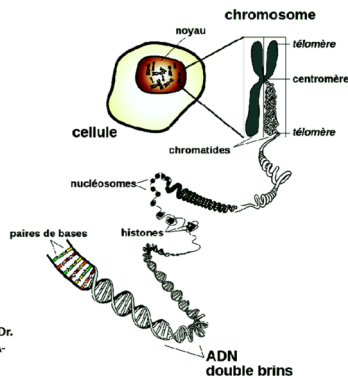
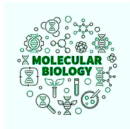


Cours de Biologie Moléculaire



Cours de Biologie
moléculaire réalisé par Dr.
REBAI Redouane (MCA-
Univ-Biskra)

Dr. REBAI Redouane-
Université- Biskra

1.0

13/08/2024

Table des matières

I - Chapitre 02 : Mutations, mutagenèse et détection	3
1. Objectifs spécifiques	3
2. Introduction	3
3. Mutations géniques	4
4. Intérêt de mutation	4
5. Réarrangements génétiques des mutations	4
5.1. Les trisomies	5
5.2. Les principaux réarrangements	5
6. Les mutations de l'ADN	6
6.1. Mutations naturelles	6
6.2. Mutations induites	6
6.3. Agents mutagènes	6
6.4. Les effets des mutations	7
6.5. L'expression des mutations	8
6.6. Les reversions	8
6.7. Mutagenèse et modification du matériel génétique	8
6.8. Les différentes techniques de détection de mutation (le diagnostic génotypique)	9
Abréviations	11
Bibliographie	12
Webographie	13

I Chapitre 02 : Mutations, mutagénèse et détection

1. Objectifs spécifiques

A la fin du chapitre, l'étudiant acquerrera les compétences suivantes :

- Définir une mutations.
- Connaître les types de mutation.
- Comprendre les causes induisant les mutations.
- Analyser les résultats d'une mutation.

2. Introduction

Toutes les bases azotées des acides nucléiques peuvent subir des lésions structurales appelées **mutations**, qui sont survenues au cours de la biosynthèse ou induites par agression du milieu environnant aboutissant à des modifications du matériel génétique. Elles peuvent avoir des conséquences délétères (rarement avantageuses) sur l'organisme.

Il est possible de distinguer 3 types de mutations: les substitutions nucléotidiques, les **insertions/ délétions** de quelques nucléotides et les remaniements géniques. Il existe des autres mécanismes de mutations qui sont rarement apparus.

3. Mutations géniques

💡 Fondamental

Elles sont des modifications de l'information génétique dans le génome d'une cellule ou d'un virus, résultant des changements permanents de la séquence de l'ADN ou l'ARN chez les virus, cette dernière peut être complètement changée sur un ou plusieurs nucléotides (par **addition**, **suppression** ou **remplacement**). La **substitution** d'une seule base n'entraîne pas systématiquement un **dysfonctionnement** profond du **polypeptide** (fig.18).

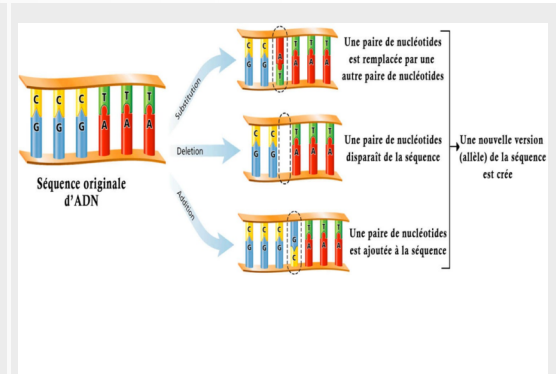


Figure 18: Différentes mutations d'une séquence d'ADN

4. Intérêt de mutation

Les êtres vivants ne peuvent survivre que si leur génome est protégé et répliqué soigneusement à l'abri de toutes **altérations** conduisant à une modification de ses propriétés **codantes**. Certaines mutations peuvent être délétères et induisant des **maladies héréditaires**.

- Les mutations sont considérées parmi les nombreux événements qui introduisent une **variabilité génétique** et l'**évolution** des espèces. A titre d'exemple chez les micro-organismes.
- Mutations dans un gène contribuent à l'apparition de deux nouveaux **allèles**.
- Source de **diversité** génétique et un des **moteurs** de l'évolution pouvant être soumis à la sélection naturelle:
 - Les mutations **avantageuses** ont tendance à se répandre dans une population.
 - Les mutations moins favorables ont tendance à être contre-sélectionnées et éliminées.

