BIOCHIMIE GENETIQUE

(2ème A. Pharmacie)/A.U. 2019/2020

Plan

IX.1 – Les cycles cellulaires.
IX.2 – Structure de la chromatine.
IX.3 – Structure chromosome eucaryote.
IX.4 – Structure des acides nucléiques : ADN, les ARN.
IX.5 – Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques.
IX.6 – Propriétés thermique et spectroscopique des acides nucléiques.
IX.7 – Le surenroulement de l'ADN.
IX.8 – Réplication et réparation de l'ADN.
IX.9 – La transcription.
IX.10 – Code génétique et traduction.
IX.11 – Régulation de l'expression des gènes.

NB. Dans ce chapitre, nous ne traitons que les parties indiquées en gras dans le plan, vu que les autres parties ont déjà été traitées en génétique.

IX.1. CYCLESCELLULAIRES

I.1. Introduction

- La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la celluledont elles dérivent. Le « cycle cellulaire » est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomessont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules-filles.

- En réalité, à côté de cecycle de division chromosomique, existent un cycle cytoplasmique, un cycle centrosomique, un cycle nucléolaire, un cycle de l'appareil de Golgi. Tous ces événements sont interdépendants et parfaitement couplés.

- La division cellulaire est un processus essentiel au développement embryonnaire, bien entendu, mais également vital pendant toute la viede l'organisme adulte. Ainsi l'être humain adulte est constitué de 10 000 milliards de cellules, provenant toutes, par divisions cellulaires successives, de la cellule initiale, l'œuf fécondé.

- Une fois la taille adulte atteinte, les divisions continuent. Tous les jours un milliard decellules doivent être renouvelées, pour remplacer les cellules qui sont perdues de façon continue, en particulier au niveau de la peau, du tube digestif et du système hématopoïétique.

- Ce mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire.

- Il arrive occasionnellement qu'une anomalie de régulation de la division apparaisse dans une cellule en cycle. Cette anomalie peut se transmettre dans les cellules-filles, elle libère alors la cellule des multiples régulations qui limitent ses capacités de division.

- L'apparition de ces anomalies est favorisée par les produits cancérigènes (produits de combustion du tabac, amiante, etc.).

- Une fois les anomalies établies, la cellule devient « cancéreuse ». Elle va se développer librement conduisant à une tumeur (1 mm de diamètre : 1 million de cellules cancéreuses ; 1 cm de diamètre : 1 milliard de cellules cancéreuses...), qui, par « métastase », va quitter son tissu de départ et essaimer dans tout l'organisme, entraînant des conséquences dramatiques pour tout l'organisme.

- On comprend alors l'intérêt d'étudier les régulateurs de la division cellulaire, dont les anomalies sont souvent à l'origine des cancers.

- La division cellulaire a été découverte il y a plus de 150 ans, et a fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental pour toute vie. En revanche sa régulation intracellulaire n'est connue que depuis quelques décennies, grâce aux travaux entrepris sur des modèlesbiologiques aussi variés que les levures, les embryons d'oursin, les ovocytes d'étoile de mer et d'amphibiens ou les cellules de mammifères en culture.

- En effet l'extrême conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a permis des études croisées, des échanges d'outils moléculaires.

- La complémentarité d'approche et la convergence des résultats ont finalement abouti à l'établissement d'un modèle général de contrôle intracellulaire de la division.
- Tous ces travaux ont été couronnés par l'attribution en Octobre 2001 du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine à trois acteurs essentiels du décryptage des mécanismes régulant le cycle cellulaire,

- Le cycle cellulaire reste un grand sujet d'études en biologie cellulaire et moléculaire comme en témoigne la dizaine d'articles publiés chaque jour dans ce domaine, les multiples applications possibles de la compréhension de la division cellulaire et, en définitive, l'intérêt montré par l'industrie pharmaceutique.

