

Génétique II



F. GESBERT

franck.gesbert@universite-paris-saclay.fr



Séquençage – méthode Sanger

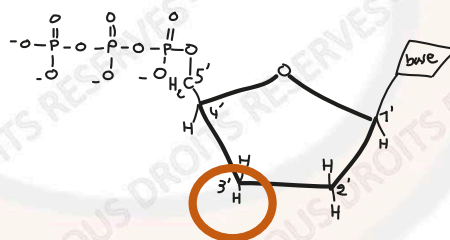
Frederick Sanger, séquençage par terminaison d'élongation, 1977

mélange réactionnel de base:

- ADN (matrice)
- amorce (complémentaire de la matrice)
- dNTP
- ^{32}P adCTP
- ADN polymérase

Ce mélange est divisé en 4 tubes, chaque tube contenant soit:

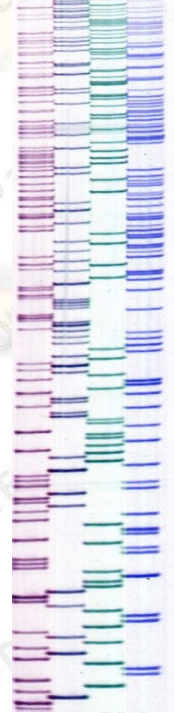
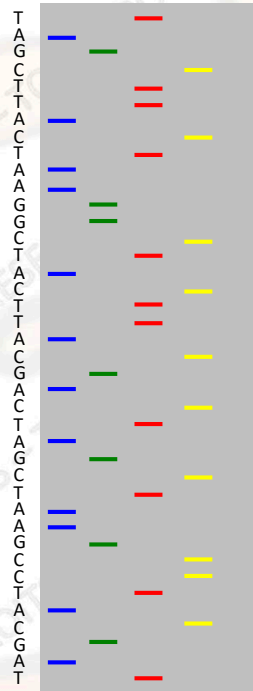
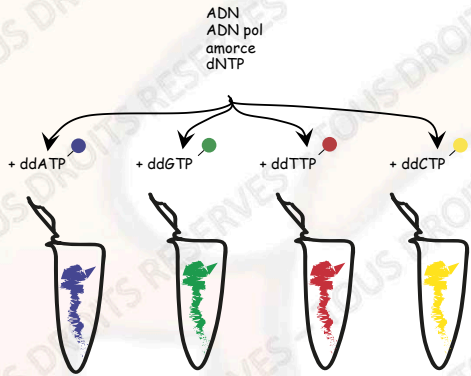
- didéoxy CTP
- didéoxy ATP
- didéoxy GTP
- didéoxy TTP





Séquençage — méthode Sanger

migration des produits de synthèse sur gel 20 % acrylamide (permet une résolution à 1 base près)



Attention, la séquence lue est le complémentaire antiparallèle de la séquence "d'intérêt".

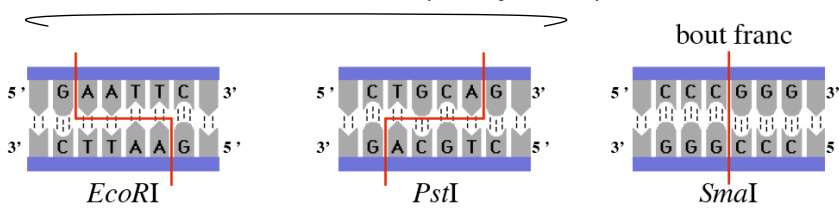


Les Acides Nucléiques - modifications enzymatiques

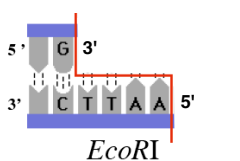
Les enzymes de restriction génèrent deux types d'extrémités:

- cohésives
- franches

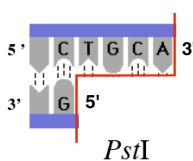
Extrémités cohésives (sticky ends)



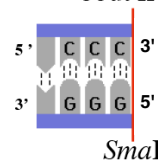
5' sortant



3' sortant

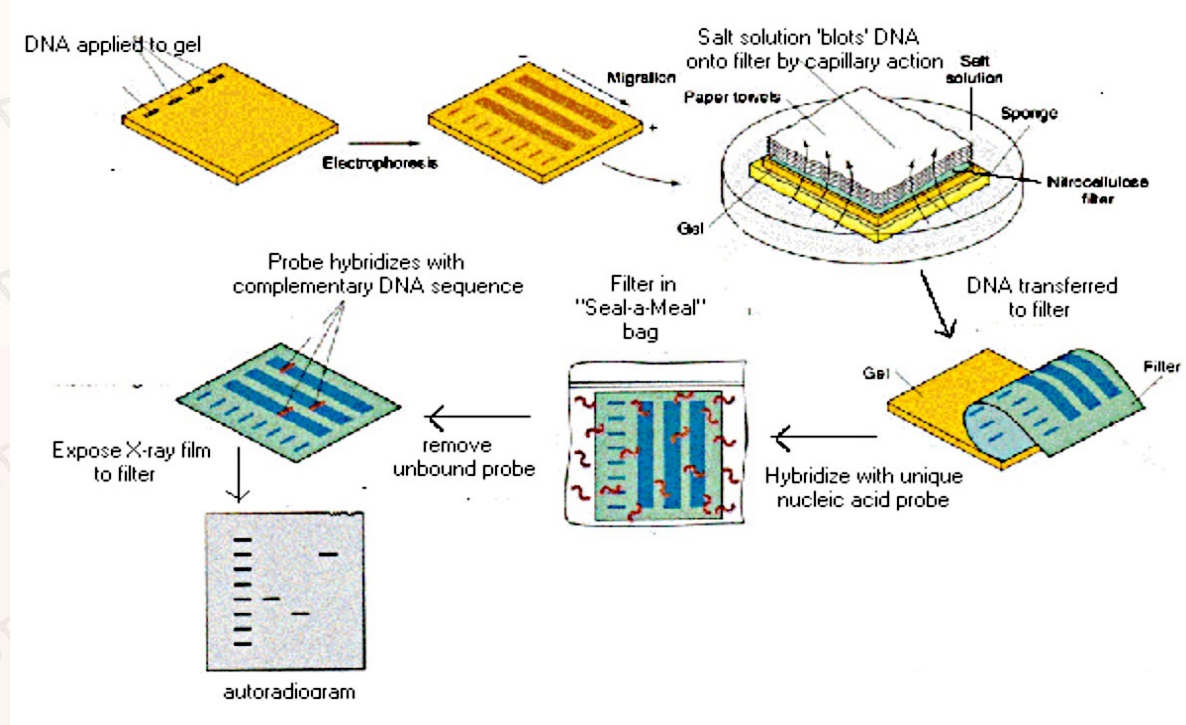


bout franc



Les Acides Nucléiques - séparation et hybridation

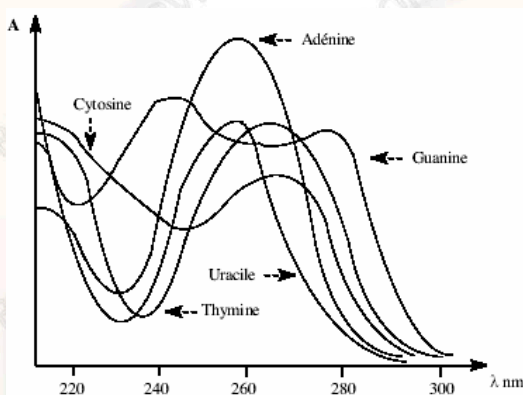
Application des notions de migration et d'hybridation: Sir Edwin Southern



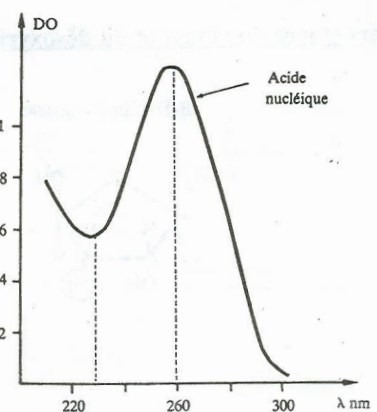
Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

Propriétés spectrales

Absorption des UV par la structure cyclique des **bases azotées**



Spectre d'absorption des bases puriques et pyrimidiques à pH7



Spectre d'absorption d'un acide nucléique à pH7

Les acides nucléiques présentent un pic d'absorption à 260 nm

QCM/QCS



Lesquelles de ces séquences sont des palindromes selon la définition de biologie moléculaire :

- a-5'-GATTAG-3'
- b-5'-GAATTC-3'
- c-3'-GAATTC-5'
- d-5'-GGGCCC-3'

Laquelle(lesquelles) de ces affirmations est(sont) juste(s) ? L'électrophorèse:

- a) peut permettre de séparer des acides nucléiques
- b) peut séparer les analytes en fonction de leur point isoélectrique
- c) nécessite un système de révélation
- d) utilise un courant électrique
- e) peut nécessiter l'ajout de mercaptoéthanol

Donner la (les) proposition(s) exacte(s). La PCR :

- a) Sert à amplifier une séquence d'ADN en plusieurs milliers de copies
- b) Utilise des didéoxynucléotides
- c) Peut servir à réaliser des empreintes génétiques
- d) Peut servir à détecter la présence d'un génome viral dans le génome des cellules de l'organisme étudié
- e) Peut être utilisée pour traiter un patient atteint d'une maladie génétique