5. Réarrangements génétiques des mutations

Un réarrangement génétique représente un élément de la dynamique du génome qui subit constamment des mutations. Ces dernières sont le plus souvent réparées par les mécanismes de réparation cellulaire ou elles échappent à la réparation et peuvent être transmettre à la descendance (apparues à la nouvelle génération) si elles ont lieu aux niveaux des cellules germinales.

Les grands réarrangements chromosomiques sont des mutations induisant un remaniement de la structure d'un ou de plusieurs chromosomes. Il peut s'agir d'une délétion, d'une insertion, d'un échange de matériel génétique entre deux chromosomes (translocation), d'une duplication ou encore d'une inversion d'une région.

La duplication d'un gène ancestral peut causer de divers réarrangements:

- les anomalies de ségrégation chromosomiques à la méiose responsable de trisomie.
- les phénomènes de recombinaison ou de transposition.

5.1. Les trisomies

La trisomie 21, la plus fréquente et qui entraîne le mongolisme, peut être diagnostiquée par la recherche d'un triplet polymorphisme d'un ou plusieurs microsatellites du chromosome 21. Le plus souvent sont causées par des anomalies de ségrégation des chromosomes au moment de la méiose, elles sont identifiées par l'étude *morphologique cytogénétique* des chromosomes.

5.2. Les principaux réarrangements

Ces anomalies chromosomiques résultent le plus souvent d'une erreur de **recombinaison** de deux portions homologues lors de la méiose, aboutissant à une perte ou gain de séquences d'ADN.

Les délétions correspondent à la perte d'un segment chromosomique, d'erreurs d'enjambement au cours de la méiose ou d'un enjambement inégal (**crossing-over** inégal) (Fig.19).

Les insertions pourraient toucher un gène, ce qui rend sa structure interrompue. Ceci est causé à une introduction d'une séquence virale ou d'un transposon. En effet, les porteurs d'une insertion peuvent être phénotypiquement sains, car aucune information n'a été perdue.

La duplication est l'un des phénomènes les plus connus de remaniements du génome, elle se produit lorsqu'une partie de l'ADN d'un gène ou une partie d'un chromosome est copiée une ou plusieurs fois. Les altérations de duplication sont très variables et elle pourrait avoir des conséquences lorsqu'elle touche une partie du gène ou le gène entièrement :

- Si la duplication a lieu à l'intérieur d'un gène et touche un ou plusieurs exons peut aboutir à l'inactivation du gène en décalant le cadre ouvert de lecture en donnant des protéines anormales qui seront rapidement dégradées.
- Si la duplication touche le gène entier peut accentuer l'expression du gène si le gène dupliqué s'exprime autant que le premier.

En effet, la duplication des gènes pourrait être l'origine des familles multigéniques, certains exemplaires d'un gène subissent des mutations et évoluent vers de nouvelles fonctions. De plus, la duplication pourrait générer des **pseudogènes**, qui ne sont ni transcrits ni traduits et restent inactifs.

Une **translocation** chromosomique est initiée par une coupure des deux brins d'ADN sur les deux partenaires chromosomiques. Les translocations chromosomiques sont causées aussi par une recombinaison inégale entre deux séquences **homologues** et souvent répétées.

Elles peuvent avoir une grave répercussion si elles touchent deux gènes et pouvant créer leur **fusion**, c'est le cas dans certains cancers comme la leucémie myéloïde.

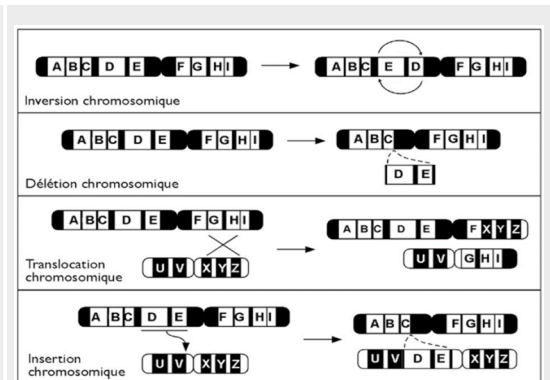


Figure 19: Différents types de réarrangements (mutations) de grande taille

La délétion diminue la quantité d'ADN, c'est la perte d'un segment chromosomique. Le réarrangement qui augmente la quantité d'ADN est la duplication. Un segment d'ADN se retrouve en deux copies dans le génome. Les duplications sont souvent en tandem, c'est-à-dire que les deux copies sont situées côte à côte sur le chromosome, dans la même orientation ou bien inversées.

