

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mostefa Ben Boulaid  
Batna 2  
Faculté SNV



جامعة مصطفى بن بولعيد باتنة 2  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Module de :

---

# Biologie Cellulaire et Moléculaire

---

*Cours destinés aux étudiants de troisième année  
Licence Biotechnologie et Génomique Végétale*

Présenté par :

**Dr. SALMI Manel**

Année universitaire 2021/2022

## **Chapitre I : La Biologie cellulaire**

### **I.1. Rappel**

La vie est affaire de cellules. Tous les êtres vivants sont constitués d'au moins une cellule et toute cellule est issue d'une autre cellule. Une cellule présente toutes les caractéristiques fondamentales du vivant : elle transfère différentes formes d'énergie de manière à effectuer un travail ; elle exprime une information génétique contenue dans des acides nucléiques ; elle échange avec son milieu de vie ; elle peut se reproduire, et enfin, elle meurt. La vie des organismes pluricellulaires impose l'existence d'une communication entre les cellules, moyen essentiel de leur coordination.

#### **➤ Les propriétés fondamentales d'une cellule**

-La cellule est hautement organisée : la complexité de la cellule est très évidente mais difficile à décrire. Si on prend les cellules qui tapissent notre intestin comme exemple, l'extrémité apicale est riche en prolongements cytoplasmiques (les microvillosités) qui facilitent l'absorption des nutriments tandis que l'extrémité basale contient un nombre important de mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire aux mécanismes de transport membranaire.

-La cellule possède un programme génétique : les organismes sont construits selon une information génétique codée par un ensemble de gènes.

-La cellule se multiplie par elle-même : elle est capable de se diviser par Mitose (division équationnelle) ou par Méiose (division réductionnelle).

-La cellule acquit et consomme l'énergie : pour la plupart des cellules animales, l'énergie est stockée sous forme de glucose. Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose subit une dégradation, cette dernière donne une énergie sous forme d'ATP.

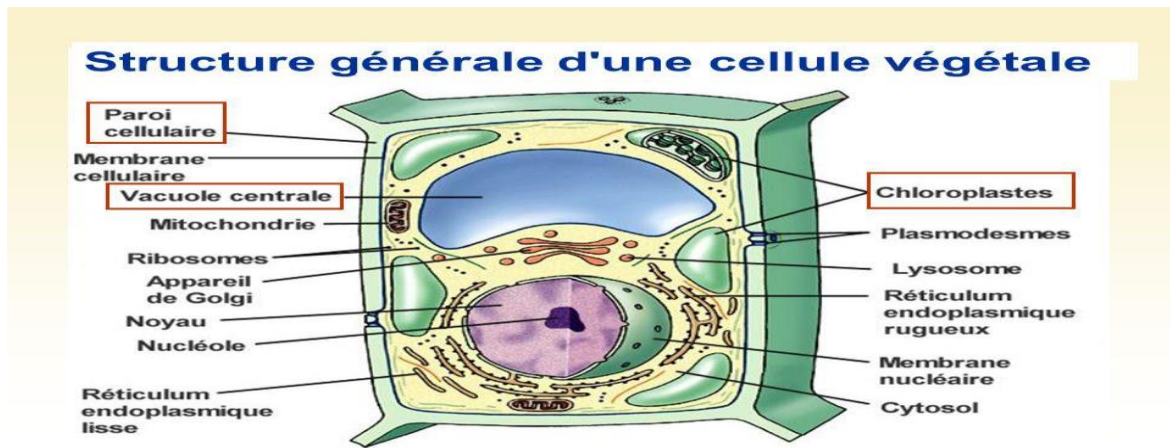
-La cellule peut faire une grande variété de réactions chimiques : en réalité, elle ressemble à une usine chimique miniature, toutes les modifications chimiques nécessitent des protéines (enzymes) qui augmentent la vitesse de ces réactions.

-La cellule peut répondre aux stimuli : certaines cellules possèdent des récepteurs spécifiques qui régissent à certaines substances exemples: hormones, facteurs de croissances,...etc. elle peut aussi répondre aux stimuli particuliers afin de modifier son métabolisme, déclencher sa division ou même se suicider (apoptose).

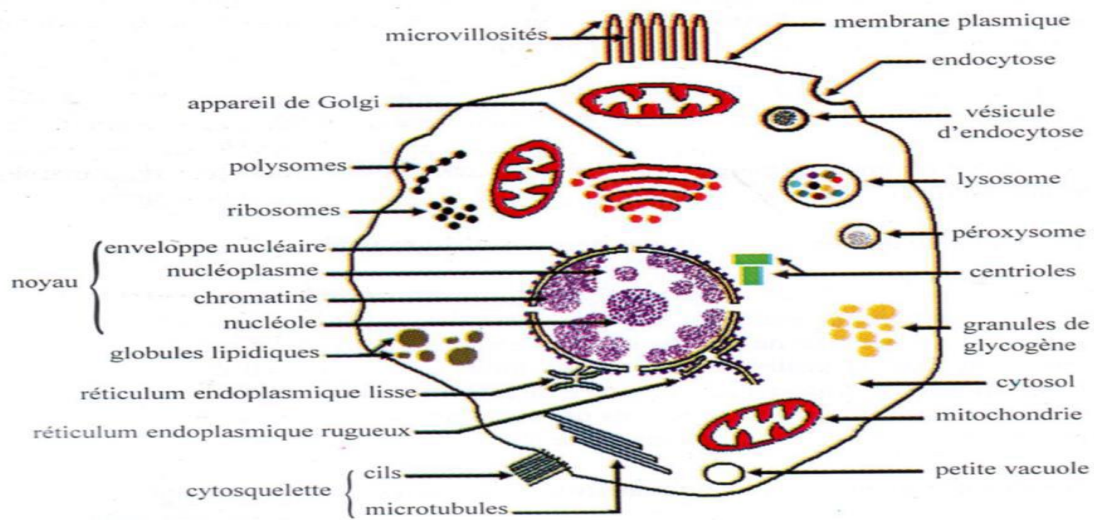
-La cellule est capable d'une autorégulation : l'entretien d'un état complexe et ordonné exige une régulation constante. Exemple : l'incapacité pour une cellule de corriger une erreur pendant la duplication d'ADN peut engendrer une mutation ou une défaillance dans le contrôle de la croissance cellulaire et peut ainsi transformer la cellule saine en une cellule cancéreuse capable de détruire tout l'organisme.

#### **➤ Organisation générale de la cellule**

Les cellules végétales bien différenciées sont totalement entourées par une paroi épaisse (la paroi pectocellulosique), Cette paroi est étroitement appliquée contre la membrane cytoplasmique, Dans le cytoplasme se trouvent : le noyau, des organites volumineux colorés en vert par un pigment (la chlorophylle) qu'on appelle les chloroplastes, sont ceux qui réalisent la photosynthèse, Les mitochondries, une ou plusieurs vacuoles de très grande taille, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique....



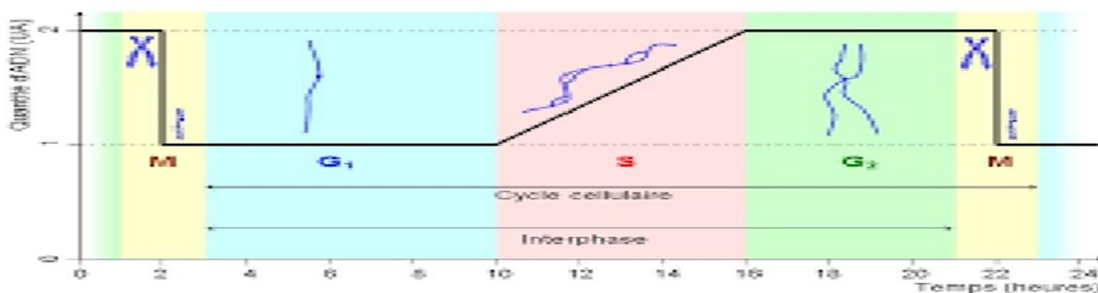
**Figure 1.** Organisation d'une cellule végétale.



**Figure 2.** Organisation d'une cellule animale

### I.2. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'intervalle de temps qui s'écoule entre le moment où une cellule vient de se former (après une mitose) et le moment où elle se divise et donne deux cellules filles ; à l'échelle cellulaire, il correspond à la durée de vie d'une génération. Le cycle cellulaire est formé par une interphase et une mitose (figure 3).



**Figure 3.** Le cycle cellulaire

### **I.2.1.Aspects structuraux et moléculaires de la mitose**

A partir d'un zygote issu de la fécondation, un individu se construit et forme un organisme souvent constitué de milliards de cellules pour les êtres les plus évolués.

Le cycle cellulaire est divisé en plusieurs phases :

**-L'interphase** : Lorsque la cellule ne se divise pas, elle est dite en interphase, avec un noyau bien délimité par une enveloppe nucléaire, la cellule transcrit ses gènes et les chromosomes sont dupliqués. Elle peut être subdivisée en plusieurs phases :

✓ **La phase G1** : au cours de laquelle la cellule croît et effectue les fonctions pour lesquelles elle est programmée génétiquement : biosynthèse des protéines, etc. C'est notamment durant cette phase que les jeunes cellules filles fraîchement divisées grandissent jusqu'à atteindre leur taille finale.

✓ **La phase S** : au cours de laquelle le matériel chromosomique est doublé par réplication de l'ADN grâce à des ADN polymérase. C'est ce qu'on appelle la duplication des chromosomes. La quantité d'ADN est donc doublée. À la fin de la phase S, chaque molécule d'ADN est représentée en double exemplaire correspondant aux deux chromatides filles du chromosome mitotique. Il y a aussi pendant cette phase, la synthèse des protéines dans le cytosol, en particulier des histones qui seront associées à l'ADN.

✓ **La phase G2** : À l'issue de cette phase, chaque chromosome est parfaitement identique à son homologue sur le plan morphologique et du point de vue des gènes présents.

**-La mitose proprement dite :**

**1- La prophase** : Lors de cette phase, le matériel génétique (ADN), qui est présent dans le noyau sous la forme de chromatine se condense en structures appelées chromosomes. Comme le matériel génétique a été dupliqué avant le début de la mitose, les chromosomes sont donc constitués de deux chromatides soeurs portant toutes les deux la même information génétique. Les deux chromatides d'un même chromosome sont reliés au niveau de la région centromérique. Une protéine nommée cohésine joue le rôle de colle et unit les deux chromatides d'un même chromosome.

-Les microtubules se réorganisent pour former le fuseau mitotique.

-L'enveloppe nucléaire se désagrège sous forme de vésicules.

-Des complexes protéiques spécialisés : les kinétochores, se forment au niveau des centromères. Certains microtubules s'accrochent aux kinétochores. Ils seront alors appelés microtubules kinétochoriens. Petit à petit chaque chromosome voit chacune de ses chromatides reliée à un pôle par l'intermédiaire des microtubules. Ceux-ci exerçant des tensions, les chromosomes ont alors des mouvements agités.

**2-La métaphase** : C'est le rassemblement des chromosomes condensés à l'équateur de la cellule, pour former la plaque métaphasique (ou équatoriale). Les tensions subies par chacun des kinétochores d'un chromosome s'équilibrent progressivement et ceux-ci s'alignent dans un plan situé à mi-chemin des deux pôles. On observe que les chromosomes sont alignés selon leur centromère. On pense que les kinétochores non accrochés aux microtubules génèrent un signal pour empêcher l'étape prématurée de l'anaphase sans les chromosomes tous alignés.

