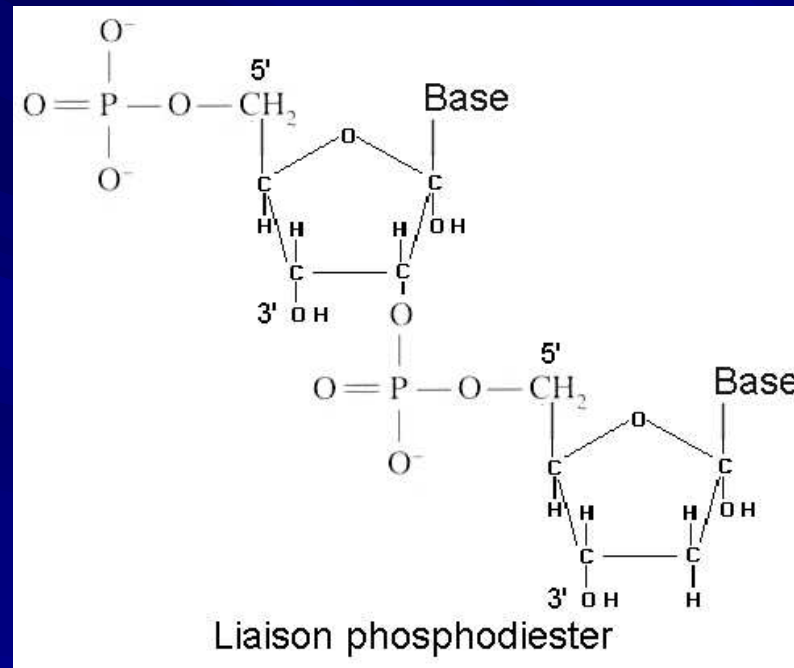
■ Nomenclature des nucléotides :

- Purines (A, G) : « ine », « ylique »
- Pyrimidines (C, T, U) : « idine, « idylique »

| Base | Nucléoside (ose+base) | Nucléotide (ac P+ose+base) | Code |
|----------|--------------------------|-------------------------------|------|
| adénine | adénosine | acide adénylique | A |
| guanine | guanosine | acide guanylique | G |
| cytosine | cytidine | acide cytidylique | C |
| thymine | thymidine | acide thymidylique | T |
| uracile | uridine | acide uridylique | U |

La structure des acides nucléiques

- Liaison entre les nucléotides : liaison phosphodiester

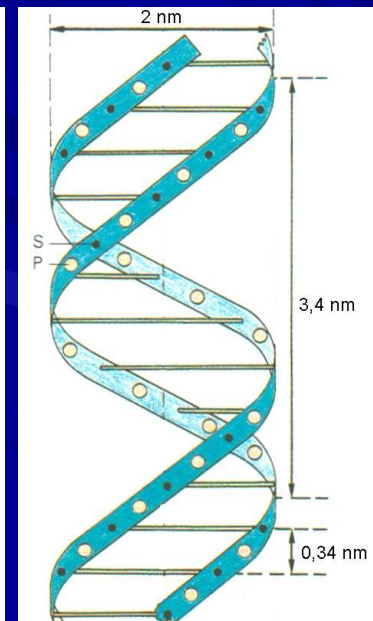
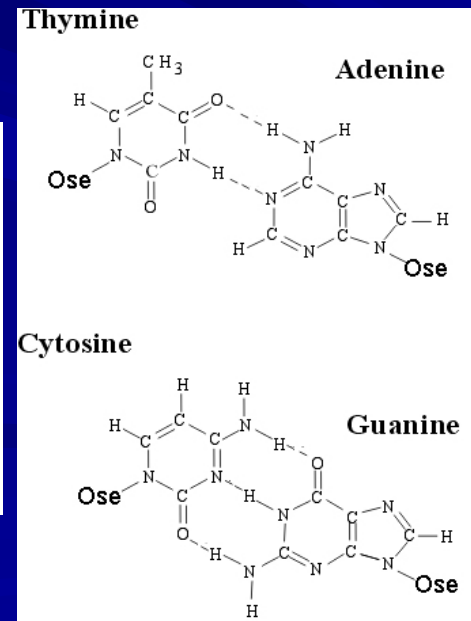
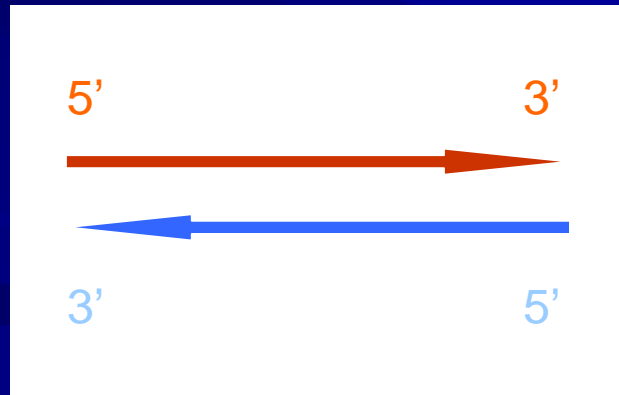


- Sens de lecture d'une chaîne de nucléotides : 5' → 3'

La structure des acides nucléiques

■ L'ADN : caractéristiques

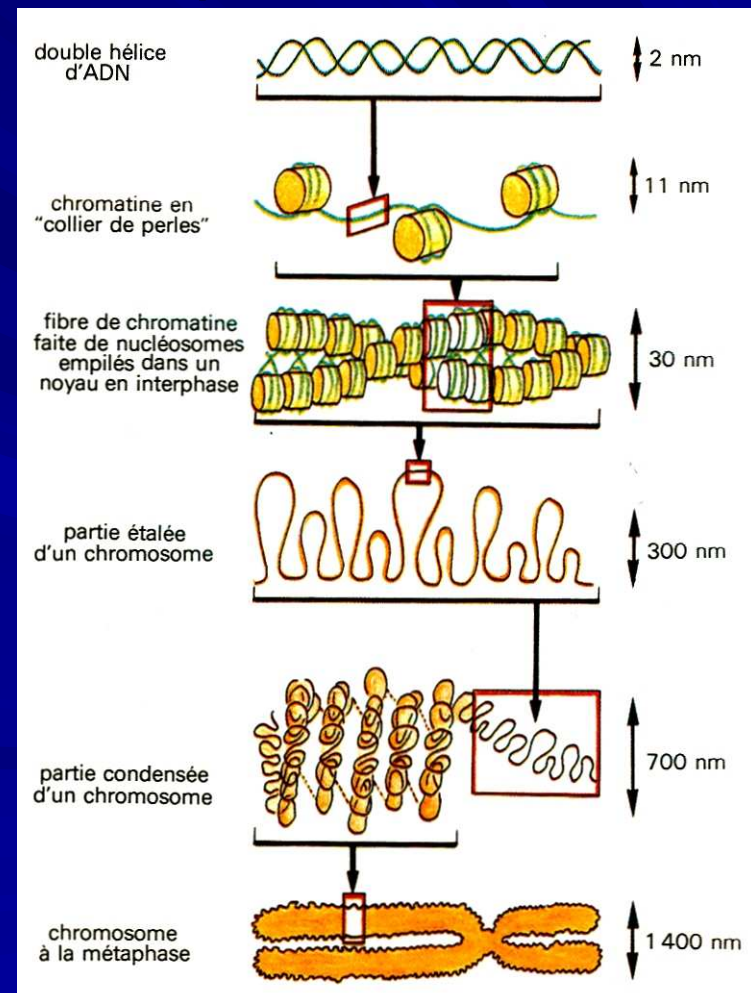
- Bases : A, T, C, et G
- Ose : désoxyribose
- Double chaîne : antiparallèle , complémentaire , hélicoïdale



