

BIOLOGIE MOLECULAIRE

I- Biologie moléculaire et comparaison des génomes

La biologie moléculaire utilise des outils/techniques variées.

Ils permettent de manipuler l'ADN: Fonctions «couper, copier, coller, rechercher»

Couper: Endonucléases de restriction , elles coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques.

Copier: ADN Polymérase, vecteur de clonage

Coller: Ligases relient entre eux des fragments d'ADN.

Rechercher: Sondes d'hybridation repérant une cible dans le génome

Ils sont à la base de techniques permettant d'analyser le génome.

Technique de clonage d'ADN dans un vecteur (ex. plasmide)

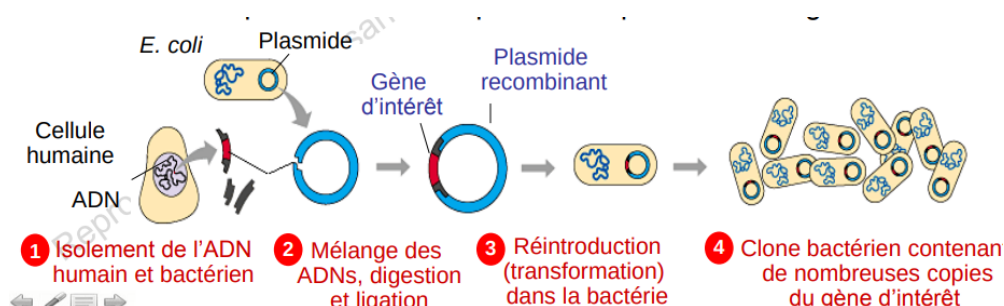
Technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et de séquençage

Séquençage haut débit puis de nouvelle génération (NGS), non traitées ici

Deux techniques majeures permettent d'amplifier l'ADN :

La technique de clonage utilise un vecteur (~ 1970) : 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** (rouge) est **introduit dans un plasmide après digestion (= coupure) des ADN**s 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.



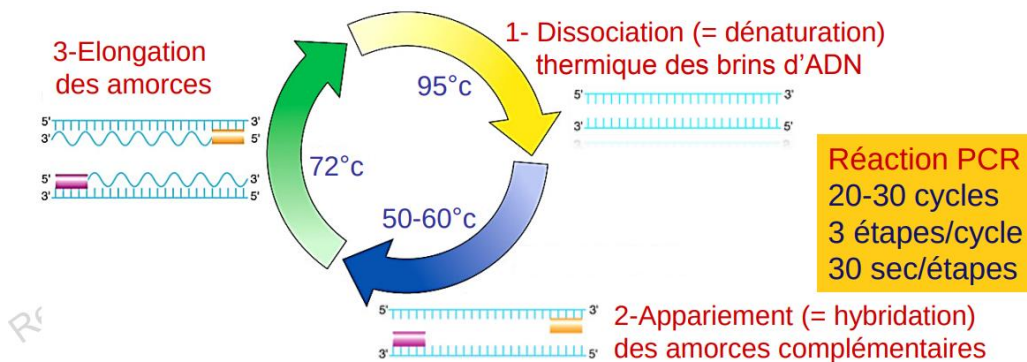
L'autre technique majeure est la technique de **PCR** (~1980).

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

Réplication in vitro d'une copie d'un gène sur n cycles: **2 n copies du gène**.

Thermocycleur: Appareil faisant varier la température de façon cyclique.