Les inversions résultent du changement d'orientation d'un segment de chromosome puis sa réintégration dans le même chromosome. Ce type de remaniement entraîne des difficultés d'appariement au moment de la méiose et le phénotype associé à ce réarrangement est souvent invisible, lorsque le segment touché inclut le **centromère**, on parle d'une inversion **péricentrique**, par opposition à l'inversion **paracentrique**.

6. Les mutations de l'ADN

Il faut distinguer entre les mutations induites qui résultent d'une interaction entre l'ADN et celle provoquées par un agent **exogène** ou **mutagène**. Cependant, dans les deux cas, la plupart des mécanismes sont identiques.

6.1. Mutations naturelles

Ce sont des **mutations spontanées**, leur apparition n'a été influencée en aucune manière par une intervention humaine ou un facteur extérieur mais elles résultent des accidents de copies des bases puriques et pyrimidiques lors de la réplication de l'ADN. Les mutations se produisent spontanément sont rares grâce aux fonctions d'édition des polymérases et aux systèmes de réparation. Malgré toutes les exigences qui entourent l'appariement des nucléotides, des erreurs peuvent survenir et aboutir à l'apparition des mutations naturelles spontanées, ceci est revient à :

a. La diminution de la fiabilité de l'ADN polymérase :

Une ADN polymérase dénuée de fonction d'édition pourrait incorporer un nucléotide incorrect à titre d'exemple entraînant une mutation lors de la réplication suivante. La fréquence des erreurs de la polymérase influe sur la fréquence des mutations spontanées.

b. La tautomérisation :

Ces sont des changements structuraux affectant les bases azotées de l'ADN, en effet, ces dernières existent sous plusieurs formes tautomères résultant du déplacement des **hydrogènes** des fonctions **amine** ou **énol** (fig.20). Les différentes formes de tautomères ont des propriétés d'appariements différentes. Par exemple, la forme amino de la **cytosine** s'apparie avec l'**adénine** de la forme éno. De même, la **guanine** sous forme éno s'apparie avec la **thymine**. Ces mauvais appariements conduisent aux mutations s'ils ne sont pas corrigés.

*

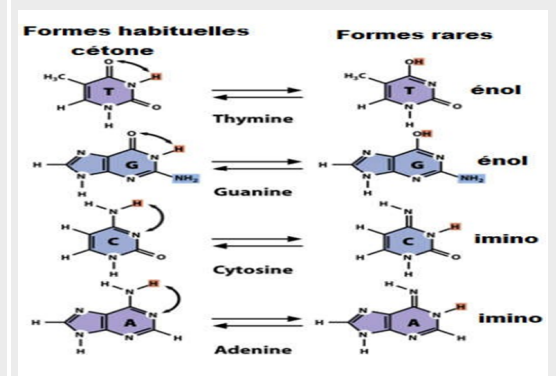


Figure 20: Les différentes formes tautomériques des bases azotées de l'ADN.

6.2. Mutations induites

Ce type de mutations résulte de l'interaction de l'ADN avec un agent extérieur ou **mutagène** qui peut augmenter le taux d'apparition de mutation. En général, la distribution des mutations induites par des agents mutagènes présente une spécificité caractéristique.

6.3. Agents mutagènes

En dehors de la réplication, les mutations peuvent être induites par des agents chimiques et d'autres physiques :

a. Agents chimiques :

- **Les agents intercalant** : ce sont des molécules qui s'insèrent entre les bases entraînant une perturbation de la réplication et induisant une cassure de l'ADN comme l'acridine orange et le bromure d'éthidium (BET).
- **Les agents chimiques** qui se comportent comme des **analogues** de bases : leur structure est très semblable aux bases purines et pyrimidines, le 5-bromo-uracile (fig.21) ressemble à la thymine et provoque des transitions de A vers G. Ainsi, il a une forte tendance à se tautomériser en « énoï », et donc s'apparier avec G au lieu de s'apparier avec A induisant une mutation.

