

Cours de Biologie Moléculaire



F. GESBERT

franck.gesbert@universite-paris-saclay.fr

INTRODUCTION – Equipe enseignante

Equipe Biologie Moléculaire:

- Franck GESBERT
- Najet MEJDOUBI-CHAREF
- Séverine Lorin
- Apolline Imbard

Organisation du cours:

- 8 heures de cours magistraux enregistrés
- 2 x 2 heures amphitheâtre
- 3 heures d'ED (2 fois 1,5 heures)

- **Cours I** : Introduction, bases fondamentales, expériences fondatrices. Métabolismes des nucléotides.
- **Cours II** : Structure de l'ADN, réplication, propriétés physico-chimiques et applications.
- **Cours III** : Transcription, Traduction et régulation de l'expression des gènes
- **Cours IV** : Concepts et bases de génétique

Un **document de travail personnel** rappelant les mécanismes vus en PASS/LAS

Un **amphi/ED** permettant de rassembler des questions et de traiter spécifiquement certains points en supplément des 2 séances d'ED en groupe.

Autant que possible

- il sera fait appel aux "expériences historiques", ces expériences devront être intégrées.
- nous ferons le lien avec des pathologies
- nous identifierons des cibles pharmacologiques

- 1- Acquisition de connaissances de base en Biologie Moléculaire et Génétique
- 2- Acquisition de notions expérimentales dans ce domaine
- 3- Acquisition de bases saines permettant une réflexion au plan moléculaire dans d'autres disciplines
- 4- Acquisition de bases saines permettant une réflexion sur les développements futurs dans le domaine de la biologie moléculaire appliquée à la santé.

Nouveauté

- A+** Connaissance devant ABSOLUMENT être acquise et maîtrisée
- A** Connaissance devant être acquise
- B** Notion d'intérêt et de culture générale

- 1- Acquisition de connaissances de base en Biologie Moléculaire et Génétique
- 2- Acquisition de notions expérimentales dans ce domaine
- 3- Acquisition de bases saines permettant une réflexion au plan moléculaire dans d'autres disciplines
- 4- Acquisition de bases saines permettant une réflexion sur les développements futurs dans le domaine de la biologie moléculaire appliquée à la santé.

Nouveauté

- A+** Connaissance devant **ABSOLUMENT** être acquise et maîtrisée (concept ou technique)
- A** Connaissance devant être acquise
- B** Notion d'intérêt et de culture générale

INTRODUCTION – l'évaluation

- A+** Connaissance devant **ABSOLUMENT** être acquise et maîtrisée (concept ou technique)
- A** Connaissance devant être acquise
- B** Notion d'intérêt et de culture générale

En conséquence :

Evaluation sous forme de QCS, de QROC et d'analyse ou de reconstitution de pédigrée. Evaluation exclusivement sur les notions A+, A, les amphi-ED et les ED. Les notions A-B ou B ne seront pas évaluées.

Points importants :

- 1- Les QCS ne porteront que sur les notions A+ et A avec une plus forte pondération sur les A+.
- 2- Les QCS comporteront une notation négative avec une très forte pondération sur les A+.

Ainsi :

- une question A valant 1 point dont la réponse est fausse sera comptée (0)
- Une question A+ valant 1 point dont la réponse est fausse sera comptée (-0,5).

	A+	A+A	A
Cours 1	38%	10%	10%
Cours 2	31%	4%	21%
Cours 3	20%	-	33%
Cours 4	33%	1%	24%
Total	31%	3%	23%

42 points pour l'épreuve finale (8 points pour les TP)

14 points pour la Biologie Moléculaire
(25 à 30 minutes sur 2 heures)

I. QCS (8 points)

12 questions (8 questions A+, 4 questions A)

II. QROC (3 points)

Uniquement question A+

III. Analyse de pédigrée (3 points)

INTRODUCTION - Bibliographie

- **Molecular Biology of the Cell**, Alberts-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter, Editions Garland science, fifth edition
- **Concepts of Genetics**, Klug-Cummings-Spencer, Editions Pearson, eighth edition
- **Biologie moléculaire du gène**, Watson-Baker-Bell-Gann-Levine-Losick, Editions Pearson
- **Principes de biologie moléculaire en biologie clinique**, Ameziane-Bogard-Lamoril, Editions Elsevier

- Cours I :

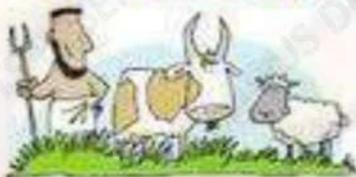
Introduction, bases fondamentales, expériences fondatrices. Métabolismes des nucléotides.



Génétique et Biologie Moléculaire – rappels historiques

B

La structure cellulaire, l'existence de gènes et leur organisation au sein d'un génome avaient été décrits avant même la connaissance moléculaire du support de l'hérédité.



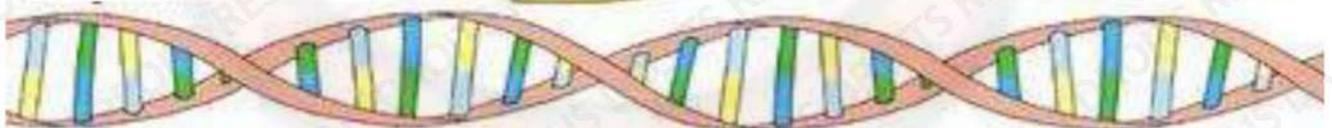
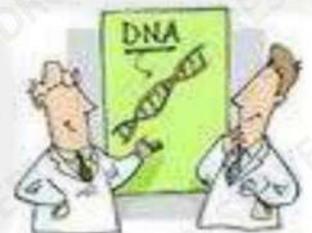
8000 bc. Les premiers "éleveurs" font de l'amélioration génétique de leurs graines et de leurs animaux d'élevage en contrôlant les croisements et en conservant les individus les plus intéressants.

1859. Publication de "de l'origine des espèces" de Charles Darwin. Observation de l'hérédité de certains caractères et hypothèse de leur évolution.



1953. Jim Watson et Francis Crick décrivent la structure en double hélice de l'ADN.

1863. Le moine autrichien Grégor Mendel décrit les lois de l'hérédité.



1953 est l'année charnière de l'essor de la biologie moléculaire. Concepts et connaissances évoluent au grès des progrès techniques.

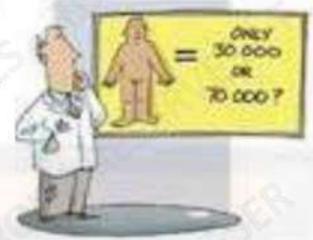
1960.

Sydney Brenner, Francis Crick, François Jacob et Jacques Monod découvrent l'ARNm

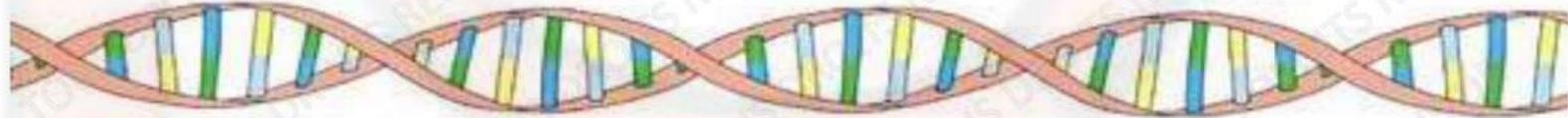


1966. Décryptage du code génétique. Chacun des 20^{*} acides aminés est codé par un codon de trois nucléotides

1990. Lancement du Human Genome Project afin d'obtenir la séquence complète d'un génome humain



2003. Fin du séquençage du génome humain révélant la position de 21000 gènes.



Le support de l'information génétique

En 1920 nous savons :

- que les espèces sont liées par des phénomènes évolutifs.
- Identifier les chromosomes.
- Localiser les gènes sur les chromosomes et en réaliser une cartographie.
- que les chromosomes sont composés de protéines et d'acides nucléiques.
- En 1908 Garod avait émit l'hypothèse "un gène-une enzyme".
- Les enzymes sont des protéines.
- Les protéines sont composées de 20 acides aminés.

"qu'est ce qui compose le support de l'information génétique?"

"Comment l'information contenue dans les gènes permet la synthèse protéique? "

Suppose un système extrêmement complexe de réactions inter-corrélées lors de la synthèse protéique.

1928: **Frederick Griffith** démontre le phénomène de transformation sur *Streptococcus pneumoniae*.

Observation:

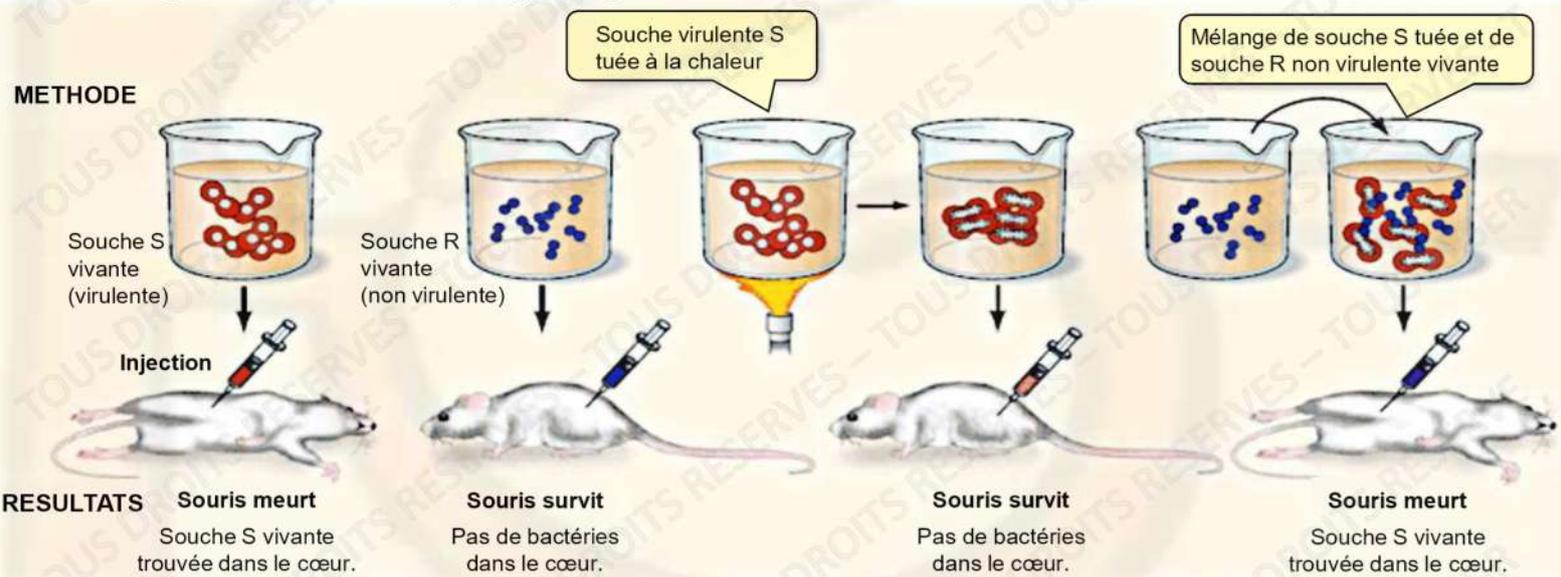
Des souches non virulentes de bactéries deviennent virulentes au contact de souches virulentes tuées par la chaleur

Hypothèse:

L'acquisition de la virulence est due à une transformation reposant sur des changements héréditaires

La pathogénicité est due à un gène qui code pour une enzyme clé impliquée dans la synthèse de la capsule bactérienne:

- Si l'allèle S (Smooth) est présent, la capsule se forme, les bactéries ont une surface lisse et sont pathogènes.
- Si l'allèle R (Rough) est présent, la capsule ne se forme pas, les bactéries ont une surface rugueuse et ne sont pas pathogènes.



CONCLUSION: une substance chimique d'une cellule est capable de **transformer** une autre cellule.

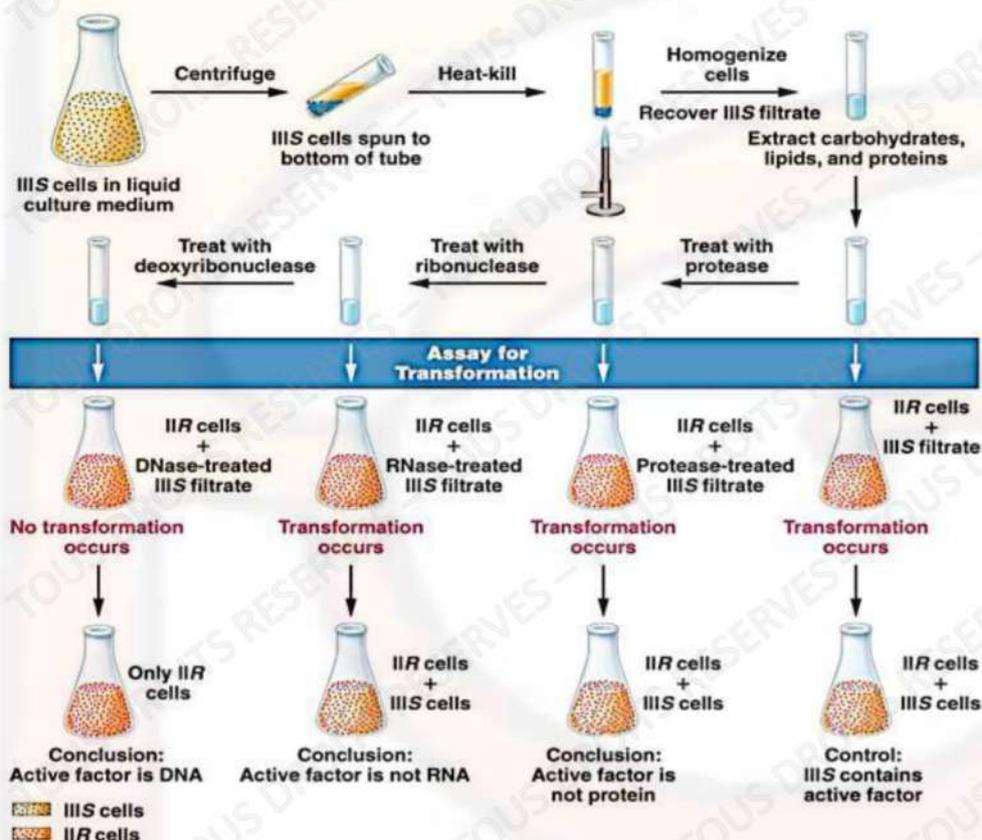
Question:

Quelle est l'identité chimique de l'agent transformant?

Avery, MacLeod, McCarty et l'ADN

A+

-1944: Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod and Maclyn McCarty



Expériences sur *Streptococcus* et montrent que le facteur transformant est sensible à l'action de la DNase.

Donc,

la substance transformante est l'ADN.

"Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III." January 1944. J. Exp. Med., 79: 137-158.

DISCUSSION

The present study deals with the results of an attempt to determine the chemical nature of the substance inducing specific transformation of pneumococcal types. A desoxyribonucleic acid fraction has been isolated from Type III pneumococci which is capable of transforming unencapsulated R variants derived from Pneumococcus Type II into fully encapsulated Type III cells.

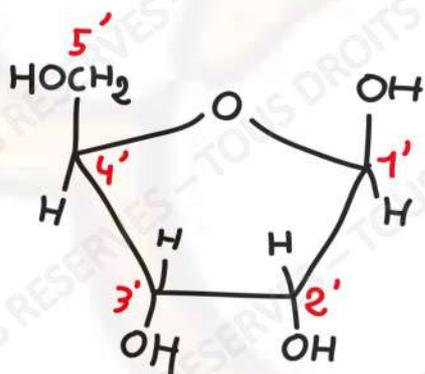
It is, of course, possible that the biological activity of the substance described is not an inherent property of the nucleic acid but is due to minute amounts of some other substance adsorbed to it or so intimately associated with it as to escape detection. If, however, the biologically active substance isolated in highly purified form as the sodium salt of desoxyribonucleic acid actually proves to be the transforming principle, as the available evidence strongly suggests, then nucleic acids of this type must be regarded not merely as structurally important but as functionally active in determining the biochemical activities and specific characteristics of pneumococcal cells. Assuming that the sodium desoxyribonucleate and the active principle are one and the same substance, then the transformation described represents a change that is chemically induced and specifically directed by a known chemical compound. If the results of the present study on the chemical nature of the transforming principle are confirmed, then nucleic acids must be regarded as possessing biological specificity the chemical basis of which is as yet undetermined.

La prudence est de mise et la majorité de la communauté scientifique persiste à croire que les protéines sont le support de l'hérédité.

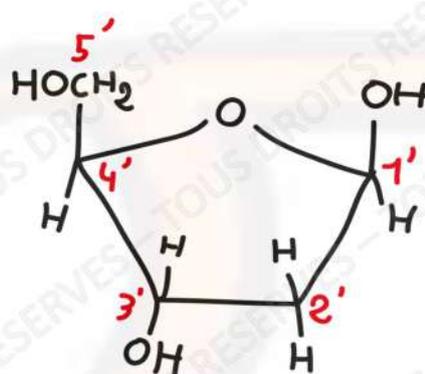
Chimie des acides nucléiques

Les acides Ribo et **Désoxy-ribo Nucléiques** (ARN et ADN) sont des polymères de **nucléotides** composés d'un squelette (**désoxy**)ribose-Phosphate et de **Bases azotées**.

