

Université de Jijel

**Cours de Biologie Moléculaire et Génie Génétique
Pour les étudiants en Licence Microbiologie**

Pr. Mohamed Sifour
Université de Jijel
2024-2025

Contenu de la matière

Partie I : Biologie moléculaire :

1. Expression de l'information génétique: synthèse protéique (Transcription, Traduction).

2. Régulation de l'expression génique : Régulation transcriptionnelle, Régulation traductionnelle.

3. Techniques de base de la biologie moléculaire :

- préparation des acides nucléiques (extraction et purification)
- séparations des acides nucléiques (électrophorèse sur gel d'agarose, en champ pulsé,.....).
- détection, caractérisation et identification des acides nucléiques (transfert sur membrane, marquage, hybridation...).
- Le séquençage de l'ADN.
- amplification in vitro des acides nucléiques (PCR, RT (reverse-transcriptase)-PCR ...).

Partie II : génie génétique : ***1. clonage in vivo :*** ***1.1. Éléments nécessaires au clonage :*** l'ADN à cloner, enzymes de restriction, enzymes de ligation, les vecteurs de clonage, leur construction et leurs caractéristiques, les cellules hôte. ***1.2. Les étapes du clonage :*** construction du vecteur, insertion de l'ADN à cloner, transformation des bactéries, sélection des recombinants, analyse des recombinants. ***2. Technologie de l'ADN recombinant :*** Synthèse de protéines recombinantes, ADNc et vecteurs d'expression. Exemple de production de protéines par *E. coli* et par *Saccharomyces cerevisiae*.

Sommaire

Partie I : Biologie moléculaire

1- Rappel

1-1- Structure et fonction des gènes

1-1-1- Structure des acides nucléiques (ADN et ARN)

1-1-2- Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

1-1-3- L'organisation de l'ADN dans les cellules

1-1-4- Structure de gènes

1-2- La réplication de l'ADN

1-2-1- La réplication chez les procaryotes

1-2-2- La réplication chez les eucaryotes

1-3- Réparation de l'ADN

2- Expression de l'information génétique

2-1- Le code génétique

2-2- La transcription

2-2-1- La transcription chez les procaryotes

2-2-2- La transcription chez les eucaryotes

2-3- La traduction

2-3-1- ARN de transfert

2-3-2- Les ribosomes et ARN ribosomaux

2-3-3- Les étapes de la traduction

2-3-4- Les modifications post-traductionnelles

3- Régulation de l'expression des gènes

3-1- Régulation chez les procaryotes

3-2- Régulation chez les eucaryotes

4. Techniques de base de la biologie moléculaire :

3-1 Outils et techniques de la biologie moléculaire

3-2- Synthèse d'oligonucléotides, Les enzymes de la biologie moléculaire, vecteurs de clonage ...

3-3- Electrophorèse, PCR, Hybridation et sondes nucléiques, Séquençage de l'ADN ...

Partie II : génie génétique

1- Génie génétique (définition, historique...)

2- Les banques d'ADN

3- Clonage (transformation, criblage, clonage dans les cellules eucaryotes, expression des gènes dans les cellules procaryotes et eucaryotes)

4- les applications du génie génétique

3- La régulation de l'expression des gènes

La quantité des protéines synthétisées par une cellule ne sont pas nécessairement fixes mais varient en fonction des besoins de la cellule.

Afin de conserver l'énergie et de ressources, les cellules règlent l'activité de leurs gènes de façon que seuls les produits génétiques nécessaires à leur fonctionnement soient fabriqués.

Ex: La bactérie ne synthétise des métabolites (AA) que lorsqu'elle ne peut les prélever du milieu.

a- Enzymes constitutives : La synthèse et l'activité de ces enzymes ne subit pas de contrôle, car elles sont nécessaires en quantités égales quelle que soit les conditions de croissance.

b- Enzymes inductibles (adaptatives): Ces enzymes sont produites uniquement en présence du substrat (exemple: la bêta-galactosidase).

3-1- La régulation chez les procaryotes

L'organisation des gènes chez les bactéries se fait suivant des opérons.