Quelle(s) est (sont) parmi les composés nucléotidiques et enzymatiques suivants celui (ceux) nécessaire(s) à la méthode enzymatique de séquençage (méthode de Sanger):

- A - Désoxyribonucléotides triphosphate
- B - Didésoxyribonucléotides triphosphate
- C - Amorce oligonucléotidique
- D - ADN polymérase
- E - ADN ligase

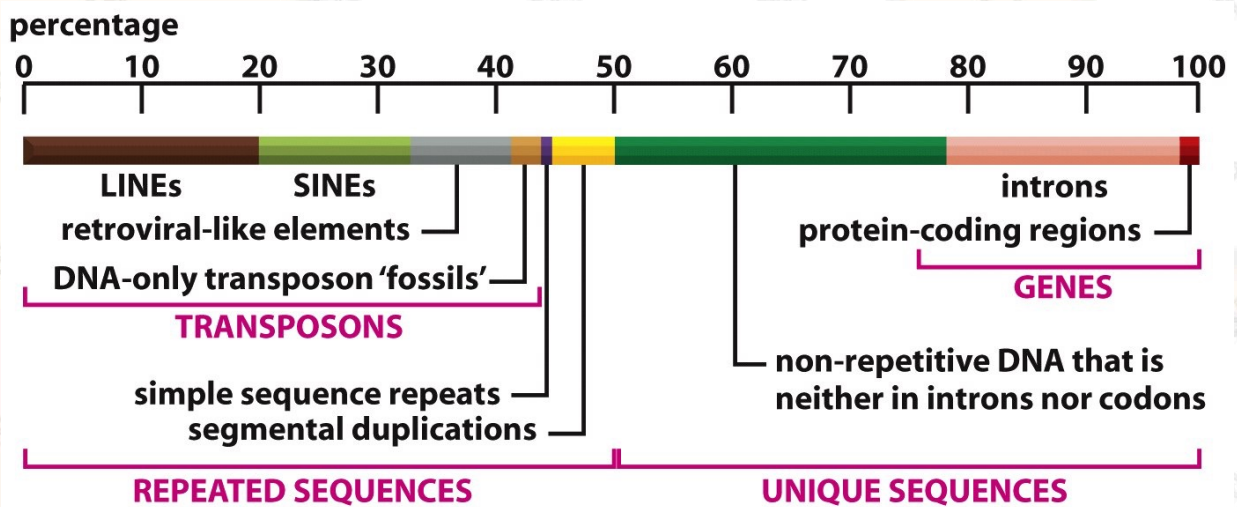
Question N°32

M

Parmi les propositions suivantes concernant les antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, laquelle (lesquelles) est (sont) exacte(s) ?

- A - Ils agissent au niveau des ADN-gyrases bactériennes
- B - Les bactéries peuvent devenir résistantes par imperméabilité
- C - Leur structure leur confère une propriété de chélation des cations
- D - Ils peuvent être utilisés dans le traitement des bactériémies
- E - Ils sont contre-indiqués chez le jeune enfant

Expression et régulation



Les ARN

Structures moléculaires ordonnées et linéaires
Molécules simples brins
Orientées 5'-3'
Possibilités d'un grand nombre de structures secondaires

Les principaux types d'ARN

% des ARN totaux
(cellule eucaryote)

ARNm: codent pour les protéines
ARNr: participent à la structure des ribosomes et à la traduction
ARNt: participent à la traduction
ARNsn: petits ARN nucléaires
ARNsno: petits ARN nucléolaires
ARNi: ARN interférents, régulation de la traduction
mi-ARN: micro ARN, régulation de la traduction ou de la demie-vie des ARNm

3%

70%

15%

10%

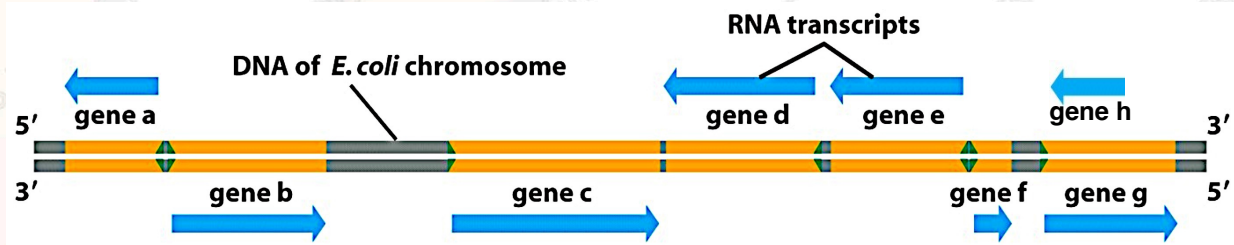
La Transcription

La transcription: mécanismes de base

- Les ARN polymérases sont des **ARN synthétases ADN dépendantes**
 - Ne nécessitent **pas d'amorce**
 - Synthétisent un ARN **de 5'-3'** en utilisant un simple brin d'**ADN matrice**
 - La séquence synthétisée est **complémentaire** et **antiparallèle** du brin ADN matrice
- Pour **initier** la transcription, l'ARN polymérase s'associe à un site sur la double hélice d'ADN
 - Ce site est le **promoteur**
 - le promoteur est toujours en **5' du gène à transcrire**
 - le promoteur est donc orienté et il détermine le brin qui sera transcrit

La Transcription

Les gènes peuvent résider sur les deux brins de la double hélice



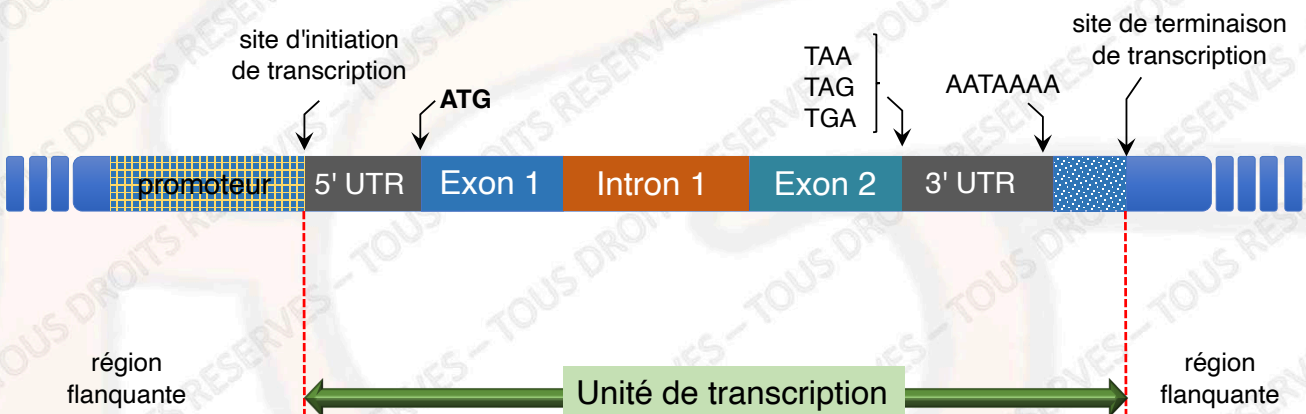
adapté de *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Rappels – unité de transcription

Transcription eucaryote

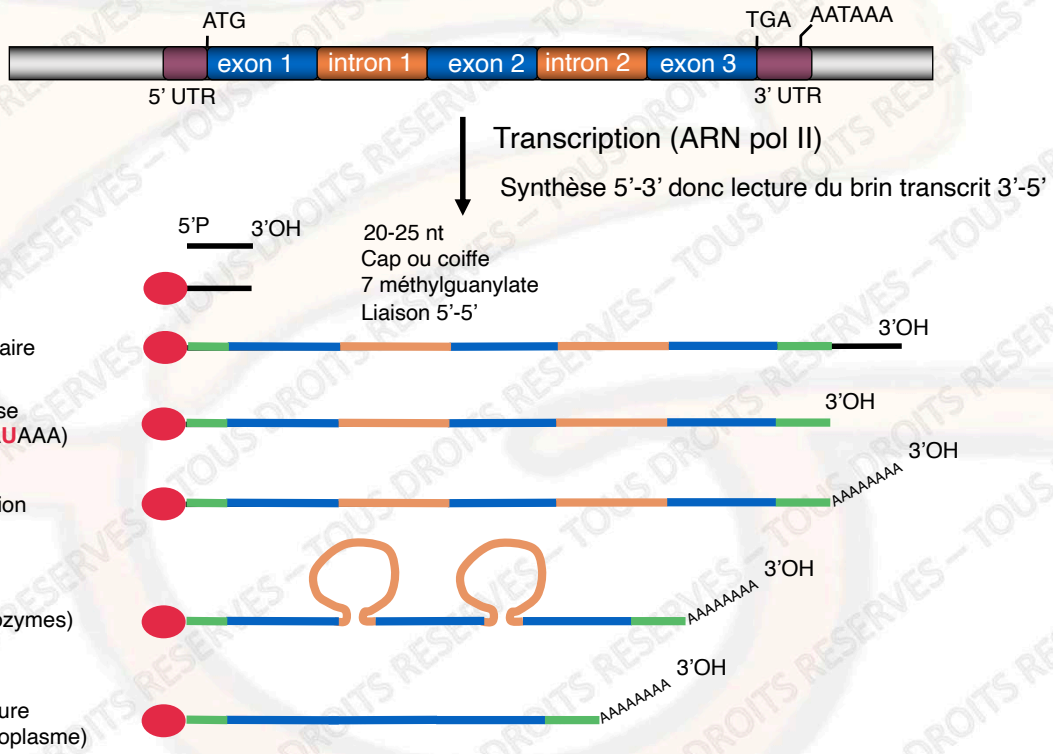
définition de l'unité de transcription eucaryote

