



BIOLOGIE MOLÉCULAIRE


Pr. BENIDIRE
GAB. 2019/2020

PLAN DU COURS

- **Chapitre.1**

- Structure des acides nucléiques & relations structure / fonction.

- **Chapitre.2**

- Transcription & traduction
 - Cycle cellulaire & réplication de l'ADN
- 

PLAN DU COURS

○ Chapitre.3

- Systèmes de mutation & de réparation de l'ADN in vivo.

○ Chapitre.4

- Biologie moléculaire des Procaryotes

○ Chapitre.5

- Outils, techniques & applications de biologie moléculaire.

OBJECTIFS DU COURS :

1. Les bases essentielles de la Biologie Moléculaire.
2. Une compréhension spécifique des mécanismes moléculaires.
3. La capacité d'analyser ces différents processus moléculaires.
4. Une compréhension globale de l'importance des techniques de Biologie moléculaire dans la Biotechnologie.

INTRODUCTION

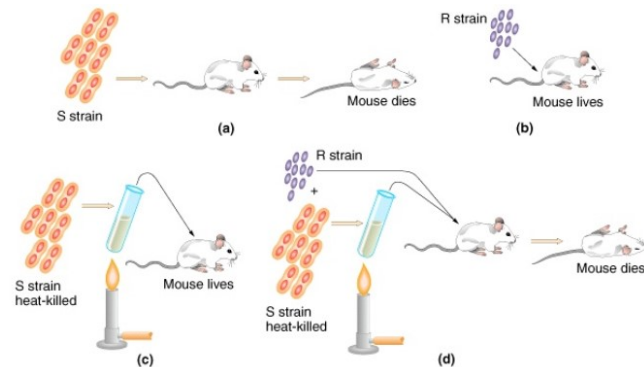
- La variété des organismes vivants est extraordinaire, on estime qu'il y a de nos jours plus de 10 millions d'espèces.
- Chaque espèce est différente des autres. Cette différence est due au contenu en information génétique de chaque espèce.
- Les généticiens ont envisagé que des molécules spécifiques étaient porteuses de cette information génétique.
- Les êtres vivants sont subdivisés en deux groupes: les eucaryotes et les procaryotes, se différencient par la présence ou non d'un noyau.

INTRODUCTION: Quelques dates

- **En 1869: Fredrich Micher** utilisa une protéase (pepsine: découverte en 1836) pour séparer le noyau du cytoplasme. Il a observé une petite tache de poudre grise qui s'était détachée d'un liquide clair jaunâtre (cytoplasme). Il l'appela nucléine.
- **En 1889:** Le biologiste **Altman** a précisé que la nucléine c'est un acide nucléique.

INTRODUCTION: Quelques dates

- **En 1928:** L'expérience de **Griffith** a montrée que l'injection de Pneumocoques (S) entraîne la mort de la souris, alors que les pneumocoques (R) sont non pathogènes. La co-infection par des (R) vivants et des (S) tués par la chaleur entraîne la mort de la souris mettant en évidence la «transformation» des (R) par les (S).



INTRODUCTION: Quelques dates

- **En 1950:** **Chargaff** a fait l'équivalence en bases dans l'ADN des animaux, végétaux, bactéries et phages.
- En conclusion il a trouvé que :
 - Le rapport $A + G / T + C \approx 1$ (purines / pyrimidines ≈ 1) chez tous les organismes testés.
 - Le rapport AT / GC est variable selon les espèces.
- **En 1952-1953:**
 - **Franklin** a obtenu une excellente photographie d'ADN par diffraction des rayons X.
 - La même année **Watson et Crick** utilisant les données de **Chargaff** et l'image obtenue par **Franklin** ont établi le modèle de la double hélice.

CHAPITRE. 1.

STRUCTURE DES ACIDES NUCLÉIQUES & RELATIONS STRUCTURE / FONCTION.

STRUCTURE DES ACIDES NUCLÉIQUES:

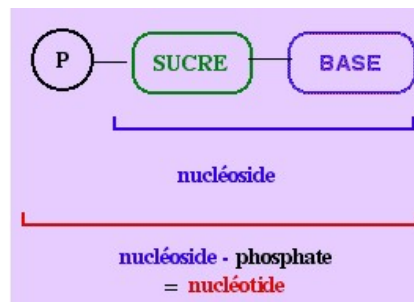
Molécules simples

- Les acides nucléiques ont été isolés initialement des noyaux des cellules.
- On peut en distinguer deux grands types:
 - les **acides désoxyribonucléiques (ADN)**: essentiellement localisés dans le noyau des cellules.
 - les **acides ribonucléiques (ARN)**: essentiellement localisés dans le cytoplasme cellulaire.
 - Ces molécules biologiques (les acides nucléiques) contiennent l'**information génétique**.

STRUCTURE DES ACIDES NUCLÉIQUES:

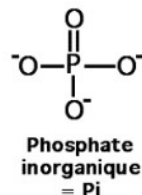
Molécules simples

- Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules composés de molécules simples et comportent des sous-unités appelées **nucléotides**.
- Un nucléotide comporte trois composants:
 - une base
 - un ose,
 - de l'acide phosphorique.

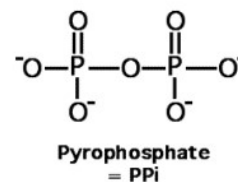


Molécules simples

- **Phosphates**
 - Le phosphate inorganique est un ion stable formé à partir de l'acide phosphorique PO_4H_3 . On l'écrit souvent **Pi**.



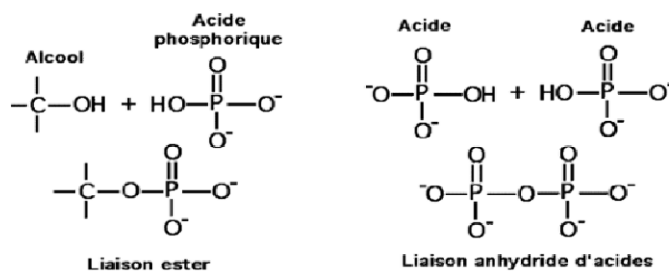
Phosphates



Molécules simples

○ Phosphates

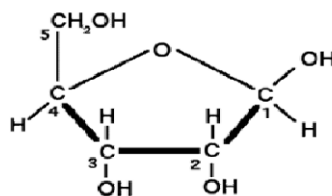
- Des **esters de phosphate** peuvent se former entre un **phosphate** et un groupement **hydroxyle** libre (alcool, émol, phénol...).
- La condensation d'un phosphate et d'un autre acide, par exemple un autre phosphate, donne un **anhydride**.



Molécules simples

○ Ribose, Désoxyribose

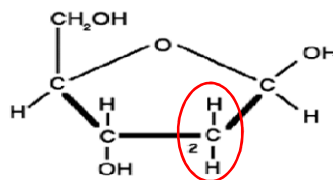
- Le ribose est un pentose de la série D, dont tous les hydroxyles sont orientés à droite (représentation de Fisher).
- Le ribose dans les acides ribonucléiques (RNA), est cyclisé en ribofuranose : anomère β spécifiquement.



Molécules simples

○ Ribose, désoxyribose

- Le désoxyribose, composant des acides désoxyribonucléiques (DNA) est dérivé du ribose par une réduction de la fonction alcool secondaire du carbone n°2.
- Le désoxyribose confère à cet acide nucléique une plus grande stabilité propre à sa fonction de conservation de l'information génétique.

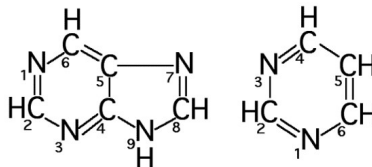


2-désoxy-β-D-Ribose

Molécules simples

○ Purine, Pyrimidine

- Les bases azotées des acides nucléiques appartiennent à deux classes de molécules selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette

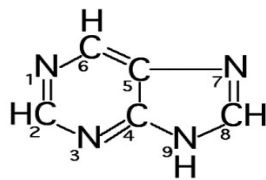


Purine

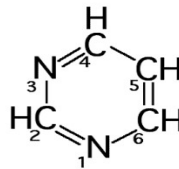
Pyrimidine

- Le noyau pyrimidine est le plus simple : c'est un noyau aromatique à six atomes, quatre carbones et deux azotes ; les deux azotes en position méta (n° 1 et 3).

Molécules simples



Purine



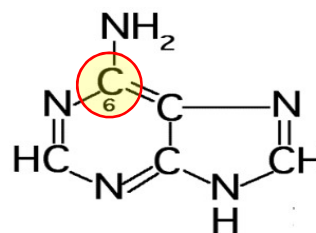
Pyrimidine

- Le noyau purine est constitué de deux noyaux hétérocycliques accolés, un de six atomes et l'autre de cinq atomes, ayant deux carbones en commun au milieu. Par rapport à ces carbones communs, les azotes occupent des positions symétriques (n° 1 et 3 à gauche, n° 7 et 9 à droite)

Molécules simples

○ Bases puriques

- Les bases puriques sont au nombre de 2 : l'adénine et la guanine.
- L'adénine est constituée d'un noyau purine dont le **carbone 6** est substitué par une **fonction amine**. Elle est la seule des bases nucléiques dont la formule ne contient pas d'atome d'oxygène.

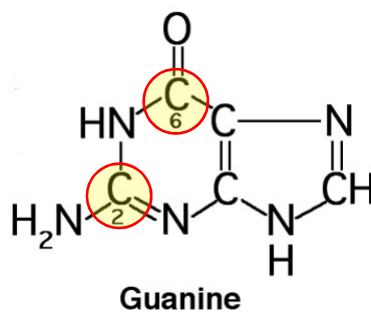


Adénine

Molécules simples

○ Bases puriques

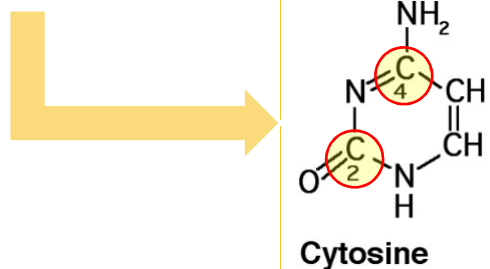
- La guanine est constituée d'un noyau purine dont le **carbone 2** est substitué par une **fonction amine** et le **carbone 6** par une **fonction cétone**.



Molécules simples

○ Bases pyrimidiques

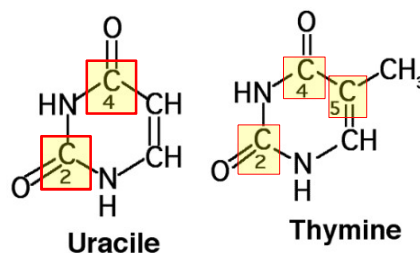
- Les bases pyrimidiques sont au nombre de 3 : la cytosine, l'uracile et la thymine.
- La **cytosine** est constituée d'un noyau **pyrimidine** dont le **carbone 4** est substitué par une **fonction amine** et le **carbone 2** par une **fonction cétone**.



Molécules simples

○ Bases pyrimidiques

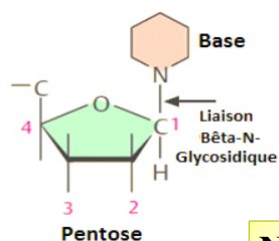
- L'**uracile** est constituée d'un noyau pyrimidine dont les **carbones 2 et 4** portent des **fonctions cétone**.
- La **thymine** est aussi constituée d'un noyau pyrimidine dont les **carbones 2 et 4** portent des **fonctions cétone**, mais dont le **carbone 5** est substitué par un **méthyle**.



Molécules simples

○ Nucléosides et nucléotides

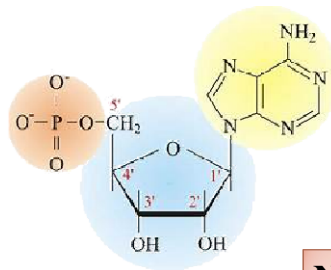
- Le sucre se lie à la base azotée par une liaison impliquant un des azotes (l'azote n°1 des pyrimidines ou azote n°9 des purines) et le carbone 1' de l'ose (carbone réducteur) = C'est une liaison N-osidique.
→ **Nucléoside**



Molécules simples

○ Nucléosides et nucléotides

- La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool primaire (carbone n°5') du sucre et une des trois fonctions acides du phosphate. → **Nucléotide**



Nucléotide

Molécules simples

○ Nomenclature des unités nucléotidiques

- Les bases azotées sont conventionnellement désignées par une initiale
- On désigne par nucléotides les nucléosides monophosphates : AMP ou acide adénylique, dTMP ou acide désoxythymidylique, etc...
- Les nucléosides polyphosphates sont des diphosphates : ADP... ou encore des triphosphates, les plus riches en énergie : ATP; etc..

