

PROGRAMME DU COURS DE GENETIQUE
Chimie-Biologie-Géologie 2^{ème} année
UNIVERSITE DE COCODY ABIDJAN
LABORATOIRE DE GENETIQUE
UFR DE BIOSCIENCES

Enseignant : Dr Fougotin Hamidou COULIBALY

TABLE DES MATIERES

BASES FONDAMENTALES DE LA GENETIQUE

INTRODUCTION

1. Rappel historique
2. Sections et domaines d'application de la génétique
 - a. Sections
 - b. Domaines d'application

I – DEFINITION DE QUELQUES NOTIONS ESSENTIELLES DE LA GENETIQUE

A) Notion de reproduction conforme et variation

1. Clone cellulaire
2. Apparition de variants
3. Mutation

B) Notion de Gène et d'Allèles

C) Génotype et phénotype

D) Mutations multiples

II – NATURE, STRUCTURE ET PROPRIETES DU MATERIEL GENETIQUE

INTRODUCTION

A) Nature Chimique du matériel génétique

1. Transformation bactérienne chez le pneumocoque
 - a) Matériel d'étude
 - b) Expérience de Griffith (1928)
2. Cas de bactériophage
 - a) Matériel d'étude
 - b) Expérience de Hershey et Chase
3. Cas du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT)
 - a) Matériel d'étude
 - b) Expérience de Fraenkel-Conrat
4. Cas des organismes supérieurs

B) Structure des Acides Nucléiques

Structure de l'ADN

- a) Molécule constitutive
- b) Formation des nucléotides et poly nucléotides
- c) Structure moléculaire de l'ADN

C – Propriétés du matériel génétique

Auto-reproduction ou réplication de l'ADN

III – TRANSCRIPTION ET TRADUCTION DU MATERIEL GENETIQUE

A) Transcription de l'ARN à partir de la matrice d'ADN

1. ARN intermédiaire entre l'ADN et la protéine
2. ARN chimiquement voisin de l'ADN
3. Synthèse enzymatique de l'ARN sur les matrices de l'ADN
4. Direction de la synthèse des chaînes d'ARN
5. Initiation et arrêt de la synthèse de la molécule d'ARN
6. Maturation de l'ARN messenger

B) Code génétique

1. Taille du codon
2. Disposition des Bases
3. Déchiffrage du code génétique
4. Hypothèse de flexibilité ou « Wobble »
5. Codon non-sens et codon d'initiation
6. Universalité du code génétique

C) Traduction de l'information génétique en protéine

1. Structure et propriétés des ARN
2. Charge de l'ARNt
3. Les ribosomes
4. Initiation de la traduction
5. Elongation de la chaîne polypeptidique
6. Terminaison
7. Sens de lecture

IV – LA MUTATION

A) Mise en évidence et sélection des mutations

1. Chez les microorganismes

- a) Cas des champignons Ascomycète : Neurospora crassa
- b) Cas des bactéries
- c) Cas des virus

2. Chez les organismes supérieurs

B) Bases moléculaires des mutations

A l'échelle nucléotidique

- a) Substitution
- b) Mutation par inversion
- c) Mutation par insertion

C – Mutations spontanées et mutations induites

1. Mutations spontanées

2. Mutations induites

- a) Les agents physiques
- b) Les agents alkylants

CONCLUSION

Université de Cocody (Abidjan)

BASES FONDAMENTALES DE LA GENETIQUE

INTRODUCTION

1. Définitions

La génétique est la science de l'hérédité et de la variation chez les êtres vivants. Elle étudie la nature, l'expression, le fonctionnement, la transmission et les modifications de l'information génétique héréditaire qui caractérise les organismes vivants. L'hérédité est la transmission des caractères des ascendants aux descendants. Un caractère est donc héréditaire s'il peut se transmettre d'une génération à la suivante au cours de la reproduction sexuée.

2. Rappel historique

Les premiers travaux sur l'hérédité ont démarré avec **Pythagore de Samos** vers 490 avant JC. Pour Pythagore, c'est le sperme qui se coagule en embryon et ce n'est qu'au cours de la gestation que le fœtus reçoit les influences maternelles.

Pour **Aristote** (384 à 322 avant JC), le sperme était du sang hautement purifié qui contient la forme et la force du fœtus tandis que le sang menstruel purifié fournirait les matériaux requis pour la formation.

Pour **Empedocle** d'Agrigente (484 à 424 avant JC), l'embryon est constitué par un mélange des deux spermes dans l'utérus.

Ces théories restaient en vigueur jusqu'au XVIIIème siècle avec l'avènement de **Johan Gregor Mendel**. En 1865, Mendel établit les fondements de la génétique moderne. Il a pu donner une explication aux ressemblances entre parents et descendants et la réapparition des caractères ancestraux apparemment perdus. Mais les travaux de Mendel n'ont pas pu retenir l'attention des biologistes de l'époque qui n'avaient pas saisi leur importance.

En 1900, **Erich Tshermark** en Autriche, **Hugo de Vries** en Hollande et **Carl Correns** en Allemagne, redécouvrirent indépendamment les lois élémentaires de Mendel. A cette époque, la biologie moléculaire connaît un essor important, ce qui a permis de reconnaître les chromosomes comme support du matériel génétique. De plus, la biologie moléculaire a permis de donner une signification à la mitose et à la méiose qui sont deux formes de division cellulaire importantes pour les généticiens.

En 1902, **William Bateson** (biologiste britannique), **William Saunders** (canadien) et **Lucien Cuenot** (1^{er} généticien français) ont montré que les lois de Mendel qui portaient sur les végétaux (le pois) pouvaient s'appliquer au règne animal.

A cette même date, **Heinrich T. Boveri**, **Walter Sutton** et **Eduard Adolf Strasburger** firent une synthèse des connaissances acquises en cytologie et en génétique et démontrèrent l'existence d'une correspondance parfaite entre le comportement des facteurs

mendéliens au cours des générations et celui des chromosomes. Ils jetèrent ainsi les bases de la théorie chromosomique de l'hérédité et créèrent en même temps la cytogénétique.

En 1903, **Sutton** postula un peu sur les gènes localisés sur les chromosomes.

En 1910, **Thomas Hunt Morgan** (généticien américain) annonçait la découverte des facteurs liés au sexe grâce à ses études sur la drosophile (*Drosophila melanogaster*)



Drosophila melanogaster



En 1911, Morgan déclara que le phénomène de l'hérédité lié au sexe pouvait être expliqué en supposant que les gènes en cause étaient situés sur des chromosomes qui étaient liés au sexe. La théorie chromosomique de l'hérédité venait ainsi d'être consacrée de façon définitive avec les auteurs comme **Morgan, Alfred H. Sturtevant, Muller** et **Calvin Bridges**.

En 1958, **Matthew Stanley Meselson** et **Franklin W. Stahl** en étudiant les bactéries, ont montré la répllication semi-conservatrice de l'ADN. Depuis cette date, le développement de la génétique par la biologie moléculaire continue de progresser.

3. Sections et domaines d'application de la génétique

a) Sections

La génétique peut être subdivisée en trois sections fondamentales :

La génétique moléculaire ou biologie moléculaire englobe l'étude de la nature, de l'expression, de la transmission et des modifications générales de l'information génétique au niveau cellulaire. Elle analyse en particulier le mode d'action des gènes du point de vue biochimique et moléculaire au niveau de la cellule.

La génétique formelle qui étudie les règles statistiques de la transmission de l'information génétique à travers la reproduction sexuée. Elle a été initiée par Mendel et est appelée de ce fait génétique Mendélienne. C'est une étude qui se fait au niveau de l'individu.

La génétique des populations qui étudie les conséquences des règles de transmission des caractères héréditaires et la répartition des informations génétiques au niveau de la population.

A coté de ces trois sections, on peut ajouter la **génétique humaine** qui étudie tous les aspects de la génétique uniquement chez l'homme et la **génétique médicale** qui s'occupe de l'étude de certaines affections pathologiques héréditaires.

b) Domaines d'applications de la génétique

Les connaissances acquises en génétique sont utilisées dans les domaines comme la production végétale et animale. En effet, grâce à la génétique, on fait de l'amélioration des plantes et de l'amélioration des races animales. On procède alors à la création, à la sélection des individus qui intéressent le consommateur, l'agriculture ou l'éleveur.

Exemple de plantes améliorées en Côte d'Ivoire : café, cacao, palmier à l'huile, cocotier.
Ailleurs dans le monde : blé, riz, mouton, cheval, maïs, etc.

Exemples d'espèces animales améliorées en Côte d'Ivoire : poulet, porc, lapin, etc.
Ailleurs dans le monde : vache, chèvre, mouton, maïs, etc.

On peut citer comme domaine d'application de la génétique :

- **La médecine** : en effet grâce à la connaissance du mode d'action des gènes responsables de certaines affections pathologiques héréditaires, des traitements adéquats ont pu être apportés. Exemple : la drépanocytose (anémie falciforme), thalassémies, etc.
- **L'industrie alimentaire** : par exemple on peut modifier génétiquement certaines levures qui entrent dans l'industrie alimentaire. Exemple : la levure de boulangerie.
- **Le génie génétique** : c'est une spécialité de la génétique qui s'occupe de transférer artificiellement le matériel génétique c'est-à-dire l'ADN d'une espèce à une autre pour le multiplier ou améliorer l'hérédité de certains individus ou de certaines populations. Cela peut se faire aussi bien chez les plantes que chez les animaux voire même chez l'homme.

La génétique moléculaire a rendu les gènes des organismes les plus complexes accessibles à l'analyse. Elle a ainsi permis de déchiffrer la programmation des êtres vivants normaux et pathologiques.

La médecine est la plus grande bénéficiaire des retombées de la génétique moléculaire. En effet, le génie génétique permet la fabrication industrielle de protéines humaines d'intérêt thérapeutique.

Exemple : insuline, interféron, hormones de croissances, etc.

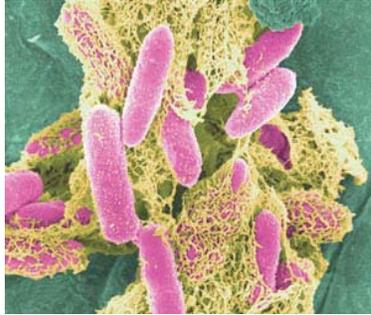
La génétique moléculaire permet d'établir également avec précision l'identité et la filiation des individus en utilisant les empreintes génétiques ou **test d'ADN**. Cette application du génie génétique est particulièrement utile dans la médecine légale et dans la police.

I) DEFINITION DE QUELQUES NOTIONS ESSENTIELLES DE GENETIQUE

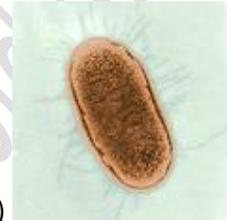
A. NOTION DE REPRODUCTION CONFORME ET VARIATION

1. Clone cellulaire

La bactérie Escherichia coli est un organisme unicellulaire dont la structure et le mode de reproduction sont relativement simples. Sa taille réduite et sa vitesse de division permettent d'obtenir un grand nombre de cellules filles en un temps très court.



Escherichia coli (Gx15000) (source : Dan Krotz)



Chez les microorganismes cellulaires on utilise certains caractères physiologiques faciles à cribler pour suivre leur évolution au cours des générations successives.

Exemples de caractère :

-La sensibilité ou la résistance à des antibiotiques.

Un tel caractère permet de suivre le comportement d'une souche donnée dans un milieu de culture.

-La capacité ou non de métaboliser une substance chimique donnée dans le milieu de culture.

Cet autre caractère permet de suivre également le comportement d'une souche donnée dans le milieu de culture.

Remarque :

Un milieu de culture de laboratoire comprend nécessairement :

- une source de carbone qui est généralement du sucre (saccharose, lactose, maltose...)
- une source d'azote
- des sels minéraux

Un tel milieu est dit **milieu minimum**. Pour la croissance de certaines souches, ce milieu minimum peut être complété par des vitamines et des acides aminés. Un tel milieu complété est dit **milieu complet**.

Dans un milieu de culture donné, la croissance se fait par division successives et au bout d'un certain temps, on obtient un ensemble de cellules filles identiques entre elles et identique à la cellule mère. Cet ensemble de cellules est appelé **clone cellulaire** et est obtenu par **reproduction conforme** c'est-à-dire par division **homéotypique** ou par **mitose**.

On peut isoler ces cellules par étalement sur un milieu de culture solide dans une boîte de pétri. Chacune de ces cellules donne naissance à une colonie. Il s'agit là d'un **sous-clone** analogue, quant à ses caractéristiques, au clone de départ.

En dehors du clonage des cellules .On peut aussi cloner chez les organismes supérieurs notamment chez les végétaux, les bourgeons, les fragments de tige, les tubercules, les rhizomes. Aujourd'hui avec le développement de la biologie moléculaire ou génie génétique, la notion de clonage s'étend à la multiplication d'un gène donné en plusieurs exemplaires dans un microorganisme appelé **vecteur de clonage**. C'est le cas des plasmides dans les bactéries utilisées comme vecteurs de clonage. **Donc cloner signifie reproduire à l'identique en très grand nombre**. Le clonage est donc une reproduction conforme car tous les individus issus du clonage se ressemblent et ressemblent à l'entité initialement soumise au clonage.

2. Apparition de variants

L'apparition de variants dépend de l'effectif des descendants analysés.

Si on prend une souche de bactéries présentant les deux caractères qui sont :

°la sensibilité à la streptomycine notée (**St^s**)

°l'incapacité à métaboliser le lactose (**Lac-**)

Une cellule de cette lignée est prélevée et mise en culture dans un milieu nutritif liquide sans streptomycine et sans lactose comme source de carbone.

- **Effectif peu élevé** : si l'on prélève à partir d'une des colonies obtenues par étalement, des échantillons d'environ 1000 cellules chacun, on peut étaler :
 - -le premier échantillon sur un milieu nutritif + streptomycine.
 - -Le deuxième échantillon peut être étalé sur un milieu nutritif + du lactose.
- Le résultat est qu'aucune colonie n'apparaît ou ne se développe sur aucun des deux milieux. Cela suppose que toutes les cellules étalées ont soit été tuées par la streptomycine ou n'ont pas utilisé le lactose pour se développer.
- Elles ont donc toutes gardé les caractéristiques de la cellule-mère qui était donc **St^s** c'est-à-dire sensible à la streptomycine et incapable d'utiliser le lactose (**lac-**)

- **Effectif très élevé** : si on transfère le reste de la colonie dans un tube à essai contenant du milieu nutritif de la culture originelle, la croissance va se poursuivre et on obtiendra plusieurs millions de cellules issues de la cellule-mère.
- On prélève alors deux échantillon représentant chacun environ 10^8 cellules et on les étale à nouveaux sur les deux milieux sélectifs précédent c'est-à-dire :
 - milieu nutritif + streptomycine et
 - milieu nutritif + lactose
- Dans ces conditions, on observe l'apparition de quelques colonies sur chaque milieu. Ceci indique que parmi les 10^8 cellules étalées sur le milieu de culture + streptomycine, quelques unes ne sont plus sensibles à l'antibiotique. Elles ont acquis le caractère de **résistance** à la streptomycine symbolisé par **St^r**.
- chaque cellule **St^r** est à l'origine d'une colonie, cela signifie que lorsqu'elle se divise, elle donne naissance à des cellules filles qui ont conservé le nouveau caractère **St^r** et le transmettent directement à leur descendance.

Il a été montré expérimentalement que ce changement de caractère se produit de manière fortuite. Il n'est pas induit par le milieu sélectif. **On dit qu'il y a eu préadaptation.** On observe le même résultat pour les colonies apparues sur le milieu nutritif + lactose. Les cellules résistantes à la streptomycine et celles qui sont capables de métaboliser le lactose nouvellement apparues sont appelées **variantes** ou **mutantes** ; ces variants transmettent la nouvelle propriété à tous leurs descendants.

Conclusion

Un caractère se transmet identique de génération en génération de manière conforme. Quelques fois il est susceptible d'y avoir de **rares** changements. L'apparition aléatoire de variants montre qu'il existe très rarement des accidents de la reproduction conforme de l'information génétique cellulaire. Les accidents appelés mutations sont héréditaires et se produisent de manière **fortuite**.

3. Mutation

Une mutation se manifeste donc par l'apparition brusque d'un nouveau caractère dans une population d'individus tous identiques. C'est une modification au niveau du matériel génétique qui se traduit par des changements de caractères qui sont transmis de génération en génération. Les mutations sont des événements **rares**. En effet, dans l'exemple précédent nous avons vu qu'il fallait analyser près de 10^8 cellules bactériennes pour observer quelques cellules mutantes. A partir d'une souche St^s , on a abouti à une colonie St^r . Si on isole les sous-clone St^r mutés et qu'on les laisse se multiplier en milieu nutritif favorable c'est-à-dire sans streptomycine, on observe quelques fois des retours au caractère d'origine. Cette reacquisition du caractère d'origine se fait également par mutation qui apparaît brusquement et qui est aussi héréditaire : $St^s \dots St^r$

On désigne ce retour du caractère muté à sa forme d'origine par **mutation reverse** ou **réversion**. Une mutation peut donc se produire dans les deux sens à partir d'un caractère donné : $St^s \dots St^r$

B. NOTION DE GENE ET D'ALLELE

Le matériel génétique d'une bactérie ou d'un organisme peut subir diverses mutations. Il peut être divisé en un certain nombre d'unités. Chaque unité ayant une fonction bien précise est impliquée dans l'expression d'un caractère. La mutation la plus souvent qu'une seule de ces unités à la fois. Elle est alors modifiée et cela se traduit par un changement de caractère qu'elle contrôle. Les unités héréditaires d'information sont appelées **gènes**.

