Philippe LUCHETTA

Biologie moléculaire en 30 fiches

2e édition

DUNOD

Tout le catalogue sur
www.dunod.com

DUNOD
ÉDITEUR DE SAVOIRS

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 1er 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).

DANGER
LE PHOTOCOPILLAGE TUE LE LIVRE

© Dunod, Paris, 2009, 2013
ISBN 978-2-10-059237-1

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

Partie 1 – Structure

Fiche 1 Constituants 1
Fiche 2 Structure 5
Fiche 3 Organisation 10
Fiche 4 Compaction 13
Fiche 5 Chromatine 16

Partie 2 – Méthodes

Fiche 6 Purification et quantification 21
Fiche 7 Électrophorèse 25
Fiche 8 Enzymes spécifiques 29
Fiche 9 Carte de restriction 33
Fiche 10 PCR 37
Fiche 11 Clonage 40
Fiche 12 ADNc 44
Fiche 13 Hybridation moléculaire 48
Fiche 14 Séquençage 53

Partie 3 – Fonctions

Fiche 15 Gènes 59
Fiche 16 Gènes procaryotes 64
Fiche 17 Gènes eucaryotes 67
Fiche 18 Transcription 74

© Dunod – La photocopie non autorisée est un délit.

Fiche 19 Transcription procaryote 79
Fiche 20. Transcription eucaryote 88
Fiche 21. Maturation des ARNm 95
Fiche 22. Régulation de la transcription 103
Fiche 23. Opéron lactose 109
Fiche 24. Traduction 115
Fiche 25. Traduction procaryote 122
Fiche 26. Traduction eucaryote 129
Fiche 27. Régulation post-transcriptionnelle 136
Fiche 28. Réplication 140
Fiche 29. Réplication procaryote 145
Fiche 30 Réplication eucaryote 152

Index 155

FICHE 1

Constituants

Les organismes vivants possèdent deux types d'acides nucléiques :
– L'**ADN** (**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique).
– L'**ARN** (**A**cide **R**ibo**N**ucléique).
Ces acides nucléiques sont principalement constitués de bases associées à un sucre.

I Bases

Chaque acide nucléique contient quatre bases. Trois d'entre elles (adénine, cytosine et guanine) sont communes à l'ADN et l'ARN, la quatrième diffère. On trouve la thymine dans l'ADN et l'uracile dans l'ARN. La différence entre ces deux bases porte uniquement sur le carbone n°5 (avec ou sans CH_3). On trouve deux catégories de bases (Figure 1.1) :
– les **purines** constituées de deux cycles aromatiques ;
– les **pyrimidines** constituées d'un seul cycle aromatique.
Les atomes de carbone et d'azote des cycles aromatiques sont numérotés de 1 à 9 (bases puriques) et de 1 à 5 (bases pyrimidiques). Les flèches bleues indiquent la liaison qui se produit entre la base et le sucre.

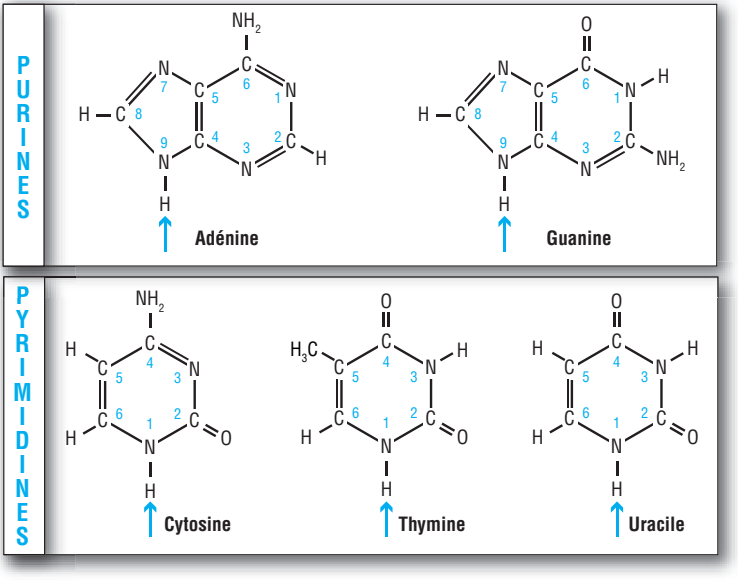
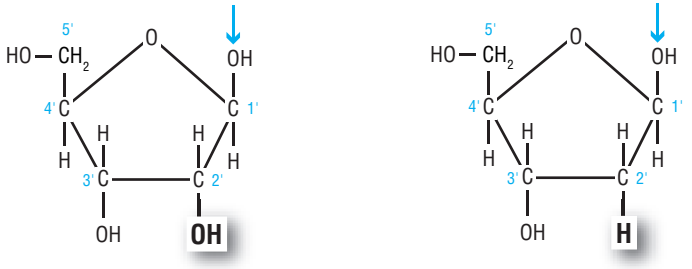