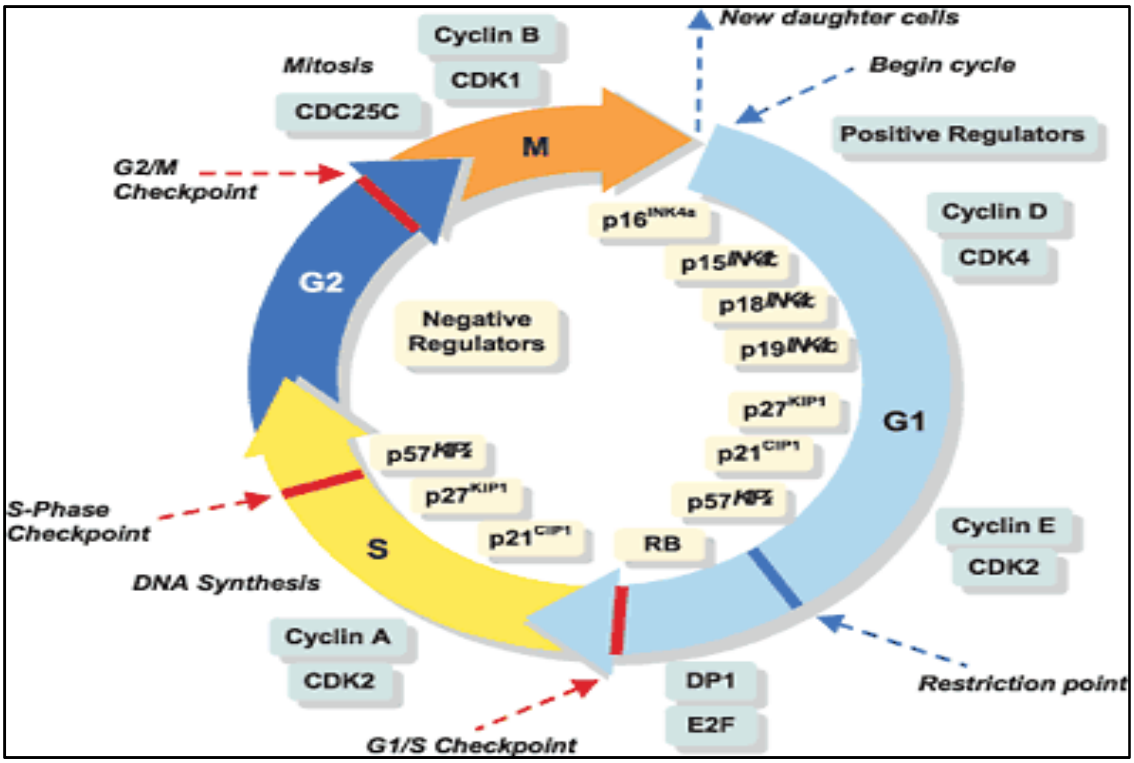
I.2. Les phases du cycle de division cellulaire

- Lorsqu'elles ne se divisent pas lescellules sont dites en quiescence ouaussi en phase G0.
- Sous l'effet designaux mitogènes, elles entamentun cycle de division.
- Le cyclecellulaire est classiquement diviséen quatre phases, G1, S, G2, M.
- Aucours de la phase G1 (de « Gap »,intervalle), les cellules passent parle point de restriction, une sorte depoint de non-retour à partir duquelle cycle est irréversiblement engagéet l'entrée en division ne dépendplus de la présence des facteursmitogènes.
- La phase G1 est préparatrice à la phase S au cours delaquelle l'ADN est répliqué.
- Laphase G2 précède la phase M, oumitose, au cours de laquelle leschromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules-filles,grâce au fuseau de division.
- Cette phase M est classiquement découpée en cinq périodes :
    - ✓ la prophase (terminée par la rupture de l'enveloppe nucléaire ;NEBD, « nuclearenvelope break-down »),
    - ✓ la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.
    - ✓ La cytokinèse achève la division dela cellule.
- Lorsque les cellules cessent toute prolifération, sous l'effetde signaux anti-mitogènes ou suiteà la disparition des agents mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et retournent en phase dequiescence.
- Ces phases se retrouvent dans la plupart des divisionscellulaires, à l'exception notoire despremières divisions embryonnaireschez la Drosophile ou le Xénope,caractérisées par une successionrapide de phases S et M.
- Les quatrephases s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement.
- En effet de nombreux mécanismes de contrôle (« checkpoints ») assurent une sorte de « contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie (endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique, parexemple) est détectée.