Rappel: les gènes eucaryotes sont morcellés

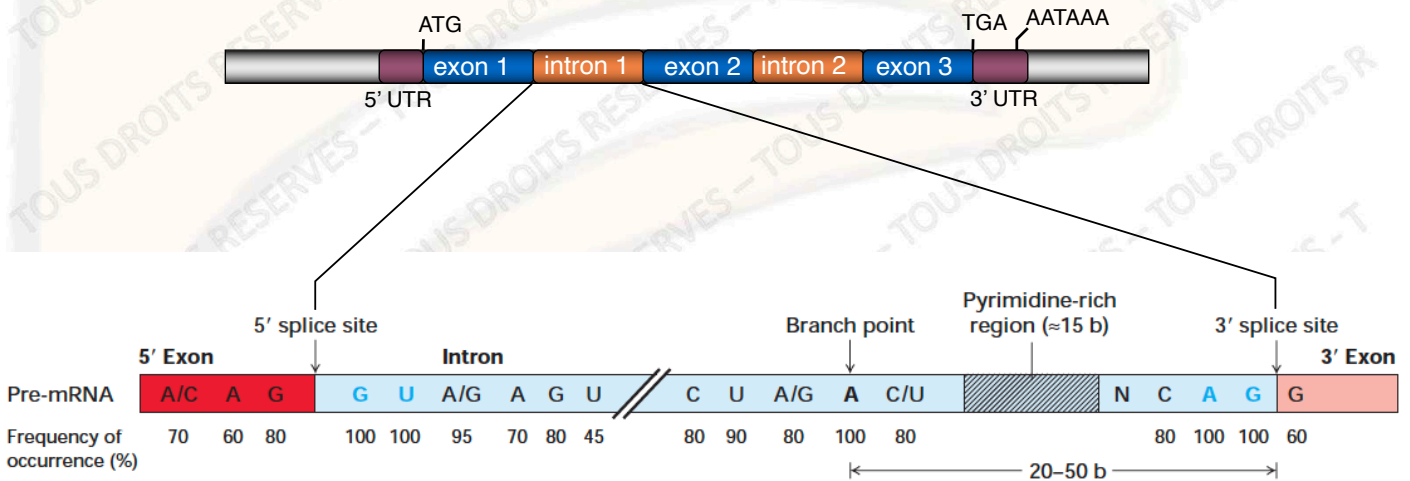


UTR: "UnTranslated Region": Région transcrite et non traduite

La Transcription - maturation



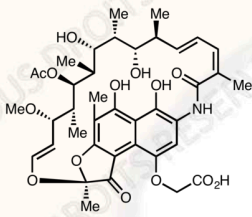
La Transcription - maturation





La Transcription

Transcription et antibiotiques

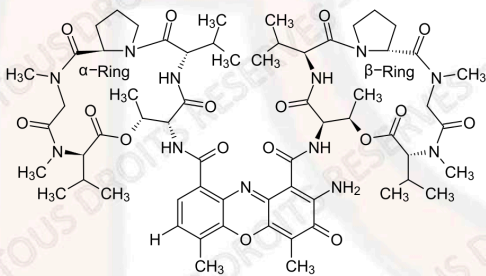


Rifamycin B

Rifamycine: naturellement produite par *Amycolatopsis mediterranei*.

Rifampicine: produit de synthèse

Mode d'action: **inhibition de l'initiation** de la **transcription bactérienne** par occlusion stérique.



Actinomycine D: produit par Streptomyces

Mode d'action: **bloque l'élongation** de la transcription en s'intercalant dans la double hélice d'ADN au moment de sa déstabilisation par l'ARN polymérase en progression.

QCM/QCS



Question n°13 -1995 Réponse simple

Parmi les médicaments anticancéreux suivants, quel est celui qui n'est pas un antimétabolite ?

- A - 5-Fluoro-uracile (5 FU)
- B - 6-Mercaptopurine (PURINETHOL)
- C - Méthotrexate (METHOTREXATE)
- D - Cytarabine (ARACYTINE)
- E - Etoposide (VEPESIDE)

Question n°59 -2000 Réponse multiple

Parmi les propositions suivantes concernant la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) laquelle (lesquelles) est (sont) exacte(s) ? Cette technique:

- A - Utilise deux amorces oligonucléotidiques
- B - Utilise une ADN polymérase ADN dépendante
- C - Utilise une ARN polymérase ADN dépendante
- D - Utilise des désoxyribonucléotides triphosphates
- E - Permet la synthèse d'ARNm

Réponse simple

Parmi les propositions suivantes concernant le mitochondrie humaine, une seule est fausse. Laquelle?

- A – Le génome mitochondrial contient des gènes produisant des ARNt
- B – Les ribosomes mitochondriaux sont différents des ribosomes de la cellule
- C – Le nombre de copies du génome mitochondrial par cellule est constant
- D – La quasi-totalité des mitochondries d'un zygote lui est transmise par la mère
- E – Le génome mitochondrial est circulaire

Pour initier la transcription d'un gène il est nécessaire d'avoir:

- A - Des amorces d'ARN
- B - Un promoteur en amont du gène à transcrire
- C - Des ribonucléotides triphosphate
- D - Une ARN polymérase
- E - Une ADN polymérase

Parmi les propositions suivantes concernant le génome nucléaire humain, laquelle est exacte ?

- A - Les exons ne sont pas systématiquement codants
- B – Le nombre total de nucléotides des ARNm est systématiquement un multiple de trois
- C - Les microsatellites sont absents des gènes
- D - Les introns commencent par le dinucléotide CG
- E - La méthylation des promoteurs s'accompagne toujours d'une activation transcriptionnelle

Si l'on cherche à cloner le promoteur d'un gène eucaryote:

- a- Ce promoteur est recherché sur l'ADN génomique car le promoteur est éliminé lors de la maturation du transcrit
- b- Ce promoteur est recherché sur l'ADN génomique car le promoteur n'est pas transcrit
- c- Ce promoteur est recherché dans la région 5' de l'ADN complémentaire
- d- Ce promoteur est recherché dans la région 5' du transcrit primaire

Question N°58

M

Parmi les propositions suivantes, laquelle (lesquelles) est (sont) exacte(s) ?
En génie génétique, l'ADN complémentaire (ADNc)

- A - Est composé d'introns et d'exons
- B - Sert de vecteur à un gène ou à une séquence génétique
- C - Doit être formé d'un double brin pour être inséré dans un plasmide
- D - Peut constituer une sonde après marquage radioactif
- E - Est copié à partir d'ARN messager grâce à l'action d'une ADN ligase

QCM 2017

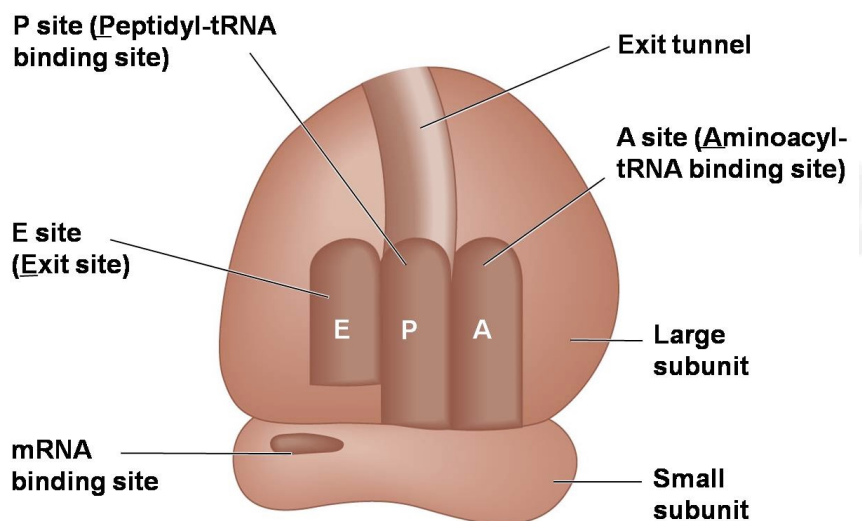
La Traduction – le ribosome

Un ribosome complet comporte

- 3 sites de fixation pour les ARNt
- 2 tunels permettant le passage de l'ARNm d'un côté et du peptide en cours de synthèse de l'autre

Le ribosome

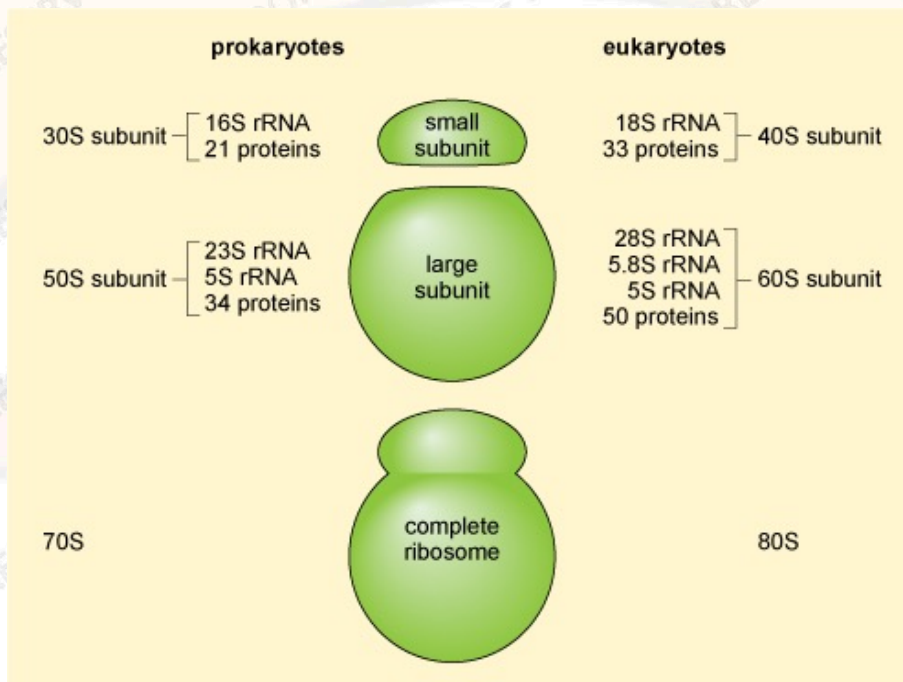
- lit l'ARNm de 5'-3'
- synthétise un peptide du NH₂ vers COOH.