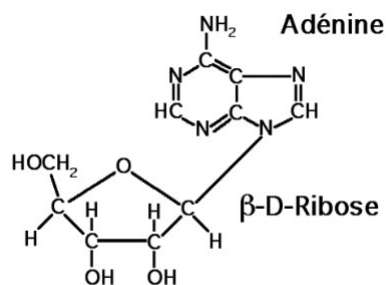
Molécules simples

○ Nomenclature des unités nucléotidiques

- Les acides nucléiques sont formés par une polycondensation de nucléotides AMP, CMP, GMP et UMP pour les acides ribonucléiques, dAMP, dCMP, dGMP et dTMP pour les acides désoxyribonucléiques.

Bases	Nucléosides	Nucléosides 5'-mono, di, triphosphates	Unités nucléotidiques des acides nucléiques
A = Adénine	(désoxy-) adénosine	AMP, ADP, ATP dAMP, dADP, dATP	(d-) adénylate
G = Guanine	(désoxy-) guanosine	GMP, GDP, GTP dGMP, dGDP, dGTP	(d-) guanylate
C = Cytosine	(désoxy-) cytidine	CMP, CDP, CTP dCMP, dCDP, dCTP	(d-) cytidylate
U = Uracile	uridine	UMP, UDP, UTP	uridylate
T = Thymine	désoxy-thymidine	dTMP, dTDP, dTTP	d-thymidylate

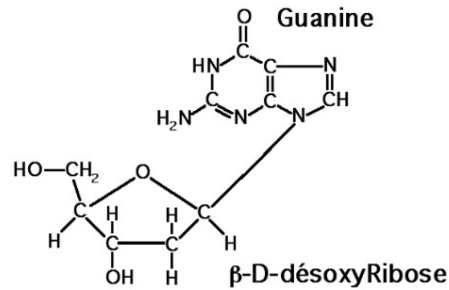
Molécules simples



Adénosine

- Un **nucléoside** est une molécule composée d'un pentose (β-D-ribose ou 2-désoxy-β-D-ribose) lié par une liaison N-osidique à une base azotée.
- Les autres ribonucléosides sont : la guanosine, la cytidine et l'uridine

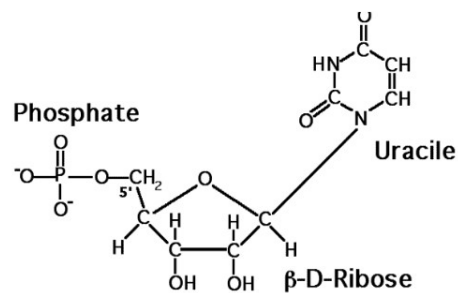
Molécules simples



Désoxyguanosine

- Les autres désoxyribonucléosides sont : la désoxyadénosine, la désoxycytidine et la désoxythymidine, souvent appelée thymidine tout court.

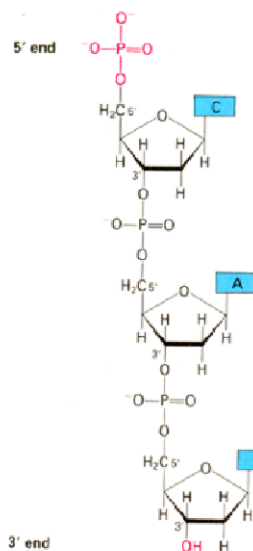
Molécules simples



Uridine Mono Phosphate = Uridylate

- Un nucléotide est une molécule composée d'un nucléoside lié par une liaison ester à un acidephosphorique.
- Les autres ribonucléotides sont: l'AMP, le GMP et le CMP

Notion de séquence

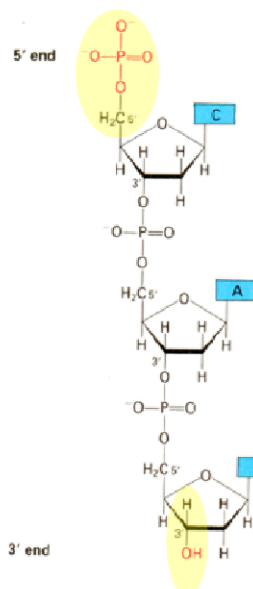


- Les acides nucléiques sont des macromolécules résultant de la condensation de très nombreux nucléotides, liés par des liaisons **phosphodiester**.

→ entre le groupe -OH du carbone 3' et le groupe -H₂PO₄ du carbone 5' de la base suivante

→ ainsi se crée une molécule avec un enchaînement ordonné de nucléotides.

Notion de séquence



- Les liaisons définissent un sens à la molécule : le début étant le nucléotide dont le phosphate en 5' ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en 3' n'est pas estérifiée.

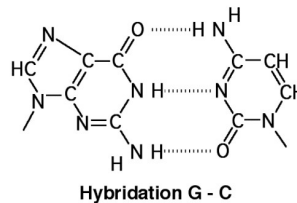
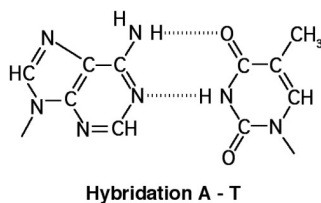
- Par convention on note cet enchaînement de l'extrémité 5' de la molécule jusqu'à l'extrémité 3'.

Exemple de séquence

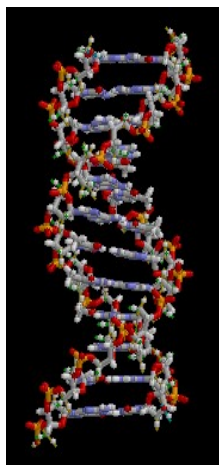
5' AAATTTGCGTTCGATTAG 3'

Notion de séquence: Hybridation

- La structure de l'ADN est double brin, avec deux chaînes anti-parallèles, formant une double hélice.
- Deux types de paires de bases, souvent appelées paires de bases complémentaires prédominants dans la plupart des ADN A-T et C-G.
- AT implique 2 liaisons hydrogènes
- GC implique 3 liaisons hydrogènes



Notion de séquence: Hybridation



- L'appariement de base entre deux purines, deux pyrimidines ou des bases non complémentaires A-C ou G-T est défavorisé, parce que les liaisons hydrogènes appropriées ne peuvent pas se former
- Une conséquence de cette règle d'appariement des bases est que la séquence d'un brin définit la séquence des bases de l'autre brin.
- Dans l'espace, les deux chaînes forment une double hélice.

Principaux types d'acides nucléiques rencontrés dans les cellules

- La molécule d'ADN est constituée en règle générale de deux chaînes (ou brins) de nucléotides.
- Les molécules d'ARN sont le plus souvent sous forme d'un seul brin.

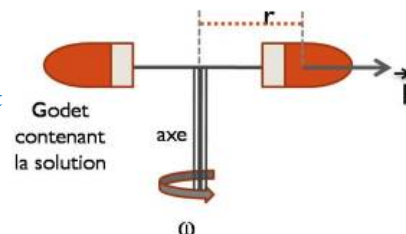
Ultracentrifugation

- Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces :
 - son poids, dirigé vers le bas,
 - la poussée d'Archimède dirigée vers le haut.
 - Selon sa densité, supérieure ou inférieure à celle du milieu, la force résultante sera dirigée vers le bas ou vers le haut. (le corps descendra ou remontera dans le liquide).
- Ce phénomène est la SEDIMENTATION.

Ultracentrifugation

- La pesanteur ne suffit pas pour provoquer la sédimentation des biopolymères .
- Pour réaliser des accélérations importantes, on soumet la solution au champ gravitationnel d'une ultracentrifugeuse.
- L'**ultracentrifugation** est une méthode dont le but est de séparer des particules très fines dispersées dans un liquide.

Sous l'effet de F , les molécules se déplacent vers le fond du godet tournant



Ultracentrifugation

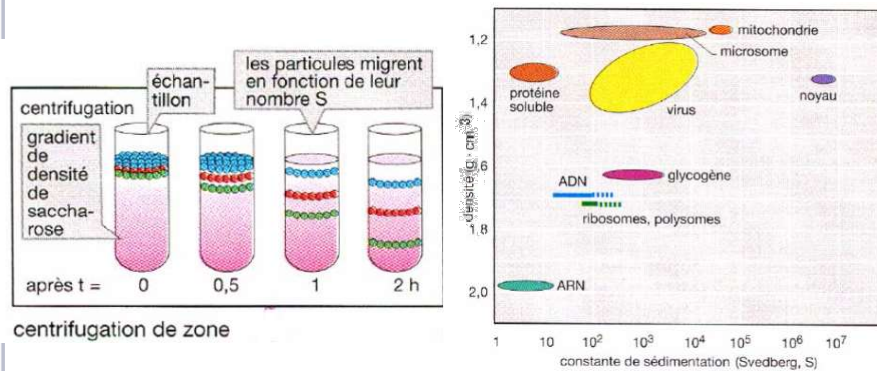
- Les molécules sont séparées selon leur taille, leur forme, leur densité, la viscosité du solvant et la force de centrifugation.
- La Constante de sédimentation dépend :
 - des caractéristiques de la particule
 - du milieu dans lequel elle baigne
 - des caractéristiques de la centrifugeuse

Constante de sédimentation :

$$S = \left(\frac{m^*}{f} \right) = \frac{v_s}{\omega^2 r}$$

L'unité de la constante de sédimentation est le Svedberg : $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ sec}$

Ultracentrifugation

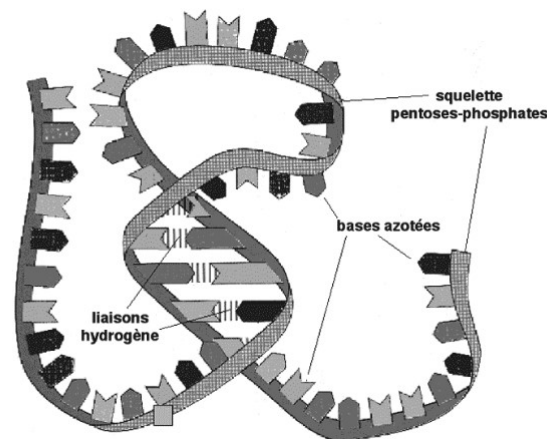


Principaux types d'acides nucléiques rencontrés dans les cellules

- **Structure secondaire du RNA**
- Le RNA diffère du DNA par plusieurs caractères :
 1. il est plus court (70 à 10 000 nucléotides)
 2. le squelette de pentoses et de phosphates contient du **ribose** à la place du **désoxyribose**
 3. parmi les bases azotées **l'uracile** (U) remplace la **thymine** (T)
 4. Les RNA sont simple brin mais certaines régions sont appariées sur une courte distance par leurs bases complémentaires selon un ajustement au hasard (épingles à cheveux).