Les sucres



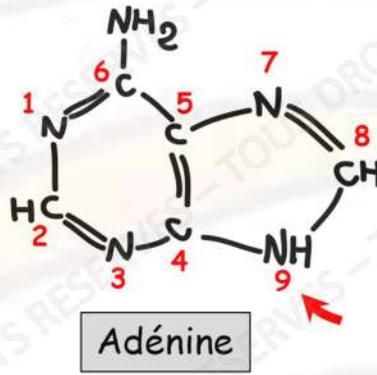
Ribose



Désoxyribose

Les Bases

➤ Puriques

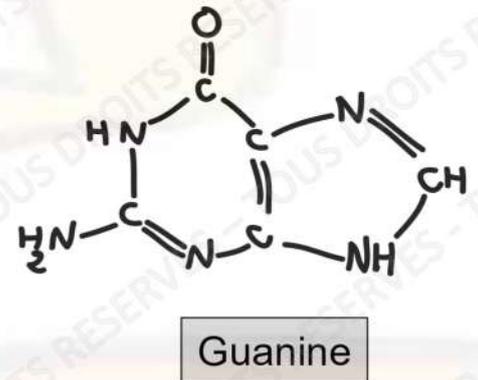


➤ Pyrimidiques

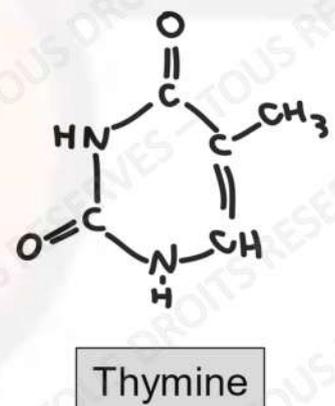
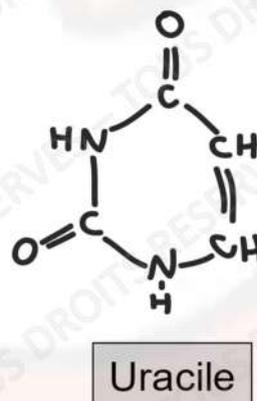
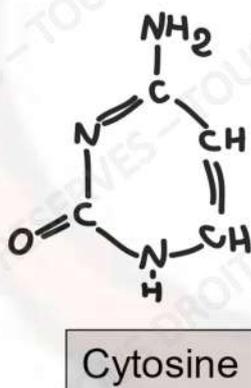


Les Bases

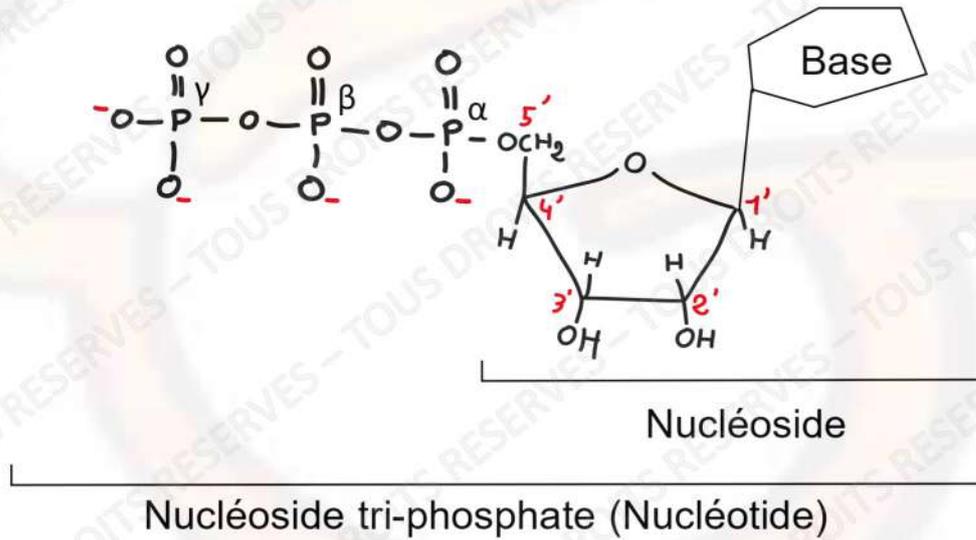
➤ Puriques



➤ Pyrimidiques



Nomenclature



Chimie des acides nucléiques - Nomenclature

BASE	NUCLEOSIDE	NUCLEOTIDE	Abréviation
Adénine	adénosine	acide adénylique	AMP
Guanine	guanosine	acide guanylique	GMP
Cytosine	cytidine	acide cytidylique	CMP
Thymine	thymidine	acide thymidylique	TMP
Uracile	Uridine	acide uridylique	UMP

Selon le degré de phosphorylation:

- Adénosine mono-phosphate (AMP)
- Adénosine di-phosphate (ADP)
- Adénosine tri-phosphate (ATP)

Ajouter le préfixe désoxy- pour les désoxyribonucléotides

Il existe **2 voies de biosynthèses** des nucléotides:

1 - Néosynthèse

2 - Récupération (Sauvegarde ou épargne)

- Dans tous les cas, les nucléotides sont synthétisés sous forme de

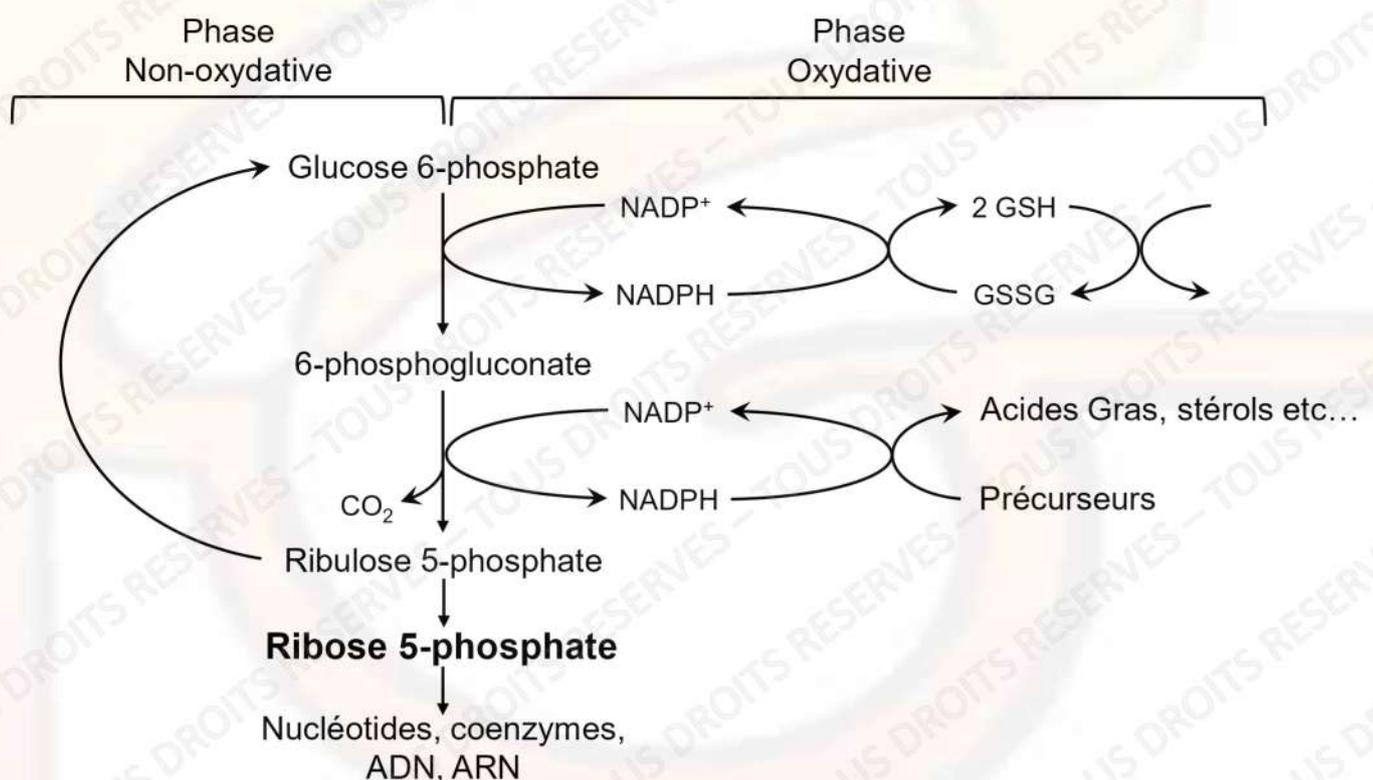
RIBO-nucléotides

- Les **voies** de biosynthèses des purines et des pyrimidines sont **distinctes**

- Les voies de biosynthèse sont **régulées** très finement **de manière spécifique et croisée**.

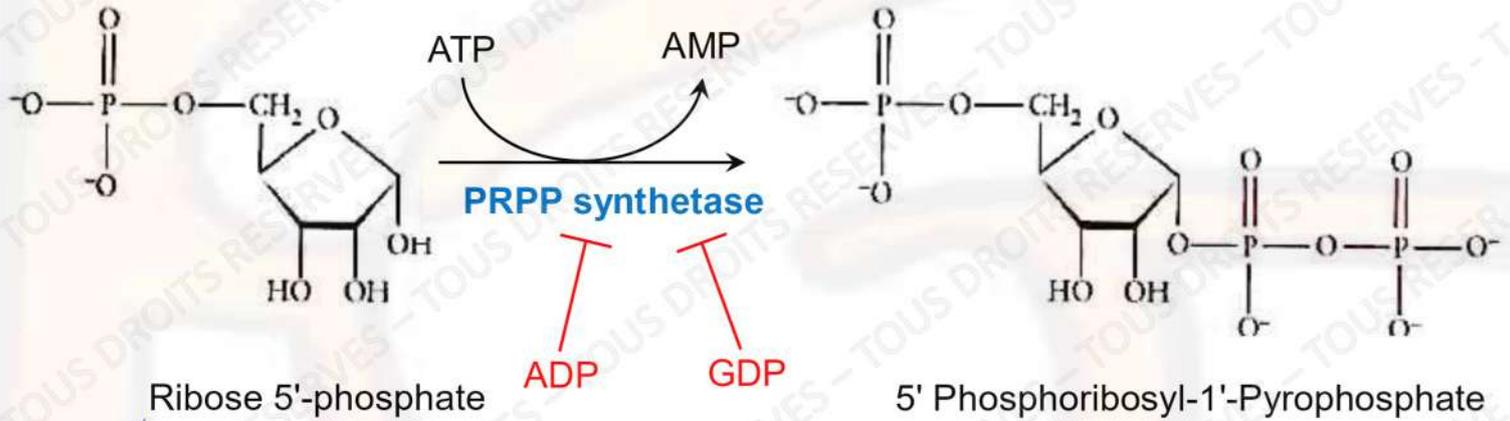
Biosynthèse des nucléotides – Le PRPP

Ribose 5-phosphate produit par la voie des pentoses



Le 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate (PRPP):

point de départ de la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques



PRPP synthétase est inhibée par les nucléotides puriques ADP et GDP

Néosynthèse

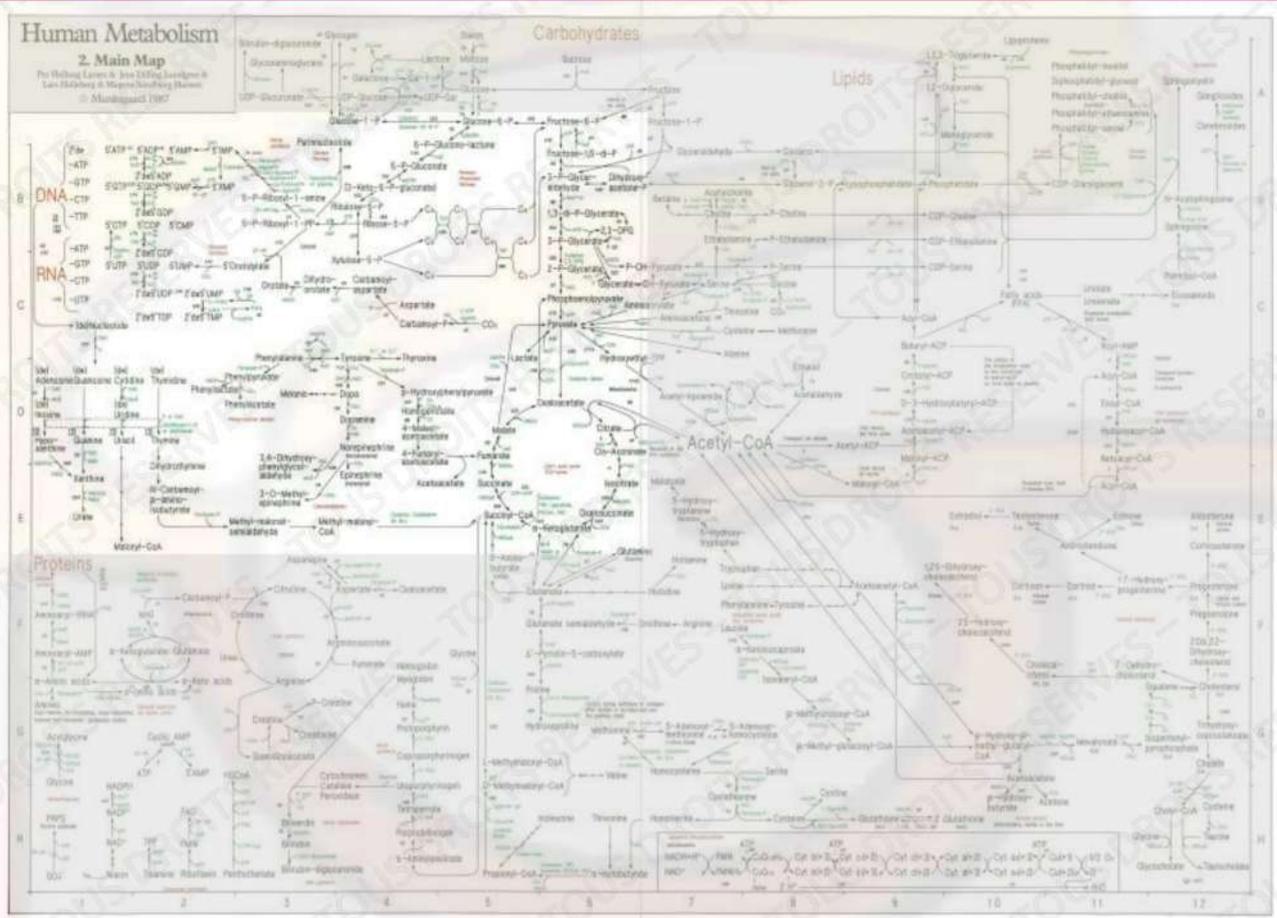
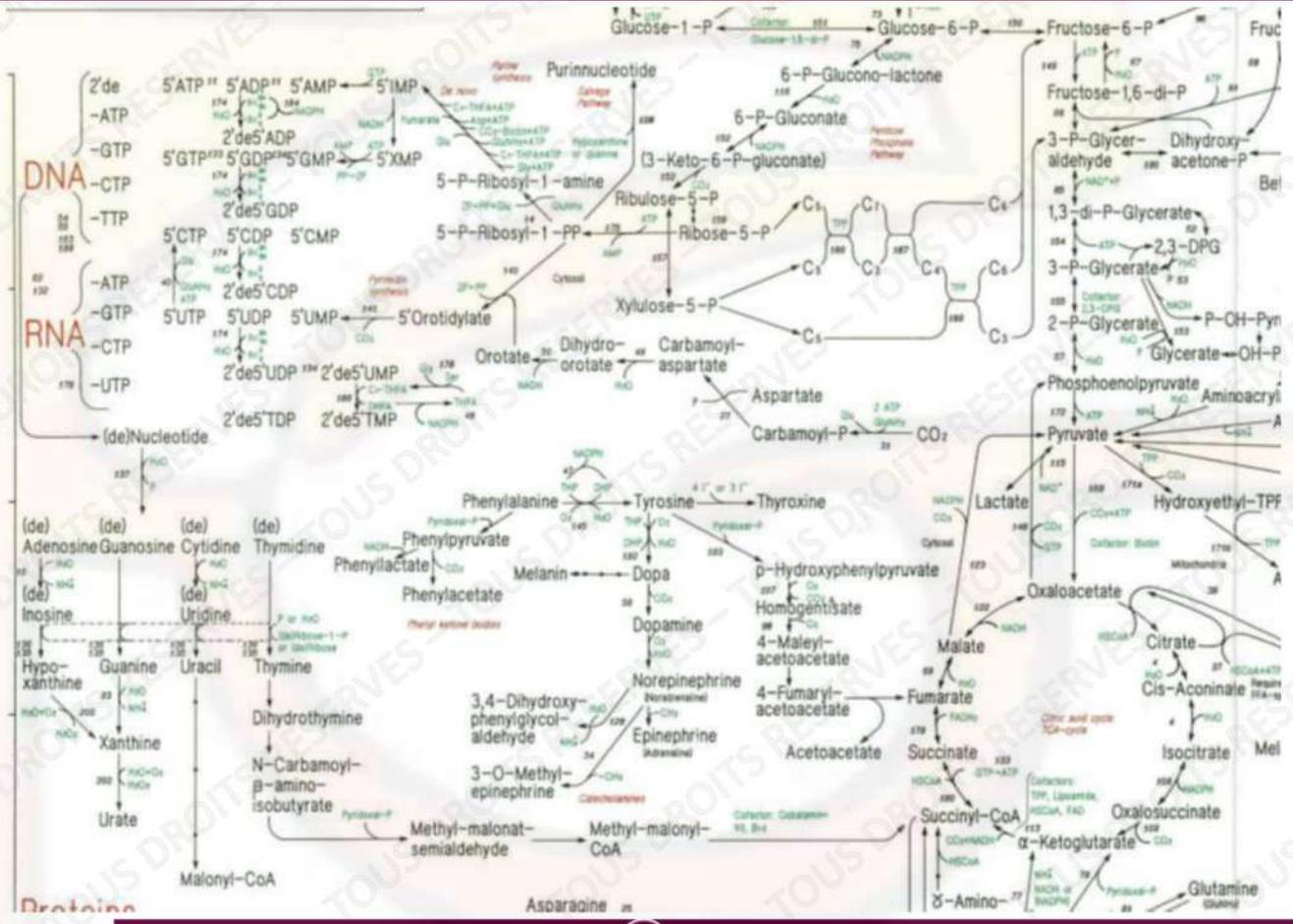
Récupération ou épargne