© 2011 Pearson Education, Inc.



La Traduction – le ribosome



La Traduction - ARNt

L'adaptateur: l'ARNt

- 70 à 90 nucléotides
- structure tige-boucle (forme de trèfle)
- l'anticodon se situe dans une boucle (région simple brin, pouvant donc s'apparier...)
- séquence CCA en 3'-OH, impliquée dans la liaison avec l'acide aminé

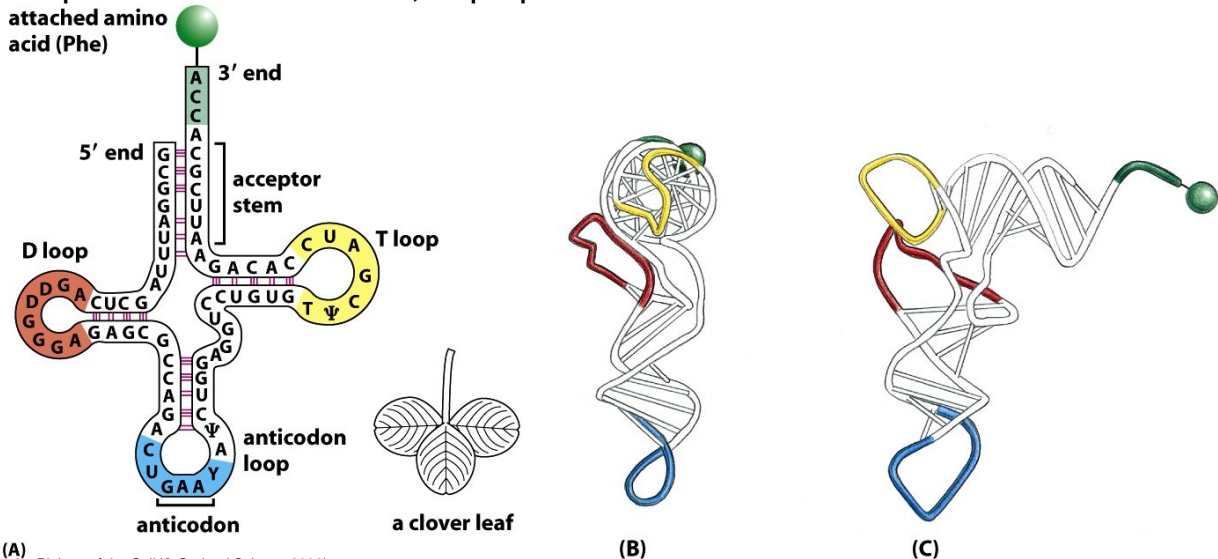


Figure 6-52 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)



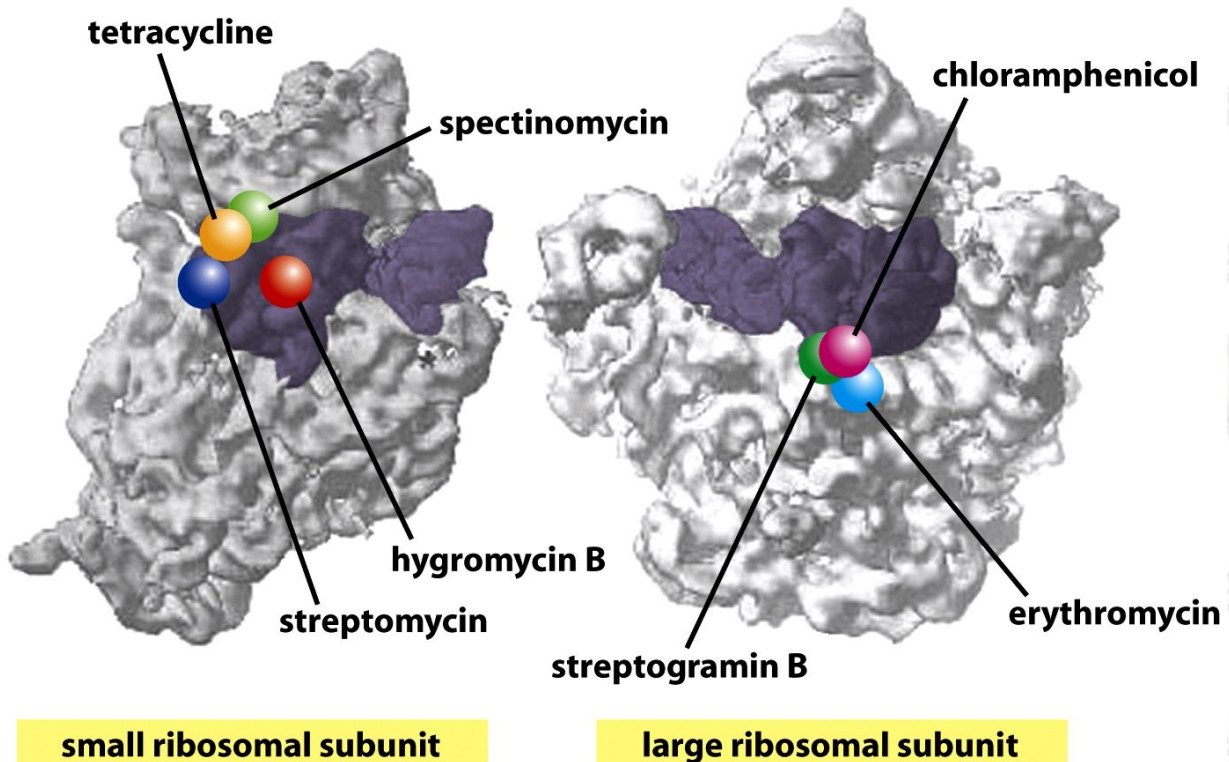
La Traduction – le code génétique

		Seconde base				
		U	C	A	G	
P r e m i è r e b a s e	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G
						T r o i s i è m e b a s e

- un codon spécifie toujours le même acide-aminé*.
- 3 codons ne codent pas pour un acide aminé. Spécifient un STOP.
- Met n'est codé que par AUG



La Traduction - antibiotiques





QCM/QCS



S

Parmi les propositions suivantes concernant l'expression d'un gène codant une protéine, laquelle est exacte?

- a) La séquence poly A des ARNm est synthétisée par une poly A polymérase
- b) Le signal de polyadénylation (AATAAA) est une séquence non transcrite
- c) L'intégrité du dinucléotide GT au début de l'intron n'est pas indispensable à l'épissage de l'ARN prémessager
- d) La TATA box est une séquence transcrite
- e) La transcription débute au codon d'initiation de la traduction

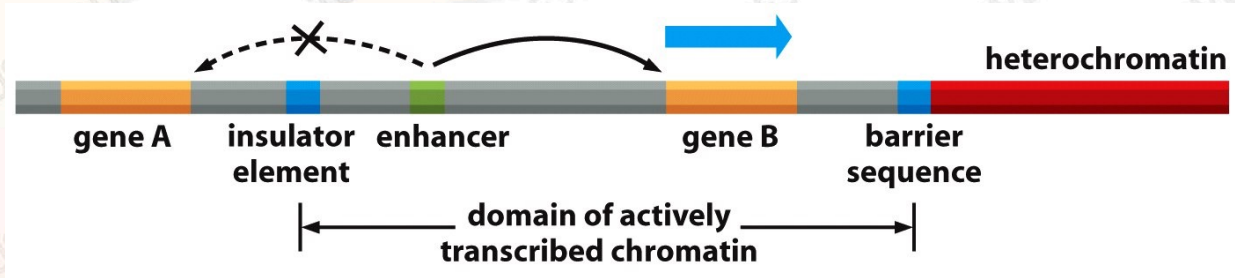
Les ARN ribosomaux (ARNr) :

- a- servent à la traduction
- b- sont transcrits, en partie, dans le nucléole
- c- sont traduits en protéines ribosomales
- d- portent les acides aminés pour l'étape de traduction

Mécanismes de régulation de l'expression des gènes

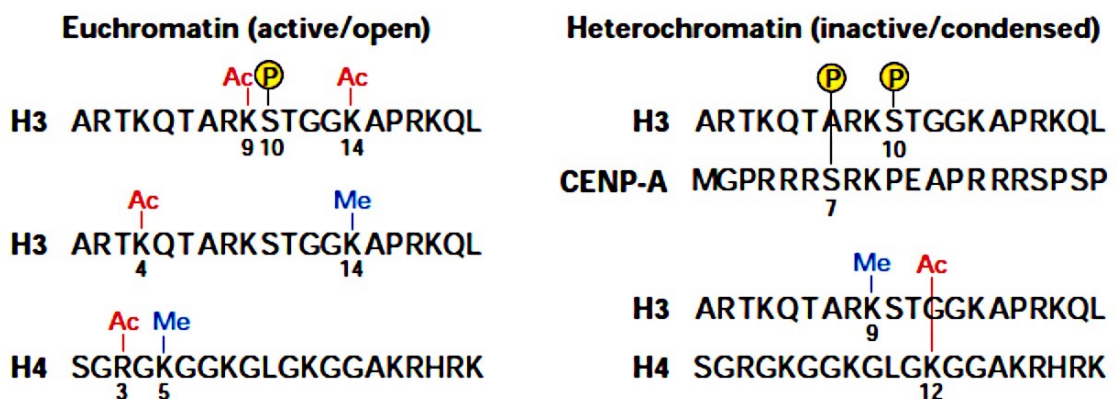
Régulation transcriptionnelle Eucaryote

Différents types de séquences régulatrices participent à la régulation de l'expression des gènes eucaryotes



Régulation de la transcription - modification des histones

Existence d'un "code" de modification des Histones





QCM/QCS



S

La régulation épigénétique d'un gène est contrôlée par des mécanismes de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones.