Principaux types d'acides nucléiques rencontrés dans les cellules

○ Structure secondaire du RNA



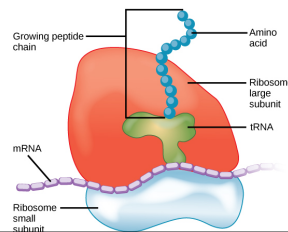
ARN

- Selon leurs fonctions, on distingue plusieurs espèces d'acides ribonucléiques :
 - ARNr = acide ribonucléique ribosomique, qui participe à la structure des ribosomes (ribonucléoprotéines) ; est responsable de la synthèse des protéines.
 - ARNm = acide ribonucléique messager, sont les produits de la transcription des gènes, grâce auxquels les ribosomes reçoivent l'information nécessaire à la synthèse des protéines.
 - ARNt = acide ribonucléique de transfert, transporteur des acides aminés activés pour la traduction ;

ARN

○ ARN ribosomiaux (ARNr) (80% de l'ARN)

- Les ARNr sont localisés au niveau des ribosomes:
- sont en fait des particules à base de 35% de **protéines** et 65% **d'ARN**.
- On peut les isoler facilement à partir de broyats cellulaires par ultracentrifugation. On les désigne pour cette raison par leur constante de sédimentation, exprimée en Svedberg (S)

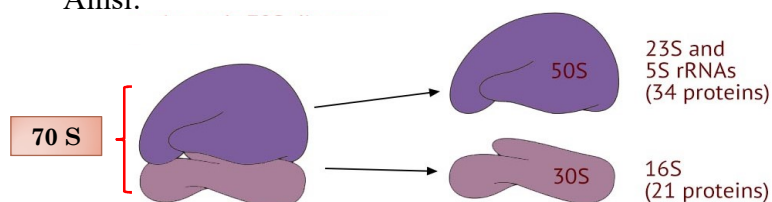


ARN

○ ARN ribosomiaux (ARNr)

Chez les Procaryotes:

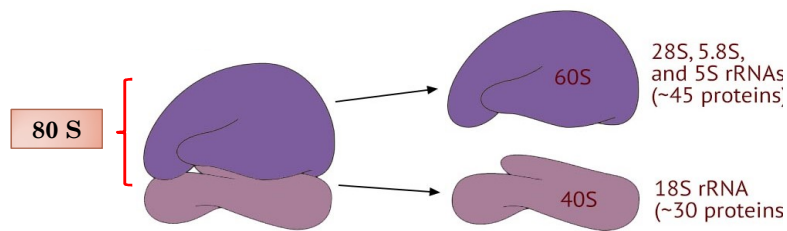
- Les ribosomes ont une constante de sédimentation de 70S.
- On peut les dissocier en 2 sous unités de 50S et 30S (les constantes de sédimentation ne sont pas additives...). Ainsi:



ARN

- Chez les Eucaryotes:

- Les ribosomes ont une constante de sédimentation de 80S \rightarrow 60S + 40 S.

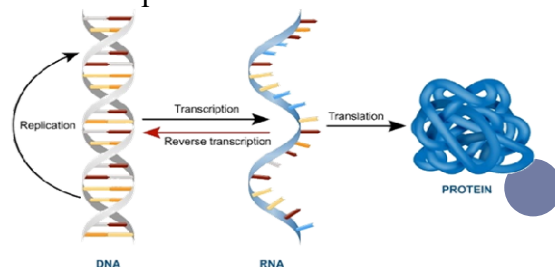


ARN

- **ARN messagers (ARNm) (5% de l'ARN)**

Structure

- Les ARNm sont monocaténares et ont une durée de vie très courte.
- Ce sont des copies en ARN de l'ADN contenu dans les gènes: leur séquence est complémentaire de certaines séquences de l'ADN.



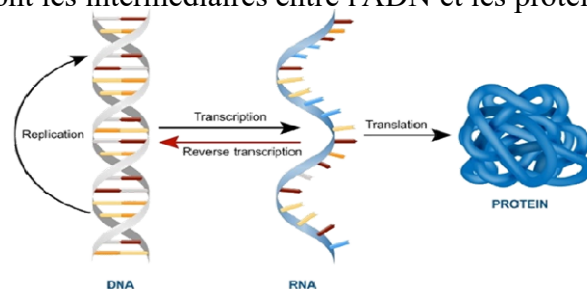
ARN

Localisation des ARNm

- Ces copies d'ADN sont réalisées dans le noyau, puis exportées dans le cytoplasme, où elles sont ensuite traduites en protéines grâce aux ribosomes.

Fonction des ARNm

- Ils sont les intermédiaires entre l'ADN et les protéines.

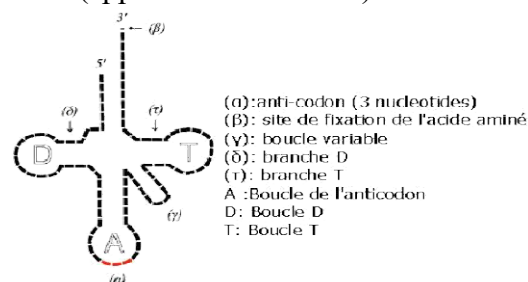


ARN

○ ARN de transfert (ARNt) (15% de l'ARN)

Structure

- Ils présentent plusieurs particularités structurales liées à leur fonction:
- petite taille: de 73 à 93 nucléotides.
- structure typique en trèfle, avec de nombreuses régions en structure II (appariement de bases).

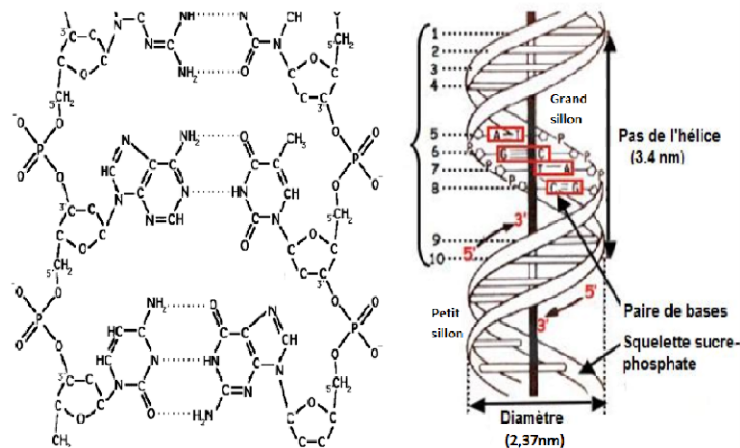


ARN

Localisation et fonction des ARNt

- Les ARNt sont synthétisés, à partir de l'ADN, dans le **noyau** des cellules Eucaryotes. Ils passent ensuite dans le **cytoplasme**, où ils jouent un **rôle** fondamental dans la **traduction**.
- ils apportent les acides aminés aux ribosomes pour construire les protéines.
- Ils sont qualifiés d'adaptateurs. Il existe une soixantaine d'ARNt différents.

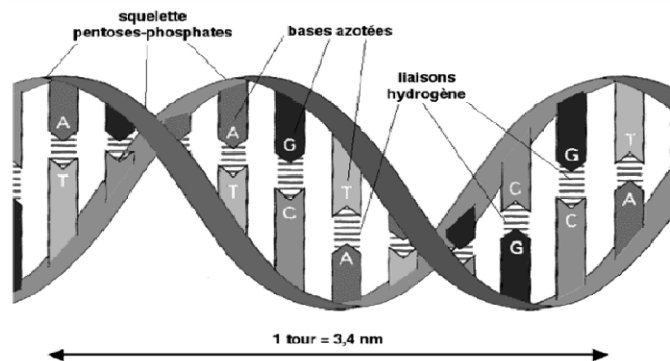
ADN=Acide désoxyribonucléique



- La structure secondaire du ADN est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre.
- Chacun des deux brins est orienté ($5' \rightarrow 3'$) dans le sens opposé à celui de l'autre brin ($3' \rightarrow 5'$). On dit qu'ils sont **antiparallèles**.

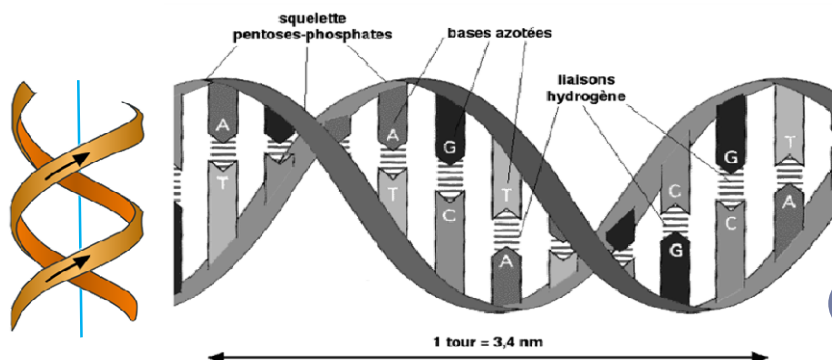
ADN=Acide désoxyribonucléique

- Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc.). On dit que les bases successives de chacun des brins sont **complémentaires**.



ADN=Acide désoxyribonucléique

- Elles s'enroulent autour d'un axe imaginaire pour constituer une double hélice à rotation droite (Forme B).
- La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice.

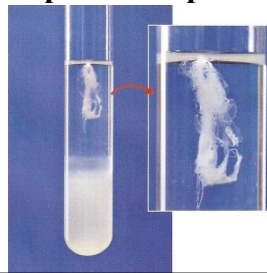


Propriétés physico-chimiques de l'ADN

○ Solubilité

- L'ADN devient un sel d'acide en milieux aqueux et est ainsi soluble.
- Il précipite en présence d'éthanol et d'une forte concentration saline.

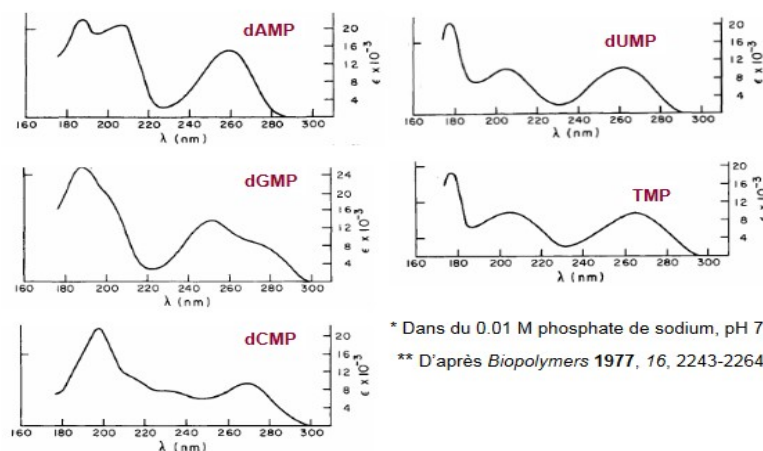
→ Cette propriété permet sa purification.



Propriétés physico-chimiques de l'ADN

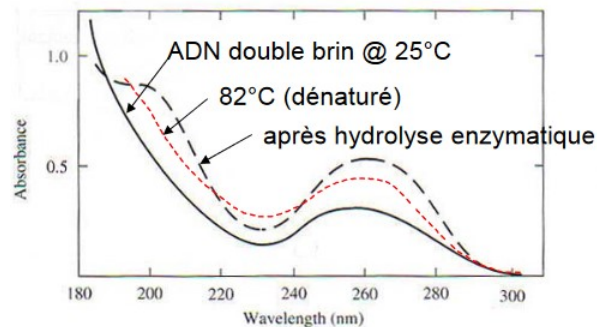
○ Absorption de la lumière ultraviolette

Spectres d'absorption des nucléotides



Propriétés physico-chimiques de l'ADN

- L'ADN dans sa forme native (double brin) absorbe moins par nucléotide à **260 nm** que la forme dénaturée (chaînes individuelles).



(D'après I. Tinoco, K. Sauer & J.C. Wang, *Physical Chemistry: Principles & Applications in Biological Sciences*, 3^e éd, 1995)

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

- La propriété d'absorption des purines et pyrimidines dans l'UV à **260 nm**, et les protéines à **280 nm** permet :
 - de doser les acides nucléiques (**C: concentration**),
 - et aussi d'estimer la contamination par les protéines lors de la purification des acides nucléiques.

$$C = A_{260} \cdot DF \cdot 100 \quad (\text{unité: } \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad A: \text{Absorbance, DF: facteur de dilution})$$

$$P_{(\text{pureté})} = A_{260} / A_{280} \quad (\text{Une solution d'ADN est considérée pure si } 1.7 \leq P \leq 2)$$

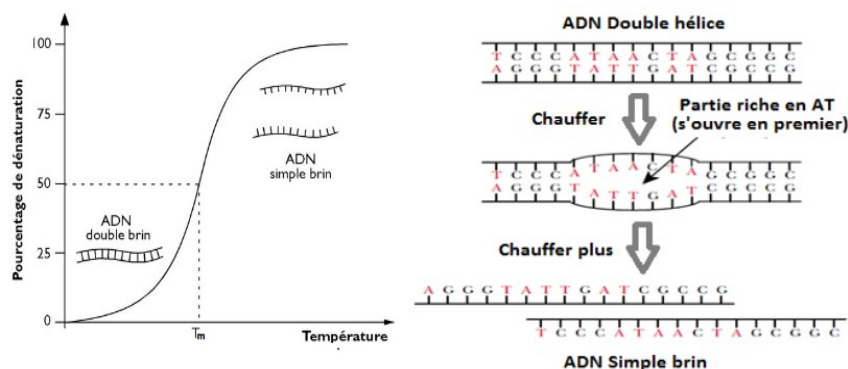
Propriétés physico-chimiques de l'ADN

○ Dénaturation thermique

- Si une solution d'ADN est chauffée, à une certaine température, les liaisons hydrogène qui assurent la cohésion des 2 brins appariés se rompent.
- La dénaturation thermique correspond au fait que les deux brins de l'hélice se dissocient par l'action de la chaleur.
- La température de fusion ou **T_m** est la température à laquelle la molécule d'ADN est à moitié désappariée

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

- Les régions riches en A et T s'ouvrent plus rapidement que celles riches en C et G
- Il y a une augmentation de l'absorption à **260 nm**.