**3-L'anaphase** : est une phase très rapide de la mitose où les chromatides se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule. Les fils chromosomiques sur lesquels étaient accrochés les centromères des cellules se détachent et les chromatides se déplacent chacune vers un pôle de la cellule.

**4-La télophase et cytotdiérèse:** Durant cette période :

-Les microtubules kinétochoriens disparaissent.

-Les chromatides soeurs commencent à se décondenser.

-L'enveloppe nucléaire ainsi que les nucléoles commencent à se reformer.

Chez la cellule végétale, la cytotdiérèse se réalise par la construction d'une nouvelle paroi, phragmoplaste appelé plus simplement corps intermédiaire entre les deux cellules filles. Cette nouvelle paroi se développe de manière centrifuge : des vésicules golgiennes contenant de la propectine s'accumulent du centre de la cellule vers la périphérie, puis ces vésicules fusionnent pour former le phragmoplaste qui se raccorde à la paroi primaire de la cellule mère, provoquant sa division en deux cellules filles. La paroi primaire et la membrane des deux cellules filles se reforment alors au niveau de cette séparation et le phragmoplaste se différencie en lamelle moyenne.

### **I.2.2. Aspects structuraux et moléculaires de la méiose**

La méiose prend place dans les cellules (diploïdes) de la lignée germinale pour former les gamètes (haploïdes).

#### **I.2.2.1. Première division méiotique : division réductionnelle**

##### **Prophase I**

L'enveloppe nucléaire disparaît. Les chromosomes bichromatidiens s'individualisent par condensation de leur ADN à partir de la chromatine du noyau. Ils s'associent ensuite par paires de chromosomes homologues. Cet appariement donne des tétrades (car 4 chromatides) aussi appelées bivalents (car  $2n$  chromosomes homologues).

##### **Métaphase I**

Les paires de chromosomes homologues (bivalents) se placent en vis-à-vis de part et d'autre de la plaque équatoriale.

##### **Anaphase I**

La contraction de la fibre du fuseau achromatique entraîne la disjonction des deux chromosomes homologues de chaque paire et migrent aux pôles opposés, tirés par des microtubules kinétochoriens. Ainsi, en méiose, les chromatides homologues restent attachées au lieu de se séparer comme en mitose.

##### **Télophase I et Cytodiérèse I**

On observe une disparition du fuseau mitotique créée en métaphase, puis une séparation et individualisation en 2 cellules par cytotdiérèse.

#### **I.2.2.2. Deuxième division méiotique : division équationnelle**

Chaque chromosome étant resté dupliqué ( $n$  chromosomes à 2 chromatides), il n'y a pas de réplication de l'ADN et la division se déroule immédiatement. Cette division consiste en une simple mitose classique : pour chaque cellule, on passe de  $n$  chromosomes doubles à deux cellules à  $n$  chromosomes simples.

**Prophase II** : Phase identique à la prophase I mais brève car les chromosomes sont restés compactés.

**Métaphase II :** Les chromosomes se placent sur la plaque métaphasique par leur centromère. Leur condensation est maximale. Durant cette phase, les microtubules se fixent aux kinétochores.

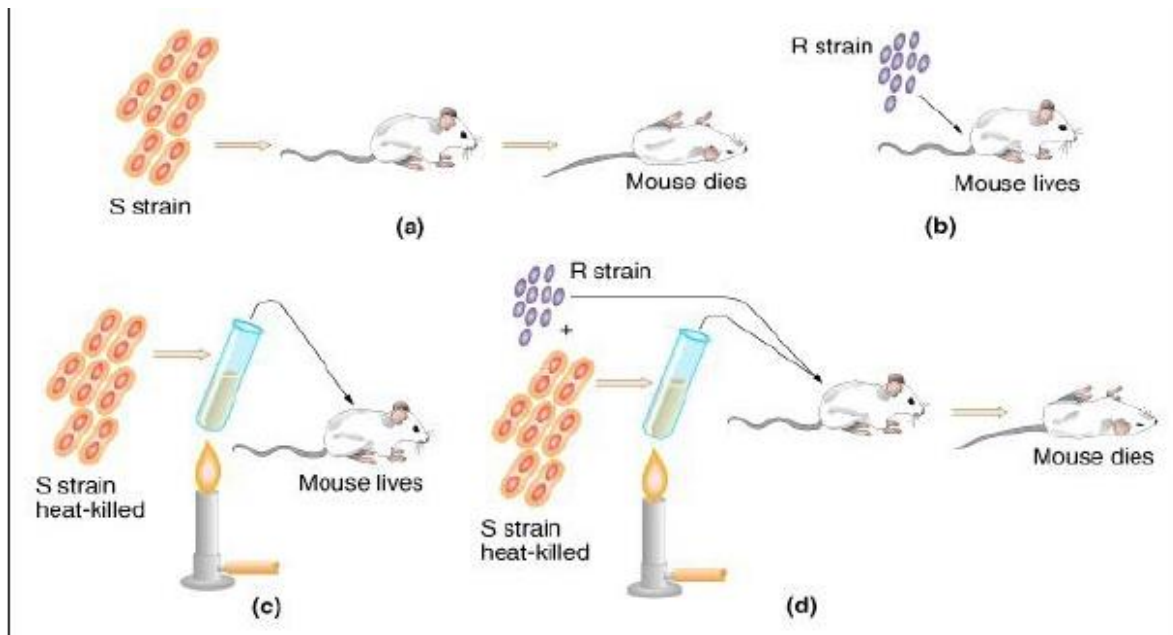
**Anaphase II :** Les chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent après rupture de leur centromère et migrent vers les pôles opposés de la cellule.

**Télophase II :** Les quatre cellules haploïdes issues de la méiose possèdent  $n$  chromosomes simples.

## Chapitre II. La biologie moléculaire

### II.1. La nature chimique des gènes

En 1928, Fred Griffith découvre le phénomène de "transformation" : une coinjection chez une souris de pneumocoques non pathogènes (R) et de pneumocoques virulents (S) mais tués préalablement entraîne la mort de l'animal. Les pneumocoques non pathogènes sont ainsi transformés par un facteur issu des pneumocoques virulents. En 1944, la purification du facteur transformant par Avery aboutit au résultat suivant : ce n'est pas une protéine, mais un acide desoxyribonucléique (ADN), mettant ainsi en évidence le rôle de l'ADN comme support de l'information génétique. Cependant, l'ADN est alors considéré comme un homopolymère dont l'élément de base serait ATGC et semble donc beaucoup trop rudimentaire pour être le support de l'information génétique.



**Figure 1.** L'expérience de Griffith (1928)

## **II.2. De l'ADN au chromosome**

### **II.2.1. Les acides nucléiques (ADN, ARN)**

Les acides nucléiques sont des composés connus depuis le 9<sup>ème</sup> siècle, on sait qu'ils se trouvent dans les cytoplasmes et dans d'autres organites cellulaires (noyaux, mitochondries, plastes...). A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, on a découvert que ces molécules étaient un polymère formé par l'enchaînement de nucléotides. Les acides nucléiques jouent un rôle fondamental dans le stockage, le maintien et le transfert de l'information génétique. Il existe deux types d'acide nucléique : l'acide ribonucléique (ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ADN).

#### **II.2.1.1. Acide désoxyribonucléique (ADN)**

Support biochimique de l'information génétique chez tous les êtres vivants (à l'exception de quelques virus qui utilisent l'ARN).

- **Les ADN des différents êtres vivants**

L'ADN de tous les êtres vivants possède :

-La même structure, soit deux brins (1 brin pour certains procaryotes et virus) constitués par une succession de plusieurs nucléotides.

Ce qui distinguera les espèces sera :

-Le nombre de molécules : une molécule dans un virus ou une bactérie, plusieurs molécules dans une cellule.

-La longueur : Quelques milliers de nucléotide ou plusieurs milliards (répartis sur plusieurs chromosomes), par exemple chez l'homme, l'ADN nucléaire comprend 3.5 milliards de paires de nucléotides, répartis dans 46 chromosomes et l'homme possède 1000 fois plus d'ADN qu'Escherichia coli. Les virus possèdent les acides nucléiques les plus courts (ADN ou ARN) quelques milliers à plusieurs dizaines de millions de nucléotides.

-La forme : Linéaire ou circulaire

-Localisation : ADN séparé ou non du cytoplasme par une membrane nucléaire.

-La séquence des bases azotées (ou de nucléotides) qui sera caractéristique de chaque molécule d'ADN, ce sont ces séquences qui joueront un rôle biologique capital (des séquences de bases différentes donneront des messages différents donc des protéines différentes).

- Eucaryotes / procaryotes : A l'intérieur de chacune de leurs cellules, les eucaryotes possèdent un noyau : petit sac entouré d'une membrane semi-perméable renfermant les chromosomes. L'Homme, ainsi que les animaux, les plantes et les champignons, sont des eucaryotes. Chez les eucaryotes, les gènes sont le plus souvent constitués de deux types de séquence nucléotidique : l'une est dite codante et l'autre non codante. Les parties codantes, appelées exons, portent l'information qui sera directement utilisée pour fabriquer les protéines. Entre les exons se trouvent les introns, non « lus » lors de la traduction. Du fait de cette disposition alternée exon/intron, on emploie l'expression gène mosaïque.

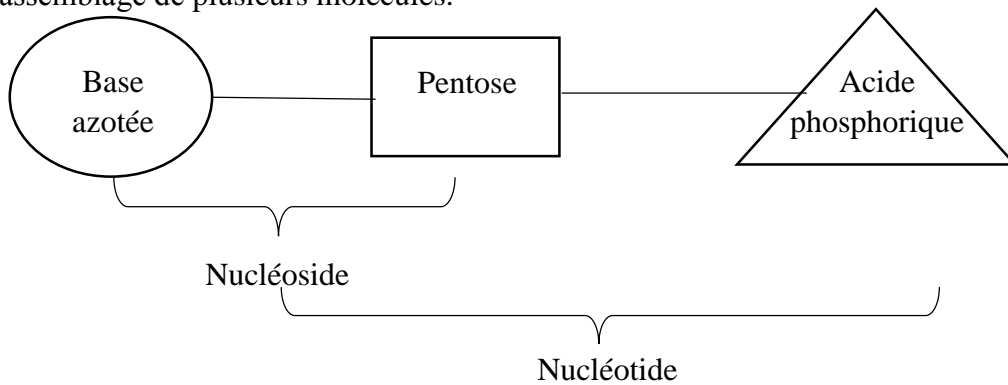
Chez les procaryotes l'ADN est situé dans le cytoplasme et constitue un seule chromosome, souvent circulaire, L'ADN est mono ou bicaténaire.

### II.2.1.2. Acide ribonucléique (ARN)

Dans les cellules, on distingue plusieurs types d'ARN suivant leur fonction. Les trois types principaux sont : les ARN messagers, les ARN de transfert et les ARN ribosomiaux. L'ARN est un acide nucléique constitué d'une seule chaîne de nucléotides, de structure analogue à celle de l'ADN. Il existe cependant des différences chimiques entre ces deux acides nucléiques qui donnent à l'ARN certaines propriétés particulières. L'ARN est produit par transcription de l'ADN.