Le gène correspond à la fois à la plus petite unité du matériel génétique responsable d'un caractère donné. L'ensemble de ces unités d'information ou gènes constitue le **génome** de la cellule. Cet ensemble est fidèlement reproduit dans chacune des cellules filles lors de la division cellulaire. Le fait qu'une mutation soit réversible montre qu'elle n'aboutit pas à la perte de l'unité fonctionnelle ou gène mais à un changement de sa structure ou de son état.

Un gène peut donc exister sous plusieurs états appelés formes alléliques. L'**allèle** est donc un état donné du gène. Exemple : **Sts** et **Str** sont deux formes alléliques du gène **St** responsable du comportement de la bactérie en présence de streptomycine.

C. GENOTYPE ET PHENOTYPE

Chez Escherichia coli on a dénombré environ 2000 unités fonctionnelles ou gènes. Chaque gène peut se trouver sous plusieurs formes alléliques. Exemple : Sts/Str , $Lac+/Lac-$, $Trp+/Trp-$. En prenant en compte tous les gènes, on peut avoir un grand nombre de combinaisons alléliques. On peut avoir une colonie $St^sLac-Trp^-$, $St^sLac+Trp^+$, $St^sLac^+Trp^-$, etc.

On appelle **génotype** d'un individu l'ensemble des combinaisons alléliques des gènes portés par cet individu. Ces combinaisons alléliques peuvent être révélées par une analyse génétique ou moléculaire.

On appelle **phénotype** l'ensemble des caractères effectivement exprimés par l'individu considéré. Ces caractères peuvent être de nature morphologique, physiologique, biochimique etc. Exemple : lorsqu'on met une colonie donnée à croître dans un milieu nutritif, le caractère exprimé c'est la croissance ou la non croissance de la colonie dans le milieu. Le phénotype dans ce cas c'est la croissance ou la non croissance ;

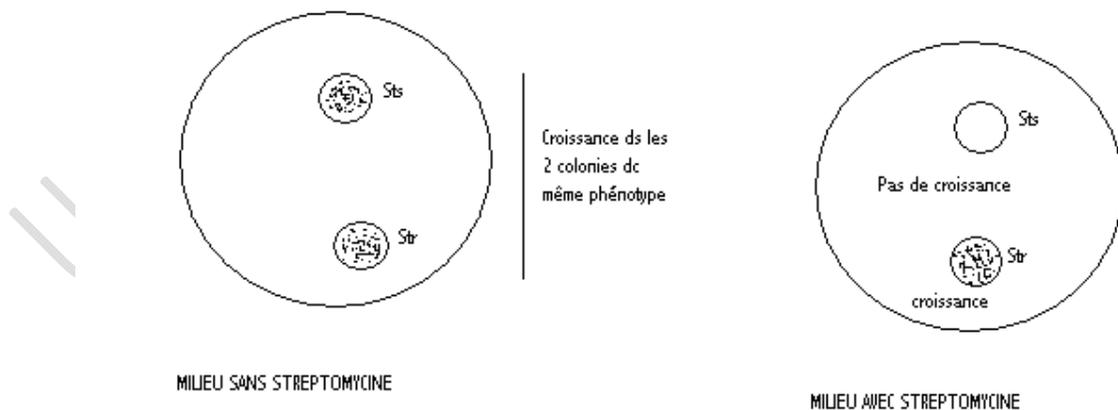
Le phénotype ne correspond pas toujours au génotype. En effet, des génotypes différents peuvent avoir le même phénotype dans certaines conditions. Exemple :

Sur un milieu nutritif sans streptomycine, les bactéries Sts et St^r se multiplient normalement, il y a croissance au niveau des deux alors qu'elles n'ont pas le même génotype.

Sur le milieu avec de la streptomycine, la bactérie St^s ne croît pas alors que la bactérie St^r croît normalement. Dans ce cas génotype et phénotypes coïncident.

Génotype et Phénotype ne coïncident pas : Impossible de les distinguer

Génotype et Phénotype coïncident : Phénotypes différents





Boite de Pétri

Certaines souches d'Escherichia coli peuvent se développer sur un milieu dépourvu de Tryptophane, grâce au tryptophane contenu dans les protéines synthétisées par ces bactéries. La synthèse du tryptophane se fait à partir des substances carbonées et azotées du milieu. La bactérie est dite **prototrophe** pour le Tryptophane et est notée : **Trp+**. On peut sélectionner des clones dont les bactéries sont **auxotrophes** pour le Tryptophane et notée **Trp-** et sont considérés comme ayant perdu l'aptitude à faire la synthèse du Tryptophane.

On peut déceler le génotype Trp+ et Trp- que lorsque les bactéries sont placées dans un milieu sans tryptophane. Cependant, on a remarqué que parmi les souches se comportant comme Trp- à 100° C, il y a en qui se développent à 25° sur un milieu sans Tryptophane. L'expression du génotype Trp- varie donc selon les conditions extérieures de température. Le phénotype ici dépend donc à la fois du génotype et du milieu. Par contre le génotype n'est pas influencé par le milieu et constitue un caractère absolu de la souche.

D. MUTATIONS MULTIPLES

Une souche d'Escherichia coli Trp+ pousse sur un milieu sans Tryptophane. Si en ajoutant de la streptomycine dans le milieu, la croissance des bactéries s'arrête, cette souche est également Sts, son génotype est alors Trp+Sts. On peut voir apparaître sur un tel milieu des bactéries capables de se développer. Elles sont apparues par mutation, leur génotype est donc Trp+Str. Par mutation cette souche peut devenir auxotrophe et avoir comme génotype Trp-Str. Des différences multiples peuvent donc s'accumuler par mutation dans le génotype. Chez Escherichia coli, on connaît plus de 150 caractères modifiés dans diverses souches mutantes. En général, chaque type de mutation intervient indépendamment des autres. Dans une souche sauvage, plusieurs centaines de gènes participent à l'élaboration d'un phénotype observé dans un milieu donné. C'est l'apparition sous sa forme mutée qui révèle l'existence du gène intervenant dans la réalisation de ce caractère.

Remarque :

Métaboliser signifie transformer une macromolécule en molécules plus simples qui peuvent être utilisées directement par la cellule. Exemples : le lactose, le saccharose, etc.

Dans un milieu plus lactose, la souche Lac- ne se développe pas par contre la souche Lac+ se développe parce qu'elle est capable de métaboliser le lactose pour utiliser son carbone. Dans un milieu sans lactose, la souche Lac- se développe ainsi que la souche Lac+

Synthétiser c'est fabriquer l'élément qui manque à partir des éléments du milieu de culture. Dans un milieu plus Tryptophane, la souche Trp- se développe ainsi que la souche Trp+ ; dans un milieu sans tryptophane, la souche Trp- ne se développe pas tandis que la souche Trp+ se développe.

II) NATURE, STRUCTURE ET PROPRIETES DU MATERIEL GENETIQUE

INTRODUCTION

Quelles doivent être les caractéristiques du matériel génétique ?

1. Le matériel génétique doit contenir l'information nécessaire à la structure, à la fonction et à la stabilité de reproduction des cellules. Cette information est codée dans la séquence des éléments de base du matériel génétique.
2. Le matériel génétique doit pouvoir se répliquer avec précision pour qu'au cours des générations successives la même information génétique soit présente dans les cellules-filles.
3. L'information codée dans le matériel génétique doit pouvoir être décodée pour produire les molécules nécessaires à la structure et au fonctionnement des cellules. Plusieurs travaux ont montré que les acides nucléiques remplissent toutes ces conditions et sont des polymères linéaires.

A. NATURE CHIMIQUE DU MATERIEL GENETIQUE

En 1869, **Miescher** a montré à partir de noyaux de spermatozoïdes de Saumon que ces noyaux renfermeraient des substances riches en phosphore. Ce sont les nucléïnes associées à des protéïnes basiques.

En 1889, **Altman** a mis au point une technique de purification et a pu séparer les nucléïnes des protéïnes et a baptisé celles-ci **acides nucléïques**.

1929 : Phoebus Levene identifie les éléments constitutifs de l'ADN, y compris les quatre bases adénine (A), cytosine (C), la guanine (G) et thymine (T).

En 1929, on distingue alors deux types d'acides nucléïques :

- L'acide désoxyribonucléique (ADN)
- L'acide ribonucléique (ARN)

Dans le noyau, il existe donc des protéïnes, des ADN et des ARN. Lequel de ces éléments correspond au matériel génétique ?

Pour répondre à cette question, il faut isoler l'un d'entre eux et démontrer que lorsqu'il est introduit à l'état pur dans une cellule, il est capable de lui transmettre une potentialité héréditaire qu'elle ne possédait pas. Cette opération a pu être réalisée à partir d'une expérience de transformation bactérienne.

1. Transformation bactérienne chez le pneumocoque

Expérience de Griffith (1928)

a. Matériel d'étude

La bactérie *Diplococcus pneumoneae* appelée pneumocoque est un agent pathogène responsable de la pneumonie chez les mammifères. Les bactéries virulentes synthétisent une capsule composée de polysaccharides qui empêchent leur phagocytose par les défenses de l'hôte. Ces bactéries présentent une surface lisse et visqueuse et sont dites **Smooth** ou **bactérie S**.

Selon l'étude de polysaccharides, on peut distinguer plusieurs types capsulaires désignés par SI, SII, SIII, etc. Il existe des mutants sans capsule qui ne sont pas virulentes car ils peuvent être phagocytés. Ces mutants ont une surface rugueuse ou **Rough** et désignés **bactéries R**.

b. Expérience de Frederik Griffith (1928)

Griffith a injecté des suspensions de bactéries à trois lots de souris :

- Au premier lot, il injecte une suspension de bactéries R vivantes.
- Au deuxième lot, il injecte une suspension de bactéries S tuées par la chaleur
- Au troisième lot, il injecte une suspension de bactéries R vivantes et de S tuées par la chaleur.

Résultats :

Les souris des deux premiers lots ne présentaient aucun signe d'infection pneumonique. Résultat normal parce que les formes R ne sont pas virulentes et les formes S sont tuées par la chaleur. Par contre, les souris du troisième lot mouraient de pneumonie et dans le sang de ces souris mortes, on a trouvé des bactéries S vivantes. Griffith a tiré la conclusion suivante : les bactéries R ont donc été transformées en bactéries S vivantes par quelque chose provenant des bactéries S tuées par la chaleur (bactérie R vivante + bactérie S vivante \longrightarrow bactérie S vivante).

Cette expérience a été réalisée in vitro en 1933 par **Dawson et Alloway**.

Quelle est la nature de ce quelque chose qui provoquerait la transformation ?

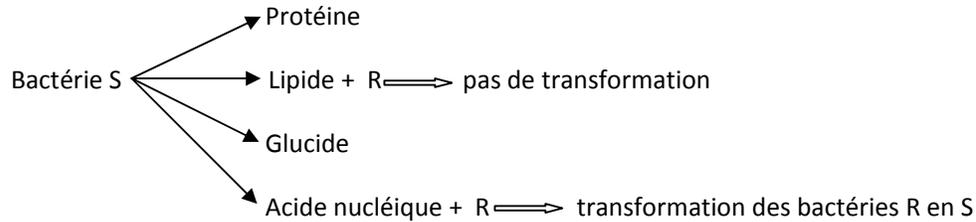
La réponse à cette importante question fût donnée par des expériences **d'Avery, MacLeod et McCarty (1944)**.

Ces auteurs ont réalisé la transformation in vitro à partir d'extrait de cellules bactériennes transformantes. Ils ont procédé à un fractionnement de la bactérie S et ont pu isoler séparément les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques. Avec les protéines, les glucides et les lipides, la transformation bactérienne n'était pas assurée. Par contre, cette transformation in vitro était possible avec les acides nucléiques. Mais il existe deux types d'acides nucléiques.

Lequel de ces deux assurerait la transformation ?

Avery et ses collaborateurs ont montré que le principe actif de la transformation était détruit par les désoxyribonucléases mais n'était pas modifié ni par les ribonucléases, ni par les

enzymes protéolytiques. Il faut savoir que les désoxyribonucléases sont des enzymes qui digèrent l'ADN tandis que les ribonucléases coupent les ARN et les enzymes protéolytiques coupent les chaînes polypeptidiques.



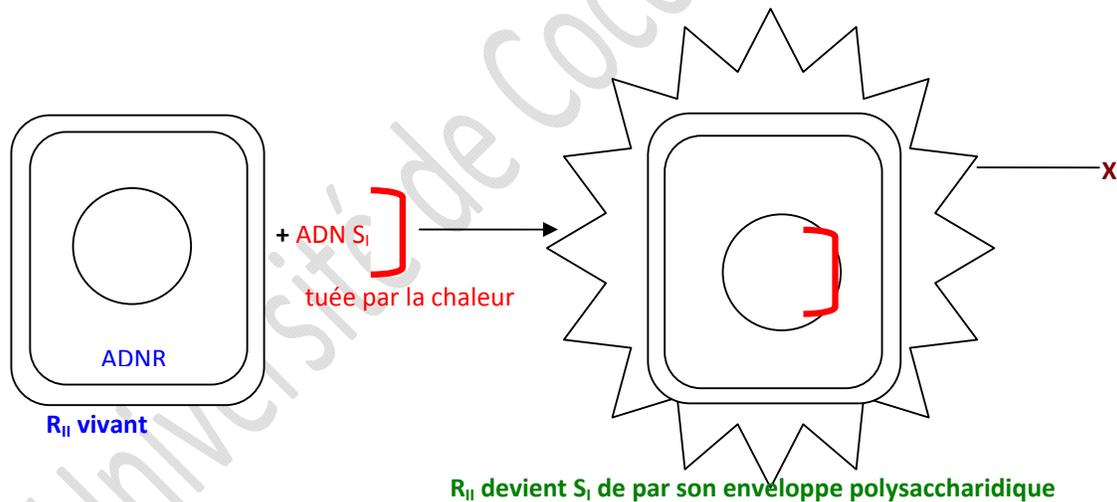
Acide nucléique----- (désoxyribonucléase) -----> perte de pouvoir transformant

Acide nucléique ----- (ribonucléase) -----> conservation du pouvoir transformant

On peut symboliser la transformation de la manière suivante :



Les ADN purs sont capables de contenir et d'apporter à une bactérie l'information nécessaire à la synthèse d'un type de polysaccharide capsulaire qu'elles ne savaient pas faire auparavant. Tout se passe comme si un gène était transféré d'une bactérie à une autre.



X : Polysaccharide : enveloppe empêchant la phagocytose.

La capacité de synthétiser les polysaccharides n'est pas le seul caractère susceptible d'être touché par la transformation. Les caractères divers peuvent être transmis de la même façon.

Synthèse des deux expériences

Expérience de Griffith

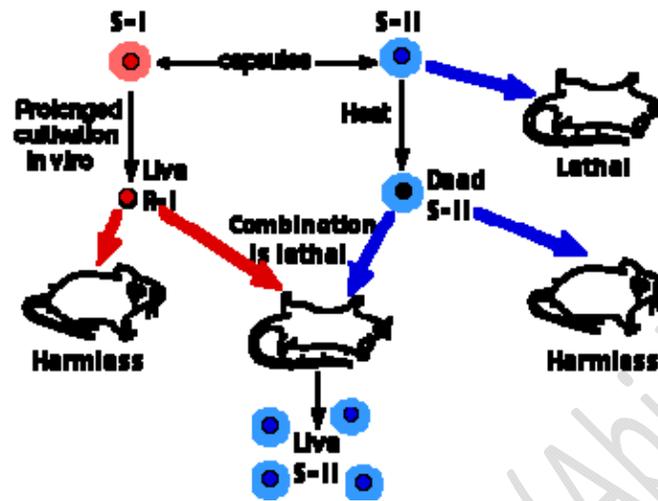


Figure 1-1. Chez le pneumocoque (agent de la pneumonie chez la souris) on connaît deux types de souches : l'une possède une capsule polysaccharidique qui donne aux cellules un aspect lisse. Cette souche est pathogène. L'autre en est dépourvue et présente un aspect rugueux, de plus elle a perdu tout pouvoir pathogène.

En cultivant une souche SI pendant longtemps in vitro, on peut en isoler une souche RI vivante non pathogène qui inoculée à une souris la laisse vivante bien qu'hébergeant la bactérie. Par contre une souche lisse SII inoculée directement à une souris induit chez celle-ci une pneumonie qui entraîne sa mort. Mais si l'on tue la bactérie SII par la chaleur et si on l'inocule alors, la souris survit parfaitement.

Griffith mélangea une fraction de culture vivante de RI vivante (non pathogène) à une fraction de SII tuée par chauffage (inoffensive) et injecta le mélange à une souris. Il fit deux constatations.

la souris mourut de pneumonie.

sa dépouille contenait des bactéries vivantes de type SII.

Il en conclut qu'un "principe transformant" était passé des bactéries mortes SII aux bactéries RI vivantes et avait transformé celles-ci en type SII vivantes.

Expérience d'Avery, MacLeod et MacCarthy

De 1928 à 1944 une technique de transformation du pneumocoque in vitro a été mise au point, ce qui permet de se passer du passage dans la souris, et simplifie l'expérience. On cultive des cellules R en présence de S tuées et on récupère des S vivantes. On refait la même expérience mais en utilisant un extrait acellulaire de cellules S : les cellules R ont été transformées. L'agent transformant est donc un agent chimique provenant de l'extrait acellulaire de S. L'intégrité physique de la cellule n'est pas indispensable pour la transformation. L'extrait acellulaire peut être fractionné, ce qui permet de démontrer que l'agent transformant est de nature macromoléculaire, qu'il n'est constitué ni de polysaccharides ni de protéines ni d'acide ribonucléique (ARN). Par contre la fraction

contenant l'acide désoxyribonucléique (ADN) est capable de réaliser la transformation. Afin d'éliminer la possibilité que cette fraction ait été contaminée par des impuretés, on prépare un extrait acellulaire que l'on répartit en trois fractions, la première est soumise à l'action des protéases qui dégradent les protéines, la seconde est soumise à l'action de l'ARNase qui dégrade l'ARN Figure 1-2. Expérience d'Avery, MacLeod et Mac Carthy et la troisième est traitée par l'ADNase qui dégrade l'ADN. Alors que les deux premières fractions sont encore capables de transformer, la troisième est dépourvue de tout pouvoir transformant.