Propriétés physico-chimiques de l'ADN

- La dénaturation et la renaturation des brins d'ADN en solution sont des propriétés critiques pour diverses fonctions biologiques normales (réplication; transcription ...etc.)

- **Facteurs de variation du T_m d'un ADN**

La température de fusion est influencée par plusieurs facteurs:

- le T_m dépend du **pH** et de la force ionique.
- le T_m dépend de **la teneur de l'ADN en GC**: le T_m augmente de 0,4°C lorsque le % de GC augmente de 1%.

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

- **Facteurs de variation du T_m d'un ADN**

- T_m dépend de la **longueur** de la molécule d'**ADN**, en effet les petites molécules sont moins stables et ont donc une température de fusion plus faible.

- **Applications**

- la mesure du T_m permet d'avoir une idée de la composition en bases de l'ADN.
- le % en GC est utilisé comme critère de classification des bactéries. En effet, des espèces d'un même genre bactérien ont des % en GC proches.

Propriétés physico-chimiques de l'ADN

○ Renaturation

- Une solution d'ADN dénaturée peut être Renaturée.

2 cas sont possibles:

- Refroidissement rapide: L'ADN reste dénaturé en grande partie.
- Refroidissement lent: Les 2 brins complémentaires se réassocient et on retrouve l'ADN db de départ. L'ADN est dit renaturé ou encore rehybridé

Topoisomères

Définition

- On considère 2 molécules d'ADN bicaténaire circulaire ayant exactement la même séquence de bases. Elles peuvent différer entre elles par ce que l'on appelle le nombre d'enlacements (surenroulement), c'est-à-dire le nombre de **tours** que fait l'un des brins autour de l'autre brin.
- On appelle alors «topoisomères» 2 ADN ne différent que par le nombre d'enlacements.

Topoisomères

Différents états de topoisomère

➤ **État relâché:**

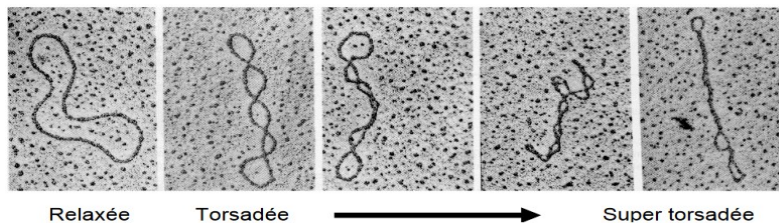
la contrainte (ou la tension) est minimale. C'est la configuration la plus stable de la double hélice et c'est celle qui est adoptée le plus souvent par l'ADN dans la cellule. Elle s'observe pour 10 pb par tour.

➤ **État surenroulé:**

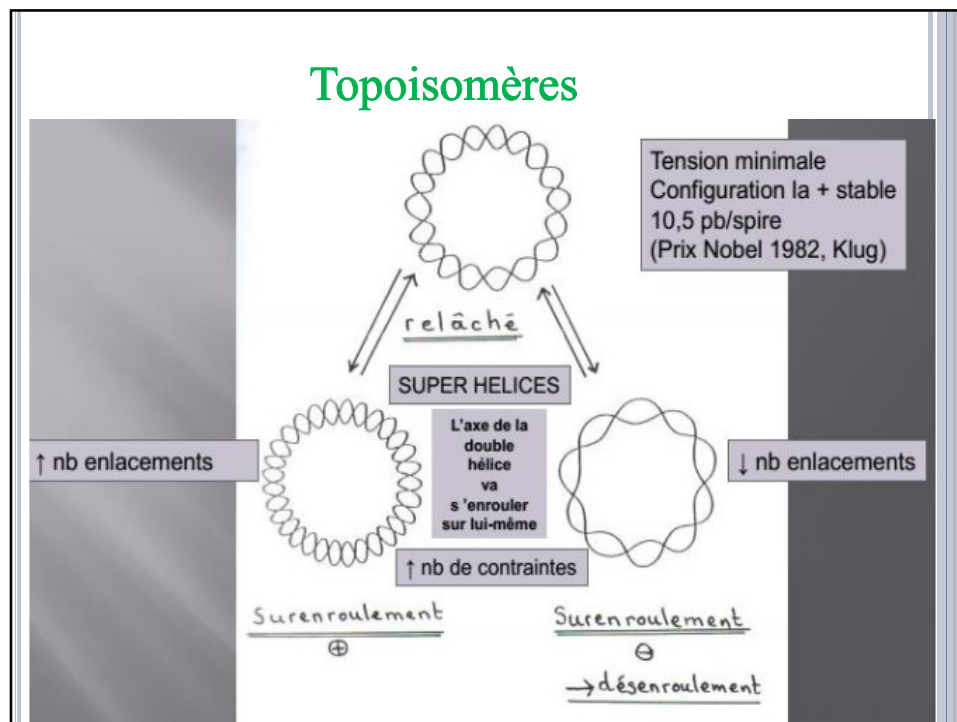
l'axe de l'hélice peut s'enrouler sur lui-même en formant une superhélice. Il existe deux possibilités de surenroulement.

Topoisomères

- **Surenroulement positif**: une augmentation du nombre d'enroulements dans **la même direction** que la rotation de l'hélice B (rotation droite).



- **Surenroulement négatif**: l'axe de l'hélice s'enroule dans le sens opposé à celui de la double hélice, selon une superhélice «négative», gauche → Il y a donc au niveau de l'ADN relâchement.



Topoisomérase

○ Définition

Ce sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements. Elles peuvent introduire ou éliminer des supertours dans une double hélice d'ADN.

→ Pour modifier le nombre de supertours, il faut obligatoirement couper 1 ou 2 brins.

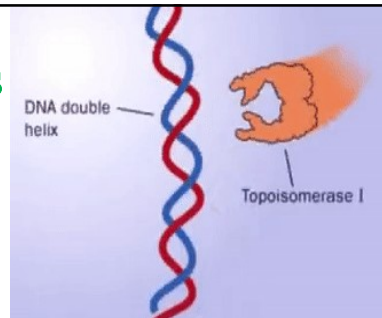
Topoisomères

○ Les différentes topoisomérases

Il en existe de 2 types:

○ Les topoisomérases I:

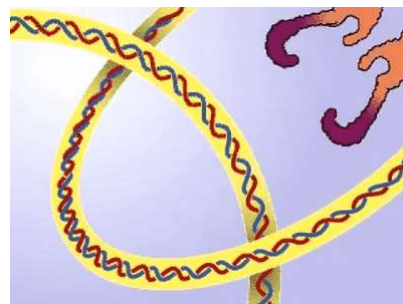
- Elles ne coupent qu'un brin de l'ADN bicaténaire.
- La coupure d'un des brins se fait au niveau d'une liaison phosphodiester,
- Le brin coupé peut alors tourner librement autour du brin intact, puis la liaison phosphodiester est rétablie.
- Ces topoisomérases peuvent agir sur de l'ADN superenroulé positif ou négatif.



Topoisomères

○ Les topoisomérases II :

Elles coupent de manière transitoire les deux brins de l'ADN, puis les ressoudent et agissent uniquement sur l'ADN superenroulé négatif.



○ Rôle des topoisomérases

- Les deux types de topoisomérases ont une importance capitale dans la réplication, la transcription et la recombinaison de l'ADN. chez les procaryotes et les eucaryotes.

CHAPITRE.2

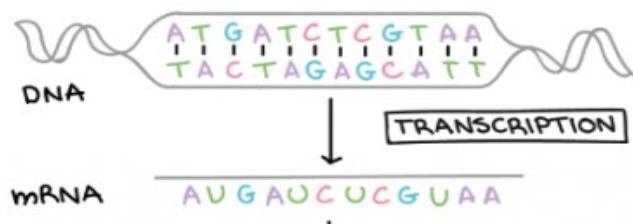
EXPRESSION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Transcription

Transcription

DEFINITION

- La transcription est un mécanisme faisant intervenir un système enzymatique, qui convertit l'information génétique d'un segment d'ADN en un brin d'ARN complémentaire (simple brin).
- Cette molécule est appelée transcrit.



Transcription

Gènes

- Il y a 3 milliards de paires de bases (pb) dans le génome mais toute l'information n'est pas transcrite.
- Les portions qui sont transcrites sont appelées les **gènes**.

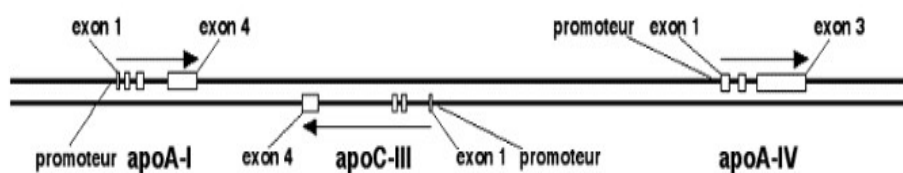
Définition:

- Le gène est l'unité fonctionnelle de l'information génétique. Il est constitué d'un ensemble de nucléotides qui contient toutes les informations nécessaires pour transcrire un ARNm

Transcription

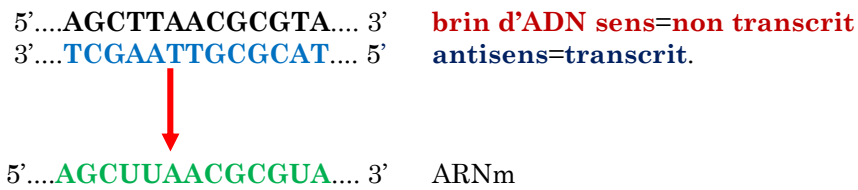
Brin sens & Brin antisens

- Tout l'ADN n'est pas transcrit seuls les gènes = exons.
- En plus même si l'ADN est double brin seul un brin est transcrit ou copié en ARNm.
- Les gènes sont situés sur les deux brins de l'ADN, de gauche à droite ou de droite à gauche, indifféremment.



Transcription

- Le ARNm est complémentaire et antiparallèle au brin d'ADN transcrit (nommé: Brin antisens)
- Le ARNm est identique à l'autre brin non transcrit (nommé: Brin sens).



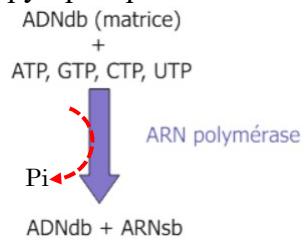
Transcription

Les Elements Necessaires

Les Ribonucleotides

- Pour la synthèse d'ARN, les ribonucléotides rentrent sous forme triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP),

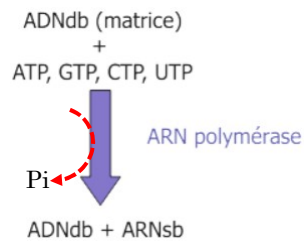
ce qui amène l'énergie nécessaire à la polymérisation par libération d'un pyrophosphate.



Transcription

◦ L'ARN polymérase ADN-dépendante

- L'ADN double brin sert de matrice à l'ARN polymérase qui synthétise un ARN simple brin dans le sens 5'→3' grâce à l'énergie apportée par le relargage du phosphate.



[!] L'ARN polymérase n'a pas de fonction d'édition!!

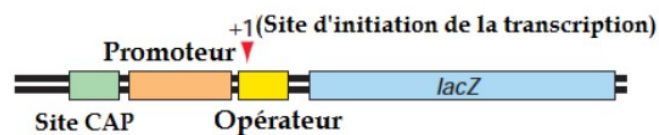
Transcription

◦ Rôle ARN polymérase

L'ARN polymérase assume de multiples fonctions dans le processus de la transcription:

- Elle cherche les promoteurs

Promoteur: Site sur l'ADN d'une centaine de bases auquel l'ARN polymérase (ainsi que les facteurs d'initiation requis) se fixe pour commencer la transcription.



Transcription

○ Rôle ARN polymérase (suite)

- Elle déroule le fragment à transcrire pour produire une matrice simple brin
- Elle sélectionne les NTPs corrects et catalyse la formation des liaisons phosphodiester.
- Elle détecte les signaux de terminaison.
- Elle interagit avec les protéines de régulation de l'expression génétique (activateurs, répresseur).