### II.2.2. Les nucléotides

Le nucléotide est un motif structural de base (monomère) des acides nucléiques, formé de l'assemblage de plusieurs molécules.



#### A- Les bases azotées

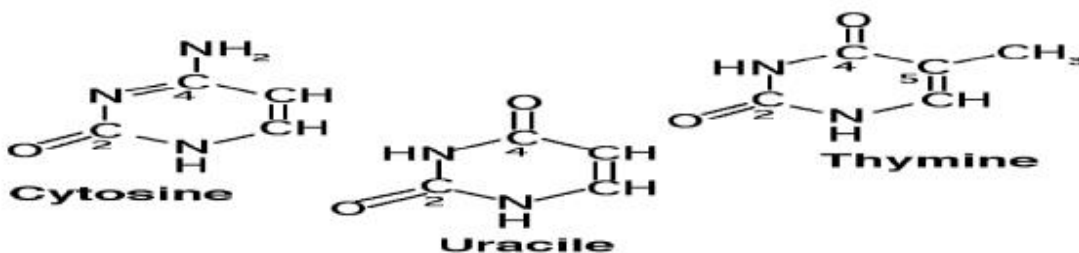
Cinq bases majeures, partagées en deux séries, entrent dans la composition des nucléotides et leurs polymères. Elles vont conférer aux composés biologiques dont elles font partie des propriétés capitales.

-Les bases pyrimidiques : Elles sont formées d'un cycle hexagonal à 4 carbones et 2 azotes. Différents substituants viennent s'ajouter sur ce cycle. Les bases pyrimidiques sont au nombre de 3 : la cytosine, l'uracile et la thymine.

-**La cytosine** : est constituée d'un noyau pyrimidine dont le carbone 4 est substitué par une fonction amine et le carbone 2 par une fonction cétone.

-**L'uracile** : est constituée d'un noyau pyrimidine dont les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone.

-**La thymine** : est aussi constituée d'un noyau pyrimidine dont les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone, mais dont le carbone 5 est substitué par un méthyl.

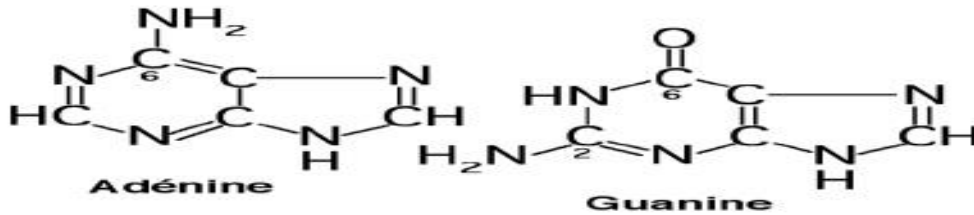




-Les bases puriques : Elles sont formées de l'accolement d'un cycle hexagonal à 4 carbones et 2 azotes et d'un cycle pentagonal à 3 carbones et 2 azotes. Différents substituants viennent s'ajouter sur ce cycle. Ces bases sont : l'adénine **A** et la guanine **G**.

-L'**adénine** : est constituée d'un noyau purine dont le carbone 6 est substitué par une fonction amine. Elle est la seule des bases nucléiques dont la formule ne contient pas d'atome d'oxygène.

-La **guanine** : est constituée d'un noyau purine dont le carbone 2 est substitué par une fonction amine et le carbone 6 par une fonction cétone.

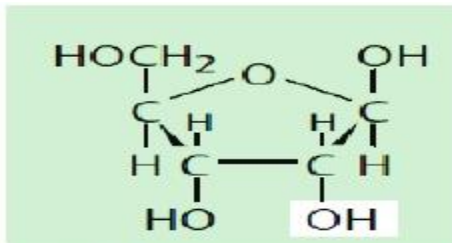


### B- Le pentose

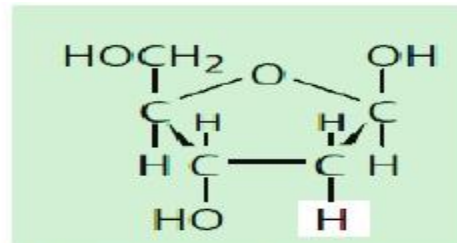
Il s'agit d'un sucre simple 5 carbones. On trouve deux types de pentoses dans les acides nucléiques.

-Le **ribose** : il se trouve dans l'ARN, on numérote les atomes de carbones du ribose avec des primes pour éviter la confusion avec les numéros des bases.

-Le **désoxyribose** : il se trouve dans l'ADN. C'est un ribose dans lequel le OH en C2' est remplacé par un H.



β-D-Ribose



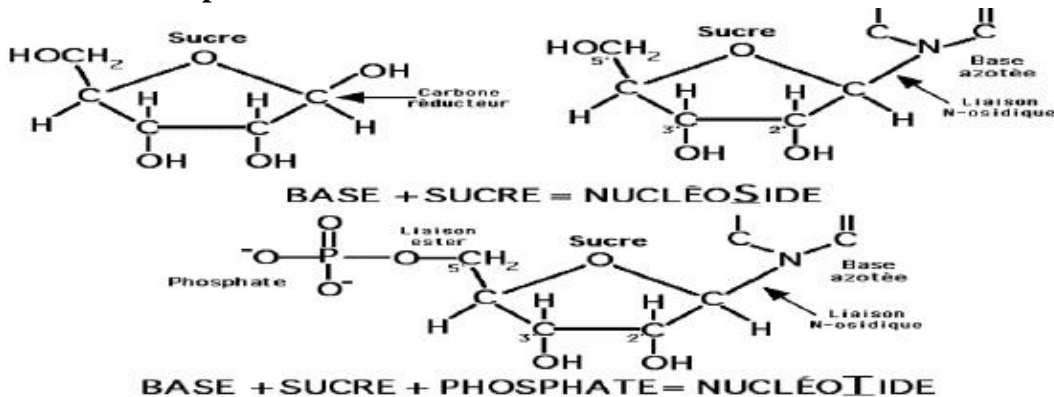
β-D-Deoxyribose

### C- L'acide phosphorique

C'est un triacide, l'une de ces fonctions sera estérifiée dans l'ADN et l'ARN.

#### II.2.3. Association des trois éléments composant un nucléotide

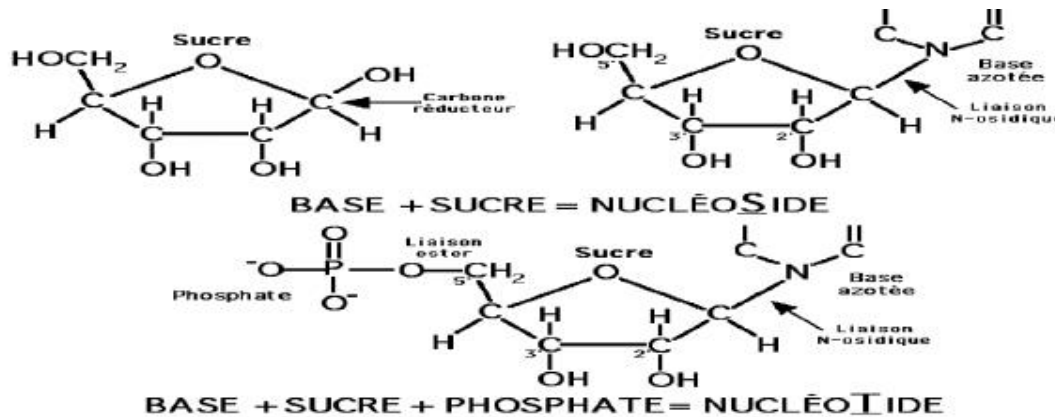
##### A- Liaison base-pentose



La liaison qui unit l'ose et la base est une liaison N-glycosidique ( $\beta$  osidique). Elle se forme par élimination d'une molécule d'eau entre l'OH du C1' l'ose et un H de la base pyrimidique (H en N1) ou purique (H en N9). Le composé obtenu est un nucléoside.

### B- Liaison pentose-phosphate

La liaison entre l'ose et l'acide phosphorique est une liaison ester (covalente ester). Cette liaison se forme par élimination d'une molécule d'eau de l'OH de l'acide phosphorique et l'H de la fonction alcool en C5' de l'ose.



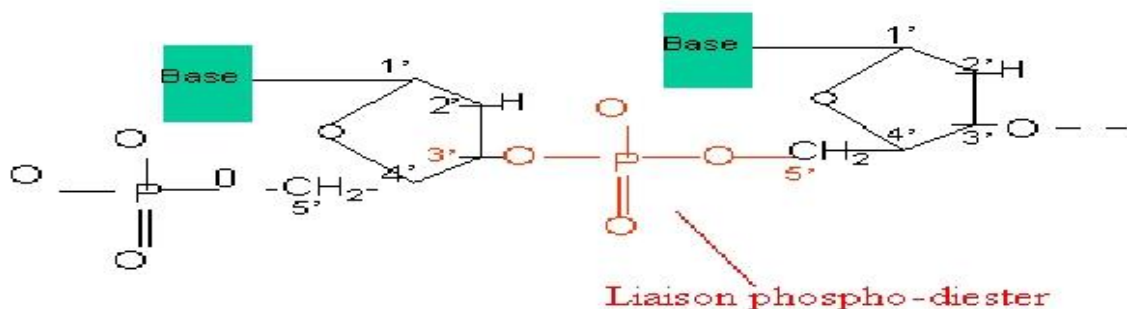
### II.2.4. Nomenclature des différents nucléotides

Le nom du nucléotide ou de nucléoside dérive de celui de la base (radical) suivi d'un suffixe **osine** (pour une base purique) ou **idine** (pour une base pyrimidique) pour les nucléosides, et **ylique** (base purique) **idylique** (base pyrimidique) pour les nucléotides.

### II.2.5. Association des nucléotides dans un acide nucléique

#### A- Liaison reliant les nucléotides

Dans un acide nucléique, les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons ester une molécule d'eau est éliminée entre l'OH de l'acide phosphorique et l'H de la fonction alcool du carbone 3' du sucre. Ainsi, l'acide phosphorique engage 2 fonctions acides dans les liaisons appelées (phosphodiester), la 3ème fonction acide libre confère des propriétés acides aux acides nucléiques.