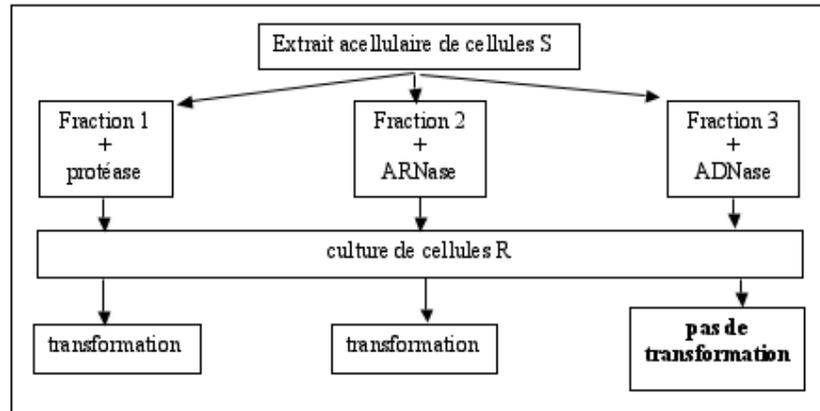


Figure 1-2 Expérience d'Avery, MacLeod et Mac Carthy

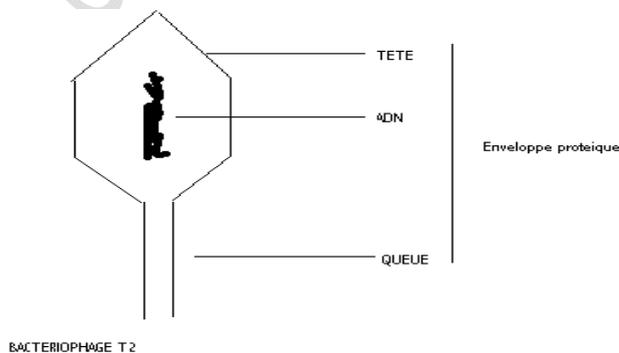
Ces expériences démontrent que l'ADN programme la synthèse des polysaccharides de la capsule. Les descendantes des cellules R transformées en S sont de type S donc l'ADN contrôle la multiplication à l'identique.

2. Cas du bactériophage

Expériences de Hershey et Chase (1952)

a. Matériel d'étude

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. Ils ne sont pas capables de se multiplier à l'intérieur des bactéries. Il existe plusieurs souches de phages qui présentent chacune des caractères bien définis. Les phages sont constitués d'une enveloppe protéique et présentent une structure particulière avec une tête ou capsid contenant l'ADN et une queue.



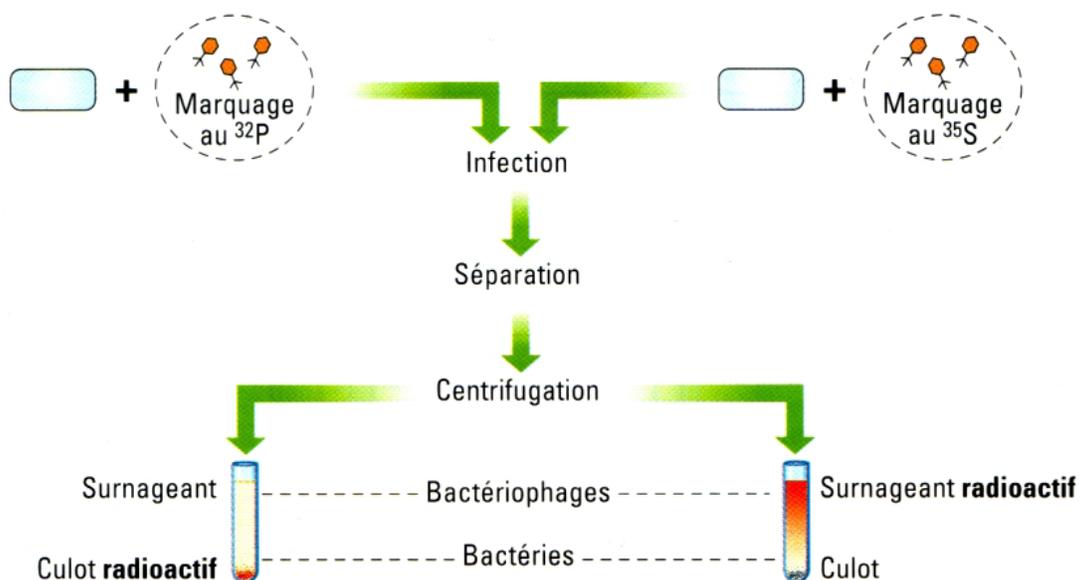
Pour se multiplier à l'intérieur de la bactérie, le phage se fixe sur la paroi de la bactérie puis pénètre à l'intérieur de celle-ci. C'est la phase d'absorption ou de pénétration suivie d'une phase d'éclipse où on n'observe rien. Au bout de quelques minutes, il apparaît un nombre de phages suite à la rupture de la paroi bactérienne. C'est la phase de lyse suivie de la libération du phage

b. Expérience de Hershey et Chase

La question est de savoir quel est le constituant du phage qui pénètre dans la bactérie et qui assure la reproduction du phage ?

Pour le savoir, Hershey et Chase ont marqué l'enveloppe protéique du phage T₂ au soufre radioactif S³⁵ et l'ADN au phosphore P³². Des phages ainsi marqués ont servi à infecter les bactéries *Escherichia coli*. Après la lyse des bactéries ; il y a la libération de particules virales filles appelées **virions** dont certaines sont marquées au phosphore P³² mais aucune n'est marquée au soufre S³⁵. Un tel résultat permet de comprendre que c'est l'ADN du phage qui pénètre dans la bactérie et sert à la reproduction du phage.

A l'intérieur de la bactérie, l'ADN du phage détourne à son profit toutes les activités de synthèse de la bactérie. Tout ceci s'explique si on admet que c'est l'ADN qui correspond au matériel génétique chez le phage



3. Cas du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT)

Expérience de Fraenkel Conrat, William et schram

a. Matériel d'étude

Le virus de la mosaïque du tabac est un virus à ARN. Là encore, on voudrait savoir lequel de l'enveloppe protéique et de l'ARN joue le rôle de porteur de l'information génétique ?

b. Expérience de Fraenkel Conrat

Fraenkel et ses collaborateurs ont pu séparer l'ARN du virus de son enveloppe protéique. Chaque élément ainsi séparé est utilisé pour infecter les plantes de tabac de même que le virus entier non fractionné

Résultats :

L'enveloppe protéique n'a pas de pouvoir infectieux. Par contre, l'inoculation de l'ARN tout seul ou d'un mélange ARN plus protéine ou de virus non fractionné provoque l'apparition de tâches jaunes sur le fond vert de la feuille. Ces zones infectées résultent de la prolifération du virus.

Tout ceci montre que c'est l'ARN du virus qui porte l'information nécessaire à l'infection des plantes de tabac. L'ARN constitue donc le matériel génétique du virus de la mosaïque du tabac. On note toutefois que le virus non fractionné a un pouvoir infectieux plus grand que l'ARN isolé.

4. Cas des organismes supérieurs

Chez les organismes supérieurs, il n'y a pas de preuve directe mais nous disposons de données qui nous permettent d'affirmer de ce point de vue qu'il n'y a pas de différence entre le pneumocoque et l'homme. C'est l'ADN qui est le support du matériel génétique chez les organismes supérieurs.

- Le matériel héréditaire est localisé sur les chromosomes. Or on sait que l'ADN colorable par le réactif de Fulgen est presque exclusivement localisé dans les chromosomes.
- Pour une espèce donnée, la quantité d'ADN est constante dans chaque cellule alors que ce n'est pas le cas pour les protéines et pour l'ARN. Cette quantité constante de l'ADN dans cellule est une propriété qu'on s'attend à retrouver au niveau du matériel génétique.
- L'ADN est le seul constituant cellulaire qui de façon rigoureuse est transmis d'une cellule mère à une cellule-fille. C'est une caractéristique essentielle que doit avoir le matériel génétique.
- Des mutations peuvent être obtenues par action des produits chimiques sur l'ADN. De telles mutations ne sont pas différentes de cellules obtenues in-vitro par l'action des mêmes produits sur les organismes supérieurs.

Conclusion :

**L'information génétique est portée par l'ADN chez tous les êtres vivants.
Exceptionnellement chez les virus sans ADN, l'ARN joue le même rôle.**

B. STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

L'analyse élémentaire des chromosomes montre qu'ils renferment de nombreux éléments chimiques en particulier l'ADN et l'ARN. Ce sont des substances qui ont des propriétés acides et qui contiennent **pour l'ADN du désoxyribose** et **pour l'ARN du ribose**. Désoxyribose et ribose sont des sucres en C₅ ou pentose. Des expériences utilisant de méthodes diverses (chimique, physique, biologique) ont permis de mettre en évidence la structure des acides nucléiques.

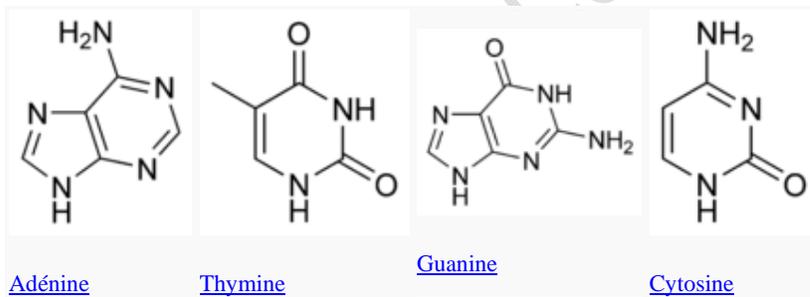
1. Structure de l'ADN

a. Molécule constitutive

Une molécule d'ADN est un polymère formé de l'enchaînement d'unités plus simples appelées **nucléotides**. Chaque nucléotide est formé d'un assemblage de trois types de molécules :

- Une molécule de sucre (désoxyribose)
- Une molécule d'acide phosphorique
- Une molécule d'une base azotée différente selon les nucléotides.

On rencontre des bases puriques (Adénine et Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine). Il existe donc quatre types possibles de nucléotides selon que la base organique est l'adénine, la guanine, la cytosine ou la thymine.



b. Formation des nucléotides et polynucléotides

Le phosphore est attaché au carbone C₅ du désoxyribose et la base au carbone C₁. La séquence des trois molécules est : **base-sucre-acide phosphorique**.

Les nucléotides sont reliés les uns aux autres par des acides phosphoriques. Une même molécule d'acide phosphorique est d'une part au C₅ d'un sucre et d'autre part C₃ d'un autre sucre part des liaisons esther -phosphates.

Dans la chaîne poly nucléotidique, le sucre et l'acide phosphorique alterne tandis que les bases sont portées latéralement par des sucres.

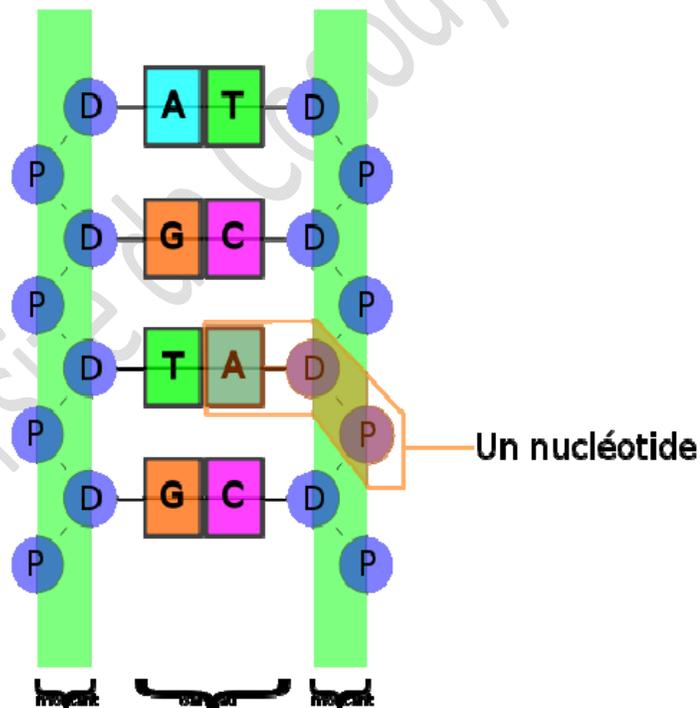
c. Structure moléculaire de l'ADN

De tous les ADN rencontrés à l'exception de ceux de certains bactériophages, les chaînes de poly nucléotides sont toujours associées par deux. Ces deux chaînes sont reliées par des liaisons hydrogènes établies entre les bases azotées. Mais l'appariement des bases se fait de telle manière qu'une purine soit en face d'une pyrimidine et plus précisément que l'adénine soit associée à la thymine et la guanine à la cytosine.

Il y a donc une contrainte totale entre les deux chaînes puisque la séquence de l'une détermine celle de l'autre. Les deux chaînes sont dites **complémentaires**. D'autre part, elles sont orientées en sens inverse c'est à dire l'extrémité phosphorylée de l'une faisant face à l'extrémité hydroxylée de l'autre. Elles sont alors dites **antiparallèles**.

5' -ATTGCCGTATGTATTGCGCT- 3'
3' -TAACGGCATAACGCGA- 5'

Le modèle de Watson et Crick: les deux chaînes enroulées en spirale forment la double hélice. Les bases sont des molécules planes. Les plateaux de paires de bases sont empilés perpendiculairement au grand axe de la molécule. Leur espacement est de 3.4 Å, le pas de l'hélice étant de 34 Å. Chaque tour comporte dix paires de nucléotides.



P	Acide Phosphorique	Adénine	A	T	Thymine	} Bases azotées complémentaires
D	Désoxyribose	Guanine	G	C	Cytosine	

Image Source : Wikimedia

2) Structure moléculaire de l'ARN

Le matériel génétique du virus de la mosaïque du tabac est l'ARN. Comme l'ADN, l'ARN est un polymère formé de l'enchaînement d'unités plus simple appelé nucléotides. Mais dans les nucléotides de l'ARN, le pentose est le ribose et les bases azotées sont l'adénine, la guanine, la cytosine et à la place de la thymine on a l'**uracile**.

L'ARN ne se présente pas obligatoirement sous forme d'une double chaîne. En effet, l'ARN ribosomal et l'ARN viral sont constitués d'une seule chaîne ou hélice. L'ARN ribosomal est localisé dans les ribosomes, l'ARN messenger transfère les messages de l'ADN et l'ARN de transfert (ARNt) sert de transporteur des acides aminés et l'ARN viral qui est la base du matériel génétique des virus.

On peut conclure que le matériel génétique est bien constitué d'acides nucléiques (ADN et ARN). Les deux chaînes constituant l'ADN sont complémentaires antiparallèles. Il existe différentes sortes de séquences d'ADN et les séquences hautement répétitives sont appelées ADN satellite.

C- PROPRIÉTÉS DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Une des propriétés de l'ADN est l'auto reproduction qui se fait de manière identique à elle-même.

Auto reproduction ou réplication de l'ADN.

En établissant leur modèle, Watson et Crick, conscients de l'importance de la complémentarité, ont proposé un mécanisme de réplication qui est le suivant. Que le modèle de l'ADN est en fait constitué d'une paire de moules et chacun d'eux est complémentaire l'un de l'autre.

Ils pensent qu'avant la réplication, les ponts hydrogènes sont rompus et les deux chaînes se déroulent à la manière d'une fermeture éclair et se séparent. Chaque chaîne joue alors le rôle de moule pour la formation à son contact d'une nouvelle chaîne complémentaire de telle sorte qu'ils obtiendront deux paires de chaînes à la place d'une paire unique originelle.

Ce schéma proposé par Watson et Crick est celui d'un procédé de réplication **semi conservative**. Chaque molécule d'ADN est formée de deux sous unités dont l'une vient en bloc de la molécule d'ADN qui lui a donné naissance et dont l'autre vient d'être synthétisée et entièrement formée d'éléments nouveaux.

Expérience de Meselson et Stahl 1958 (Voir annexe II)

Si l'on utilise une technique permettant de reconnaître les parties des chaînes formées d'éléments anciens et celles formées d'éléments nouveaux, il serait alors possible de savoir si le schéma de reproduction de l'ADN proposé par Watson et Crick est exact ou non.

En utilisant les isotopes comme marqueurs, on peut suivre le devenir des molécules dans la cellule. L'ADN peut être marqué par plusieurs isotopes, en particulier ceux de l'**azote (N^{14} et N^{15})**. Les molécules d'ADN qui contiennent une quantité appréciable d'azote 15 (azote lourd) sont plus denses que celles qui contiennent l'azote 14 (azote léger) et on peut déceler cette différence par centrifugation.

En 1958, Meselson et Stahl ont utilisé pour séparer les molécules d'ADN une méthode de centrifugation dans un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl). Quand une solution concentrée de chlorure de césium est centrifugée à grande vitesse, il se produit un gradient de concentration de CsCl stable à l'intérieur du tube de centrifugation, c'est-à-dire une augmentation continue du CsCl de la surface vers le fond. Si l'ADN est centrifugé dans ce gradient, les molécules se déplacent dans le tube et à l'équilibre, elles se trouveront dans la région du gradient où la densité de solution de CsCl est égale à celle de l'ADN.

Ainsi les différents types d'ADN de densités différentes seront séparés en bandes distinctes le long du tube de centrifugation et l'on pourra les repérer par leur absorption à 260 nm. Meselson et Stahl ont donc cultivé des bactéries d'*Escherichia coli* pendant plusieurs générations dans un milieu ne contenant que de l'azote 15 . L'ADN est donc marqué par l'azote 15 . Ils ont transféré ensuite ces bactéries après lavage dans un milieu où l'azote est uniquement léger (Azote 14).