Transcription

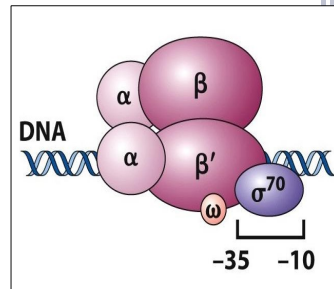
- Les ARN polymérases réalisent les mêmes réactions dans toutes les cellules procaryotes et eucaryotes.

Chez les procaryotes

- Il n'existe qu'une seule ARN polymérase, constituée de plusieurs sous unités: α_2 , β , β' et σ (\rightarrow c'est un complexe multimérique).
- Cette enzyme a deux dénominations: enzyme cœur ou holoenzyme, selon sa constitution

Transcription

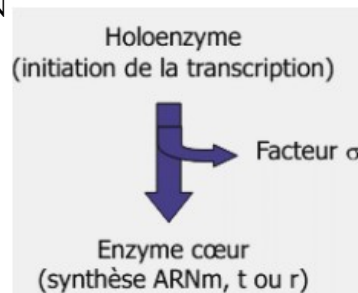
- Au niveau de ARN polymérase II existe :
- **2 α** : Assemblage de l'enzyme, assure la liaison au promoteur.
- **1 β** : Assure la liaison des nucléotides.
- **1 β'** : Assure la liaison à la matrice d'ADN.
- **1 σ** : Assure la reconnaissance du promoteur, initiation de la transcription.



Transcription

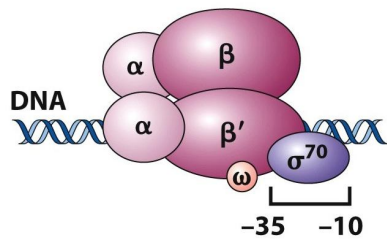
Chez les procaryotes (suite)

- Le complexe **holoenzyme** correspond à l'association des sous unité, α_2 , β , β' et σ . Il initie la transcription.
- Puis le facteur σ est relargué pour former l'**enzyme cœur** (constituée des sous unités α_2 , β et β'), qui synthétise tous les ARN



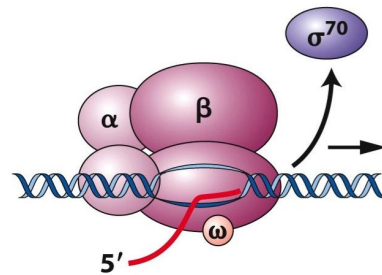
Transcription

(a) RNA polymerase binding to promoter



Complexe Holoenzyme

(b) Initiation



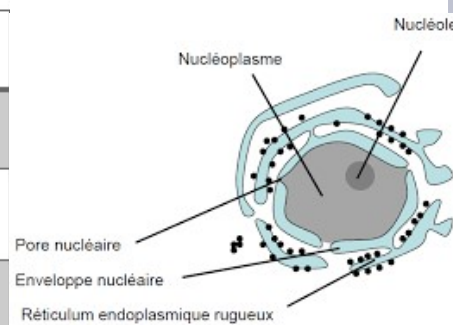
Enzyme Cœur

Transcription

ARN polymérase Chez les eucaryotes

- Il existe 3 ARN polymérase différentes, localisées dans le noyau cellulaire. Chacun de ces ARN est spécialisé dans la synthèse de certains transcrits.

3 Enzymes	Localisation nucléaire
ARN Polymérase I	Nucléole
ARN Polymérase II	Nucléoplasme
ARN Polymérase III	Nucléoplasme



Transcription

- **ARN-polymérase I** synthétise les ARN ribosomiques (18 S, 5.8 S, 28 S).
- **ARN-polymérase II** synthétise les RNA messagers qui contiennent l'information destinée à la traduction et certains des ARNsn.
- **ARN-polymérase III** synthétise les petits ARN (ARNt, ARNr 5 S, ARNsn).
- **RNA-polymérase IV** spécialisé dans la transcription de l'ADN mitochondrial.

Transcription

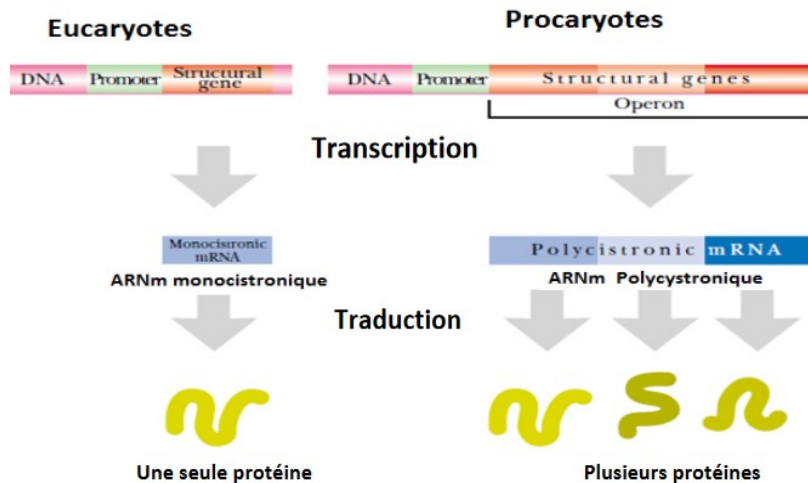
🔍 [!] La transcription chez les **procaryotes**

- ce fait au niveau du **cytoplasme**,
- elle est **polycistronique** → car plusieurs gènes peuvent être transcrit par la même polymérase.

🔍 [!] Par contre chez les **eucaryotes**

- elle se fait au niveau du **noyau**,
- et une polymérase transcrit un seul gène, on dit qu'elle est **monocistronique**

Transcription



Synthèse monocistronique (eucaryotes) et polycistronique (procaryotes) de l'ARNm (Clark, 2005).

Transcription

- La synthèse de l'ARN:
 - Ne nécessite pas d'amorce
 - Se fait dans le sens 5'→3'
 - Se fait de manière antiparallèle à l'ADN matrice et complémentaire de l'un des deux brins de l'ADN
 - Incorpore des ribonucléotides
 - Hybride ARN/ADN grâce à des liaisons hydrogènes entre dNT et NT

ADN		ARN
G	←→	C
C	←→	G
T	←→	A
A	←→	U

Transcription chez les procaryotes

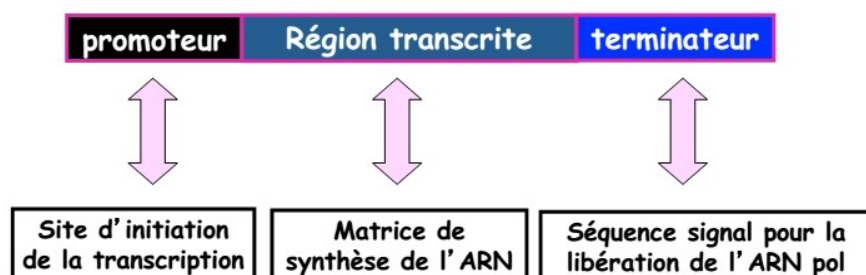
- La synthèse de l'ARN, comme presque toutes les réactions biologiques de polymérisation comprend trois étapes:
- l'**initiation**,
- l'**élongation**,
- et la **terminaison**.

Transcription chez les procaryotes

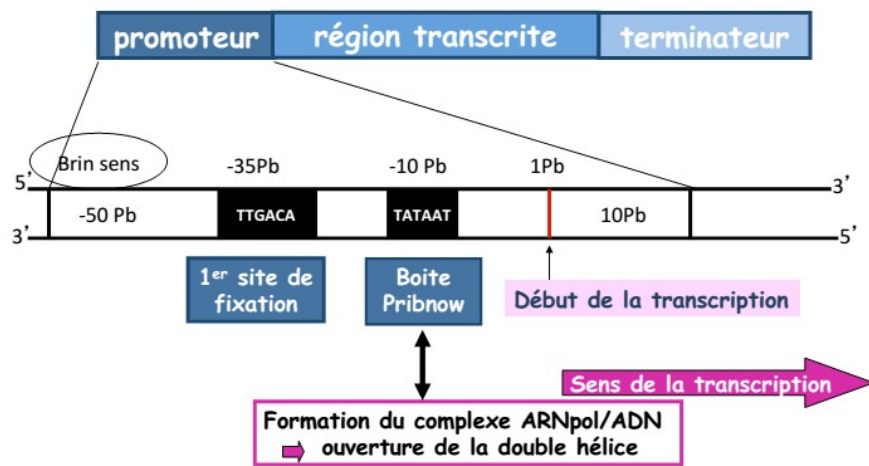
1. Initiation

- ARN polymérase se fixe à l'ADN au niveau d'une courte séquence d'ADN placée juste avant le début du gène = **promoteur** reconnu par le facteur σ .

1. Organisation d'un gène bactérien



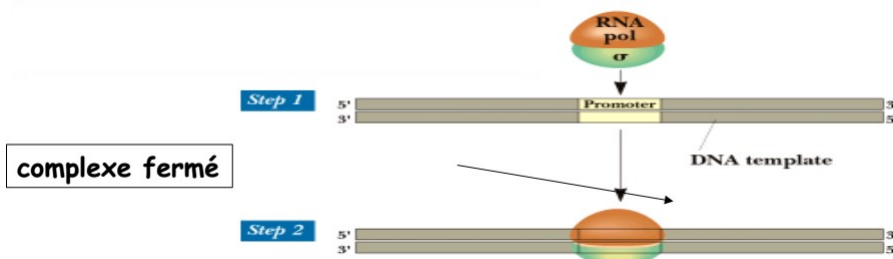
Transcription chez les procaryotes



Transcription chez les procaryotes

Reconnaissance des séquences promotrices

- L'ARN polymérase sous forme **holoenzyme** reconnaît et se fixe sur la séquence **-35** de l'ADN génomique, on obtient un complexe binaire (dit fermé) : enzyme+ ADN.
- Ensuite, l'ARN polymérase migre et se déplace jusqu'au promoteur **-10** (boite de Pribnow).

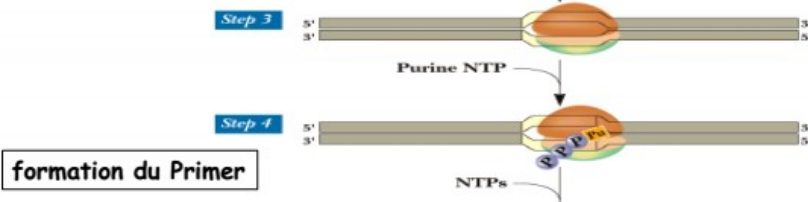


Transcription chez les procaryotes

Début de la polymérisation

- L'ARN polymérase ouvre la double hélice de l'ADN génomique sur une courte région.
- On a donc un passage à l'état simple brin, pour permettre la lecture de l'ADN par l'ARN polymérase

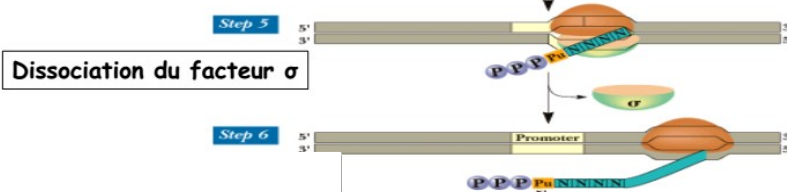
complexe ouvert



Transcription chez les procaryotes

Début de la polymérisation

- L'initiation va durer le temps que la polymérase associe 7 ou 8 ribonucléotides sous forme d'un polymère hybridé au brin matrice.
- Le facteur σ va être libéré.
- L'ARN polymérase adopte donc sa conformation cœur, pour poursuivre la synthèse de l'ARN.