I.3. Les kinases cycline-dépendantes

- L'une des découvertes majeures dans le domaine du cycle cellulaire a été l'identification d'une famille de protéines kinases, les kinases cyclines-dépendantes (« cyclin-dependent kinases », CDKs).
- Ces protéines kinases jouent en effet un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle.
- Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline).
- D'après le séquençage du génome humain, il existerait 13 CDKs et 25 cyclines, mais toutes les possibilités de formation de complexes CDK/cycline ne sont pas encore connues.
- Par ailleurs certaines CDKs sont impliquées dans des fonctions autres que la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, CDK5 et CDK11 ont des fonctions neuronales ; CDK7, CDK8, CDK9 jouent un rôle dans la transcription.
- CDK4et CDK6, associées à des cyclinesde type D, régulent le déroulementde la phase G1.
- Puis CDK2/cycline Eprend le relais pour assurer latransition G1/S, suivie par CDK2/cycline A qui assure le contrôle dela phase S.
- CDK1/cycline A intervient en G2,
- CDK1/cycline B régulela transition G2/M et l'entrée enmitose.

Quatre niveaux de régulation contribuent à l'activité transitoire de ces CDKs :



- **<u>l'assemblage transitoire des complexes CDKs/cyclines</u>**, lié à une durée de vie des cyclines généralement courte (succession rapide de synthèse, d'interaction avec une CDK, de dégradation ubiquitine-dépendante).

- **<u>Des modifications post-traductionnelles</u>** – essentiellement des phosphorylations/déphosphorylations – conduisant à l'activation ou à la l'inactivation des CDKs. Ainsi les CDKs sont phosphorylées sur deux résidus adjacents (Thréonine 14 et Tyrosine 15 pour CDK) situés au bord de la poche de fixation de l'ATP. Cette phosphorylation inhibitrice est levée par une famille de phosphatases très particulières, les phosphatases CDC25 A, B, C. En revanche la phosphorylation d'un résidu situé sur la « boucle T »,Thr161 pour CDK1, est essentielle à l'activation des CDKs. Cette phosphorylation est catalysée par

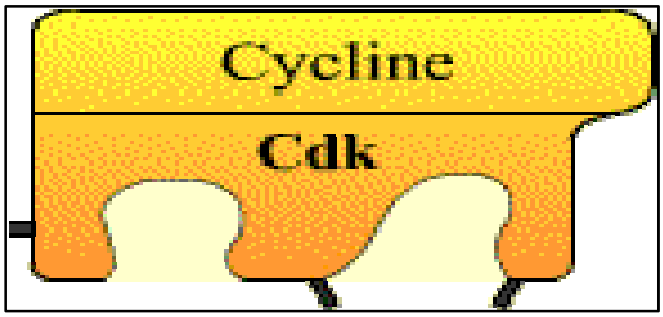
CDK7 associé à la cycline H et un co-facteur, Mat1 ;

- **des associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques**. Il en existe deux types, la famille INK4, dont les membres interfèrent avec la fixation des cyclines de type D sur la CDK, et la famille CIP/KIP, dont les membres se fixent sur les complexes CDK/cyclines et les inactivent. De façon surprenante, p21CIP1 et p27KIP1 se fixent sur CDK4 sans en inhiber l'activité kinase, ils sont en fait nécessaires pour l'assemblage du complexe CDK4/cycline D et sa translocation dans le noyau. Par contre ces deux protéines sont d'excellents inhibiteurs de CDK2/cycline E. L'apparition de p21CIP1et p27KIP1 permet donc la formation des complexes CDK4/cyclines D, tout en retardant l'activation des complexes CDK2/cycline E. Enfin, CDK2/cycline E, en phosphorylant p27KIP1, conduit à son ubiquitination par Skp1/Skp2, et à sa destruction par le protéasome [4]. Cette élimination de p27KIP1 contribue à l'entrée en phase S ;
- **des changements très importants de localisation intracellulaire**, en général également régulée par phosphorylations et déphosphorylations.

I.4. La régulation de la succession des quatre phases du cycle par les complexes Cyclines-Cdk

I.4.1. Définition et mode d'action des Kinases cycline-dépendantes (Cdk)

- Entre 1987 et 1990, le régulateur universel de l'entrée en mitose (le MPF) est caractérisé : c'est une kinase cycline-dépendante (Cdk) associée à une cycline. Entre 1990 et 2000, une douzaine de Cycline / Cdk sont décrites chez l'homme. **Six d'entre elles interviennent dans le contrôle direct du déroulement du cycle cellulaire**.
- Les Cdk forment des complexes hétérodimériques avec les cyclines, leurs sous unités régulatrices.



Une Cdk s'associe avec une cycline pour former un complexe.