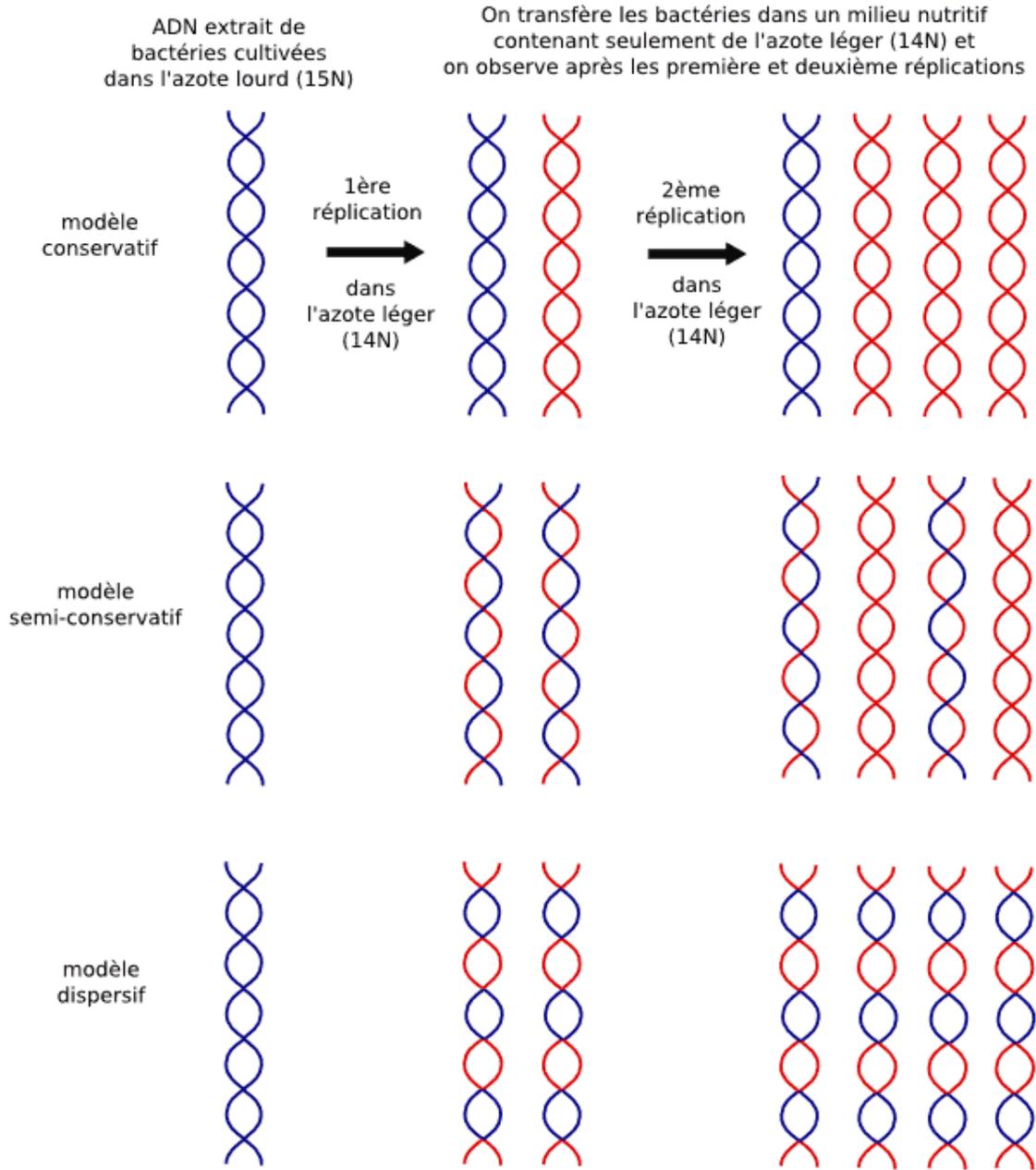
Ils ont prélevé à des intervalles de temps variés, des échantillons de bactéries et ils ont mesuré la densité d'ADN que ces bactéries contiennent. L'intervalle de temps correspond à un dédoublement du nombre de cellules dans la culture.

Le premier dédoublement correspond à la première synthèse d'ADN sans l'azote 15 c'est-à-dire en présence de l'azote 14 . Le premier prélèvement correspond donc à la première génération qui contient des ADN hybrides c'est-à-dire ayant un brin ancien lourd (Azote 15) et un brin nouveau léger (azote 14). Le deuxième prélèvement correspond à la deuxième génération.

On trouve des ADN hybrides lourds et des ADN légers en quantité égale. Le troisième prélèvement correspond à la génération 3, contient la même quantité d'ADN hybride mais trois fois plus d'ADN légers.

Les résultats de Meselson et Stahl sont tout à fait cohérents avec le schéma proposé par Watson et Crick. A chaque génération, la moitié de la molécule de la génération précédente est conservée. **C'est la réplication semi-conservatrice.** D'autres résultats expérimentaux notamment ceux obtenus par Taylor chez une Liliacée et chez *Escherichia coli* sont en faveur de ce mode de réplication de l'ADN

L'azote lourd est représenté en bleu et l'azote léger en rouge.



III) TRANSCRIPTION ET TRADUCTION DU MATERIEL GENETIQUE

Synthèse protéique

L'étude du mécanisme par lequel l'ADN détermine la séquence des acides aminés (A.A) dans les protéines.

On sait que la structure primaire d'une protéine c'est-à-dire sa séquence d'AA est déterminée par une séquence spécifique de nucléotides dans l'ADN. Cet assemblage est sous le contrôle du code génétique inscrit dans une séquence de nucléotides et dépend la manière dont cette information est décodée et traduite en séquence d'AA. Tout le processus de la synthèse des protéines peut être divisé en deux étapes principales.

La première est la transcription d'une séquence de nucléotides d'un brin d'ADN en une séquence complémentaire de nucléotides d'ARN en particulier l'ARN messager.

La seconde étape est la traduction de la séquence de nucléotides d'ARNm par un processus qui assemble les AA en une séquence spécifique

A. TRANSCRIPTION DE L'ARN A PARTIR DE LA MATRICE D'ADN

1) L'ARN intermédiaire entre l'ARN et la protéine

Un gène est un segment d'ADN à partir duquel doit partir l'information nécessaire à la fabrication d'une chaîne polypeptidique donnée. Cette information contenue dans l'ADN des eucaryotes localisé dans le noyau est transférée par un intermédiaire dans le cytoplasme et sert à la synthèse protéique. Un nombre de faits observés indiquent que l'ARN est l'intermédiaire entre l'ADN et la protéine :

-Absence de l'ADN dans le cytoplasme qui est le siège de la synthèse protéique. Sa quantité reste constante sauf pendant la division cellulaire

-Présence d'ARN à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme

-Il existe une corrélation entre la quantité d'ARN et la quantité de protéines synthétisées.

-Il ya plus d'ARN que d'ADN. Ainsi les cellules du pancréas qui produisent beaucoup plus de protéines contiennent beaucoup plus d'ARN que les cellules du cœur. De plus la ribonucléase qui découpe l'ARN en morceaux provoque l'arrêt de la synthèse protéique.

L'ensemble de ces faits indique que l'intermédiaire entre l'ADN et la protéine est l'ARN qui est une macromolécule chimiquement voisine de l'ADN. Le rapport entre l'ADN, l'ARN et la protéine est :

ADN=====transcription=====>ARN=====traduction=====>protéine



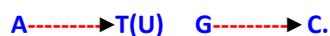
Duplication ou réplication

2) ARN chimiquement voisin de l'ADN

La structure de l'ARN permet de voir que celui-ci peut être l'exacte copie d'une matrice à ADN. C'est une longue molécule formée de quatre types de nucléotides reliés par des liaisons phosphodiester par des extrémités 3'==→5'. On note deux changements dans la structure chimique : Le désoxyribose et le ribose diffèrent par un groupement OH hydroxyle supplémentaire pour le ribose. Il y a absence d'un groupement méthyle dans l'uracile qui remplace la thymine. Mais ni le groupement OH supplémentaire ni l'absence du groupement méthyle de la thymine n'affecte l'ARN dans sa faculté de former des structures en double hélice maintenues transitoirement par des liaisons hydrogènes entre les bases appariées.

3) Synthèse enzymatique de l'ARN sur les matrices de l'ADN

L'ARN tout comme l'ADN est une longue chaîne formée de l'assemblage de quatre nucléotides différents. L'information génétique incluse dans les chaînes d'ADN est transférée à l'ARN suivant une séquence nucléotidique complémentaire. Dans ce cas, les deux brins d'ADN se séparent une ou plusieurs fois durant le cycle cellulaire pour servir de matrice sur laquelle les ribonucléotides complémentaires viennent s'apparier par des liaisons hydrogènes aux nucléotides de l'ADN.



Il existe un système de contrôle qui détermine si les brins d'ADN ainsi séparés vont servir de matrice pour la synthèse d'une chaîne complémentaire d'ADN ou d'une chaîne complémentaire d'ARN. Le mécanisme de contrôle est assuré par une enzyme, **l'ARN polymérase** qui polymérise les ribonucléotides en catalysant la formation des liaisons 3'-5' phosphodiester internucléotidiques formant des squelettes phosphate sucre de l'ARN.

Cet enzyme ne fonctionne qu'en présence d'ADN. D'autre part, la matrice est constituée par un seul brin d'ADN. La transcription sélective est due à l'existence des sites d'initiation de l'ARN polymérase. Ces sites sont appelés des **promoteurs**.

4) Direction de la synthèse des chaînes d'ARN

Chaque molécule d'ARN comme celle d'ADN a une direction définie par l'orientation du squelette sucre-phosphate (extrémité 5' - extrémité 3'). A l'heure actuelle, on a la preuve **que le sens de la synthèse va de 5' à 3'**. En effet, l'examen des brins en voie d'allongement montre que les derniers nucléotides se trouvent à l'extrémité 3' alors que le groupement P~P~P est décelé dans le premier nucléotide incorporé au début de la chaîne.

La synthèse est séquentielle. La polymérisation commence par le nucléotide qui constituera l'extrémité 5' phosphate de la molécule d'ARN. A ce nucléotide est ajouté un second, puis un troisième, etc. jusqu'au dernier qui constitue l'extrémité 3'OH. Ceci implique que lorsque l'ARN polymérase se fixe sur le site d'initiation, elle n'utilise comme matrice que le nucléotide de l'ADN orienté dans le sens 3'OH à 5'Phosphate.

5) Initiation et arrêt de la synthèse de la molécule d'ARN

Les ARN transcrits à partir des molécules d'ADN sont beaucoup plus petits que leur matrice. On pense donc que l'ARN polymérase peut s'attacher à de nombreux sites sur la molécule d'ADN pour débiter la synthèse d'ARN. Elle se déplace alors le long de la matrice d'ADN en transcrivant une séquence nucléotidique spécifique puis se détache de cette matrice lorsqu'elle reçoit un certain signal d'arrêt. Il en résulte que chaque brin d'ARN achevé est libéré de la matrice sous forme d'une molécule libre d'ARN dit monocaténaire de 70 à 10.000 nucléotides.

6) Maturation de l'ARN messager

Chez les procaryotes, ce stade n'existe pas. La maturation de l'ARNm est un phénomène relativement complexe et propre à la cellule eucaryote. On sait aujourd'hui que dans les cellules eucaryotes, avant sa sortie du noyau après la transcription, l'ARNm transcrit n'est qu'un pré-messager (pas encore mûr). Il est formé par des séquences codantes appelées **exons** alternant avec les séquences non codantes appelées **introns**.

Par ailleurs, il existe toujours à l'extrémité 3'OH de toute molécule d'ARNm des eucaryotes, une séquence de nucléotide adénylique (séquence poly A) non codante. A l'extrémité 5'P, il y a de la guanine méthylée. La maturation de l'ARNm consiste à enlever, de sa structure, par l'excision des séquences non codantes.

B. LE CODE GENETIQUE

La colinéarité entre la structure du gène et la structure primaire de la protéine qu'il spécifie, implique l'existence dans la cellule, d'un système qui fait correspondre à des nucléotides de l'ARN, les acides aminés d'une protéine. On appelle **code génétique**, l'ensemble des équivalences qui, à des séquences données de nucléotides, fait correspondre chacun des 20 acides aminés présents dans la protéine. On appellera **codon**, l'association de 3 nucléotides de l'ARN lue dans le sens 5' 3'et qui correspond à un acide aminé.

1) Taille du codon

Il existe quatre nucléotides représentés par les quatre bases qui sont : l'adénine, l'uracile, la guanine, et la cytosine (**A, U, G, C**) et les 20 acides aminés à coder.

-Si le codon est formé d'une seule base ; on pourra coder que 4 acides aminés.

-Si le codon est formé de deux bases ; on pourra avoir 4^2 pour donner 16 acides aminés.

-Si le codon est formé de trois bases ; on aura 4^3 qui correspond à 64 triplets. Ce qui sera plus que suffisant pour coder les 20 acides aminés. Dans ce cas 44 de ces codons seraient superflus. Le nombre de codons inutiles serait plus élevé si le codon était supérieur à trois bases.

Pour rendre compte des codons en excès, on peut supposer que plusieurs d'entre eux peuvent coder un acide aminé particulier. Si par exemple chaque acide aminé est codé par trois

codons différents, on aura 20 acides aminés x 3 = 60 acides aminés, c'est-à-dire 60 des 64 seront utilisés.

Un code où il y a plusieurs codons qui codent pour un acide aminé est dit dégénéré. Il est possible que ces 44 codons en excès ne codent pour aucun acide aminé et correspondent à des codons qui n'ont pas de sens (codon non sens).

2) Disposition des bases

Si nous admettons que le codon est un triplet, plusieurs dispositions de ces trois bases par rapport à leurs voisines peuvent être imaginées :

Codons adjacents

UUA GUA CUA codons adjacents.

UUA® GUA® CAU codons ponctués ou séparés.

UUA GUA CUA codons chevauchants

Les expériences ont montré que le code génétique est non ponctué, non chevauchant. Il est plutôt adjacent, dégénéré, et non ambigu.

3) Déchiffrage du code génétique

En 1961, **Nirenberg et Matthei**, on démontré in vitro qu'une séquence particulière d'ADN produisait une séquence spécifique d'acide aminé. Ils ont utilisé des extraits acellulaires d'*Escherichia coli* contenant des ribosomes, des acides aminés radioactifs, des ARNt, des enzymes nécessaires et des ATP servant de source d'énergie pour la synthèse protéique.

En absence d'ARNm, aucune synthèse protéique n'apparaissait. Ils ont alors utilisé comme ARNm celui du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT). Après l'addition de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac, on avait incorporation des acides aminés et synthèse de protéine ressemblant à celle des VMT.

Quand ils utilisent en particulier une molécule d'ARN synthétique constituée d'unités répétitives d'uridine (poly U), on obtenait un polypeptide dont les acides aminés sont formés de la phénylalanine. Bien que d'autres acides aminés fussent présents dans le milieu, cela veut dire que le codon de la phénylalanine est UUU. On en déduit que le triplet de nucléotides pour l'ARNt de phénylalanine qui s'apparie avec le codon de l'ARNm serait composé de AAA. Ce triplet est appelé **anticodon**.

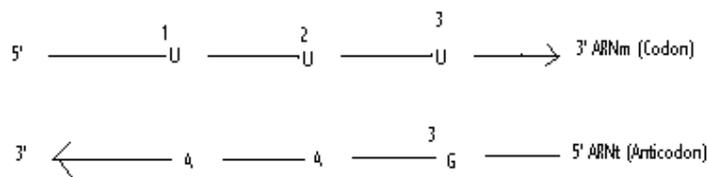
En réalisant des expériences similaires avec divers autres ARNm synthétiques, on a déterminé les codons correspondant à un grand nombre d'acides aminés. Ainsi, la spécificité de la réaction due à l'interaction entre codons et anticodons et la préparation de nombreux triplets ont permis le **déchiffrage complet du code génétique en 1965**.

Les 64 Triplets possibles ont été testés et la relation entre les 20 acides aminés et leurs codon a pu être établie. Dans de nombreux cas, un seul acide aminé est codé par plus d'un codon. **Le code génétique est donc dégénéré mais non ambigu** car un codon ne correspond qu'à un seul acide aminé et non plusieurs acides aminés.

4) Hypothèse de flexibilité ou « Wobble »

Il semble en général que les deux premières bases jouent un rôle plus important que la troisième base qui n'interviendrait pas dans la spécificité du codon. Partant de ce constat, Crick en 1966, a émis une nouvelle théorie appelée théorie de flexibilité ou de tolérance ou le « Wobble ».

Les deux premières bases du codon de l'ARNm s'apparient spécifiquement avec les deux dernières bases de l'anticodon de l'ARNt. Mais l'appariement de la troisième base est peu spécifique. Pour la troisième base, un jeu (Wobble) pourrait être toléré. Ainsi, dans le cas de la phénylalanine (phe), le même ARNt reconnaît les codons UUU et UUC, Or son anticodon ne peut pas être à la fois AAA et AAG. Mais on sait que l'anticodon est AAG, il faut donc imaginer que G peut exceptionnellement s'apparier à U. Cette théorie rend parfaitement compte de la dégénérescence du code génétique



5) Codons non sens et codon d'initiation

La présence de codons qui ne correspondent à aucun acide aminé indique que ces codons n'ont pas de sens. Il s'agit des trois codons : **UAA (ochre)** ; **UAG (ambre)** ; **UGA (azur ou opale)**. Ce sont des codons servant de signal de fin de chaîne de la synthèse protéique alors que le triplet **AUG** qui détermine à la fois la formyl méthionine et la méthionine correspond à un **codon d'initiation** et **d'élongation** de la chaîne polypeptidique.

