

Biochimie génétique. Biologie moléculaire

J. ETIENNE

ABRÉGÉ

2^e EDITION

MASSON 

Tableaux de base :

Enzymes de restriction	40
Code génétique	105
M13/pUC	293

Table des matières

Avant-propos 2 ^e éd.	V
Avant-propos 1 ^{re} éd.	VI
Abréviations	XIX
Recommandations parues au JO du 26/9/90	XX

BIOCHIMIE DES ACIDES NUCLÉIQUES ET EXPRESSION DU GÉNOME

Les acides nucléiques	3
CARACTÈRES GÉNÉRAUX	3
LES NUCLÉOTIDES	4
Éléments constituant le nucléotide	4
La base (4). L'ose (7). L'acide phosphorique (7).	
Association des trois éléments constituant un nucléotide	8
Liaison ose-base (8). Liaison H ₃ PO ₄ -ose (8).	
Noms des différents nucléotides	9
Nucléotides à base pyrimidique (9). Nucléotides à base purique (9).	
Association des nucléotides dans un acide nucléique	10
Liaisons reliant les nucléotides (10). Convention de lecture d'un acide nucléique (10).	
LE DNA.....	11
Structure et caractéristiques du DNA	11
Les constituants du DNA (11). Caractéristiques des 2 chaînes de DNA (12). La dénaturation du DNA (19). Pourquoi ces différences de structure entre DNA et RNA (20).	
Le DNA des différents êtres vivants	21
Les virus (21). Les procaryotes (21). Les eucaryotes (22).	

Le DNA des mitochondries (mtDNA)	22
Topoisomères et topoisomérases	23
Topoisomères (23). Topoisomérases (27).	
DNA « de gauche » ou Z-DNA	29
Mise en évidence du Z-DNA (29). Caractéristiques du Z-DNA (29). Intérêt du Z-DNA (31).	
Les éléments génétiques mobiles : transposons et rétrotransposons	32
Les transposons (32). Les rétrotransposons (ou rétrotransposons) (32).	
Les séquences répétitives	34
Séquences répétitives groupées (télomères) (34). Séquences répétitives dispersées LINE, SINE (Alu) (34).	
Les séquences régulatrices	37
Les enzymes de restriction et étude des séquences de DNA	37
Coupure du DNA par les enzymes de restriction (37). Détermination de la séquence des bases dans les fragments de DNA obtenus (41).	
Les enzymes de modification	42
LES RNA	43
Caractéristiques des RNA	43
Les règles d'appariement	43
Les différents RNA	43
RNA ribosomiques (rRNA) (44). RNA de transfert (tRNA et travaux de Hou Schimmel) (45). RNA messenger (mRNA) (55). snRNA (56).	
 La synthèse des protéines	 57
I. LA TRANSCRIPTION	57
LE MÉCANISME GÉNÉRAL DE LA TRANSCRIPTION	57
Définition	57
Caractéristiques	58
Éléments nécessaires pour la transcription	58
Des nucléotides (58). Un enzyme : la RNA polymérase (58). Un modèle DNA (58).	
Les différentes étapes de la transcription	59
Début de la transcription (59). Transcription proprement dite (62). Fin de transcription (signal de polyadénylation) (63).	
Quelques précisions	65
Quel brin de DNA est copié par la RNA polymérase? (65). Quel est le rôle de la gyrase (bactérienne) lors de l'initiation de la transcription (chez les procaryotes)? (66). Amplification des informations contenues dans le DNA (67).	

