



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Génétique Moléculaire Appliquée



## **Polycopié de travaux dirigés de Biologie Moléculaire**

**Destiné aux étudiants de 3eme année Licence académique**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie**

**Préparé par :**

Dr LAROUCI Saliha

Maitre de conférence B

**2020-2021**

## Préface

La biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire. La biologie moléculaire est apparue au XX<sup>e</sup> siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.

Après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson (1928-), Francis Crick (1916-2004), Maurice Wilkins (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958), la biologie moléculaire a connu d'importants développements pour devenir un outil incontournable de la biologie moderne à partir des années 1970. Depuis la fin des années 1950 et le début des années 1960, les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les composants moléculaires des cellules et des organismes. Ces composants incluent l'ADN, support de l'information génétique, l'ARN, et les protéines, molécules structurelles et enzymatiques les plus importantes des cellules.

Ce polycopié est le support de travaux dirigés de la matière Biologie Moléculaire Unité d'enseignement fondamentale 1 (UEF 3.2.1) destiné aux étudiants de troisième année licence LMD académique Biochimie.

L'objectif des travaux dirigés de la matière Biologie moléculaire est d'appliquer les connaissances apprises pendant les cours théoriques par le biais d'une série de 05 travaux dirigés sur : **Structure et dynamique de l'ADN, Réplication de l'ADN, Mutation et mutagenèse, : Régulation de l'expression des gènes et méthodologie en biologie moléculaire**

Le polycopié est divisé en deux parties : la première partie concerne les énoncés des exercices proposés pour chaque fiche de TD avec un rappel de cours de la biologie moléculaire qui permettra aux étudiants de comprendre la structure et l'organisation du génome avec toute sa complexité de transcription, traduction, régulation transcriptionnelle et traductionnelle. Ainsi que les techniques de bases (PCR, séquençage, électrophorèse). Tandis que la seconde partie présente également l'ensemble des solutions aux exercices proposées.

## SOMMAIRE

### Enoncés et rappel de cours

TD1 : Structure et dynamique de l'ADN .....	1
TD2 : Réplication de l'ADN .....	10
TD3 : Mutation et mutagenèse .....	20
TD4 : Régulation de l'expression des gènes .....	28
TD5 : Méthodologie en biologie moléculaire .....	34

### Solutions des exercices

TD1 : Structure et dynamique de l'ADN .....	41
TD2 : Réplication de l'ADN .....	43
TD3 : Mutation et mutagenèse .....	47
TD4 : Régulation de l'expression des gènes .....	48
TD5 : méthodologie en biologie moléculaire.....	50
Références bibliographique .....	52
Annexe : Canevas et programme de l'offre de formation Licence Biochimie.....	53

# **Enoncés d'exercices et Rappel de cours**

## TD1 : structure et dynamique de l'ADN

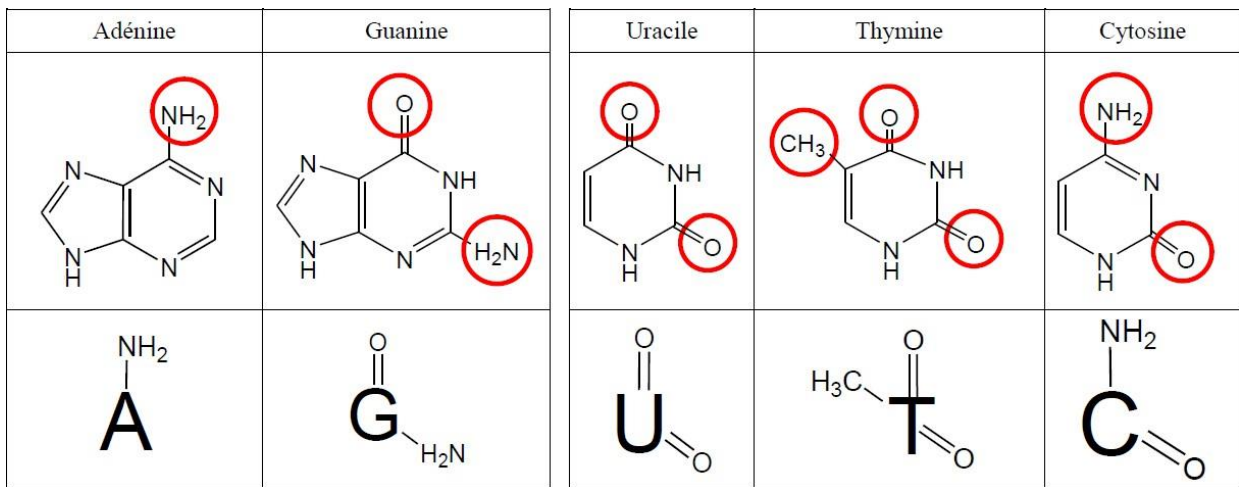
### Rappel sur la structure et dynamique de l'ADN

#### 1. Structure primaire d'ADN (Les composants des acides nucléiques)

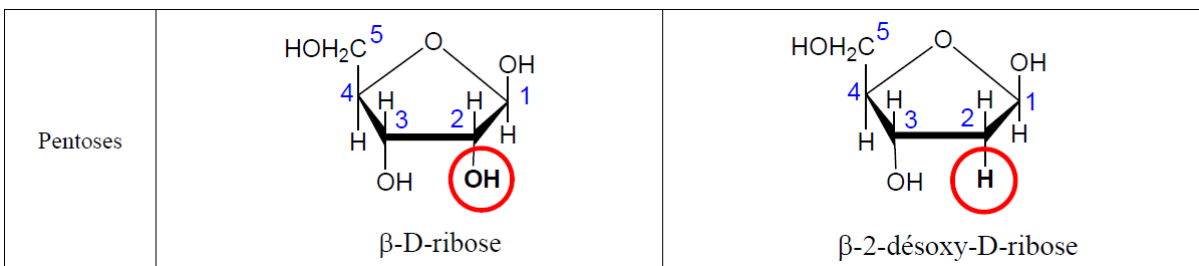
Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules composées d'un enchaînement d'unités structurales appelées **nucléotides**. Ce sont donc des **polynucléotides (polymère)**.

À l'état libre, chaque nucléotide est constitué :

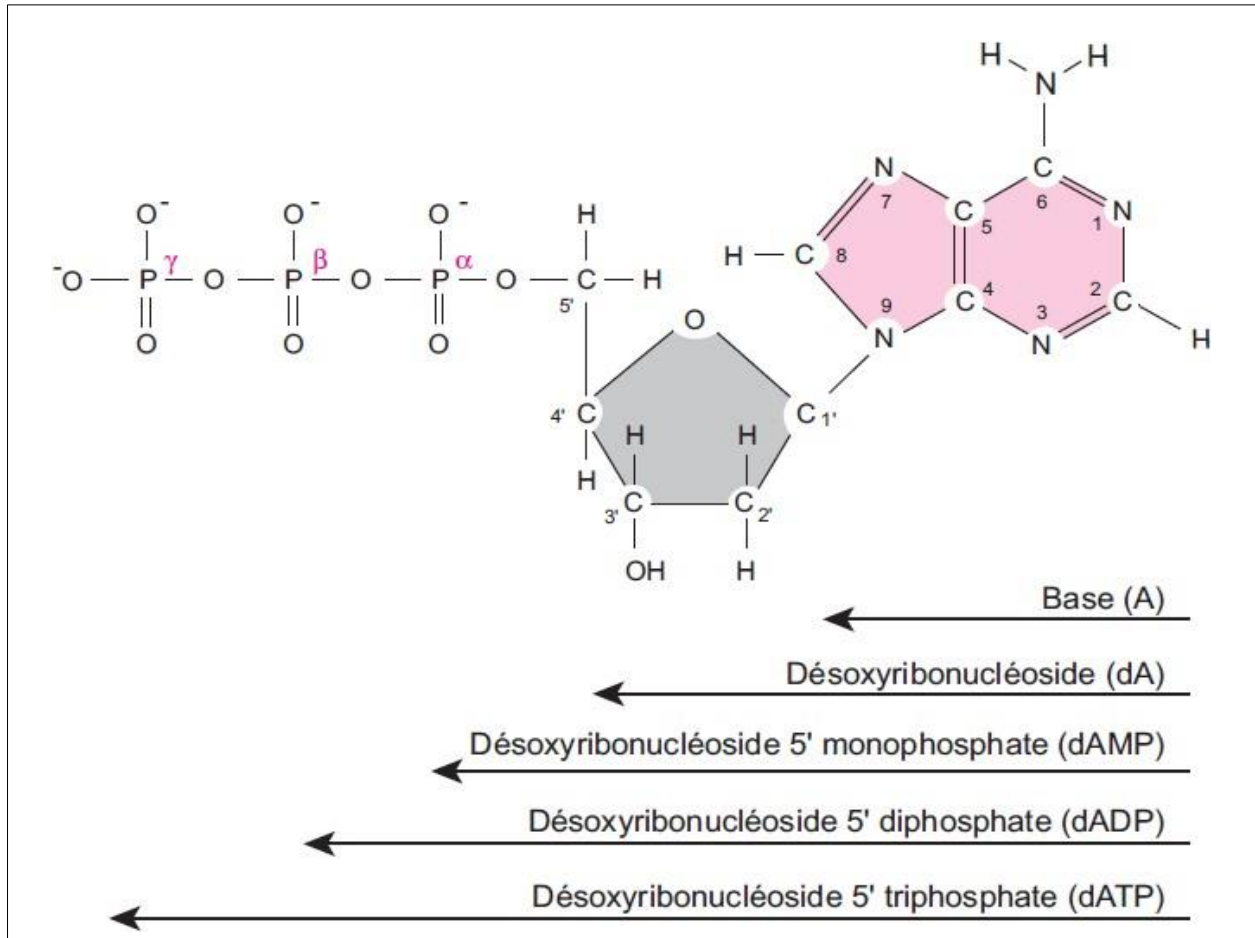
- ▶ d'une base (Fig. 1.1), qui peut être une purine (composée de deux hétérocycles azotés) ou une pyrimidine (un seul hétérocycle azoté) ;
- ▶ d'un **pentose** (ose à cinq atomes de carbone, Fig. 1.2) ;
- ▶ d'un à trois groupes phosphate (Fig. 1.3).



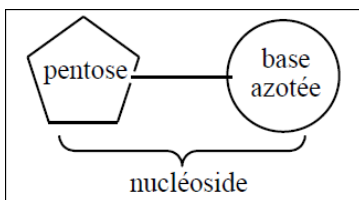
**Figure 1.1.** Structures chimiques des bases puriques (Adénine, Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine, Thymine, Uracile) des acides nucléiques ADN et ARN [1].



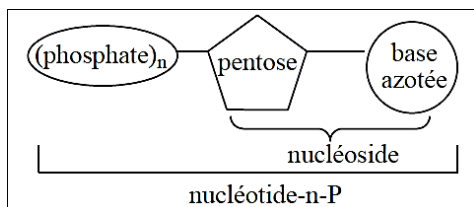
**Figure 1.2.** Les deux pentoses respectifs de l'ARN et de l'ADN [1].



**Figure 1.3.** Structure détaillée d'un désoxyribonucléoside triphosphate. En remplaçant la lettre A (Adénine) par les lettres G, C, T/U et le désoxyribose par le ribose, la nomenclature est généralisable à tous les nucléotides de l'ADN et de l'ARN [1].



Nucléoside = condensation d'un pentose et une base nucléique par des liaisons N-osidiques



Nucléotide =

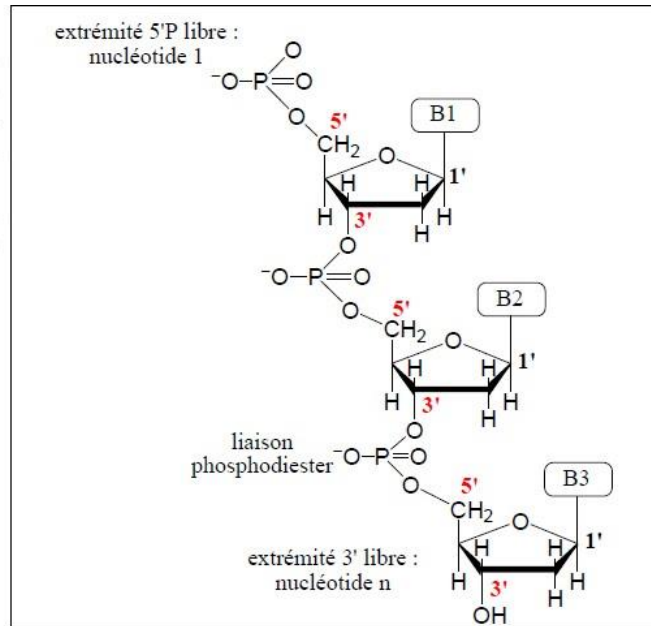
Dans l'ADN, l'ose est le **2'-désoxyribose** (Fig. 1-2) et les nucléotides sont des désoxyribonucléosides monophosphates. Ils ne comportent qu'un seul groupe phosphate. Ces désoxyribonucléosides monophosphates sont liés par des liaisons phosphodiester (Fig.1.4)

Les AN sont des polymères de nucléotides reliés entre eux par des liaisons phosphodiester entre le carbone 3' d'un nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant.

Ces liaisons donnent un sens à la molécule d'acide nucléique avec une extrémité 5'P libre et une extrémité 3'OH libre.

**Par convention :**

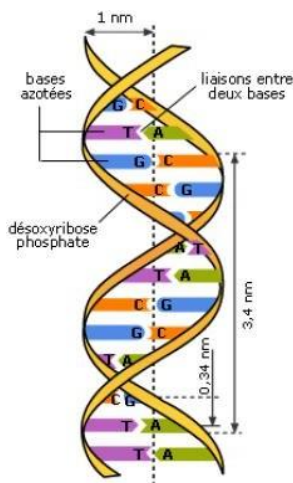
- Le début est le nucléotide dont le phosphate en C5 est libre
- La fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en C3 n'est pas estérifiée



**Figure 1.4.** Liaison phosphodiester entre les nucléotides [1].

## 2. Structure secondaire d'ADN

En 1953, Watson et Crick ont démontré par diffraction aux rayons X que l'ADN est structuré en hélice double brin enroulé l'un sur l'autre.