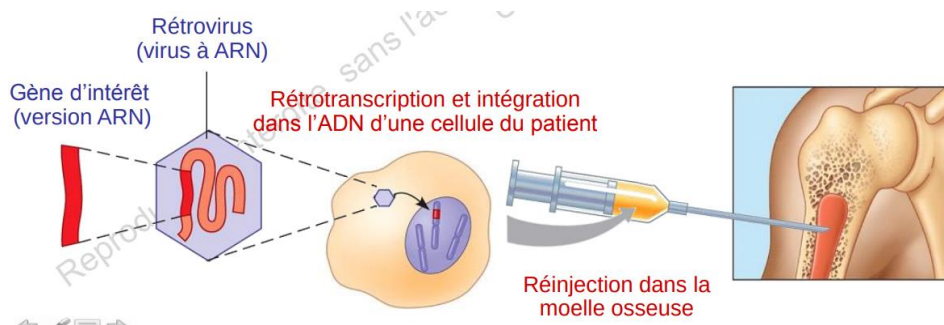
Réactifs: ADN contenant le gène cible, ADN Polymérase thermostable (Taq), dNTPs et primers (= amorces de synthèse) encadrant le gène.



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.



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

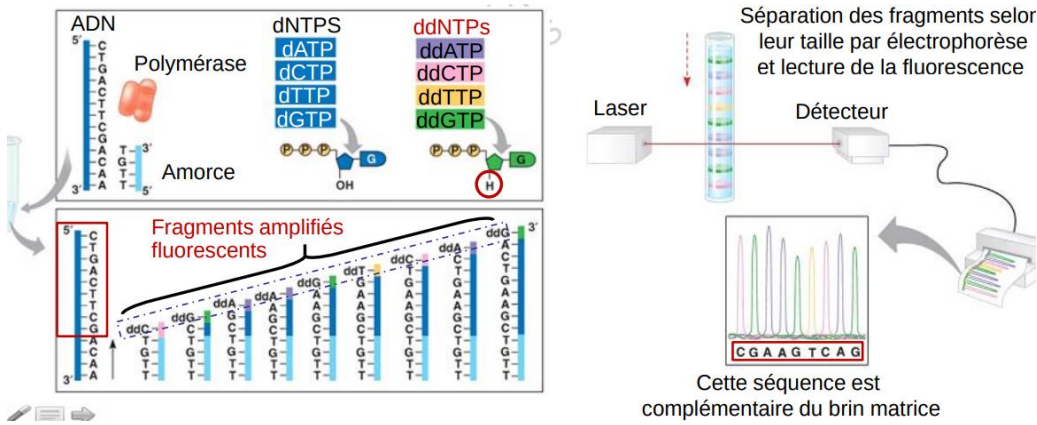
- Diagnostic génétique des maladies héréditaires
- Diagnostic post-natal, prénatal (interruption de grossesse), préimplantatoire (fécondation in vitro) avec analyse sur quelques cellules seulement
- Diagnostic en virologie, parasitologie, bactériologie, criminologie, etc...
- Détection et quantification de virus, parasites, ou bactéries
- Identification de coupables par l'ADN retrouvé sur les scènes de crime...

Ces techniques ont permis de lire la séquence du génome.

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

Utilise des terminateurs de chaîne (didéoxynucléotide, ddNTP) fluorescents.

La réaction de PCR s'arrête à chaque incorporation possible d'un ddNTP. Mélange de fragments dont la taille diffère d'un seul nucléotide et dont la fluorescence indique le dNTP présent à l'extrémité



Le génome humain contient 3 milliards de paires de bases

– Le nombre de gènes est estimé entre 20-3000

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 d'autres organismes est séquencé:

-Procaryotes, eucaryotes unicellulaires et pluricellulaires

Le génome de l'homme et du chimpanzé sont identiques à 98,6%.

La comparaison des génomes (génomique comparative) peut-elle expliquer les différences entre espèces ?

Les questions fondamentales de la génomique comparative :

– Quelle(s) différence(s) fondamentale(s) entre procaryotes / eucaryotes ? Le nombre de gènes est à peu près similaire. Il est donc sans rapport avec la complexité d'un organisme.