Figure 1.1

© Dunod – Toute reproduction non autorisée est un délit.

II Sucre

Le sucre est un pentose composé de 5 carbones numérotés de 1’ à 5’. Cette numérotation en « ’ » permet de faire la distinction avec celle des bases. L’ARN contient du **ribose** alors que l’ADN contient du **désoxyribose** (Figure 1.2). La différence entre ces deux sucres se situe au niveau du carbone 2’. On trouve un groupement **2’–OH (ARN)** pour le ribose et un **2’-H (ADN)** pour le désoxyribose. Cette différence qui semble peu importante a pourtant une conséquence déterminante sur la stabilité de l’acide nucléique. Ainsi, à pH alcalin (pH 12), l’ARN est hydrolysé alors que l’ADN est stable. Attention à ne pas confondre ici « hydrolyse » et « dénaturation ». On parle de dénaturation lorsque, par exemple à pH alcalin, un ADN double brin se dissocie en deux ADN simples brins par rupture des liaisons hydrogènes. Pour l’ARN, à ce même pH, le mécanisme est différent car il y aura hydrolyse de la molécule par coupure des liaisons phosphodiester entre les carbones 5’ et les carbone 3’ des nucléotides adjacents.



Ribose **Désoxyribose**

Figure 1.2

III Nucléosides et Nucléotides

- **Nucléosides**

Le carbone 1’ du sucre se lie à l’azote de la base (N1 ou N9) pour former un **nucléoside**. Cette liaison est appelée **N-glycosidique**. Un ou plusieurs groupements phosphate (P) peuvent se lier avec le carbone 5’ pour former un nucléoside phosphate (Figure 1.3). On établit une nomenclature très précise en fonction de la structure de la molécule. Si le sucre est le ribose (ARN), on a la nomenclature NMP, NDP, NTP en fonction du nombre de groupements phosphate. Si le sucre est un désoxyribose (ADN), on a la même nomenclature précédée d’un « d ». Enfin, il faut connaître la position des groupements P à partir du C5’ : 1er P en α, 2e P en β, 3e P en γ. Cette nomenclature est importante car, même si elle semble fastidieuse, elle permet de comprendre certaines abréviations de molécules utilisées en biologie. Par exemple, le $^{\alpha 32}$P-dCTP signifie que le 1er phosphate fixé sur le C en 5’ du dCTP est radioactif (^{32}P).

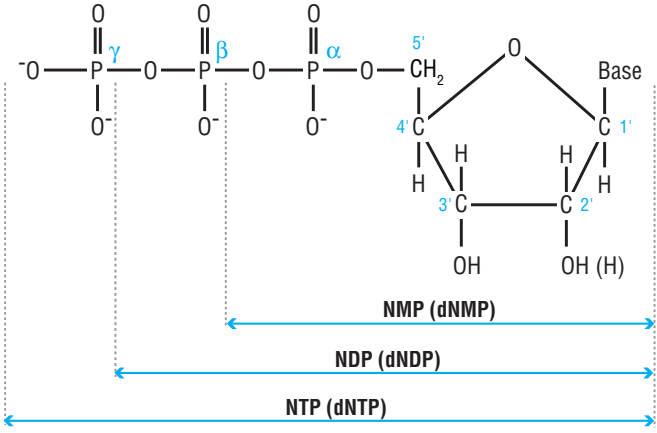


Figure 1.3

(désoxy)nucléoside		(désoxy)ribose	+ Base	
(désoxy)nucléoside monophosphate	(d)NMP	(désoxy)ribose	+ Base	+ 1 P
(désoxy)nucléoside diphosphate	(d)NDP	(désoxy)ribose	+ Base	+ 2P
(désoxy)nucléoside triphosphate	(d)NTP	(désoxy)ribose	+ Base	+ 3P

- **Nucléotides**

Le nucléoside monophosphate est aussi appelé **nucléotide** car l'association de plusieurs nucléosides monophosphate entre eux porte le nom de **chaîne polynucléotidique** (Fiche 2). Le nom donné aux nucléosides ou aux nucléotides en fonction de la base présente est différent du nom de la base seule. Par exemple dans l'ATP, l'adénine devient adénosine, dans l'UMP, l'uracile devient uridine, etc.