La structure des acides nucléiques

■ L'ADN : propriétés physico-chimiques

- Dénaturation
- Absorption dans les UV
- Enroulement et compaction



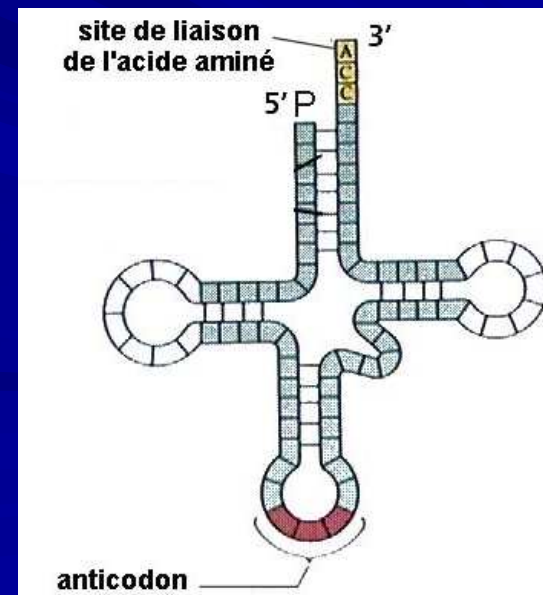
La structure des acides nucléiques

■ Les ARN : caractéristiques générales

- Bases : A, U, C, et G
- Ose : ribose
- Simple chaîne

■ Les principaux types d'ARN

- ARNr (ribosomique)
- ARNt (de transfert)
- ARNm (messager)



La réplication de l'ADN

■ Caractéristiques générales :

- Semi-conservative
- Bidirectionnelle
- Complémentaire et dans le sens 5' → 3'
- Discontinue

■ Éléments nécessaires :

- ADN matrice
- Amorces ARN
- Désoxyribonucléotides : dATP, dTTP, dCTP et dGTP
- Nombreuses enzymes
- Ions Mg^{2+}

La réplication de l'ADN

■ Les différentes étapes :

- Déroulement de la double hélice par l'ADN hélicase
- Stabilisation sous forme simple brin par les protéines SSB
- Synthèse d'amorces ARN par la primase
- Hybridation des amorces sur l'ADN
- Synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase
- Destruction des amorces ARN par la RNase H
- Réparation des lacunes par l'ADN polymérase
- Ligation des fragments d'ADN synthétisés par l'ADN ligase

La réplication de l'ADN

- Discontinuité de la réplication entre les deux brins d'ADN :
 - Brin avancé / brin retardé
 - Fragments d'Okazaki
- Réparation des erreurs de réplication

La Transcription de l'ADN en ARNm

■ Caractéristiques générales :

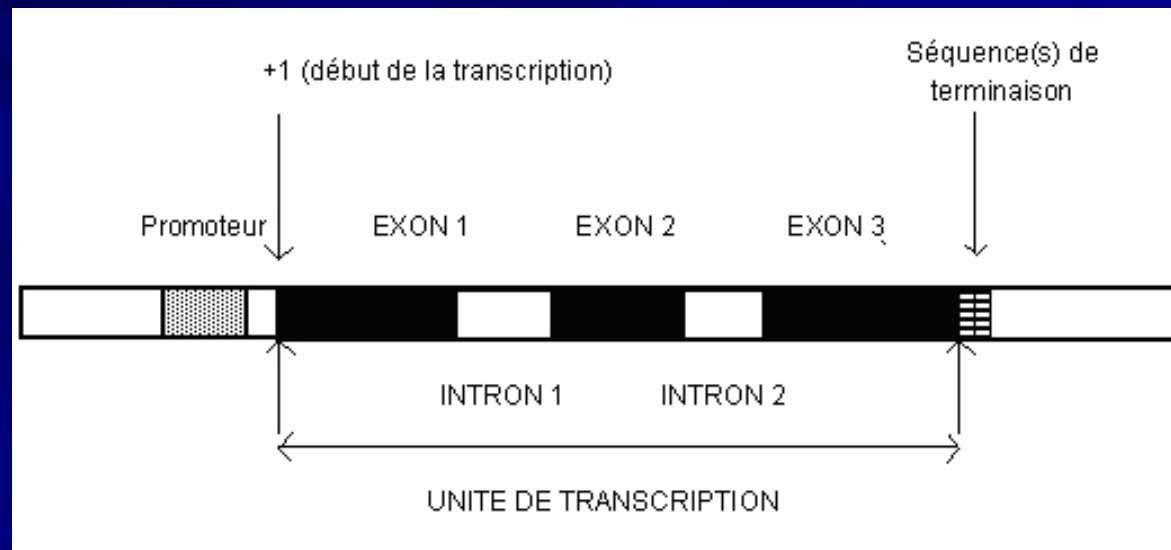
- dans le sens 5' → 3'
- Anti-parallèle
- complémentaire

■ Éléments nécessaires :

- ADN matrice
- Ribonucléotides : ATP, UTP, CTP et GTP
- ARN polymérase
- Ions Mg²⁺

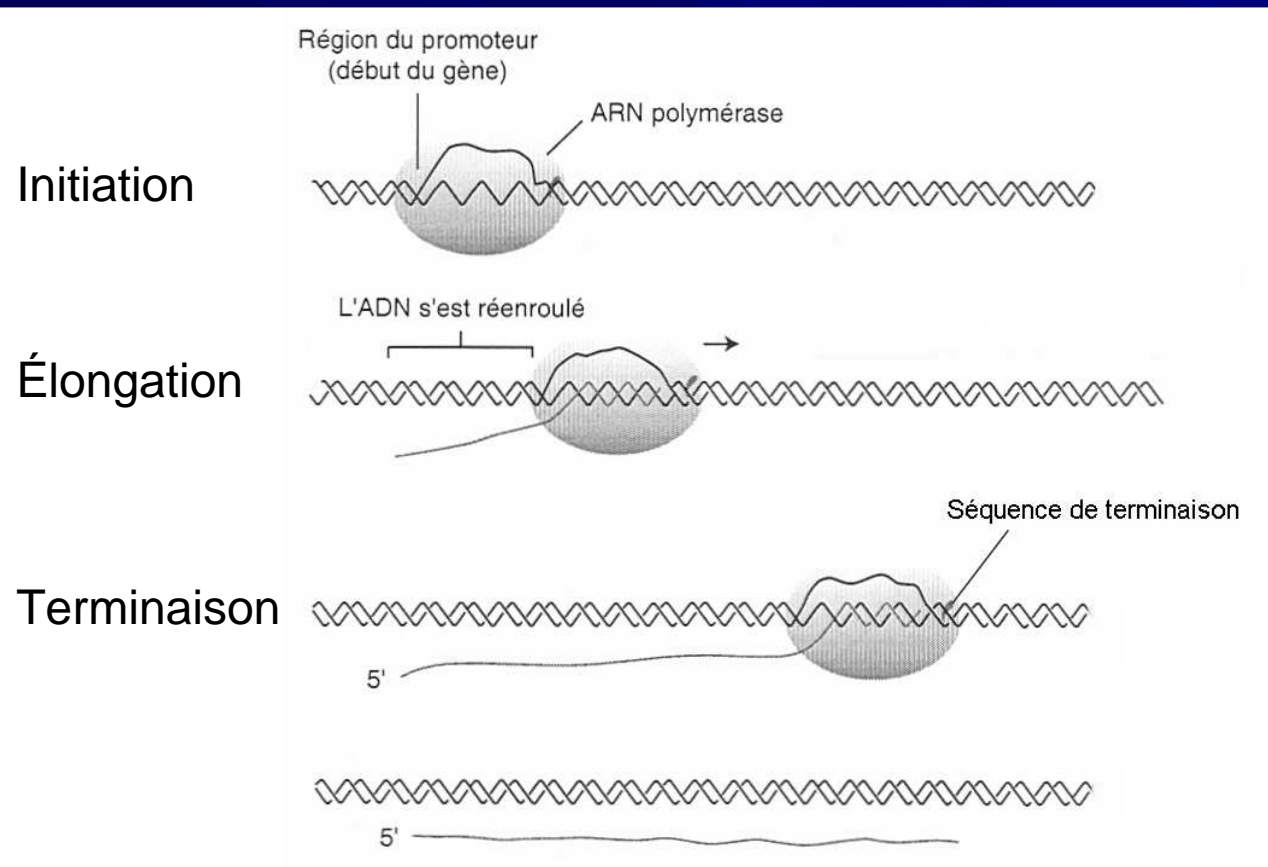
La Transcription de l'ADN en ARNm

■ L'unité de transcription



La Transcription de l'ADN en ARNm

■ Les différentes étapes :