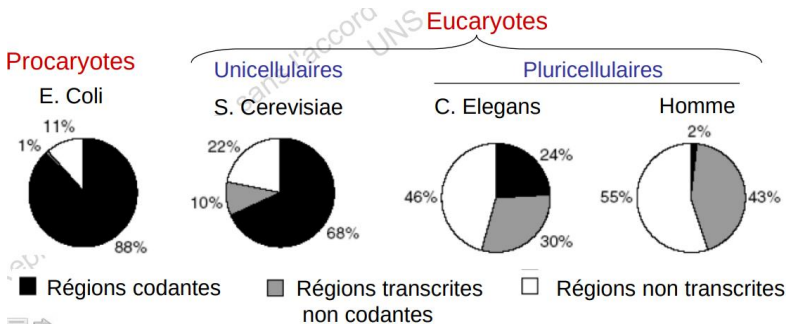
– Et entre eucaryotes monocellulaires et pluricellulaires ?

Le rapport nombre de gènes / taille du génome décroît. Plus un organisme est complexe, moins son génome est riche en gènes ! +++ (tableau pas à apprendre)

	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** +++ (graph pas à apprendre non plus 😊)



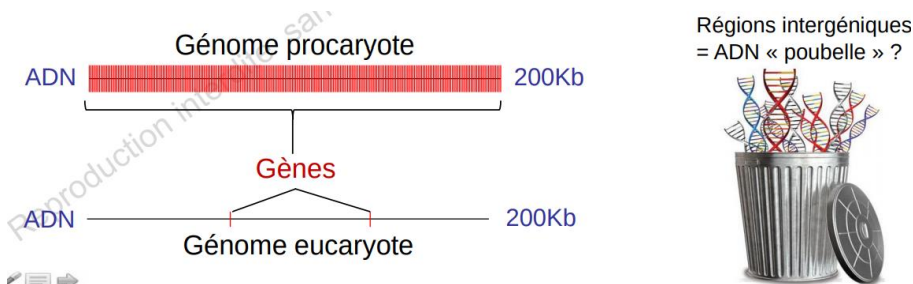
Les réponses de la génomique comparative:

- **La différence réside dans la proportion des séquences non codantes.** ++

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.

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

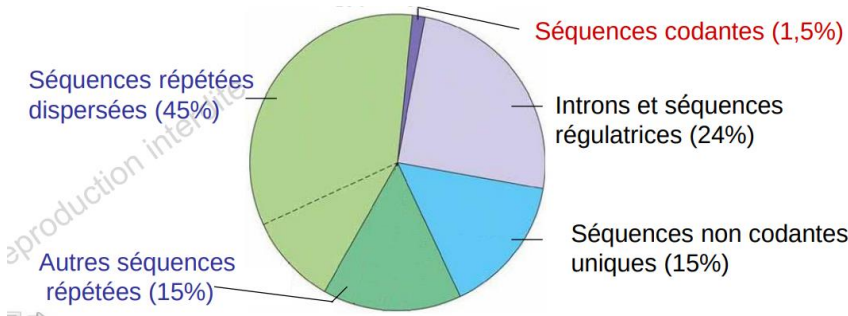
Le **génome procaryote** est **très compact (peu de régions intergéniques)**. La **densité de gènes est élevée** (un gène toutes les 1000 bases). Le **génome eucaryote** contient de **vastes régions intergéniques («désert»)**. La **densité de gènes est faible** (un gène toutes les 100 000 bases).



– **Les génomes eucaryotes et humains sont riches en séquences répétées.**

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

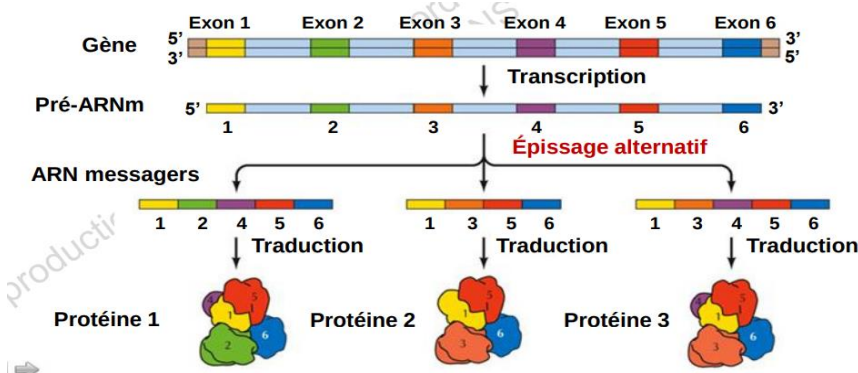
- Les **séquences répétées dispersées** (45% du génome humain)
- Transposons** et **rétrotransposons** (séquences L1 ou Alu)
- D'autres séquences répétées (15%) sont des **séquences répétées en tandem** (5%) ou des **duplications de larges séquences génomiques** (5%)