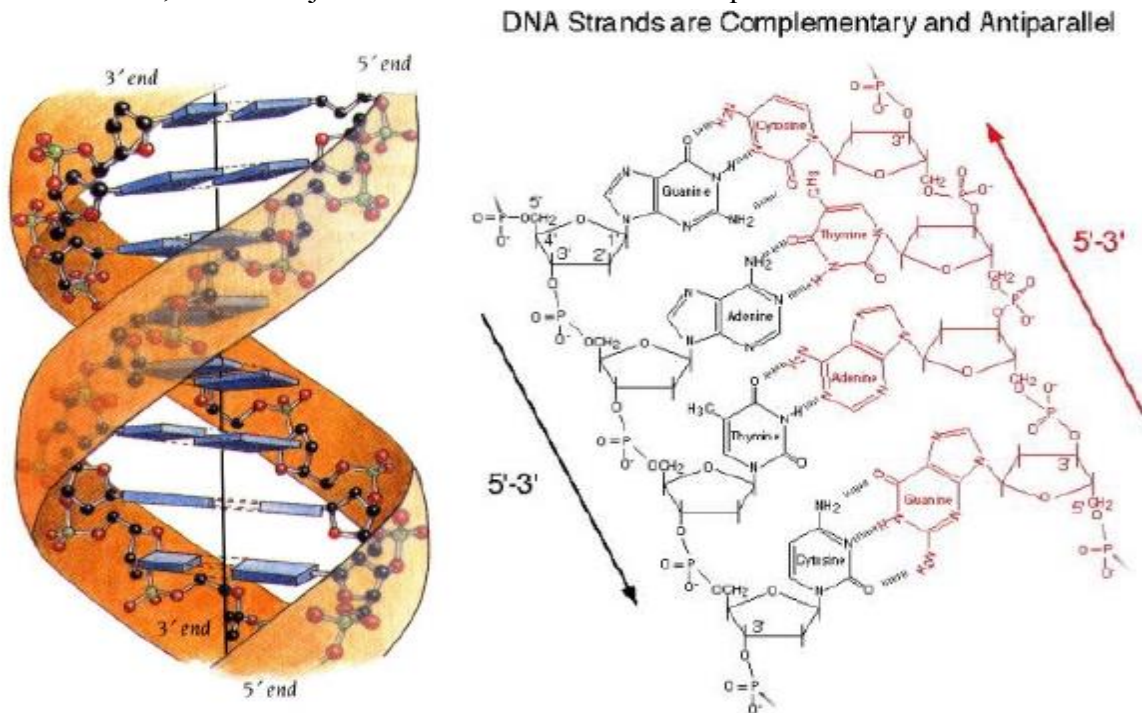


## B- Convention de lecture d'un acide nucléique

Une chaîne d'acide nucléique comprend deux extrémités :

- Une extrémité contient le groupement phosphate avec 2 fonctions acides libres, c'est l'extrémité 5'P.
- Une extrémité comporte un OH (fonction alcool) libre porté par le carbone 3' de l'ose, c'est l'extrémité 3'OH.

Par convention, on lira toujours une chaîne d'acides nucléiques dans le sens 5'P vers 3'OH.



**Figure 2.** A gauche : structure primaire de l'ADN. A droite : la structure secondaire de l'ADN en double-hélice droite.

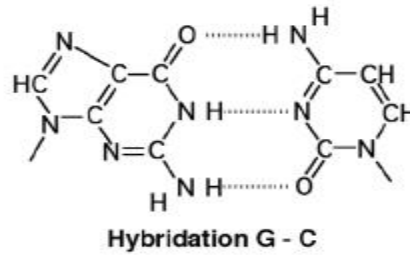
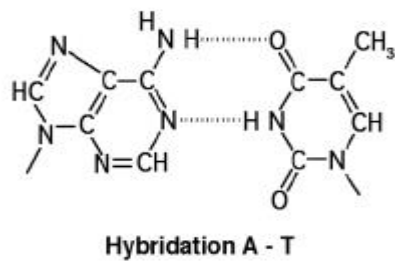
## C- Liaisons hydrogène

Les atomes d'azote et surtout d'oxygène possèdent respectivement deux et quatre électrons de leur couche périphérique qui ne participent pas aux orbitales des liaisons covalentes de la molécule. Ceci leur confère un caractère nucléophile qui leur permet d'exercer une attraction sur les atomes électrophiles voisins, en particulier les atomes d'hydrogène : cette attraction constitue une liaison hydrogène.

Lorsqu'un acide nucléique est en solution, les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans un RNA) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine.

On désigne cette liaison sous le terme d'hybridation.

- L'hybridation adénine-thymine est moins stable (2 liaisons hydrogène) que celle entre guanine et cytosine.
- L'hybridation guanine-cytosine est plus stable (3 liaisons hydrogène) que celle entre adénine et thymine.



## II.2.6. Caractéristiques des deux chaînes d'ADN

Les deux chaînes ont 3 propriétés essentielles, elles sont dites :

-Antiparallèles -complémentaires -hélicoïdales

**-Antiparallèles** : Elles sont parallèles mais dans des directions opposées l'extrémité 5' de l'une est en face de l'extrémité 3' de l'autre et inversement.

**-Hélicoïdales** : les deux chaînes de la molécule d'ADN présentent dans l'espace une configuration hélicoïdale. Elles s'enroulent autour d'un axe central imaginaire pour former une double hélice.

**-Complémentarité** : La règle de complémentarité est : en face de A on a T et en face de G, on a C. Cette règle de complémentarité confère à chaque paire de base la même dimension (une base purique en face d'une base pyrimidique), ce qui rend possible la structure régulière de la double hélice. Par ailleurs, C et G et A et T sont respectivement reliés par 3 et 2 liaisons hydrogènes, ce qui permet d'exploiter tous les liaisons H possibles. En effet, si G et T, par exemple étaient complémentaires, elles seraient reliées par 2 liaisons H, la cytosine et l'adénine également seraient reliées par 2 liaisons H dans ce cas, on perdrait une liaison H pour tous les couples de nucléotides, ce qui affecterait la stabilité de la molécule d'ADN.

-La chaleur peut dissocier les deux chaînes : c'est la fusion de l'ADN. Cette fusion est réversible : les deux chaînes peuvent s'hybrider à nouveau.

## II.2.7. La forme de l'ADN (La double hélice)

La structure secondaire du DNA est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre. Chacun des deux brins est orienté (5'→3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'→5'). On dit qu'ils sont antiparallèles. Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc..). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires. La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice.

Le surenroulement joue un rôle important dans la condensation de l'ADN. Il module l'entortillement de l'ADN. Une molécule d'ADN pouvant être mille fois plus longue que le diamètre d'une cellule, sa condensation pour qu'elle occupe un espace à la mesure de celui d'une cellule est une opération critique. C'est à ce niveau qu'intervient le surenroulement de l'ADN, dans la mesure où il en réduit sensiblement l'encombrement.

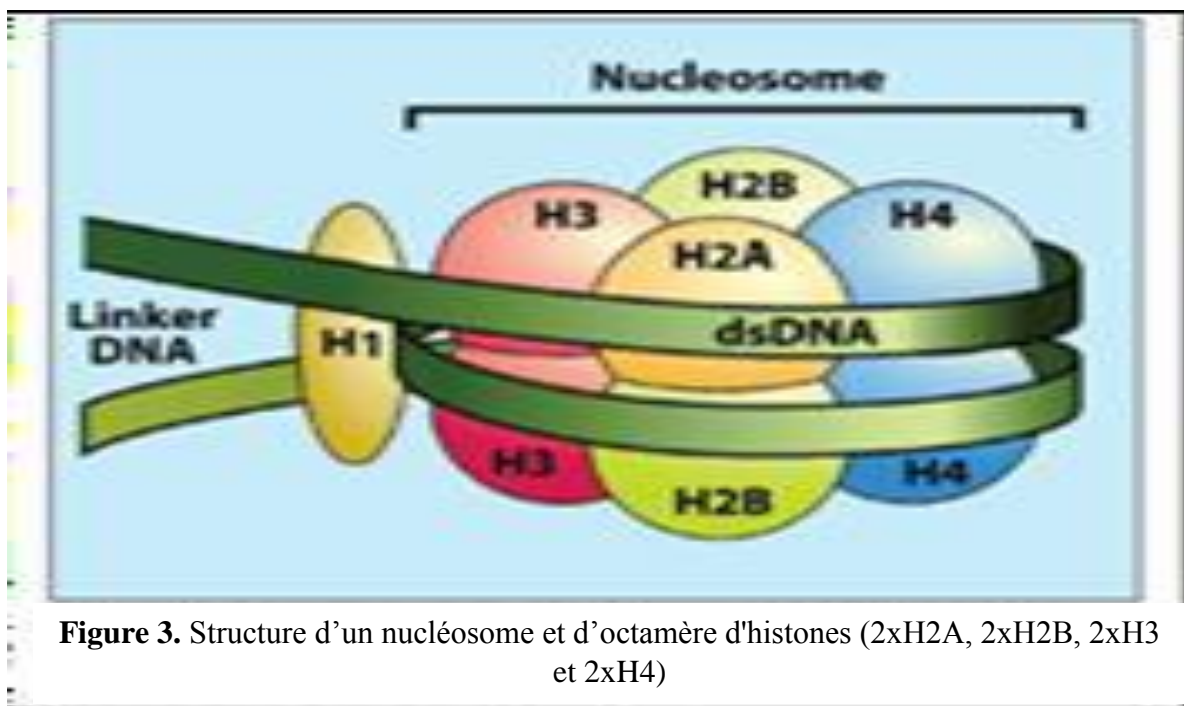
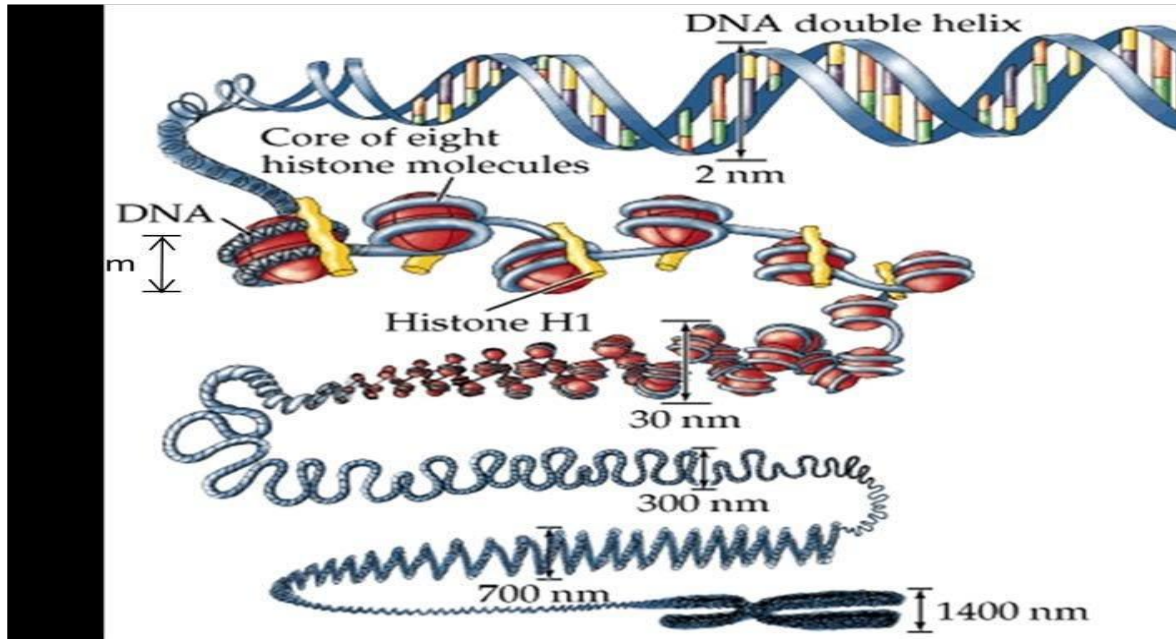
## II.2.8. La chromatine

La chromatine intervient lors de la division et la croissance cellulaire. Elle se présente sous MET sous deux aspects :

**L'euchromatine** : une chromatine décondensée, qui correspond à la fraction des gènes actifs (bandes q et g sur le chromosome).