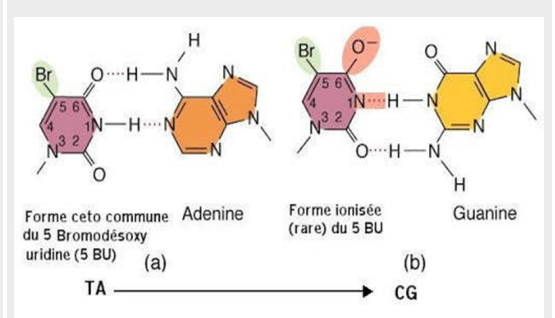


Figure 21: L'effet mutagène des analogues de bases (mésappariement).

- Les agents chimiques qui modifient la structure des bases : ces substances comme l'acide nitreux provoquent une **désamination** de cytosine qui se transforme en uracile. Ce dernier s'apparie avec l'adénine plutôt que la guanine. De plus, il existe d'autres agents chimiques qui procèdent aux **alkylations** des bases, tels que le **méthyl-methanesulfonate** et la **nitrosoguanidine** réagissent avec les bases en ajoutant des groupements **alkyles** (méthyle ou éthyle) (fig.22).

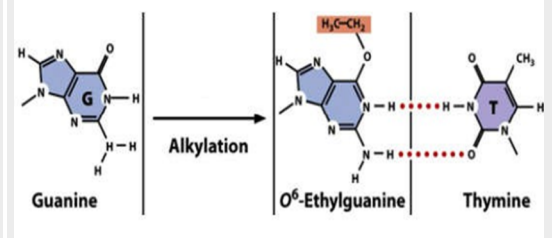


Figure 22: Mésappariement induit par l'alkylation de bases.

b. Agent physiques

Les radiations sont les principaux agents physiques responsables des mutations, par exemple, nous citons les rayons ionisants comme les rayons X qui induit des cassures de l'ADN, mais aussi les rayons UV qui provoquent la formation de dimères de pyrimidine à partir de 2 pyrimidines adjacents (T-T, C-C, T-C).

6.4. Les effets des mutations

Les mutations au sein de la séquence codante d'un gène peuvent avoir divers effets sur la séquence de l'ARNm transcrit et du coup la séquences d'acides aminés du polypeptide codé qui sera ou non modifié par rapport à la protéine codée par le gène non muté.

On distingue des mutations sans effets c.-à-d. sans changement du cadre de lecture : les mutations faux sens, les mutations silencieuses et les mutations. Ainsi, il existe des mutations qui induisent un changement du cadre de lecture, telles que les mutations dues aux insertions ou délétions.

- Mutations silencieuses: le codon résulte de ce type de mutation code le même acide aminé car la mutation ici est une substitution qui serait sans effet. Par exemple, le triple **UUA** est remplacé par **UUG**. Donc ces deux codons codent la leucine.
- Mutations faux sens: c'est une mutation ponctuelle dont laquelle un codon est remplacé par un autre codon donnant un acide aminé différent qui sera d'autant plus délétère pour les fonctions de la protéine.

- Mutations non sens : dans ce type de mutations, le codon qui code pour un acide aminé est transformé à l'un des trois codons stop. Par exemple, le codon **UGC** qui code pour la Cys^{*} est transformé à un codon stop **UGA**.
- Mutations conservatrices : la mutation ici stipule qu'un codon est remplacé par un codon donnant un acide du même groupe (possède les mêmes caractéristiques physico- chimiques): le codon **AAA** (Lys^{*}) est muté en **AGA** (Arg^{*}), donc la Lys et l'Arg faisant partie du même groupe d'acides aminés basiques.