-Les introns ont favorisé la complexification des espèces.

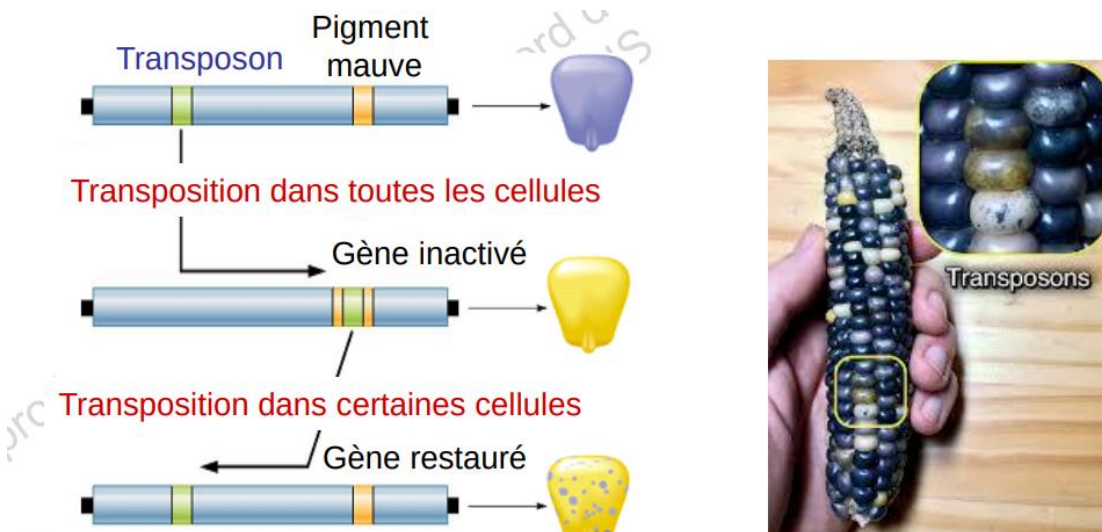
Leur existence est à la base du **phénomène d'épissage alternatif**. Ils permettent donc de **produire plusieurs protéines à partir d'un gène**. Chez l'homme, 20-30 000 gènes (200 000 protéines différentes)

C'est nombre de protéines d'un organisme qui reflète sa complexité. +++



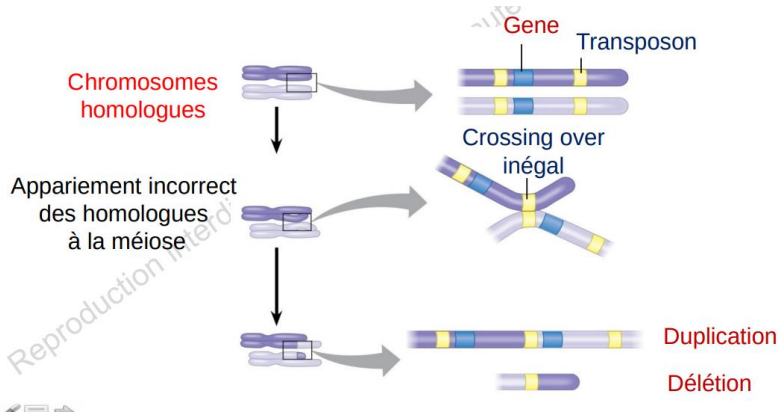
- Les transposons ont favorisé la complexification des espèces.