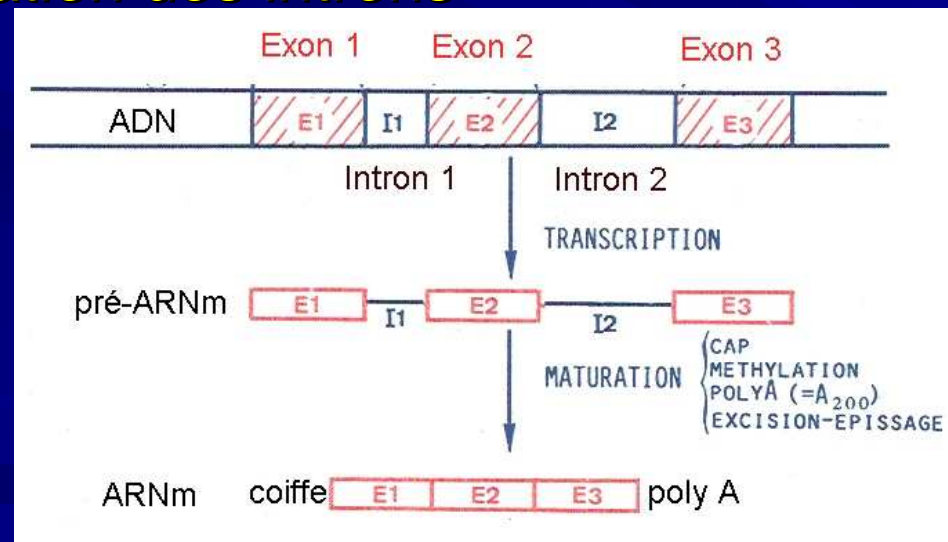


⇒ pré-ARNm

La Transcription de l'ADN en ARNm

■ La maturation

- Addition de la coiffe en 5'
- Addition de la queue polyA en 3'
- Élimination des introns

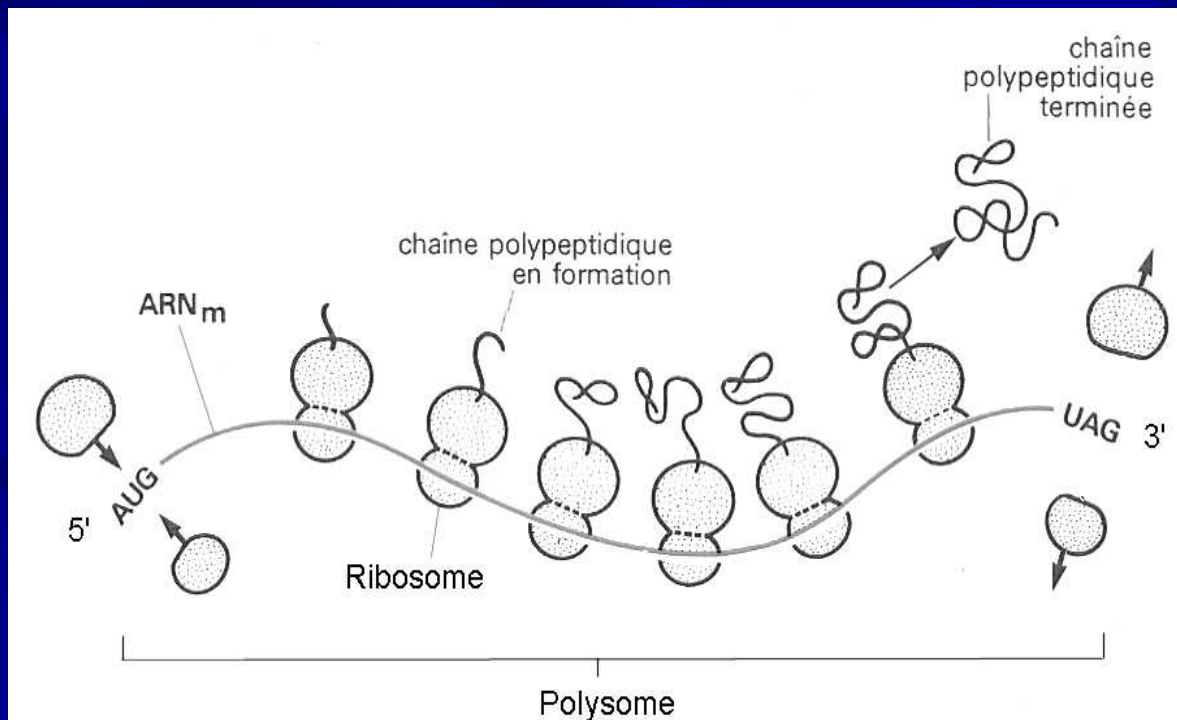


⇒ ARNm

La Traduction de l'ARNm en protéine

■ Caractéristiques générales :

- Déplacement des ribosomes sur l'ARNm dans le sens 5' → 3'
- Synthèse protéique de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale
- Polysomes :

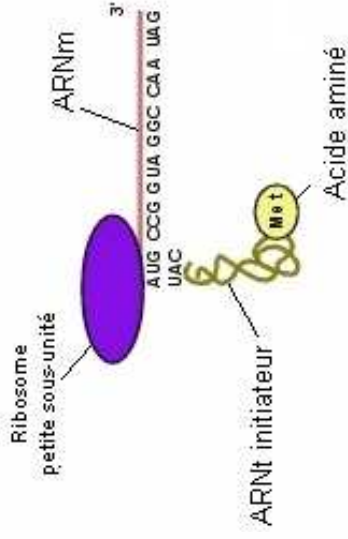


La Traduction de l'ARNm en protéine

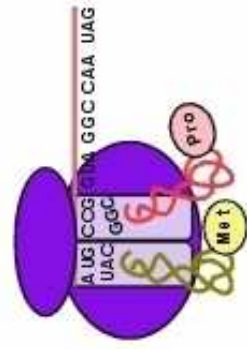
■ Éléments nécessaires :

- ARNm
- Ribosomes
- ARNt
- Acides aminés
- Enzyme aminoacyl-ARNt synthase

■ Les différentes étapes :