- a- cette affirmation est vraie
- b- seules les histones sont méthylées
- c- seul l'ADN est méthylé et acétylé
- d- l'ADN est acétylé et les histones sont méthylées

Le (ou les) mécanisme(s) de régulation post-transcriptionnel(s) chez les eucaryotes est (sont)

- a) Méthylation des cytosines
- b) Promoteurs alternatifs
- c) Epissage alternatif
- d) Stockage des ARNm
- e) Acétylation des histones

Mutations et Polymorphisme du génome



Variations du génome - Polymorphismes

Un génome normal :

- 1 séquence de référence
- de nombreuses variations dans la population

=> les polymorphismes :

Séquences intra- ou inter-géniques considérées comme non pathologiques pour le sujet.

peuvent correspondre à des traits phénotypiques simples (couleur des yeux, etc.), et peuvent être associés à des risques spécifiques.

variabilité entre deux sujets compte pour environ 0,1% du génome humain, soit 3×10^9 bp \times 0,1% => 3×10^6 bp !!!



Mutations - définition

Les mutations « ponctuelles » sont des substitutions de bases ou des gains ou pertes d'un petit nombre de paires de bases. Elles résultent d'erreurs de réplication mais également de modification chimiques de bases (déamination des cytosines, oxydation de bases modifiant les propriétés d'appariement) ou de perte de bases (sites abasiques) pouvant résulter du métabolisme de la cellule.

Ces variations dans la séquence d'ADN n'ont pas de conséquence pathologiques.

Les polymorphismes sont le résultat de "mutations".

Mutation : changement permanent et transmissible dans le matériel génétique

Ceci implique que "mutation" n'est pas synonyme de "pathologie"

Mutations - causes

MUTAGENES PHYSIQUES

Chaleur	désamination, dépurination
Rayonnement UV	dimères de thymine
Radiations ionisantes	cassures simple et double brin

MUTAGENES CHIMIQUES

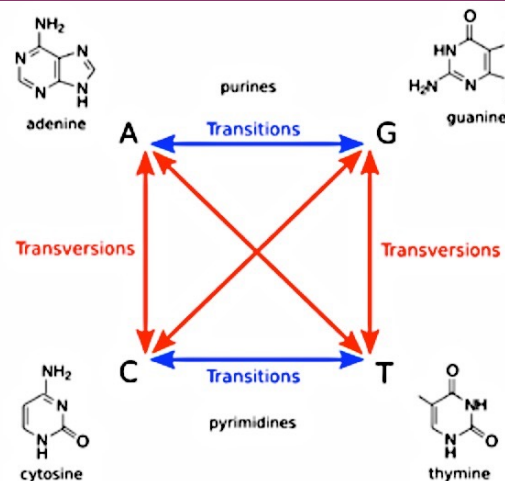
Analogues de bases	erreur réplication
Modificateurs de bases	mésappariement
Alkylants	mésappariement
Intercalants	erreur réplication
Agents de Pontage	liaison covalentes inter-brin

MUTAGENES BIOLOGIQUES

Virus, Transposons	insertion-délétion (Indel)
Activité Biologique	ADN pol, ROS

Les mutations ponctuelles

2 types de variations ponctuelles:



- **Les transitions :**

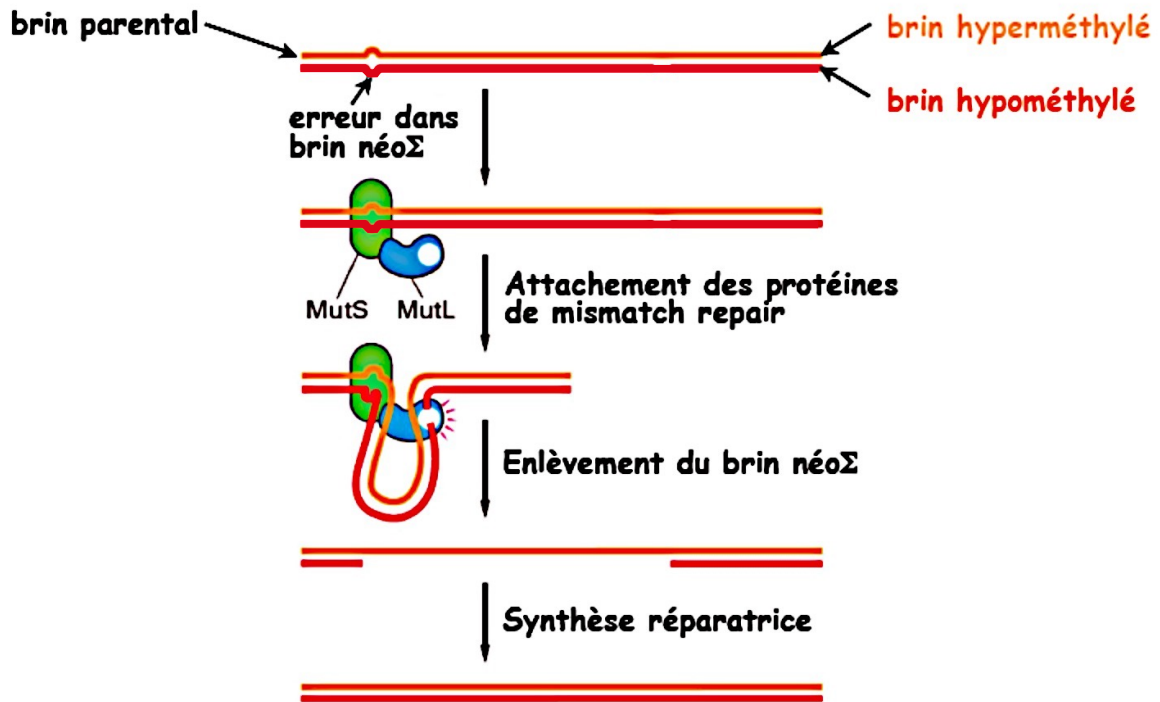
- base purique vers base purique (G>A/A>G)
- base pyrimidique vers base pyrimidique (C>T / T>C)

- **Les transversions :**

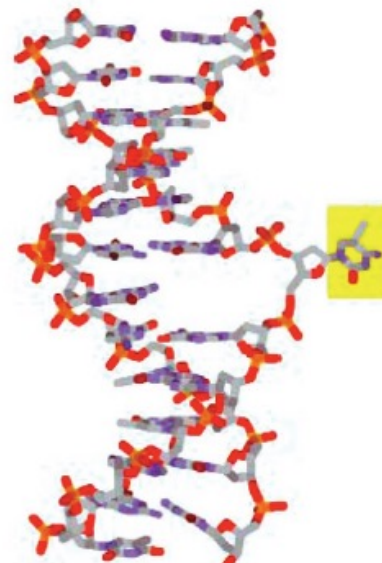
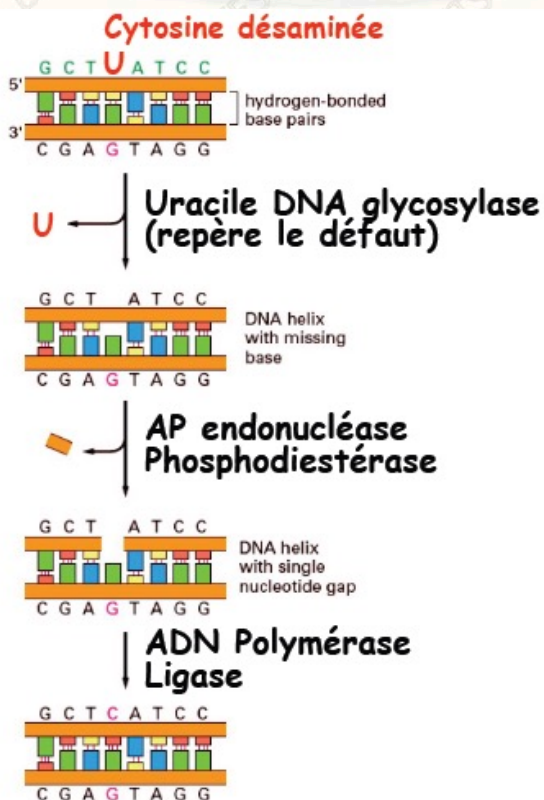
- base purique vers base pyrimidique (G>T/ G>C/A>T/A>C)
- base pyrimidique vers base purique (C>A/C>G/T>G/T>A)