**Le pas d'hélice 10pb = 3,4nm pour chaque tour d'hélice. (0,34nm entre 2bases)**

**La double hélice a un diamètre de 2 nm**

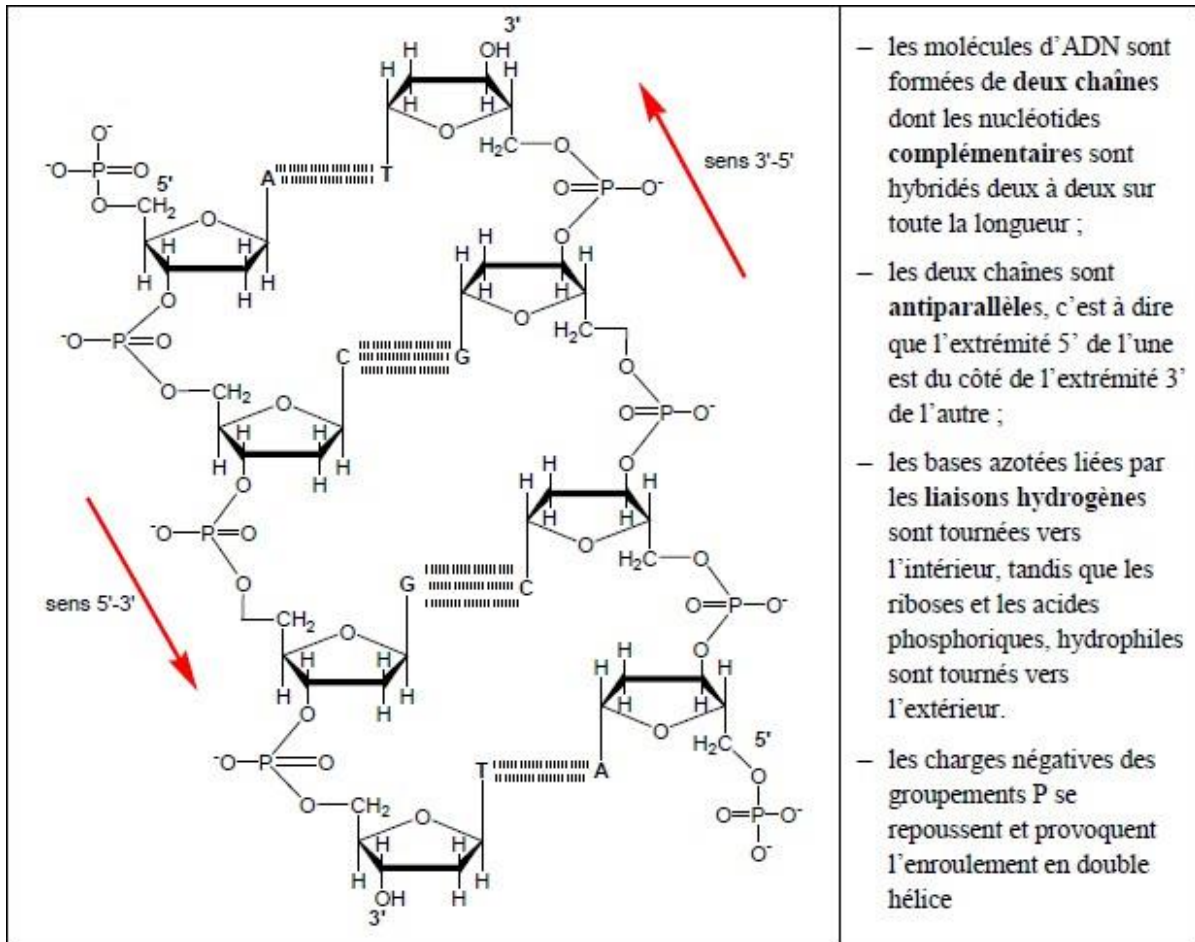


Figure 1.5. Structure de la double hélice d'ADN [1].

• **La règle de Chargaff et les appariements complémentaires**

L'ADN est un acide nucléique **bicaténaire**, c'est-à-dire constitué de deux brins associés par des **liaisons hydrogène** entre les bases. Les liaisons hydrogène s'établissent toujours entre une purine de l'un des brins et une pyrimidine de l'autre brin. Dans cet appariement complémentaire, l'adénine (A) est toujours associée à la thymine (T) par deux liaisons hydrogène et la guanine (G) interagit avec la cytosine (C) grâce à trois liaisons hydrogène.

**Règle d'Erwin Chargaff=Le nombre de thymines est égal au nombre d'adénines et celui des cytosines au nombre de guanines. (%A=%T, %C=%G)**

La composition en base de l'ADN est caractéristique d'un organisme :

- Toutes les cellules d'un même organisme ont un ADN de même composition en base :  $(A+G) = (C+T)$ .

- On caractérise des ADN des différentes espèces par la valeur du rapport  $A+T / G+C$  qui varie selon l'origine de l'ADN (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Composition en base de l'ADN des différentes espèces [1].

Origine de l'ADN	Bases (%)				(A+T)/(G+C)	(A+G)/(T+C)	%GC
	A	G	C	T			
Bactériophage T7	26,0	23,8	23,6	26,6	1,11	0,99	47,4
<i>Escherichia coli</i> B	23,8	26,8	26,6	23,1	0,88	1,01	53,2
Neurospora	23,0	27,1	26,6	23,3	0,86	1,00	53,8
Drosophile	30,7	19,6	20,2	29,5	1,51	1,01	39,8
Saumon	28,0	22,0	20,0	27,8	1,33	1,05	42,0
Poule	28,0	22,0	21,6	28,4	1,29	1,00	43,6
Rat	28,6	21,4	21,6	28,4	1,33	1,00	42,9
Vache	27,3	22,5	22,5	27,7	1,26	0,99	43,0
Homme	29,3	20,7	20,0	30,0	1,46	1,00	40,7

### 3. Propriétés physicochimiques de l'ADN

#### 3.1. Taille et masse moléculaire de l'ADN

N	ADN d'une cellule		
	taille	masse	longueur
adénovirus	≈ 35 10 <sup>3</sup> pb	≈ 10 <sup>7</sup> Da	≈ 1,1 10 <sup>-6</sup> m
E. coli	≈ 3,5 10 <sup>6</sup> pb	≈ 10 <sup>9</sup> Da	≈ 1,3 10 <sup>-3</sup> m
homme	≈ 2 x 3 10 <sup>9</sup> pb	≈ 10 <sup>12</sup> Da	≈ 2 m

1 kpb = 1000 pb, 1 Mpb = 1 000 000 pb...

### 3.2. La température de fusion

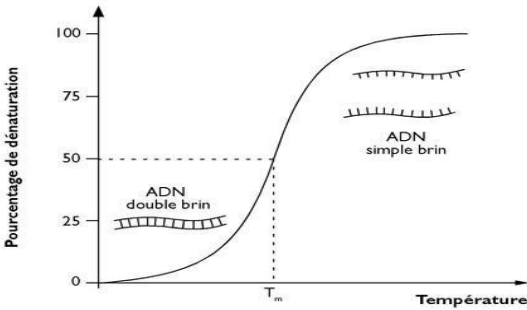
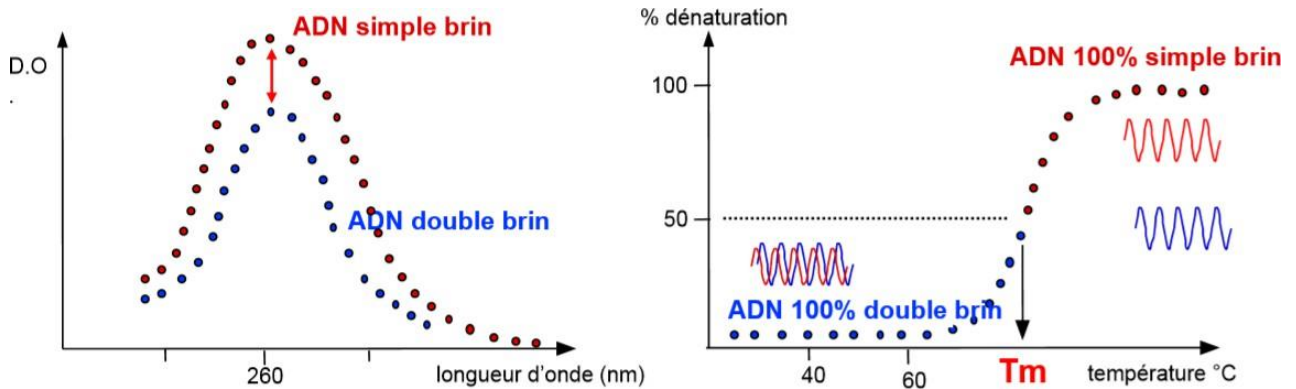


Figure : Tm d'un fragment d'ADN.

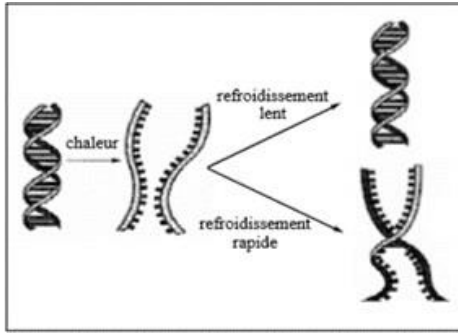
Le Tm (melting temperature ou température de fusion moléculaire) d'un fragment d'ADN est la température à laquelle 50 % des molécules sont sous forme double brin.

- Calcul de la Tm  $T_m = \frac{(A+T)2 + (G+C)4}{100}$



- **Facteurs influençant la Tm**

- Elle dépend de la longueur de la molécule d'ADN, en effet les petites molécules sont moins stables et ont donc une température de fusion plus faible.
- Elle dépend également de la richesse en paires de bases C-G (40% du génome humain) étant plus stable que les paires de bases A-T, ce qui augmente la température de fusion.
- La Tm humain est de 86°C et la **dénaturation** complète est à 95°C.



- Pour que la renaturation soit parfaite il faut obtenir le chemin inverse de la courbe de dénaturation et donc un refroidissement lent.

- Lorsque le refroidissement est trop rapide, la réassociation est irréversible.

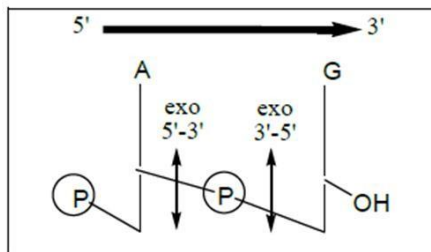
- La renaturation est seulement possible pour des petites molécules d'ADN.

## 2. Hydrolyse enzymatique

Les nucléases sont des enzymes qui permettent l'hydrolyse des liaisons phosphodiester entre les nucléotides (phosphodiesterases spécifiques).

Les nucléases présentent des niveaux de spécificité et sont classées par :

- Le mode d'attaque de la chaîne : extrémité (exonucléase) ou intérieur (endonucléases).
- La spécificité vis-à-vis du substrat : ADN, ARN ou les deux et de la structure, simple ou double brin
- La spécificité de reconnaissance des sites : bases ou leur enchainement
- Le type de coupure de liaison phosphodiester



## FICHE TD 1

### Exercice 1 :

La séquence **5' ATCGTTCG 3'** se rapporte à l'un des brins de l'ADN bicaténaire (A).

1. A quoi correspondent les valeurs et symboles 5' et 3' et quelle est leur signification ?
2. Entre les polynucléotides A, B et C déterminer celui qui correspond au brin complémentaire de l'ADN A. justifier votre réponse.

(A) : 5'TAGCAAGC3'      (B) : 5' CGAACGAT3'      (C) : 3'CGAACGAT5

### Exercice 2 :

Chez l'Homme, la quantité d'ADN par cellule diploïde est environ  $6,4 \cdot 10^9$  pb (1pb= 0.34nm).

1. Quel est la longueur de la double hélice formée par cette quantité d'ADN ?
2. L'Homme possède 23 paires de chromosomes. Quelle est la longueur moyenne de l'ADN contenu dans chaque chromosome ?
3. La taille moyenne d'un chromosome en métaphase est d'environ 6  $\mu\text{m}$ . Quel est le taux de compaction moyenne (longueur de la molécule étalée / longueur de la molécule condensée) de chaque chromosome ?

### Exercice 3 :

Les proportions molaires de Guanine et de Cytosine dans divers échantillons d'ADN ainsi que leurs températures de melting ( $T_m$ ) sont rassemblées dans la tableau ci-dessous :

Espèces	% GC	$T_m$ en °C
<b>Homme</b>	<b>37.5</b>	<b>84,7</b>
<b>Levure</b>	<b>35.5</b>	<b>84</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>51.5</b>	<b>90</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>70.3</b>	<b>98</b>

1. Définissez la  $T_m$ .
2. Déduisez la relation entre la  $T_m$  d'un ADN et sa teneur en ces deux bases.
3. Quel est l'intérêt de connaître cette température.

**Exercice 4 :**

L'analyse des bases azotées de 3 ADN a donné les résultats suivants :

Type d'ADN	A	G	T	C
ADN a	15	35	15	35
ADN b	5	10	25	60
ADN c	48	2	48	2

- Indiquez la structure prévisible des différents ADN
- Classer les différents ADN par ordre décroissant de  $T_m$  prévisible et justifiez votre réponse.

Le traitement de ces différents ADN par des exonucléases révèle que les ADN a et b sont hydrolysés par ces enzymes tandis que l'ADN c est résistant.

- Précisez le mode d'action des exonucléases et expliquez la résistance de l'ADN c à ce type de nucléases.

## TD 2 : Réplication de l'ADN

### Rappel de cours

1. **Le principe de la réplication de l'ADN** : il est contenu dans la structure même de la molécule d'ADN, et basé sur la complémentarité des deux brins qui la constituent : chaque brin sert de matrice à la synthèse d'un brin nouveau. De façon universelle, le type de réplication est semi-conservatif : quelle que soit sa longueur, la molécule d'ADN s'ouvre au niveau d'une ou plusieurs origines de réplication, et est ainsi recopiée sur chaque brin et sur toute sa longueur.

### 2. Caractéristique de la réplication :

**Semi-conservative** : chaque nouvelle molécule d'ADN est composée d'un brin parental (foncé) et d'un brin néoformé (clair).

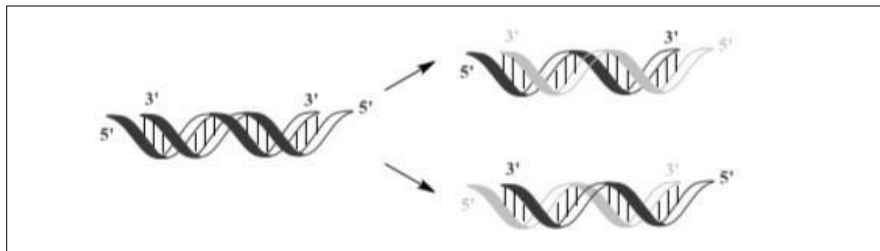


Figure 2 : la réplication de l'ADN est semi-conservative [7].

**Bidirectionnelle** : à partir d'une origine de réplication, deux fourches de réplication démarrent, chacune dans une direction opposée.