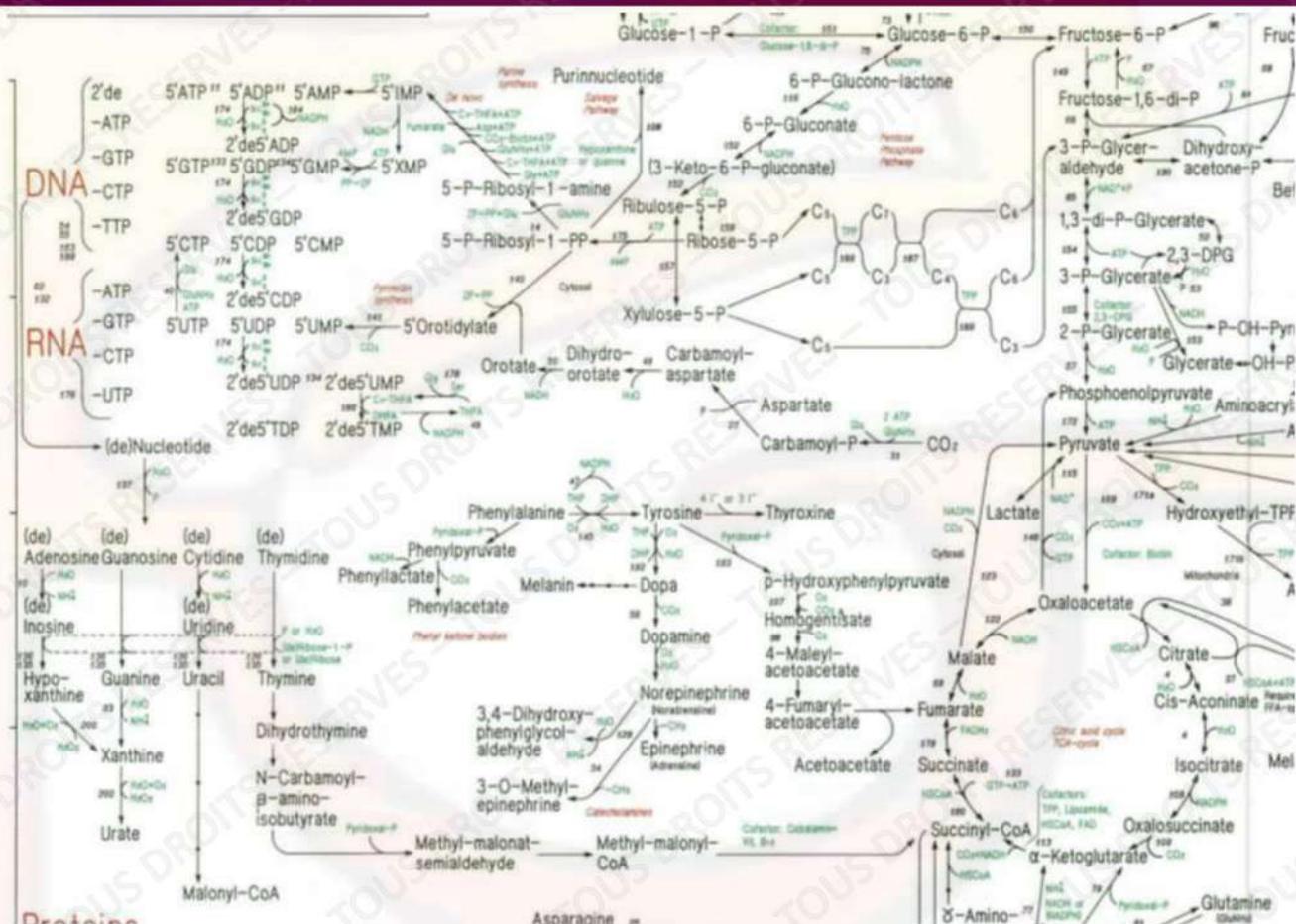
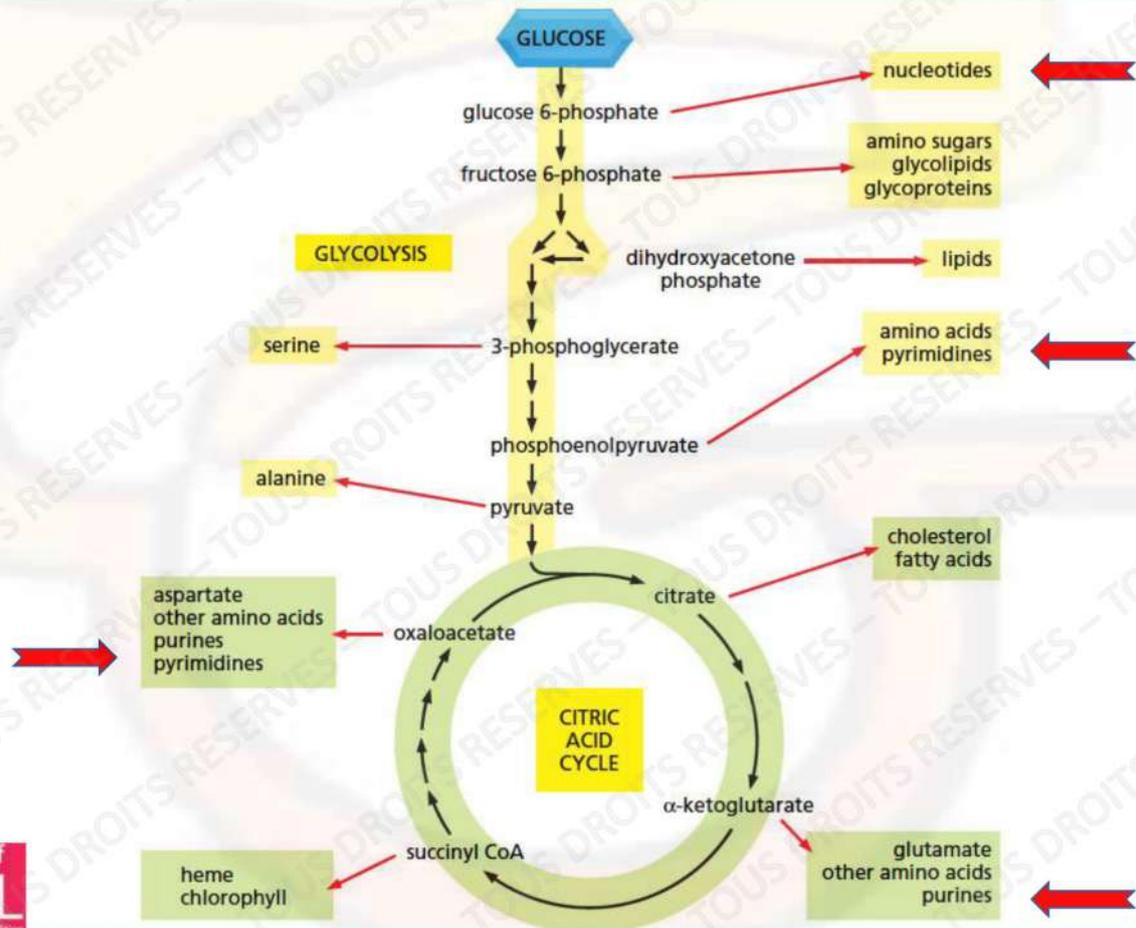
PRPP
+
Acides aminés
+
ATP+HCO₃
+ co-enzymes foliques

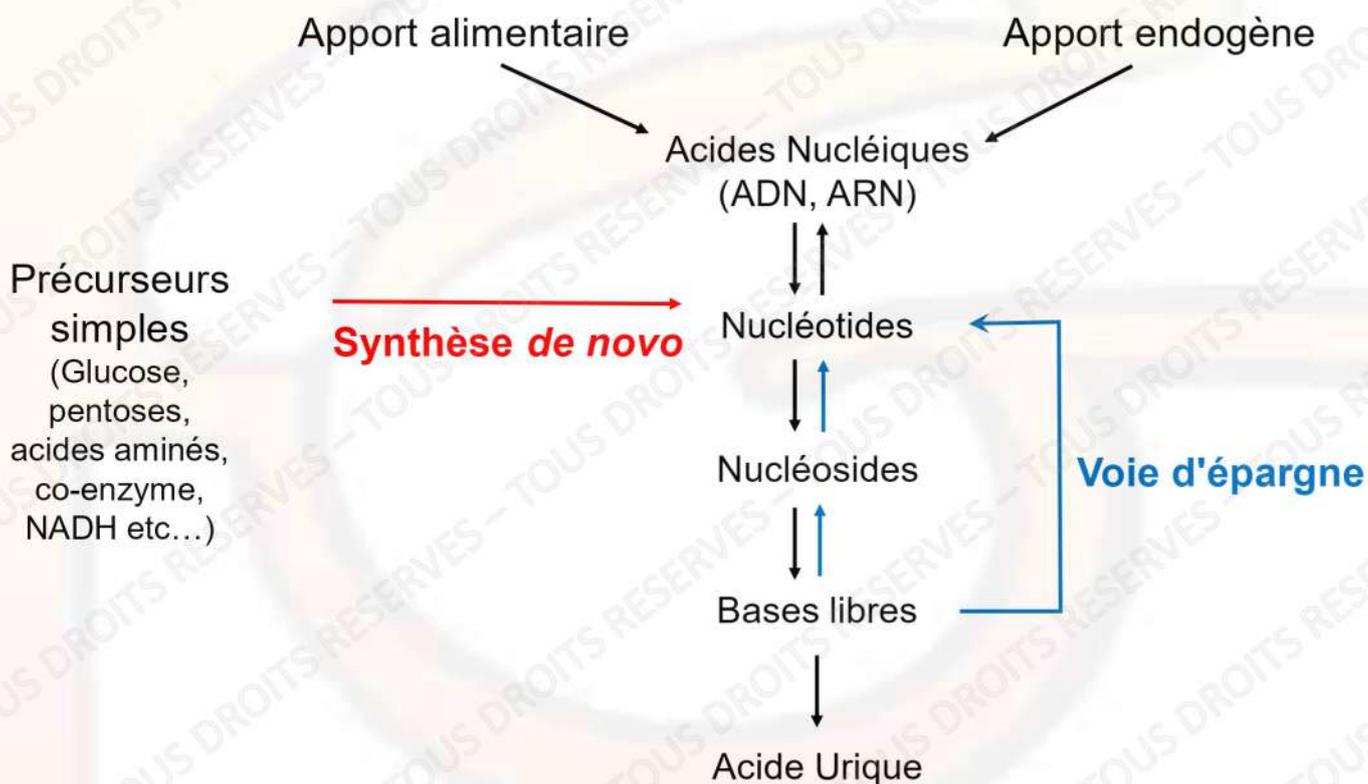
PRPP
+
Bases azotées

Nucléotides

Acides Nucléiques





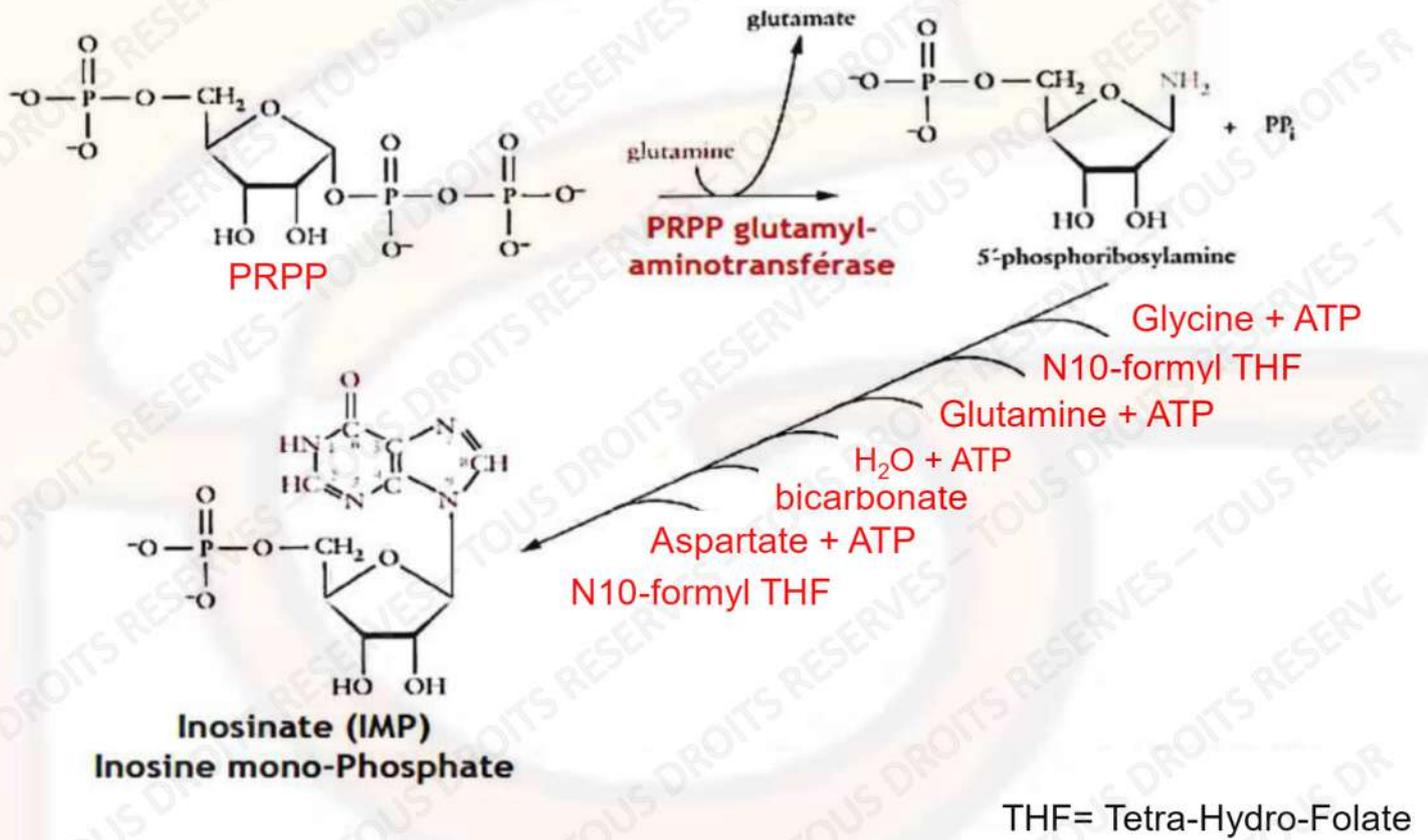


Biosynthèse des nucléotides – néosynthèse des purines

En résumé:

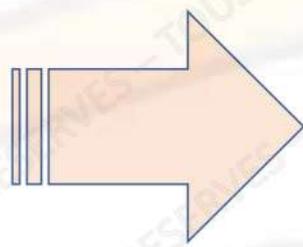
- **Construction** d'un double cycle azoté **sur le PRPP**
- Utilisation d'acides aminés, d'ATP et de co-enzymes foliques
- Doit aboutir à l'obtention de la première purine connue:

IMP (Inosinate Mono Phosphate)



Bilan énergétique de la synthèse d'1 IMP

1 Ribose-5-P
 + 2 Gln
 + 1 Gly
 + 1 Asp
 + 2 N10 formyl THF
+ 5 ATP
 (1 ATP pour synthèse du PRPP
 4 ATP pour synthèse de l'IMP)

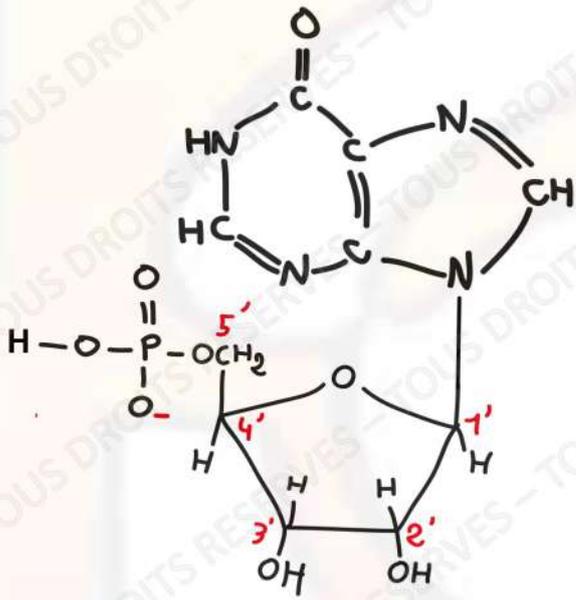


1 IMP
 + 2 Glu
 + 1 Fumarate
 + 2 THF
+ 5 ADP

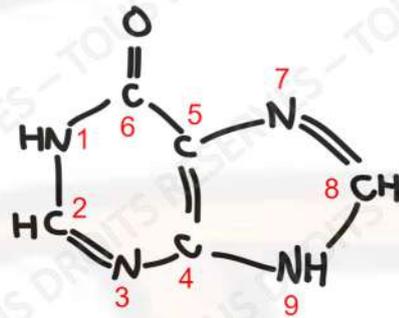
+ 2 ATP pour régénérer Gln à partir de Glu
 + 2 ATP pour reformer N10 formyl THF

Bilan : 9 molécules d'ATP pour synthétiser 1 molécule d'IMP

Hypoxanthine est la base de l'**Inosinate**:



Inosinate

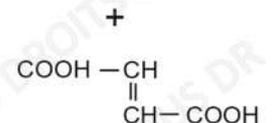
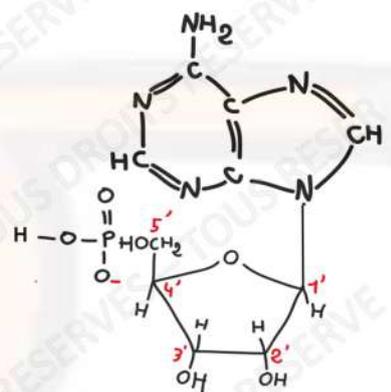
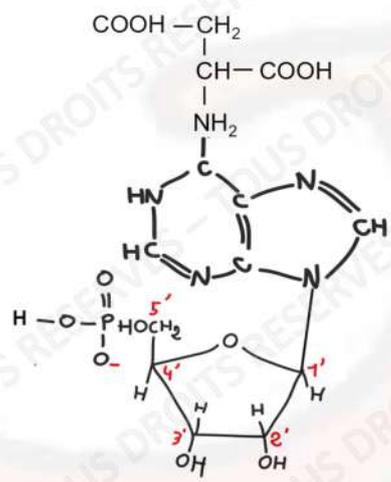
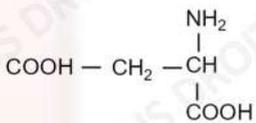
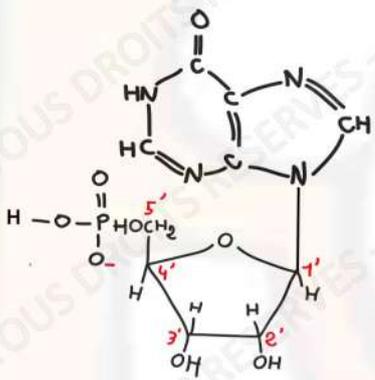
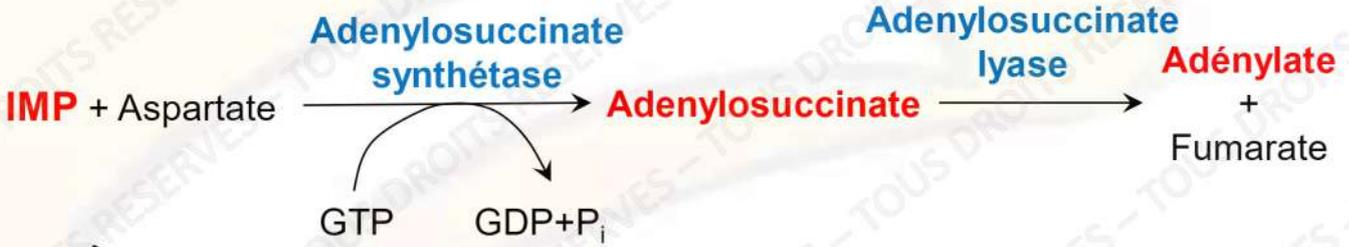