C'est la formyl méthionine qui se trouve en début de chaîne. Lors de la traduction du message, le premier ARNt qui se fixe sur l'ARNm est celui qui porte la formyl méthionine et la synthèse de la chaîne polypeptidique s'arrête au niveau d'un codon non sens

6) Universalité du code génétique

IL existe de nombreux arguments en faveur de l'universalité du code génétique. En effet, les ARNm viraux sont traduits correctement dans le système acellulaire d'*Escherichia coli*. Ceci indique que les anticodons des ARNt des plantes et des bactéries sont les mêmes. D'autres parts les ARNm des mammifères sont aussi traduits correctement dans le système bactérien. Toute fois l'efficacité des systèmes hétérologues est plus faible que les systèmes homologues (dans la même espèce, la traduction est plus efficace que dans les espèces différentes).

b) Charge de l'ARNt

LA fixation e d'acide aminé sur une espèce d'ARNt se fait par liaison covalente riche en énergie qui associe les 2 molécules. Une molécule d'ATP est hydrolysée pour fournir l'énergie nécessaire à la réaction catalysée par une enzyme dite **aminoacyl ARNt synthétase**. Avant la formation du composé acide aminé-ARNt, les acides aminés sont activés par des enzymes en formant des complexes du type acide aminé adénylate (AA-AMP) dont la réaction est la suivante.



L'intermédiaire AA-AMP reste fixé à l'enzyme jusqu'à ce qu'il y ait interaction avec une molécule d'ARNt spécifique de cet acide aminé. La même enzyme d'activation transfère l'acide aminé du résidu acide adénylate à l'extrémité de l'ARNt :



Première réaction : formation d'une liaison COOH et phosphate de l'AMP

Deuxième réaction : rupture de cette liaison et formation d'une liaison entre COOH(AA) et OH(3') de l'ARNt.

Une espèce d'ARNt ne peut s'associer qu'à un seul acide aminé mais un même acide aminé peut être chargé sur plusieurs espèces d'ARNt. Donc le système de reconnaissance ARNt-acide aminé tout comme le code génétique n'est pas ambigu mais dégénéré

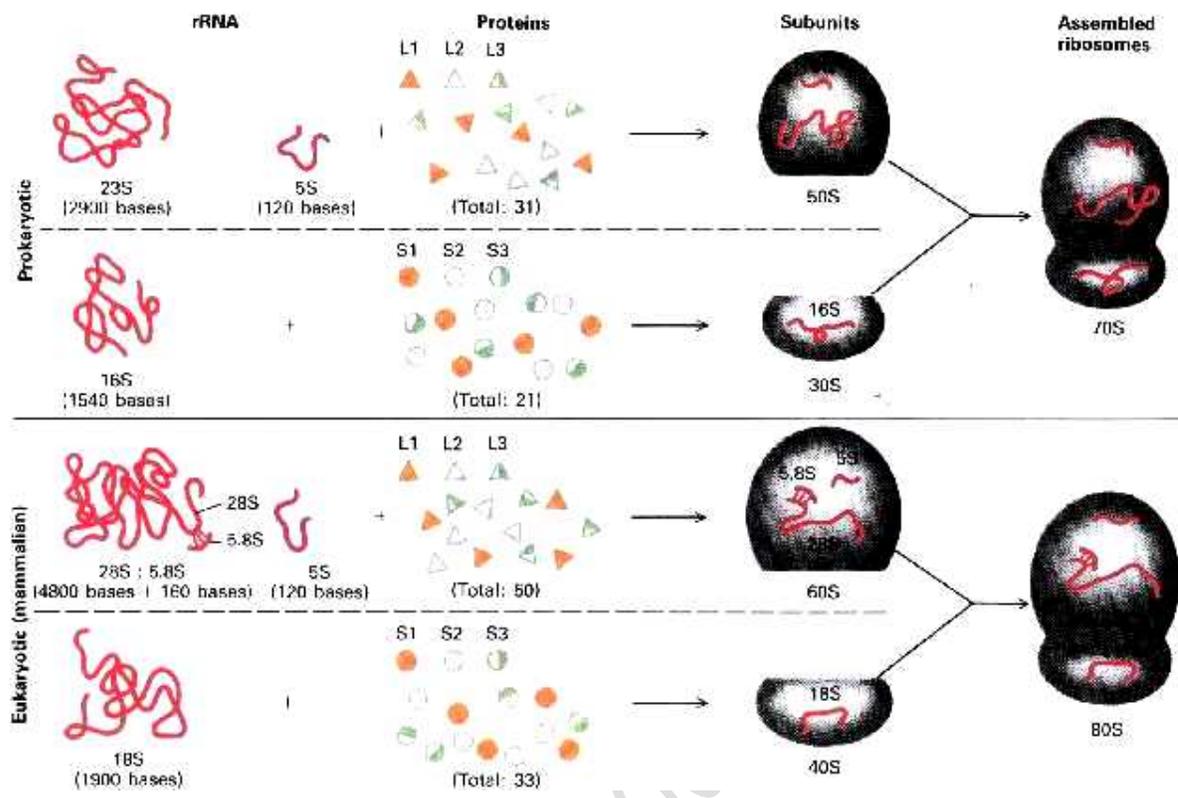
Origine des ARNt

Les expériences d'hybridation entre les ADN et les ARNt montrent que les ARNt sont les produits de la transcription de l'ADN tout comme les ARNm et les ARNr (ARN ribosomal).

c) Structure et propriétés des ribosomes

Chez les procaryotes, les ribosomes sont libres au sein de la cellule. Chacun est constitué de deux sous-unités dont une petite de 30s et une grosse de 50s et la constante de sédimentation est de 70s (s=Svedberg)

Chez les eucaryotes, les ribosomes ne sont pas libres dans la cellule mais tapissent les surfaces externes du réticulum endoplasmique ou ergastoplasme. Chacun d'eux comporte une petite sous-unité de 40s et une grosse sous-unité de 60s. La constante de sédimentation du ribosome de la cellule eucaryotique est de 80s. Dans le cytoplasme, la molécule d'ARNm se fixe généralement sur quatre à six ribosomes à la fois et ceci au niveau de leur petite sous-unité. Les ribosomes sont dans ce cas espacés de 10µ les uns des autres.



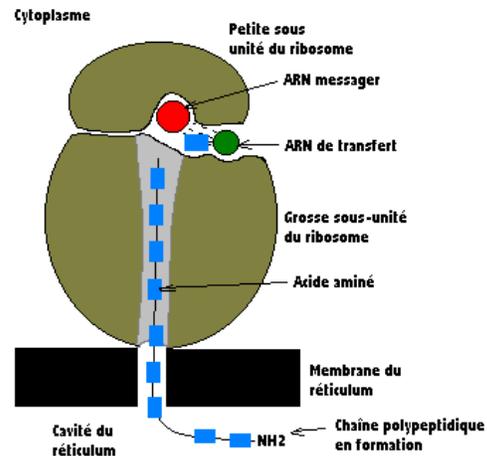
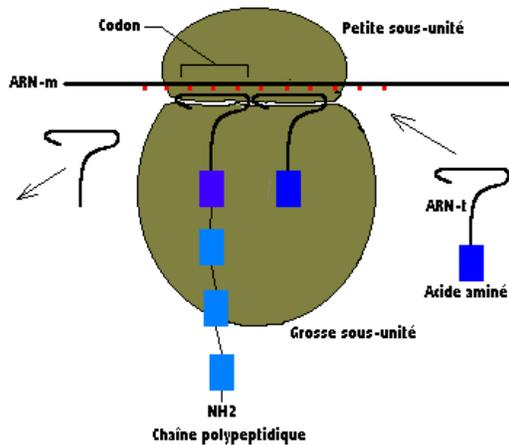
C'est le complexe ARNm-ribosome ainsi constitué qu'on appelle **polysome** ou **polyribosome**. Chaque ribosome comporte deux cavités dans la grande sous-unité au niveau desquelles les molécules d'ARNt peuvent s'insérer. Ce sont les sites P ou peptidyl et A ou amino acyl.

2) Traduction proprement dite

a) Initiation de la traduction

Elle débute avec la fixation sur l'ARNm de la petite sous-unité (30s ou 40s) du ribosome. Sa séquence commence toujours par le signal **AUG** ou **codon initiateur**. Ce codon situé sur l'ARNm appelle l'ARNt dont l'anticodon est **UAC**, c'est-à-dire l'ARNt sur lequel s'est fixé l'acide aminé méthionine sous forme de formyl méthionine – ARNt. Ce premier agrafage nécessite la présence de deux facteurs **Fc** et **Fb**.

Dans un deuxième temps, grâce à la molécule GTP fournissant l'énergie et à un troisième facteur d'initiation **Fa**, la sous-unité 50s ou 60s complète la structure d'initiation. Le complexe formyl méthionine – ARNt qui initie la traduction entre directement au site P. de même, la fixation de tous les autres ARNt chargés sur le ribosome se fait par le site A.



b) Elongation de la chaîne polypeptidique

C'est la mise en place des acides aminés dans l'ordre prévu dans la succession des codons sur l'ARNm. Un facteur d'élongation T intervient pour fixer un second complexe AA-ARNt dans le site A. c'est la réaction d'association. Après la fixation de ce deuxième ARNt qui porte le premier acide aminé caractéristique du peptide en formation, le ribosome détache alors la formyl méthionine de l'ARNt et utilise l'énergie pour réaliser la liaison peptidique entre la N-méthionine et l'acide aminé numéro un sous l'action d'une enzyme. Ce qui donne naissance à un dipeptide accroché au deuxième ARNt.

Le ribosome dans ce cas avance de trois bases et au même moment le premier ARNt (F-méthionine) est libéré et la chaîne polypeptidique commence à s'amorcer grâce à des facteurs de transpeptidation et de translocation. La réaction nécessite la présence de GTP. La deuxième ARNt accroché au dipeptide se déplace du site A au site P si bien que le site A libéré se trouve en face du troisième codon de l'ARNm.

Le troisième ARNt porteur du deuxième acide aminé est caractéristique du polypeptide vient à son tour se fixer dans le site A. une liaison peptidique s'établit entre acide aminé spécifique numéro un et l'acide aminé spécifique numéro deux et le deuxième ARNt est expulsé du site P. le processus de la traduction se poursuit de la sorte codon par codon jusqu'à la fin de la lecture de l'ARNm.

c) Terminaison

De même qu'il existe sur la molécule d'ARNm un codon d'initiation AUG, il existe **trois codons de ponctuations** ou **codons terminateurs** ou **codons non-sens** qui sont **UAA, UAG et UGA**. Le ribosome ayant achevé son rôle de tête de lecture et de pôle de synthèse d'une chaîne polypeptidique lâche le polysome, scinde en ses deux sous-unités qui sont ainsi rendues libres pour une nouvelle traduction.

d) Sens de lecture

Pour la protéine, la synthèse commence par l'extrémité N-terminale. En ce qui concerne le sens de la lecture de l'ARNm, de nombreuses expériences ont montré que l'ARNm est lu comme il est transcrit, c'est-à-dire à partir de l'extrémité 5'P vers l'extrémité 3'OH.

Remarques :

ARNm, ARNt et ARNr sont tous transcrits à partir d'un brin d'ADN.

Université de Cocody (Abidjan)

IV) LA MUTATION

INTRODUCTION

Jusqu'à présent, nous avons considéré l'ADN comme étant à l'abri des erreurs de réplication. Si tel était le cas, l'évolution des êtres vivants serait impossible. D'autre part, les modifications de la séquence de nucléotides de l'ADN qui peuvent entraîner un changement sélectif graduel des organismes ne sont pas très fréquentes car la grande majorité d'entre elles sont nuisibles ou délétères.

La complémentarité des deux brins de l'ADN fait que de nombreuses détériorations de sa structure portant sur l'un des brins sont automatiquement corrigées à partir du brin intact. Cependant, lorsque la détérioration de l'ADN porte sur les deux brins, celle-ci devient permanente et se transmet à toute la lignée de la cellule dans laquelle elle s'est produite.

La mutation d'un gène ou mutation génique est un événement spontané mais qui peut être induit expérimentalement. C'est un événement universel car il intéresse le règne animal comme le règne végétal. C'est un événement fortuit parce qu'il arrive par hasard, par accident d'une manière imprévue, exceptionnel car il est rare et se définit par sa fréquence mesurée par le taux de mutation. Cet événement modifie le contenu du message héréditaire. Il peut entraîner de ce fait un changement qualitatif ou quantitatif de la protéine dont la biosynthèse est contrôlée par ce message.

Cette définition de la mutation permet d'éliminer du cadre de ce chapitre la mutation somatique qui affecte donc le soma et qui n'est pas héréditaire et la mutation chromosomique ou aberration chromosomique qui frappe tout ou une partie du chromosome et qui est repérable sur le caryotype contrairement à la mutation génique.

A) MISE EN EVIDENCE ET SELECTION DES MUTATIONS

Une mutation peut affecter soit un caractère morphologique (taille, forme, aspect, couleur, etc.) soit la viabilité de la cellule (mutation létale) soit encore un caractère biochimique nutritionnel (exigence vis-à-vis d'une substance donnée : acide aminé, vitamine). La mise en évidence d'une mutation et sa sélection dépendent de l'organisme considéré.

1) Les microorganismes

a) Cas de champignons Ascomycète: *Neurospora crassa*

Une technique remarquable de criblage a été élaborée par Beadle et Tatum en 1945 pour déceler les mutations biochimiques nutritionnelles chez *Neurospora*. La technique est basée sur le fait que toutes les souches de *Neurospora crassa*, même celles qui sont mutantes peuvent se développer sur un milieu appelé **milieu complet**. Ce milieu renferme :

- Sels minéraux
- Une source de carbone
- Une vitamine
- Précurseurs d'acides nucléiques
- Acides aminés

Cependant, la souche sauvage de *Neurospora* peut pousser sur un milieu beaucoup plus simple appelé **milieu minimum**. Ce milieu est composé de sels minéraux, de sources de carbones, de source d'azote et une vitamine.

A partir du milieu minimum, la souche sauvage S est capable de fabriquer toutes les macromolécules nécessaires à son métabolisme. Contrairement à la souche sauvage S, il existe des souches mutantes apparues soit spontanément soit après traitement mutagénique et qui sont incapables de pousser sur un milieu minimum.

On peut compenser cette incapacité de croissance en ajoutant au milieu minimum soit un acide aminé, soit un acide nucléique, soit une vitamine spécifique. S'il y a croissance, c'est que la souche étudiée est incapable de fabriquer de l'acide aminé, l'acide nucléique ou la vitamine que l'on a ajouté. Une telle souche mutante est dite **auxotrophe** pour le produit concerné et la souche sauvage est dite **prototrophe**.

Quand la mutation est criblée, la souche mutante est croisée avec la souche sauvage et on observe la ségrégation. On s'attend à observer autant de spores mutées que de spores sauvages : on parle de ségrégation 1 :1. **Si c'est le cas, on dit que la mutation est d'origine nucléaire ou génique.**

b) Cas de bactéries

Le criblage des mutations chez les bactéries est basé sur la même méthode que celle utilisée chez *Neurospora crassa*. On place une population de bactéries d'environ 200 sur un milieu complet solide dans une boîte de Pétri. On repique ensuite ces cellules sur un milieu minimum en utilisant une technique spéciale dite **technique de Velours**.

S'il y a croissance de toutes les cellules, c'est à dire si toutes les bactéries donnent naissance à un clone, cela veut dire qu'elles sont sauvages ou **prototrophes**. Si dans la population, une bactérie est incapable de croître sur ce milieu minimum, elle ne donnera pas de clone et sera considérée comme mutante. Si par contre, elle peut se multiplier après qu'on ait supplémenté le milieu avec une vitamine spécifique ou un acide aminé, on dit que la bactérie mutante est auxotrophe pour ce composé.

c) Cas des virus

Au niveau des bactéries et des champignons, le criblage est beaucoup plus facile mais chez les virus, le criblage est long et difficile parce que les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. On a découvert que chaque virus a une caractéristique propre en fonction de la plage de lyse:

- La plage de lyse est caractéristique pour chaque virus
- L'allure de la plage est caractéristique d'un type de phage dans les conditions standards de culture. Exemple : les mutations r du phage T₂ provoquent la formation de grandes plages.
- La capacité du phage à se développer dans certaines souches bactériennes mais pas dans d'autres. Exemple : mutation h du phage T₂.
- La sensibilité à la température. Exemple du phage T₄ : il y a des virus qui se développent à 30°C et d'autres à 45°C et le mutant à 25°C. On parle alors de mutants **thermosensibles** ou **cryosensibles**. Il s'agit de mutants conditionnels.

2) Chez les organismes supérieurs

Cas des drosophiles

Il existe de nombreuses méthodes pour déceler les mutations portées par les chromosomes X chez la drosophile. Dans ces méthodes, on utilise l'existence des souches portant soit des mutations récessives soit des anomalies chromosomiques soit les deux à la fois.

Exemple : chez la femelle on a XX attaché. L'état récessif s'exprime à l'état homozygote

Chez la drosophile, il est relativement facile de cribler des mutations autosomales et sur les chromosomes sexuels que ce soit des mutations récessives ou dominantes. Chez la plupart des autres organismes supérieurs, il est beaucoup plus difficile parce qu'une mutation récessive ne peut être décelée chez les diploïdes que si elle est à l'état homozygote.

Chez l'Homme, pour une mutation récessive telle que l'albinisme, seul l'analyse du pedigree peut donner quelques indications sur l'origine de la mutation. Chez les diploïdes, les mutations peuvent affecter soit les cellules germinales soit les cellules somatiques.

Dans le cas des cellules germinales, l'individu affecté ne manifeste pas la mutation mais c'est dans la descendance qu'on observera la mutation. Dans le cas des cellules somatiques, cette mutation n'est pas transmise à la descendance. Elle sera localisée dans les régions de l'individu où il y a eu la mutation. On a une mosaïque de cellules composées de cellules mutées et de cellules normales. Ces mutations somatiques peuvent être multipliées ou maintenues si l'organisme est capable de se reproduire à partir d'organe ou de tissu cellulaire (arbres fruitiers).