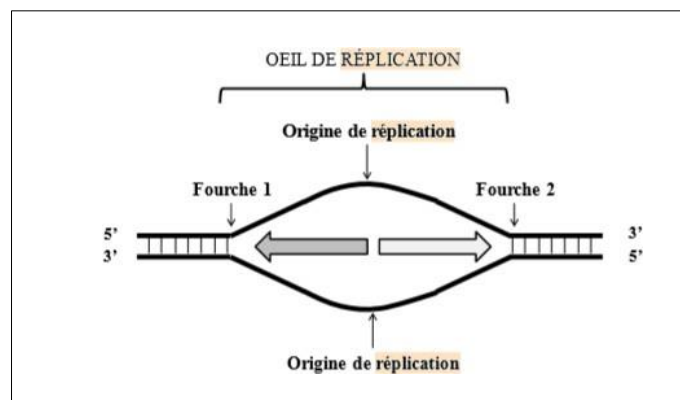
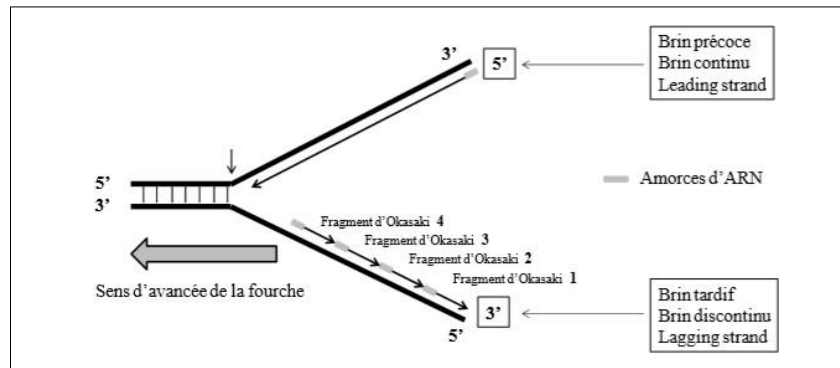


Figure 3 : la réplication de l'ADN est bidirectionnelle [7].

**Asymétrique** : les ADNPol ne peuvent lire les brins matrices que dans le sens 3'-5' et donc polymériser les néo-brins dans le sens 5'-3'. Par conséquent, si le brin 3'-5' peut être répliqué en continu, cela n'est pas possible pour le brin 5'-3'. Ce dernier est donc répliqué de façon

discontinue et « à reculons » sous forme de fragments d'Okasaki. Le terme « asymétrique » fait référence au fait que les deux brins sont synthétisés selon des modalités différentes.



**Figure 4** : la réplication de l'ADN est asymétrique [7].

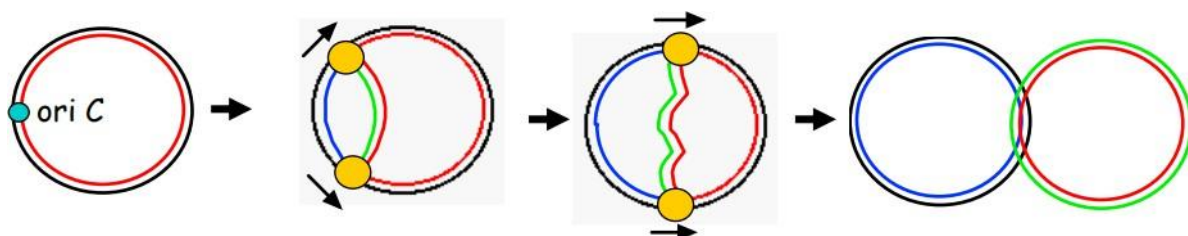
### 3. Mécanisme de réplication :

La réplication de l'ADN dans les cellules eucaryotes et procaryotes se déroule selon un mécanisme identique. Elle est cependant beaucoup plus complexe chez les eucaryotes.

#### ➤ **Réplication chez les procaryotes :**

##### ➤ **1. Origine de réplication**

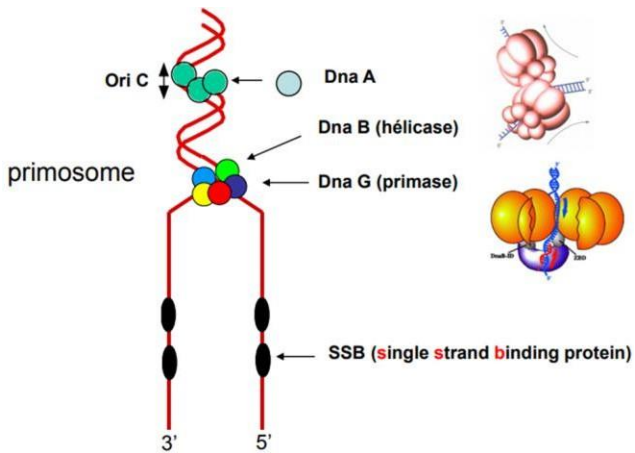
- 1 seule origine par chromosome : ori C
- réplication bidirectionnelle
- réplication rapide ( $\approx 1000$  bases/s; 20 à 100 min)
- 1 séquence de terminaison



##### ➤ **2. Phase d'initiation**

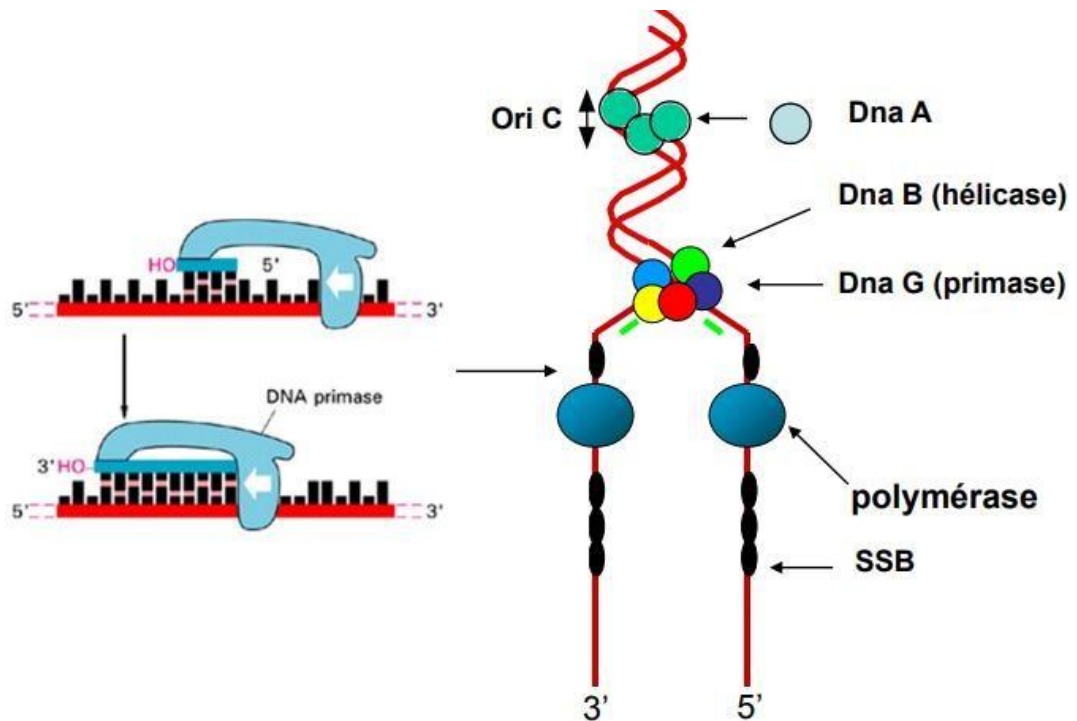
1. Reconnaissance de la séquence d'origine

2. Formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins



### 3. Accrochage de l'ADN polymérase

### 4. Synthèse d'une amorce ARN par la primase



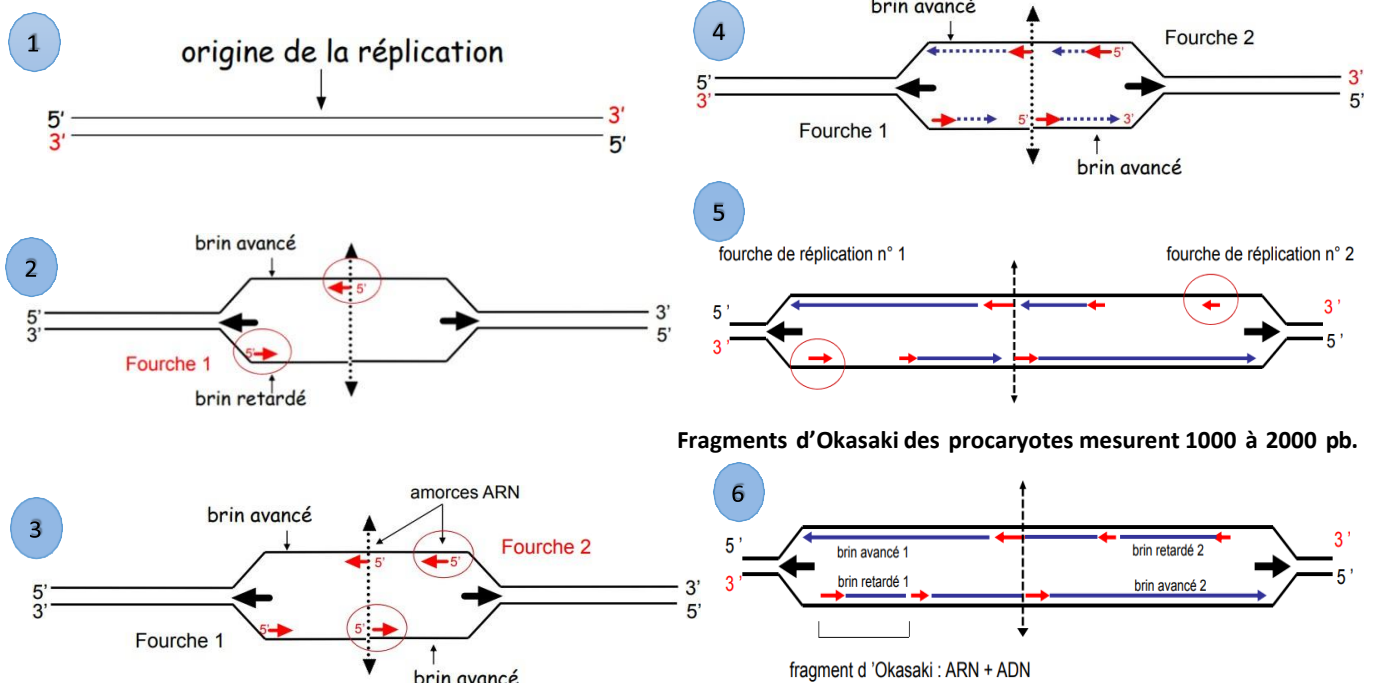
#### ➤ 3. Phase d'élongation : l'élongation nécessite :

- ADN polymérase (activité de copie 5'-3')
- Matrice formée par 1 simple brin, dNTP, Mg<sup>++</sup>
- Amorce ARN avec OH libre en 3'
- Hélicases, gyrases (topoisomérases)

	ADN polymérase I	ADN polymérase II	ADN polymérase III
Structure	Monomérique	> 4 sous unités	> 10 sous unités (core + clamp + protéines associées)
Rôle	Elimine les amorces lors de la réplication + réparation	Réparation de l'ADN	Réplication de l'ADN génomique
Polymérisation 5' → 3'	Oui	Oui	Oui (sous-unité α)
Exonucléase 3' → 5'	Oui	Oui	Oui (sous-unité ε)
Exonucléase 5' → 3'	Oui	Non	Non
Vitesse de polymérisation	16-20 bases / sec	5-10 bases / sec	250-1000 bases / sec

Tableau récapitulatif des principales polymérases procaryotes (il existe d'autres polymérases : Pol IV et V)

- L'élongation est mono directionnelle 5'-3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »

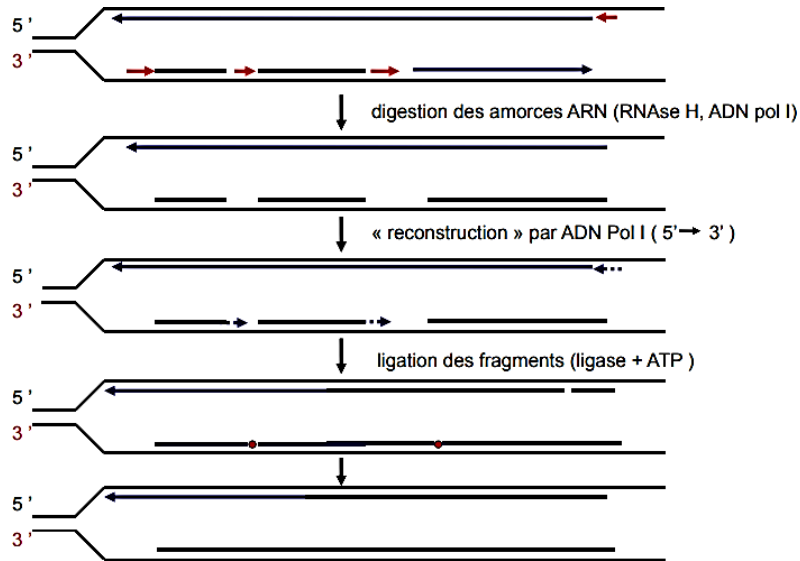


### ➤ Finition du brin

-A chaque segment il y a recrutement d'une primase pour la synthèse d'une amorce d'ARN constitué de 10 à 50 nucléotides selon l'espèce.

-Par la suite les amorces vont être détruites par des protéines à activité ribonucléasique telles que des RNases, et l'ADN polymérase I va compléter la brèche entièrement.

-La dernière liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' du premier fragment et l'extrémité 3' du deuxième fragment, ce qui correspond à l'épissage, sera réalisée par la ligase.

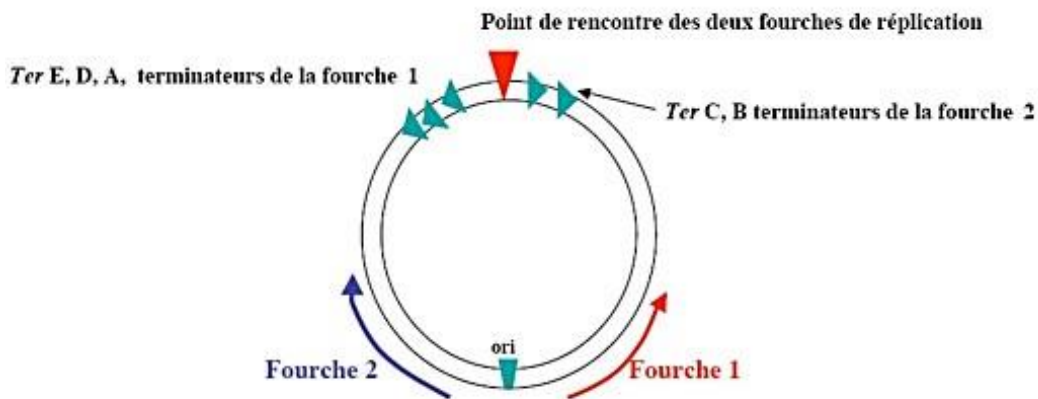


#### ➤ 4. Phase de terminaison

-Présence de séquences « terminator » pour chacune des deux fourches.

-La protéine Tus (terminator utilisation substance) reconnaît les séquences d'arrêt de réplication et bloque DnaB.