Ils **se déplacent et se multiplient** dans le génome (gènes « sauteurs »). Ils peuvent déplacer des exons ou des gènes entiers, ou inactiver des gènes. Les variations de couleur des grains de maïs sont à l'origine de la découverte des transposons (Barbara McClintock, 1947).

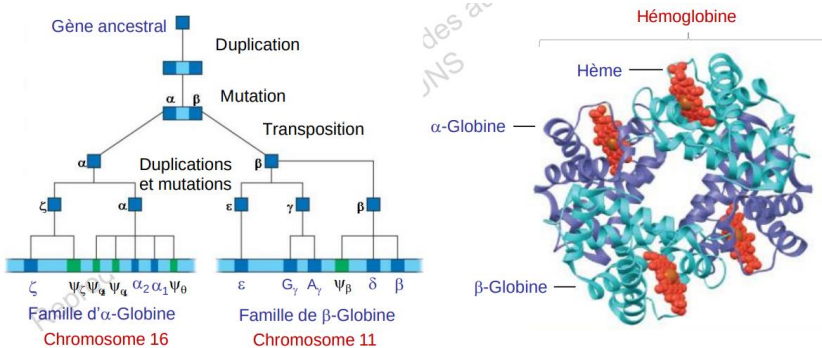


Les transposons ont favorisé l'évolution :

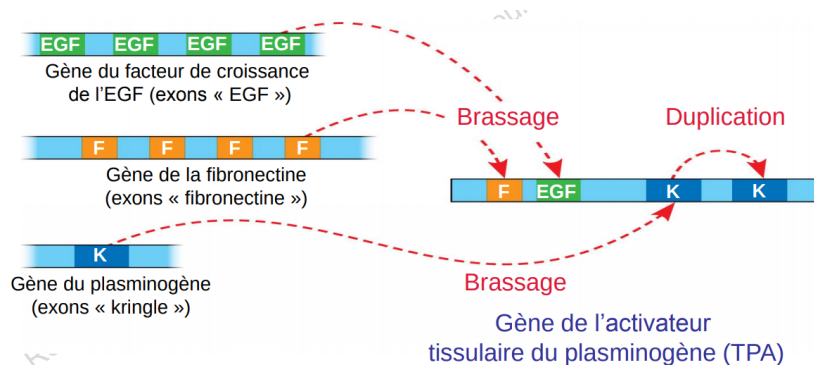
– Ils peuvent **favoriser les crossing-over inégaux** entre chromatides. Le résultat est d'un coté un chromosome avec délétion d'une région et des gènes qu'elle contient, et de l'autre coté un chromosome avec duplication de cette même région.



– 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, cinq de la famille 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.



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**

En conclusion, 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 génétique

DEDICAAAAAAAACES :

Et voilà c'est la dernière fiche de biomol, je sais que vous en êtes très attristés 😞 Dédicace à toi qui est en pls sur la fin de ce cours, tu peux être très fier d'être arrivé jusqu'ici, la dernière ligne droite va pas être facile mais rappelle toi pourquoi tu t'es embarqué dans cette galère et lâche rien, ca en vaut tellement la peine! 😊

" Si ton rêve ne te fais pas peur c'est qu'il n'est pas assez grand" (Lilou philo bonjour)

Dédicace à ma co tut qui fait un magnifique mouton ^^, et à Hugo sans qui cette soirée parrain-fillot aurait été très ennuyeuse (lol)

A mes vieux de biomol Hugo (rip ton estomac après le léopard) et Baptiste

A tout le tutorat, vous êtes au top <3

Dédicaces à mes deux Koren du love <3

Dédicaces à mes fillots à qui j'envoie bcp bcp de courage : Thomas, Elias (sans y t'as vu? 😞), Lila, Tess, Steven, lâchez rien vos marraines sont fières de vous !

A ma Mayou qui lira surement pas cette fiche <3