Hypoxanthine

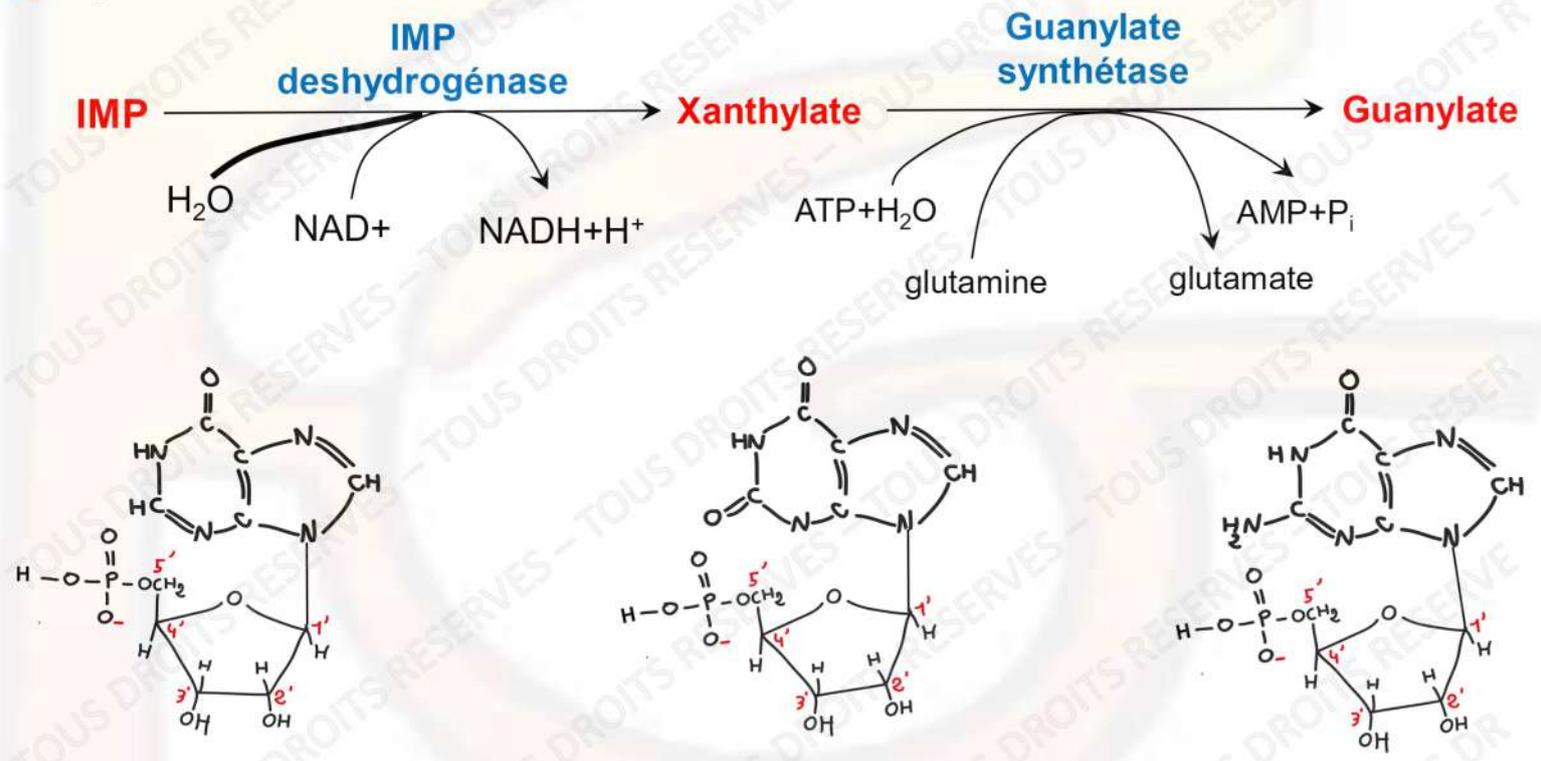


Purines: Liaison N-glycosidique 1'-9

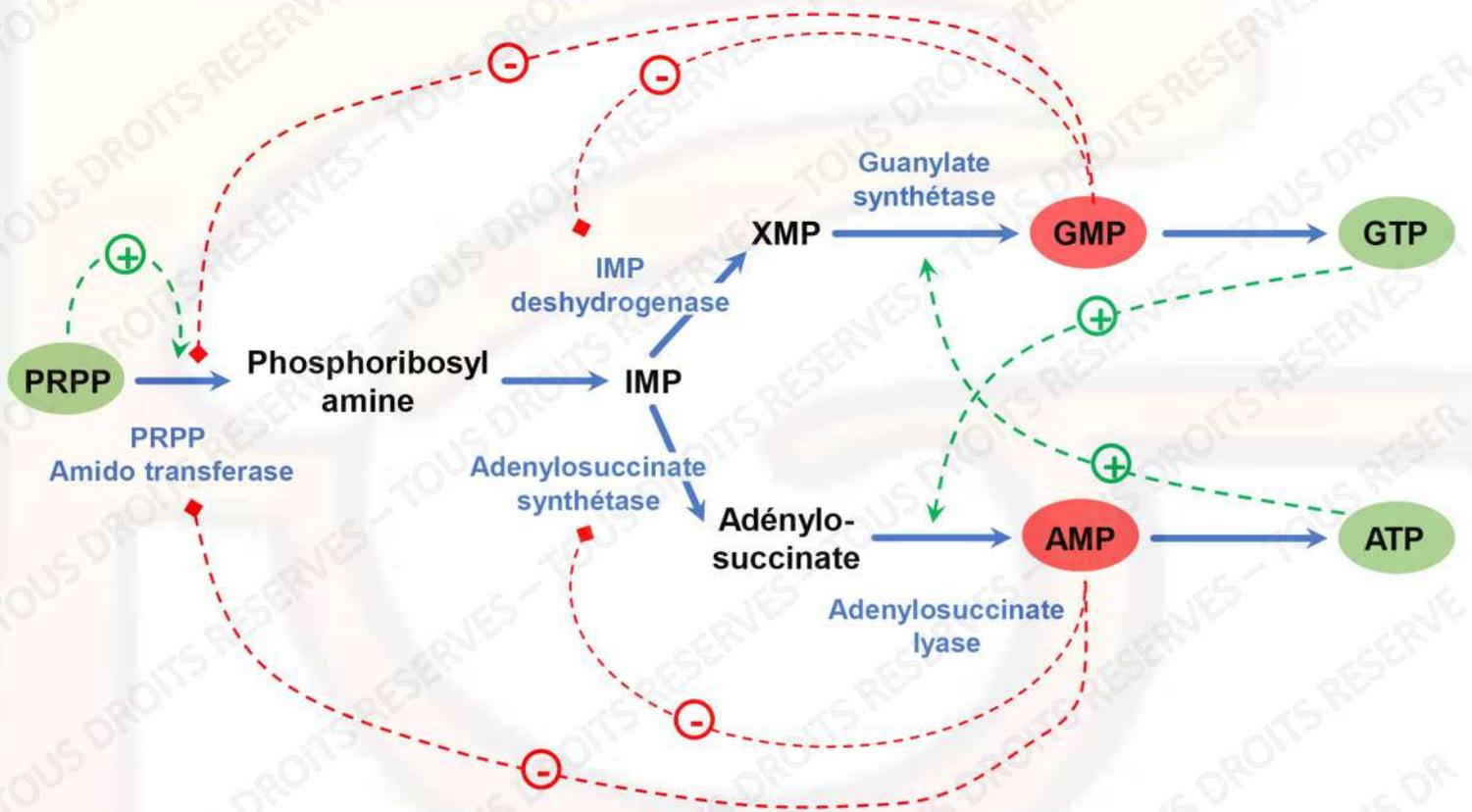
A+ Synthèse de l'AMP



(A+) Synthèse du GMP



Néosynthèse des purines - régulation



Réactions **de recyclage des bases puriques** très importante (++++)

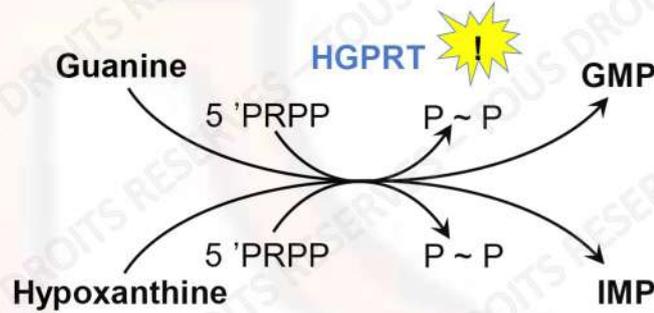
I.



* APRT (Adénine-P ribosyl Tfase)

recupération des **nucléosides puriques** est négligeable

II.

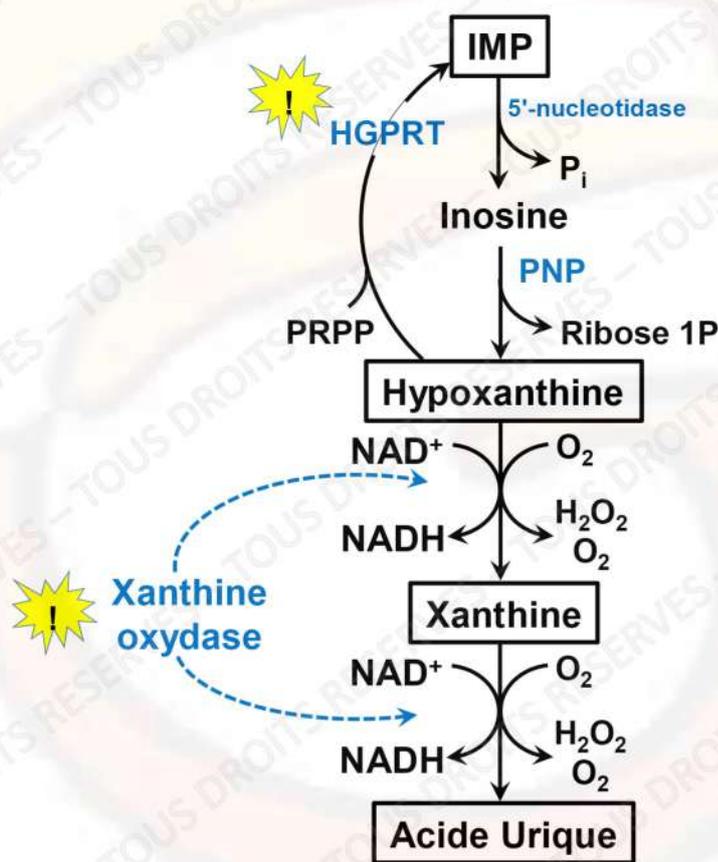


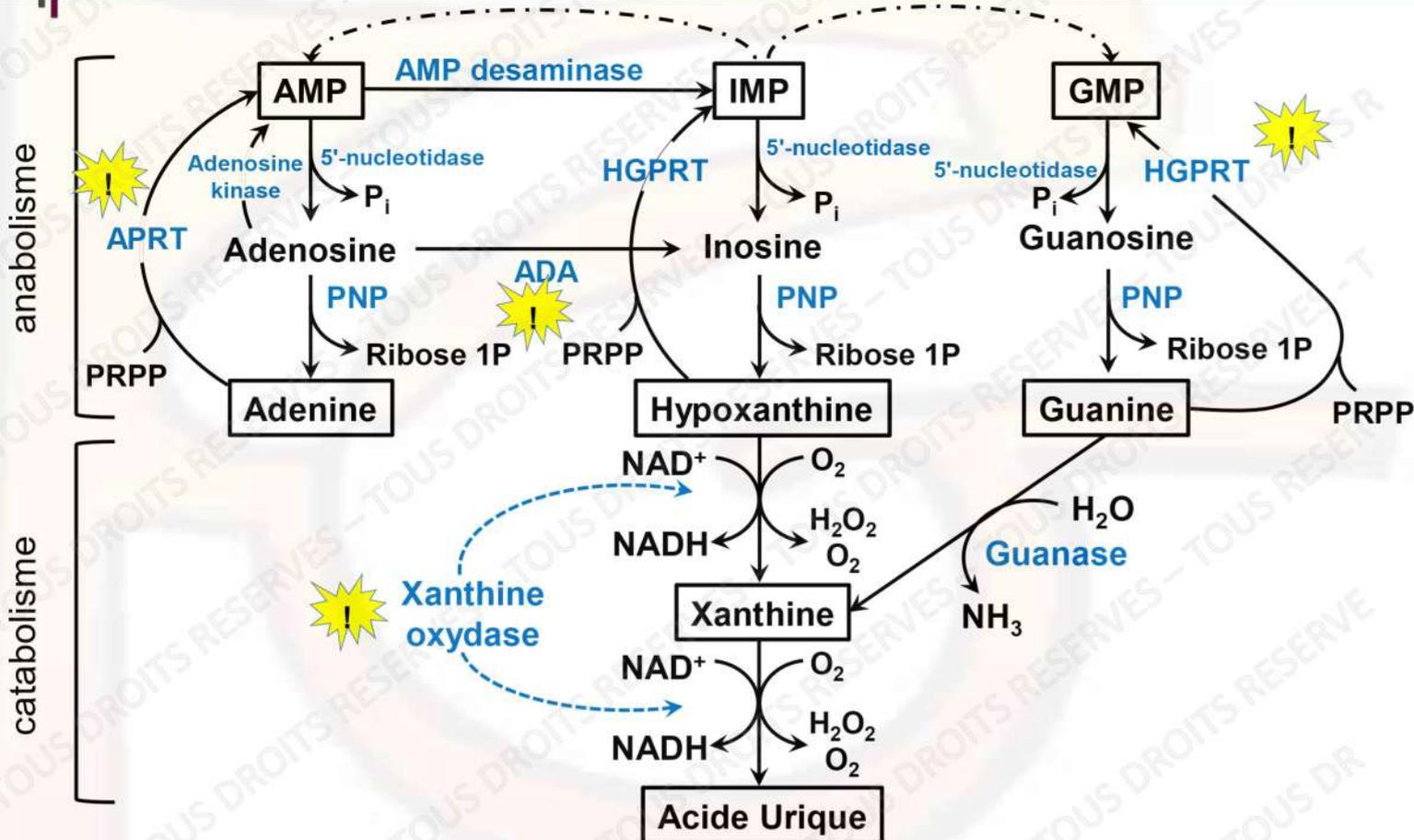
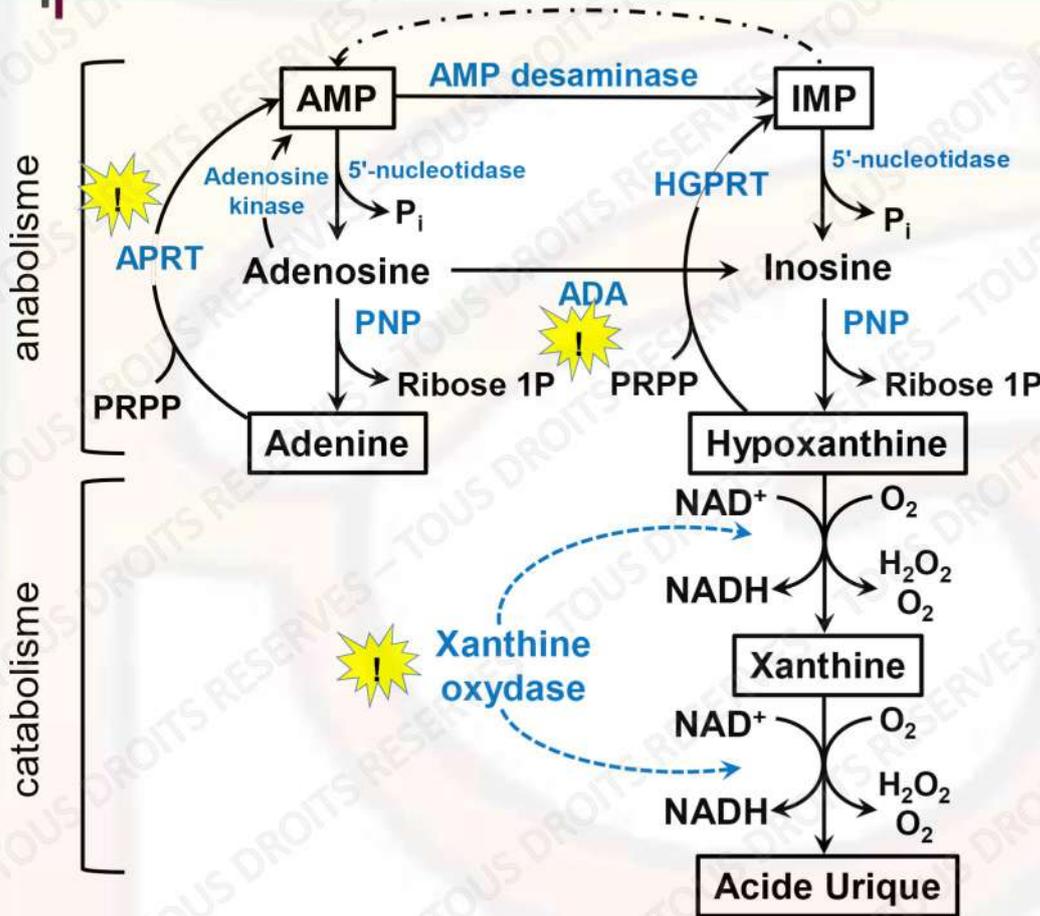
* HGPRT (Hypoxanthine -Guanine- Phosphoribosyl Tfase)