Réparation de l'ADN - Methyl Mismatch Repair

Erreur de l'ADN polymérase (spontanée ou induite) --> Mésappariement

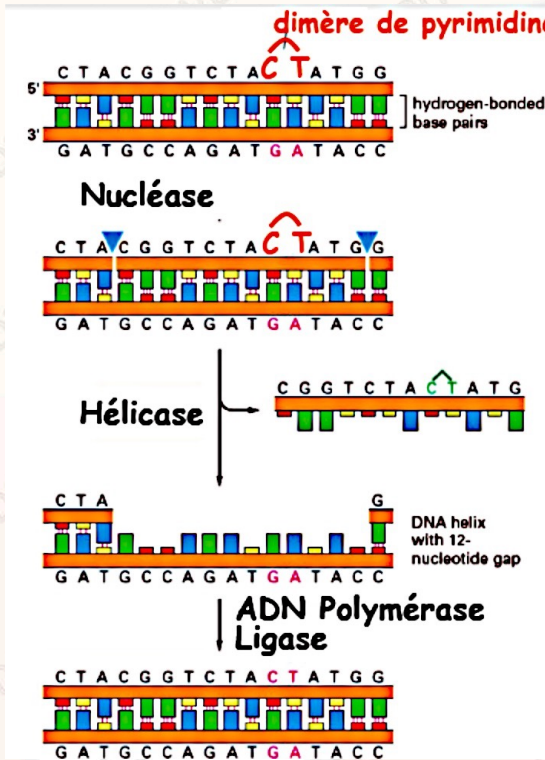


Réparation de l'ADN - Base Excision Repair: BER



Défaut repéré par glycosylase
= Retournement du à base anormale

Réparation de l'ADN - Nucleotide Excision Repair



Molécules impliquées

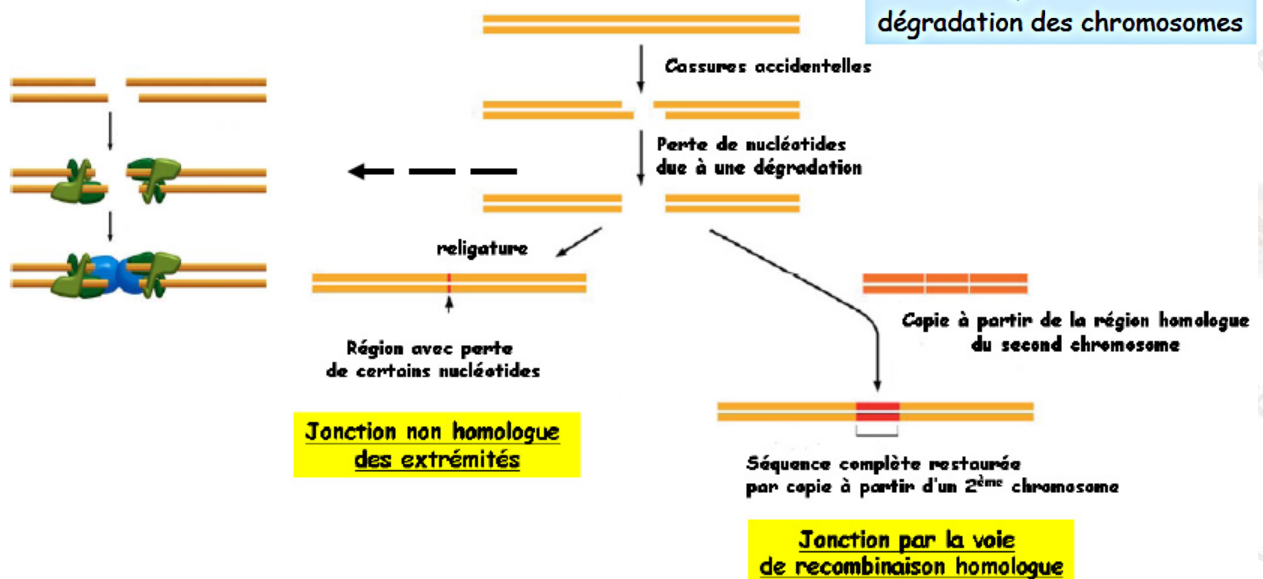
- Procaryotes: UVR A, B et C
- Eucaryotes: 15 protéines

Taille du gap généré

- Procaryotes: 12 MERS
- Eucaryotes: \approx 20 mers

Réparation de l'ADN - cassures double brin

Deux mécanismes de réparation

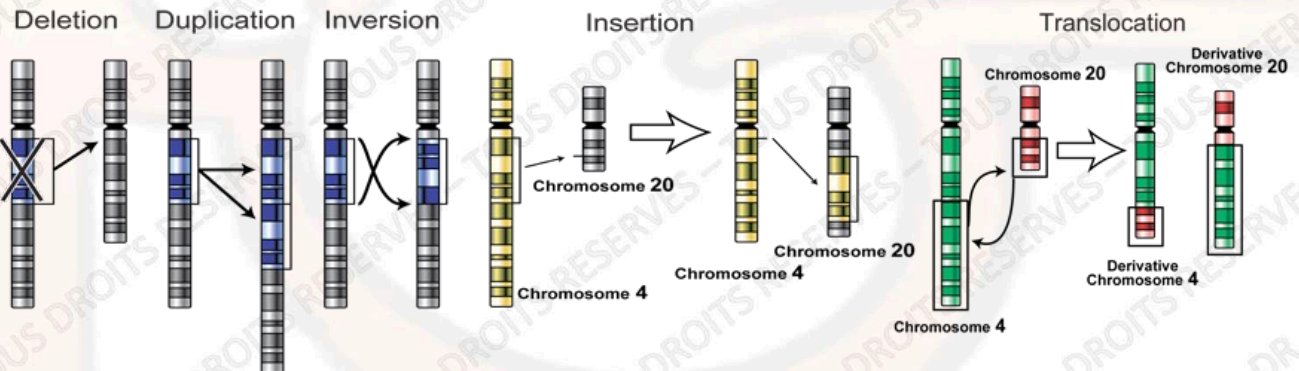




Variations du génome - Mutations

Les Macrolésions

- Délétion
- Duplication
- Amplification
- Inversion
- Fusion ou translocation
- Insertion

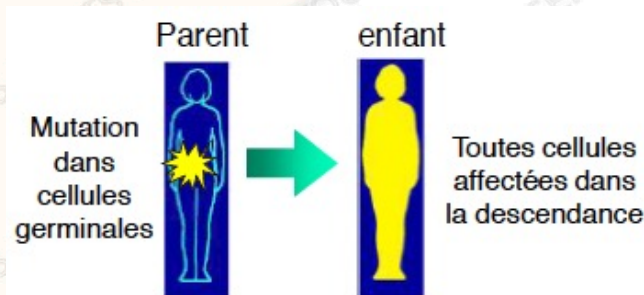


Modifications du génome et méthodes d'analyses



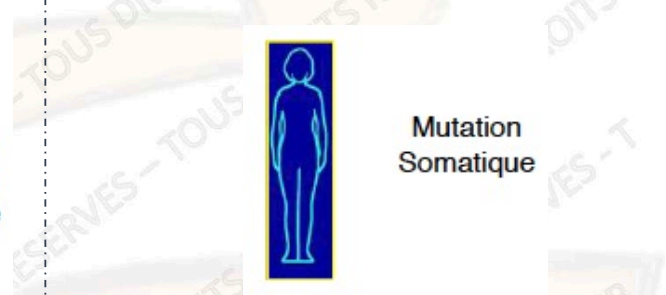
Variations du génome - Mutations

Germine/Constitutionnelle



- présent dans les cellules germinales
- héréditaire
- Analyse possible à partir de tout tissu (Sang, Salive...)
- Législation précise pour effectuer ce type d'analyse
- Nécessité d'un consentement éclairé

Somatique



- Survient dans les tissus non germinaux
- Non héréditaire
- Nécessite d'avoir accès au tissu atteint pour l'analyse
- Pas de législation spécifique en dehors de la législation relative à de la Biologie Médicale

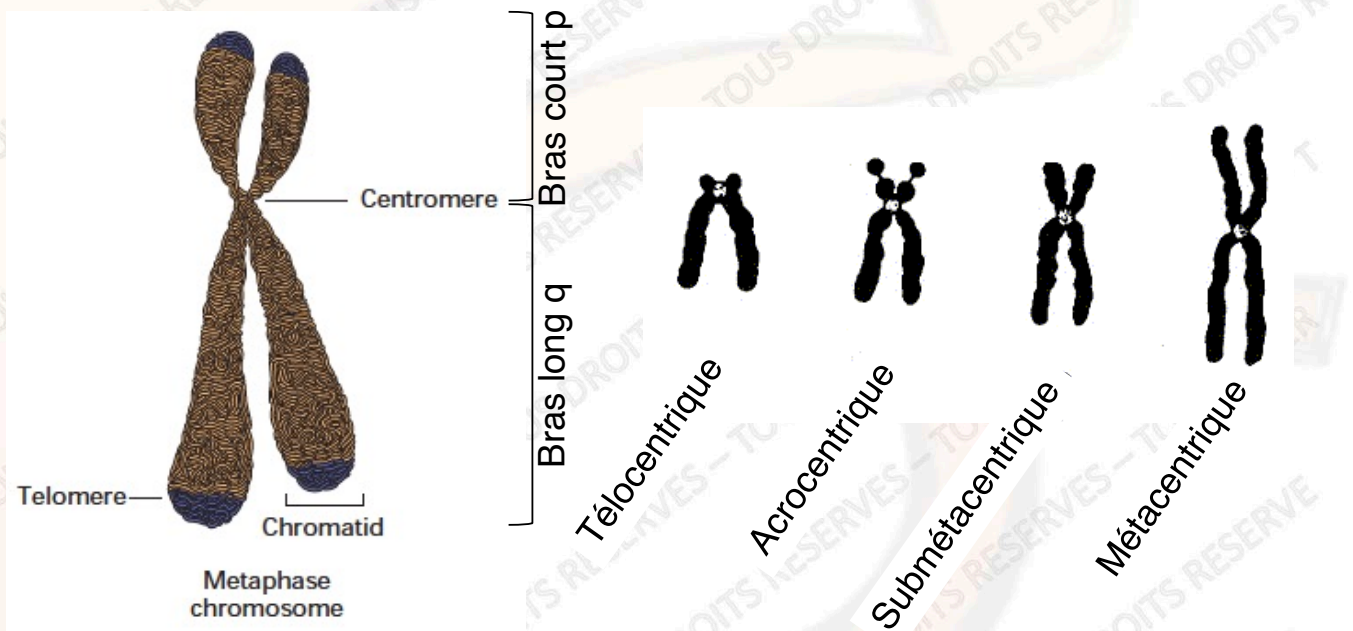
Article L1131-1 du code de la santé publique