C'est sur ce type que les premières études de la régulation ont été menées.

L'opéron Lactose : regroupe trois gènes (*lac Z*, *lac Y* et *lac A*) codant pour enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose par la bactérie (*E. coli*)

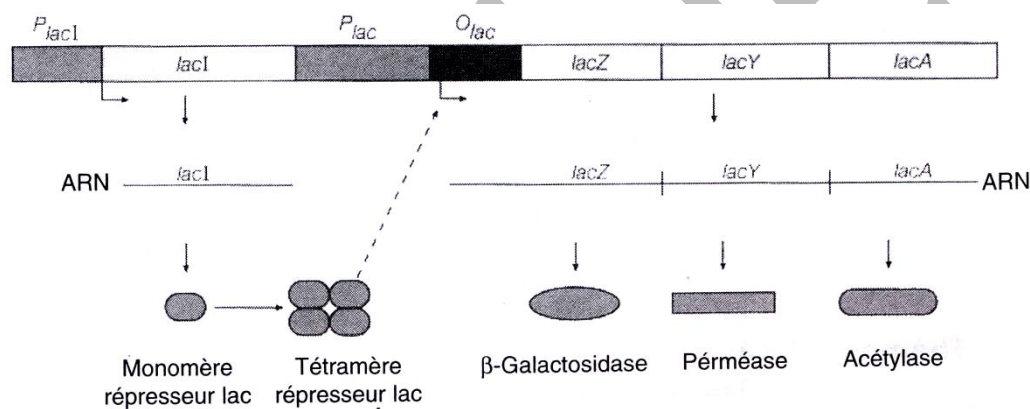


Figure 21: Structure de l'opéron du lactose

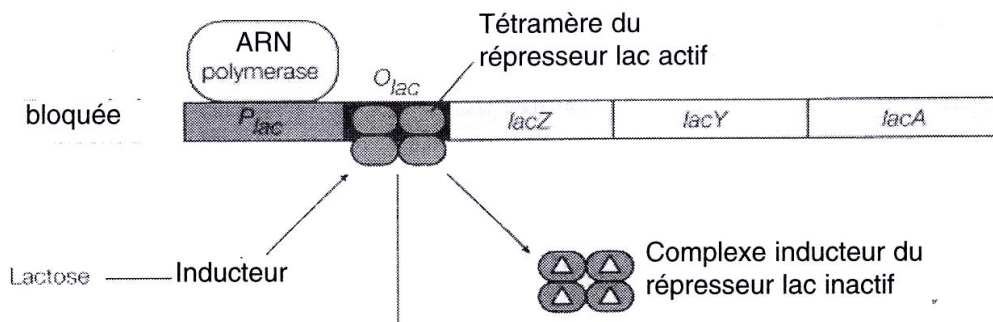
➤ Les trois gènes de structure:

- *lac Z* code une β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose
- *lac Y* code une perméase permettant au lactose de pénétrer dans la cellule
- *lac A* code une acétylase
- Un promoteur P (unique pour les trois gènes)
- Un opérateur O (élément de contrôle de la transcription)
- Gène régulateur *lac I* (en amont du promoteur): codant pour le répresseur qui règle l'expression des gènes *lac Z*, *lac Y* et *lac A*.

- En l'absence de lactose:

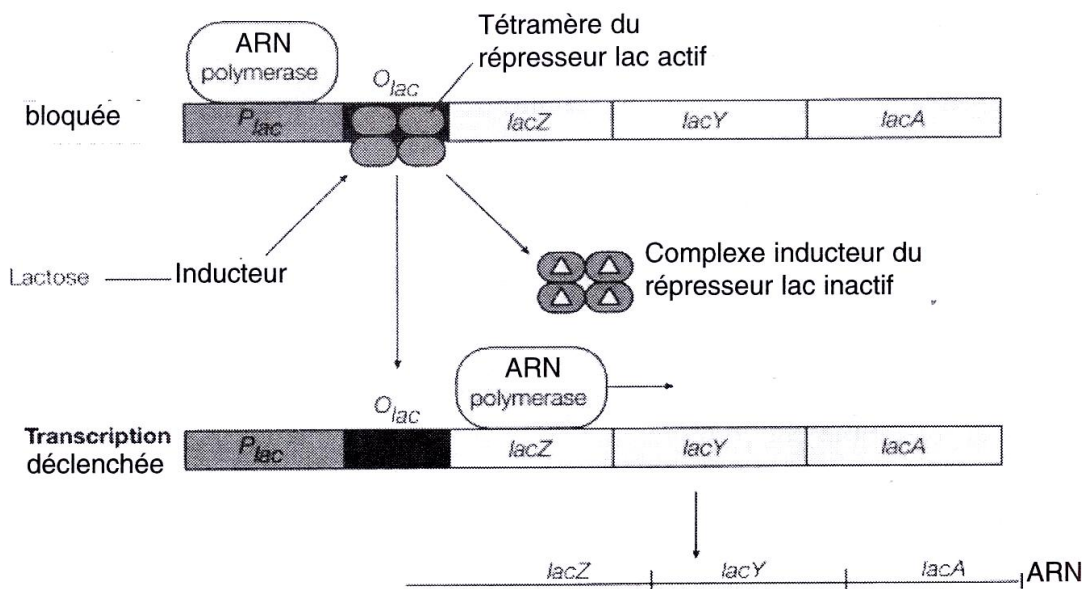
Le promoteur de *lac I* permet la transcription du gène *lac I*, donc la synthèse du répresseur (*lac*) et formation de tétramère *lac*.

Fixation du répresseur la région opératrice *O lac* et blocage de la transcription des gènes de structure (empêcher la fixation de l'ARN Polymérase au site d'initiation de la transcription). Ainsi, il y a régulation négative de la transcription des gènes de l'opéron lactose. Les enzymes nécessaires au métabolisme du lactose ne sont pas synthétisées car inutiles en absence de lactose.



En présence de Lactose :

- Le gène régulateur continue de synthétiser la protéine répresseur,
- Le répresseur va s'associer au lactose présent dans le milieu
- Changement de conformation, donc le répresseur n'est plus capable de se fixer à l'opérateur.
- L'ARN polymérase peut alors se fixer sur le promoteur et transcrire les trois gènes de structure qui donneront les trois enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose par les bactéries.
- On peut dire que le système de régulation de la voie de dégradation du lactose est inductible



Répression catabolique, régulation positive

C'est un mécanisme supplémentaire de régulation du métabolisme qui permet à l'opéron lac de tenir compte de la présence de glucose. S'il y a à la fois du lactose et du glucose, les cellules utilisent le glucose en premier et ne dépensent ainsi pas d'énergie à découper le lactose en ces sources constitutifs. La présence de glucose dans la cellule éteint l'opéron par un mécanisme appelé répression catabolique qui met en jeu une protéine régulatrice appelée la protéine régulatrice du catabolisme (CAP).

La CAP augmente la transcription de l'opéron en présence de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique, un dérivé de l'ATP). Quand la concentration du glucose est faible, l'AMPc devient abondant, se fixe à la CAP et active ainsi l'opéron lactose. Le complexe AMPc-CAP se fixe sur le promoteur et active la transcription de l'opéron en favorisant un meilleur attachement de l'ARN polymérase au promoteur.

Model de l'opéron tryptophane

L'opéron *trp* est précédé par une séquence leader (L) codant un peptide de 14 acides aminés dont deux tryptophanes adjacents. Cette séquence présente des zones pouvant s'apparier deux à deux (zones 1 à 4).

Lorsque la concentration en tryptophane dans le milieu est élevée, le segment 3 transcrit s'apparie avec le segment 4, formant une épingle à cheveux qui provoque la dissociation de l'ARN polymérase et la terminaison de la transcription.

Lorsque la concentration en tryptophane est faible, les ribosomes marquent une pause sur la région 1. Le segment 2 peut alors s'apparier au segment 3, l'empêchant d'interagir avec le segment 4. L'épingle à cheveux formée n'est plus suffisamment stable pour arrêter l'ARN polymérase, et la transcription se poursuit.