Quels sont les produits de la transcription?	68
Des mRNA (69). Des tRNA et des rRNA (69).	
Modifications post-transcriptionnelles	69
Chez les procaryotes (69). Chez les eucaryotes (70).	
MÉCANISME DE LA TRANSCRIPTION ET MODIFICATIONS	
POST-TRANSCRIPTIONNELLES CHEZ LES EUCARYOTES	70
Mécanisme de la transcription chez les eucaryotes	70
Les différentes RNA polymérases des eucaryotes (70). Structure du DNA des eucaryotes : exons et introns (71). Les différentes phases de la transcription (71). Comment se font les excisions des introns et les épissages des exons (les snurps) (73). Le « trans-splicing » (77). Rôle des introns (77).	
Le contrôle de la transcription chez les eucaryotes	79
Le complexe d'initiation (79). Définition des éléments cis- et trans-régulateurs (80). Exemples d'éléments cis et trans-régulateurs (81). Structure des éléments trans-régulateurs (89).	
LES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE (HSP, « HEAT SHOCK PROTEINS »)	93
LES RIBOZYMES	94
Clivage d'un pré-tRNA par un RNA catalytique (94). Auto excision-épissage d'un RNA : les 2 types d'introns autoclivés (94).	
LES RNA ANTISENS	98
RNA « EDITING », OU « CORRECTION » DES RNA	98
Editing par addition (99). Editing par substitution (100). Editing par insertion (100).	
II. LE CODE GÉNÉTIQUE	101
Code à 3 lettres	101
Déchiffrage du code génétique	102
Caractéristiques du code	103
Universel (103). Dégénéré (106). Le wobble (107). Non chevauchant (109).	
III. LA TRADUCTION	112
Lieu de la traduction	112
Les éléments nécessaires	112
Acides aminés (112). mRNA (112). tRNA (113).	
Les différentes étapes de la traduction	113
Initiation (113). Élongation (114). Terminaison (117).	
Bilan énergétique	117
Pour l'étape de l'initiation (117). Pour l'étape de l'élongation (117). Pour l'étape de la terminaison (121).	

Les polysomes	121
Le « cap » et le mRNA monocistronique des eucaryotes	122
La séquence signal	123
Quelles protéines ont une séquence signal? (123). Synthèse des protéines à séquences signal chez les eucaryotes : rôle de la SRP (« signal recognition particle ») (123). Clivage de la séquence signal (124). Expérience démontrant le rôle de la séquence signal (124). Exemple d'un peptide possédant une séquence signal : biosynthèse de l'insuline (125). L'importation des protéines mitochondriales (126).	
Les molécules chaperonnes et leur rôle dans la conformation des protéines	126
MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES	126
Quelques exemples de modifications réversibles (126). Quelques exemples de modifications permanentes : la glycosylation (128).	
La diversité des protéines	133
LE RÉARRANGEMENT GÉNIQUE	133
Réarrangement des gènes codant les immunoglobulines	133
Les 4 chaînes des immunoglobulines (133). Théorie de la sélection clonale (134). Synthèse d'une chaîne lourde μ (135). Synthèse d'une chaîne légère kappa (κ) (138). L'association chaînes lourdes-chaînes légères (139). Localisation des gènes de chaînes lourdes et légères sur les chromosomes (14, 2, 22), et l'exclusion allélique. (139). Le réarrangement en μ précède celui en κ qui lui-même précède celui en λ (141). Commutation (« switch ») IgM membranaire-IgM sécrétée (141). Commutation des chaînes lourdes (143). Les signaux impliqués lors des réarrangements de DNA : la règle des espaceurs 12-23 (144).	
Réarrangement des gènes codant les récepteurs situés sur les lymphocytes T	147
L'ÉPISSAGE DIFFÉRENTIEL	148
LES GÈNES CHEVAUCHANTS	148
EDITING	148