- La première Cdk mise en évidence fut la Cdk1 qui, associée à la cycline B, constitue le MPF :

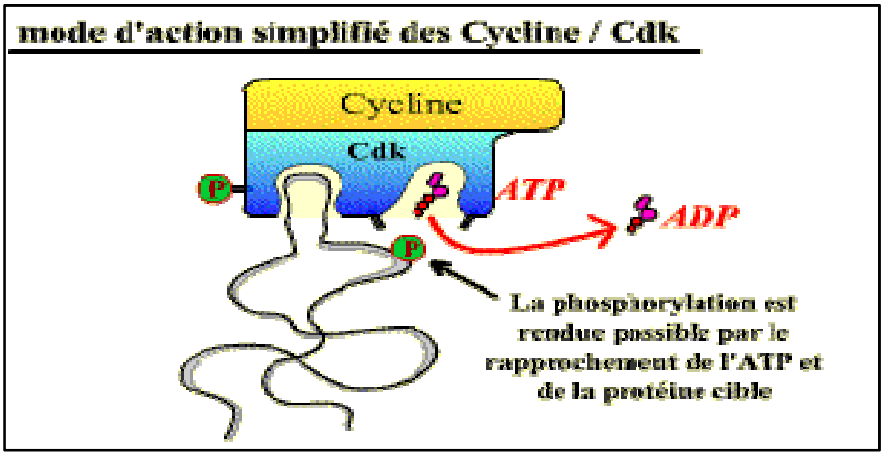
Cycline B / Cdk1 = MPF

- Les Cdk ne deviennent fonctionnelles que lorsqu'elles sont associées à une cycline.

- Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique.
- Les Cdk peuvent donc être sous forme activée ou désactivée, selon qu'elles sont associées ou non à leur cycline. Mais nous verrons que d'autres activateurs ou inhibiteurs des Cdk interviennent.

- Les Cdk sont des **sérine-thréonine kinases**, enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles (= substrats) jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN ….), ou dans l'avancement du cycle.

- Leur activité consiste à transférer le groupement γ-phosphate de l'ATP sur une sérine ou une thréonine, présentes dans les protéines cibles, à condition que ces acides aminés soient dans une séquence d'acides aminés caractéristique (séquence consensus) spécifiquement reconnue par la kinase (exemple : Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys). .