6.5. L'expression des mutations

Une mutation pourrait induire des anomalies d'expression génique en altérant surtout les éléments impliqués dans la régulation de transcription, par exemple :

- Altération de régulation en **Cis** : Une mutation à ce niveau sera délétère car elle perturbe le rôle du promoteur dans la transcription de ce gène en modifiant les sites (**séquences consensus**) responsables de la liaison aux facteurs de transcription.
- En outre, les mutations peuvent altérer d'autres séquences régulatrices (**enhancers** ou **silencers**) qui sont capables de fixer des facteurs de transcription et donc l'activation ou l'inhibition de la transcription.
- Altération de régulation en **Trans** : elle résulte des mutations de gènes codant des facteurs de transcription. La plupart de ces mutations sont létales et induisent des anomalies du développement, un exemple bien précis est celui de gène **MECP2** (**méthyl-CpG binding protein**) impliqué dans un désordre neurologique (**syndrome de Rett**) et code pour la protéine **MecP2**. Cette dernière agit comme un répresseur transcriptionnel.
- Altération de la maturation de l'ARN prémessager : ces mutations affectent les sites donneurs et accepteurs d'épissage, mais selon des études récentes, plusieurs mécanismes sont à l'origine d'anomalies d'épissage. Des insertions ou des délétions pourraient modifier les séquences consensus de sites du branchement intronique.
- Une perturbation de l'extrémité 3' de l'ARN causé par une mutation du signal de **poly- adénylation** qui est à l'origine d'une **diminution** de stabilité du transcrit primaire.

6.6. Les reversions

Également appelées les mutations inverses, désignent tout processus ou mutation qui restaure le **phénotype** de type sauvage aux cellules portant déjà une mutation directe altérant le phénotype. Ce type de mutation permet un retour à la séquence d'origine.

6.7. Mutagénèse et modification du matériel génétique

Les techniques modernes mises en œuvre pour modifier le génome accroissent la précision des transformations et visent à minimiser les effets non voulus de ces changements. Les techniques de mutagénèse sont plus en plus utilisées en laboratoire pour produire des gènes mutants, des protéines, des souches de bactéries ou d'autres organismes génétiquement modifiés. En effet, les stratégies de mutagénèse peuvent être divisées en deux techniques : la mutagénèse dirigée et la mutagénèse aléatoire.

- **La mutagénèse dirigée** : est la méthode de choix pour modifier un gène ou une séquence de vecteur à un emplacement sélectionné. Des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions sont introduites en incorporant des amorces contenant la ou les modifications souhaitées avec une ADN polymérase dans une réaction d'amplification (PCR). Dans des expériences d'ingénierie protéique plus complexes, on peut concevoir des amorces mutagènes pour incorporer un codon dégénéré. De plus, il existe d'autres méthodes utilisées dans la mutagénèse dirigée, citons qui sont médiées par l'insertion de sites de restriction, d'autres

repose sur utilisation des oligonucléotides synthétisés sur des puces à ADN, et celles qui sont basées sur la mutagenèse dirigée multi-site, basée sur la recombinaison.

- **La mutagenèse aléatoire** : dans cette méthode, les mutations sont provoquées par insertion ou suppression de nucléotides d'une séquence de gène cible. L'insertion ou la suppression aléatoire conduit à un changement net de la longueur du gène d'intérêt. La mutagenèse aléatoire s'avère une technique technique optimale pour obtenir des protéines mutées à travers de la technique de PCR.

Les modifications issues de cette technique permettent d'obtenir rapidement des mutants aux caractères intéressants et de les sélectionner sans attendre qu'une mutation spontanée.

6.8. Les différentes techniques de détection de mutation (le diagnostic génotypique)

a. L'étude de polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP)

elle repose sur la recherche de différences entre les individus provoquant un changement de la taille de la séquence **palindromique** ou le site de **restriction**. Cette forme spéciale de polymorphisme génétique crée une différence dans la longueur des fragments d'ADN générés par la digestion de l'enzyme de restriction, que la séquence de l'enzyme de restriction soit présente sur un site précis ou non. La révélation d'une mutation est effectuée en utilisant des enzymes de restriction qui coupent dans des sites spécifiques (séquence palindromique), la détection des variations de la longueur de fragment est obtenue par l'électrophorèse.