- Intervention d'une topoisomérase IV pour catalyser la séparation des 2 chromosomes.



## Réplication chez les eucaryotes :

### ➤ Spécificités liées aux génomes eucaryotes :

- Taille des génomes eucaryotes = 2/4 milliards pb (procaryotes : Coli = 4 millions pb)
- Structure chromatinienne : chez les eucaryotes l'ADN est associé à des **histones** qui vont être un frein à la réplication
- ADN linéaire (télomères) : le mécanisme réplcatif ne permet pas de répliquer l'intégralité du télomère

-Les longs chromosomes eucaryotes comportent **un grand nombre d'origines** : les deux fourches parties d'une origine donnée progressent jusqu'à rencontrer les fourches parties d'origine voisines.

-**La multiplicité des origines** de réplication fait que **la duplication de l'ADN eucaryote s'avère globalement plus rapide que celle de l'ADN procaryote** bien que la vitesse de déplacement de la fourche de réplication soit plus lente.

-**La taille des fragments d'OKAZAKI** : Chez les eucaryotes ces fragments ont une taille de **100 à 200 bases** alors que ceux des procaryotes, la taille varie de 1000 à 2000 bases.

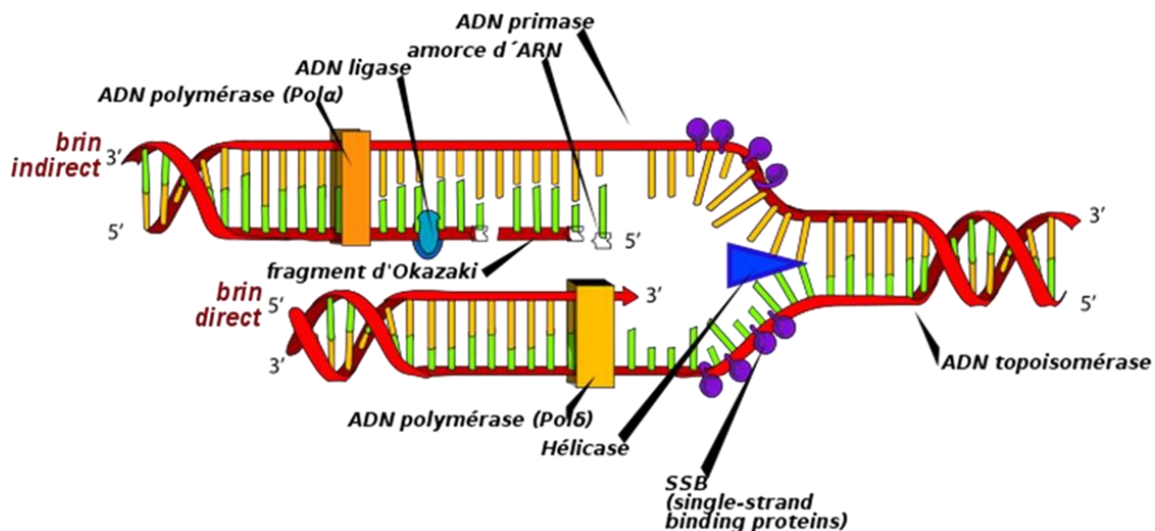


Figure : Schémas représentatif des différentes étapes de la réplication de l'ADN

### ➤ Chez les eucaryotes, l'ADN est répliqué par 5 ADN polymérases ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ ).

-L'ADN polymérase  $\alpha$  : enzymes à 2 activités de polymérisation

➤ agit comme une primase (synthétisant une amorce d'ARN)

- puis comme une ADN polymérase allongeant cette amorce avec des dNMP. ( $\alpha$  synthétise le brin retardataire)
- constituée de quatre sous-unités : ✓ la sous-unité catalytique POLA1 ✓ la sous-unité régulatrice POLA2 ✓ la petite et la grande sous-unité de la primase, PRIM1 et PRIM2.
- L'ADN polymérase  $\delta$  synthétise le brin précoce, possède une activité 3'→5'
- L'ADN polymérase  $\epsilon$  est impliqué dans la réparation de l'ADN, reste fixé sur l'ADN et est maintenu par un complexe protéique spécifique, possède une activité d'auto correction 3'→5', qui lui permet d'éliminer un désoxynucléotide non complémentaire qui est là par erreur.
- L'ADN polymérase  $\gamma$  réplique l'ADN mitochondriale.
- L'ADN polymérase  $\beta$  supprime l'ARN amorce et assure la synthèse et la réparation de l'ARN amorcé.
- Seules les ADN polymérases  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  ont une activité d'autocorrection (3'→5' exonucléase).
- Aucune des ADN polymérases eucaryotes n'a la capacité d'enlever les amorces d'ARN (pas d'activité 5'→3' exonucléase), cette étape est assurée par d'autres **enzymes (FEN1, RNase H)**.

#### ➤ **Autres protéines intervenant au niveau de la fourche de réplication**

Le plus compliqué pour répliquer l'ADN c'est de séparer les 2 brins de l'ADN parental. D'un point de vue expérimentale, si on veut séparer le double brin, il faut le placer dans un tube à essai avec une quantité d'énergie très importante. Il faut donc une machinerie très importante.

**-Complexe MCG (MCM – cdc45 – GINS) :** complexe hélicase qui permet la séparation des 2 brins de la double hélice avant le passage des ADN polymérases. MCG hydrolyse l'ATP et progresse d'environ 300 nucléotides par seconde. Elles utilisent l'ATP pour entraîner un mouvement dans la molécule.

**-RFC (replication factor C - clamp loader) :** le chargeur de pince permet l'ouverture et la mise en place de **PCNA**

**-Déroutases RPA (replication protein A) :** protéines qui n'ont pas d'activité catalytique mais sont capables de se fixer sur l'ADN monocaténaire et vont empêcher de reformer des doubles brins. Empêchent la formation de structures secondaires et protègent l'ADN simple brin de la dégradation.

**-Topoisomérases** : permettent d'éliminer les torsades positives qui s'accumulent en amont de la fourche de réplication et à l'ADN néo-synthétisée de se ré-enrouler correctement après le passage des ADN polymérase.

**-RNAses FEN1 et RNase H** : éliminent les amorces d'ARN.

**-ADN ligase Lig1** : reforme les liaisons phosphodiester entre les fragments d'Okazaki après l'élimination des amorces d'ARN.

## Fiche TD2

**Exercice 1 :** Dans l'expérience de Meselson et Stahl (1957), les pourcentages des différents molécules d'ADN en fonction de leur densité sont portés dans le tableau suivant :

Génération	Lourd (%) : N <sup>15</sup> / N <sup>15</sup>	Intermédiaire (%) : N <sup>15</sup> / N <sup>14</sup>	Léger (%) : N <sup>14</sup> / N <sup>14</sup>
0	100	0	0
1	0	100	0
2	0	50	50
3	0	25	75
4	0	12	88

1. Donnez l'aspect technique de cette expérience (schémas)
2. A quelles questions répond cette expérience ?
3. A quoi correspond les résultats du tableau ci-dessus ?

**Exercice 2 : Vrai ? Faux ? Pourquoi ?**

**1. Concernant la réplication de l'ADN :**

- a. Elle est fondamentalement différente chez les eucaryotes et chez les procaryotes.
- b. Elle permet le maintien de l'intégrité du patrimoine génétique de génération cellulaire en génération cellulaire.
- c. Elle fait passer une cellule eucaryote somatique d'un statut N à un statut 2N.
- d. Elle nécessite la présence de Ca<sup>2+</sup>.
- e. Dans une cellule humaine, elle nécessite environ 24 heures.

**2. Concernant les ADNPol répliquatives eucaryotes :**

- a. L'ADNPol  $\alpha$  intervient la première après la synthèse de l'amorce d'ARN.
- b. L'ADNPol  $\alpha$  participe à la synthèse du brin discontinu.
- c. Les ADNPol  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  possèdent une activité exonucléasique 3'-5'.
- d. Les ADNPol  $\delta$  et  $\epsilon$  nécessitent la coopération de la protéine RP-A pour maintenir leur association à l'ADN.
- e. Toutes les ADNPol synthétisent les brins d'ADN dans le sens 5'-3'

**3. Concernant les télomérases :**

- a. Ce sont des enzymes dégradant les extrémités des chromosomes.
- b. Ce sont des ADN-polymérase ARN-dépendantes.
- c. Elles sont exprimées dans toutes les cellules eucaryotes.
- d. Elles sont capables de reconnaître une séquence spécifique d'ADN.
- e. Elles contiennent leur propre amorce.

**Exercice 3 :**

1. Le génome humain fait  $3.10^9$  nucléotides et se réplique en 8H. Combien d'ADN polymérase sont-elles nécessaires pour cette répllication ?
2. *E. coli* possède un génome circulaire de  $4,7.10^6$  nucléotides. Combien de temps faut-il pour répliquer tout le génome ?

**Exercice 4 :**

Résumez dans un tableau les différences entre les réplifications eucaryote et procaryote.

## TD 3 : Régulation de l'expression des gènes

### Rappel de cours :

La régulation de l'expression des gènes passe avant tout par la régulation de la transcription et de l'expression des ARNm, qui aboutit à réguler la production et la nature des protéines. Elle est assurée de plusieurs façons :

- **Régulation quantitative :**

- Modulation du niveau de transcription d'un gène
- Régulation de l'accumulation des ARNm

- **Régulation qualitative :**

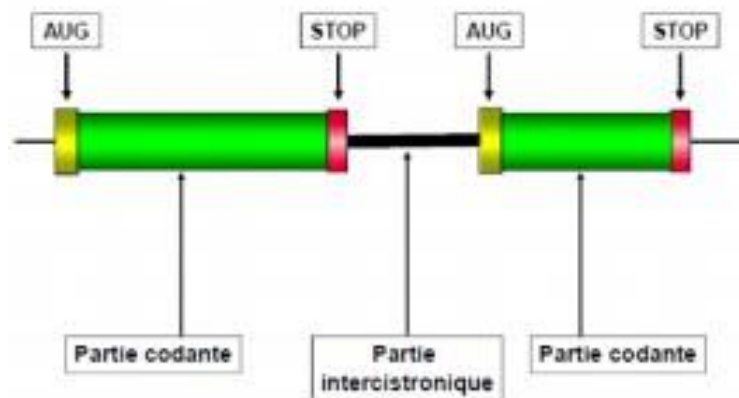
- Structure des ARNm
- Modifications de la séquence codante

### -RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

➤ **Chez les procaryotes :**

- Chez les procaryotes, l'ARNm est polycistronique : il présente plusieurs séquences codantes.

-Un cistron est une séquence codante encadrée par AUG puis STOP  
- Certains ARNm peuvent avoir plus de 2 cadres de lectures



- Indépendantes, chacune entourée d'un codon Start et d'un codon stop.
- En général, toutes les protéines codées par un même ARNm polycistronique sont produites simultanément et de manière coordonnée, et interviennent dans une même séquence biochimique.

- Les gènes vont donc souvent être organisés en opérons. Un opéron est un ensemble de gènes ayant vocation à fonctionner de manière coordonnée de façon à produire les protéines répondant à une voie physiologique bien intégrée, ainsi qu'à apporter les mécanismes de régulation de cette voie.
- **Exemple : régulation transcriptionnelle de l'opéron lactose dans le génome d'*E-coli* qui est un exemple de gène inductible (c'est-à-dire que les gènes sont exprimés quand cela est nécessaire par inactivation d'un répresseur).**

- **L'opéron lactose:**

L'opéron est une unité d'expression et de régulation des gènes bactériens constituée de gènes de structure et d'éléments de contrôle reconnus par le ou les produits des gènes régulateurs c'est-à-dire le regroupement dans l'espace, sur le même chromosome, de gènes nécessaires à une même fonction métabolique. L'opéron possède un promoteur et un opérateur.

- Composé d'un gène de structure avec 3 cadres de lectures :

- **Lac Z** : code pour la  $\beta$ -galactosidase (clive le lactose en Glu + Gal)

- **Lac Y** : code pour la  $\beta$ -galactosyl-perméase (assure la perméabilité de la bactérie au lactose, permet les échanges de sucres à travers la membrane)

- **Lac A** : code pour la  $\beta$ -galactoside trans-acétylase (rôle inconnu de l'acétylation)

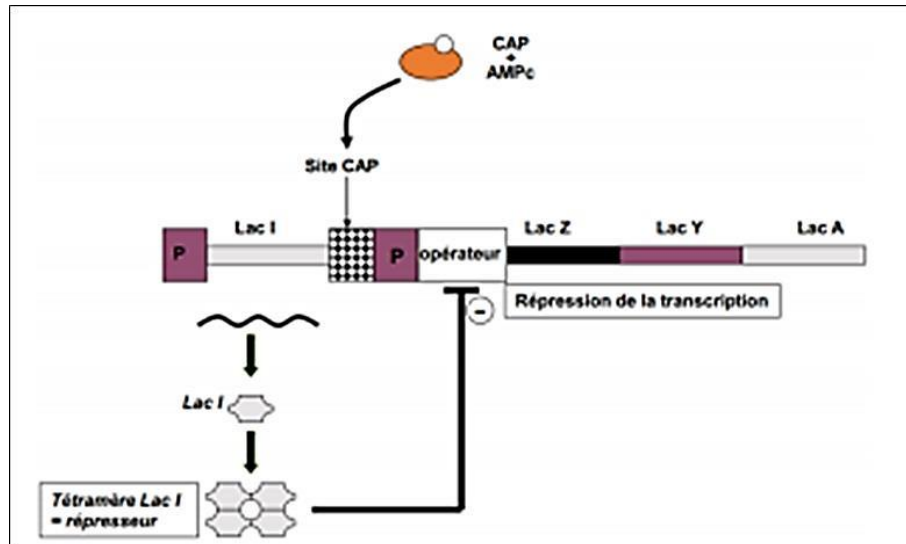
- Le promoteur de ces trois gènes possède :

- En amont : **un site CAP** fixant une protéine CAP activée par **l'AMPC** : la fixation induit l'activation du promoteur et donc la transcription des gènes de structure.

- En aval : **un opérateur**, qui est une séquence d'ADN sur laquelle se fixe des protéines régulatrices **permettant la régulation transcriptionnelle de l'opéron.**

- Un gène de l'inhibition de la voie, **Lac I**, qui est un répresseur de la transcription sous forme tétramérique qui va se fixer sur l'ADN opérateur et bloquer la transcription. Le répresseur peut se lier au lactose et devient alors inactif.