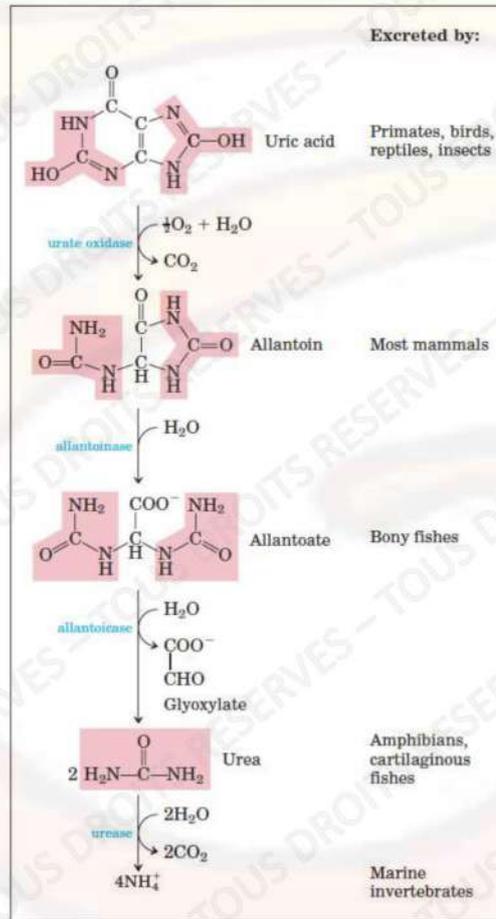
Métabolisme des purines

anabolisme

catabolisme







Le métabolisme des purines

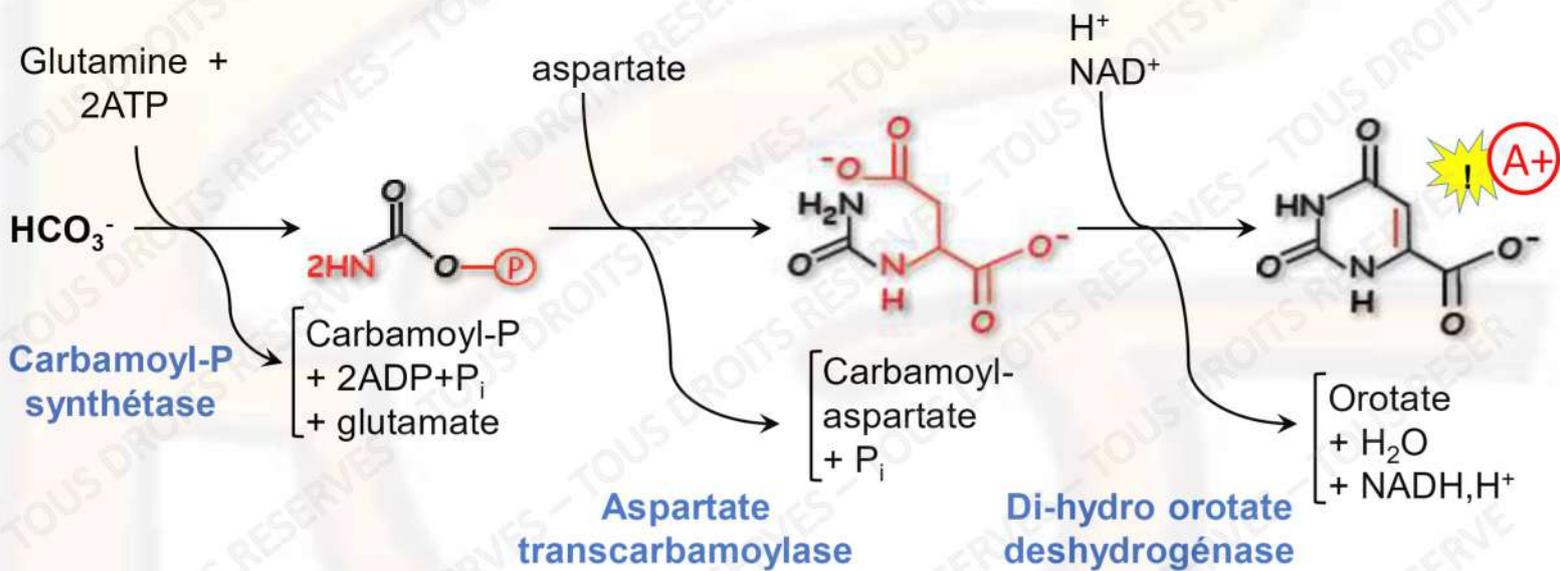
Les purines sont des composants chimiques "essentiels" de la cellule

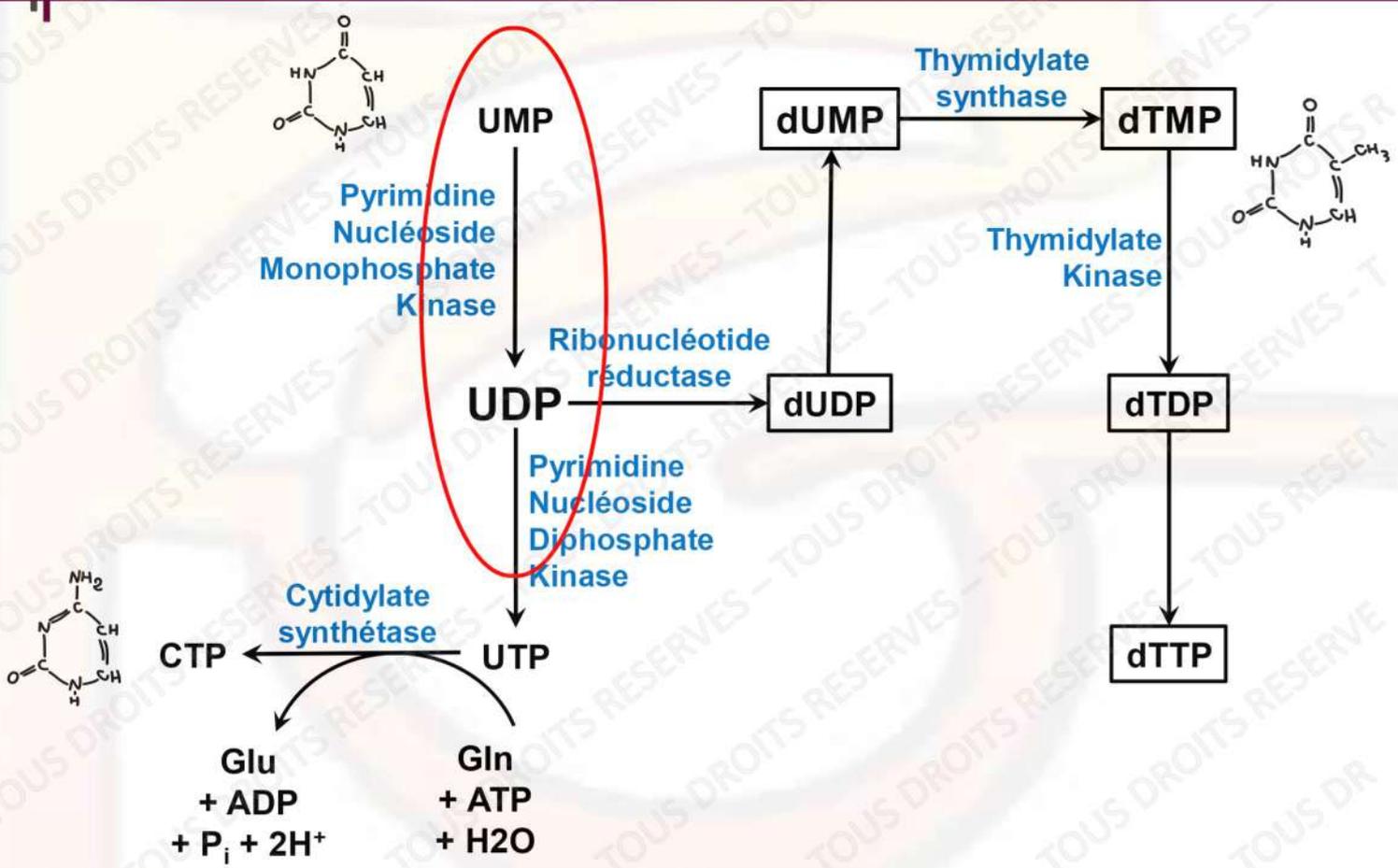
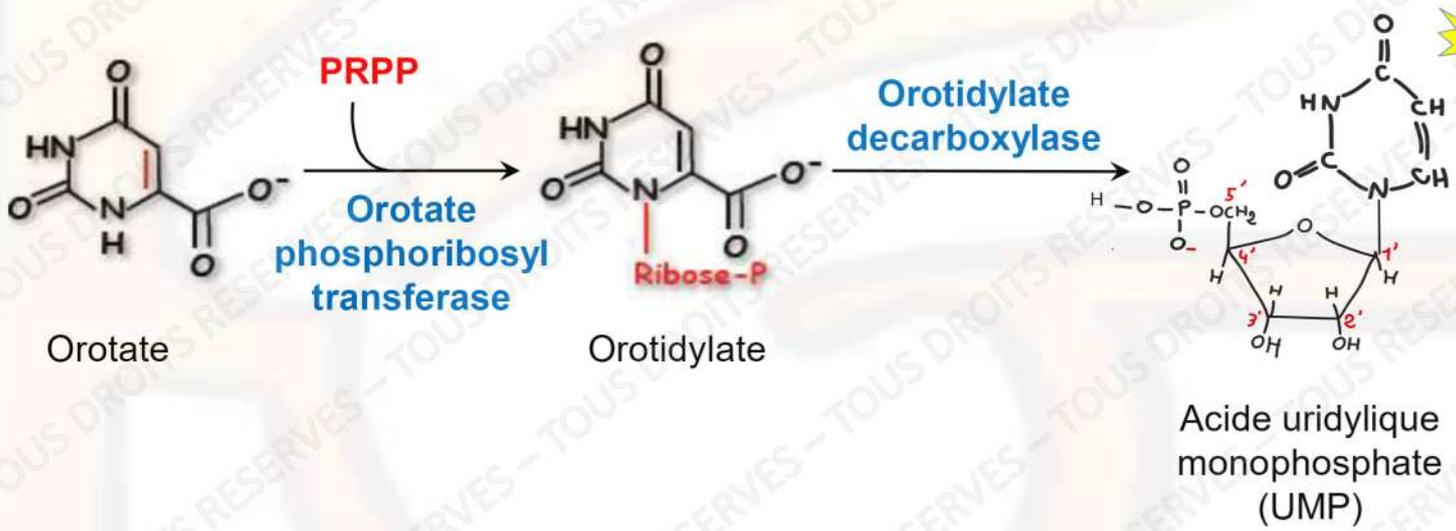
- éléments primaire constituant les Acides Nucléiques
- Réserve d'énergie: ATP et GTP
- constituant de co-enzymes
- médiateurs métaboliques: AMPc et GMPc
- Effecteurs allostériques
- des défauts dans les voies métaboliques sont responsables de nombreuses anomalies métaboliques congénitales
- La connaissance de leur structure a permis d'élaborer de nombreux agents thérapeutiques

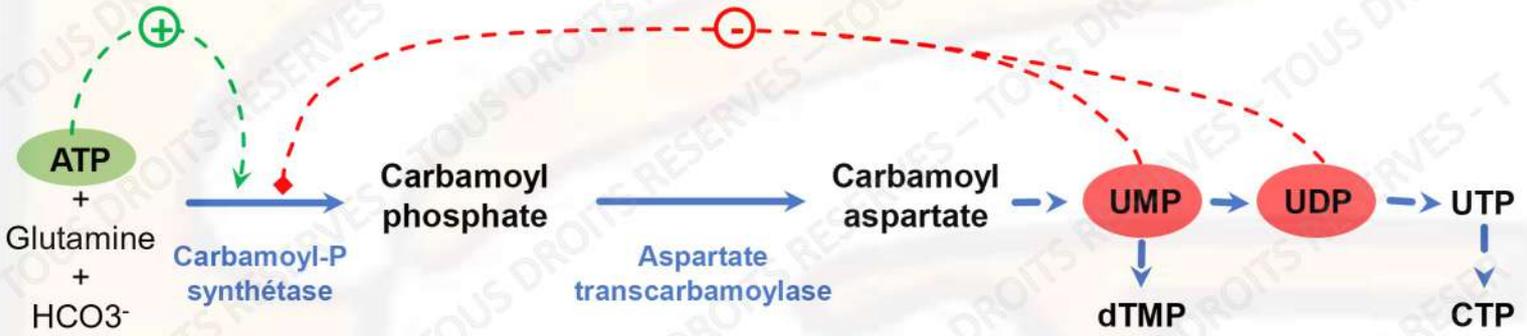
En résumé:

- **Construction** du cycle **pyrimidique** sous forme d'**Orotate**
- **Ajout** de ce cycle **sur un PRPP**
- Utilisation d'acides aminés, d'ATP et de co-enzymes foliques
- Doit aboutir à l'obtention de la première pyrimidine connue:

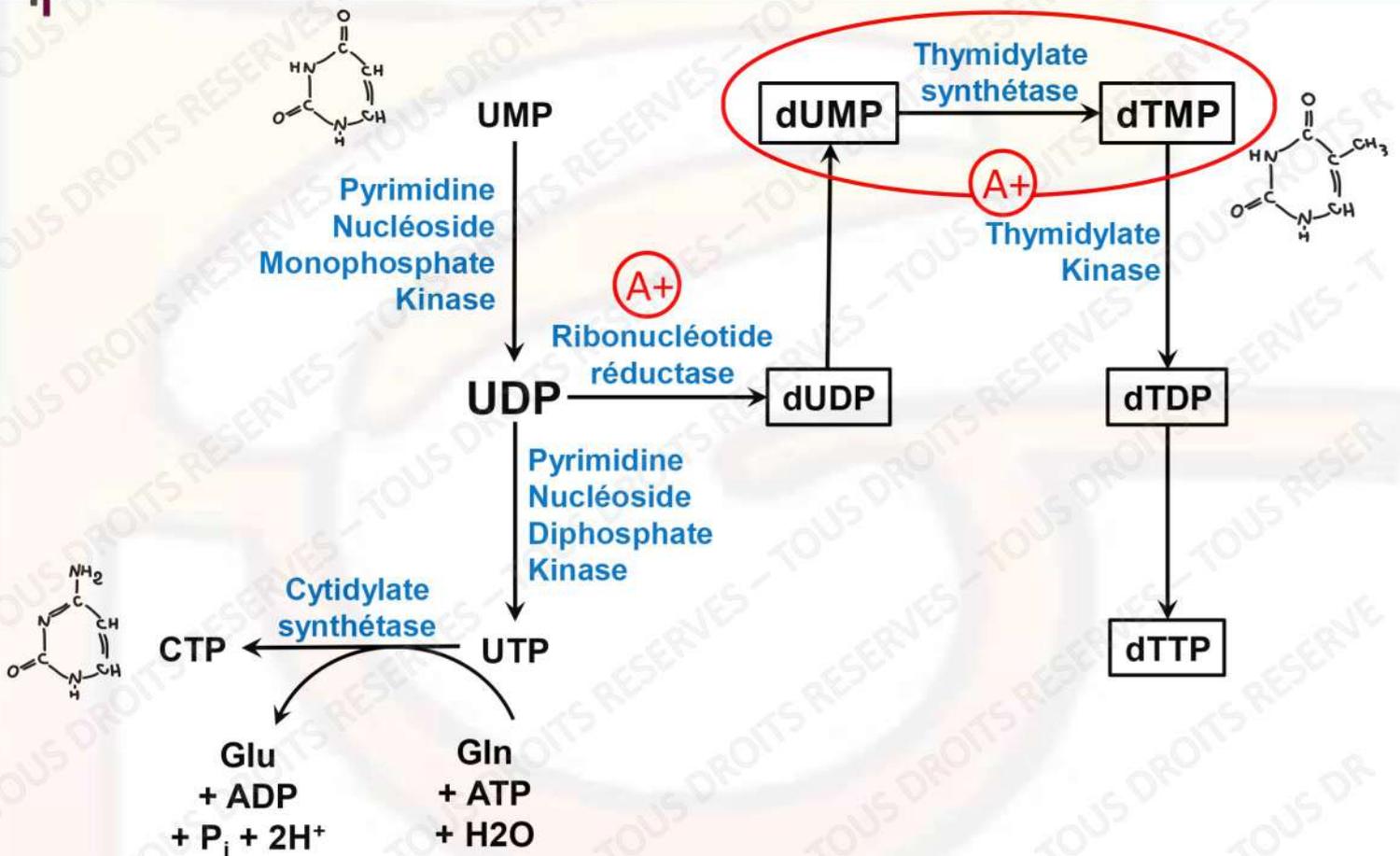
UMP (Uridine Mono Phosphate)