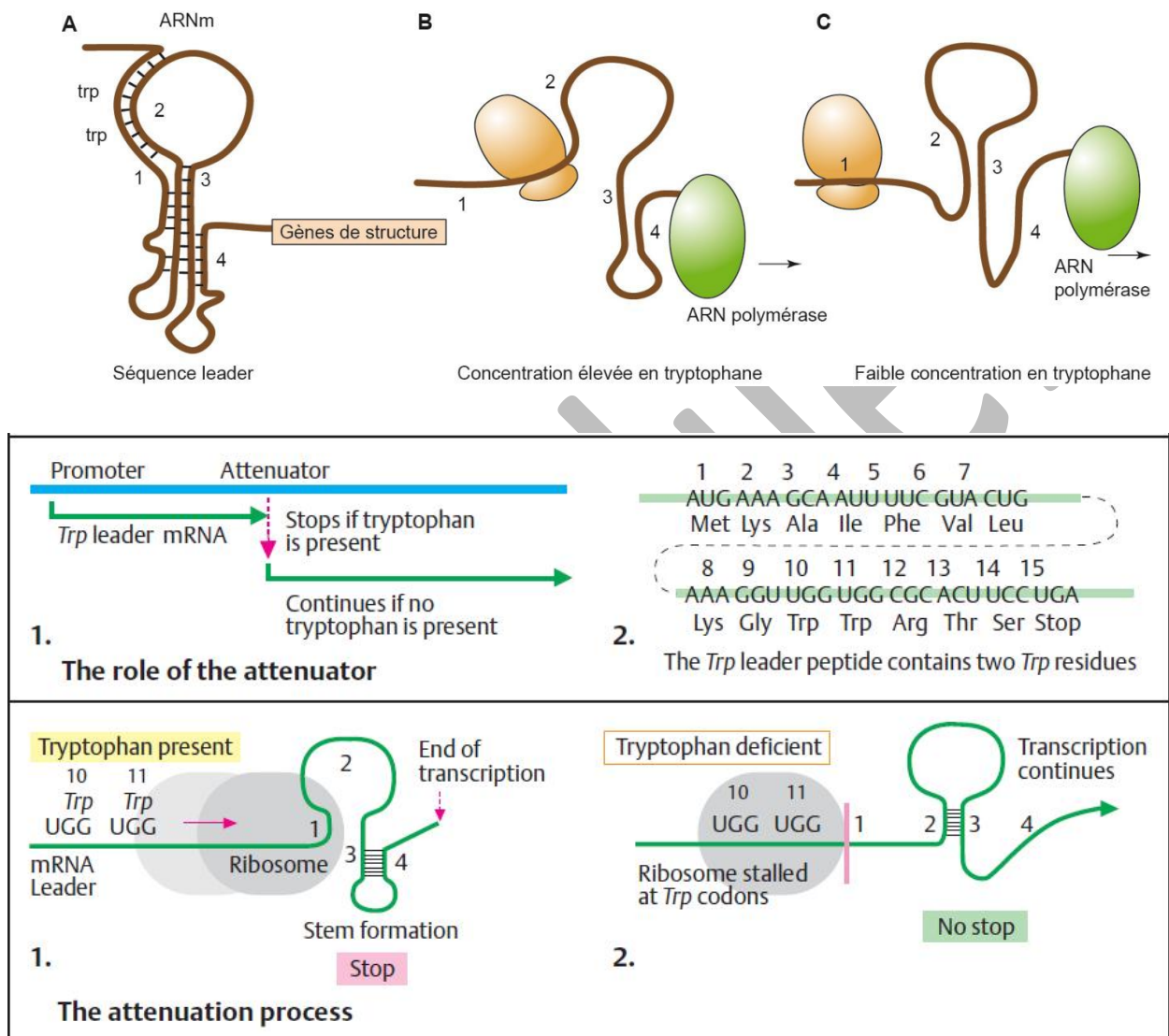


Figure 24 : Processus de l'atténuation de l'opéron tryptophane d'*E. coli*.