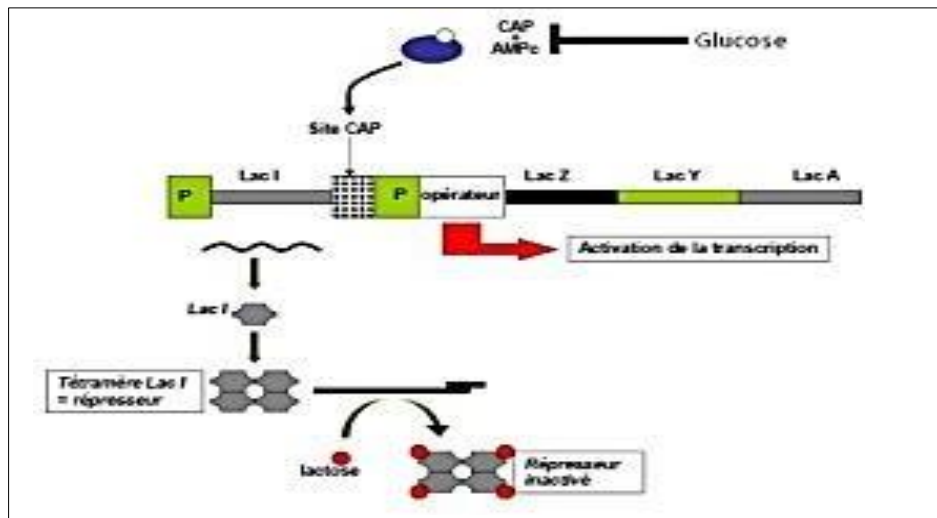
- **Le gène Lac I** possède son propre promoteur.



• Le gène de structure est doublement contrôlé :

-Le tétramère Lac I fixe le lactose, et quand il est fixé au lactose, il ne peut pas se fixer à l'opérateur. Il ne bloque donc pas la transcription----- → la répression est levée.

- Le glucose inhibe l'AMPc, qui n'active donc pas la protéine CAP

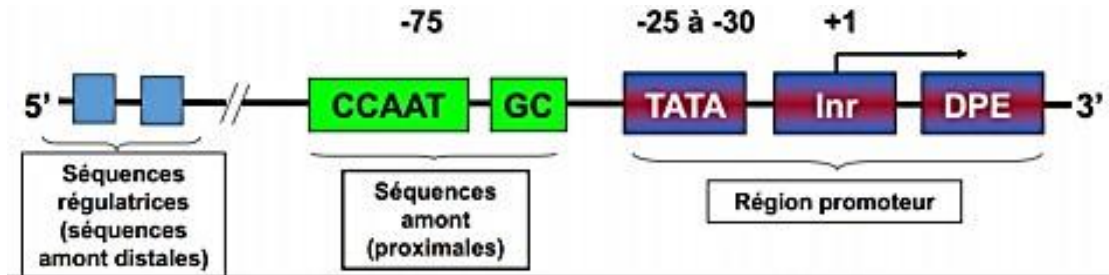


Pour que la transcription ait lieu, il y a donc deux conditions :

- Il faut que le répresseur soit inactif
- Le promoteur soit actif.

➤ **Chez les eucaryotes :**

- **Structure générale des régions assurant le contrôle de la transcription des gènes eucaryotes**



- **Région promoteur :**

- Boîte TATA de -25 à -30 : lieu de fixation du facteur général de transcription TFIID et du complexe basal de transcription.
- Boîte DPE (dans certains gènes) : lieu de fixation de facteurs qui constituent des éléments du complexe basal de transcription.
  - Inr : site d'initiation de transcription.

- **Séquences amont :**

- Boîtes CG et CCAAT = séquences amont proximales à lieux de fixation des protéines indispensables à la transcription (pas spécifiques du tissu).
- Boîtes « séquences régulatrices » = séquences amont distales : très éloignées du promoteur
  - Fixation des facteurs régulateurs de la transcription (activité très spécifique du tissu, assurant une spécificité de réponse).
  - Induisent une modulation de l'intensité de la transcription = régulation quantitative
  - Peuvent être très proche ou très éloigné du gène concerné
  - Assurent une interaction indirecte avec le médiateur
  - L'unité de transcription des eucaryotes comporte une origine (base +1, Inr) et un point de fin de la transcription (avec une séquence de terminaison). Le transcrit primaire comporte aussi bien les portions codantes (exons) que non codante (introns). L'unité de transcription va de la première à la dernière base transcrite
- **Les facteurs régulateurs eucaryotes :**

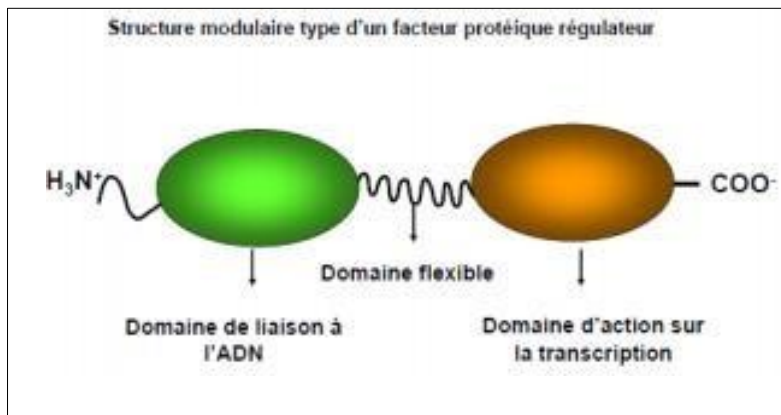
-Les facteurs régulateurs eucaryotes ont un rôle de régulation de la transcription. Ils permettent de moduler positivement ou négativement la transcription en réponse à des stimuli externes spécifiques.

-Ils sont soit synthétisés, soit activés à des instants précis et/ou dans des tissus spécifiques et permettent donc le contrôle de la transcription dans le temps et dans l'espace et en fonction des conditions environnantes. Ils se lient sur des séquences régulatrices aussi appelés éléments de réponse (ou RE pour response element).

### **Structure générale des facteurs régulateurs chez les eucaryotes :**

-Les facteurs régulateurs contiennent :

- Un domaine de liaison à l'ADN (en N-ter) : souvent composé d'AA basiques favorisant l'adhésion à l'AN.
- Un domaine d'action sur la transcription (en C-ter) : rôle d'activation ou d'inhibition, interaction avec les protéines impliquées directement dans la transcription (riche en Gln).
- Un domaine flexible entre les deux



**Fiche TD3**

**Exercice 1 :**

Chez les mammifères, la post-hypophyse élabore des hormones de nature polypeptidique : l'ocytocine qui favorise les contractions utérines.

Extrait de la séquence de bases de la portion d'ADN non transcrit pour l'ocytocine

T G C T A C A T C C A G A A C T G C C C C C T G G G C

- 1) Ecrire le brin d'ARN messenger correspondant
- 2) Ecrire la séquence d'acides aminés correspondant à l'ARN messenger.

**Exercice 2 :**

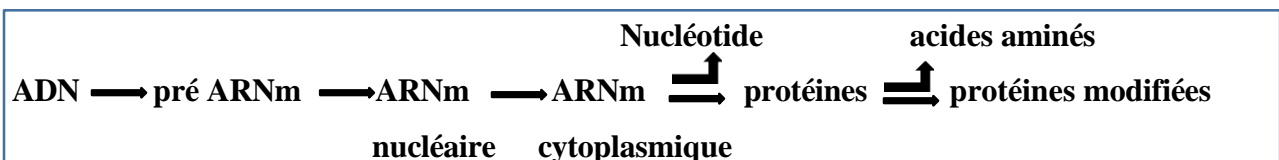
Des mutations ont des conséquences spécifiques sur l'expression de l'opéron lactose quand seul le lactose est disponible comme seule source de carbone.

Décrivez les conséquences dans les trois cas suivant :

- 1- Mutation dans le site de liaison de CAP dans le promoteur de l'opéron.
- 2- Mutation dans le gène LacI qui produit un répresseur se liant de façon constitutive à l'opérateur.
- 3- Mutation dans l'opérateur qui modifie le site de reconnaissance du répresseur qui ne peut plus s'y lier.

**Exercice 3 :**

En principe les cellules eucaryotes peuvent réguler l'expression des gènes à toutes les étapes allant de l'ADN à la protéine active :



1. Placez les types de contrôle décrits ci-dessous à la bonne place sur le diagramme ci-dessus (marquez le/les numéros correspondant à chaque flèche) :

- 1- **Contrôle de la stabilité-dégradation des ARNm.**
- 2- **Contrôle de la maturation des protéines**
- 3- **Contrôle de la maturation des ARN.**

#### 4-Contrôle du transport nucléaire et de la localisation.

#### 5-contrôle de la transcription.

#### 6-contrôle de la traduction.

2. Parmi ces différents niveaux de contrôle, le (s) quel (s) ne sera (seront) pas utilisé(s) par une bactérie ?

#### Exercice 4 : QCM

##### 1. A propos de la régulation de l'opéron lactose, quelles propositions sont vrai ?

- a. En présence simultanée de glucose et de galactose l'opéron est inactif
- b. Pour que l'opéron soit activé il faut que le répresseur soit lié à l'inducteur
- c. Pour que l'opéron soit activé il faut que la protéine CAP soit liée à l'AMPc
- d. Quand l'opéron est actif le répresseur n'est pas lié à l'opérateur
- e. Quand l'opéron est actif la protéine CAP n'est pas liée à son site de liaison proche du promoteur *lac*

##### 2. Quelles sont les affirmations vraies à propos de la traduction ?

- a. Dans les ARNm cytoplasmiques d'une cellule mammifère les codon STOP rencontrés sont AUA, UAA et UAG
- b. La synthèse d'un ARNm s'arrête au niveau d'un codon STOP
- c. Grâce au Wobble une cellule n'a pas besoin d'autant d'aa-ARNt que de codon
- d. Une molécule d'ARNm interagit avec un ribosome à la fois
- e. La traduction d'un ARNm peut débuter dans le noyau, mais s'achève toujours dans le cytoplasme d'une cellule eucaryote.

##### 3. Les différences entre transcription chez les procaryotes et chez les eucaryotes peuvent être illustrées par les affirmations suivantes :

- a. Chez les procaryotes, un ARNm peut être en contact avec des ribosomes avant la fin de sa synthèse
- b. Chez les eucaryotes, un ARNm est synthétisé dans le noyau sous forme d'un précurseur, pré ARNm, mûré ensuite dans le cytoplasme
- c. Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II est nécessaire et suffisante pour initier la transcription d'un ARNm

- d. La mise en jeu de l'ARN polymérase II eucaryote nécessite l'assemblage d'un grand nombre de protéines au niveau du promoteur, contrairement à la mise en jeu de l'ARN polymérase bactérienne
- e. Chez les eucaryotes, le site d'initiation de transcription est indiqué par la présence de la séquence 5'TATA

**4. Concernant l'excision- épissage d'un pré-ARNm :**

- a- Il consiste à supprimer les séquences intronique et à rabouter les exons entre eux
- b- Ce sont les exons qui sont excisés et les introns qui contiennent l'information
- c- Chez les eucaryotes, l'épissage des ARN a lieu dans le cytoplasme
- d- Il n'y a pas d'épissage chez les procaryotes car il n'y a pas d'intron
- e- Ce sont des ribozymes qui assurent l'épissage des pré ARNm

**5. Apparemment, nos cellules musculaires sont différentes de nos cellules nerveuse car :**

- a- Elles contiennent différents gènes
- b- Elles ont différents chromosomes
- c- Elles ont des ribosomes uniques
- d- Elles utilisent des codes génétiques différents
- e- Elles expriment différents gènes

## TD 4 : Mutation et mutagénèse

### **Rappel de cours :**

Une mutation est une modification de l'information génétique contenue dans l'ADN. Elle affecte la séquence par le remplacement d'un ou plusieurs nucléotides, l'insertion ou la délétion de quelques nucléotides. Elle peut être due à l'instabilité du génome, à des erreurs de copie ou de réparation lors de la multiplication des cellules ou de la reproduction sexuée, à des coupures de l'ADN, à des conditions environnementales ou à l'action ciblée du sélectionneur.

Les mutations sont la source de la variabilité dans une même espèce.

### **1. Causes des mutations :**

**Les mutations dans les gènes peuvent apparaître spontanément ou être induites.**

**A- Les mutations spontanées :** sont des mutations qui apparaissent naturellement et peuvent

toucher n'importe quelle cellule.

-Des erreurs dans la réplication de l'ADN, des lésions spontanées et même des éléments génétiques transposables peuvent être à l'origine des mutations spontanées.

▪ **Des erreurs dans la réplication de l'ADN :**

**1- Transitions**

**2- Transversions**

**3- Mutations par décalage du cadre de lecture**

▪ **Des lésions spontanées :**

**1- La dépurination**

**2- La désamination**

**3- Les bases endommagées par oxydation**

**B- Les mutations induites :** se produisent à la suite de l'action de certains agents appelés mutagènes qui augmentent le taux d'apparition des mutations.

➤ **Agents mutagènes chimiques tels que :**

• **Colchicine :** La colchicine peut induire une polyploïdie. Elle se lie à la tubuline et empêche la formation de nouveaux microtubules. Ceci inhibe alors la synthèse du fuseau de division et donc la séparation des chromatides durant la division cellulaire.

• **5-bromo-uracil** : Le 5-bromo-uracil est un analogue de la thymine. Il possède un atome de brome à la place du groupe méthyl dans la thymine. Lors de la réplication, il est souvent confondu avec la cytosine, de sorte qu'une guanine est incorporée dans l'ADN, à la place de l'adénine, ce qui conduira finalement à une substitution de bases.

➤ **Agents mutagènes physiques**

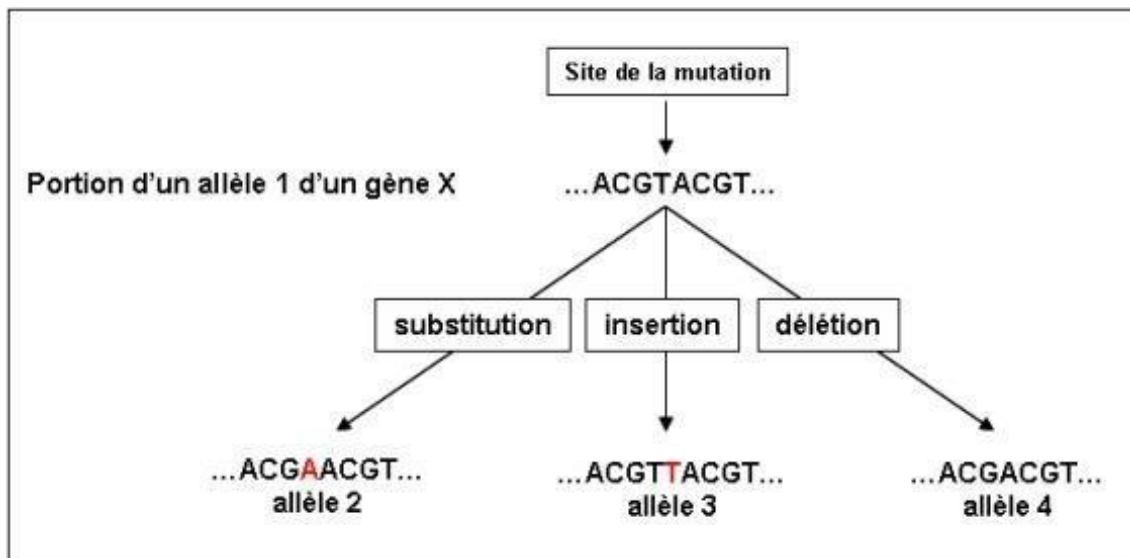
• **Rayons ionisants** : Les rayons ionisants (rayons X, rayonnement alpha, bêta ou gamma des substances radioactives) sont des rayonnements riches en énergie, qui transfèrent une partie de leur énergie aux molécules irradiées, qui en sont ainsi modifiées. Les rayons X, par exemples, induisent des cassures des chromosomes.