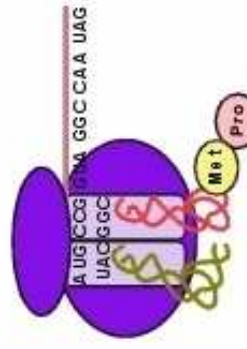


Initiation

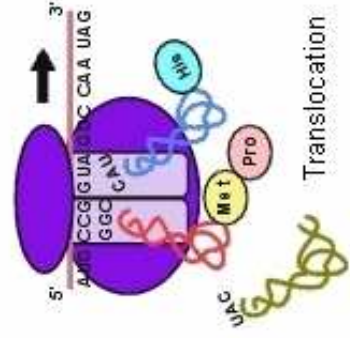


Elongation

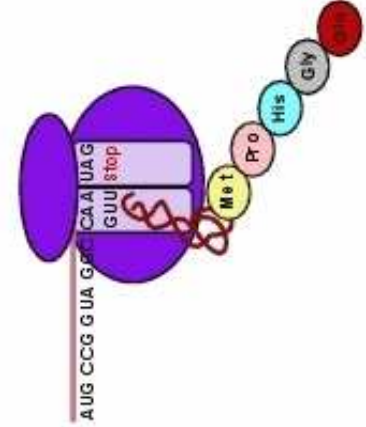
Accrochage du deuxième aminoacyl-ARNt



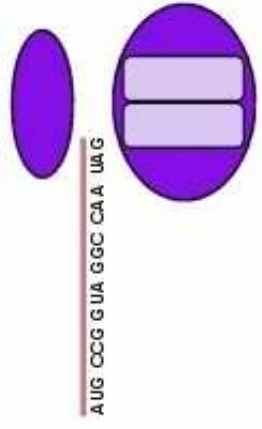
Formation liaison peptidique



Translocation



Termination



Polypeptide



La Traduction de l'ARNm en protéine

- Le code génétique
 - Code de 3 lettres, dégénéré

| 1ère base | 2ème base | | | | 3ème base |
|-----------|--|---|--|---|------------------|
| | U | C | A | G | |
| U | UUU } <i>Phe</i> UUC } UUA } <i>Leu</i> UUG } | UCU } UCC } <i>Ser</i> UCA } UCG } | UAU } <i>Tyr</i> UAC } UAA } Stop UAG } Stop | UGU } <i>Cys</i> UGC } UGA } Stop UGG } <i>Trp</i> | U C A G |
| C | CUU } CUC } <i>Leu</i> CUA } CUG } | CCU } CCC } <i>Pro</i> CCA } CCG } | CAU } <i>His</i> CAC } CAA } <i>Gln</i> CAG } | CGU } <i>Arg</i> CGC } CGA } CGG } | U C A G |
| A | AUU } AUC } <i>Ile</i> AUA } AUG } <i>Met</i> | ACU } ACC } <i>Thr</i> ACA } ACG } | AAU } <i>Asn</i> AAC } AAA } <i>Lys</i> AAG } | AGU } <i>Ser</i> AGC } AGA } <i>Arg</i> AGG } | U C A G |
| G | GUU } GUC } <i>Val</i> GUA } GUG } | GCU } GCC } <i>Ala</i> GCA } GCG } | GAU } <i>Asp</i> GAC } GAA } <i>Glu</i> GAG } | GGU } <i>Gly</i> GGC } GGA } GGG } | U C A G |

La Traduction de l'ARNm en protéine

■ Le code génétique

- Universel
- Cadre de lecture

Si on considère par exemple la séquence suivante d'un ARNm :

ACG ACG ACG ACG ACG ACG ACG ACG ...

Les trois cadres de lecture possibles (en rouge) sont :

ACG ACG ACG ACG ACG ACG ACG ACG ...

A CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA ...

AC GAC GAC GAC GAC GAC GAC GAC GAC ...

Le polymorphisme de l'ADN

■ Remaniements chromosomiques

- Translocations
- Inversions
- Fusions
- Délétions
- insertions

■ Mutations ponctuelles

- Substitutions : transitions et transversions
- Délétions
- insertions

■ Séquences répétées en tandem

Le polymorphisme de l'ADN

■ Mécanismes générant du polymorphisme

- Erreurs de réparation
- Recombinaisons inégales
- Conversion génique
- Insertions de séquences mobiles
- Glissement intra-chromatidien

Les outils et techniques de la biologie moléculaire

Outils : les enzymes

- Enzymes de restriction
 - Endonucléases
 - Site de restriction (palindrome)
 - Coupure à bouts francs ou cohésifs
- Enzyme de digestion autres que les enzymes de restriction
 - Exonucléases
 - Endonucléases
- Polymérase
- Ligases

Outils : les amorces et les sondes

- Courtes séquences d'ADN (15 à 30 nucléotides)
- Complémentaires de certaines régions d'ADN
- Utilisation :
 - Amorces marquées ou non : PCR
 - Sondes marquées : identification de séquences d'ADN

Outils : les vecteurs et les cellules hôtes

■ Vecteur

- ADN circulaire
- Autoréplication dans les cellules hôtes
- Insertion d'ADN exogène
- Gènes de sélection

■ Cellules hôtes

- Microorganismes
- Compétentes

Techniques : extraction-purification d'ADN

- Isolement de l'ADN (qualité et quantité)
- 2 étapes :
 - Extraction (digestion des tissus et lyse des cellules)
 - Purification (séparation de l'ADN des autres constituants cellulaires)
- Plusieurs techniques :
 - Phénol/chloroforme
 - Kit Qiagen
 - Kit Puregene

Techniques : extraction-purification d'ADN

■ Comparatif des différentes méthodes de purification

1 : la moins bonne, 3 : la meilleure

| | Phénol chloroforme | Kit <u>Puregene</u> | Kit <u>Qiagen</u> |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Quantité/rendement | 2 | 3 | 1 |
| Pureté de l'extrait | 3 | 1 | 2 |
| Rapidité | 1 | 2 | 3 |
| Coût | 3 | 2 | 1 |
| Sécurité du manipulateur | 1 | 3 | 3 |

Techniques : migration sur gel et visualisation de l'ADN

■ Migration électrophorétique

- Séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille
- Résolution des gels : agarose et acrylamide

■ Visualisation

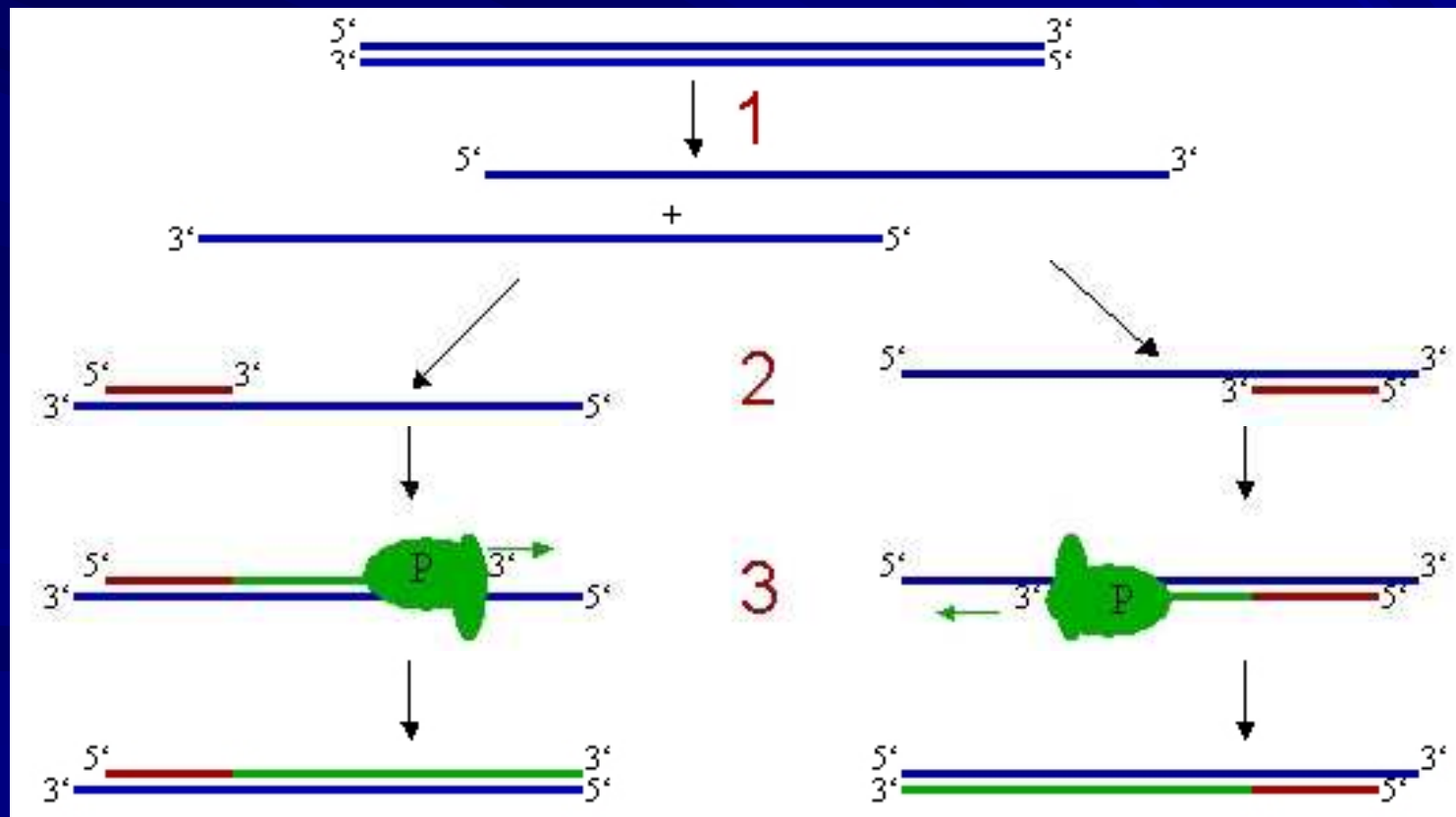
- Détermination de la taille des fragments d'ADN
- Évaluation de la quantité d'ADN
- Évaluation de la qualité d'ADN