La régulation de la synthèse des protéines	149
CHEZ LES PROCARYOTES	149
Régulation au niveau de la transcription	149
Induction – Ex : opéron lactose (150). La répression– Ex : opéron tryptophane (154). Comparaison de l'induction et de la répression (156).	
Régulation au niveau de la traduction	
ex : Synthèse des r-protéines	157
Intérêt (157). Les r-protéines en excès bloquent leur propre mRNA (157). Qu'est-ce qui explique à l'échelle moléculaire l'affinité des r-protéines à la fois pour les rRNA et les mRNA? (158).	
Comment se fait la reconnaissance protéine-acide nucléique?	159
Exemples de reconnaissance protéine-acide nucléique (159). Mécanismes possibles de reconnaissance (159). L'œuf et la poule (160).	
CHEZ LES EUCARYOTES	160
Rappel de la structure du chromosome eucaryote	161
Les nucléosomes, le DNA inter-nucléosomes et l'apoptose (161). Les protéines « histones » (162). Les protéines « non histones » ou « NHP » (162).	
Expression des gènes	162
Expérience de transplantation du noyau (163). Hypométhylation et expression des gènes (la maintenance méthylase) (163).	
Les hormones	166
Définition (166). Mécanisme d'action (166).	
La réplication	169
LA RÉPLICATION CHEZ LES PROCARYOTES	169
Quelle est la caractéristique fondamentale de la réplication?	169
Éléments nécessaires pour la réplication	170
Nécessité d'un DNA parental (170). Nécessité de nucléotides (170). Nécessité d'enzymes (170). Nécessité de cations divalents (171).	
Mécanismes de la réplication	171
Addition des nouveaux nucléotides (171). La propagation de la réplication est bidirectionnelle (171). La réplication est discontinue pour l'un des deux brins (modèle de Kornberg) (172). Nécessité d'amorces de RNA (174). Remarque sur les enzymes à fonction d'édition (175). Le déroulement de la double hélice (176).	
LA RÉPLICATION CHEZ LES EUCARYOTES	177
Mécanisme de la réplication chez les eucaryotes (177). Le cycle cellulaire (178).	

Le développement embryonnaire	180
LES GÈNES À HOMÉOBOX	180
L'homéobox (gène) (180). L'homéodomaine (protéine) (180). Les expériences de mutations homéotiques (181).	
Les mutations	182
DÉFINITION	182
DIFFÉRENTS TYPES DE MUTATION	182
Mutations sans changement du cadre de lecture (183). Mutations avec changement du cadre de lecture (« frameshift » en anglais) (184).	
LES POINTS CHAUDS DE MUTATION : LES ÎLOTS RICHES EN CG OU « ÎLOTS HTF »	184
QUELQUES CONSÉQUENCES DES MUTATIONS	185
Maladies (185). Les mutations au cours de l'évolution (186). Les pseudogènes (187).	
LES AGENTS MUTAGÈNES	187
Agents chimiques (187). Agents physiques (187).	
RÉPARATIONS DES DIMÈRES DE THYMINE	188
Réparation par excision-resynthèse (188). Réparations post-répliques (189). Le système SOS (rec A, lex A) (191).	
LES tRNA SUPPRESSEURS	193
Les virus	195
Structure (195). Pouvoir pathogène (195). Lutte contre les virus (196).	
• LES VIRUS DE L'HÉPATITE :	
LE VIRUS DE L'HÉPATITE A (HAV)	197
LE VIRUS DE L'HÉPATITE B (HBV)	197
La structure (originale!) du virus de l'hépatite B (197). Les gènes (chevauchants!) (198). La transcription du DNA viral (199). La réplication du virus de l'hépatite B (200). La prévention de l'hépatite B (les vaccins) (202).	

LE VIRUS DE L'HÉPATITE C (HCV)	203
LE VIRUS DE L'HÉPATITE D (HDV)	204
LE VIRUS DE L'HÉPATITE E (HEV)	205
• LE VIRUS DU SIDA (HIV) :	
HIV EST UN RÉTROVIRUS	205
LA PARTICULE VIRALE (OU VIRION)	206
L'enveloppe (206). La capside (207). Le cœur de la particule (207).	
DE LA PARTICULE VIRALE AU PROVIRUS	208
HIV extra-cellulaire est incapable de se multiplier (208). Récepteur CD 4. Entrée dans la cellule cible et intégration dans le DNA cellulaire (209).	
LE PROVIRUS	211
Structure	211
LTR (long terminal repeat) (212). Les 3 gènes gag, pol, env, codant des protéines de structure (212). Les 6 gènes codant des protéines régulatrices (213).	
Expression des gènes proviraux	213
Période de latence avant la séroconversion (213). Les protéines de structure et les protéines régulatrices (213). Les mRNA plus ou moins excisés-épissés (214). Rôle des protéines régulatrices (nef, tat, rev, vif, vpr, vpu) (214). La sortie des nouvelles particules virales (clivage des polyprotéines) (218).	
RÔLE PATHOGÈNE DE HIV	219
La diminution des lymphocytes T4 (219). HIV et apoptose (220).	
LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	220
Test global de détection des anticorps (220). Western-blot (221). Autres tests (222).	
LES MODÈLES ANIMAUX	223
BASES DU TRAITEMENT	223
À visée curative	223
Empêcher la reconnaissance gp120/CD4 (223). Empêcher l'action de la RT : Utilisation d'AZT et d'autres didésoxynucléotides apparentés (DDC, DDI) (224). Bloquer la maturation des jeunes particules virales (224). Inhibition de la pol-protéase (225). Bloquer l'expression de HIV dans les cellules déjà infectées (225).	
À visée préventive	225
Les vaccins (225).	