*

b. Polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP)

Elle repose sur la vitesse de migration électrophorétique de brins simples d'ADN d'un allèle comporte un même marqueur, où il se trouve une mutation ou soit ponctuelle par exemple, cette mutation crée un changement de conformation des brins d'ADN où leurs structures tridimensionnelles portent différents positions dans l'espace contrairement à celles des brins où le marqueur n'a été pas muté.

c. Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

Cette technique base sur la séparation des brins d'ADN amplifiés par la technique de PCR, là où les séquences subissent une séparation par un gradient de dénaturation croissant par des agents chimiques (urée/formamide), ou un gradient de température TGGE. L'objectif est la détection de mutation en se basant sur la cinétique de la mobilité 'migration' des brins dénaturés comportant de le polymorphisme entre deux allèles sur l'électrophorèse sur gel où cette mobilité sera influencée par ce gradient, à ce niveau là le profil électrophorétique des allèles comporte des différentes bandes de deux même allèles.

d. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et Séquençage de Sanger

C'est la technique la plus performante mais coûteuse, elle permet d'amplifier les brins d'ADN in vitro d'un même gène à partir une seule molécule d'ADN ce que nous appelons l'ADN matrice, sous l'action d'une enzyme dite Taq polymérase dans des conditions favorables, cette enzyme catalyse la synthèse des nouveaux brins en présence des amorces (fragments initiateurs pour aider la polymérisation) et nucléotides actifs sous forme triphosphate dNTP, et aussi des cofacteurs de la même manière de la répllication d'ADN in vivo. L'intérêt de cette

technique est d'augmenter la quantité d'ADN, de détecter les mutations avec la comparaison des tailles moléculaires par l'électrophorèse sur gel des gènes amplifiés pour suivre l'analyse et détecter les mutations dans les amplifiants, une étape de séquençage aura lieu pour donner l'enchaînement des bases d'ADN, la plus utilisée est la *méthode de Sanger*.

- Le principe du séquençage par méthode de Sanger, il repose sur le même principe du PCR* en présence d'enzyme ADN polymérase qui synthétise des copiés de brins d'ADN en utilisant les même amorces utilisées dans la PCR. Après la synthèse des nouvelles copies, une analyse par l'électrophorèse résolutive qui permet de séparer des molécules d'ADN qui se diffèrent dans un seul nucléotide, puis subit une analyse spectrale qui sépare les nucléotides en fonction de leur absorption et la fiabilité du signal électrique reçu par un détecteur.

Q *Définition : Site palindromique (site de restriction)*

Séquence d'ADN pouvant se lire de la même façon dans les deux sens par rapport à un point central soit sur le même brin (exemple : ATTGC. CGTTA), soit sur les deux brins (AACGTT et TTGCAA).

Note : Les séquences complémentaires reconnues par la plupart des enzymes de restriction sont palindromiques.

Abréviations

Arg : Arginine : acide aminé basique

Cys : Cystéine : acide aminé aliphatique contient une fonction Thiol (SH)

Lys : Lysine : acide aminé basique

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne : technique d'amplification d'un gène d'ADN in-vitro

Bibliographie

- Benmohamed, A. (2017). La réplication chez les eucaryotes et les procaryotes. Cours en ligne. Site : <https://sienceduvivant.wordpress.com/2017/01/07/replication-chez-les-procaryotes-et-eucaryotes/>. Consulté le 20/08/2020.
- Bruto, M. (2010). Etude de la plasticité génomique chez *Streptomyces ambofaciens* : Assemblage et analyse comparative du génome des souches ATCC23877 et DSM40697 Mémoire de master. Université Henri Poincaré Nancy 1. P23.
- Cheriyedath, S. (2020). Technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Cours en ligne. Site Web (<https://www.news-medical.net/life-sciences>), consulté le 19/12/2020.
- Etienne, J et (2004). Biochimie génétique Biologie moléculaire. Masson. ISBN: 2294004477, 9782294004476. 431p.
- Fanning, E., & Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology*, 384(2), 352-359.
- Finn, K., Lowndes, N.F., Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* 69 : 1447-1473.
- Housset, C., Raisonnier, A. (2009). Cours de biologie moléculaire. Faculté de médecine. Université Pierre et Marie Curie. 207p.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. (2003). *Molecular Cell Biology*. 6th Ed. 937p.
- Morange, M. (2013). Histoire de la biologie moléculaire. La Découverte. ISBN : 2707172596, 9782707172594. 378 p.
- Moussard, C., Mougins, C. (2005). Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires. De Boeck Supérieur. ISBN : 2804134881, 9782804134884. 311 p.

Webographie

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/2111.jpg>.

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/rflp.html.

<https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/prokaryotictranscription/>.

- <https://www.bio-top.net/Terminologie/R/index.php?page=ribo>.

<http://planet-vie.ens.fr/article/1482/transcription-eucaryotes>.