B) BASES MOLECULAIRES DES MUTATIONS

1) A l'échelle nucléotidique

Ce sont des mutations qui impliquent une anomalie au niveau de l'appariement des bases :

- Mutation par substitution
- Mutation par inversion
- Mutation par insertion
- Mutation par perte de base

a) La substitution

Sauvage Mutant

TAT → TGT

ATA → ACA

On a remplacé A par G et T par C. Nous avons dans l'ensemble remplacé **A (purine)** par **G (purine)** et remplacé **T (pyrimidine)** par **C (pyrimidine)**. On parle alors de substitution de type **transition**. On a un même nombre de bases au niveau du matériel génétique.

Purine Purine

Pyrimidine → Pyrimidine

TAT → TTT A(Purine) → T(Pyrimidine)

ATA → AAA T(Pyrimidine) → A(Purine)

Ici il s'agit d'une substitution de type **transversion**

A-----> C A ↔ T ↔ : transversion
 T-----> G C ↔ G → : transition

b) Mutation par inversion

C'est le retournement d'un certain nombre de bases et leur lecture en sens inverse.

Sauvage ADN 3' TAC CGT CAA ATG 5'

ARNm 5' AUG GCA GUU UAC 3'

Polypeptide S Met - Ala - Val - Tyr

Mutant ADN 3' TAC CGT AAC ATG 5'

ARNm 5' AUG GCA UUG UAC 3'

Polypeptide M Met - Ala - Leu - Tyr

La mutation par inversion peut ne pas concerner la totalité du codon.

Exemple : ARNm 5' AAA CCG AAG GCC 3'

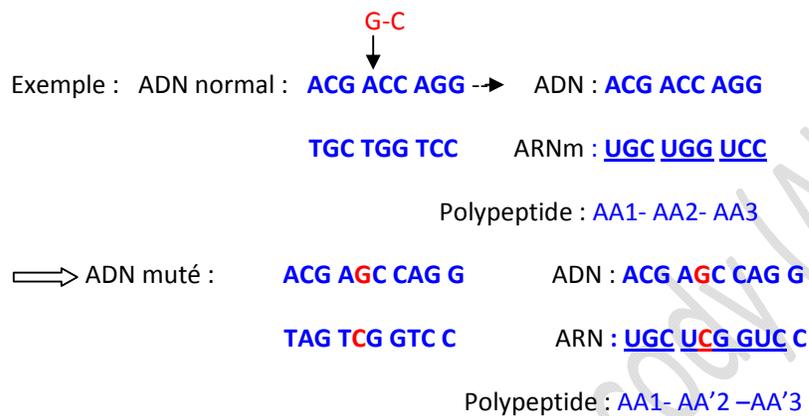
AA1 - AA2 - AA3 - AA4

5' AAA CCA GAG GCC 3'

AA1- AA'2- AA'3- AA4

c) Mutation par insertion

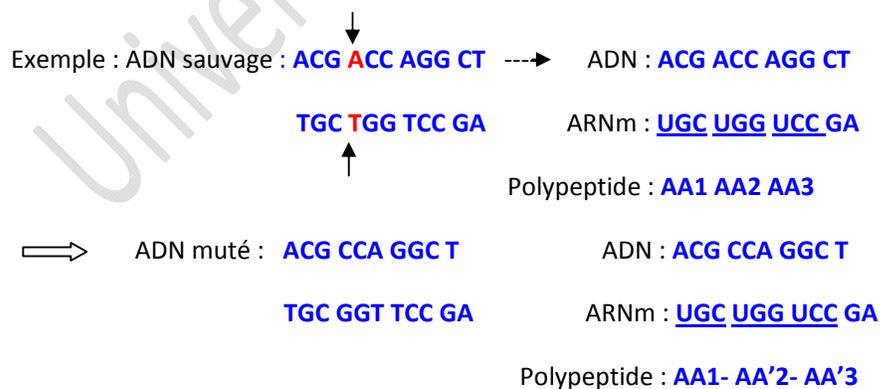
C'est l'introduction d'une nouvelle paire de nucléotides dans le message. la lecture des triplets se trouve falsifiée.



Il ya addition d'une paire de bases au niveau du codon (insertion d'une base G entre les bases A et C du deuxième codon du premier brin d'ADN normal). Au niveau protéique, tout le reste du polypeptide change. Le changement donne le mutant.

d) Mutation par perte

La mutation par perte se traduit par une perte d'une paire de nucléotides dans le message. A partir de cette perte, la lecture est également falsifiée.



Lorsque la perte porte sur plusieurs paires de bases de nucléotides, on parle alors de **délétion**. La mutation par délétion ne donne jamais par d'autres mutations le type original (révertant).

ADN sauvage : ACG **ACC** AGG CT
 TGC **TGG** TCC GA

ADN muté B1 : ACG CCA GGC T

ARNm B1: UGC GGU CCG A

⇒ Mutation reverse: ADN muté B2: ACG **ACC** AGG CT
 TGC **TGG** TCC GA

Dans le cas de la délétion, la mutation ne reverse jamais. Tous les autres types de mutation qu'on a évoqués, appelés géniques ou mutations ponctuelles parce que portant sur une paire de bases reversent.

C) MUTATIONS SPONTANÉES ET MUTATIONS INDUITES

1) Mutations spontanées

Les premières mutations étudiées sont apparues dans les populations dans les conditions normales d'environnement sans aucune cause apparente. De telles mutations sont dites **spontanées**. Des modifications de base peuvent se produire spontanément et induire des mutations spontanées.

Les causes des mutations sont multiples :

Le rayonnement naturel (rayons cosmiques, la radioactivité terrestre permanente).

Dans le rayonnement cosmique, on a les particules α , β , protons et électrons. La radioactivité terrestre existe à l'état naturel dans le sol, l'eau, l'air, la plante, sous forme de radioéléments (C_{14} , Uranium, Radon). Toutes ces particules et radioéléments peuvent provoquer des modifications de base et induire des mutations spontanées.

Taux des mutations spontanées

Evènements rares, d'autant plus rares que les causes sont naturelles. Ils apparaissent à un taux très faible. Le taux de mutation est la fréquence d'apparition d'individus portant les allèles mutants d'un gène de génération en génération.

Cette fréquence varie selon les organismes et les gènes. Elle est généralement comprise entre 10^{-6} et 10^{-9} .

10^{-6} : 1 individu -----> 1.000.000 de personnes

10^{-9} : 1 individu -----> 1.000.000.000 de personnes

Problème : le taux étant faible, il faut abattre un travail colossal pour déceler les quelques rares mutants et même quand le matériel d'étude se multiplie rapidement tel *Escherichia coli*. Il est indispensable d'augmenter le taux de mutation

2) Mutations induites

En 1927, **Muller** a mis en évidence la possibilité de provoquer des mutations à haute fréquence chez la drosophile en la soumettant aux rayons X. Son expérience fut reprise chez d'autres organismes tels que la guêpe, l'orge (Stadler, 1928), le blé. Les mutations ainsi obtenues sont appelées **mutations induites**.

L'agent utilisé pour induire la mutation est appelé agent mutagène. On connaît actuellement un grand nombre d'agents mutagènes qui se classent en deux catégories :

Les agents physiques

Les agents chimiques : ils augmentent la fréquence des mutations par un facteur de 100 ou 1000 (1/1000)

a. Les agents physiques

Ce sont des radiations ionisantes (RX), ultraviolets (UV)

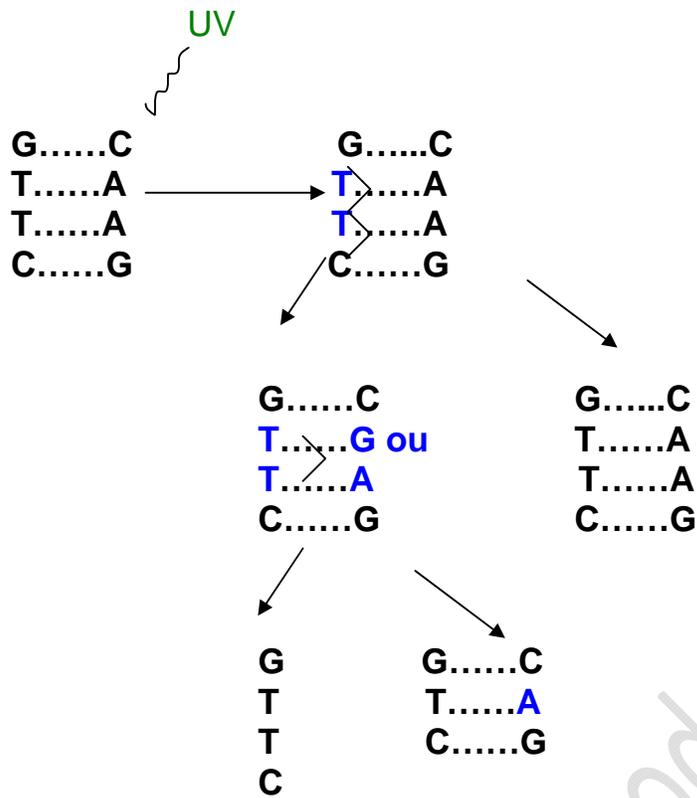
-Les radiations ionisantes

Elles induisent aussi bien des mutations génétiques que chromosomique. Le taux de mutation observé est fonction de la dose. Les mutations chromosomiques sont en général obtenues à forte dose d'irradiation.

-Les ultraviolets :

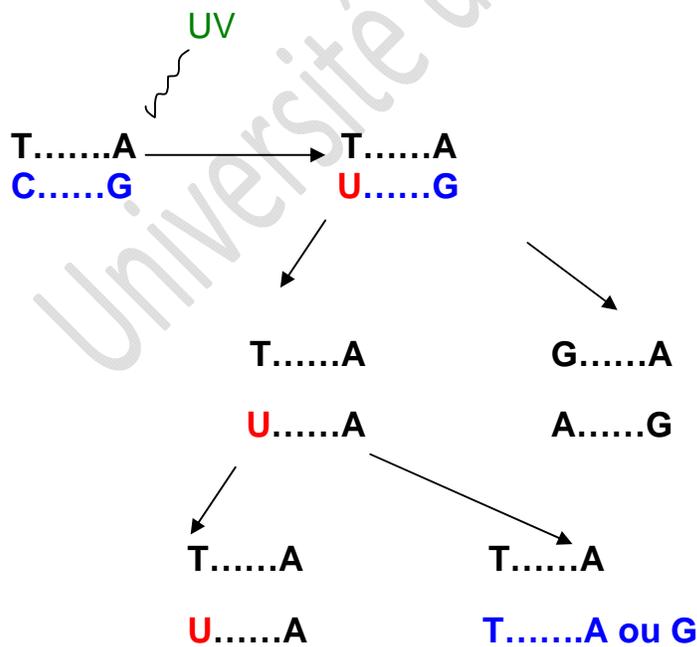
Les UV induisent surtout les mutations géniques. Elles peuvent induire la formation de dimères de pyrimidine sur une même chaîne de la double hélice et surtout des dimères de thymine.

En conséquence on a des distorsions locales de la double hélice. IL va avoir problème au cours de la réplication qui suit cette distorsion et ces dimères ne pourront pas former des liaisons hydrogènes normales. On aboutit à une mauvaise insertion



Mutant : **Perte** d'une paire de bases

Les UV peuvent aussi hydrater les pyrimidines. L'hydratation la plus connue est celle de la cytosine qui devient **uracile**



Mutant : **Substitution** de type **transition**

b) Les agents chimiques

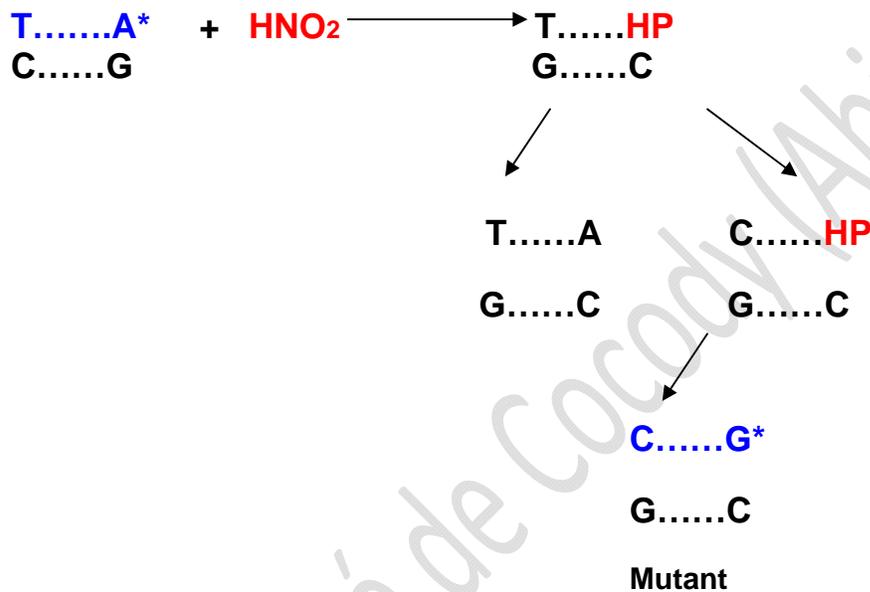
On a une grande quantité d'agents chimiques qui ont une action mutagène

-Les agents désaminants

Les plus connus sont :

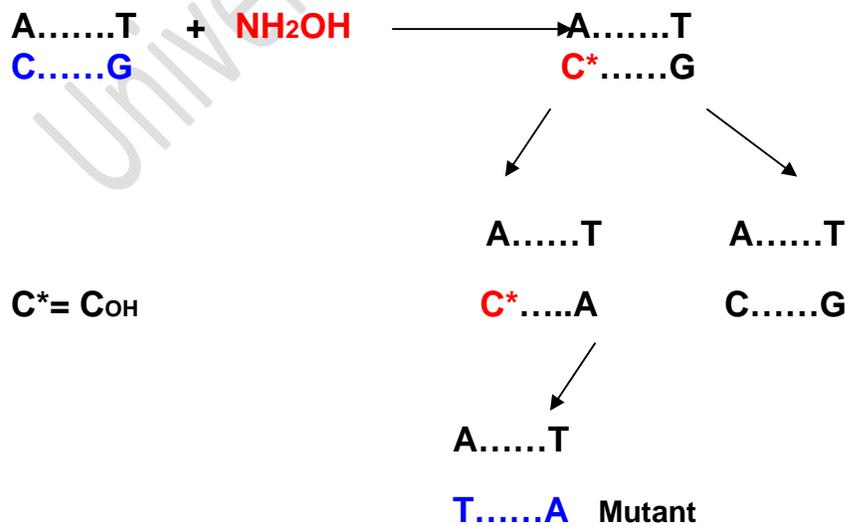
L'acide nitreux (HNO₂) :

Il transforme l'adénine en **hypoxantine** (HP) qui peut s'apparier à la **cytosine**. Il transforme aussi la **cytosine** en uracile qui peut s'apparier l'**adénine**



L'Hydroxylamine (NH₂OH)

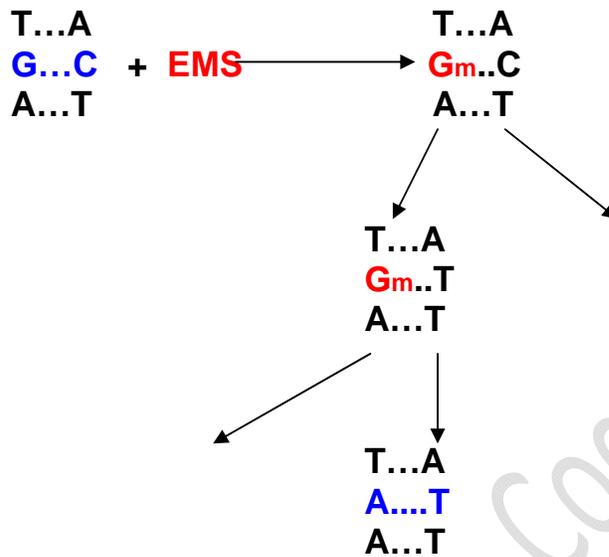
Il réagit avec la **cytosine** qu'il hydrolyse et alors la **cytosine** peut s'apparier avec l'**adénine**



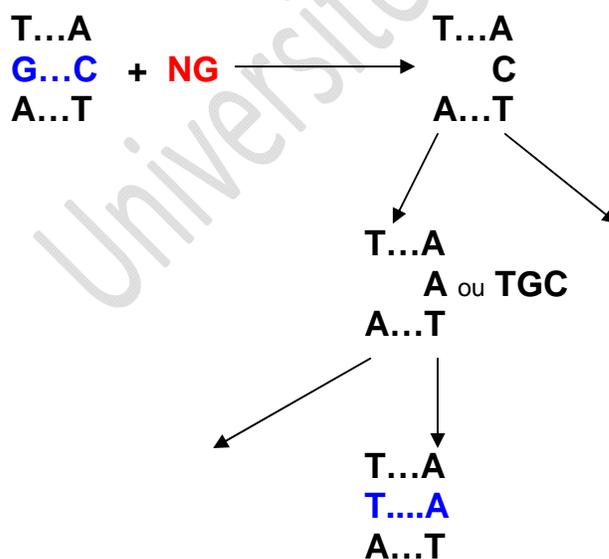
On ne peut pas faire de mutation réversible avec l'hydroxylamine.

-Les agents alkylants

Les plus connus sont : EMS (éthyle méthyle sulfonate), EES (éthyle éthyle sulfonate). NG (Nitrosoguanine). Ce sont des agents qui réagissent avec les purines et surtout avec la guanine. Ces agents peuvent ajouter soit un radical méthyle soit éthyle à la guanine qui se comporte comme une base qui va s'apparier à la thymine (T). Ces agents provoquent l'enlèvement simple de la guanine. C'est une dépurinisation de l'ADN, c'est-à-dire enlèvement de la purine et surtout de la guanine, cela peut entraîner une perte de base ou une substitution de base.