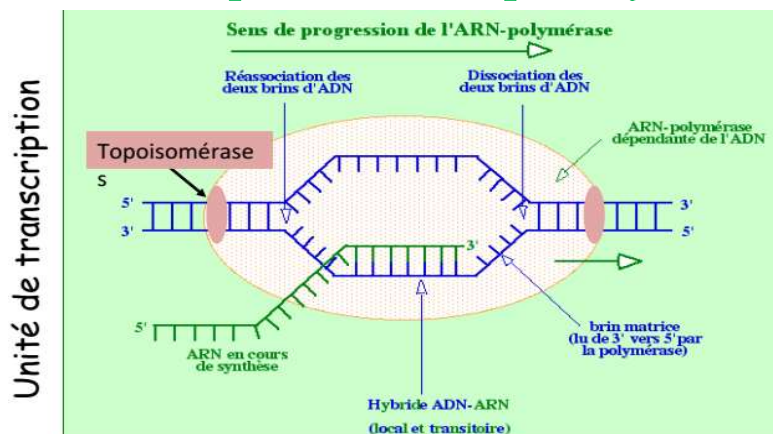


Transcription chez les procaryotes

2. Élongation

- La synthèse par l'ARN polymérase cœur dans le sens $5' \rightarrow 3'$,
 - avec une progression de l'ARN polymérase et de la **boucle de transcription** en supprimant les liaisons hydrogène.
 - Une fois la séquence transcrite, l'ADN se renature spontanément.
- La polymérase parcourt le gène entier jusqu'à rencontrer une séquence dite de **terminaison**.

Transcription chez les procaryotes



- [!] Topoisomérases précèdent et suivent la polymérase
- [!] La transcription par la polymérase se fait à une vitesse d'environ 30 nucl/sec.
- [!] Le premier NT est sous forme triphosphate.

Transcription chez les procaryotes

3. Terminaison de la transcription

- Processus conduisant à la dissociation des sous unités de l'ARNp après la rencontre des signaux de terminaison.

Deux mécanismes:

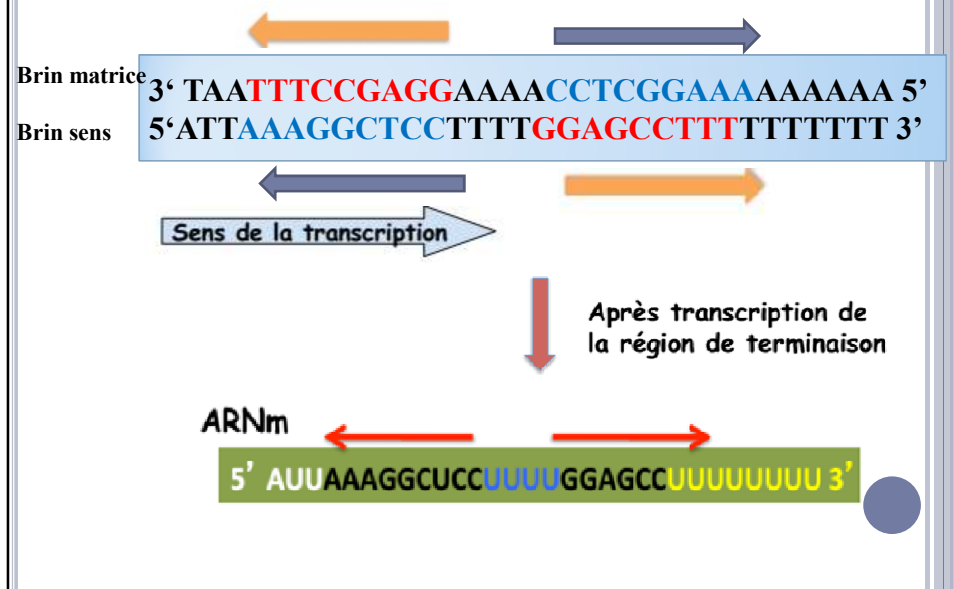
- **Mécanisme direct** : Rho indépendant.
- **Mécanisme indirect** avec une protéine Rho à activité ATPasique: Rho dépendant.

Transcription chez les procaryotes

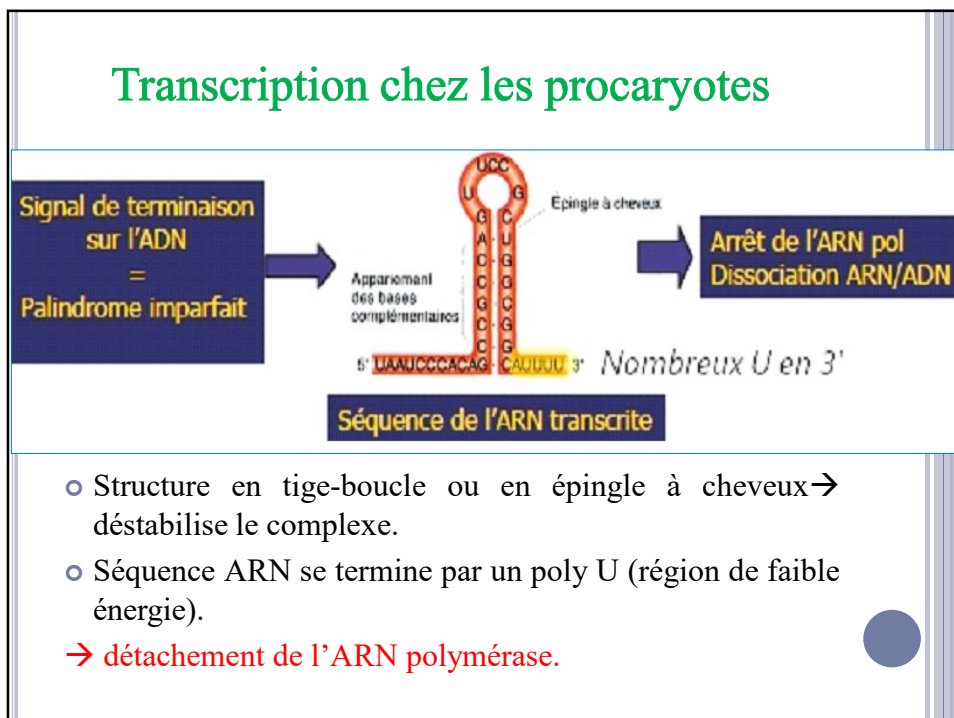
Mécanisme direct : Rho indépendant

- Termineur intrinsèque
- Sites spécifiques de terminaison: constitué de 3 segments caractéristiques (**région palindromique**)
- Deux séquences répétées inversées particulièrement riches en G et C, séparées par un court segment
- cette région **palindromique** est terminée par un segment de bases répétées d'une série de 6 à 8 bases A sur le brin matrice codant pour un poly-U (région de faible énergie)

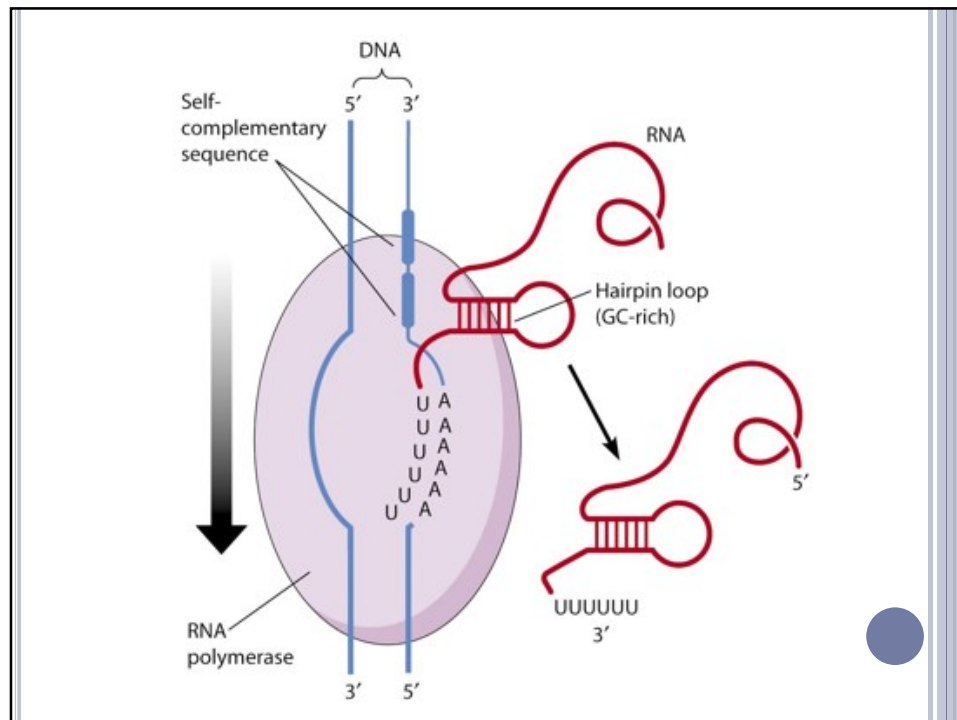
Transcription chez les procaryotes



Transcription chez les procaryotes



- Structure en tige-boucle ou en épingle à cheveux → déstabilise le complexe.
 - Séquence ARN se termine par un poly U (région de faible énergie).
- détachement de l'ARN polymérase.

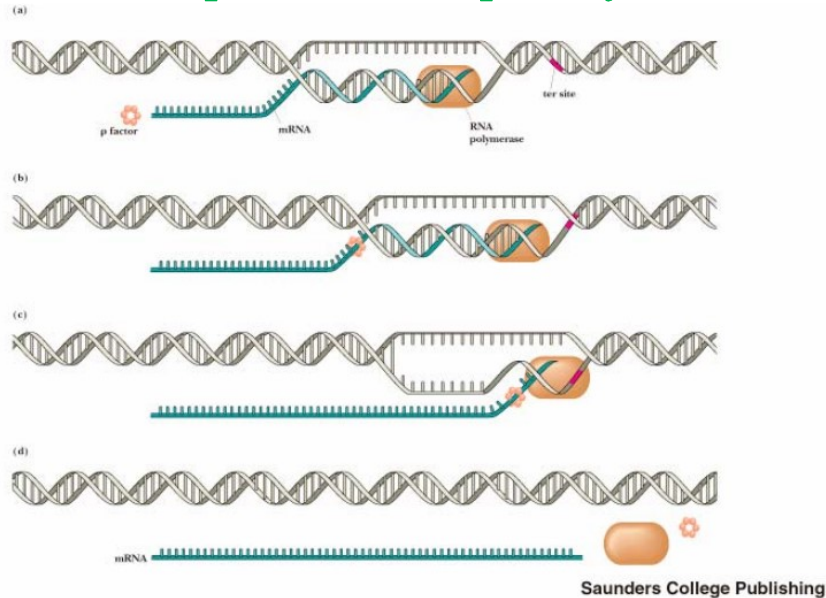


Transcription chez les procaryotes

Mécanisme indirect: Terminaison Rho dépendante

- Hélicase ATP dépendante
- Fixation à l'extrémité 5' de l'ARN,
- Migration le long de l'ARN,
- Localisation du complexe de transcription et le déroule
- ➔ **Libération de l'ARN nouvellement synthétisé**

Transcription chez les procaryotes



Transcription chez les Eucaryotes

Les inhibiteurs spécifiques de la transcription

- **Groupe Rifamycines:**

Inhibiteur de l'ARNp en se fixant sur la sous unité β .

- **Streptomycines:**

Inhibiteur de l'ARNp en se fixant sur la sous unité β (site différent des rifamycines)

- **Actinomycines:**

Inhibition de l'élongation en se fixant à l'ARN sur les paires de bases GC

Transcription chez les Eucaryotes

Différences entre la transcription chez les eucaryotes et les procaryotes:

- **Localisation cellulaire :**

- Chez la bactérie, elle s'effectue dans le cytoplasme.
- Chez les eucaryotes, elle s'effectue dans le noyau cellulaire.

- **ARN polymérase :**

- Chez les procaryotes : 1 seule.
- Chez les eucaryotes : 3 (+1 extra nucléaire)

Transcription chez les Eucaryotes

- Chez les eucaryotes uniquement :

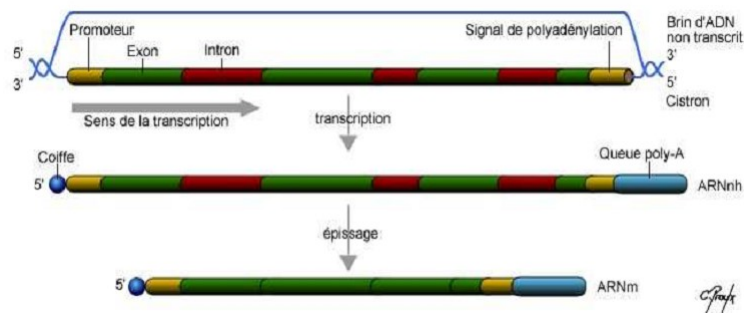
1-Trois étapes: Initiation, élongation et terminaison.