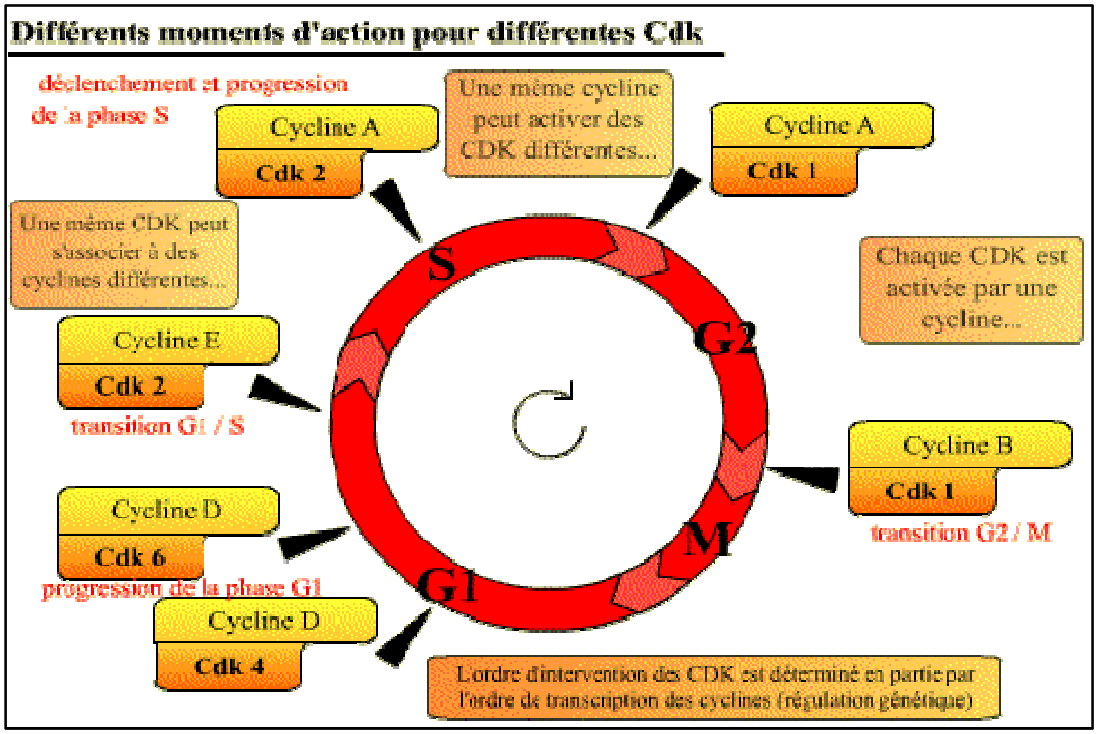


Le complexe Cycline / Cdk agit en phosphorylant une protéine.

- De cette phosphorylation, il résulte un changement de conformation des protéines cibles, ce qui entraîne des propriétés nouvelles pour ces dernières (activation, inhibition, changement de partenaire d'intéraction…).
- Les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique, ce sont des protéines régulatrices nécessaires aux Cdk pour qu'elles soient enzymatiquement actives.

I.4.2. Différents complexes Cycline / Cdk interviennent à des moments précis du cycle cellulaire

- Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins 6 complexes Cycline/Cdk différents qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire. (Chaque Cdk agit sur des substrats définis)



Complexes Cycline / Cdk et cycle cellulaire. *Au cours du cycle cellulaire, six complexes Cycline / Cdk interviennent.*

I.4.3.Actions des différents complexes Cycline / Cdk au cours du cycle cellulaire

- Les complexes Cycline / Cdk assurent le bon déroulement du cycle cellulaire, permettant le passage d'une phase à l'autre du cycle et permettant la réalisation des événements du cycle, par le biais de l'activité kinase des Cdk :

Moment du cycle	Complexe Cycline / Cdk	Effets du complexe
G1	**Cycline D / Cdk4 et Cycline D / Cdk 6**	• Phosphorylent et inactivent la protéine **Rb** ("Rétinoblastomaprotein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription **E2F** qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de S (**synthèse des cyclines E et A**, entre autres).
G1/S	**Cycline E / Cdk 2**	• Responsable de la transition G1/S. Phosphoryle la protéine **Rb.** • Induit la duplication du **centrosome dans certains cas (xénope)**
S	**Cycline A / Cdk 2**	• Phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G1. • induit la duplication du centrosome chez les mammifères. • arrêt de la dégradation de la cycline B qui s'accumule.
G2/M	**Cycline B / Cdk 1**	• Dirige la transition G2/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

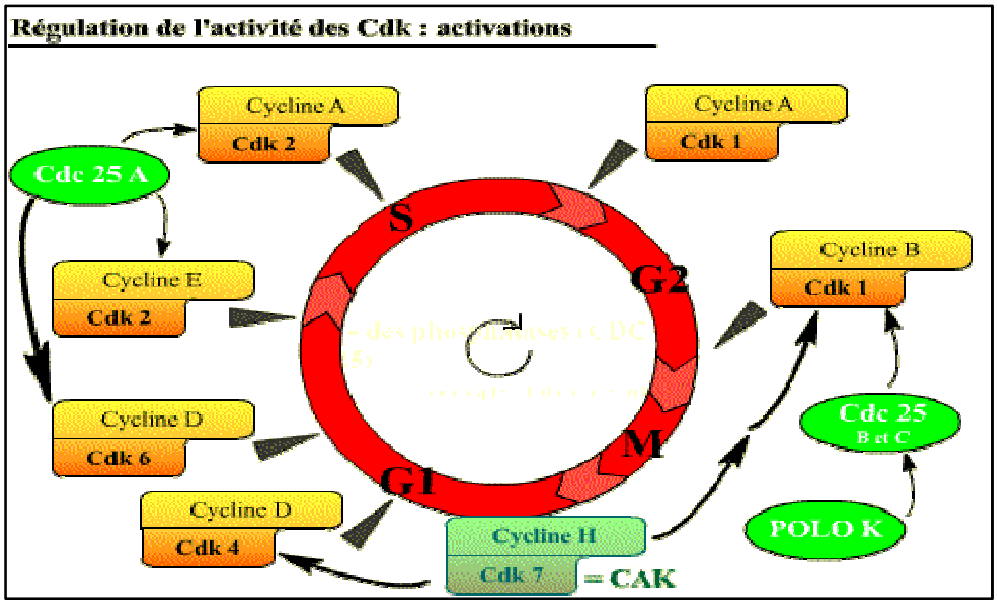
- Comme l'illustre ce tableau, l'activité de chacune des Cdk n'est pas constante au cours du cycle cellulaire : les Cdk peuvent donc être activées ou inhibées.