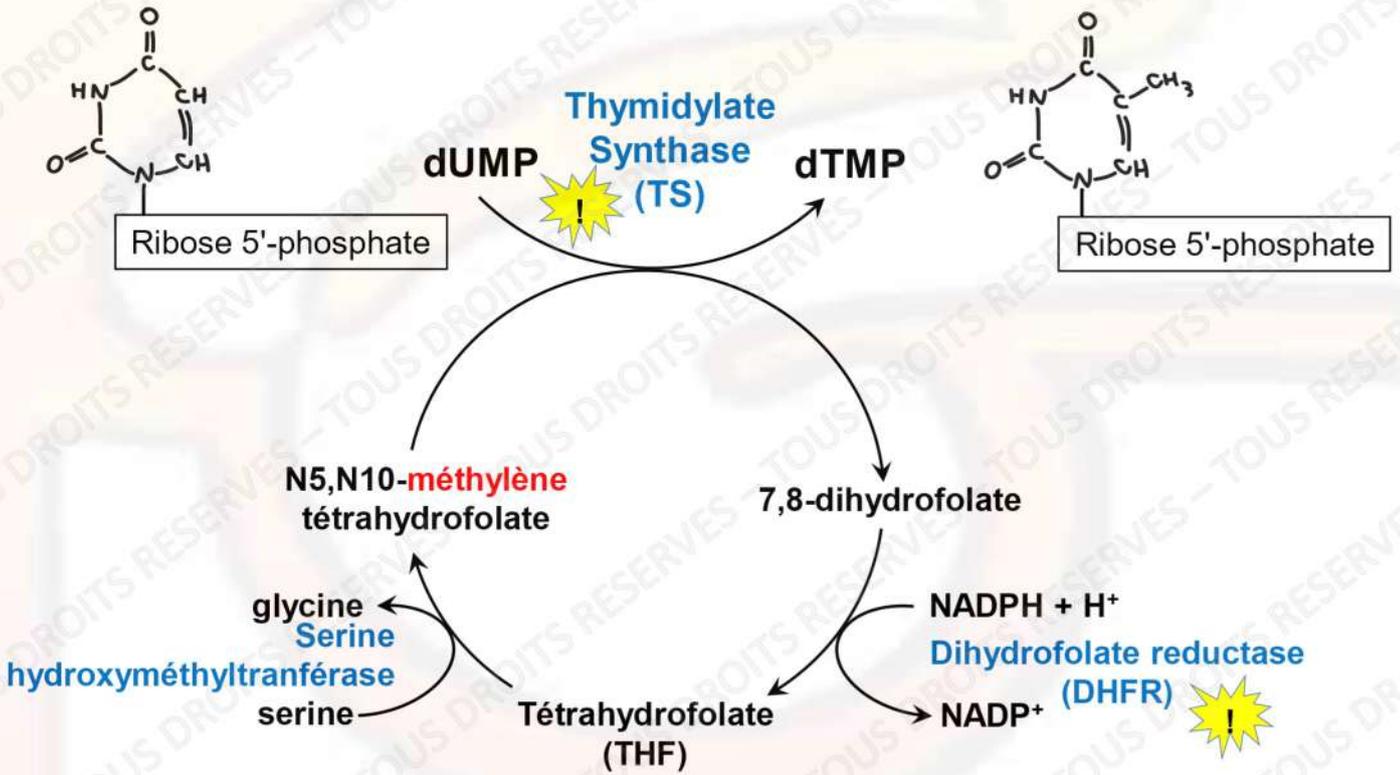




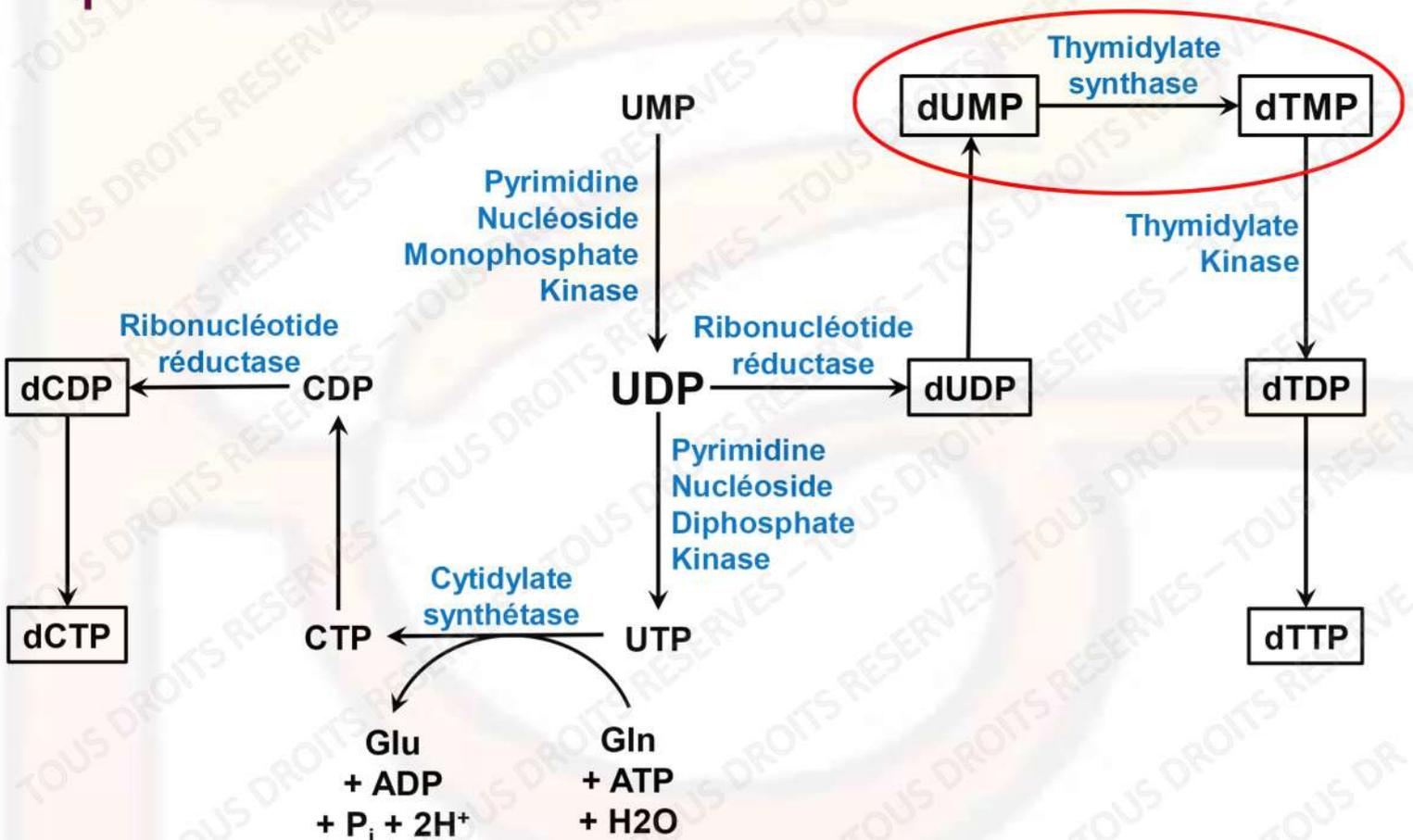
Biosynthèse des nucléotides – néosynthèse des pyrimidines



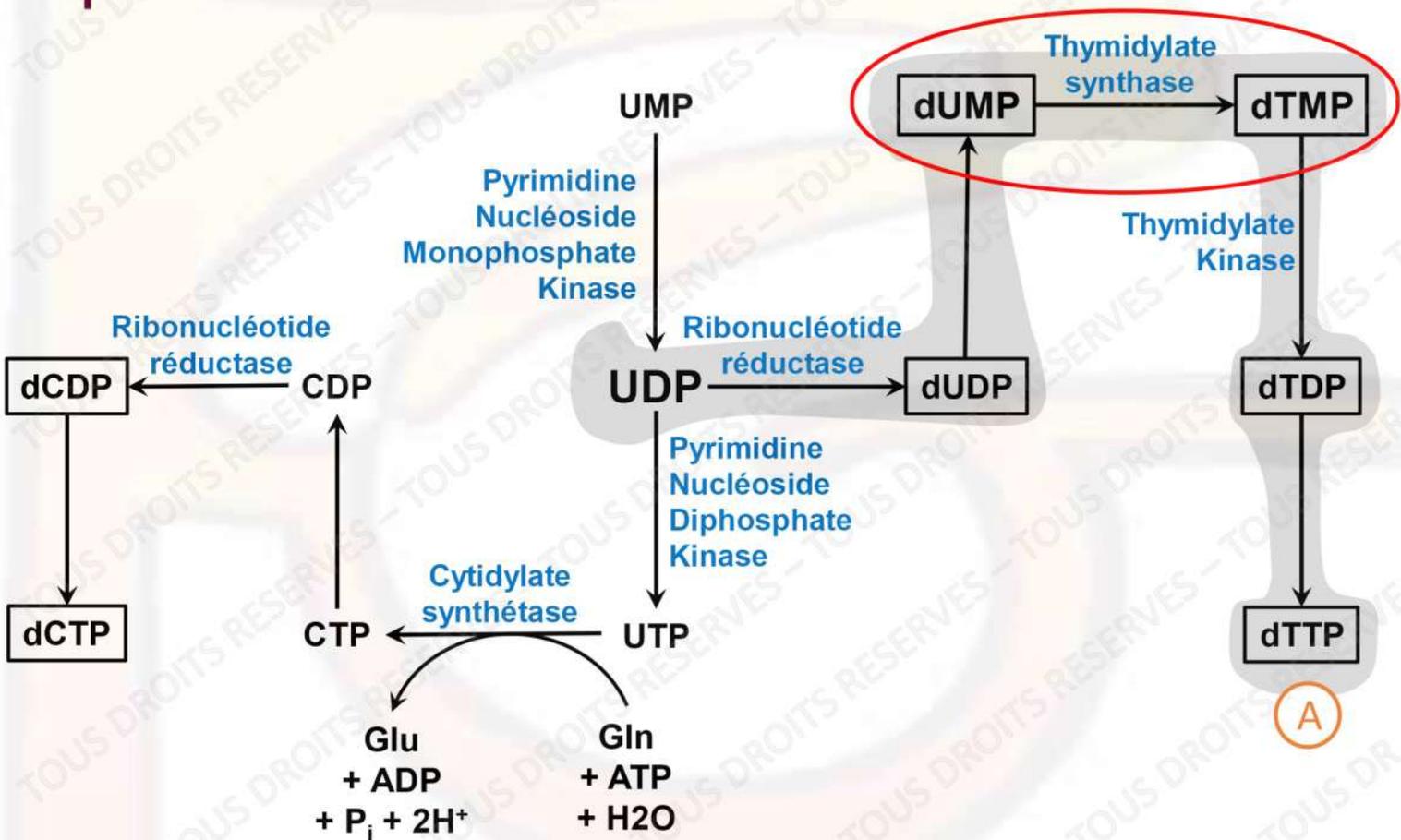
Biosynthèse du dTMP



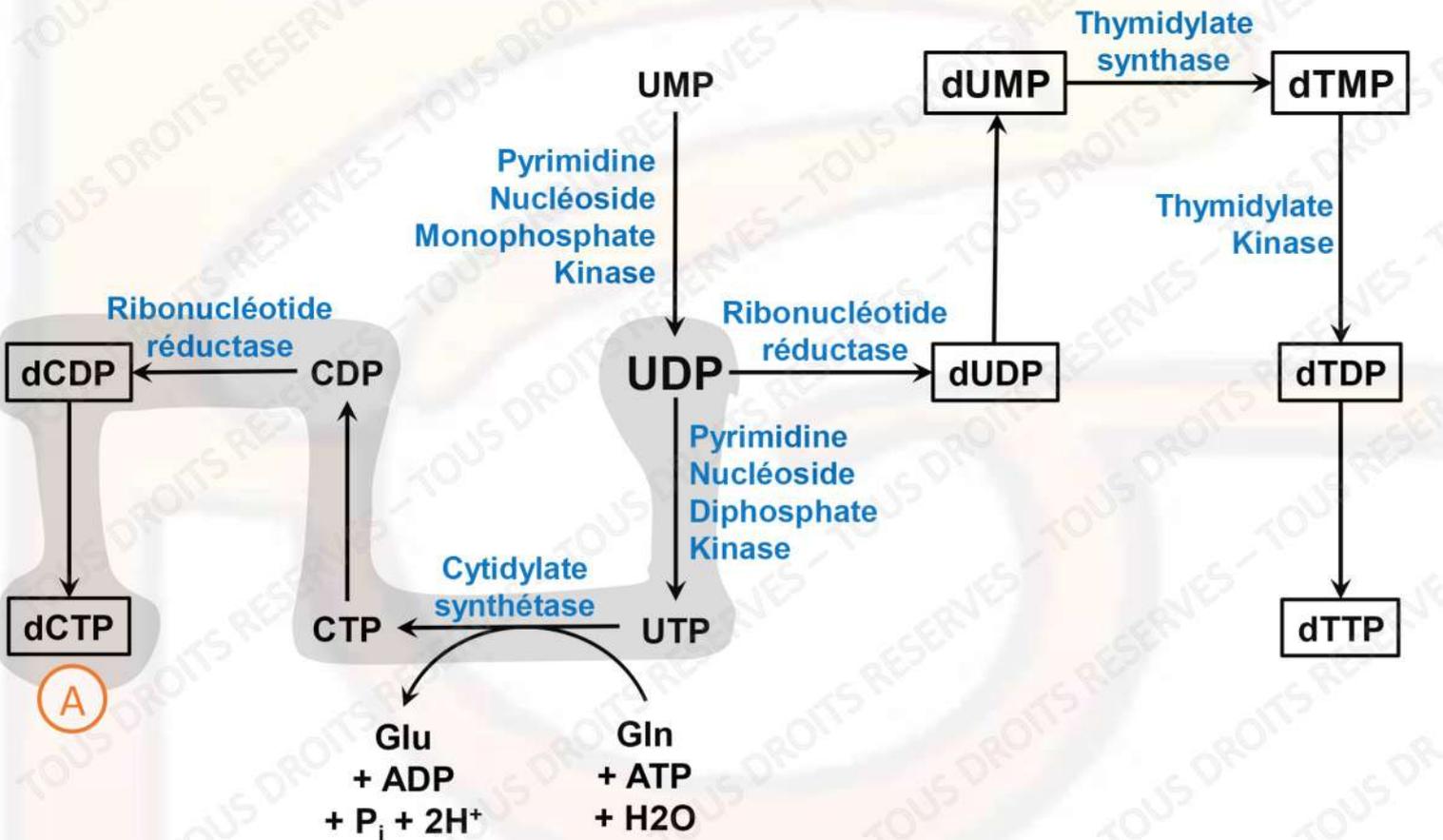
Néosynthèse des pyrimidines – vue d'ensemble



Néosynthèse des pyrimidines – vue d'ensemble



Néosynthèse des pyrimidines – vue d'ensemble

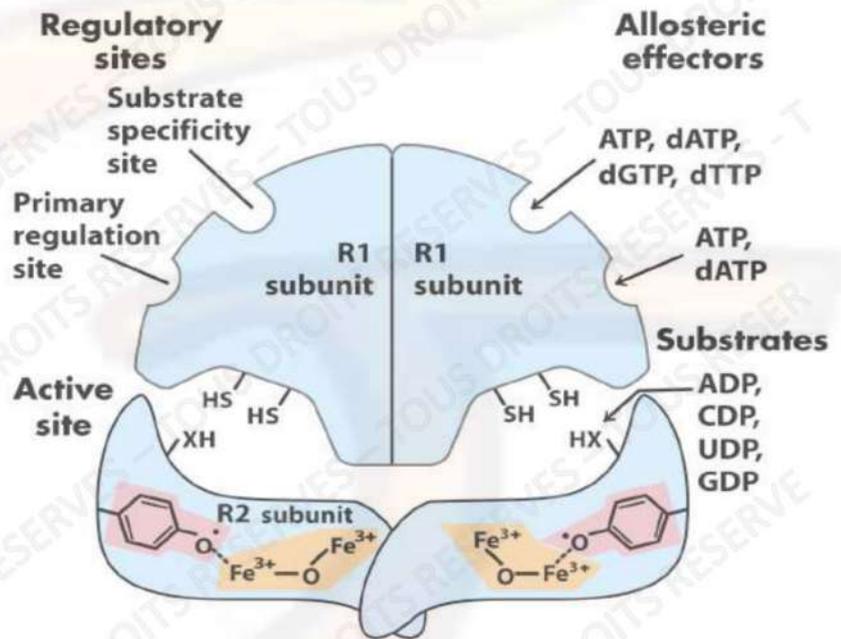


Biosynthèse des **désoxy**-ribonucléotides

La Ribonucléotide Réductase !

- hétéro-tétramère
- Substrats: ADP, CDP, UDP, GDP
- Catalyse radicalaire
- 1 site actif
- 2 sites de régulation allostérique
- Activité conduit à un équilibre des quantités de dNTP disponibles
- **Inhibiteur:** hydroxyurée ou hydroxycarbamide

(A+)



Sauvegarde – pyrimidines et bases pyrimidiques

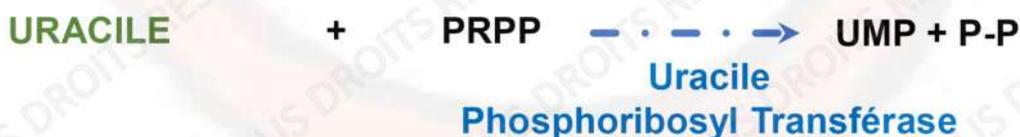
(A+)

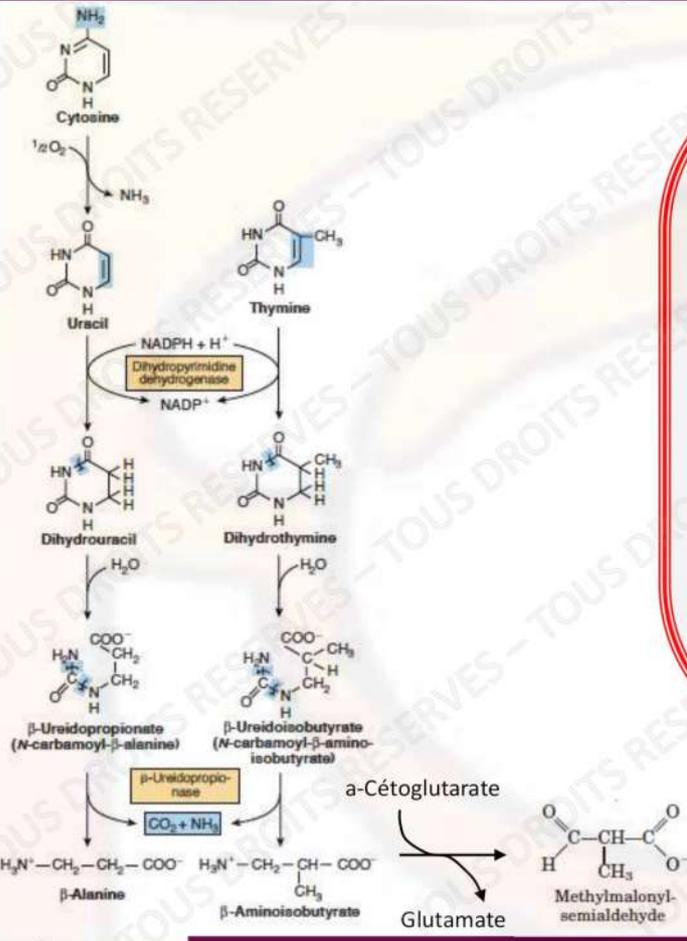
1- La récupération des nucléosides pyrimidiques est la seule part importante des voies d'épargne. Elle fait intervenir l'Uridine-cytidine kinase et la thymidine kinase.



CYTIDINE

2- Les bases pyrimidiques ne sont pas recyclées excepté l'Uracile.