Régulation par des facteurs sigma alternatifs

Les bactéries, dont *E. coli*, fabriquent différents facteurs sigma (de l'ARN polymérase responsable de l'initiation de la transcription) alternatifs, qui reconnaissent des ensembles différents de promoteurs et font que l'ARN polymérase transcrit différents ensembles de gènes. Ceci est utilisé comme un moyen pour réguler l'expression des gènes lorsque les conditions environnementales dictent des modifications majeures dans l'expression des gènes.

Dans les conditions normales, le facteur sigma σ^{70} dirige l'activité de l'ARN polymérase (chez *E. coli*).

- Choc thermique: lorsqu'elle est exposée à une température élevée, *E. coli* transcrit un ensemble de 17 protéines qui aident la cellule à s'adapter aux nouvelles conditions environnementales. Un facteur sigma alternatif, σ^{32} , est produit et il reconnaît les promoteurs des gènes du choc thermique (heat shock proteins). σ^H (σ^{32}).
- Sporulation chez *Bacillus subtilis*: un des exemples les mieux étudiés de régulation par le facteur sigma. Cette bactérie produit des spores en réponse à des conditions environnementales défavorables. La sporulation requiert des changements drastiques dans l'expression des gènes qui impliquent d'arrêter la plupart des synthèses protéiques lorsque la spore germera. *B. subtilis* réalise ces modifications en utilisant des facteurs alternatifs. Normalement, l'ARN polymérase de *B. subtilis* emploie le facteur sigma σ^A (σ^{43}) pour reconnaître les gènes. La sporulation commence lorsque σ^F remplace partiellement σ^A dans la préspore. La sporulation est régulée par deux cascades de facteurs sigma (pro- σ^E , σ^E , pro- σ^K , σ^K).

La régulation par l'ARN antisens

L'activité de certains gènes est contrôlée par une espèce de petites molécules régulatrices d'ARN (ARN antisens). Ces ARN régulateurs ont une séquence en bases complémentaire à un segment d'une autre molécule d'ARN et se lient spécifiquement à cet ARN cible. La liaison d'un ARN antisens peut bloquer la réplication de l'ADN, la synthèse d'ARNm ou la traduction. Par exemple, elle aide à contrôler le niveau des porines (protéines formant des canaux au travers de la membrane externe de la paroi des bactéries. Ces canaux permettent le passage de petites molécules).

3-2- La régulation chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, l'ARNm est toujours monocistronique est assure donc la biosynthèse d'une seule chaîne polypeptidique. Le profil d'expression des gènes eucaryotes détermine les caractéristiques d'une cellule et son rôle dans l'organisme.

Régulation au niveau de la chromatine

La transcription ne peut pas avoir lieu lorsque la chromatine est sous forme d'hétérochromatine. Cette structure compacte est maintenue par les histones des nucléosomes. Les histones sont des protéines basiques dimériques qui sont presque inchangées au cours de l'évolution. Ils possèdent une queue, celle-ci peut être acétylée par une transférase spécifique et désacétylée par une désacétylase. Quand les histones sont désacétylés, les nucléosomes sont compactés en hétérochromatine, l'acétylation désagrége ces structures et les rend perméables aux facteurs de transcription. C'est donc un préalable nécessaire à la transcription chez les eucaryotes, pas chez les bactéries. L'un des schémas proposés inclut donc comme étape première dans la transcription une liaison entre ces transférases et les facteurs de transcription.