**L'hétérochromatine** : une chromatine très compactée, en général au niveau des centromères et qui correspond à la fraction inactive pour la transcription. Peut-être constitutive (stable, les bandes C) ou facultative.

## II.2.9. Le nucléosome



**Figure 3.** Structure d'un nucléosome et d'octamère d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4)



L'ADN a besoin d'être protégé par des protéines lorsqu'il n'est pas utilisé comme modèle pour l'expression des gènes ou la réplication.

Le nucléosome (structure de base de la chromatine) est constitué d'un octamère d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4) autour duquel s'enroule la molécule d'ADN (1,7 tour autour de chaque nucléosome, soit 146 paires de bases). Entre deux nucléosomes successifs, on trouve une portion d'ADN « linker » de 200 pb environ chez les organismes supérieurs. La molécule d'ADN est liée aux histones par ses groupements Phosphate (environ une liaison tous les deux tours et demi d'hélice). Une cinquième histone, l'Histone H1, stabilise l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome où elle joue le rôle de socle.

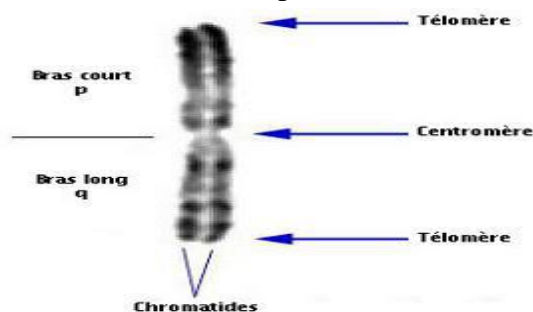
## II.2.10. Le chromosome

Le chromosome et la chromatine sont deux états morphologiques différents d'un même matériel génétique. Au cours de la mitose la chromatine se condense de plus en plus et de façon plus complexe grâce à la participation de protéines acides. La fibre solénoïde constitue des boucles qui se condensent de plus en plus pour atteindre le maximum au cours de la métaphase. A ce stade, le chromosome est 50 000 fois plus court que la molécule d'ADN déroulée.

### ➤ Morphologie du chromosome

Lorsque la cellule ne se divise pas, le noyau apparaît comme un réseau de filaments enchevêtrés auquel Flemming (1879) a donné le nom de chromatine.

La structure des chromosomes est plus visible pendant certaines phases de division cellulaire lorsqu'ils sont fortement compactés (Métaphase). La stabilité de la taille et de la forme du chromosome de métaphase d'une cellule à l'autre d'un organisme, et d'un individu à l'autre dans une même espèce, permet d'utiliser ce stade pour définir les caractéristiques chromosomiques de l'espèce. Depuis 1970, ces dernières ont pu être précisées davantage par des techniques nouvelles de coloration (techniques du banding) qui font apparaître des bandes spécifiques (près de 300 pour les chromosomes humains) le long de tous les chromosomes. Chez les eucaryotes le chromosome est constitué de deux chromatides étroitement associées au niveau du centromère, qui constitue la constriction primaire du chromosome et correspond à la zone de fixation sur les fibres du fuseau de division.



La constriction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court et un bras long. Les extrémités des bras chromosomiques sont des régions possédant une architecture particulière sur le plan moléculaire et sont appelées télomère. Chaque chromosome peut être distingué de tous les autres par plusieurs

critères morphologiques dont la taille ordre décroissant, la position de son centromère : Les chromosomes métacentriques, les chromosomes submétacentriques, les chromosomes acrocentriques.

## II.3. Enzymes de restriction et de modification

### II.3.1. Enzymes de restriction

La découverte des enzymes de restriction signe le début de l'ère du "génie génétique". Ces enzymes, qui constituent *in vivo* un mécanisme de défense contre des molécules d'ADN étrangères, sont capables de couper la molécule d'ADN en des sites bien spécifiques.

Les enzymes de restriction sont des endonucléases spécifiques, leur utilisation permet d'obtenir des fragments d'ADN aux extrémités bien caractérisées, dont certains peuvent contenir des gènes.

#### II.3.1.1. Nomenclature des enzymes de restriction

Les trois premières lettres de chacune d'entre elle concernent :

- La première lettre du nom de genre, par exemple E (*Escherichia*)
- Les deux premières lettres du nom de l'espèce, par exemple co (*coli*).
- La quatrième concerne la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme en question.
- Le chiffre romain : indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche. HindIII signifie que c'est la troisième (III) Enzyme de restriction isolée et caractérisée de la souche bactérienne *Haemophilus influenzae* Rd.

Le site de coupure, compris dans le site de reconnaissance est représenté par une flèche verticale (tab.1), et les produits de la digestion d'un génome par les enzymes de restriction sont appelés les fragments de restriction. Selon la position de la coupure (dans l'axe ou loin de l'axe) on distingue deux types de coupure :

- Coupure franche : Dans l'axe Extrémités franches
- Coupure cohésive (collant) : N'est pas dans l'axe. Extrémités cohésives.

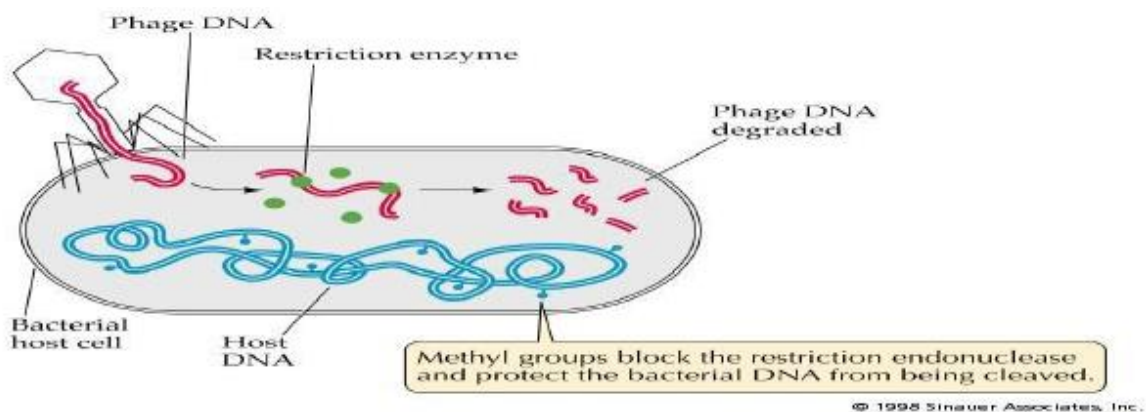
**Tableau 1.** Exemples des enzymes de restriction de type II.

Enzyme	Source Organism	Recognition Sequence
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC CTAG/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC CTAG/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CC(A or T)GG GG(T or A)CC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

N: n'importe quelle base, R: n'importe quelle purine, Y: n'importe quelle pyrimidine/  
Position de coupure.

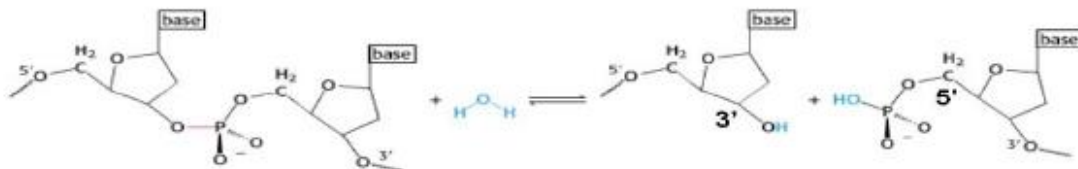
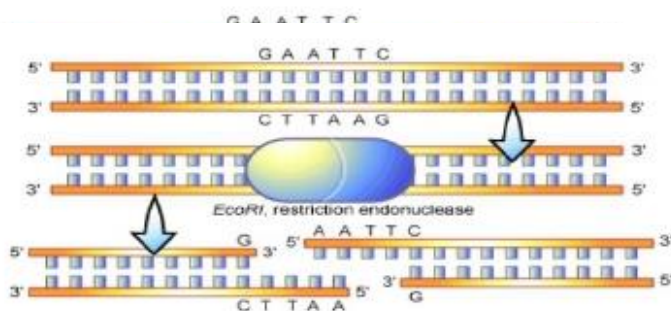
### II.3.1.2. Système de restriction méthylation

Dès 1953, on avait observé que lorsque des molécules d'ADN provenant d'une souche d'E.coli sont introduites dans une autre souche, elles ne sont que très rarement exprimées. En fait, l'ADN étranger est la plupart du temps rapidement coupé en petits fragments par une enzyme dite de restriction. Pour qu'il puisse se répliquer dans une nouvelle souche bactérienne, l'ADN introduit doit être protégé par une enzyme de modification qui ajoute des groupements méthyles à l'ADN. Donc ces enzymes participent à un mécanisme de défense des bactéries vis-à-vis des virus "système de restriction méthylation". Les endonucléases de restriction coupent l'ADN étranger à des sites spécifiques. Et afin de protéger l'ADN bactérien de l'hydrolyse par les enzymes, une méthylase, codé par le gène de méthylation, va méthyler l'ADN au niveau des sites de coupure pour qu'ils ne soient plus reconnus par l'enzyme de restriction.



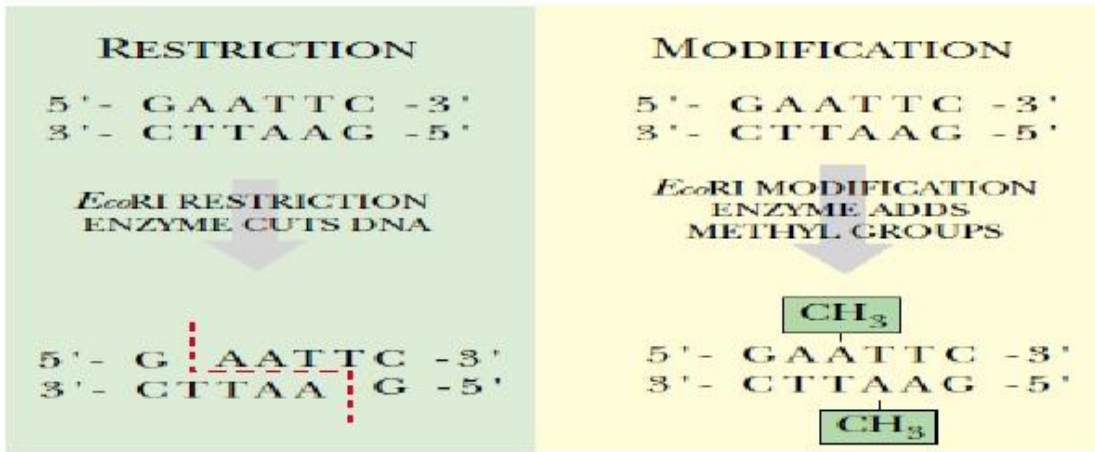
Type II:

Coupure au sein du site



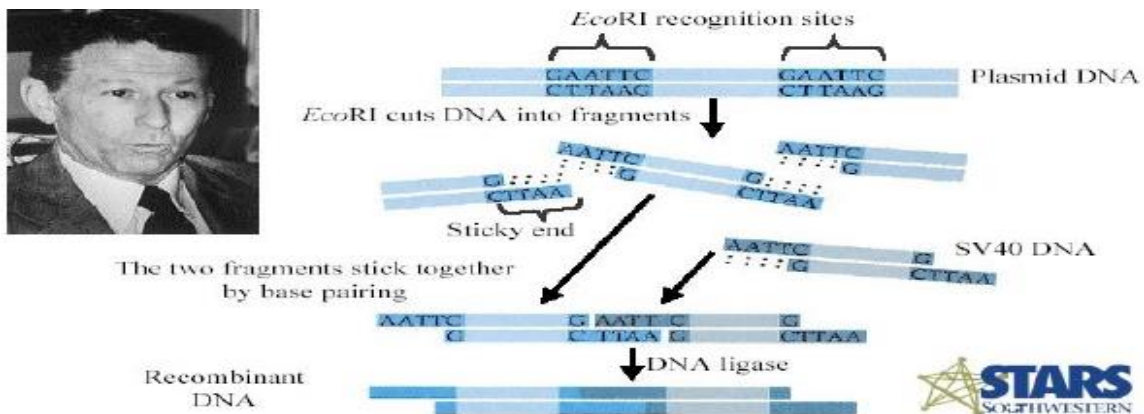
**Figure 4.** Haut : Les bactéries ont développé le système de restriction/modification pour se protéger des phages. Bas : exemple d'EcoRI, qui reconnaît la séquence 5'-GAATTC-3'. La coupure forme des extrémités 5'-P et 3'-OH.