Techniques : PCR

- Réaction de polymérisation en chaîne
 - Basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN
 - Polymérase thermostable
 - Nécessité de connaître les régions flanquantes
 - Répétition de cycles : amplification exponentielle

Techniques : PCR

1. Dénaturation de l'ADN
2. Hybridation des amorces sur l'ADN
3. Elongation des brins complémentaires



Techniques : PCR

■ Les principaux types de PCR

- Hot Start PCR
- Touch Down PCR
- Touch Up PCR

■ Optimisation

- Optimisation Mg^{2+}
- Optimisation température d'hybridation des amorces
- Optimisation du nombre de cycle
- Ajout d'adjuvants

Techniques : PCR

■ Règles d'optimisation

– Si l'amplification donne trop de bandes :

- diminuez la concentration en Mg^{2+} ;
- diminuez légèrement le nombre de cycle;
- augmentez la température d'hybridation des amorces (max $62^{\circ}C$);
- faites une Touch Down PCR.

– Si l'amplification est trop faible :

- augmentez la concentration en Mg^{2+} ;
- augmentez légèrement le nombre de cycle;
- diminuez la température d'hybridation des amorces (min $45^{\circ}C$);
- faites une Touch Up PCR.

Techniques : PCR-RFLP

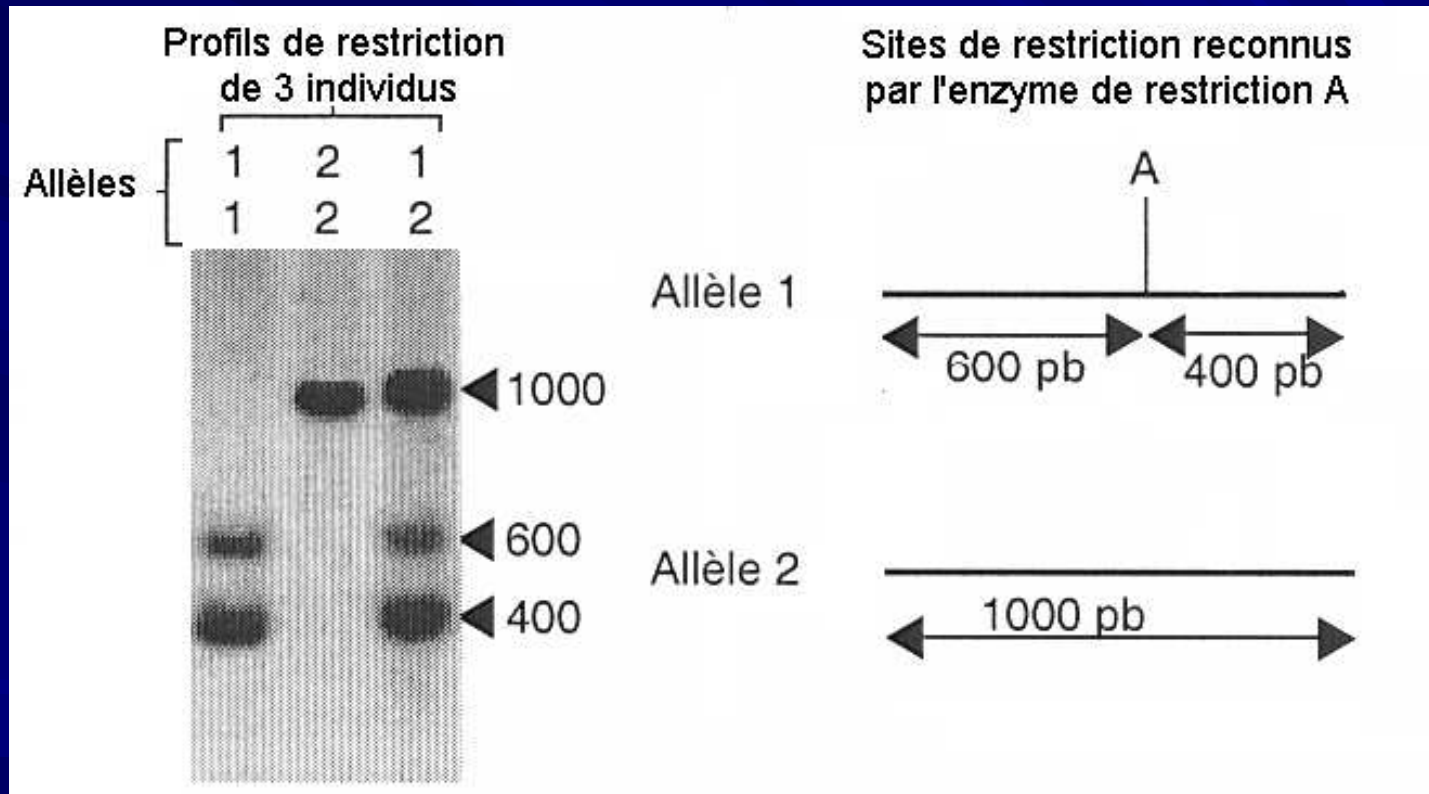
■ Polymorphisme de longueur de fragments de restriction sur une PCR

- Polymorphisme de restriction
- Région identifiée
- Marqueur co-dominant

■ Principe :

- Digestion de produits PCR par une enzyme de restriction
- Migration sur gel d'agarose
- Révélation des bandes