- Catabolisme des pyrimidines produit CO_2 et NH_4
- Catabolisme des pyrimidines spécifique de l'ADN produit β -Aminoisobutyrate qui sera transformé en méthylmalonate (intégrera le métabolisme des acides gras)
- Catabolisme des pyrimidines communes à ADN et ARN produit de la β -Alanine (sera en partie éliminée dans les urines et dégradée en succinyl-CoA, cycle de l'Acide citrique)



Les anti-métabolites



G.H Hitchings G.B. Elion J.W. Black

Hitchings et Elion font une **recherche systématique et orientée** d'inhibiteurs des voies métaboliques des nucléotides à partir de molécules dont la structure mime celle des nucléotides.

les **anti-métabolites** qu'ils synthétisent sont des analogues structuraux des nucléotides.



Physiology, medicine 1988

➤ Analogues de bases ou de nucléosides

• Anti-pyrimidines :

- (A+) ○ 5-FU
- Capecitabine
- Cytarabine
- Gemcytabine

• Anti-Purines

- Cladribine
- Pentostatine
- Fludarabine
- Azathioprine
- (A+) ○ Allopurinol
- 6-Mercaptopurine
- 6-Thioguanine

➤ Anti-folates

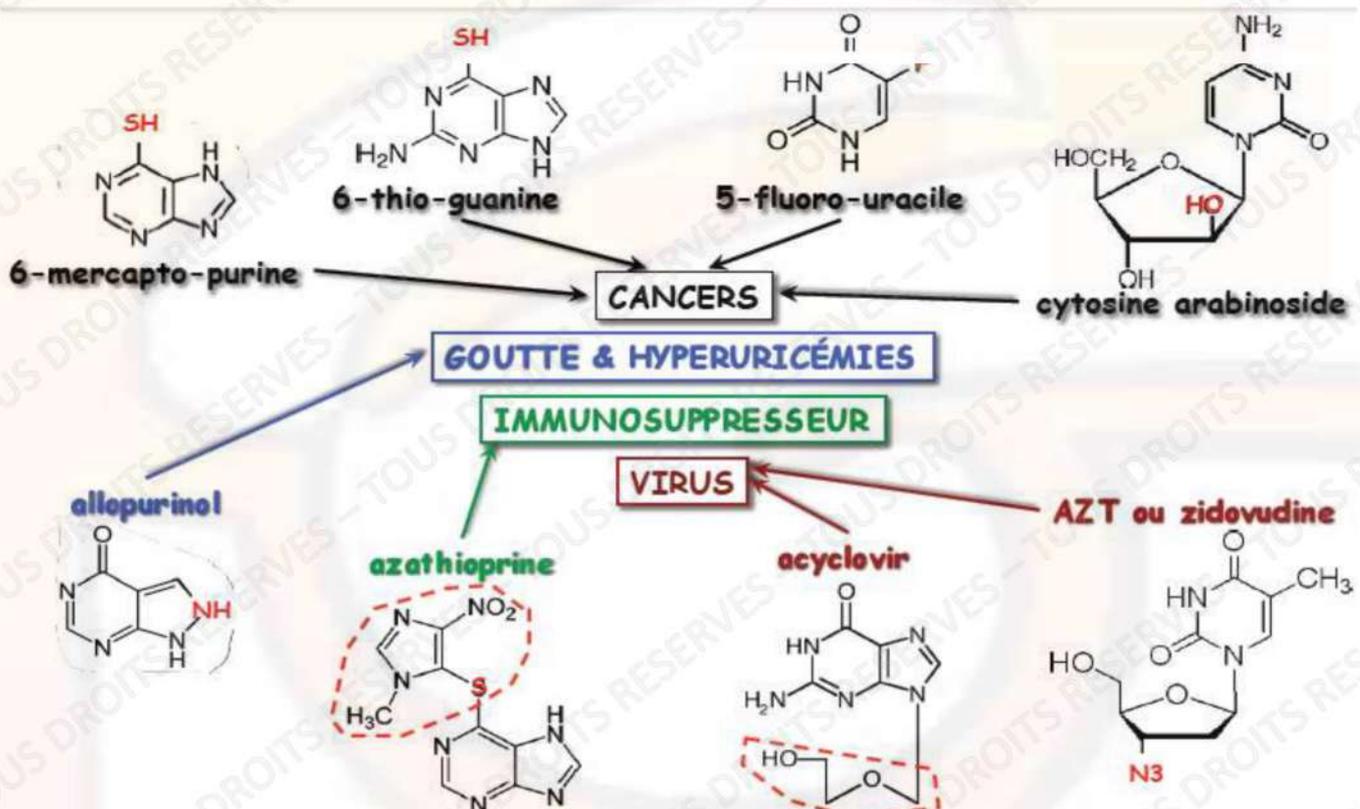
- (A+) • Methotrexate
- Aminoptérine
- Pemetrexed

➤ Autres

- (A+) • Hydroxyurée

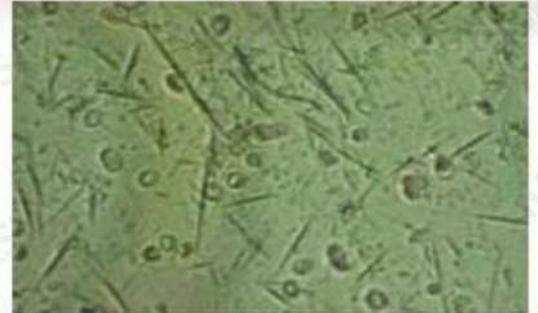
Les anti-métabolites

(B)

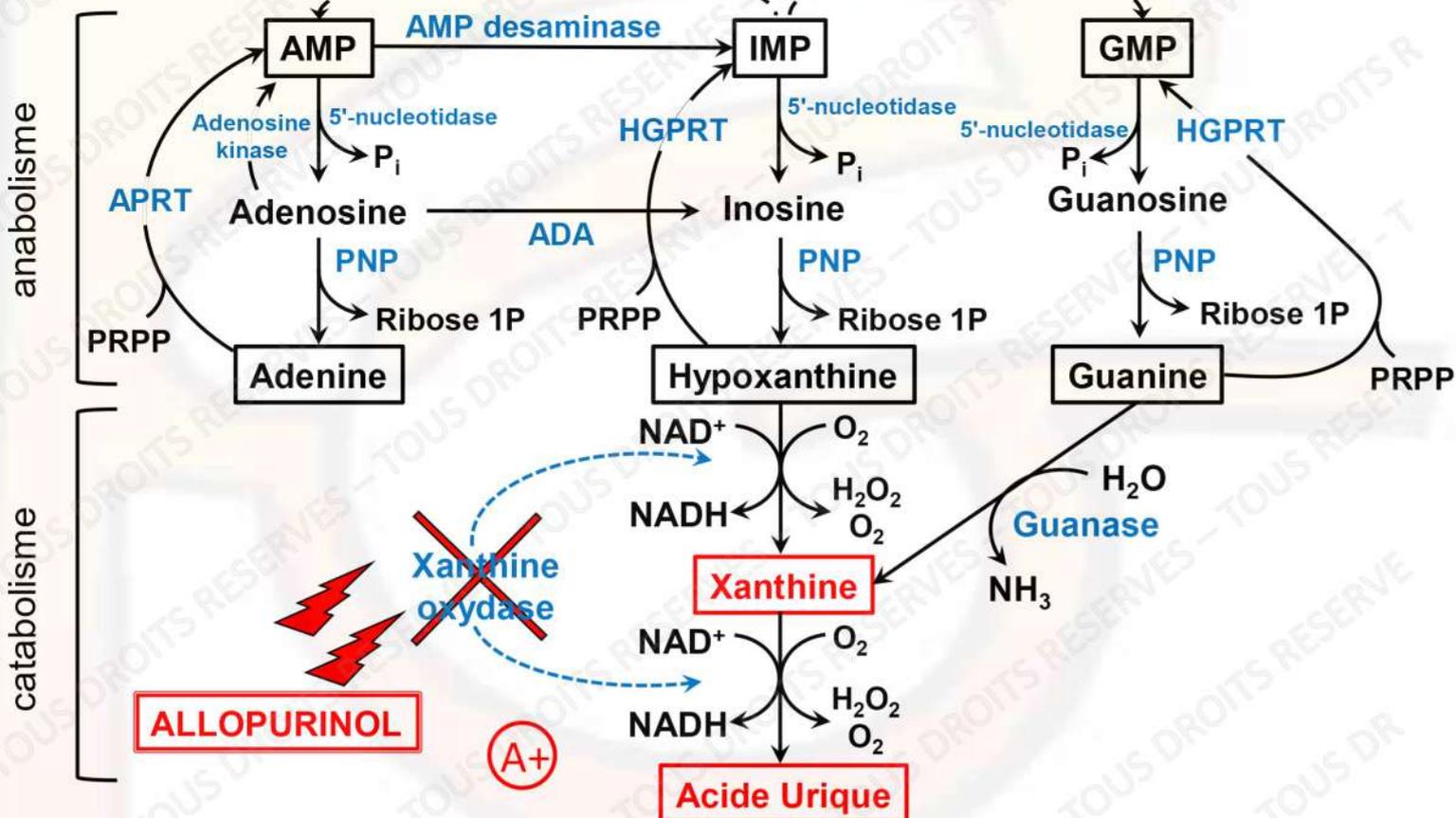


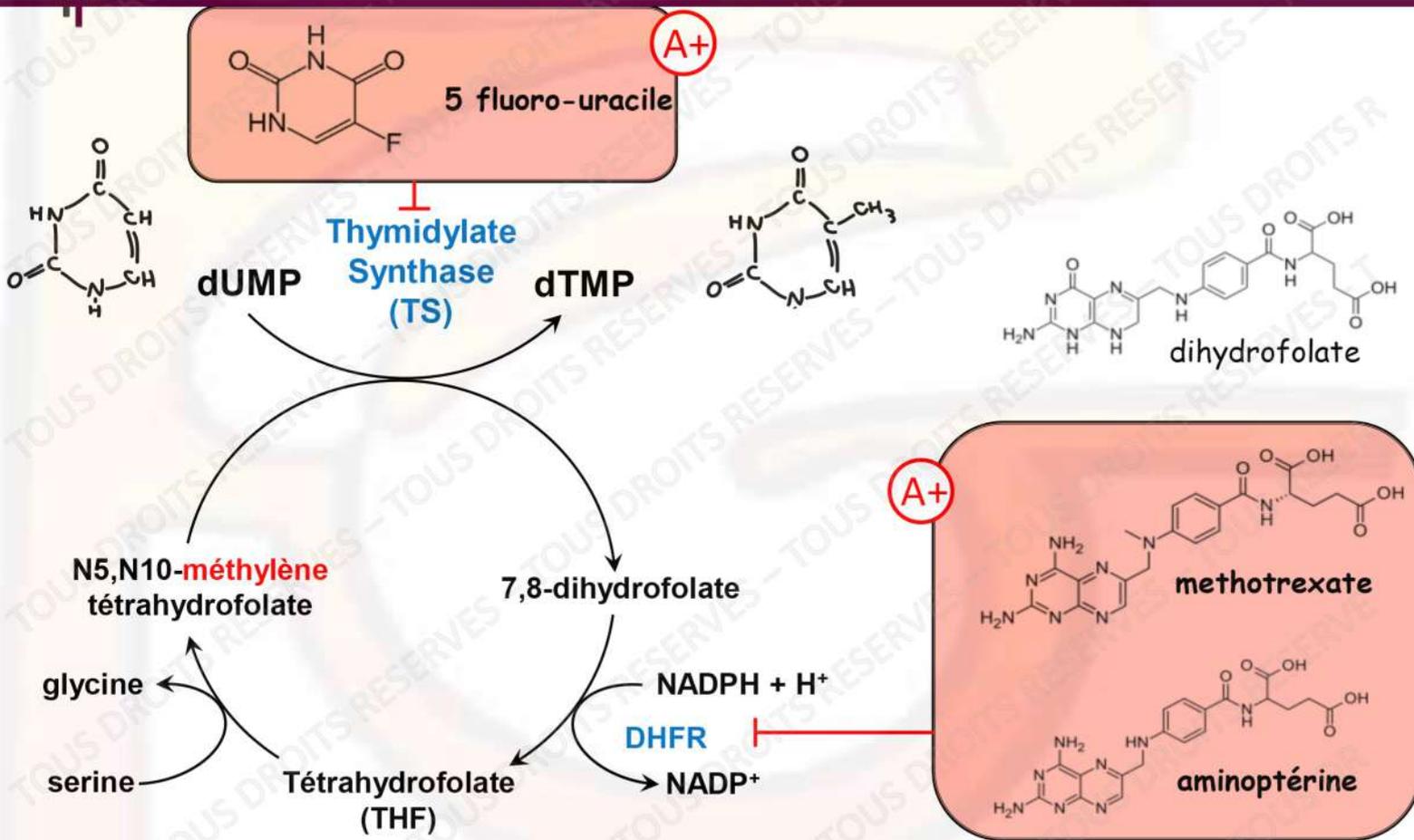
Emballlement du métabolisme des purines conduisant à une hyper-uricémie primaire

- arthrite goutteuse
- tophus
- néphropatie uratique



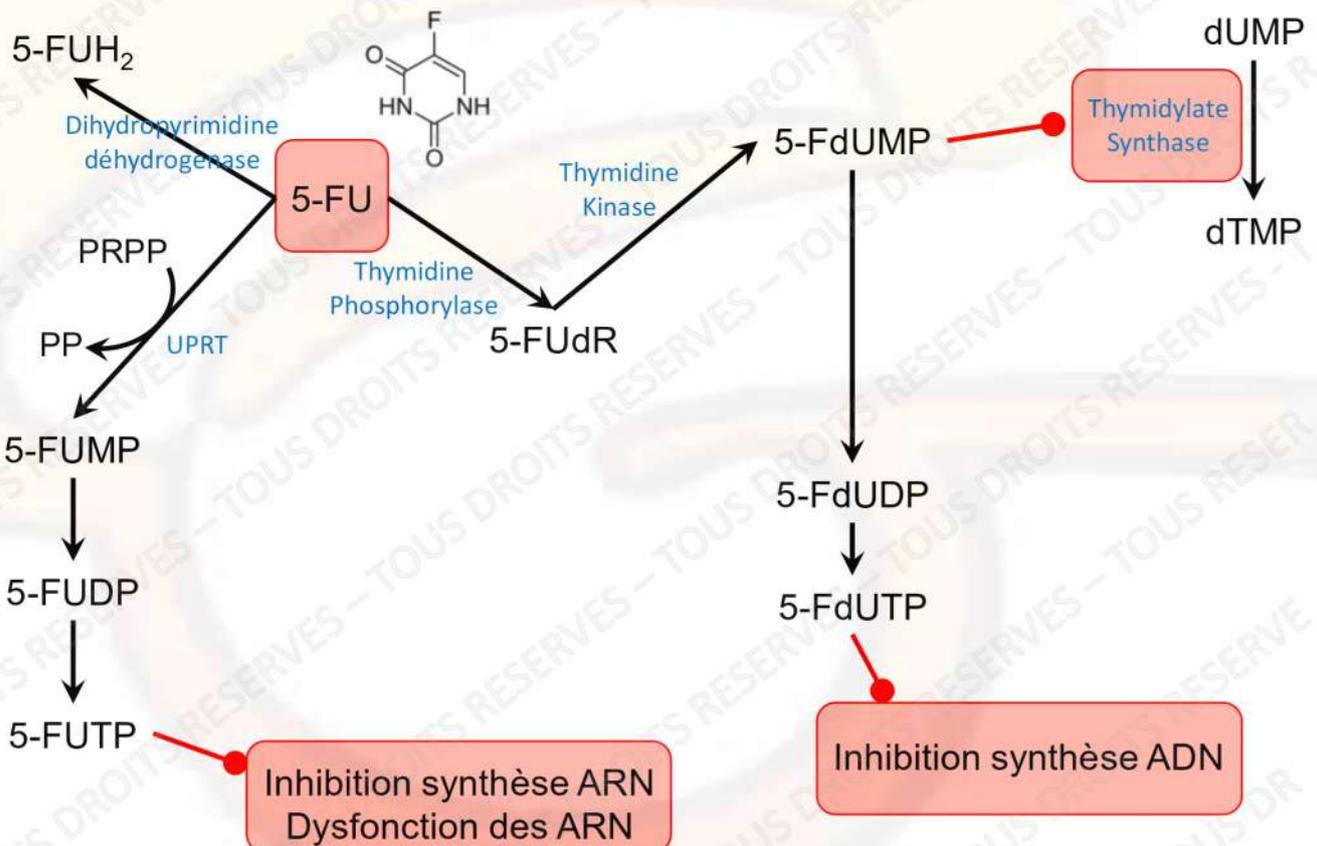
Une application: La Goutte





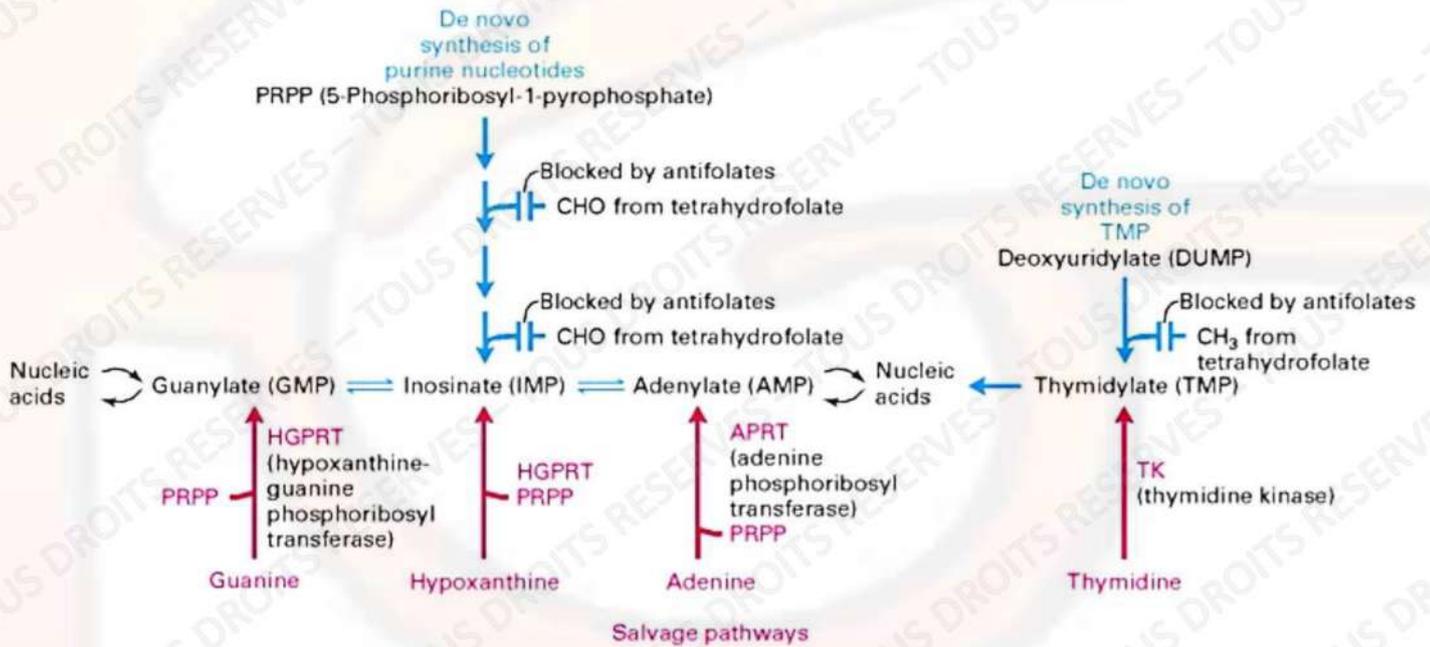
Métabolisme du 5-FU

(B)

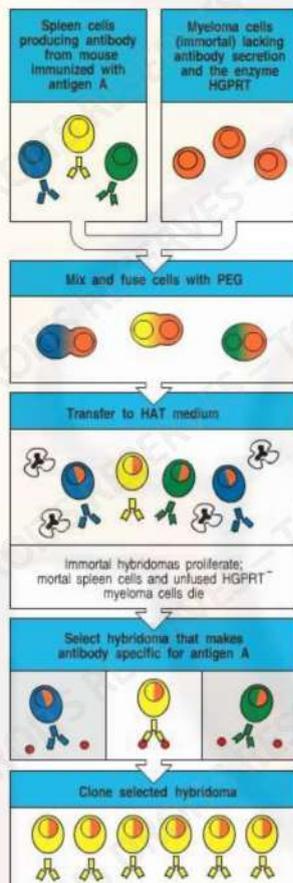


Les 2 Origines biosynthétiques des précurseurs des acides nucléiques

- Néosynthèse
- Sauvegarde (ou récupération)



Métabolisme des nucléotides - application



Technique développée par **G. Köhler et C. Milstein**

Réponse polyclonale contre un antigène A.
 Nécessité de cloner les cellules B.