2- Les modifications post-transcriptionnelles

- Événement de **maturation** d'un précurseur d'ARN, qui est appelé transcrit primaire et qui nécessite des modifications pour devenir mature donc fonctionnel.

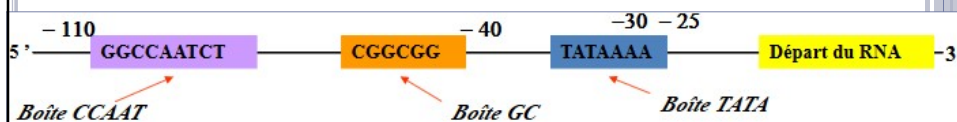
Transcription chez les Eucaryotes

- Particularités du génome des eucaryotes
 - Diploïde
 - Éclaté ou en mosaïque: introns et exons
 - Unité de transcription est monocystronique



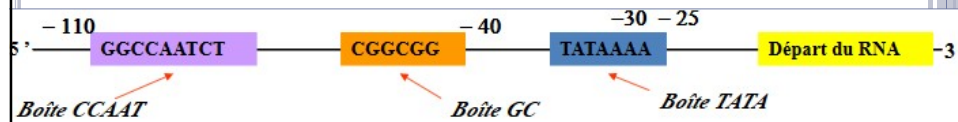
Transcription chez les Eucaryotes

- Structure de promoteur de l'ARN polymérase II



- Boîte TATA riche en thymine et adénine: **TATAAAA**
 - la plus importante, est située vers -25 à -30 nucléotides du site de démarrage de la transcription (noté +1) ;
- Des éléments proximaux : Boîte CAAT et Boîte GC

Transcription chez les Eucaryotes



- Boîte CCAAT (facultative), contenant de la cytosine, est située vers -120 à -80 nucléotides du site de démarrage de la transcription.
 - Boîte GC (facultative également), riche en guanine et cytosine (-40) peut être présente entre la boîte CCAAT et la boîte TATA.
- stabilisation du complexe ADN-ARNp
- régulent la fréquence d'initiation de la transcription.

Transcription chez les Eucaryotes

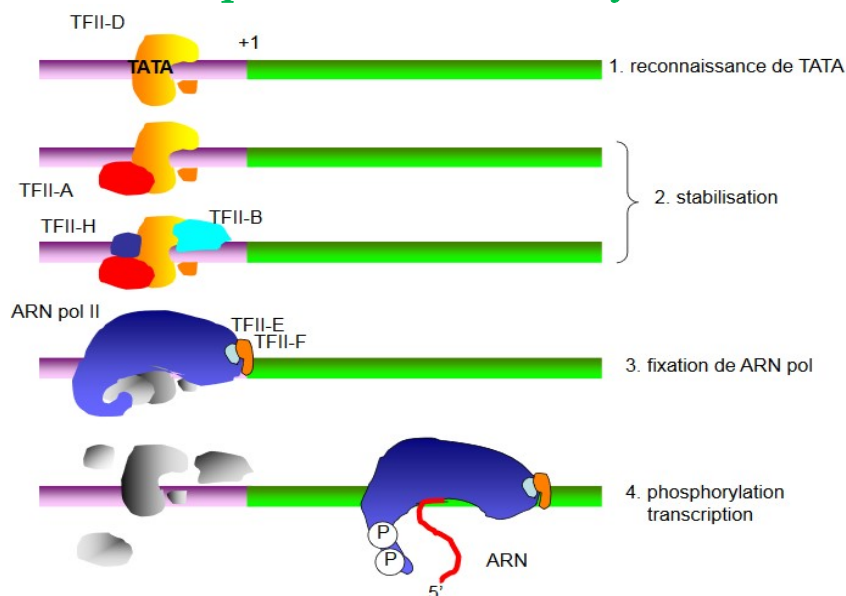
Initiation

- 6 facteurs de transcription généraux ("Transcription Factor" : TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F et TFII-H) doivent d'abord médier la fixation des ARN polymérases et l'initiation de la transcription.
 - Le complexe complet [ARN polymérase+facteurs de transcription+séquence ADN du promoteur]
- est appelé complexe de pré-initiation de la transcription.

Transcription chez les Eucaryotes

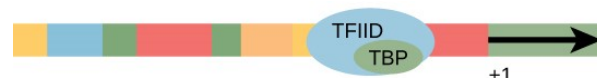
- Ce complexe assure :
 - le chargement précis de l'ARN polymérase II (Pol II) sur le bon site de démarrage de la transcription
 - la déshybridation (ouverture) de l'ADN au niveau du promoteur
 - le relargage de ARN Pol II du promoteur

Transcription chez les Eucaryotes

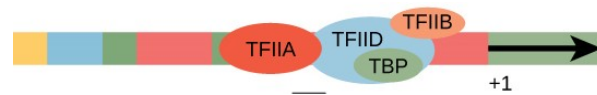


Transcription chez les Eucaryotes

- Certains de ces facteurs ont un rôle particulier :
- Le facteur TFIID: est la première protéine qui reconnaît la séquence de l'ADN initiatrice de la transcription (la boîte TATA).

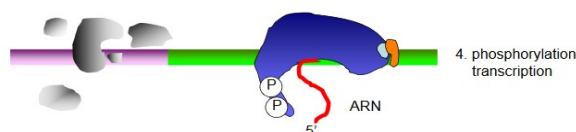


- Le facteur TFIIB semble impliqué dans la sélection précise du site d'initiation (nucléotide à partir duquel se déroule la transcription).



Transcription chez les Eucaryotes

- Le facteur TFIIH
 - une activité **hélicase**: permettant l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau du promoteur,
 - et une activité **kinase** responsable de la phosphorylation de l'ARN polymérase II.
- Cette phosphorylation provoque une modification de la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase qui entraîne la dissociation du complexe d'initiation et le début de la transcription.



Transcription chez les Eucaryotes

Élongation fait intervenir :

- Des facteurs protéiques d'élongation, qui permettent le maintien le plus longtemps possible de l'ARN polymérase II sur l'ADN matrice : ils augmentent la processivité.
- Des topoisomérases, qui permettent l'élimination des surenroulements positifs créés par l'avancée de l'ARN pol II.
- Des facteurs protéiques de correction, qui stimulent la fonction de correction de l'ARN pol II.

Transcription chez les Eucaryotes

La terminaison de la transcription

- Elle s'effectue selon différents processus, qui dépendent de la polymérase employée.
- En ce qui concerne Pol II le signal de terminaison → séquence de 6 pb à la fin du gène reconnue par ARN-endonucléase.
- La terminaison est couplée à la maturation des ARNm (modification post-transcriptionnelle).

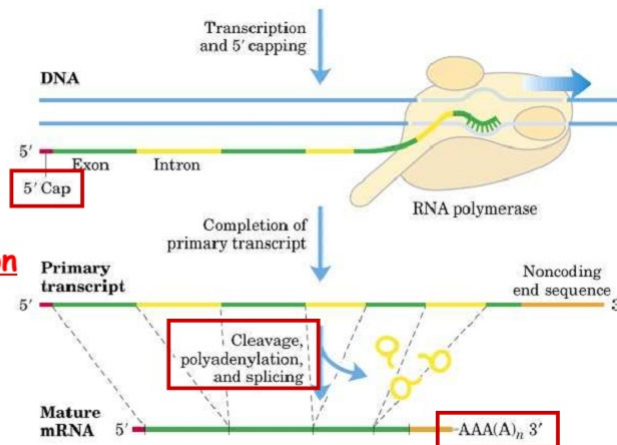
Transcription chez les Eucaryotes

Maturation des Transcrits

• Capping

• Polyadénylation

• Epissage



Transcription chez les Eucaryotes

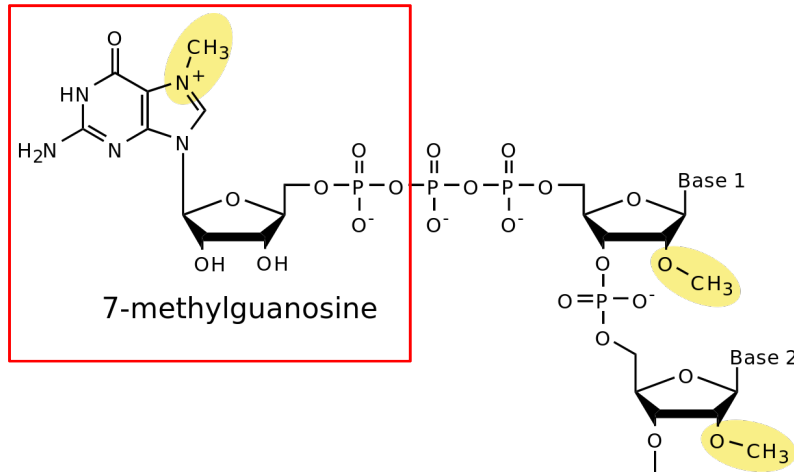
Maturation des Transcrits

La maturation de la plupart des transcrits primaires porte sur 3 points :

- la formation d'une structure particulière (coiffe) en 5'.
- l'adjonction d'une séquence polyadénylée en 3'
- l'épissage : excision des introns et jonction des exons.

Transcription chez les Eucaryotes

a. Ajout de la coiffe en 5' (= cap)



Transcription chez les Eucaryotes

a. Ajout de la coiffe en 5' (= cap)

Au cours de la transcription, lorsque les ARN atteignent 20 à 30 nucléotides de longueur,

1. Élimination d'un phosphate en 5' du premier nucléotide triphosphate
2. Soudure d'une 7-méthyl-guanine (GMP méthylée sur l'azote en 7)
3. Méthylation en 2' sur les riboses des 2 premiers nucléotides dans la plupart des ARNm.

Transcription chez les Eucaryotes

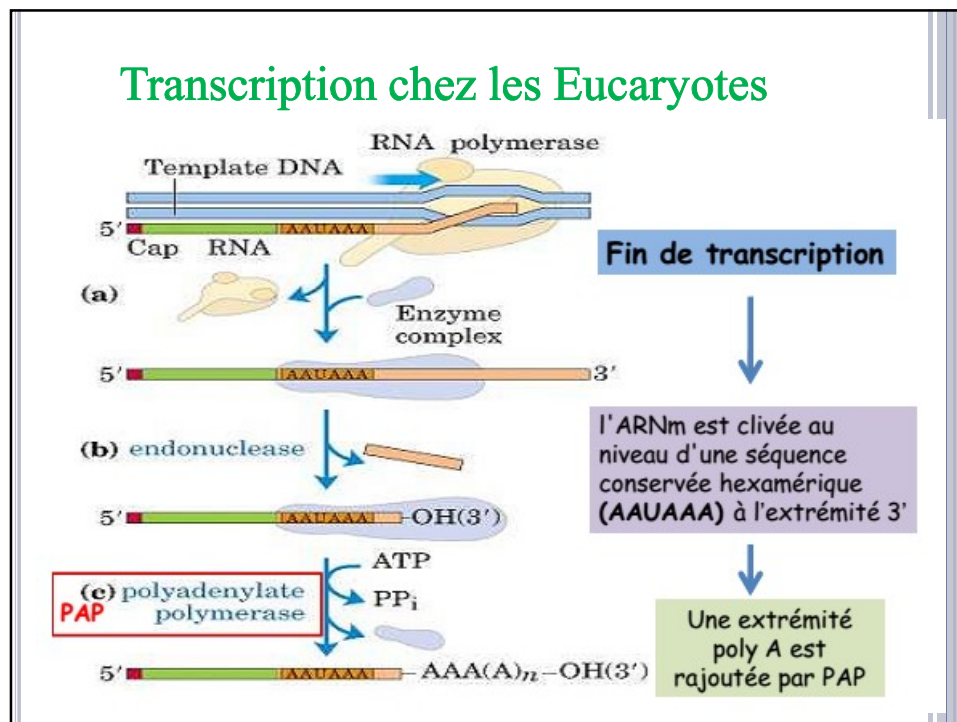
- La coiffe a pour rôle de permettre :
 - ✓ La **distinction** (au niveau de la cellule) entre les ARNm et les autres ARN
 - ✓ **L'export** dans le cytoplasme de l'ARNm pour traduction
 - ✓ Augmente **l'efficacité** de la **traduction**
 - ✓ **Stabilise** l'extrémité 5' des ARNm

Transcription chez les Eucaryotes

b. La queue poly(A) : coupure et polyadénilation des ARNm

- A la fin de la transcription, l'extrémité 3' de l'ARNm est clivé au niveau d'une séquence conservée hexamérique (AAUAAA).
- Puis une extrémité poly A est rajoutée.