• **Lumière UV** : Le rayonnement UV induit la formation covalente de dimères de pyrimidine à partir de 2 pyrimidines adjacentes (T-T, T-C, C-C).

**2. Types de mutations :**

Dans la mutation génique, l'allèle d'un gène est changé en un autre allèle. Puisqu'un tel changement se produit à l'intérieur d'un seul gène et est localisé en un locus unique du chromosome, on appelle parfois les mutations géniques des mutations ponctuelles.

Lorsque la mutation ne concerne qu'une modification d'une paire de nucléotides (ou limitée à quelques nucléotides), on parle **de mutations ponctuelles** parmi lesquelles on peut distinguer :



- **Mutation par substitution** : remplacement d'un nucléotide par un autre. Cela arrive la plupart du temps à cause d'une erreur de lecture lorsque l'ADN est recopié, au cours de la division cellulaire par exemple.

- **Transition** : Purine remplacée par une purine différente ou pyrimidine remplacée par une pyrimidine différente. Exemple : A G, C T, etc.
- **Transversion** : Purine remplacée par une pyrimidine ou pyrimidine remplacée par une purine. Exemple : A C, A T, etc.
- **Mutation par addition / insertion** : gain d'un ou plusieurs nucléotide(s) au niveau de la séquence initiale.
- **Mutation par délétion** : perte d'un ou de plusieurs nucléotide(s) au niveau de la séquence initiale.

### 3. Conséquences des mutations ponctuelles :

Les mutations ont des conséquences variables sur le phénotype au sein d'une même espèce, de par leur nature, leur localisation et le rôle du gène concerné. La modification de la séquence d'acides aminés d'une protéine par certaines mutations peut altérer la fonction de la protéine. Ces modifications vont avoir ainsi pour conséquence une modification du phénotype.

Les mutations peuvent être répertoriées en fonction des conséquences qu'elles induisent au niveau des protéines synthétisées.

- **Les mutations silencieuses** : une substitution peut avoir lieu sans conséquence sur le phénotype moléculaire.

-La séquence de l'ADN est modifiée mais pas la séquence en acides aminés de la protéine codée par le gène, du fait de la redondance du code génétique.

-La fonction de la protéine modifiée est ainsi maintenue intacte. Ces mutations ne s'expriment pas au niveau du phénotype.

**Portion du gène initial** > protéine initiale : ... AAG GTA ACG ACC ... > ... Phe His Cys Trp ...

**Portion du gène muté** > protéine mutée : ... AAA GTA ACG ACC ... > ... Phe His Cys Trp ...

- **Les mutations non-sens** : une substitution peut faire apparaître un codon stop qui arrête prématurément la traduction. La protéine se trouve ainsi écourtée et devient souvent non-fonctionnelle (ex : perte du site actif d'une enzyme).

... AAG GTA ACG ACC ... > ... Phe His Cys Trp ...

... AAG GTA ACT ACC ... > ... Phe His Stop

- **Les mutations faux-sens** : une substitution peut modifier un acide aminé lors de la traduction. Les conséquences à l'échelle de la cellule et de l'organisme dépendront des modifications structurales et fonctionnelles subies par la protéine. Celles-ci sont très

variables suivant les cas. Certaines de ces substitutions sont dites conservatrices (aucune modification des propriétés de la protéine) ou non conservatrices (changement plus ou moins important des propriétés de la protéine).

... AAG GTA ACG ACC ... > ... Phe **His** Cys Trp ...

... AAG TTA ATG ACC ... > ... Phe **Asn** Cys Trp ...

- **Les mutations par insertion ou délétion** d'une base azotée engendrent le décalage du cadre de lecture dans les segments d'ADN qui codent des protéines. Ces mutations sont dites décalantes. Ceci conduit à de nouveaux acides aminés à partir de ce site mutationnel et parfois à une terminaison anticipée (ou plus lointaine) de la chaîne polypeptidique.

... AAG **GTA** ACG ACC ... > ... Phe **His Cys Trp** ...

... AAG GAA CGA CC ... > ... Phe **Leu Ala** ...

## Fiche TD 4

### **Exercice 1 :**

Soit une protéine constituée de 302 acides aminés. On a isolé un fragment d'ADN contenant le début de la séquence codante du gène correspondant :

ATG ATC CAG CAA ACC AAA TGT AAC AAC TCG GCA GCT (brin non transcrit)

1. Écrivez la séquence nucléotidique du fragment d'ARNm codant pour le début de la protéine.
2. Déduisez, grâce au code génétique, le début de la séquence protéique.
3. On a isolé une protéine anormale dans laquelle la première sérine est remplacée par une arginine. Quelles mutations nucléotidiques peuvent expliquer ce changement d'acide aminé ?
4. Dans une pathologie, on trouve une forme écourtée de la protéine : seuls les 3 premiers acides aminés sont présents. Quelle mutation nucléotidique peut expliquer ce fait ?

### **Exercice 2 :**

Soit la séquence d'un fragment d'ADN transcrit :

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC.TAC.TTC.GAC.ACT5'

Donner le nom et la conséquence de la mutation.

- a) Changement du 9<sup>ième</sup> nucléotide : T en C.
- b) Changement du 25<sup>ième</sup> nucléotide : T en A.
- c) Changement du 30<sup>ième</sup> nucléotide : C en A.
- d) Entre le 31<sup>ième</sup> nucléotide et le 32<sup>ième</sup> nucléotide, on insère un T.

### **Exercice 3 : QCM**

**1. Parmi les facteurs ou mécanismes suivants, lesquels peuvent être considérés comme agents mutagènes :**

- A - les rayons infrarouges
- B - le bromure d'éthidium
- C - la réplication de l'ADN
- D - les rayons X
- E - le chlorure de magnésium

**2. Quelles sont les propositions qui sont exactes ?**

- A - dans un gène, une mutation par délétion n'est jamais silencieuse
- B - une mutation par délétion peut ne pas modifier le cadre de lecture

C - seule une substitution peut engendrer une mutation faux sens

D - une mutation ponctuelle peut aboutir à la synthèse d'une protéine plus longue que la protéine normale

E - les mutation par insertion sont plus rares que les mutations par délétion

## TD5 : Méthodologie en biologie moléculaire

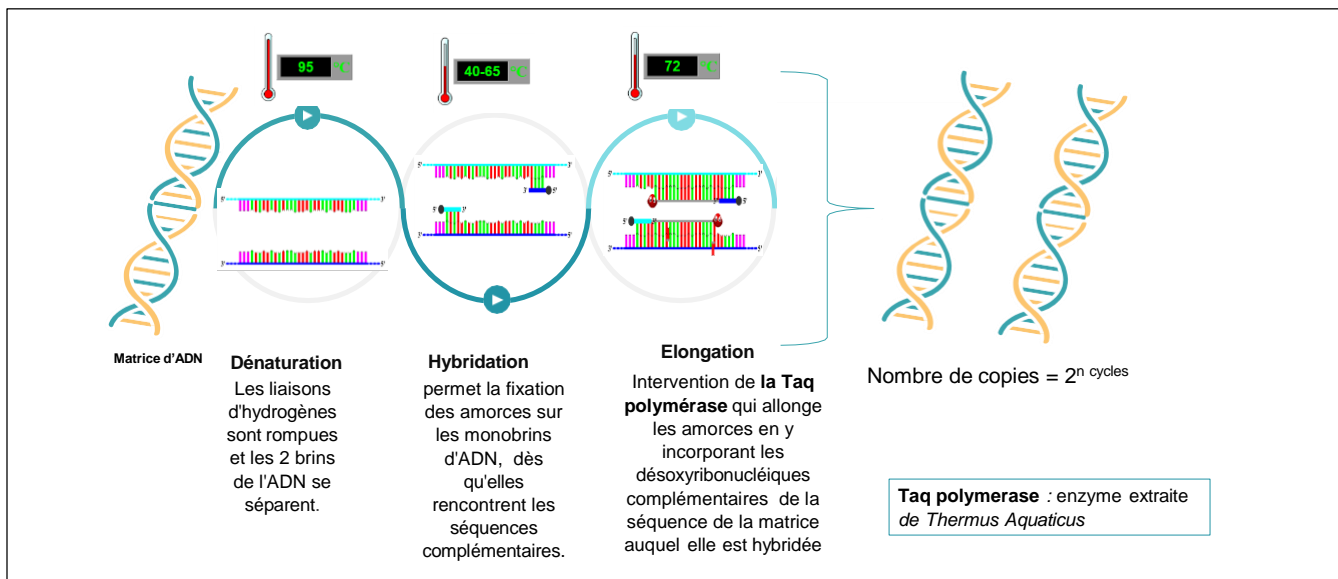
### Rappel du cours :

#### 1. La technique de PCR :

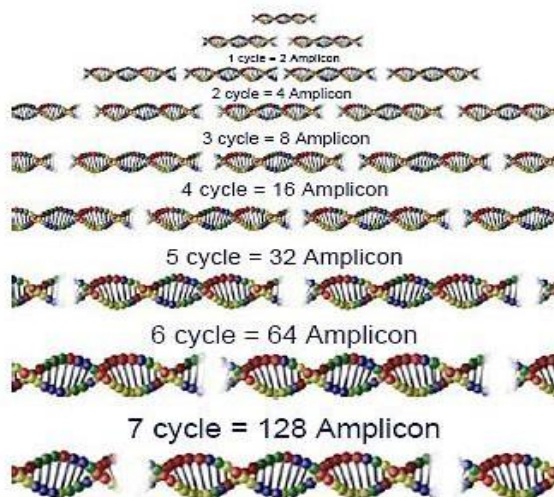
-La PCR (Polymerase Chain Reaction) repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une réplification (amplification) in vitro de séquences spécifiques d'ADN.

-Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

- **Principe de la PCR**

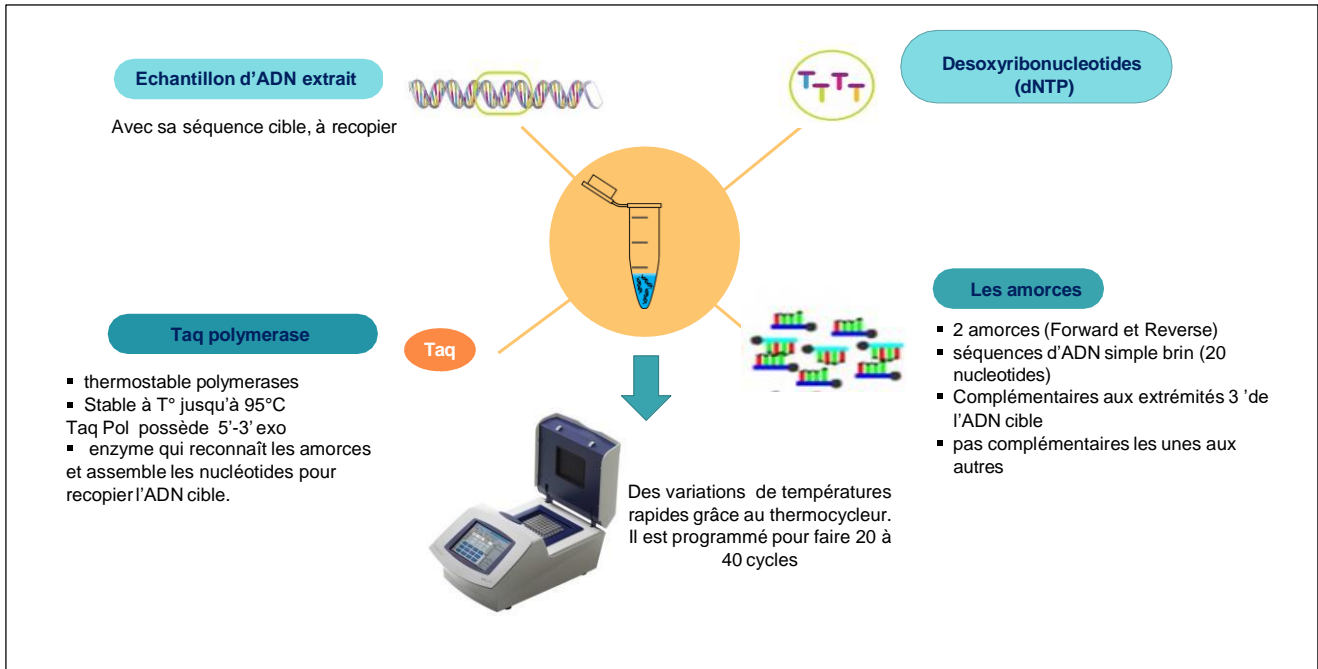


### Amplification exponentielle : > 1 milliard d'amplicons à 30 cycles



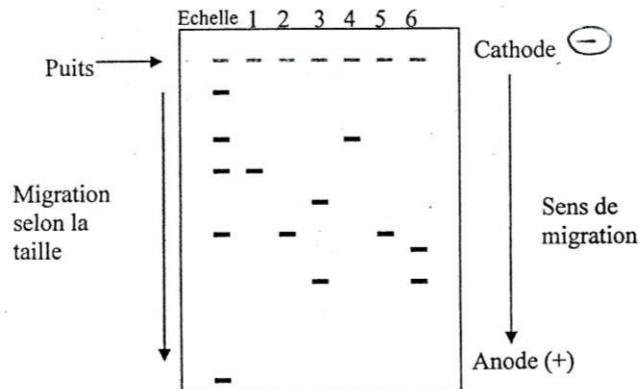
No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

- **Composition du milieu réactionnel de la PCR :**



- **Révélation des produits PCR par l'électrophorèse sur gel d'agarose :**

Les molécules d'ADN chargées négativement sous l'action d'un champ électrique, elles migrent vers l'anode. En passant au travers des mailles de l'agarose, les molécules d'ADN se séparent **selon leurs tailles** : plus elles sont grandes, moins elles migrent vite.



**Tableau des concentrations de l'agarose en fonction de la taille d'ADN recherché :**

<b>Concentration du gel en agarose (%)</b>	<b>Fourchette de tailles des fragments d'ADN (pb)</b>
<b>0,5</b>	<b>1000 – 30 000</b>
<b>0,7</b>	<b>800 – 12 000</b>
<b>1</b>	<b>500 – 10 000</b>
<b>1,2</b>	<b>400 – 7 000</b>
<b>1,5</b>	<b>200 – 3 000</b>
<b>2</b>	<b>50 – 2 000</b>

La visualisation des fragments d'ADN après électrophorèse s'effectue grâce au BET qui joue le rôle d'un intercalant fluorescent des bases nucléiques (orange à l'excitation aux UV), l'intensité de la fluorescence émise dépend de la quantité de BET intercalé.