Mutant : Substitution de type transition



Mutant : Substitution de type transversion

-Les acridines

Ce sont des colorants basiques qui permettent de mettre en évidence l'ADN.

Exemple : **La proflavine, le bromure d'éthyldium**. Ils provoquent la déformation de l'ADN dans la mesure où ils ont la propriété de s'intercaler entre deux purines adjacentes situées sur la même chaîne et va entraîner des **micro insertions** ou **micro délétions**. Ils transforment les bases qui vont se comporter comme d'autres bases.

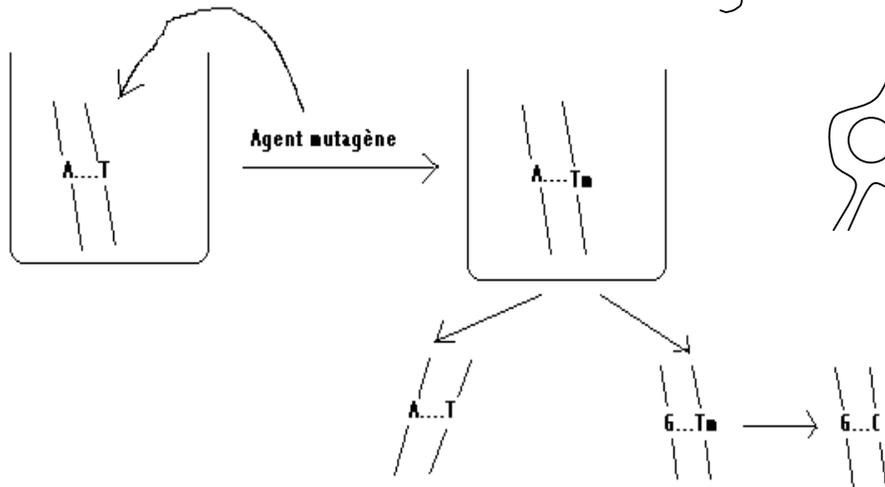
GM.....T

GM se comporte comme un A

GM est l'analogue de A

GM \longleftrightarrow A

Exemple



Exemple

c) Les analogues de bases

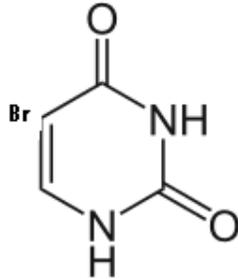
Mutation \longrightarrow directe sur l'ADN

Mutation \longrightarrow indirecte par les analogues de base

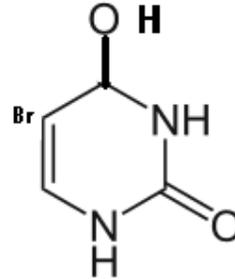
Ce sont des substances qui ont une structure voisine de celle des bases de l'ADN. Ils peuvent exister naturellement dans la cellule ou alors on peut les synthétiser. C'est ce qu'on appelle **analogue artificiel**.

- 5-BU(5-Bromouracile)

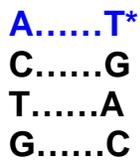
IL existe sous deux formes : La forme **cétonique** la plus fréquente qui est analogue de la **thymine** donc peut s'apparier à l'adénine et la forme **énolique** qui est la forme la plus rare est analogue de la **cytosine** et peut s'apparier à la **guanine** (les deux formes s'inter changent).



5-BU [cétonique] : analogue de T



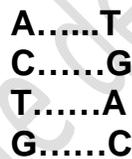
5-BU (énolique) : analogue de C



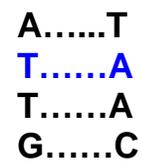
+ 5-BU (Céto)



+ 5BU (énolique)



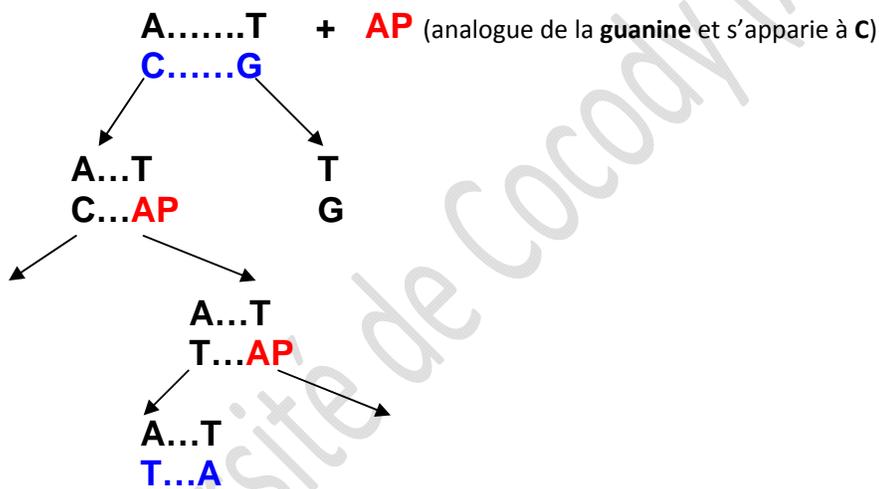
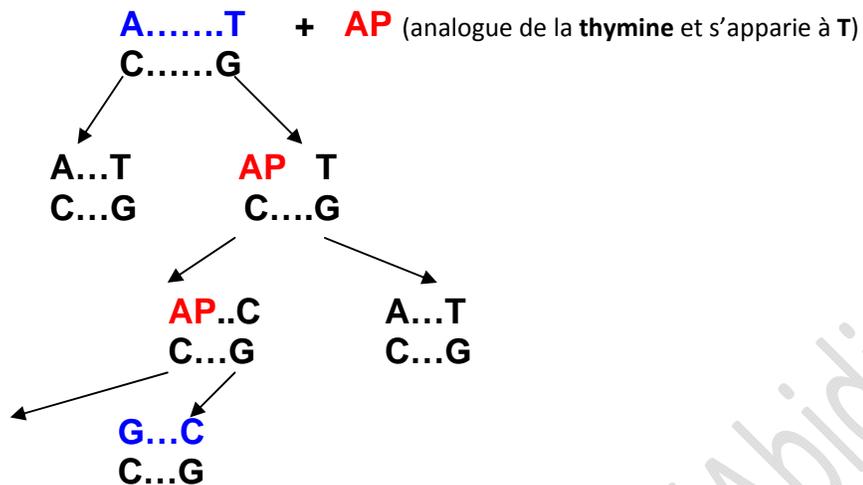
Mutant



mutation réversible

- Les amino purines

2-methyl amino purine (analogue de l'adénine)



CONCLUSION :

Les mutations sont des événements fortuits, héréditaires se produisant spontanément à des fréquences très faibles. Ces fréquences peuvent être augmentées par l'emploi d'agents mutagènes physiques ou chimiques.

Du point de vue moléculaire, les mutations géniques apparaissent comme des anomalies de la réplication. Si le mode réplication semi conservatif est la règle, la mutation est son exception.

Il en ressort donc qu'un gène peut exister sous de nombreuses formes différentes décrivant les unes des autres par le jeu de mutations. Ces différentes formes constituent des formes alléliques ou allèles. Dans le langage généticien, on pourra distinguer l'allèle sauvage dont le fonctionnement est normal et les allèles mutants dont le fonctionnement est plus ou moins altéré

ANNEXE I

Historique des Découvertes

Université de Cocody (Abidjan)



1865 : Gregor Mendel découvre grâce à la reproduction de ses expériences avec des pois que les traits de l'hérédité sont fondés sur des lois spécifiques (plus tard qualifiées de "lois de Mendel").

1866 : Ernst Haeckel propose que le noyau contient les facteurs responsables de la transmission des caractères héréditaires.

1869 : Friedrich Miescher isole l'ADN ("nuclein") pour la première fois.

1871 : Premières publications décrivant l'ADN par Friedrich Miescher, Felix Hoppe-Seyler, et P. Plósz.

1882 : Walther Flemming décrit les chromosomes et examine leur comportement pendant la division cellulaire.

1884–1885 : Oscar Hertwig, Albrecht von Kolliker, Eduard Strasburger, et August Weismann fournissent indépendamment la preuve que les noyaux des cellules contiennent la base de l'hérédité.

1889 : Richard Altmann rebaptise "nuclein" en "acide nucléique."

1900 : Carl Correns, Hugo De Vries, et Erich von Tschermak redécouvrent les lois de Mendel.

1902 : Theodor Boveri et Walter Sutton forment le postulat que les unités de l'hérédité (appelés "gènes" de 1909) sont situés sur les chromosomes.

1909 : Wilhelm Johannsen utilise le mot "gène" pour décrire les unités de l'hérédité.

1910 : Thomas Hunt Morgan utilise les mouches des fruits (drosophiles) comme un modèle d'étude de l'hérédité et trouve la première mutante, avec des yeux blancs.

1913 : Alfred Sturtevant et Thomas Hunt Morgan produisent la première carte génétique (pour la mouche drosophile).

1928 : Frederick Griffith postule qu'un "facteur transformant" peut être libéré par des bactéries et intégré par d'autres en leur conférant de façon héréditaire de nouvelles propriétés génétiques.

1929 : Phoebus Levene identifie les éléments constitutifs de l'ADN, y compris les quatre bases adénine (A), cytosine (C), la guanine (G) et thymine (T).

1941 : George Beadle et Edward Tatum montrent que chaque gène est responsable de la production d'une enzyme.

1944 : Oswald T. Avery, Colin MacLeod, et Maclyn McCarty démontrent que le "facteur transformant" de Griffith n'est pas une protéine, mais plutôt l'ADN, suggérant que l'ADN puisse fonctionner comme le matériel génétique.

1949 : Colette et Roger Vendrely et André Boivin découvrent que les noyaux de cellules germinales contiennent la moitié de la quantité d'ADN que l'on retrouve dans les cellules somatiques. Ceci fournit une nouvelle preuve du fait que l'ADN est le matériel génétique.

1949–1950 : Erwin Chargaff publie ses travaux sur le contenu en base azotées de l'ADN et montre alors que le rapport $A+T/C+G$ est variable selon les espèces mais constant entre membre d'une même espèce et que les rapport C/G et A/T sont toujours égaux à 1.

1952 : Alfred Hershey et Martha Chase utilisent un virus (le bactériophage T2) pour confirmer que l'ADN est le matériel génétique : ils démontrent que, lors de l'infection virale seul l'ADN entre dans la bactérie tandis que les protéines virales ne pénètrent pas dans ces bactéries.

Mouche mutante



Mouche normale



1953 : Rosalind Franklin et Maurice Wilkins utilisent les rayons X pour démontrer que l'ADN possède une structure hélicoïdale répétée.



1953 : James Watson et Francis Crick, ici à gauche, découvrent la structure moléculaire de l'ADN: une double hélice dans laquelle on retrouve toujours les paires A avec T et C avec G.

1956 : Arthur Kornberg découvre l'ADN polymérase, une enzyme qui réplique l'ADN.

1957 : Francis Crick propose le "dogme central" (l'information dans l'ADN est traduit en protéines grâce à l'ARN) et spécule que trois bases de l'ADN vont toujours spécifier un acide aminé dans une protéine.

1958 : Matthew Meselson et Franklin Stahl décrivent comment l'ADN se réplique (réplication semi-conservative).

1961–1966 : Robert W. Holley, Har Gobind Khorana, Heinrich Matthaei, Marshall W. Nirenberg, et ses collègues

identifient le code génétique.

1968–1970 : Werner Arber, Hamilton Smith et Daniel Nathans utilisent pour la première fois des enzymes de restriction pour couper l'ADN en des endroits précis.

1972 : Paul Berg utilise des enzymes de restriction afin de créer le premier morceau d'ADN recombinant.

1977 : Frederick Sanger, Allan Maxam et Walter Gilbert développent des méthodes de séquençage d'ADN.

1982 : Le premier médicament (insuline humaine), basé sur l'ADN recombinant, apparaît sur le marché.

1983 : Kary Mullis invente la PCR en tant que méthode d'amplification *in vitro* de l'ADN.

1990 : Début du séquençage du génome humain.

1995 : Première séquence complète du génome d'un organisme vivant (la bactérie *Haemophilus influenzae*) est publiée.

1996 : La séquence complète du génome du premier organisme eucaryote (la levure *Saccharomyces cerevisiae*) est publiée.

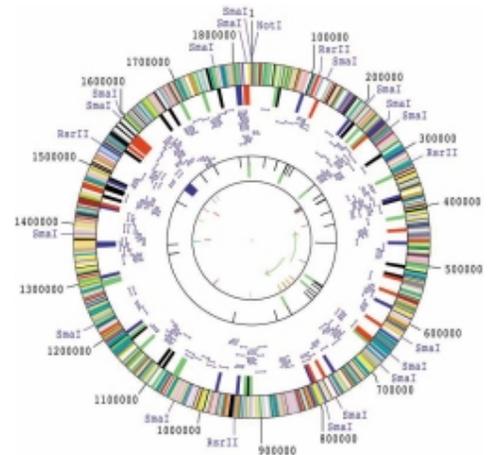
1998 : Séquence complète du génome du premier organisme pluricellulaire (le ver nématode *Caenorhabditis elegans*) est publiée.

1999 : La première séquence complète d'un chromosome humain (le chromosome 22) est publiée.

2000 : Les séquences complètes des génomes de la mouche drosophile et de la première plante (*Arabidopsis*) sont publiées.

2002 : La séquence complète du génome du premier mammifère modèle (la souris) est publiée.

2004 : La séquence complète est terminée par le consortium international public.



2007 : HELYS propose des œuvres d'art personnalisées à partir de l'ADN de ses clients !

ANNEXE II

Expériences de Meselson et Stahl

I. Introduction

Cette expérience date de **1958**. Elle permet de démontrer le caractère semi-conservatif de la multiplication de la molécule d'ADN chez les bactéries. Cette expérience a pu être réalisée grâce à **plusieurs mises au point techniques** :

1 - Meselson et Stahl mettent au point une technique d'obtention de **gradient de densité par centrifugation**. En utilisant du **chlorure de Césium** de densité moyenne 1,72, ils obtiennent après 24h de centrifugation à grande vitesse un gradient de densité (environ de 1,70 à 1,75), gamme qui englobe la densité de l'ADN (1,710).

2 - Ils cultivent les bactéries dans un milieu dans lequel les substances organiques utilisées comme source d'azote contiennent de l'**azote lourd (15N)**. Au cours de la culture, toutes les molécules azotées et en particulier l'ADN contiennent une forte proportion d'azote 15N. L'ADN "lourd" a une densité de 1,724 et peut être distingué de l'ADN "léger" (1,710).

3 - Ils mettent au point une méthode qui permet de **synchroniser pendant quelques générations la division des bactéries**.

II. Le problème à résoudre

Depuis Watson et Crick (1953), on sait que l'ADN est une molécule formée de deux brins antiparallèles, formant une double hélice. Dès leur publication originale sur la structure de l'ADN, Watson et Crick ont proposé que cette double hélice puisse s'ouvrir, permettant ainsi la synthèse de nouveaux brins, complémentaires des brins originaux.

L'ADN peut ainsi servir de matrice à sa propre réplication, étape essentielle du cycle cellulaire. Cette duplication de l'ADN (et donc des chromatides) permet de passer de chromosomes à une chromatide à des chromosomes possédant deux chromatides identiques, portant la même information génétique. Lors de la mitose, ces deux chromatides sont réparties, chaque cellule - fille héritant d'une chromatide de chaque chromosome. On obtient ainsi deux cellules possédant la même information génétique que la cellule - mère.

Le problème qui se posait à Meselson et Stahl était alors de comprendre comment se réalisait cette réplication : **selon quelles modalités passe-t-on d'une molécule d'ADN formée de deux brins à deux molécules d'ADN bicaténares identiques ?**

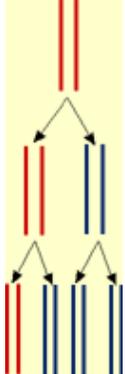
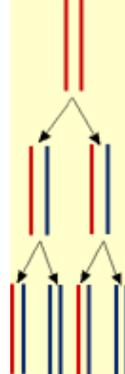
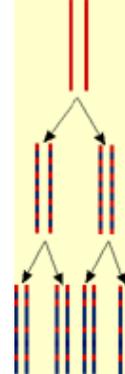
III. Les hypothèses

Pour expliquer la duplication d'un ADN bicaténaire, trois modèles ont été proposés. Ces modèles se basent tous sur l'utilisation de la molécule d'ADN "mère" comme matrice pour sa réplication, mais selon des modalités différentes :

Légendes :

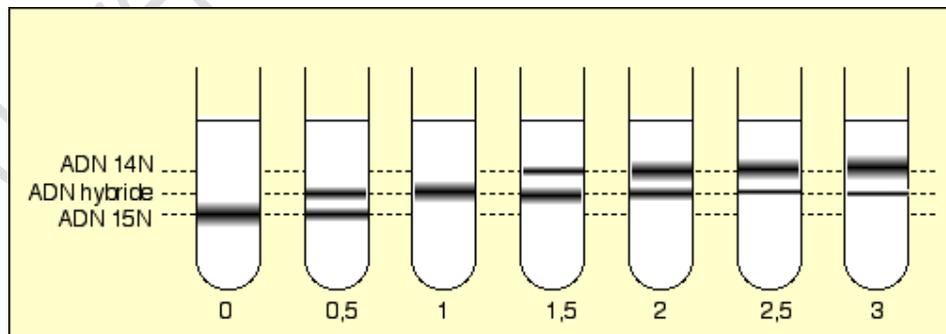
molécules d'ADN "mère" et son devenir
ADN néo-formé

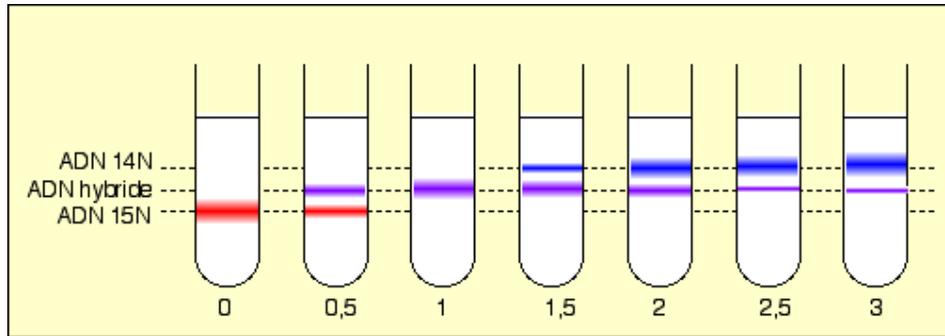
Devenir de l'ADN chez trois générations de
cellules successives

		
<p>Hypothèse 1: modèle conservatif</p> <p>A partir d'une molécule d'ADN bicaténaire "mère", on forme une nouvelle molécule d'ADN bicaténaire. On garde donc ici une molécule "mère", non modifiée (elle est donc conservée), tout en "créant" une nouvelle molécule ("fille").</p>	<p>Hypothèse 2: modèle semi-conservatif</p> <p>On dissocie les deux brins de la molécule d'ADN bicaténaire "mère". Chaque brin sert donc de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire, l'ensemble reformant une molécule d'ADN bicaténaire. Chaque nouvelle molécule "fille" ne conserve donc que la moitié de la molécule "mère".</p>	<p>Hypothèse 3: modèle dispersif</p> <p>On ne conserve aucun brin intact. La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN, permettant de former les deux molécules d'ADN bicaténares "filles".</p>

IV. L'expérience : résultats observés

Des bactéries cultivées depuis longtemps en présence de molécules azotées ^{15}N sont repiquées sur un milieu contenant des molécules azotées ^{14}N et permettant la synchronisation des divisions. Des fractions sont prélevées après différents temps correspondant à 1, 2, 3, ... divisions. L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de Césium et centrifugé 24h à 100.000 g. La position des ADN est repérée par une mesure de la densité optique.