Base	Nom du nucléoside
Adénine (A)	Adénosine
Cytosine (C)	Cytidine
Guanine (G)	Guanosine
Thymine (T)	Thymidine
Uracile (U)	Uridine

© Dunod – Toute reproduction non autorisée est un délit.

Exercice

1. Écrivez la structure à pH 7du désoxyribonucléoside triphosphate contenant de l'adénine et du ribonucléoside triphosphate contenant de la thymine. Vous indiquerez sur le schéma la numérotation des carbones du sucre et de la base et la position de la liaison N-glycosidique.

2. Comment appelle-t-on ces deux nucléosides ? Quelle est leur abréviation ?

3. Ces deux molécules sont-elles présentes dans l'ADN ou dans l'ARN ?

Solution

1. Voir la Figure 1.4. La liaison N-glycosidique est indiquée par une étoile bleue.

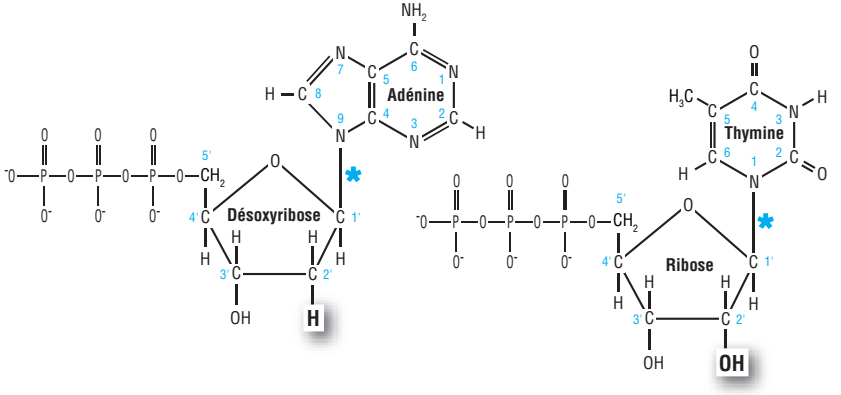


Figure 1.4

2. À gauche, le désoxyribo adénosine triphospahte (dATP). À droite, le ribo thymidine triphosphate (TTP).

3. Le dATP est présent dans l'ADN mais sous forme monophosphate (dAMP) tandis que le TTP n'est présent ni dans l'ADN, ni dans l'ARN. Dans l'ADN, on aurait le dTTP (sous forme dTMP) et dans l'ARN, on aurait l'UTP (sous forme UMP).

FICHE 2

Structure

I ARN

• Chaîne d'ARN simple brin

L'ARN est constitué d'un polymère de nucléotides. Les nucléotides sont liés par une **liaison phosphodiester**. Dans cette liaison, le groupement phosphate entre les deux nucléotides est relié d'un côté par une liaison ester au carbone 5' et de l'autre côté par une seconde liaison ester au carbone 3'. Cette chaîne polynucléotidique est orientée et possède deux extrémités, l'**extrémité 5'P** et l'**extrémité 3'OH** (Figure 2.1 page suivante)

• Structures secondaires de l'ARN

Selon les types d'ARN, la chaîne peut être simple brin (ARNm) ou partiellement double brin (ARNr et ARNt). On observe des associations doubles brins si deux séquences sont complémentaires au sein d'une même chaîne d'ARN. Ces associations se font comme dans l'ADN, entre A et U (2 liaisons hydrogène) et entre C et G (3 liaisons hydrogène). Les structures les plus communes sont l'« épingle à cheveux » et la « tige boucle » (Figure 2.2). La différence vient seulement de la taille de la région entre les deux séquences appariées. Il existe d'autres structures secondaires plus complexes comme le « pseudo-nœud ».