Techniques : PCR-RFLP

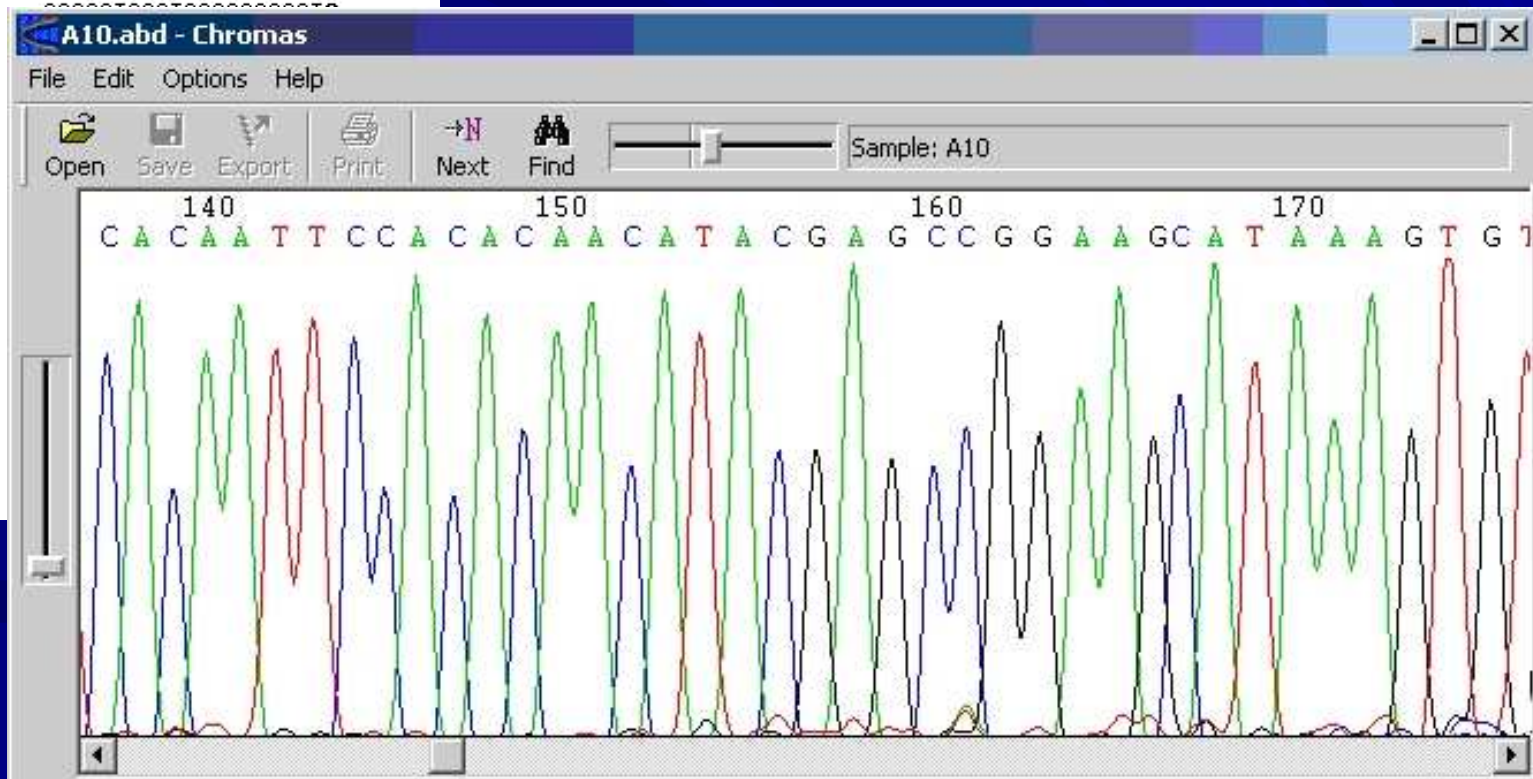
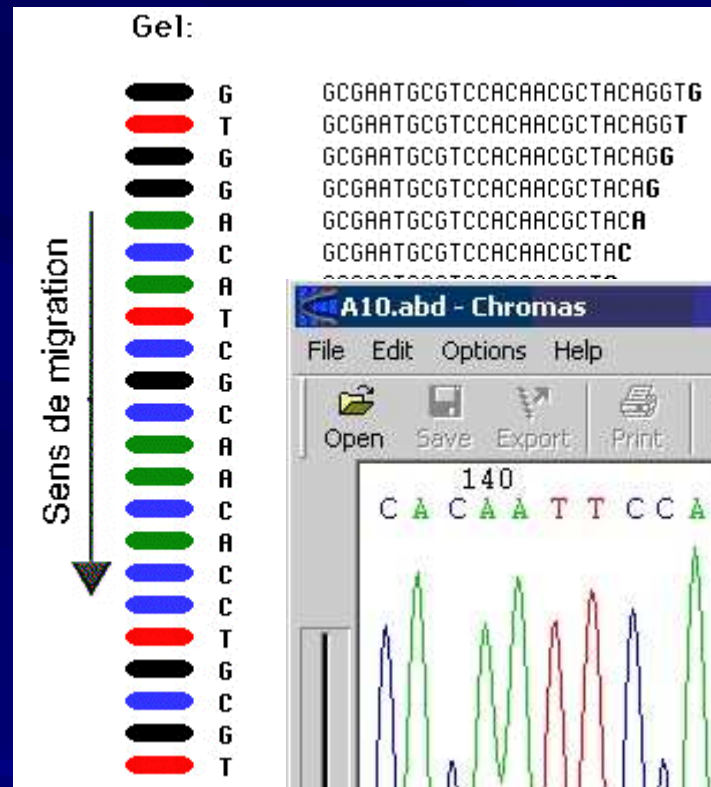


Techniques : séquençage

■ Principe :

- Amplification par PCR particulière :
 - ADN matrice = fragment amplifié par PCR
 - Une seule amorce par réaction
 - Nucléotides = dNTP + ddNTP fluorescents
- Migration sur gel d'acrylamide
- Visualisation à l'aide d'un laser

Techniques : séquençage



Techniques : génotypage microsatellites

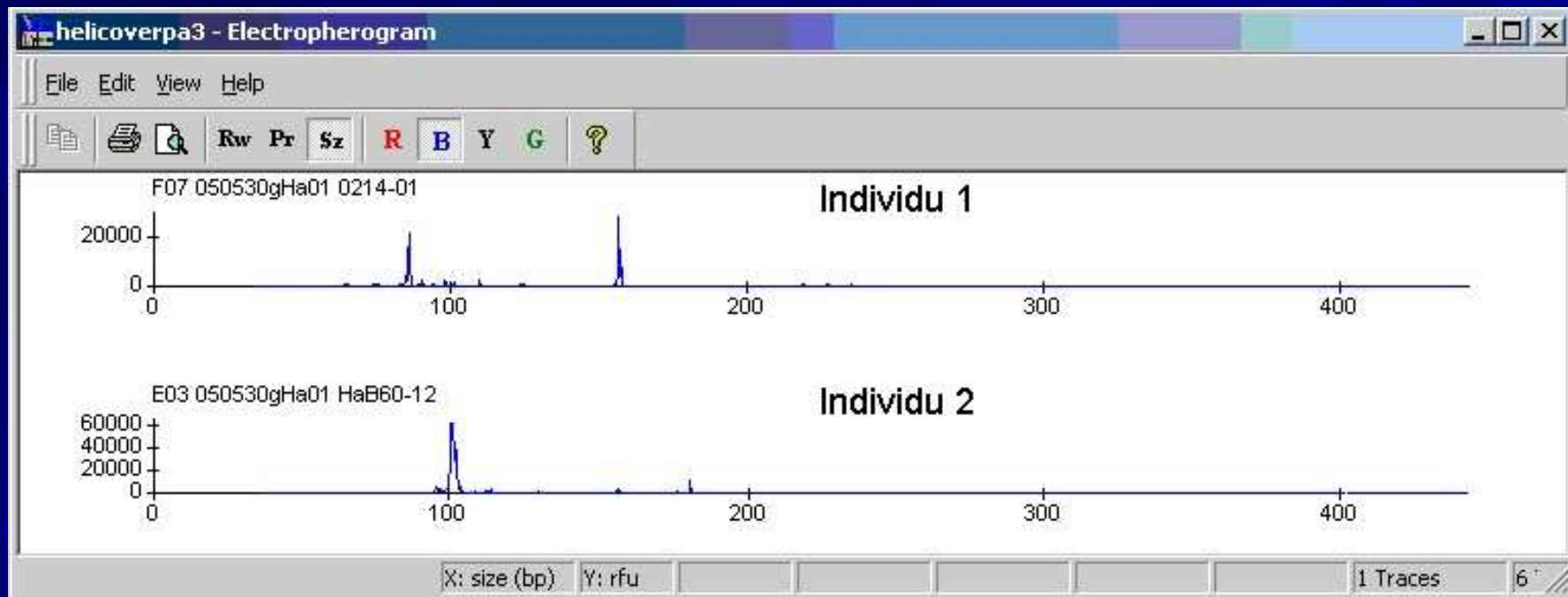
■ Répétitions en tandem de courts motifs