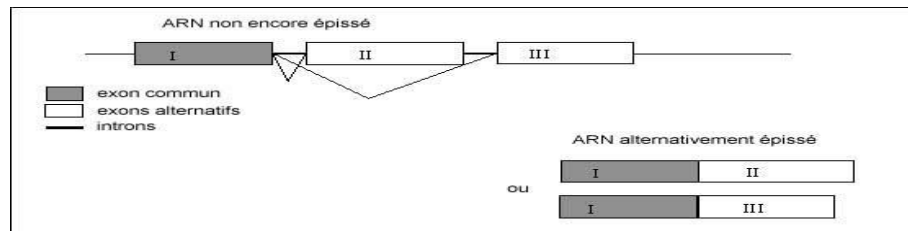
L'inactivation d'un gène, d'un groupe de gènes ou d'un chromosome ou « *silencing* » est due à la *méthylation de cytosines sur des séquences CG*. Le rôle physiologique de ce processus n'est connu qu'au cours du développement ou dans le cas des deux chromosomes X, chez la femme.

Régulation de la transcription

Les régulateurs de la transcription les mieux connus chez les eucaryotes supérieurs sont les hormones. Les hormones agissent en modulant la transcription, c'est le cas de nombreuses hormones sexuelles, de nature hydrophobe, capable de traverser les membranes cellulaires et d'arriver au contact de l'ADN. La cellule cible contient un récepteur nucléaire (r) capable de se complexer avec l'hormone (H). Le complexe formé (Hr) interagit avec l'ADN, avec des sites HRE (Hormone responsive elements) présents au niveau des promoteurs cibles, et active la transcription.

L'épissage alternatif (alternative RNA splicing)

Les ARNm issue de la transcription des gènes sont d'abord maturés par excision-épissage avant d'être traduits. Les étapes de la maturation de l'ARNm eucaryote sont des sites potentiels de régulation. Ainsi un même transcrit primaire peut subir diverses maturations conduisant à des ARNm différents, chacun correspondant à une combinaison particulière d'exons. Ce type de régulation est appelé épissage alternatif. Un phénomène très intéressant : selon les protéines réalisant l'épissage, on peut avoir différents épissages de l'ARN en choisissant parmi plusieurs exons et obtenir une protéine dont une région peut être de plusieurs sortes différentes. Un gène permet ainsi de coder pour un plus grand nombre de protéines différentes.



Certains gènes eucaryotes peuvent être à l'origine de plusieurs protéines par épissage alternatif, ce processus est multiforme. Il est utilisé chez les eucaryotes et intervient au moment de la maturation de l'ARNm soit par sélection du promoteur, soit par sélection de la queue, soit par sélection alternative d'une cassette.

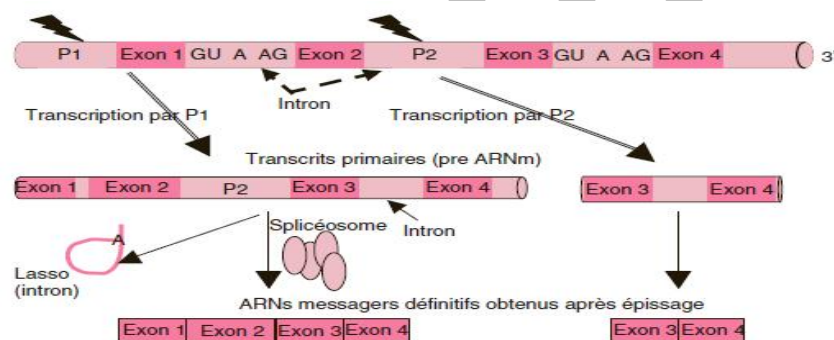


Figure 26 : Épissage alternatif (Swynghedauw and Silvestre, 2008)

Dans cet exemple, un même gène possède plusieurs promoteurs, P1 et P2. L'activation de P1 aboutit à la transcription primaire de tout le gène, P2 compris. L'activation de P2 ne permet que la transcription des séquences situées en 3' par rapport à P2. Les résidus GU et AG situés, en haut, sur les introns indiquent les points d'épissage. Le résidu A situé au milieu des introns indique le point de fermeture du lasso formé par les introns après leur excision. Le splicéosome forme l'unité fonctionnelle d'épissage.