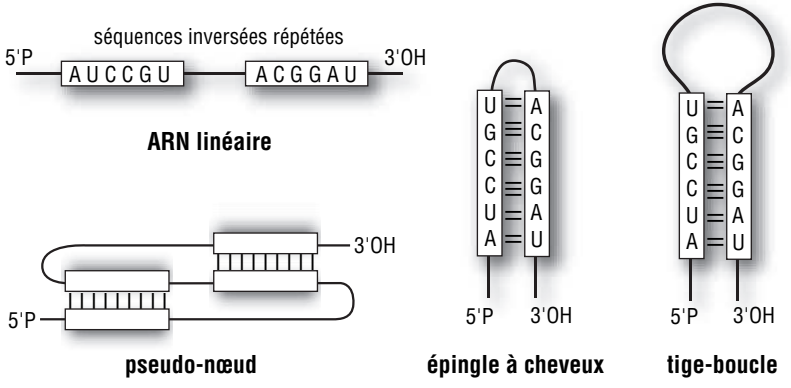


Figure 2.2

© Dunod – Toute reproduction non autorisée est un délit.

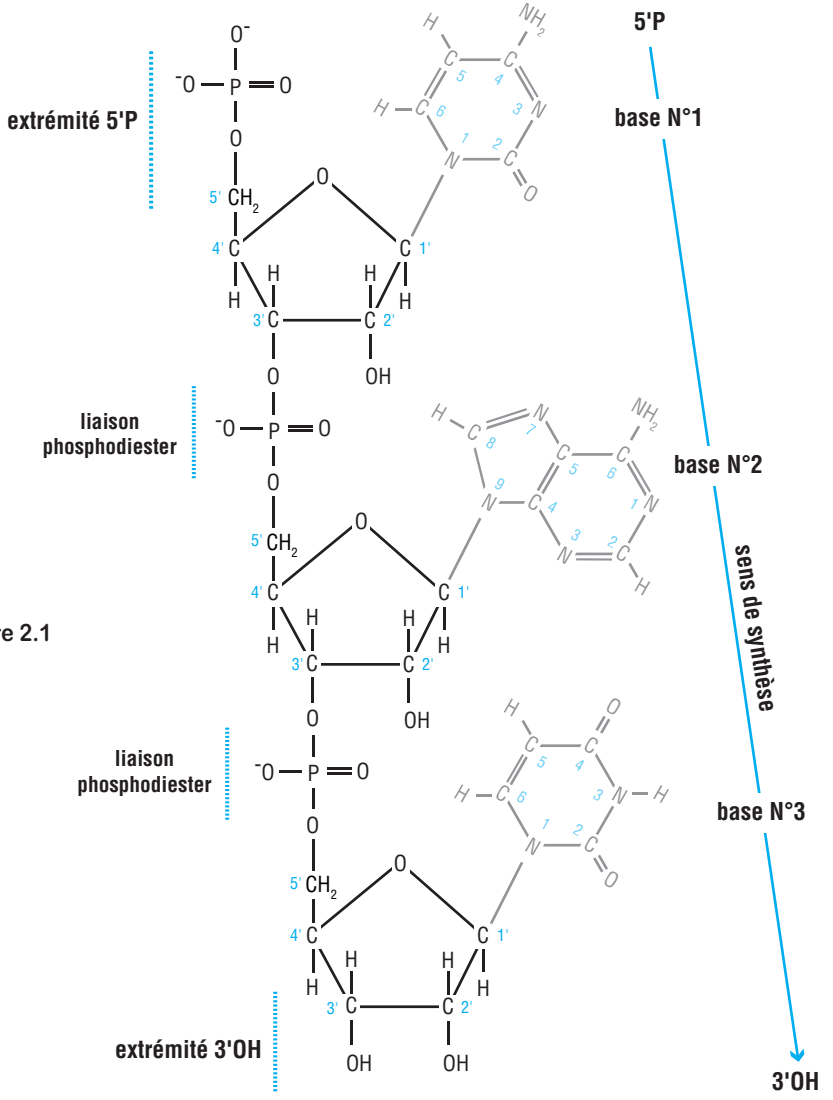


Figure 2.1

II ADN

On trouve plusieurs structures en double hélice mais la plus fréquente est celle qui a été décrite en 1953 par James Watson et Francis Crick. Cette structure est appelée **hélice Watson/Crick** ou **hélice B**. Elle possède certaines caractéristiques :

- **Les deux brins sont antiparallèles et associés en paire de bases**

Deux molécules d'ADN simple brin peuvent s'associer entre elles par complémentarité de leurs bases pour former une molécule d'ADN double brin. Cette structure porte aussi le nom d'**ADN bicaténaire**.