- polymorphisme de longueur
- Régions identifiées
- Marqueur co-dominant

■ Principe :

- Amplification par PCR
- Migration sur gel d'acrylamide
- Visualisation des fragments amplifiés

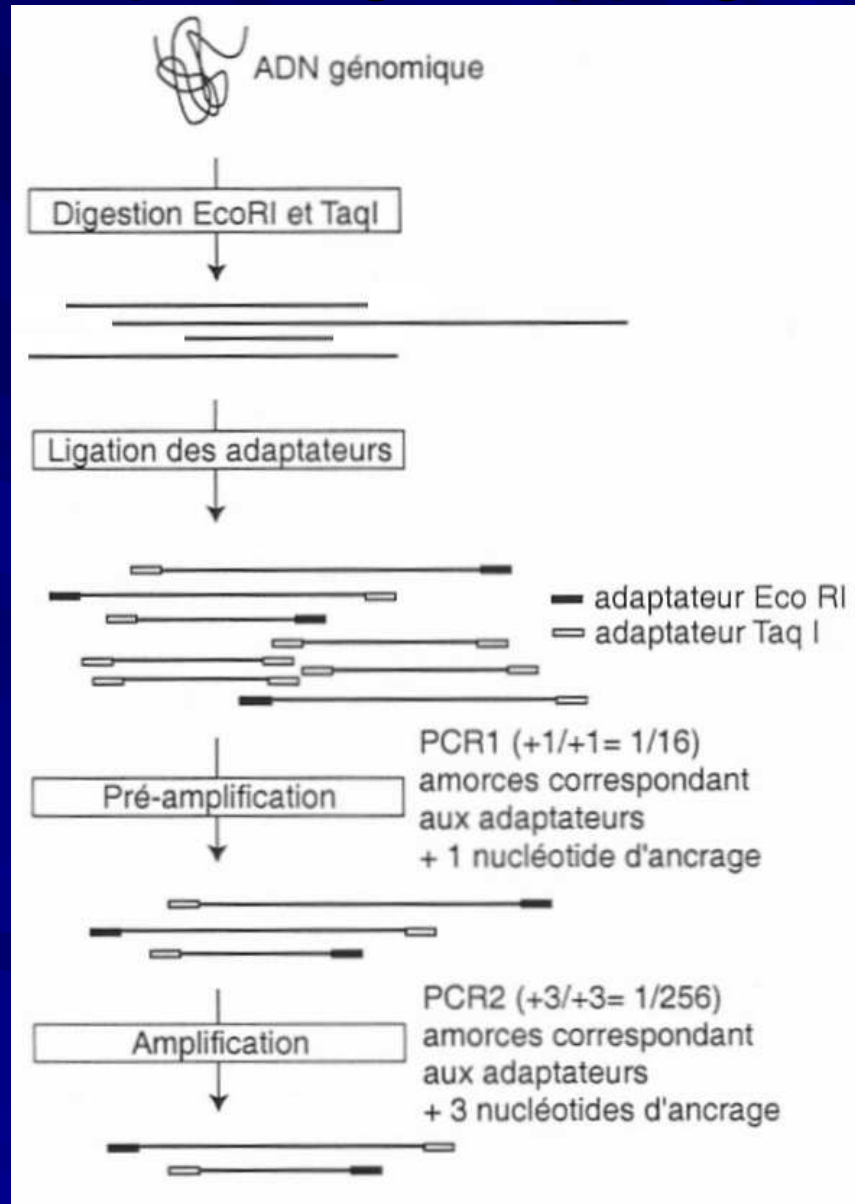
Techniques : génotypage microsatellites



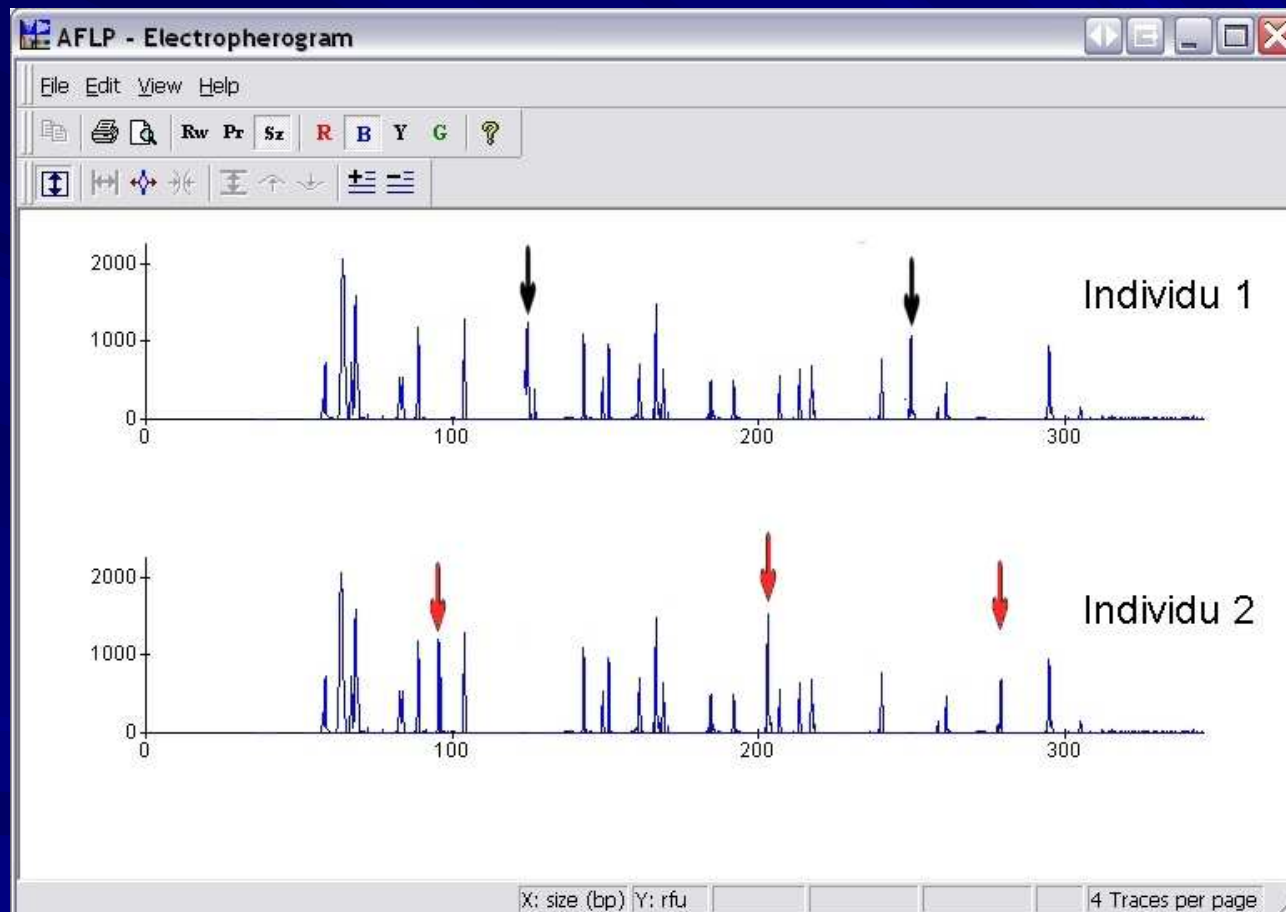
Techniques : génotypage AFLP

- Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés
 - polymorphisme de restriction
 - Génome total, régions inconnues
 - Marqueur dominant
- Principe :
 - Digestion de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction
 - Ligation d'adaptateurs
 - Amplifications par PCR
 - Migration sur gel d'acrylamide
 - Visualisation des fragments amplifiés