Position des différentes bandes d'ADN au cours du temps. Les chiffres donnent le nombre de divisions.

Après 1 génération, tout l'ADN est **hybride** (du point de vue de sa densité). Il n'y a plus d'ADN ^{15}N . Ensuite, l'ADN hybride disparaît progressivement au profit d'ADN "léger" (^{14}N).

V. L'expérience : comparaison avec les modèles

L'expérience de Meselson et Stahl montre donc la présence d'un ADN hybride au bout d'une génération cellulaire. Or, qu'attend-on pour les trois modèles proposés ?

ADN hybride	<p>ADN lourd (^{15}N) et ADN léger (^{14}N)</p>	<p>ADN hybride (molécules formées d'un brin lourd et d'un brin léger)</p>	<p>ADN hybride</p>
résultat observé	résultat attendu pour le modèle conservatif	résultat attendu pour le modèle semi-conservatif	résultat attendu pour le modèle dispersif

On peut donc, dès cette première observation, **rejeter le modèle conservatif**.

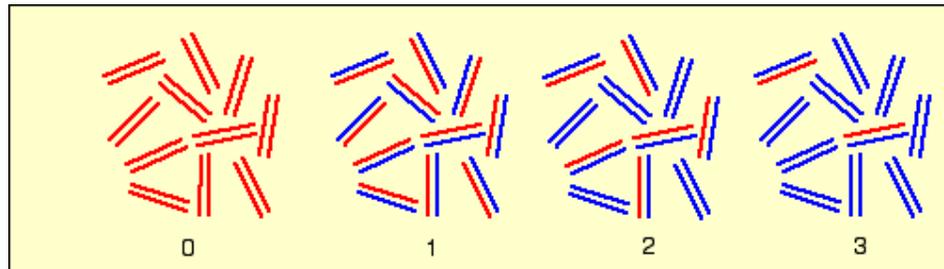
Au bout de deux générations cellulaires, Meselson et Stahl observent la présence d'ADN hybride et d'ADN léger. Ceci permet de conclure quant aux deux modèles restants :

ADN hybride et ADN léger	<p>ADN hybride et ADN léger</p>	<p>ADN hybride</p>
résultat observé	résultat attendu pour le modèle semi-conservatif	résultat attendu pour le modèle dispersif

En conclusion, **seul le modèle semi-conservatif** permet d'aboutir à des résultats attendus correspondant aux résultats observés.

VI. Conclusion

L'expérience de Meselson et Stahl permet donc de mettre en évidence le fait que **la réplication se réalise selon un mode semi-conservatif**.



Représentation schématique de la population de fragments d'ADN au cours des générations. Après 1 génération tout l'ADN est "hybride" et constitué d'un brin "lourd" (15N) et d'un brin "léger" (14N).

Cette conclusion a été depuis confirmée par des études plus précises, pour aboutir au modèle actuel de fonctionnement de la réplication.

Quelques **points importants** de cette expérience sont à noter : Tout d'abord le fait qu'il est nécessaire de séparer les ADN sur un gradient permettant de mettre en évidence leurs très faibles différences de densités; une "simple" centrifugation ne suffit pas. L'utilisation d'un gradient de Chlorure de Césium est donc un point fondamental du protocole. De même, ces observations n'ont été possibles que parce que Meselson et Stahl avaient réussi à obtenir des populations de bactéries synchrones (pendant quelques générations). De nombreux auteurs omettent ces points fondamentaux... Ce qui fait perdre tout sens à leurs conclusions...

Source : Roger Prat & Gilles Furelaud

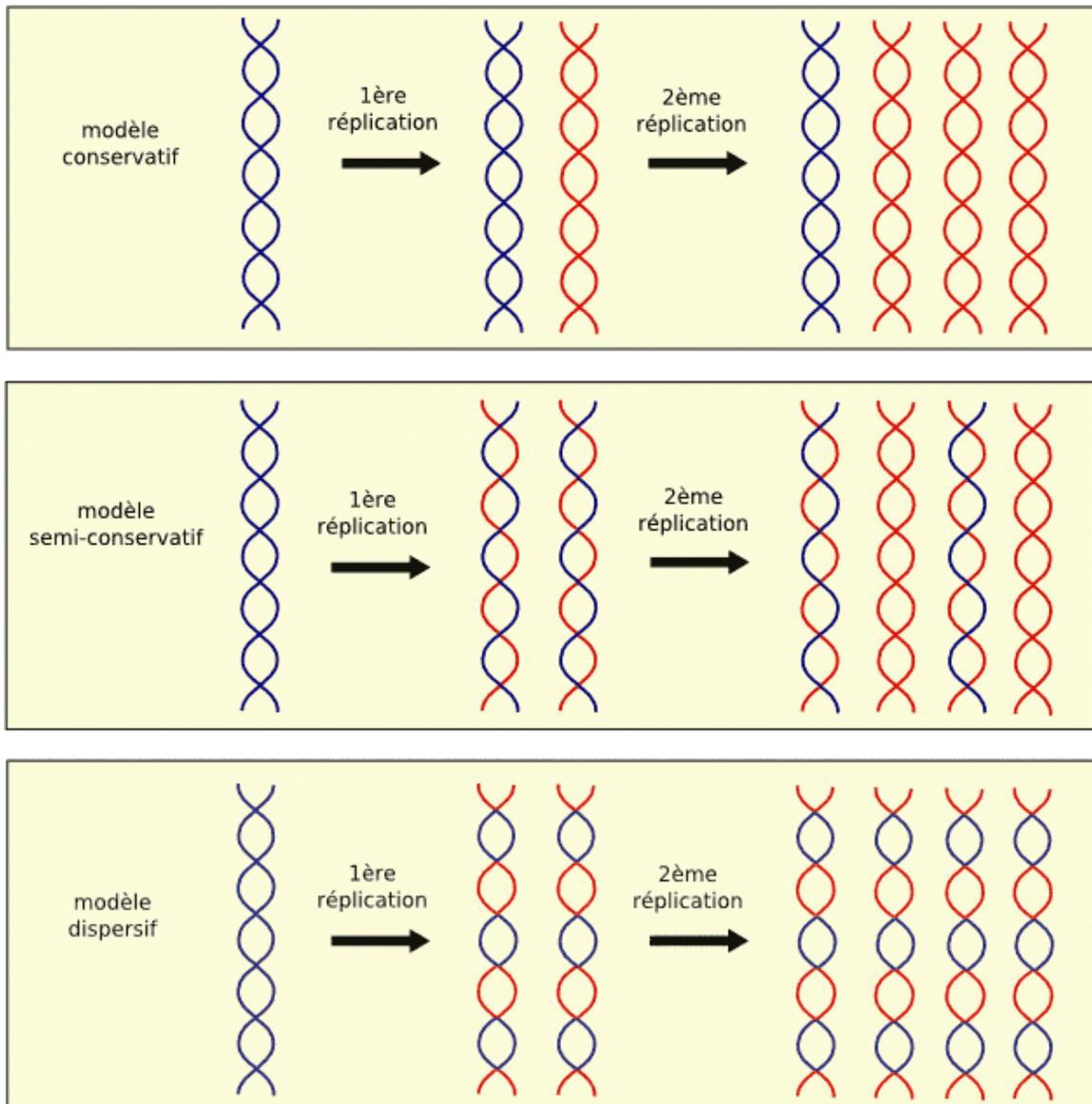
L'expérience de Meselson et Stahl

Cette expérience, réalisée en 1958 par les biologistes Meselson et Stahl, a pour but de comprendre le mécanisme de la réplication des molécules d'ADN.

Lors de l'interphase, chaque molécule d'ADN est « dédoublé » en vue de la mitose. Meselson et Stahl, au cours de leur célèbre expérience, vont déterminer le mécanisme de ce « dédoublement ».

Les hypothèses :

Pour expliquer le mécanisme, trois hypothèses ont été faites :



Modèle conservatif : à partir d'une molécule d'ADN, on forme une nouvelle molécule d'ADN sans "toucher" à la première. On garde donc ici une molécule "mère" non modifiée (elle est donc conservée).

Modèle semi-conservatif : chaque brin de la molécule à répliquer sert de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire, pour obtenir deux molécules d'ADN identiques. Chaque nouvelle molécule "filie" ne conserve donc que la moitié de la molécule "mère".

Modèle dispersif : aucun brin n'est conservé intact. Les deux molécules "filles" sont créées à partir de fragments de la molécule "mère" dispersés dans chacune des deux molécules et de copies de ces fragments.

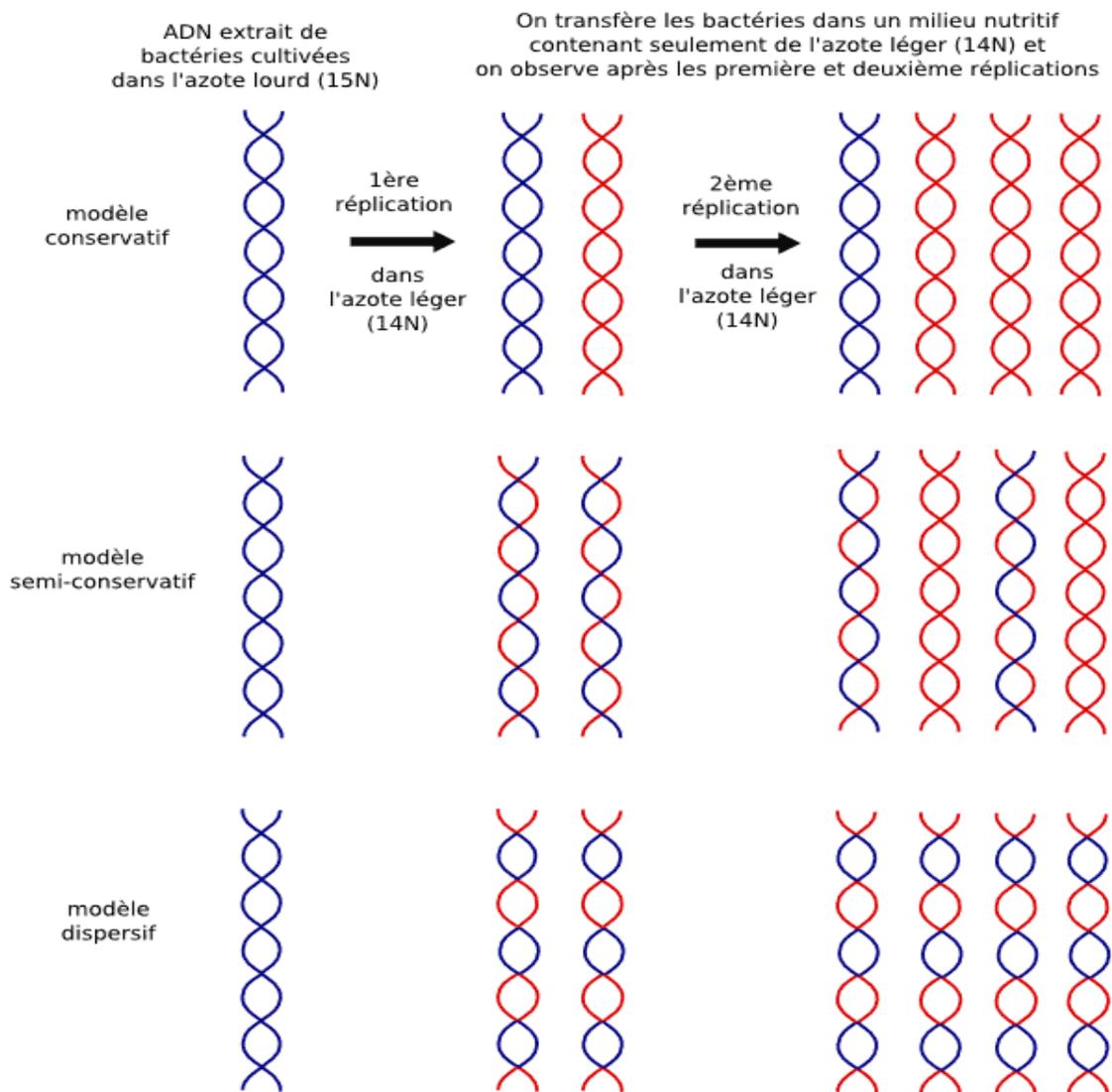
L'expérience :

Des bactéries sont cultivées sur un milieu ne contenant que de l'azote lourd (^{15}N , sachant que l'azote « naturel » est ^{14}N). Leur ADN est donc composé avec des atomes d'azote lourd.

Ces bactéries sont ensuite placées sur un milieu ne contenant que de l'azote léger ^{14}N . L'ADN maintenant synthétisé sera donc constitué d'azote ^{14}N , le seul présent dans le milieu. Les divisions des bactéries sont synchronisées.

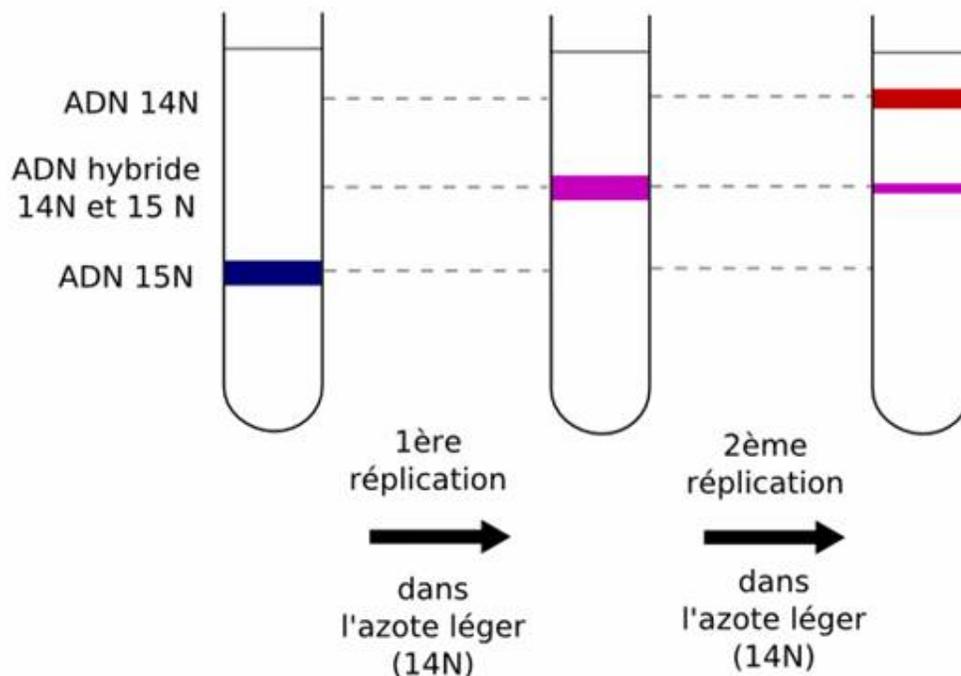
Le schéma suivant présente les molécules d'ADN suivant les trois hypothèses :

L'azote lourd est représenté en bleu et l'azote léger en rouge.



Résultats :

Pour savoir quel modèle est le bon, l'ADN des bactéries est extrait après la première, la deuxième et la troisième réplication (rappelons nous que les divisions ont été synchronisées donc toutes les bactéries sont au même stade de leur cycle cellulaire en même temps), placé dans une solution de chlorure de Césium et centrifugé. La position des ADN est repérée par une mesure de la densité optique. Cette manipulation permet de séparer les molécules d'ADN selon leur poids. Le résultat est le suivant :



Après la 1^{ère} division (donc première réplication de l'ADN), il n'y a que de l'ADN hybride (contenant ^{14}N et ^{15}N). Ensuite, après la deuxième réplication, il y a de l'ADN hybride et de l'« ADN ^{14}N ». Cette configuration ne peut correspondre que à l'hypothèse du modèle semi-conservatif.

L'expérience de Meselson et Stahl démontre donc que la réplication de l'ADN se fait selon un modèle semi-conservatif.