Pour des raisons structurales, les deux brins sont orientés de manière opposée. Ils sont dits **antiparallèles**.

Il y a toujours complémentarité entre une purine et une pyrimidine. Il y a 2 liaisons hydrogène entre A et T et 3 liaisons hydrogène entre C et G (Figure 2.3, les flèches bleues indiquent la liaison avec le sucre). Cette association a une conséquence directe sur la composition en nucléotides de l'ADN double brin. À la fin des années 1940, le biochimiste **Erwan Chargaff** a analysé la composition en nucléotides de génomes de différents organismes vivants (procaryotes) contenant de l'ADN double brin. Il en a déduit une règle appelée « **règle de Chargaff** » :1) la quantité d'adénine est identique à celle de thymine (A=T) et la quantité de cytosine est identique à celle de guanine (C=G), 2) le rapport de purines sur pyrimidines est égal à 1. Cette règle s'applique uniquement pour les molécules d'acides nucléiques double brin et n'est bien sûr valable pour de l'ADN simple brin ou de l'ARN simple brin.

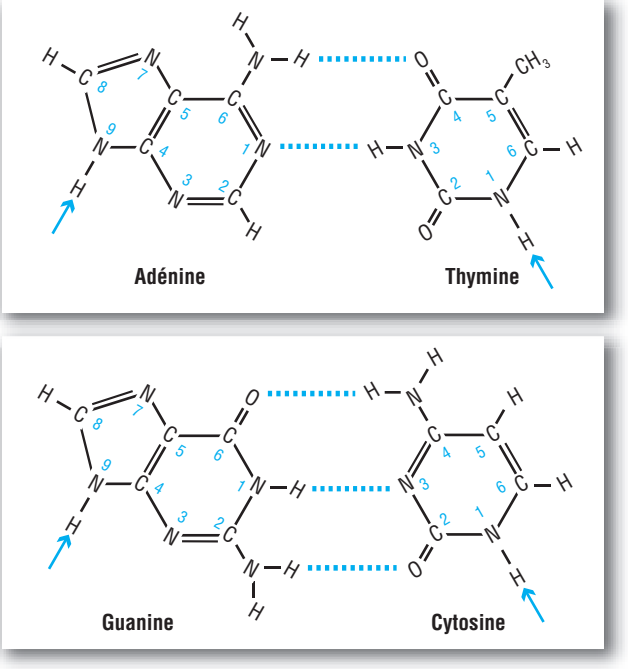


Figure 2.3

© Dunod – Toute reproduction non autorisée est un délit.

- **La double hélice B est « droite »**

L'hélice B est dite « droite » car le sens du pas de l'hélice est à droite (Figure 2.4). L'angle de rotation entre deux bases consécutives est de 36°. Le « pas » de l'hélice est de 3,4 nm et son diamètre de 2,37 nm. Il y a 10,4 paires de bases par tour.