Régulation de la traduction

Chez les eucaryotes, existe une régulation traductionnelle qui intervient sur la durée de vie de la molécule d'ARNm. L'exemple est l'œuf d'oursin. Quand il n'est pas fécondé, il y'a accumulation de grandes quantités d'ARNm ayant une longue durée de vie. Dans un œuf fécondé, les molécules d'ARNm sont très rapidement traduites pour assurer les synthèses protéiques nécessaires. Ces ARNm protégés avant la fécondation puis activés au moment de la fécondation sont appelés ARN Masqués.

Régulation par réarrangement des gènes

Les eucaryotes possèdent des mécanismes qui permettent le réarrangement de segments d'ADN de manière contrôlée et l'augmentation du nombre de gènes quand cela est nécessaire (phénomène rare chez les procaryotes).

Exemple : la biosynthèse des immunoglobulines (anticorps)

Les classes d'immunoglobulines : IgA , IgM, IgD, IgG et IgE. Ces classes diffèrent par les chaînes constantes, et au sein d'une même classe c'est la région variable qui est différente.

Les anticorps (10^6 types différents) ne sont pas codés par des gènes spécifiques. Ils correspondent à la combinaison de trois sous unités, chacune étant codée par une famille de cent gènes différents. Chaque cellule (lymphocyte) est spécialisée dans la production d'une sorte d'anticorps, ce qui démontre la présence d'un système de régulation.

Les IgG sont des tétramères formés de deux chaînes légères (L) et de deux chaînes lourdes (H). Dans chacune des chaînes existent deux segments importants : une région constante (C) et une région variable (V). Il existe en plus deux type de chaînes L : κ et λ . Plusieurs gènes sont impliqués dans la synthèse de l'une des deux chaînes L. Ces gènes sont distribués en trois classes :

- Classe V composée de 300 gènes codant les 95 premiers acides aminés de la région variable ;
- Classe C compte un seul gène qui code la région constante ;
- Classe J composée de 5 gènes codant 12 acides aminés de la fin de la région variable et de la jonction entre les parties V et C.

Dans les cellules lymphocytaires non différenciées, les gènes des trois classes sont regroupés situés sur le même chromosome. Un réarrangement dans les gènes s'opère dans les cellules au cours de la différenciation en fonction de l'immunoglobuline produit. Ce réarrangement repose la recombinaison entre un gène V et un gène J et sur la délétion du fragment d'ADN entre ces deux gènes. Le processus s'opère au niveau de l'ADN et non de l'ARN. Le nombre de gènes V et J ainsi que les différentes possibilités de recombinaison aboutit à plus de 3000 régions variable L possibles.

Les gènes des chaînes H sont organisés de la même manière avec la différence essentielle que quatre types de segments différents sont impliqués dans leur assemblage (V, C, J et D). Potentiellement la recombinaison peut aboutir à 5000 régions variables H possibles. Ceci donne 1.5×10^7 IgG différents et explique la diversité des anticorps.

Références

- **Beaumont S.**, Biologie Moléculaire. Cours, exercices, annales et QCM corrigés, Dunod, Paris, France, 2006
- **Clark, Pazdernik and McGehee;** . Molecular Biology, Third Edition(2019)
- **Lehninger**, Principles of Biochemistry, Fourth edition 2005
- **Lewin B.**, Gene, 8ème édition, 2005
- **Meftah A. et Julien R.**, Biologie moléculaire, 2eme edition, Dunod, Paris, France, 2003
- **Passarge E.** , Color Atlas of Genetics, Third edition, 2007, Thieme, Germany
- **Prescott et al.** Microbiologie 2003
- **Serge Weinman, Pierre Méhul.** TOUTE LA BIOCHIMIE. Dunod, Paris, 2013
- **Swynghedauw B., J-S Silvestre** , Biologie et Génétique Moléculaires Aide-Mémoire, 3e Edition, Dunod, Paris, 2008
- **Voet et al.** Fundamental of Biochemistry 1999
- **Winter P.C., Hikey G.I. et Fletcher H.L.**, L'essentiel en génétique, Port royal Livres, Paris 2000
- Site internet
- La transcription chez les eucaryotes, Auteurs : *Françoise Ibarrondo, Gilles Camus*
Document publié le : 12 décembre 2006.
<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transcription/transcription.htm>