## **2.Séquençage de l'ADN (Méthode de Sanger) :**

Le **séquençage de l'ADN** consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

-La réplication (ou duplication) de l'ADN nécessite la présence d'un brin modèle (**matrice**), d'une amorce complémentaire d'un fragment d'ADN qui jouxte la région à séquencer, des 4 nucléotides **dXTP**, **d'ADN polymérase**.

-La synthèse du brin complémentaire se faisant dans la direction 5'P vers 3'OH, le brin matriciel a l'orientation inverse ; l'amorce se lie du côté 3' de l'ADN matriciel ; l'ADN polymérase parcourt ce brin dans sa direction 3'-5' pour allonger l'amorce dans la direction correcte 5'-3'.

-Lorsque l'ADN polymérase identifie A sur le brin modèle, elle place T sur le brin en cours de synthèse (de même pour C et G).

-Quand des **ddXTP** (didésoxyribonucléotide) sont utilisés :

L'enzyme place soit 1 dXTP et l'élongation de l'amorce se poursuit, soit 1 ddXTP et la synthèse s'arrête. On obtient au final une série d'oligonucléotides de taille variable, tous terminés par ddX

(X = A, G, C, T selon le milieu). Le résultat de l'électrophorèse des 4 milieux donne directement la séquence de l'ADN complémentaire à la séquence recherchée.

<b>Fiche TD 5</b>
-------------------

**Exercice 1 :****1. Pour réaliser une expérience d'amplification de gène par PCR, il faut :**

- A. une matrice d'ARN, des amorces spécifiques, des ions  $Ca^{2+}$ , des dNTPs, une ARN polymérase, ARN dépendante
- B. une matrice d'ADN, des amorces spécifiques, des ions  $Mg^{2+}$ , des dNTPs, une ADN polymérase ADN dépendante
- C. une matrice d'ADN, des amorces spécifiques, des ions  $Ca^{2+}$ , des dNTPs, une ADN polymérase ADN dépendante
- D. une matrice d'ADN, des amorces spécifiques, des ions  $Mg^{2+}$ , des NTPs, une ADN polymérase ADN dépendante

**2. Pour évaluer la pureté d'un échantillon d'ADN par rapport aux protéines, vous mesurez par spectrométrie :**

- A. la densité optique à 260nm
- B. le rapport de densité optique à 260nm et 280nm
- C. la densité optique à 280nm

**3. Quelle(s) molécule(s) permet (tent) de visualiser des fragments d'ADN séparés par électrophorèse ?**

- A. le bromure d'éthidium
- B. le bromure de potassium
- C. l'actinomycine D
- D. la green fluorescent protein (GFP)

**Exercice 2 :**

1. Parmi les séquences oligonucléotidiques suivantes lesquelles vous paraissent susceptibles d'hybrider avec le fragment d'ADN ci-après.

Oligo 1 : 5' CGGGCACCCGGGTTA 3'

Oligo 2 : 5' CCCGGGGATCCCGGG 3'

Oligo 3 : 5' GACTGATCTGACATG 3'

Oligo 4 : 5' GAGAAACTGACTGAC 3'

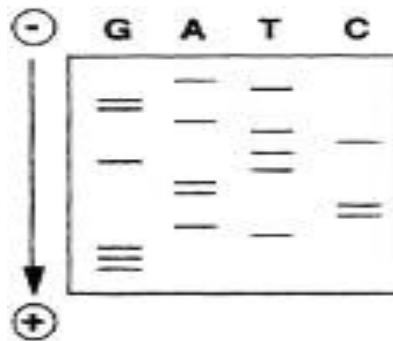
5'ATCGGTGATCTGCAGTCCCGATCGGGCACCCGGGTTAGCGATCGTTTAATGGGTTCG  
 GCCCGGGGATCCCGGGCCTGGACTGATCTGACATGGTGTTCAGTCAGTTTCTC 3'

2. Vous réalisez un séquençage de ce fragment d'ADN par la méthode de Sanger avec l'amorce oligonucléotidique simple brin suivante : 5' TCAGATCAGTCCAGG 3'.

Schématisez l'autoradiographie du gel de séquençage que vous devriez obtenir.

**Exercice 3 :**

L'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide réalisée pour déterminer la séquence d'un ADN selon la méthode de Sanger est représentée ci-dessous. Chaque indication figurant sur le schéma en haut du gel : G, A, T, C correspond à l'incubation en présence d'un des 4 didésoxynucléotides triphosphate.



1. Donnez la séquence du brin néo-synthétisé
1. Déduisez la séquence de l'ADN matrice
2. Proposez une amorce permettant de séquencer les 10 dernières bases.

# **Les solutions des fiches TD**

## Corrigé type TD1

### Exercice 01 :

5'ATCGTTCG3'

1. 5' signifie **P 5'** (position du C5 du premier désoxyribose lié au phosphate libre)  
3' signifie **OH 3'** (position du C3 du dernier désoxyribose lié à OH libre)
2. Séquence complémentaire : 3'TAGCAAGC5'

- Aucune réponse ne correspond à la séquence complémentaire

### Exercice 02 :

ADN dans une cellule diploïde =  $6,4 \cdot 10^9$  pb

1. La longueur de la double hélice formée :

$$\begin{array}{l} 1\text{pb} \longrightarrow 0,34\text{nm} \\ 6,4 \cdot 10^9\text{pb} \longrightarrow X \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1\text{pb} \\ 6,4 \cdot 10^9\text{pb} \end{array}} \right\} \quad \frac{6,4 \cdot 10^9 \times 0,3}{1}$$

$X = 2176 \cdot 10^6 \text{ nm} \quad (1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}) \quad \boxed{x = 2,176 \text{ m}}$

2. Homme possède 23 paires de chromosome = **46** chromosomes

La longueur de l'AND par chromosome =  $2,176 \text{ m} / 46 = \mathbf{0,0473 \text{ m}}$

> **Longueur du chromosome = 4,73 cm**

3. Taux de compaction = longueur de molécule étalée / longueur de molécule condensé

La taille moyenne d'un chromosome en métaphase est d'environ  $6 \mu\text{m}$ .

Donc le **taux de compaction** =  $4,73 \cdot 10^3 \mu\text{m} / 6 \mu\text{m} = \mathbf{0,78 \cdot 10^3} = 7,8 \cdot 10^4$

### Exercice 03 :

**1. Définition de Tm** : est la température à laquelle 50 % des molécules sont sous forme double brin.

**2. Relation entre Tm et teneur en GC :**

D'après les résultats présentés dans le tableau on remarque que la Tm varie d'une espèce à une autre et qu'elle est proportionnelle aux % GC (quand %CG augmente, la Tm augmente aussi)

**3. L'intérêt de Tm :**

- La dénaturation de l'ADN

- Calcul de la température d'hybridation des amorces lors d'une PCR

## **Exercice 04 :**

### **1. Structure des ADN :**

ADN A : A=T, C=G double brin

ADN B : A≠T, G≠C simple brin

ADN C : A=T, G=C double brin

### **3. Classement des ADN en fonction de l'ordre décroissant des Tm :**

Tm A CG = 70

Tm B CG = 70

Tm C CG = 4

D'après les résultats des pourcentages de CG des différents ADN et puisque la Tm dépend de la teneur en GC (plus le % GC est élevé plus la température TM est élevée)

Donc : ADNA > ADN B > ADNC

### **3. Traitement avec exonucléases :**

ADNA hydrolysé linéaire

ADNB hydrolysé linéaire

ADNC résistant circulaire

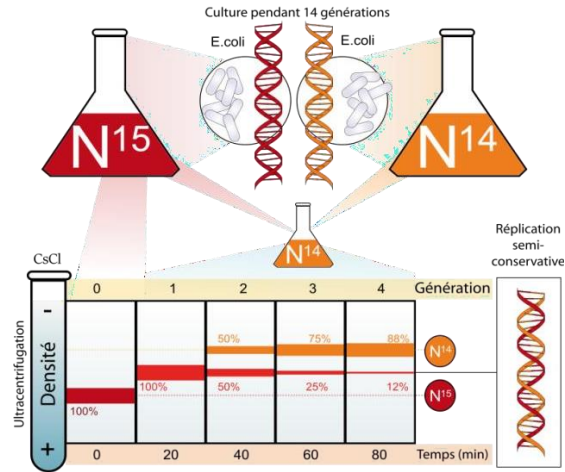
**4. Mode d'action des exonucléases :** hydrolyse le nucléotide situé à l'extrémité 5' ou 3' libre de l'ADN linéaire.

L'ADN C est résistant : il ne contient pas d'extrémités libres, il est circulaire

## Corrigé type fiche TD2

### Exercice 1:

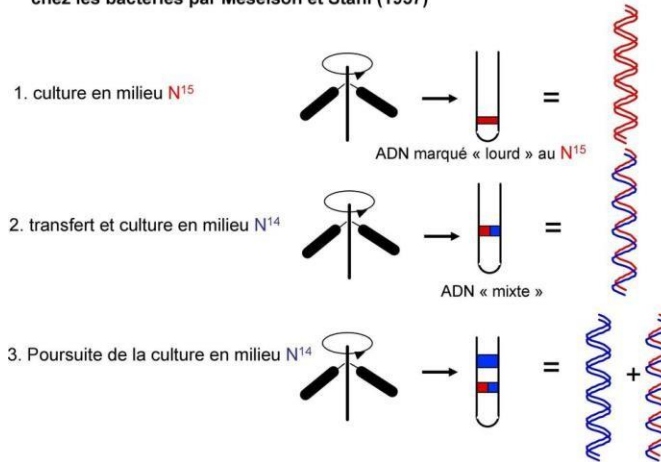
#### 1. L'aspect technique de l'expérience :



2. Cette expérience répond à la question : le mécanisme de réplication se fait selon quel modèle ? modèle conservatif, semi-conservatif ou dispersif ?

3 Le résultat de ces expériences concorde avec le modèle semi-conservatif de la réplication de l'ADN, la proportion d'ADN léger augmentant avec le nombre de générations s'étant divisées dans le milieu contenu du <sup>14</sup>N.

**Mise en évidence expérimentale de la réplication semi conservative chez les bactéries par Meselson et Stahl (1957)**



### Exercice 2 :

1.a. **FAUX** : les modalités générales sont relativement proches (réplication semi-conservative, bidirectionnelle, asymétrique) ainsi que les propriétés des ADNPol. (Elle est cependant plus complexe chez les eucaryotes (ADN linéaire et beaucoup plus long, présence d'histones, très nombreux cofacteurs protéiques au sein du réplisome,...)).

**b. VRAI** : car les brins néo-synthétisés le sont en calquant l'information portée par les brins parentaux grâce au système de complémentarité des bases. De plus, la réplication est un processus d'une fidélité admirable.

**c. FAUX** :  piège ! Les cellules eucaryotes somatiques (c'est à dire hors gamètes) sont 2N. La réplication les fait passer à un statut 4N.

**d. FAUX** : la réplication nécessite du  $Mg^{2+}$  afin de stabiliser les nucléosides triphosphates servant de substrats aux polymérase.

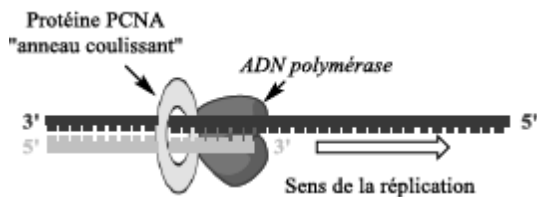
**e. FAUX** : dans les cellules humaines, en moyenne 6 à 8 heures.

## 2. a. VRAI

**b. VRAI** : elle synthétise les premiers nucléotides de chaque fragment d'Okasaki, après action de la *primase*.

**c. FAUX** : pas l'*ADN Pol α*.

**d. FAUX** : la protéine facilitant l'association des *ADN Pol δ* et *ε* à l'ADN est la protéine PCNA qui enserre le brin matrice et le brin en cours d'élongation à la façon d'un collier coulissant.



**e. VRAI** : règle ABSOLUE!

**3. a. FAUX** : piège ! Le suffixe « ase » pourrait le faire penser mais au contraire, elles reconstruisent les télomères.

**b. VRAI** : autrement dit des transcriptases inverse.

**c. FAUX** : elles ne le sont que dans les cellules embryonnaires et les cellules souches dont la capacité de prolifération doit rester permanente. Dans les cellules « adultes », le raccourcissement progressif des télomères est physiologique, servant d'horloge biologique : en deçà d'une certaine taille, la cellule déclenche son apoptose. (Dans les cellules **cancéreuses**, l'expression des télomérases est souvent réactivée, ce qui leur confère l'immortalité.)

**d. VRAI** : la séquence TTAGGG.

**e. VRAI** : il s'agit d'une séquence d'ARN AAUCCC qui permet de reconnaître la séquence TTAGGG des télomères. Les télomérases sont des ribonucléoprotéines.

## Exercice 3 :

**Sachant que :**

**-La vitesse d'assemblage d'ADN polymérase est : 1000 nucléotides/s pour les procaryotes, 100 nucléotides/s pour les eucaryotes**

-Pour chaque fourche de réplication ya l'action de 2 ADN polymérases (une pour le brin continue et une pour le brin discontinue)

1. Le génome humain fait  $3 \cdot 10^9$  nucléotides

Calcul du temps nécessaire pour une enzyme :  $3 \cdot 10^9 / 100 = 3 \cdot 10^7$  secondes

Or : 8h = 28800 secondes

$3 \cdot 10^7$  secondes / 28800 secondes = 1041.66 ADN polymérases = approximativement 1042 enzymes

2. Génome *E.coli* circulaire de  $4.7 \cdot 10^6$  nucléotides

Temps nécessaire pour une enzyme : de  $4.7 \cdot 10^6 / 1000 = 4.7 \cdot 10^3$  secondes

$4700 / 60 = 78$  minutes pour 1 ADN polymérase

Génome *E. coli* circulaire donc 1 seul fourche de réplication (2 ADN polymérases)

$78/2 = 39$  minutes temps nécessaire pour la réplication de tout le génome.