Transcription chez les Eucaryotes



Transcription chez les Eucaryotes

b. La queue poly(A) : coupure et polyadénilation des ARNm

- La longueur de la queue poly A varie de 100 à 200 nucl.
- Absente chez les ARNt, les ARNr et les ARNm codant pour les protéines histones
- La queue polyA sera raccourcie dans le cytoplasme

Transcription chez les Eucaryotes

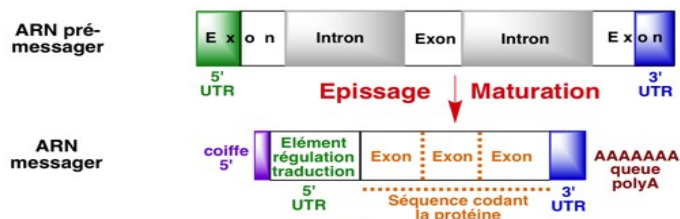
Rôle de la queue poly(A)

- **Attachement** de l'ARNm à la membrane de RE
- **Transfert** de l'ARNm au cytoplasme
- **Stabilisation** de l'ARNm

Transcription chez les Eucaryotes

C. Épissage

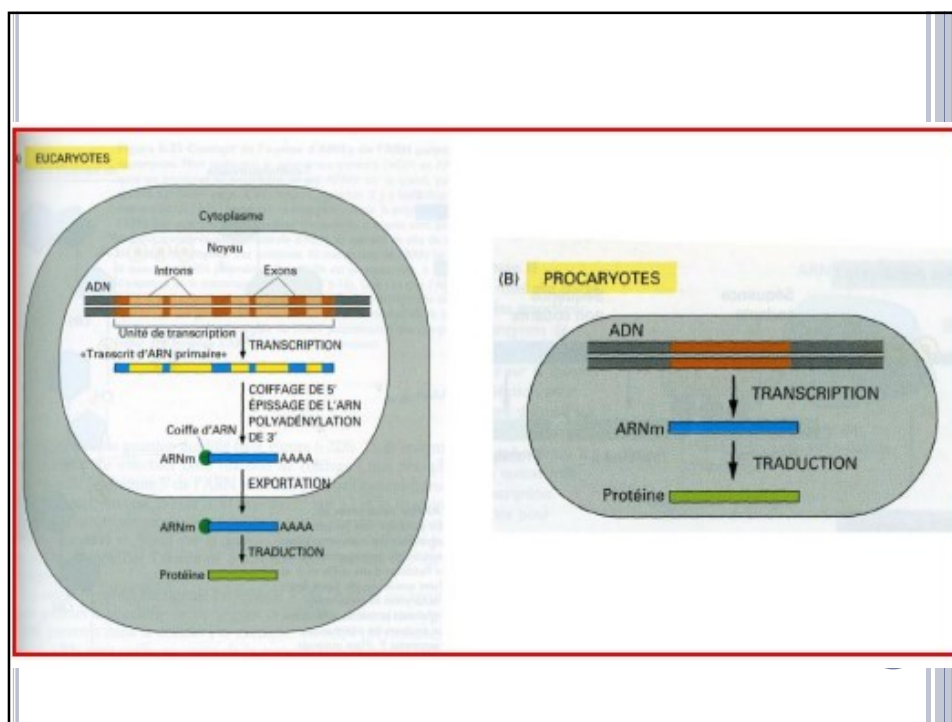
- C'est un mécanisme qui aboutit à
 - l'excision des introns (les parties du gène qui ne codent pas un polypeptide)
 - et à la ligation des exons (les brins codant)
 - pour aboutir à un ARN fonctionnel et mature.



Transcription

Comparaison de la synthèse des ARNm chez les eucaryotes et les procaryotes

	PROCARYOTES	EUCARYOTES
Lieu	Transcription et traduction dans le cytoplasme : la traduction peut donc commencer avant la fin de la transcription	Transcription et maturation des ARNm dans le noyau Traduction dans le cytoplasme → transcription et traduction non couplées
Maturation des ARNm	Pas de coiffe	Coiffe en 5'
	Pas de queue poly A	Coiffe en 3'
	Pas d'épissage (pas d'intron)	Epissage (introns)



CHAPITRE.2

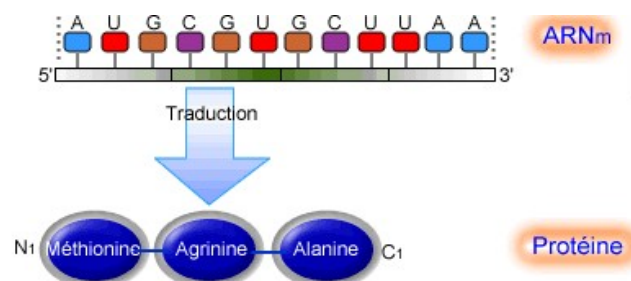
EXPRESSION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Traduction

Traduction

I. DEFINITION

- La traduction correspond au mécanisme par lequel l'information génétique transportée par l'**ARNm** va être **décodée** et **transformée** en **protéines**, c'est-à-dire une chaîne polypeptidique constituée d'acides aminés.

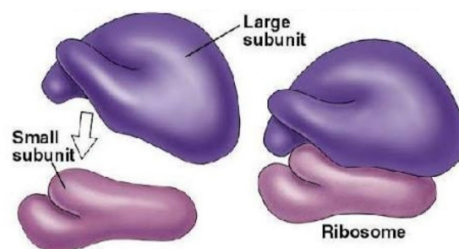


Remarque: L'extrémité N-ter de la protéine correspond à l'extrémité 5' de l'ARN et l'extrémité C-ter à l'extrémité 3'.

Traduction

II. ELEMENTS NECESSAIRES A LA TRADUCTION

1. Les ribosomes: sont des structures cellulaires organisées en **deux sous-unités** qui permettent la « lecture » de l'ARNm et ainsi sa traduction en protéine. Les ribosomes sont constitués à la fois d'ARNr et de protéines.



Traduction

1. Ribosomes

- Il faut signaler que la grande sous-unité ribosomique comprend trois sites fonctionnels qui sont importants pour la traduction:
 - Le **site A** (pour amino-acyl ARNt) qui assure l'accueil d'un nouvel acide aminé transporté par un ARN de transfert.
 - Le **site P** (pour peptidyl-ARNt) qui assure l'accrochage du nouvel acide aminé à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse.
 - Le **site E** (pour exit) qui permet l'évacuation de l'ARNt libéré de son acide aminé.

Traduction

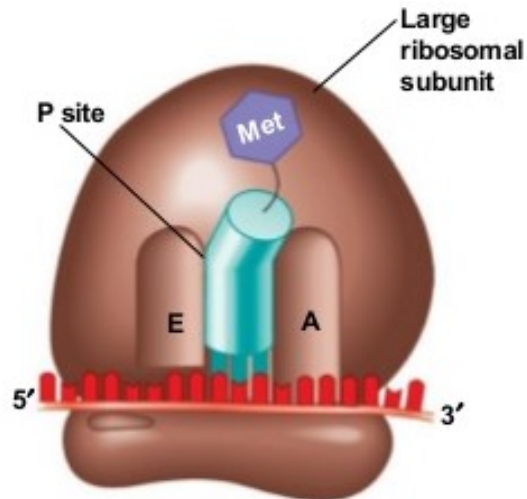


Schéma montrant l'organisation fonctionnelle d'un ribosome et les sites de liaison

Traduction

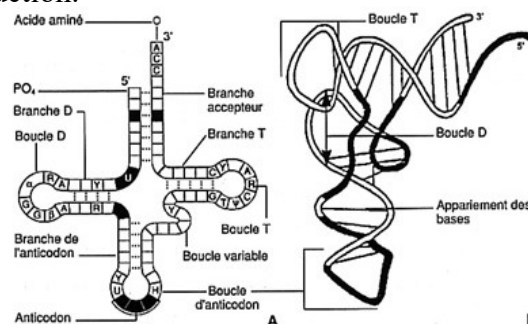
1. Ribosomes

- Il est à noter que les ribosomes réalisant la traduction, ils possèdent une activité **catalytique** qui est assurée, non par les protéines, mais par l'ARN ribosomique qu'on peut alors qualifier de ribozyme (= ARN à fonction catalytique).
- Notons aussi que la traduction consomme de l'énergie apportée par l'hydrolyse de GTP (guanosine triphosphate) et non d'ATP.

Traduction

2. ARN de transfert (ARNt)

- Ce sont des ARN qui se lient à des acides aminés dont ils assurent l'acheminement vers le ribosome lors de la traduction.



Représentation de la structure de l'ARNt. A) structure secondaire et B) représentation 3D

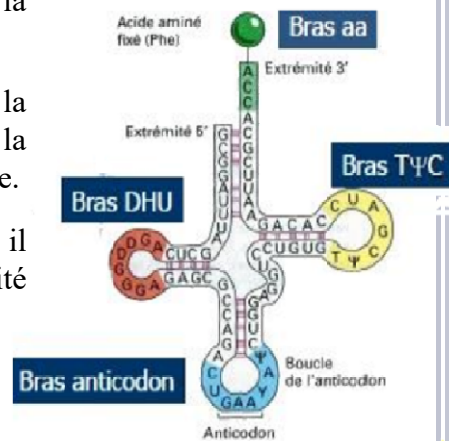
Traduction

2. ARN de transfert (ARNt)

- Ils ont une structure en feuille de trèfle avec au moins **4 bras**:
 - **Le bras acide aminé** : forme la liaison covalente avec l'acide aminé qui correspond à l'**anticodon**, via l'extrémité 3' porteuse d'une séquence (non appariée= libre) **CCA** (c'est le résidu A qui permet la liaison covalente).

Traduction

- **Le bras DHU** : contient de la dihydrouridine.
- **Le bras TΨC** : contient de la ribothymidine, de la pseudouridine et de la cytidine.
- **Le bras anticodon** : il s'hybride par complémentarité avec l'ARNm.



Exercice 1

QCM

1. Le génome des eucaryotes:

- A. est toujours circulaire et bicaténaire
- B. contient l'ensemble des gènes d'un organisme
- C. présente une structure composée de 2 chaînes d'ADN orientées de façon parallèle

2. Les bases appelées "purines" sont :

- a. la cytosine et l'adénine
- b. l'adénine et la thymine
- c. l'adénine et la guanine

3. Le ribose est un sucre à :

- a. 4 atomes de carbone
- b. 5 atomes de carbone
- c. 6 atomes de carbone

Exercice 1

4. Concernant l'ADN

- a. Les brins sont antiparallèles
- b. Les brins sont complémentaires
- c. La molécule est bicaténaire
- d. C'est une protéine
- e. C'est un polymère de ribonucléotides

5. L'appariement complémentaire des bases azotées de l'ADN bicaténaire est déterminé par:

- a. Des liaisons de van der Waals
- b. Des liaisons ioniques
- c. Des liaisons covalentes
- d. Des liaisons hydrogènes
- e. Des liaisons hydrophobes

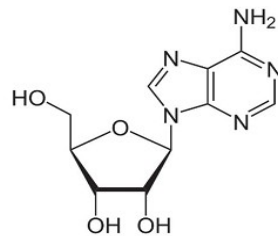
Exercice 1

Vrai ou Faux

1. Les molécules d'ADN génomique nucléaire eucaryote possède deux extrémité 3'-OH libre et deux extrémités 5'-phosphate libre.
2. Deux désoxyribonucléotides d'un ADN (**B**) sont unis par des liaisons hydrogènes avec une distance de 0,34 nm entre chaque base
3. Les ARN sont susceptibles de former des structures partiellement double-brin par appariements complémentaires et antiparallèle
4. Les hétérocycles aromatiques des nucléotides absorbent à une longueur d'onde optimale de 280 nm
5. Un nucléotide est un nucléoside mono-, di- ou triphosphate

Ex1

Recopiez la molécule



1. Quel est le nom commun de cette base ?
2. Indiquez la numérotation adoptée par les différents atomes constituant les cycles de la base nucléique et du sucre.
3. Entourez les groupements chimiques susceptible d'être rattachés à un atome de phosphate.
4. Indiquez la position de la liaison N-glycosidique
5. Dans quel type d'acide nucléique est-on susceptible de retrouver cette molécule.