Modifié par [LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 2](#)

L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou son identification par empreintes génétiques sont régis par les dispositions du chapitre III du titre Ier du livre Ier du code civil et par les dispositions du présent titre, sans préjudice des dispositions du titre II du présent livre.

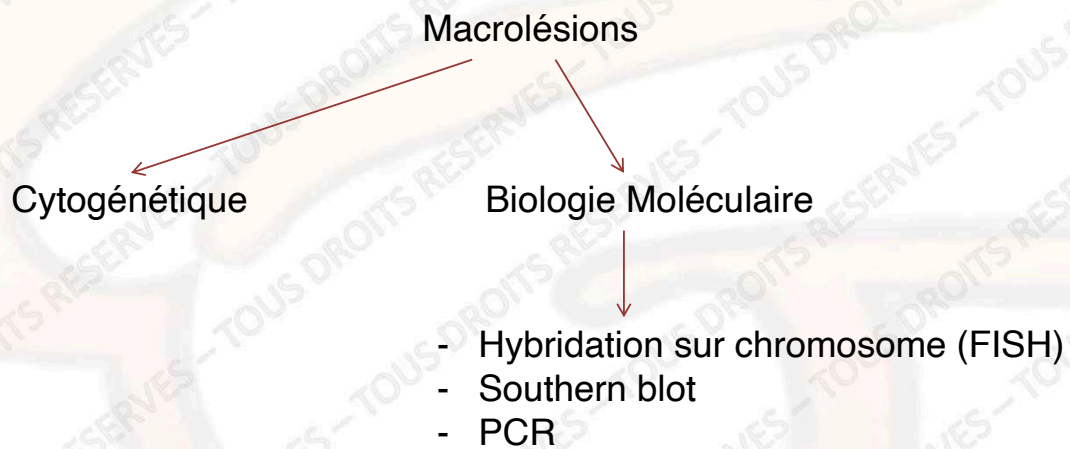
Toutefois, lorsqu'il est impossible de recueillir le consentement de cette personne ou, le cas échéant, de consulter la personne de confiance mentionnée à [l'article L. 1111-6](#), la famille ou, à défaut, un de ses proches, l'examen ou l'identification peuvent être entrepris à des fins médicales, dans l'intérêt de la personne.

Chromosomes - structure, nomenclature



Molecular Cell Biology, Fifth Edition

Stratégies d'analyse de mutations



Caryotype

I- A partir de cellules nucléées en division

(culture au moins 72h pour obtenir des plaques métaphasiques)

- Lymphocytes circulants
- Cellules amniotiques
- Cellules trophoblastiques
- fibroblastes...

II- Extraction

- Blocage à la Colchicine
- choc hypotonique

III- Coloration

R Banding: RHG (Rbanding, Heat, Giemsa)

G Banding: GTG (Giemsa, Trypsine, Giemsa)

IV- Observation et analyse

Caryotype

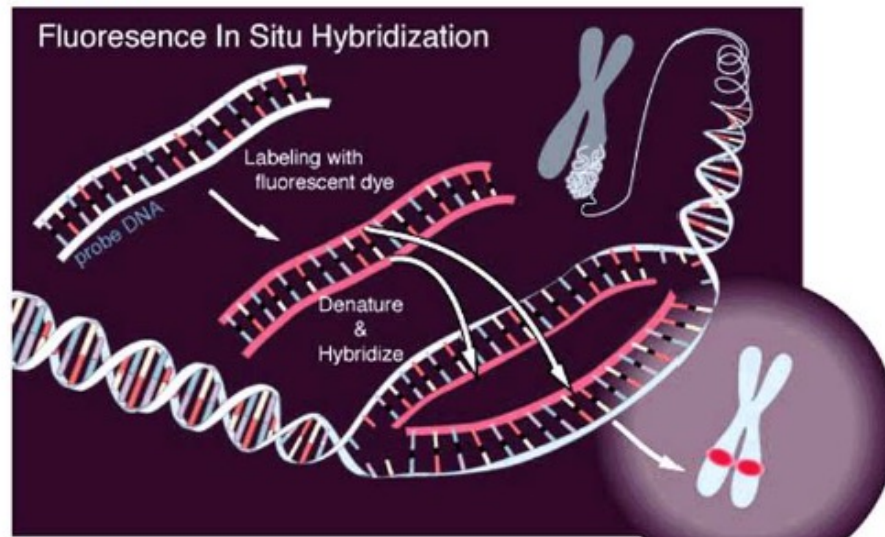
Caryotype normal en bandes R



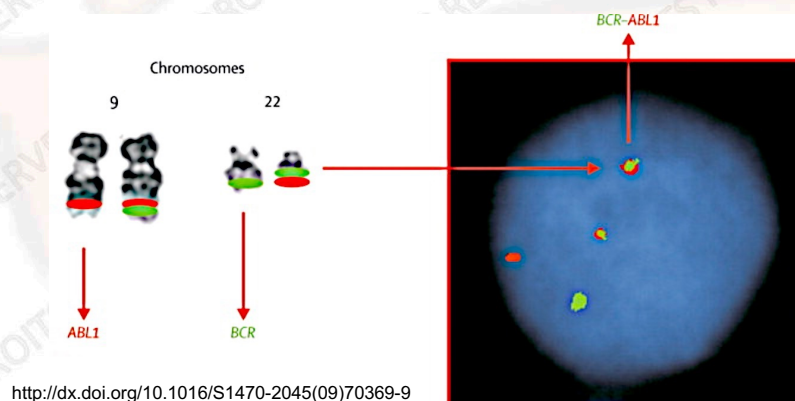
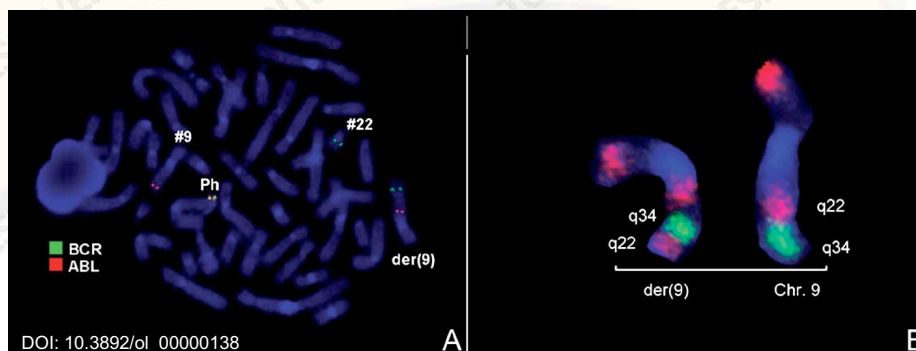
- Le caryotype a une résolution de 10Mbases au mieux, nécessite des cellules en division,
- Identifications d'anomalie de nombre :
 - Aneuploïdie : triploïdies, tétraploïdies
 - Aneusomies : monosomies, trisomies
- de structure :
 - Translocations et insertions, Inversions Délétions, duplications et gains, amplifications
- Essor aussi avec l'utilisation de la fluorescence

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

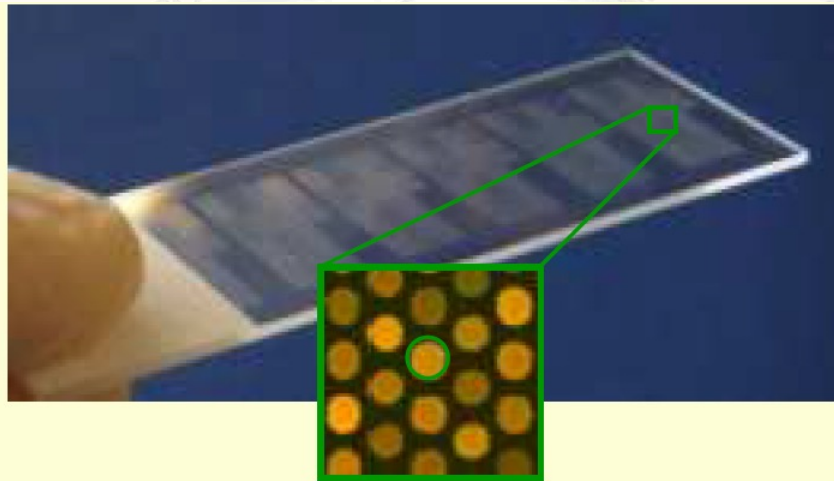
- Principe
 - Sonde = ADN marqué spécifique d'une région que l'on veut étudier
 - Cible = chromosomes ou noyaux ou cellules que l'on veut tester