**Exercice 4:**

	<b>Procaryotes</b>	<b>Eucaryotes</b>
<b>Origines de la replication</b>	Unique	Multiplés
<b>Début de la réplication</b>	N'importe quand	Juste avant la mitose
<b>Désenroulement de l'ADN</b>	<i>Gyrase,</i> <i>Topoisomérase I</i>	<i>Topoisomérase I et II</i>
<b>Début de la polymérisation</b>	<i>ADNPol III</i>	<i>ADNPol <math>\alpha</math></i>
<b>Polymérisation brin continu</b>	<i>ADNPol III</i>	<i>ADNPol <math>\epsilon</math></i>
<b>Polymérisation brin discontinu</b>	<i>ADNPol III</i>	<i>ADNPol <math>\delta</math></i>
<b>Protéine de liaison au brin monocaténaire</b>	SSB	RP-A

<b>Anneau coulissant</b>	/	PCNA
<b>Taille des fragments d'Okasaki</b>	1000-2000	100-200
<b>Hydrolyse des amorces</b>	<i>ADN Pol I</i>	<i>RNAse H - Fen-1</i>
<b><i>Téломérase</i></b>	Non (chromosome circulaire)	Oui

### Corrigé type TD3

#### Exercice 1 :

**ADN non transcrit :** 5'T G C T A C A T C C A G A A C T G C C C C C T G G G C 3'

1) **ARNm :** 5'UGCUACAUCCAGAACUGCCCCCUGGGC 3'

2) **Protéine :** Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly

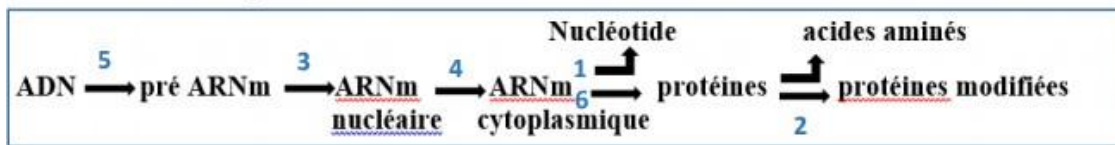
#### Exercice 2 :

##### Les conséquences des mutations :

- 1) Absence de liaison de l'ARN polymérase, donc pas de synthèse des gènes Lac.
- 2) Le répresseur empêche l'accès à l'ARN polymérase, donc pas d'expression des gènes Lac.
- 3) Permet la liaison de l'ARN polymérase, indépendamment du lactose. Expression constitutive des gènes Lac.

#### Exercice 3 :

1)



2) **les niveaux qui ne seront pas utilisés par une bactérie sont : 3 et 4**, car l'ARN bactérien (Procaryote) ne contient pas d'intron et parce que la bactérie n'a pas de noyau.

#### Exercice 4 : QCM

1. A propos de la régulation de l'opéron lactose, quelles propositions sont vrai ?

a/b/c/d

2. Quelles sont les affirmations vraies à propos de la traduction ?

c

3. Les différences entre transcription chez les procaryotes et chez les eucaryotes peuvent être illustrées par les affirmations suivantes :

a/d

4. Concernant l'excision- épissage d'un pré-ARNm :

a/d

## Corrigé type TD 4

### Exercice 1 :

1. **ARNm** : AUG AUC CAG CAA ACC AAA UGU AAC AAC UCG GCA GCU

2. **Protéine** : Met- Ile – Gln – Gln – Thr – Lys – Cys – Asn – Asn – Ser – Ala – Ala

3. La 1<sup>ère</sup> sérine est codée par UCG, pour être remplacée par une arginine ce codon a dû être remplacé par CGU, ou CGC, ou CGA, ou CGG, ou AGA, ou AGG. (La mutation à l'origine de cette modification s'est opérée sur l'ADN).

L'hypothèse la plus simple est que la mutation porte sur les deux 1<sup>ers</sup> nucléotides : TC remplacés par CG ou par AG sur le brin non transcrit de l'ADN.

4. **Le 4<sup>e</sup> codon (CAA) a dû être remplacé par un codon-stop** : UAA ou UAG ou UGA.

Il suffit donc d'un seul remplacement du C par un U dans l'ARNm, c'est-à-dire une mutation remplaçant le C par un T dans le brin non transcrit de l'ADN, pour que la traduction de l'ARNm en protéine s'arrête au 3<sup>e</sup> acide aminé.

### Exercice 2 :

**Donner le nom et la conséquence de la mutation.**

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC.TAC.TTC.GAC.ACT5'

a) Changement du 9<sup>ième</sup> nucléotide : T en C.

3'ACC.GAC.TAC.ATA.TAT.CCG.CAC.TAC.TTC.GAC.ACT5'

Mutation Faux sens, de transition (T →C) au niveau du promoteur, donc modification affinité de ARN polymérase II et promoteur.

b) **Changement du 25<sup>ième</sup> nucléotide : T en A.**

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC. **A** TC.GAC.ACT5'

Mutation transversion (T →A), Protéine : AUG.UAG.CUG.UGA →Met. STOP

Donc mutation non-sens, la protéine est plus courte, ici pas de protéine car Met s'en va et il ne reste que codon stop qui ne donne pas d'acide aminé.

c) **Changement du 30<sup>ième</sup> nucléotide : C en A.**

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC.TTC.GAA. ACT5'

Mutation de transversion, Protéine : AUG.AAG.CUU.UGA →Met.Lys. Leu.Stop

Même protéine qu'au départ, mutation silencieuse synonyme.

d) **Entre le 31<sup>ième</sup> nucléotide et le 32<sup>ième</sup> nucléotide, on insère un T.**

3'ACC.GAC.TAT.ATA.TAT.CCG.CAC. TAC.TTC.GAC.A T CT5'

Mutation d'insertion, décalante car si on reforme les codons il reste un nucléotide seul

→AUG.AAG.CUG.UAG.A→ Met. Lys. Leu. Stop, même protéine mais cadre de lecture décalé (la lecture des codons est décalée).

**Exercice 3 :**

**1. Parmi les facteurs ou mécanismes suivants, lesquels peuvent être considérés comme agent mutagènes :**

b- c- d

**2. Quelles sont les propositions qui sont exactes ?**

a-b- d- e

## Corrigé type TD5

### Exercice 1 :

1. Pour réaliser une expérience d'amplification de gène par PCR, il faut :

B

2. **2. Pour évaluer la pureté d'un échantillon d'ADN par rapport aux protéines, vous mesurez par spectrométrie :**

B. le rapport de densité optique à 260nm et 280nm

3. **Quelle(s) molécule(s) permet (tent) de visualiser des fragments d'ADN séparés par électrophorèse ?**

A.

### Exercice 2.

1. Oligonucléotide 04 qui va s'hybrider

5'ATCGGTGATCTGCAGTCCCGATCGGGCACCCGGGTTAGCGATCGTTTAATGGGTCG  
GCCCGGGGATCCCGGGCCTGGACTGATCTGACATGGTGTGTCAGTCAGTTTCTC 3'

**Hybridation de l'amorce**

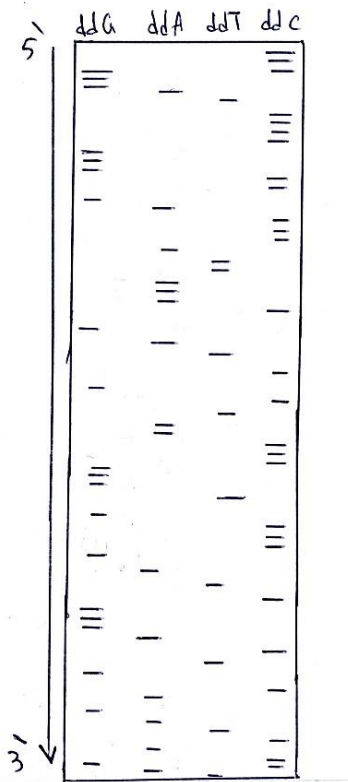
**5' TCAGATCAGTCCAGG 3' = 3' GGACCTGACTAGACT 5'**

**2. Brin complémentaire :**

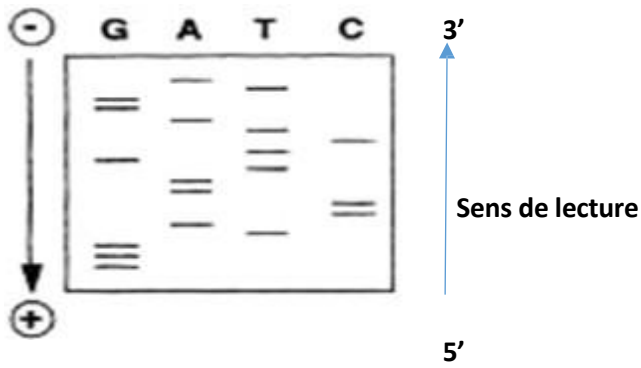
**3'TAGCCACTAGACGTCAGGGCTAGCCCGTGGGCCCAATCGCTAGCAAATTACCCAG  
CCGGGCCCTAGGGCCC 5'**

**Brin néo-synthétise (Résultat du séquençage)**

**5'CCCGGGATCCCGGGCCGACCCATTAACGATCGCTAACCCGGGTGCCCGATCGG  
GACTGCAGATCACCGAT3'**



**Exercice 3 :**



1. **Brin néo-synthétisé :** 5' GGGTACCAATGTCTAGGTA 3'
2. **Brin complémentaire :** 3' CCCATGGTTACAGATCCAT5'  
**Brin matrice :** 5' TACCTAGAGACATTGGTACCC3'
3. **Amorce** 5' TACCTAGAGAC 3'

## Références bibliographiques

- [1] Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit, Raymond Julien (2018). Mini manuel de biologie moléculaire, Cours + QCM/QROC. 4e édition, ISBN 978-2-10-077368-8.
- [2] Beaumont Simon, (2007). Biologie moléculaire PCEM1, Dunod, Paris 151-155p.
- [3] Christian Moussard (2005). Biologie moléculaire Biochimie des communications cellulaires. ISBN :978-2-8041-3488-4.
- [4] E.Clause, S.Conchon (2004). Biochimie génétique Biologie moléculaire, 300 QCM et exercices.
- [5] J. Eienne, E. Clauser, C. Housset, P. Roingard (2006). Biochimie génétique Biologie moléculaire, PCEM1, 9<sup>e</sup> édition.
- [6] J.Nicklin, K. Graeme-Cook, T. Paget & R. Killington (2013). L'essentiel en Biologie moléculaire. Edition BERTI. ISBN : 978-9961-69-324-7.
- [7] Sophie SÉRONIE-VIVIEN (2015). Biochimie-Biologie Moléculaire UE1 PACES Manuel de préparation au concours. ÉDITIONS ELLIPSES.
- [8] Site de la Faculté de médecine de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris) : <http://www.chups.jussieu.fr/>

## **Annexe**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

# **Canevas de mise en conformité**

## **OFFRE DE FORMATION L.M.D.**

### **LICENCE ACADEMIQUE**

**2014 - 2015**

<b>Etablissement</b>	<b>Faculté</b>	<b>Département</b>
<b>Université des Science et Technologies Mohamed Boudiaf-Oran USTMB-Oran</b>	<b>Science de le Nature et de la Vie</b>	<b>Biotechnologie</b>

<b>Domaine</b>	<b>Filière</b>	<b>Spécialité</b>
<b>SNV</b>	<b>Sciences Biologiques (SB)</b>	<b>Biochimie</b>

## Semestre 06

Unité d'Enseignement	VHS	V.H hebdomadaire				Coeff	Crédits	Mode d'évaluation	
	14-16 sem	C	TD	TP	Autres			Continu (40%)	Examen (60%)
<b>UE fondamentales</b>									
<b>UEF 3.2.1 (O/P) : Biologie moléculaire et génie génétique</b>									
<b>Matière 1 : Biologie moléculaire</b>	90h00	3h	1h30	1h30	2	3	5	x	x
<b>Matière 2 : Génie génétique</b>	45h00	1h30	1h30	-	2	2	4	x	x
<b>UEF2 (O/P)</b>									
<b>UE méthodologie</b>									
<b>UEM1(O/P) : Pharmacotoxicologie et biochimie végétale</b>									
<b>Matière 1 : Pharmacotoxicologie</b>	67h00	1h30	1h30	2h00		2	4	x	x
<b>Matière 2 : Biochimie végétale 2</b>	50h00	1h30		2h00		2	4		x
<b>UE découverte</b>									
<b>UED1 (O/P) :</b>									
<b>Matière 1 : Biologie des plantes médicinales</b>	45h00	1h30		1h30		2	3	x	x
<b>Matière 2 : Stage</b>	90h				90h	3	6	x	x
<b>Matière 3 : Gestion et management</b>	25h00	1h30				1	1		x
<b>UE Transversale</b>									
<b>Matière 1 : Biostatistique</b>	45h00	1h30	1h30			2	2	x	x
<b>Matière 2 : Anglais scientifique</b>	25h00	1h30			2h	1	1		x
<b>Total Semestre 6</b>	482h	13h30	6h	6h	96h	18	<b>30</b>		

**Semestre: 6**

**Unité d'enseignement fondamentale 1 (UEF 3.2.1) : Biologie moléculaire et génie génétique**

**Matière 1 : Biologie Moléculaire**

**Crédits : 5**

**Coefficient : 3**

### **Objectifs de l'enseignement**

Visé à comprendre, en termes moléculaires, comment l'information génétique d'un organisme vivant est exprimée et régulée aux niveaux de la transcription, traduction, modifications post-traductionnelles et importation dans les compartiments subcellulaires. Et présente aussi comment les outils du génie génétique sont mis à profit pour isoler et caractériser des gènes, les modifier et les transférer entre espèces.

### **Connaissances préalables recommandées**

Notions de base en génétique et de biochimie acquises en L2.

### **Contenu de la matière :**

#### **1. Le support de l'information génétique, l'ADN**

- **Structure et dynamique de l'ADN** (structure de base, formes alternatives de la double hélice, structures secondaires, propriétés physicochimiques et biologiques des acides nucléiques, manipulations topologiques, dénaturation-renaturation, interactions avec les protéines...) et leurs implications biologiques.
- **Structure et organisation du génome procaryotique et eucaryotique.**

#### **2. Mutations, mutagenèse et detection**

- **Mutations géniques** (définitions, intérêt des mutations, réarrangements génétiques des mutations, les mutations naturelles, les mutations induites, les agents mutagènes, les effets des mutations, l'expression des mutations, les réversions et suppressions...)
- **Mutagenèse** : physique, chimique et biologique et techniques de modification du matériel génétique
- **Diagnostic génotypique.**

#### **3. Transmission et conservation de l'information génétique**

- **La réplication de l'ADN et sa régulation.** (Ex. du virus SV40, la levure et les mammifères).
- **La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène**
- **Les systèmes de restriction-modification :** les cartes de restriction, intérêt et analyse du polymorphisme de restriction.

#### **4.L'expression de l'information génétique et son contrôle**

- **La transcription et la maturation de l'ARN.**
- **La traduction et la maturation des protéines**
- **Régulation de l'expression des gènes** (Structure chromatinienne des gènes actifs, modification de la structure primaire de l'ADN, les régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles).
- Voies de régulation des gènes par les signaux extracellulaires
- 

#### **5.Méthodologie et biologie moléculaire**

- Méthodes de caractérisation et analyse de l'ADN (extraction, séparation analytique, préparation, purification, visualisation, quantification, hybridation, amplification (la PCR et ses applications, séquençage, restriction et analyse des polymorphismes, interaction avec les protéines)

**Mode d'évaluation : Contrôle continu, Exposés, Posters, Compte rendu de TP, Références :** Thèses, livres et articles d'actualités, photocopies, sites internet.