**Figure 5.** Systèmes de restriction et de méthylation.

En 1972, L'équipe de Berg utilise l'enzyme de restriction *EcoRI* pour obtenir in vitro une molécule d'ADN hybride qui contient à la fois l'ADN d'un virus (SV40) et une forme altérée d'un bactériophage. C'est la première recombinaison génétique réalisée in vitro.



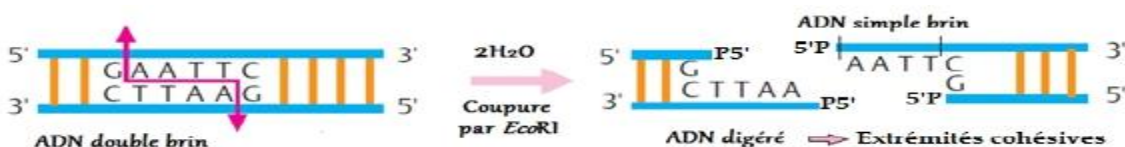
**Figure 6.** Expérience de recombinaison in vitro par Paul Berg en 1972 (simplifié).

### II.3.1.3. Enzymes de restriction utilisées en génie génétique

Les enzymes de restriction de type II sont pratiquement les plus utilisées en génie génétique, à cause de leurs propriétés de coupure et de reconnaissance.

#### Exemples d'enzymes de restriction de type II

1- **EcoRI**: C'est la deuxième enzyme caractérisée et identifiée chez *E. coli* souche R, le site de reconnaissance et de coupure est formé de six paires de bases (nucléotides). les fragments qui en résultent sont dits « à bouts cohésifs ».



**Figure 7.** Coupure de l'ADN double brin par *EcoRI*, générant des extrémités cohésives.

**2- HaeIII :** C'est la troisième enzyme de restriction caractérisée et identifiée chez la bactérie *Haemophilus aegypticus*.

Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».

La méthylation de la cytosine immédiatement en aval du site d'hydrolyse inhibe la reconnaissance du site par Hae III. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

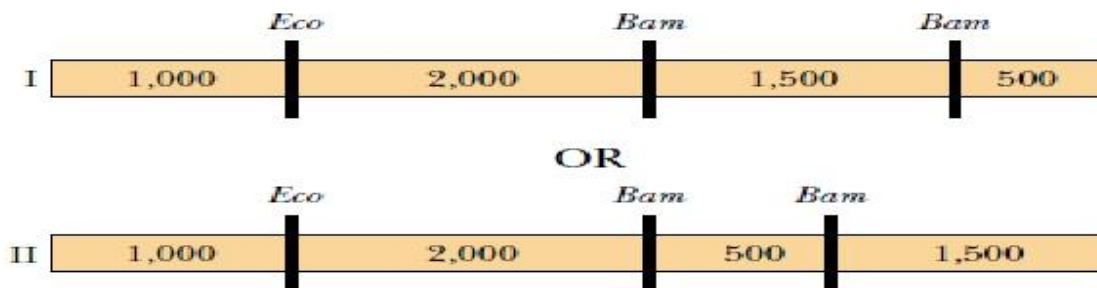


**Figure 8.** Coupure de l'ADN double brin par HaeIII, générant des extrémités franches.



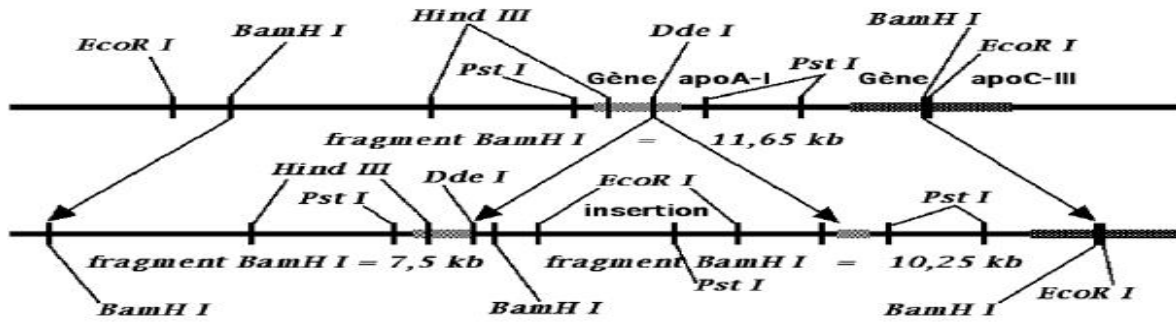
**Figure 9.** Gel d'agarose des produits de digestion d'un fragment de 5kb par deux enzymes de restriction (BamHI et EcoRI).

L'analyse des résultats de la digestion (fig. 9) nous permet de déterminer les différentes possibilités de la localisation des sites de restriction pour chaque enzyme (fig. 9 et 10).



**Figure 10.** Les différentes possibilités de localisation des sites de restriction des deux enzymes (EcoRI, et BamHI).

## Cartes de restriction



### II.3.1.4. Isoschizomères

Les différents enzymes qui reconnaissent le même site de restriction mais le coupe de manière différente sont dites isoschizomeres. Par exemple les enzymes de restrictions SmaI et XmaI reconnaissent tous les deux la même séquence de restriction : 5'-CCCGGG-3', SmaI coupe la séquence au milieu entre la C et la G alors que XmaI coupe juste après la première C de chaque brin.

### II.3.2. Enzymes de modification des acides nucléiques

#### II.3.2.1. Ribonucléases A (RNase) :

Cette hydrolase agit comme une endonucléase, préférentiellement après les nucléotides à pyrimidines (U, C). En hydrolysant la liaison entre le phosphate et le carbone 5' du nucléotide suivant. Elle hydrolyse les ARN simple brin (inactive sur l'ARN double brin) jusqu'à un mélange d'oligonucléotides se terminant tous par un nucléotide à pyrimidine estérifié par un phosphate en 3'.

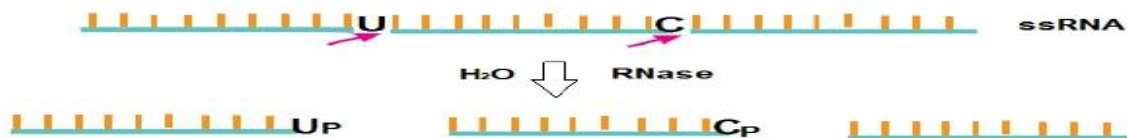


Figure 11. Digestion de l'ARN simple brin par l'RNase.

#### II.3.2.2. Désoxyribonucléase I (DNase I) :

La DNase agit sur les liaisons adjacentes aux nucléosides pyrimidiques (C, T) des ADN simple ou double brin. Elle est utilisée pour l'analyse des sites de liaison protéines –ADN. Car la protéine liée à l'ADN le protège de l'hydrolyse par cette enzyme (fig. 10). Cette enzyme est extraite du pancréas de bœuf.

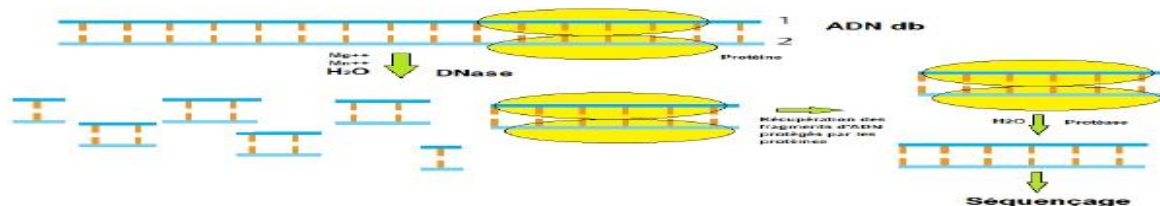


Figure 12. Détection des sites de liaison des protéines sur l'ADN par la technique de "foot printing".

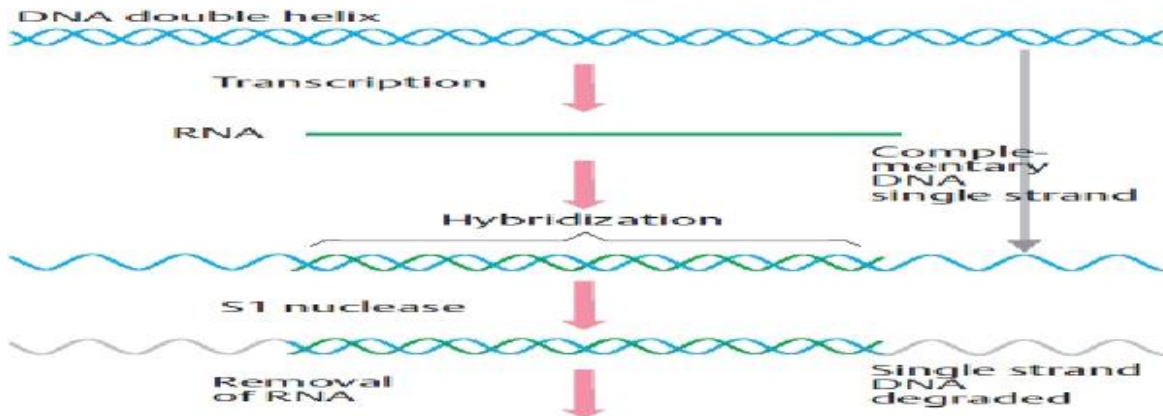
### II.3.2.3. Nucléase S1 :

La nucléase S1 est produite par le champignon *Aspergillus oryzae*, c'est une nucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin, bien qu'à des concentrations élevées elle agit sur les hybrides. Elle agit en milieu acide (pH 4-4.3) en présence d'ion Zinc ( $Zn^{++}$ ).

- Pour faire des bouts francs aux extrémités des fragments d'ADN double brin.

- Pour ouvrir les épingles à cheveux formés lors de la synthèse de l'ADNc.