FISH – détection de translocation



Comparative Genomic Hybridization- CGH



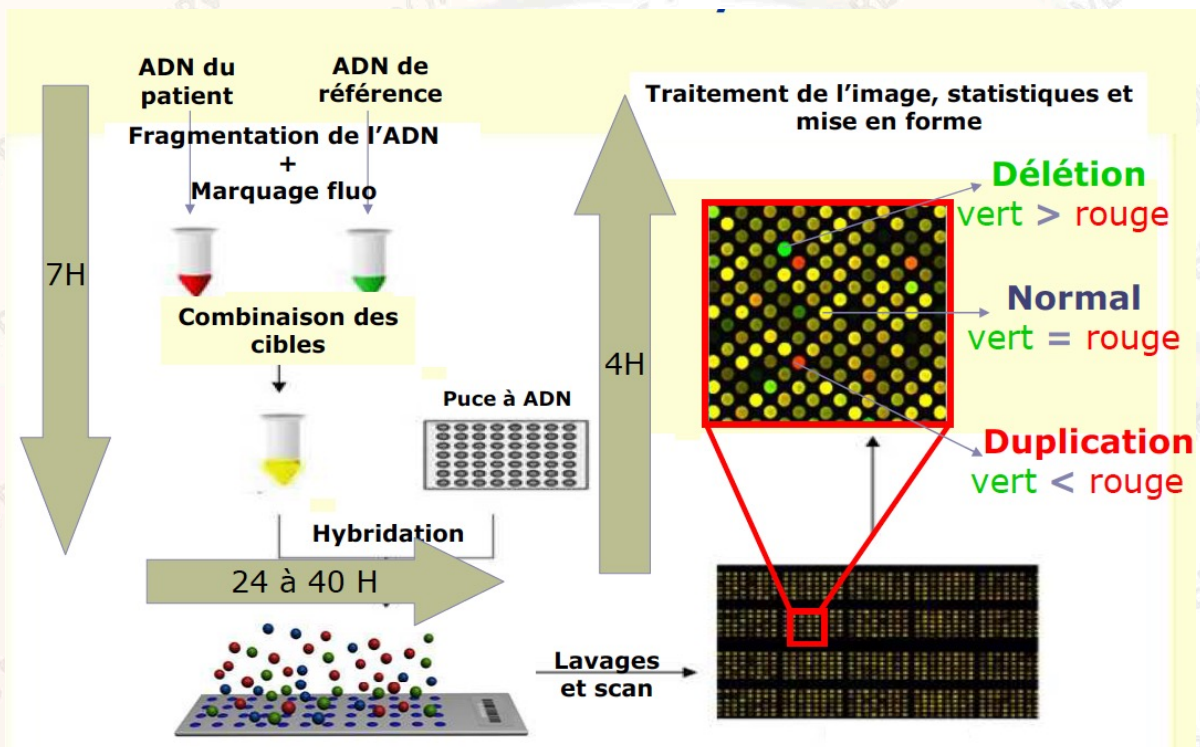
1 spot = 1 séquence d'ADN présente en multiples copies.

1 bonne sonde = **séquence d'ADN unique présente dans le génome humain.**

Plus il y a de sondes différentes sur la puce à ADN, meilleure sera la résolution de la puce (+ d'informations).

from CHU Nantes-Laboratoire de cytogénétique

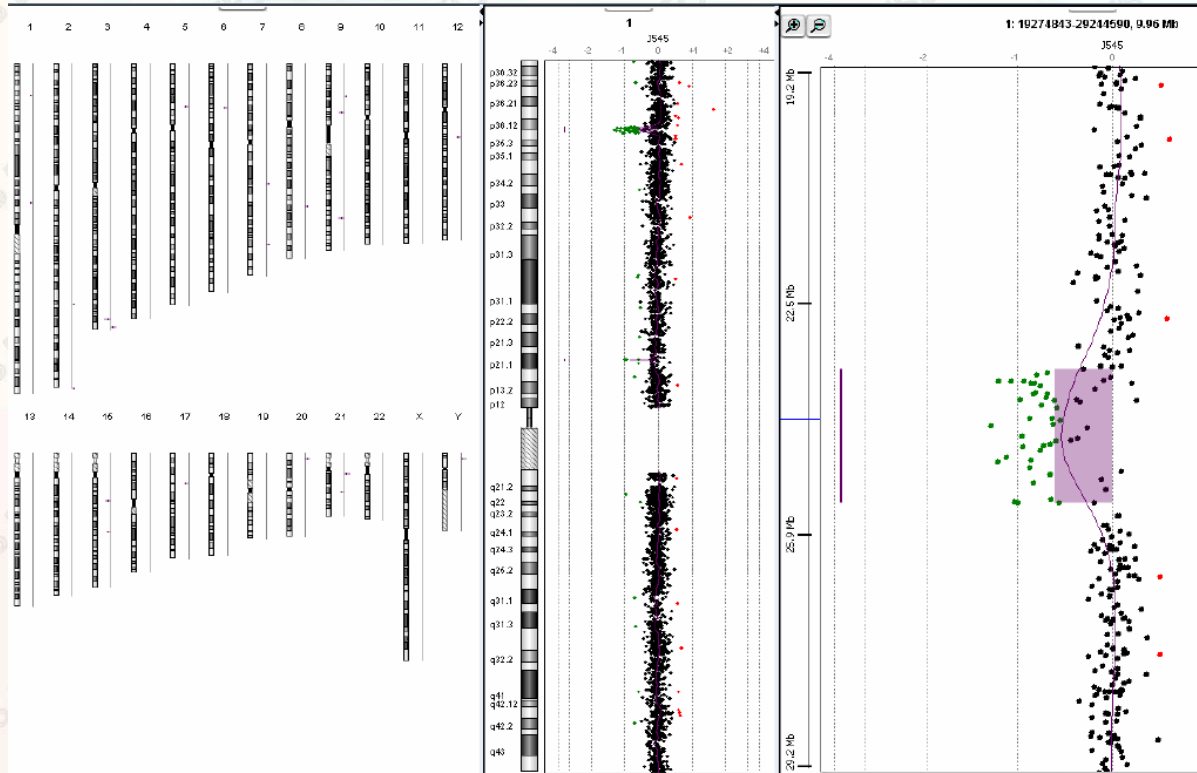
Comparative Genomic Hybridization- CGH



from CHU Nantes-Laboratoire de cytogénétique



Comparative Genomic Hybridization- CGH



from CHU Nantes-Laboratoire de cytogénétique



QCM/QCS



Parmi les propositions suivantes concernant les notions de génotype et de phénotype, lesquelles sont **justes** ?

- A - Le génotype est l'ensemble des gènes hérités par un individu
- B - Le phénotype est l'ensemble des caractères observés chez un individu
- C - L'expression du génotype de l'individu lui confère son phénotype
- D - Un même génotype ne peut produire que des phénotypes identiques
- E - Le génotype est la totalité de l'ADN d'une cellule

Parmi les propositions suivantes concernant la génétique, indiquez celle(s) qui est (sont) **exacte(s)** :

- a) La cytogénétique et le southern blot permettent la détection d'anomalie de grande taille
- b) La PCR, permettant une amplification exponentielle de l'ADN, utilise une Taq polymérase et des dNTP
- c) Le Southern blot est une hybridation ADN-ARN
- d) Le western blot est une méthode semi-quantitative
- e) Le northern blot permet l'étude de l'expression transcriptionnelle

Parmi les propositions suivantes, donner la (les) réponse(s) **exacte(s)**. Le Southern blot :

- a) Vise à détecter la présence d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques dans un génome entier
- b) Permet de détecter la présence d'une mutation sur une séquence nucléotidique définie (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP)
- c) Permet l'analyse des ARN messagers
- d) Utilise le principe de l'hybridation moléculaire
- e) Peut être utilisé pour la détection d'empreinte génétique

Quelles sont les propositions exactes?

Le caryotype :

- a) est l'ensemble des chromosomes d'un individu
- b) est analysé afin de mettre en évidence des translocations entre les chromosomes
- c) peut différer d'un individu à l'autre appartenant à la même espèce en absence de pathologies
- d) comprend 22 paires de chromosomes chez l'homme

Parmi les propositions suivantes concernant le caryotype, laquelle ou lesquelles est (sont) **exacte(s)** ?

- a) Peut être établi après stimulation en culture des lymphocytes sanguins par la phytohémagglutinine
- b) Peut être établi après examen direct (sans culture) des mitoses sur cellules médullaires
- c) Peut mettre en évidence une anomalie de nombre des chromosomes
- d) Peut mettre en évidence une translocation
- e) Peut mettre en évidence une mutation génique

Question N°11

M

Parmi les propositions suivantes concernant le génome nucléaire de l'Homme, lesquelles sont exactes ?

- A - Il existe en moyenne une séquence de type Alu tous les 5 kilobases
- B - Les SNPs sont des polymorphismes liés à des insertions/délétions de quelques nucléotides
- C - Les centromères sont constitués de séquences uniques
- D - Tous les exons sont codants
- E - La taille génomique des gènes varie de quelques centaines à quelques millions de paires de bases

Merci de votre attention