Techniques : génotypage AFLP



Techniques : génotypage AFLP



Technique : génotypage SSCP

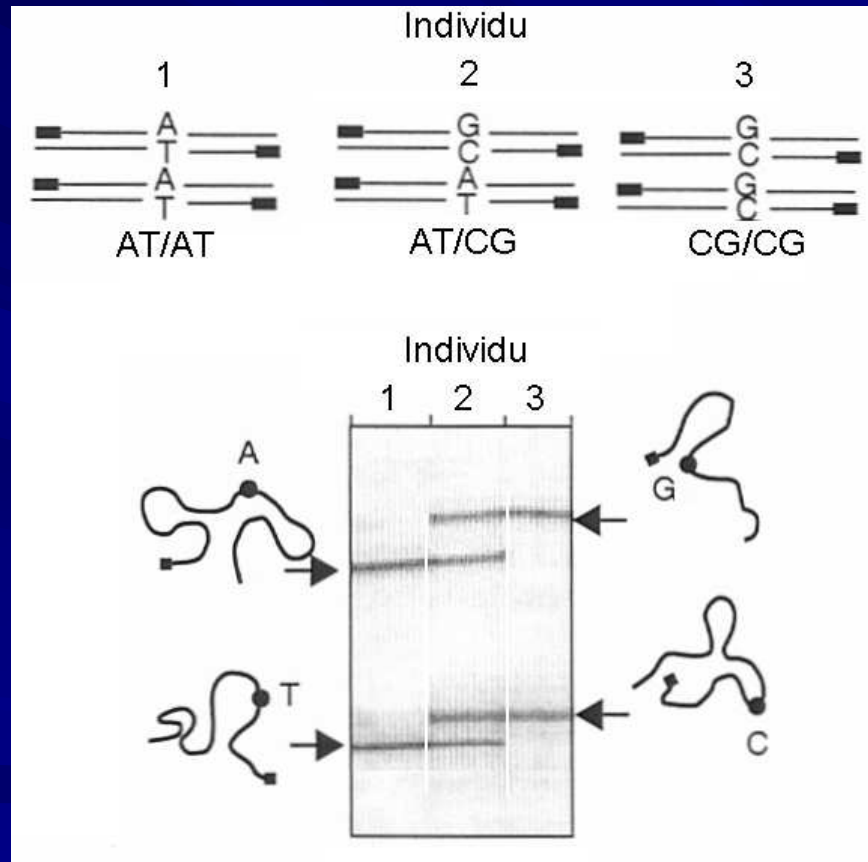
■ Polymorphisme de conformation simple brin

- La conformation 3D de l'ADN dépend de sa composition en bases
- Détection de mutations ponctuelles
- Marqueur co-dominant

■ Principe :

- Amplification par PCR d'une région d'ADN contenant une ou plusieurs mutations ponctuelles
- Migration sur gel d'acrylamide
- Visualisation des fragments amplifiés

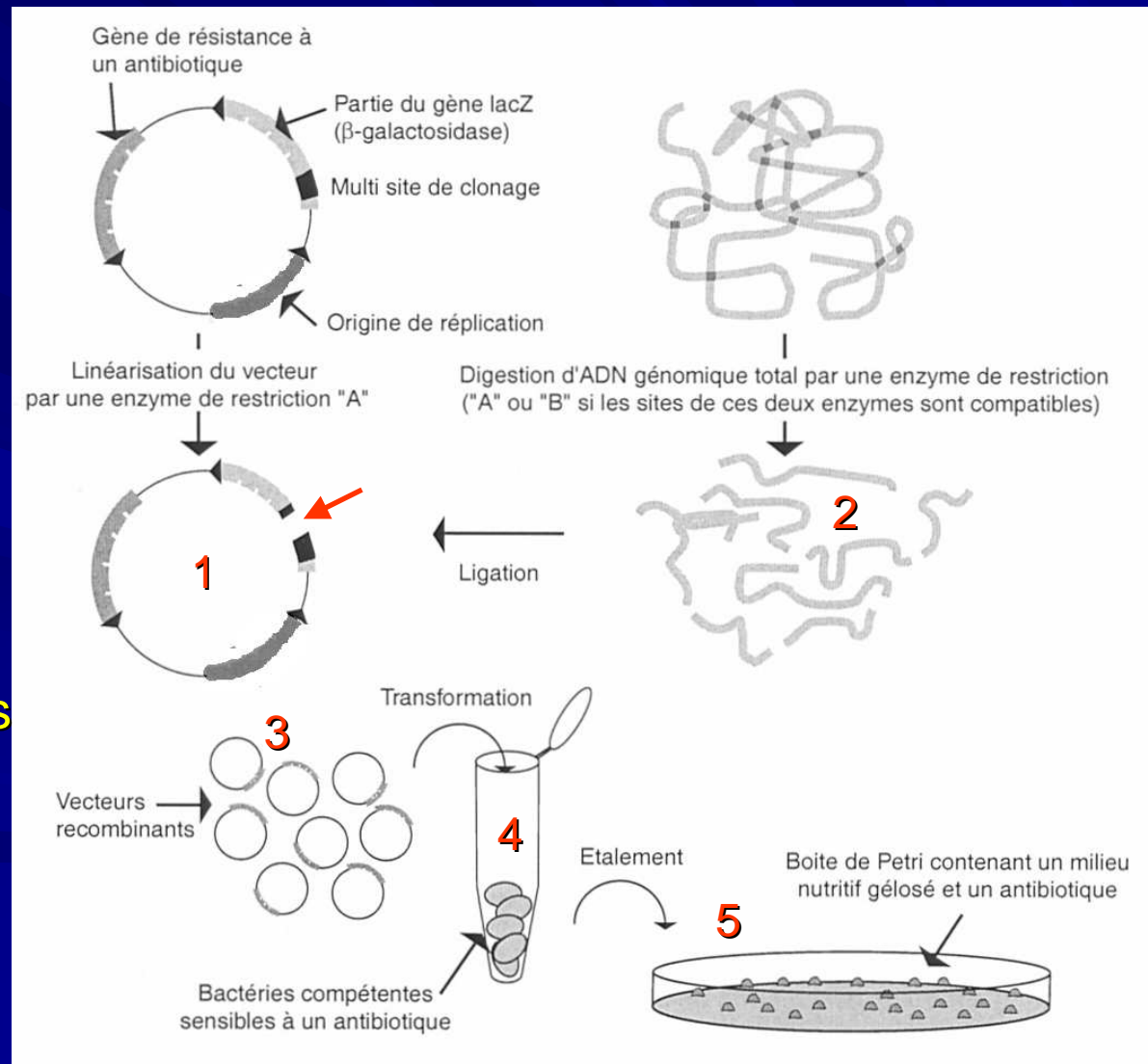
Techniques : génotypage SSCP



Techniques : clonage

■ Création d'une banque d'ADN génomique :

- Digestion du vecteur
- Digestion de l'ADN génomique
- Ligation des fragments dans les vecteurs
- Transformation des bactéries
- Isolement des différents clones cellulaires
- Sélection des clones ayant incorporés un fragment d'ADN génomique



Techniques : clonage

■ Recherche des fragments d'intérêt :

- Transfert sur membrane
- Éclatement des bactéries
- Fixation de l'ADN
- Hybridation d'une sonde marquée
- Révélation
- Récupération des bactéries et mise en culture
- Séquençage