H: Hypoxanthine
 A: Aminoptérine
 T: Thymidine

Prolifèrent les fusions qui sont immortelles (part myélome) et HGPRT⁺ (part lymphocyte B).

Nature Vol. 256 August 7 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

G. KÖHLER
 C. MILSTEIN

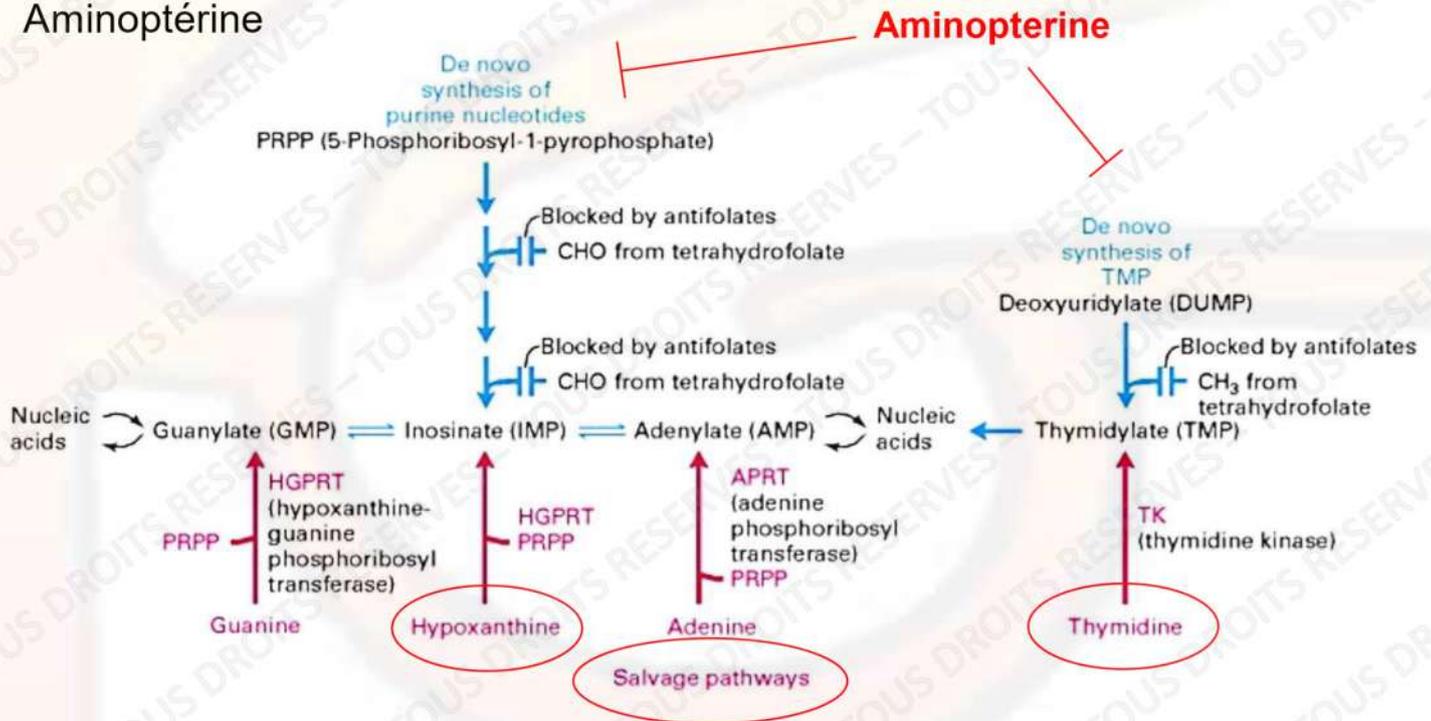
MRC Laboratory of Molecular Biology,
 Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK



Physiology, medicine 1984

Cette connaissance à conduit, par exemple, à la méthode de sélection des hybridomes en milieu HAT:

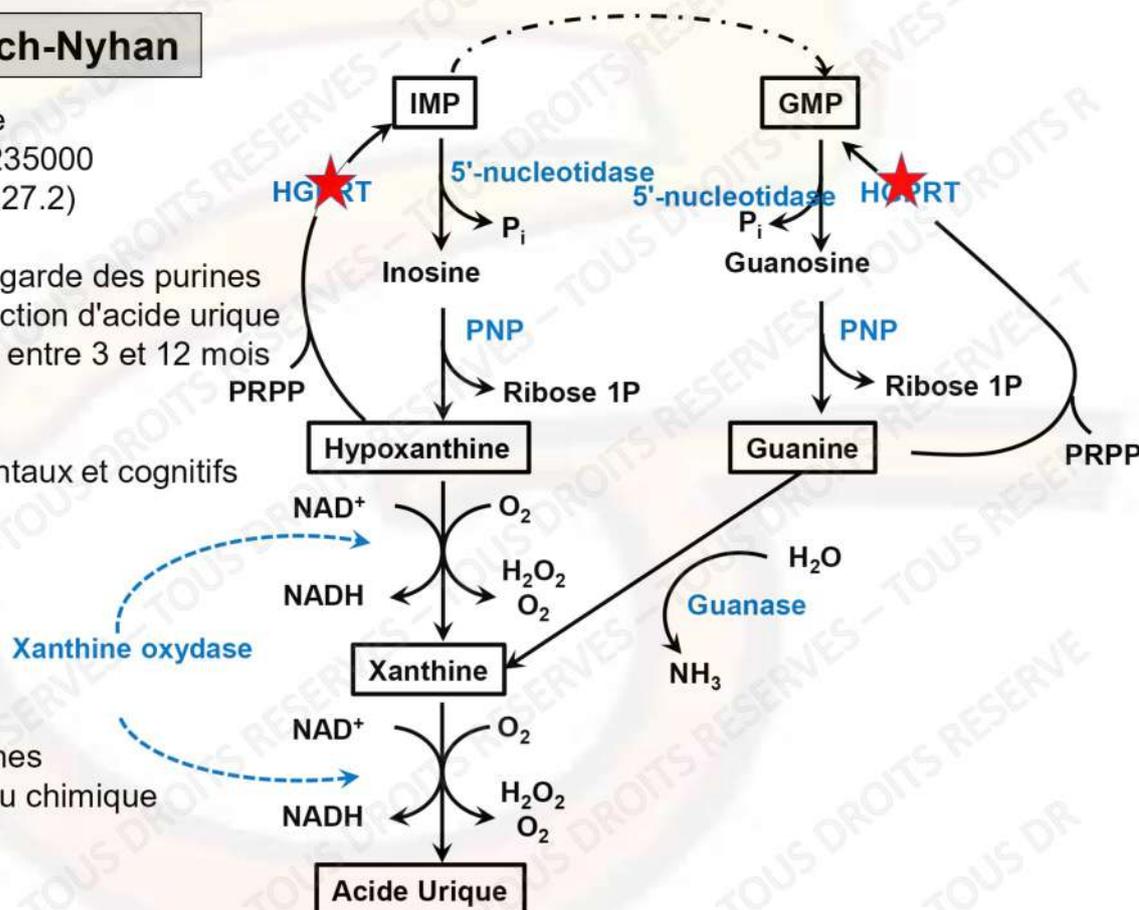
- Hypoxanthine
- Aminoptérine



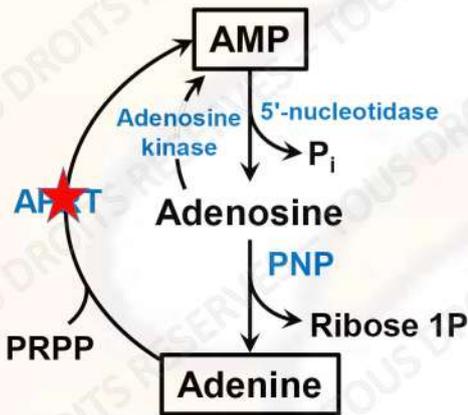
Désordres du Métabolisme des nucléotides

Syndrome de Lesch-Nyhan

- Maladie liée à l'X récessive
- Prévalence 1/380000 à 1/235000
- Défaut de HGPRT (Xq26-q27.2)
- Défaut de la voie de sauvegarde des purines
- Accroissement de la production d'acide urique
- Apparition des symptômes entre 3 et 12 mois
 - Cristaux de Xanthine
 - Hyperuricémie
 - Retards comportementaux et cognitifs
 - Auto-mutilation
- Aucun traitement :
 - Diète pauvre en purines
 - Camisole physique ou chimique
 - Extraction des dents
 - allopurinol



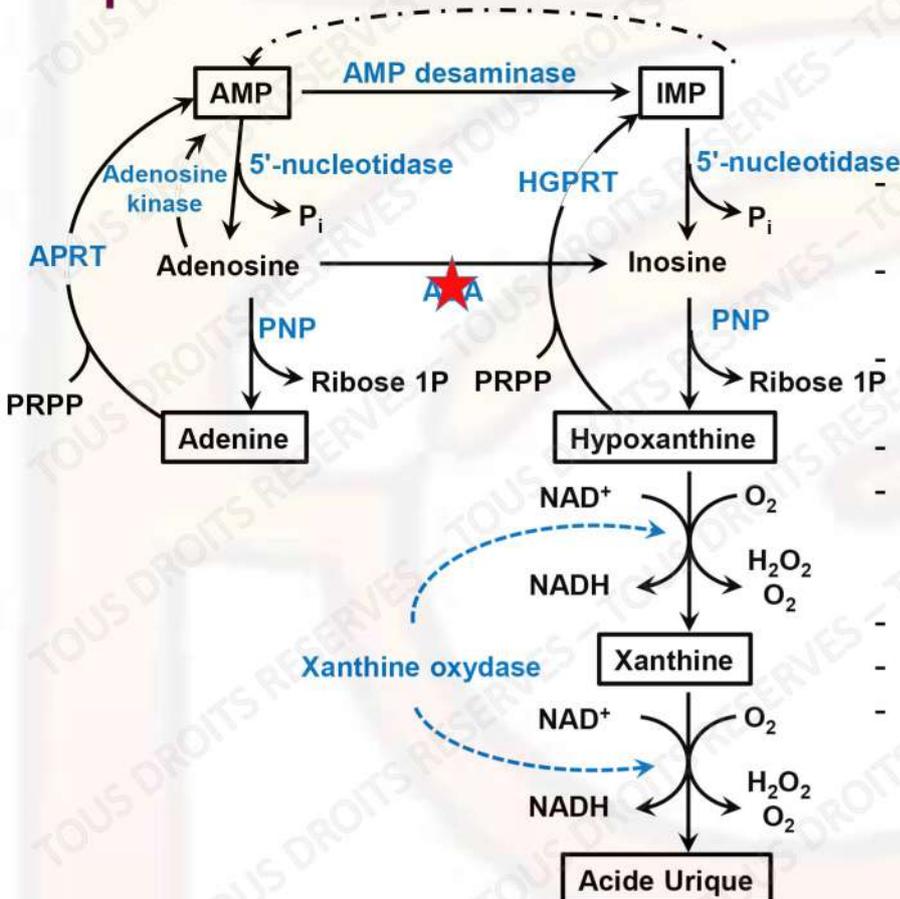
Déficiance en APRT



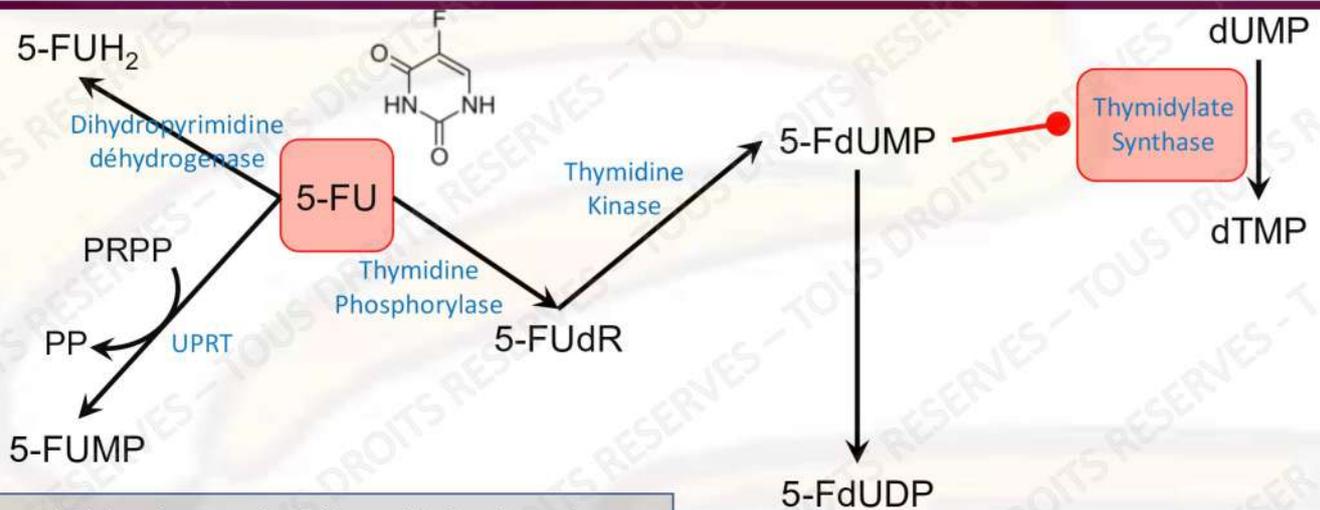
- Maladie autosomale récessive
- Défaut de récupération de l'adénine
- Accumulation de l'adénine et oxydation en 2,8 dihydroxyadénine.
- Formation de cristaux de hydroxyadénine
- Néphropathie, coliques néphrétiques, fréquentes infections urinaires, insuffisance rénale (fatale).

- Traitement : diète pauvre en purines, apport d'eau important, éviter alcalinisation des urines, greffe rénale.

Déficiance en ADA



- Accumulation d'adénosine et désoxyadénosine
- Dans les lymphocytes : dATP inhibe Ribonucléotide réductase
- Prévalence de 1/100000 à 1/500000 naissances
- Maladie autosomale récessive
- Représente 50% des SCID non liés à l'X
- Transplantation de moelle osseuse
- Injection PEG-ADA
- Thérapie génique



Déficit en Di-hydro-pyrimidine déshydrogénase

- Prévalence mal définie
- Sévérité variable
- Epilepsie, retards moteurs et mentaux, hypertonie, hyper-réflexie, microcéphalie, troubles "autistiques".
- Chez l'adulte, parfois découverte lors 'un traitement au 5-FU (hypertoxicité).
- Forme infantile héritée de manière autosomale récessive

Ce qu'il faut retenir (1)

- La Biologie Moléculaire est une discipline issue de la Biochimie qui a permis de démontrer que le support de l'hérédité est l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) qui compose les chromosomes.
- l'ADN est composé de désoxyribonucléotides issus de la biosynthèse de ribonucléotides
- Un nucléotide est composé d'une base, d'un pentose et de phosphates
- Le pentose est le ribose dont le précurseur est le PRPP
- La base est une base:
 - purique : Adénine ou Guanine
 - ou
 - pyrimidique : Uracile, Thymine ou Cytosine

Ce qu'il faut retenir (2)

- Le métabolisme des nucléotides fait intervenir des voies de néosynthèse ou des voies d'épargne
- Les voies de néosynthèse conduisent à la synthèse de précurseurs:
 - IMP pour les purines
 - Orotate pour les pyrimidines

Ce qu'il faut retenir (3)

- l'UMP est le premier nucléotide pyrimidique néosynthétisé
- Les voies de néosynthèse sont finement régulées
- La Ribonucléotide Réductase est un élément majeur de la néosynthèse des désoxyribonucléotides. Sa régulation, complexe, fait intervenir divers sites allostériques (de spécificité ou d'activité). Elle régule la balance des dNTP.
- Les voies d'épargne font majoritairement intervenir:
 - l'APRT et l'HGPRT: recyclage des bases puriques
 - Uridine-Cytidine Kinase et Thymidine Kinase sont la part majoritaire de l'épargne des nucléosides pyrimidiques
- Les antimétabolites sont des analogues structuraux, directement issus de la connaissance du métabolisme.

Merci de votre attention



franck.gesbert@universite-paris-saclay.fr