Le cancer	226
DÉFINITION	226
ORIGINE DU CANCER CHEZ L'HOMME	227
LES PROTO-ONCOGÈNES	228
Définition et quelques exemples (228). Les proto-oncogènes auraient une origine cellulaire et non virale (230). Les virus défectifs (230).	
PROTÉINES CODÉES PAR LES PROTO-ONCOGÈNES ET LES ONCOGÈNES	231
Famille des facteurs de croissance : sis	232
La protéine sis est sécrétée (232). La protéine codée par l'onco- gène viral sis est une protéine hybride (232). Analogies entre les séquences de la protéine sis et du PDGF (232). La tyrosine jou- rait un rôle clé dans le contrôle de la croissance (232).	
Famille des récepteurs pour des facteurs de croissance : erb-B1, erb-B2, fms, kit	233
Rappel sur les récepteurs membranaires et la transduction (233). Exemples de protéines impliquées dans le cancer présentant une homologie avec des récepteurs membranaires pour facteurs de croissance (234).	
Famille des protéines intracellulaires apparentées aux protéines de transduction	237
Protéine liant GTP : ras	237
Les différents gènes ras (237). Les protéines ras sont farnésylées (237). L'oncogène ras (240). La protéine ras est apparentée aux protéines G (243). La protéine ras oncogène a des propriétés GTPase inférieures (244). Quelques nouvelles perspectives théra- peutiques (244).	
Protéines à propriétés tyrosine kinase : src, abl, yes, fes, fps, fgr, ros	245
Les protéines codées par les gènes de la famille src ont des pro- priétés tyrosine-kinase (245). Les protéines codées peuvent être hybrides (245). La protéine v-src est myristylée (246).	
Famille des protéines nucléaires	246
jun, erb A, myc, fos, myb, ski (246).	
TRANSFORMATIONS DE PROTO-ONCOGÈNES EN ONCOGÈNES	247
Principaux types de transformation connus	247
Mutations (247). Translocations chromosomiques LMC (bcr-abl) (247). Amplification génique (251). Insertion d'un promoteur viral (252).	

Intervention possible de plusieurs oncogènes	253
LES ANTI-ONCOGÈNES OU « GÈNES SUPPRESSEURS DU CANCER »	253
Quelques exemples (Rétinoblastome, Wilms, p53, RAP, Krev) (254).	
COMMENT RECHERCHER, TESTER SI UN PRODUIT EST CANCÉRIGÈNE	256
Pouvoir mutagène sur une bactérie (256). Pouvoir cancérogène (257).	
Les viroïdes et les prions	258
Les viroïdes (258). Les prions (258).	
Médicaments perturbant la réplication et / ou la synthèse protéique	261
LES ANTICANCÉREUX	261
Médicaments alkylants (Endoxan) (261). Le gène mdr (263).	
LES ANTIBIOTIQUES	263
Définition (263). Exemple de la streptomycine (263).	
LES ANTIVIRAUX	264
Quelques exemples de médicaments inhibant ou activant des systèmes enzymatiques	264
Aciclovir (264). AZT (264). Les interférons (264).	
Résumé des différentes conversions DNA ↔ RNA décrites dans les chapitres précédents	268

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Quelques définitions	271
Les principaux outils de la biologie moléculaire	274
LES ENZYMES	274
Les enzymes qui coupent le DNA	274
Les enzymes de restriction (274). La DNAase (276). La nucléase S1 (277).	
Les enzymes qui ligaturent	277
La ligase (277).	
Les enzymes qui déphosphorylent	277
Les phosphatases (277).	