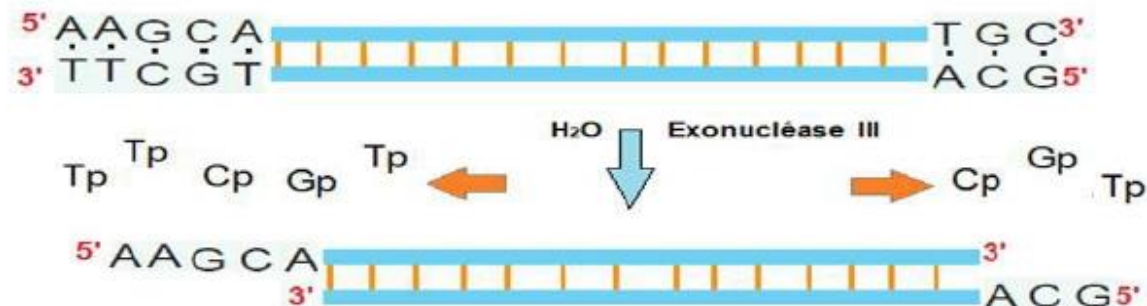
- Pour isoler des hybrides ADN/ADN, ADN/ARN, ou ARN/ARN. C'est un outil de choix pour mesurer le taux d'hybridation.



**Figure 13.** L'utilisation du nucléase S1 pour la détermination du site d'initiation de la transcription.

### II.3.2.4. Exonucléase III :

Cette enzyme produite par *E. coli*, et aussi par *Haemophilus influenzae*, au contraire de l'exonucléase de phage  $\lambda$ , hydrolyse de préférence les extrémités 3' des ADN doubles brin en remontant vers le côté 5' (3' 5' exonucléase). Elle produit des nucléotides 5'-phosphate (fig.13).



**Figure 14.** L'hydrolyse des extrémités 3' de l'ADN db par l'exonucléase III.

### II.3.2.5. ADN ligase :

La ligation entre deux molécules d'ADN par une liaison covalente entre l'extrémité 3'-OH d'un brin et celle 5'-phosphate de l'autre brin est le résultat de l'action d'une ligase. Cette réaction nécessite la consommation d'une molécule d'ATP.

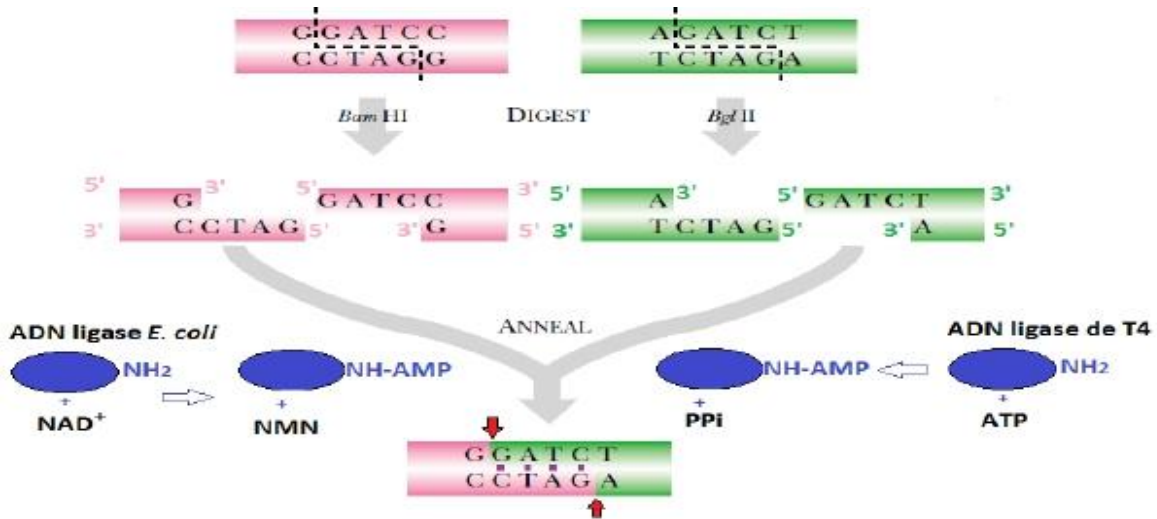
L'ADN-ligase d'*E. coli* et celle du phage T4 sont les plus utilisées en génie génétique. La quantité de l'ADN ligase nécessaire dans chaque réaction et l'activité de cette enzyme dépendent de certains nombre de facteurs :



- Nature des fragments d'ADN à ligaturer (extrémités franches ou cohésives).
- Longueur d'extrémités cohésives.
- Stabilité des liaisons hydrogène.
- La température d'incubation.
- La concentration des fragments.

**Exemple :**

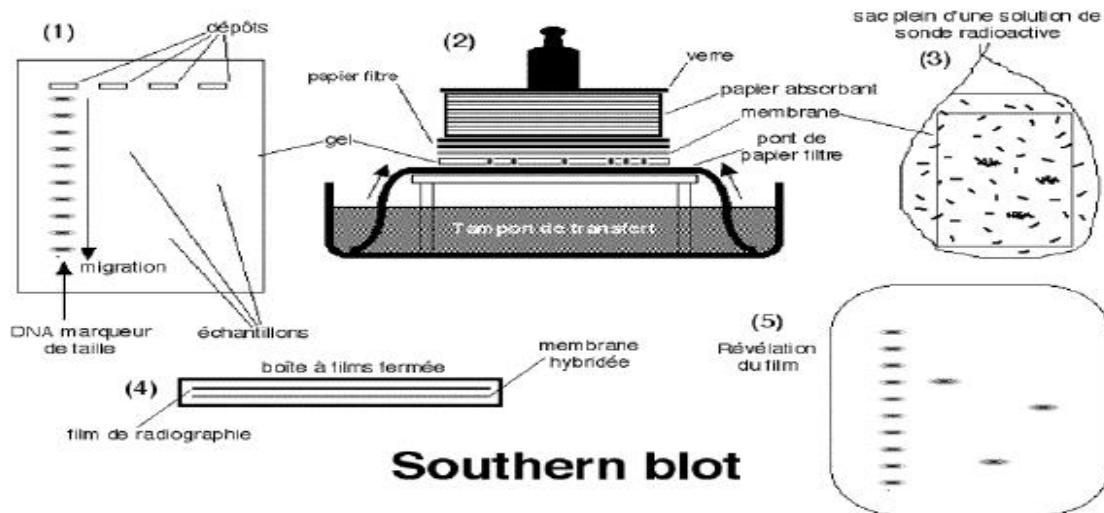
- La vitesse de ligature des fragments de restriction de pBR322, de même longueur et tous à extrémités cohésives, varie selon la séquence de ces extrémités.



**Figure 15.** L'une des modalités de l'utilisation des ligases en génie génétique (ligation des extrémités cohésives des enzymes de restriction). L'enzyme ligature les extrémités 3'-OH et 5'-phosphate. L'ADN ligase est adénylylée par NAD (*E. coli*) ou par l'ATP (phage T4). Après l'adénylylation, l'extrémité 5' phosphate favorise la formation de liaison phosphoester.

**II.4. Electrophorèse de l'ADN**

Le principe de l'électrophorèse, qui consiste à faire migrer dans un certain milieu des molécules chargées en présence d'un champ électrique, date des années trente. Cependant, elle est devenue une technique très répandue d'analyse et de séparation d'ADN (on l'utilisait initialement pour la migration de protéines) avec l'utilisation de gel d'agarose (1973). L'ADN est déposé dans un gel d'agarose en présence d'un marqueur qui devient fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN. L'ADN est attiré vers l'électrode + (phosphates chargés négativement), mais les mailles du gel d'agarose permettent de séparer les molécules en fonction de leur taille. Cette méthode permet de vérifier la taille de fragments d'ADN, et de les séparer ensuite. On peut aussi l'utiliser pour détecter la présence d'une séquence spécifique dans des fragments donnés. C'est la technique du Southern blot : Après l'électrophorèse d'ADN double brin, le gel est transféré sur une membrane et l'ADN double brin dénaturé en simple brin. Cette étape permet de fixer l'ADN sur un support solide. La réplique du gel sur la membrane est ensuite mélangée à une sonde, c'est-à-dire un simple brin d'ADN portant un marqueur (radioactif ou fluorescent). Après rinçage, seules les bandes du gel ayant intégré la séquence voulue retiennent la sonde, et on peut les révéler (par autoradiogramme ou simple photo dans le cas d'un marqueur fluorescent).



**Figure 16.** Le Southern blot est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.



**Figure 17.** Hybridation d'une sonde

## II.5. Vecteurs de clonage

La bactérie *E. coli* est la bactérie la plus utilisée en clonage moléculaire, l'ADN recombinant peut être introduit sous forme de plasmides, Phages, BAC, YAC...

### II.5.1. Plasmides

La découverte de nombreuses enzymes de restriction et la possibilité de recombiner l'ADN in vitro conduisent à l'utilisation de petites molécules circulaires d'ADN, les plasmides. C'est une très petite molécule d'ADN extranucléaire, double brin, circulaire, localisée dans le cytoplasme. Son nombre est variable selon les espèces (1 à plusieurs). Les plasmides portent des gènes utiles mais non essentiels à la croissance normale et à la division des cellules procaryotes. Ils se dupliquent indépendamment du Nucléotide.

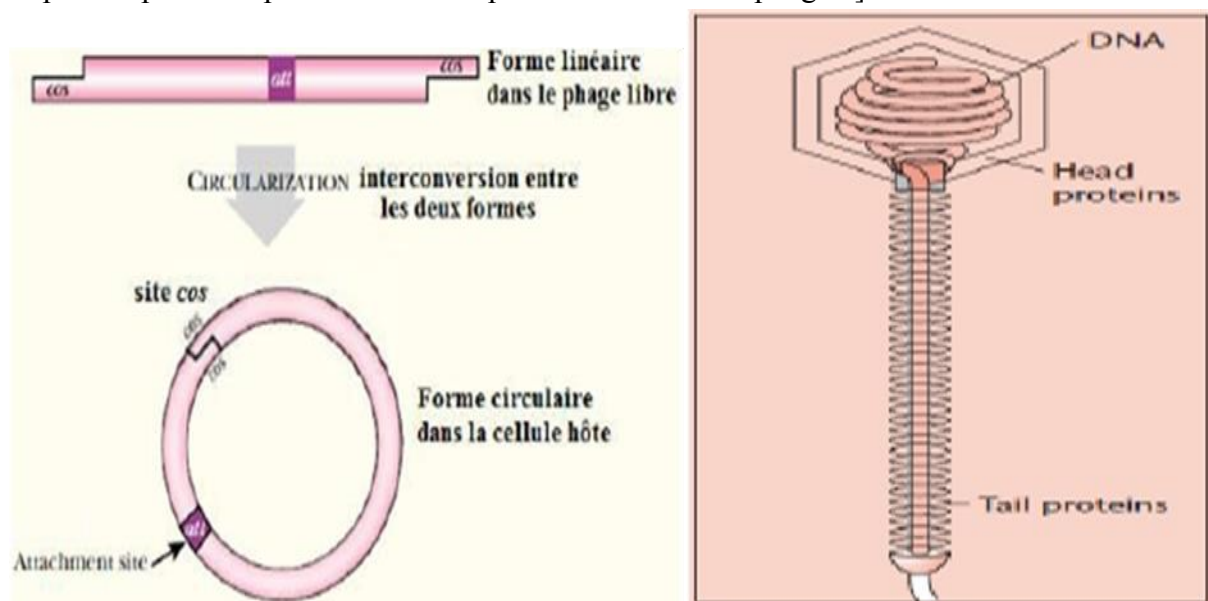
Les plasmides sont utilisés en génie génétique comme vecteurs de gènes. Des fragments d'ADN sont incorporés dans les plasmides. Ce vecteur fonctionne comme véhicule propageant le gène dans la cellule hôte, généralement une bactérie mais d'autres cellules peuvent aussi être utilisées après transfection ou transformation. Ils contiennent des gènes codants souvent pour des protéines qui donnent un ou des avantage(s) à la cellule hôte.