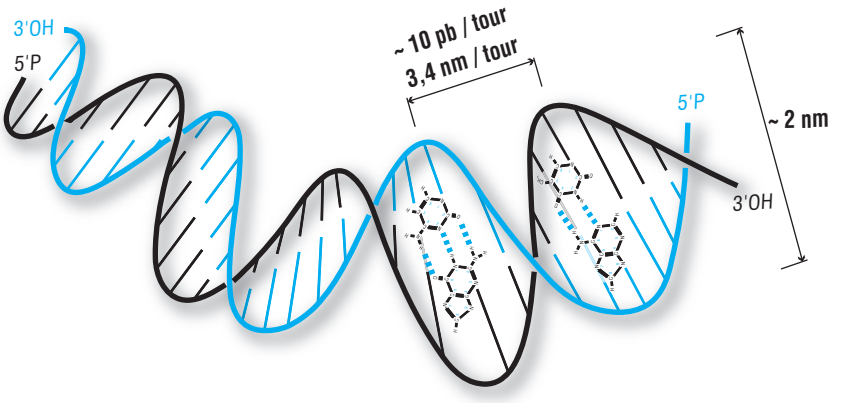


Figure 2.4

- **Il y a deux sillons différents**

Les deux brins de la double hélice d'ADN ne sont pas symétriques par rapport à l'axe central. Sur un plan de coupe, on voit que les deux brins sont plus proches d'un côté que de l'autre (Figure 2.5). La face où les deux brins sont les plus proche est appelée **petit sillon** (ou **sillon mineur**), l'autre est appelée **grand sillon** (ou **sillon majeur**). Cette particularité à une conséquence importante puisque les bases présentes dans le petit sillon seront masquées et ne pourront pas interagir avec les protéines de liaison à l'ADN comme, par exemple, les protéines de régulation. Les interactions avec ces protéines se feront essentiellement avec les bases accessibles du côté du grand sillon.

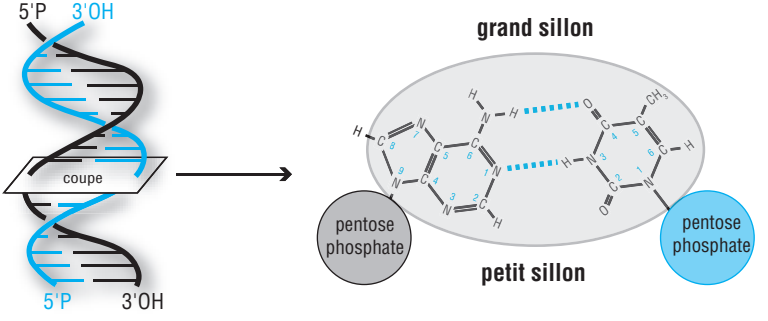


Figure 2.5

- **L'ADN est chargé négativement à pH 7**

Les groupements phosphates présents entre deux nucléotides portent des atomes d'oxygène chargés négativement à pH 7. Cela confère une charge globale négative de l'ADN à ce pH.

- **Les autres conformations de la double hélice**

L'hélice B que nous venons de décrire est la forme majoritaire trouvée dans les cellules *in vivo*. Deux autres conformations de la double hélice d'ADN sont aussi décrites.
L'**hélice A** que l'on trouve dans des solutions où il y a peu d'eau (après extraction) ou *in vivo* lorsque l'ADN est associé à des complexes protéiques. Cette forme A est plus « resserrée » que la forme B avec un diamètre plus important (2,6 nm) et un nombre de paire de bases par tour plus important (environ 11 pb/tour).
L'**hélice Z** peut se trouver aussi *in vivo* dans certaines conditions particulières et en très faible proportion. C'est une hélice « gauche » qui apparaît lorsqu'il y a alternance entre bases puriques et pyrimidiques. Cette hélice est plus étirée que l'hélice B avec un diamètre de l'ordre de 1,8 nm et un nombre de paire de bases par tour d'environ 12 pb/tour.

Exercice 1

Le pourcentage molaire de la somme Guanine + Cytosine de l'ADN purifié de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* est 67 %.

1. Quel est le pourcentage molaire de chacune des 4 bases de l'ADN ?

2. Quel est le rapport bases puriques/bases pyrimidiques ?

3. Quelle indication donne le rapport calculé précédemment sur la structure de l'acide nucléique ?

Solution

1. Les bases G et C étant associées dans l'ADN, il y a autant de chacune de ces deux bases (règle de Chargaff). Il y a donc 67/2 = 33,5 % de G et 33,5 % de C. Le pourcentage de A + T = 100 – 67 = 33 %. Sur le même principe, il y a donc 33/2 = 16,5 % de A et 16,5 % de T.

2. Les bases puriques sont G et A, soit 33,5+16,5 = 50 %. Les bases pyrimidiques sont C et T, soit 33,5+16,5 = 50 %. Le rapport des deux est de 1. C'est aussi un des principes de la règle de Chargaff puisque les purines sont associées aux pyrimidines dans un acide nucléique double brin.

3. Cela montre que l'acide nucléique est double brin. S'il s'agissait d'un ARN ou d'un ADN simple brin, le rapport serait différent de 1.

© Dunod – Toute reproduction non autorisée est un délit.