Les enzymes qui phosphorylent	278
Les kinases (278).	
Les enzymes qui « recopient » un acide nucléique	278
DNA polymérase I et enzyme de Klenow (279). La Séqué-nase (279). La Taq polymérase (280). La RNA polymérase (280). La rétrotranscriptase (RT) (280).	
LES VECTEURS	282
• Les virus	282
Le virus λ	282
Biologie du virus λ (283). Modifications apportées au virus (284). Description de quelques virus λ modifiés : λ gt10 et 11, EMBL 3 et 4 (286). L'empaquetage <i>in vitro</i> (291).	
Le virus M13	291
Biologie du virus M13 (291). Modifications apportées au virus M13 : les séries de Messing, polylinker, opéron lac et α -complémentation (292). Clonage dans les vecteurs M13 mp (297).	
• Les plasmides	300
Qu'est ce qu'un plasmide? (300). pBR322 (301). pUC18, pUC19 (301).	
• Les cosmides	302
• Les phagémides	303
• Les vecteurs navettes (« shuttle vectors »)	304
• Les banques YAC (yeast artificial chromosome)	304
LES CELLULES-HÔTES	304
Choix de la souche (304). Croissance en milieu liquide (305). Distinction entre infection et transfection (306). Les réactifs IPTG et X-Gal (306).	
LES SONDAS NUCLÉOTIDIQUES	307
Caractéristiques des sondes (307). Obtention d'une sonde (309). Marquage d'une sonde : « nick translation » et « random priming » (310). Hybridation moléculaire—La stringence (312).	
Quelques techniques générales de biologie moléculaire	313
Criblage de banques	313
Banques cDNA (313). Banques génomiques (315).	
Séparation électrophorétique des DNA	316
Purification des acides nucléiques par le mélange phénol-chloroforme	316
Estimation des quantités de DNA	316
Par lecture au spectrophotomètre à 260 nm (316). Par minigel (317).	

Séquencage :	317
Méthode de Sanger	317
Principe (317). Rôle des didésoxynucléotides (317). Le DNA à séquencer est cloné dans le virus M13, ou dans pUC (318). La réaction de séquençage (318).	
Méthode de Maxam & Gilbert	320
Les techniques de Southern, de Northern et des dots	322
RFLP (« restriction fragment length polymorphism »)	323
PCR (« polymerase chain reaction »)	323
Applications de la biologie moléculaire	326
DANS UN LABORATOIRE DE RECHERCHE	326
Recherche de la présence de gènes dans un génome	326
Technique du zoo-blot (326). Traitement informatique (326).	
Génétique moléculaire classique et génétique inverse	327
Génétique moléculaire classique (327). Génétique inverse : mucoviscidose, myopathie (328).	
Recherche du début du site de transcription	329
Analyse par extension d'amorce (329). Technique à la nucléase S1 (330).	
Détermination de l'origine d'une augmentation de mRNA	330
Augmentation du nombre de molécules de RNA formées correspondant à une augmentation de la vitesse de transcription : technique du « run on » (330). Augmentation de la stabilité des mRNA-Ex : « pulse chase » (331).	
Étude de l'expression	332
Mise en évidence de la fixation de protéines sur le DNA (332).	
Mesure de l'activité d'un promoteur, gène « reporter » (333).	
Mutagenèse dirigée	334
Les animaux transgéniques	334
DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE	335
Techniques utilisées pour synthétiser une protéine	335
Pourquoi utiliser le cDNA plutôt que le DNA? (335). Obtention du cDNA (335). Expression du cDNA (336).	
Quelques exemples de synthèses de protéines	337
Médicaments (337). Vaccins (342).	
Perspectives d'avenir	342
EN MÉDECINE	342
Diagnostic	343
Identification de DNA normaux	343
Les empreintes génétiques (Jeffreys) (343).	

Identification de DNA pathologiques	344
Recherche d'un DNA étranger Ex : recherche du virus de l'hépa- tite B (344). Recherche d'un DNA anormal (345).	
Thérapeutique	349
Médicaments et vaccins (349).	
Thérapie génique	350
Annexe	351
Quelques aspects quantitatifs : Transcription (351). Traduction (351). Réplication (352).	
Quelques références bibliographiques	353
Exercices et réponses se rapportant aux différents chapitres	361
Index	395