Comme par exemple : résistance aux antibiotiques, production de toxines, production d'antibiotiques, induction des tumeurs chez les plantes.....

Les plasmides sont de bons vecteurs de clonage chez les bactéries parce qu'ils se multiplient en nombre de copies important et qu'ils sont aisément purifiables. Les marqueurs de sélection (Ex. gènes de résistance aux antibiotiques) permettent l'identification des bactéries recombinantes (transformées) qu'ils les portent.

### II.5.2. Bactériophage $\lambda$

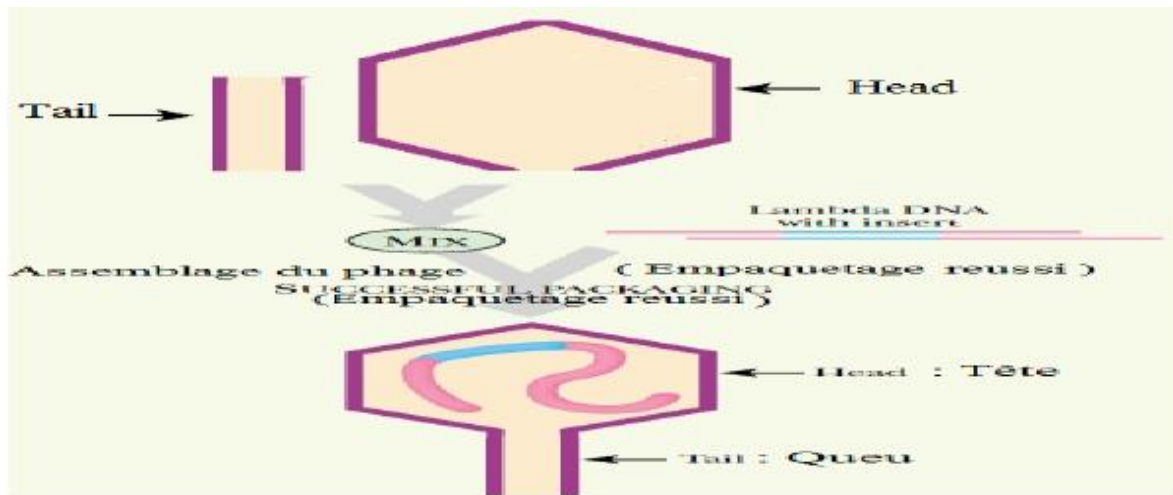
Le bactériophage  $\lambda$  a été découvert par E.M. Lederberg en 1950. C'est un virus d'*E. coli*, l'ADN de ce phage est une molécule linéaire d'ADN double brin de 48 kb. A chaque extrémité 5' se trouve une région monocaténaire de 12 nucléotides, l'une complémentaire de l'autre et leur association donne une structure circulaire à l'ADN dans la cellule hôte. L'association de ces extrémités cohésive naturelles forme le site *cos* (fig.) [*cos*: Des éléments important pour la réplication et l'encapsidation de bactériophage  $\lambda$ ].



**Figure 18.** Différentes formes du génome du bactériophage  $\lambda$ , et sa structure.

#### II.5.2.1. Principales étapes de la construction d'un vecteur phagique

- 1- Produire une grande quantité de phage, la purifier, puis en extraire son ADN génomique, qui sera digéré par une enzyme de restriction.
- 2- Hybrider les deux bras du phage avec le fragment d'ADN à cloner (ce dernier doit avoir une taille adéquate) puis souder par l'ADN ligase.
- 3- Procéder à l'encapsidation in vitro de l'ADN recombinant en ajoutant les protéines phagiques de tête et de la queue. Ces derniers ils vont s'auto assembler pour former les nouveaux virions recombinants infectieux.
- 4- Infecter des bactéries (cellules hôtes) et les étaler sur boîte de Pétri, chaque plaque de lyse correspond à un phage recombinant qui peut être récupéré.
- 5- Vérifier la présence d'un insert dans l'ADN recombinant par toute procédure appropriée (hybridation ADN-ADN, séquençage, etc.).



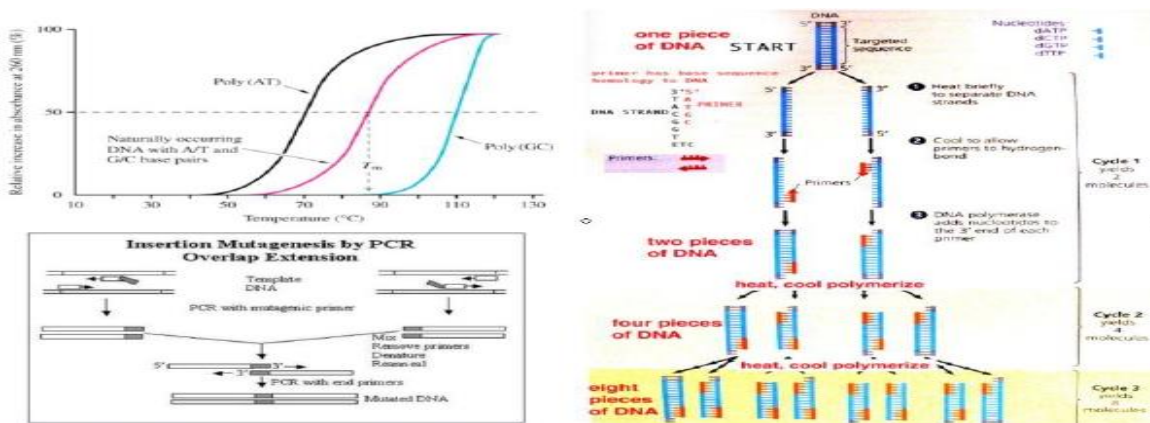
**Figure 19.** Encapsidation in vitro.

## II.6. Clonage et expression de gènes chez la bactérie

Le clonage d'un gène consiste à insérer un gène d'intérêt dans un vecteur et transformer des bactéries avec ce vecteur. Une fois inséré dans la bactérie, ce gène pourra, selon les besoins, être amplifié en vue d'un séquençage (voir plus loin), ou exprimé en vue de la production de la protéine associée à ce gène. Historiquement, les premières expériences de production de protéines humaines dans les bactéries furent des protéines d'intérêt thérapeutique comme l'insuline (1979). La production de protéines ou l'élaboration d'organismes transgéniques ne sont pas des techniques limitées aux bactéries. D'autres méthodes de transformation peuvent aussi être employées, par exemple l'utilisation de vecteurs différents des plasmides (virus modifiés, phages, cosmides, phagemides, etc).

## II.7. Amplification de l'ADN par PCR ( Polymerase chain reaction)

Depuis sa découverte en 1980 la PCR a eu des conséquences très importantes sur tous les aspects de la recherche en biologie moléculaire. En termes simples, la PCR est la réplication en chaîne d'un fragment d'ADN bicaténaire d'intérêt. L'atout de la PCR est son pouvoir à répliquer, en un temps très court un fragment d'ADN en grande quantité. Cet impact a été reconnu suite à l'attribution du prix de Nobel à son inventeur Kary Mullis en 1990.



**Figure 20.** Cycles d'amplification de l'ADN lors d'une PCR.



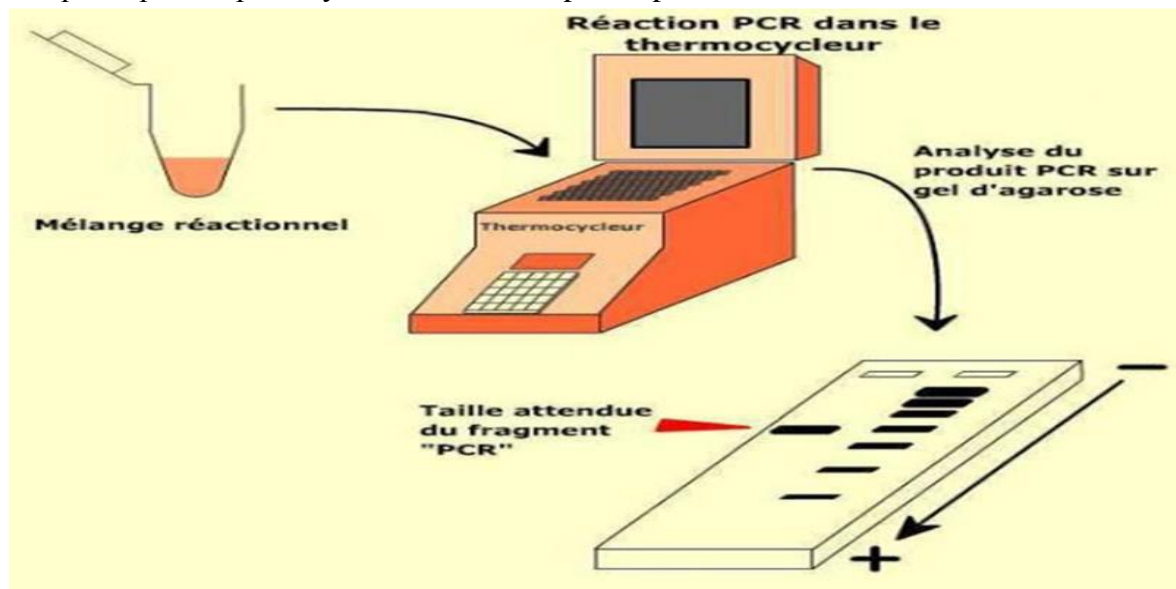
## II.7.1. Les étapes de la PCR

La PCR est constituée de trois étapes qui se différencient par la température de la réaction:

1. L'ADN doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).
2. On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces (de 17 à 30 oligonucléotides) qui vont s'hybrider à ~60°C avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de l'ADN, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
3. On soumet le tout à l'activité d'une enzyme thermo tolérante l'ADN polymérase (Taq polymérase, issue de la bactérie *Thermus aquaticus*) qui synthétise à 72°C un brin complémentaire à partir du 3'OH de l'amorce hybridée.  
- On obtient deux brins de DNA double brin.
4. On recommence à dénaturer ces 2 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 4 brins de DNA double brin.
5. On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA..

**Les amorces doivent présenter les caractéristiques suivantes :**

- 1- Une longueur de 17 à 30 nucléotides riche en GC, jusqu'à hauteur de 50%.
- 2- Une température d'hybridation déduite de la relation suivante :  $T^{\circ} = 2(A+T) + 4(G+C)$ .
- 3- Ne doit pas porter des séquences complémentaires pour éviter la formation d'épingle à cheveux comme c'est le cas de l'amorce suivante : 5'-GAGATCGATGCATCGATCT-3'.  
Ce qui ne permet pas l'hybridation et donc pas de produit de la PCR.



**Figure 21.** Réaction PCR dans le thermocycleur