1.4.4.L'activité des Cdk est régulée

- Les Cdk sont présentes avant qu'elles ne soient requises. Comment alors leur activité enzymatique apparaît-elle et disparaît-elle aux moments opportuns ?
  - C'est, **premièrement, grâce aux cyclines** : les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique par elles-mêmes, mais se lient aux kinases du cycle pour les rendre actives. L'activité des Cdk est donc contrôlée par un cycle de synthèse/dégradation de leur cycline associée, tout au long du cycle cellulaire.
  - **Deuxièmement**, des protéines **déphosphorylant** (Cdc 25) ou **phosphorylant** (CAK, Wee-1) les Cdk permettent de compléter le contrôle de l'activité des Cdk.
  Nous verrons qu'une phosphorylation peut être activatrice ou inhibitrice.
  - **Troisièmement**, des protéines inhibitrices, les CKI (CdkInhibitor), qui ne régulent que négativement

Les Cdk sont activées, par :

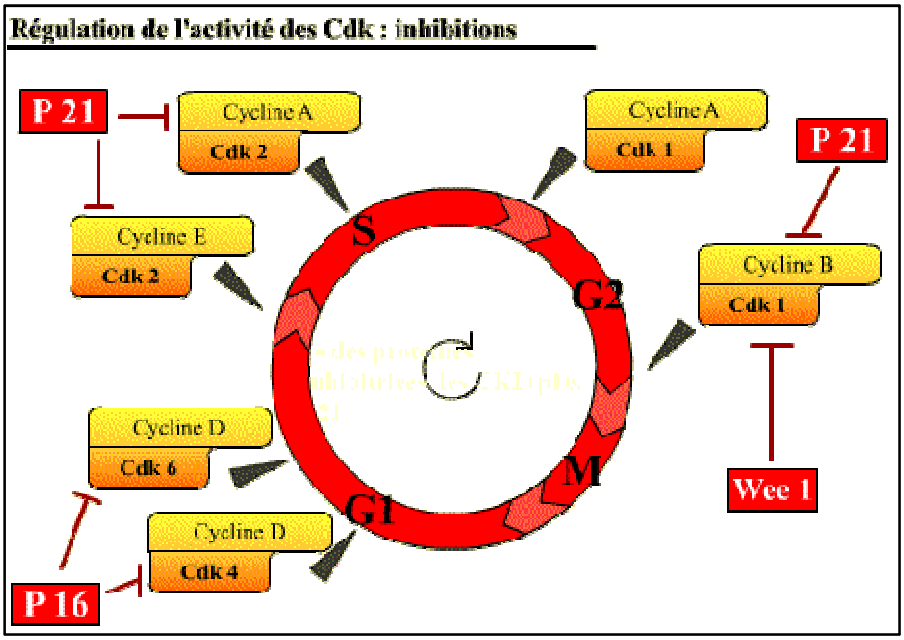
1. des phosphatases : Cdc 25 (responsables de Déphosphorylations "activatrices")
2. des kinases : CAK ("CdkActivating Kinase" = Cycline H / Cdk 7), (Polo K, indirect), [Phosphorylations "activatrices"]



En plus de leur activation par association avec les cyclines, les Cdk peuvent être activées par diverses protéines : *Des phosphatases (Cdc 25) [déphosphorylations activatrices] et des kinases (Cycline H / Cdk , et Polo K) [phosphorylations activatrices].* [Cliquez sur la figure pour accéder à une explication animée]

Les Cdk sont inhibées par :

1. des protéines inhibitrices (inhibiteurs physiologiques), les CKI (CdkInhibitor) : p16, p21, p27, qui agissent sur les complexes Cycline / Cdk ;
2. une kinase : Wee 1 [responsable de Phosphorylations "inhibitrices"]qui agit sur la Cdk1 en phosphorylant les sites tyrosine 15 et thréonine 14.



Les Cdk peuvent être inhibées par diverses protéines : *des protéines inhibitrices, les CKI (p16 et p21) et des kinases (Wee 1) [phosphorylations inhibitrices].* [Cliquez sur la figure pour accéder à une explication animée]

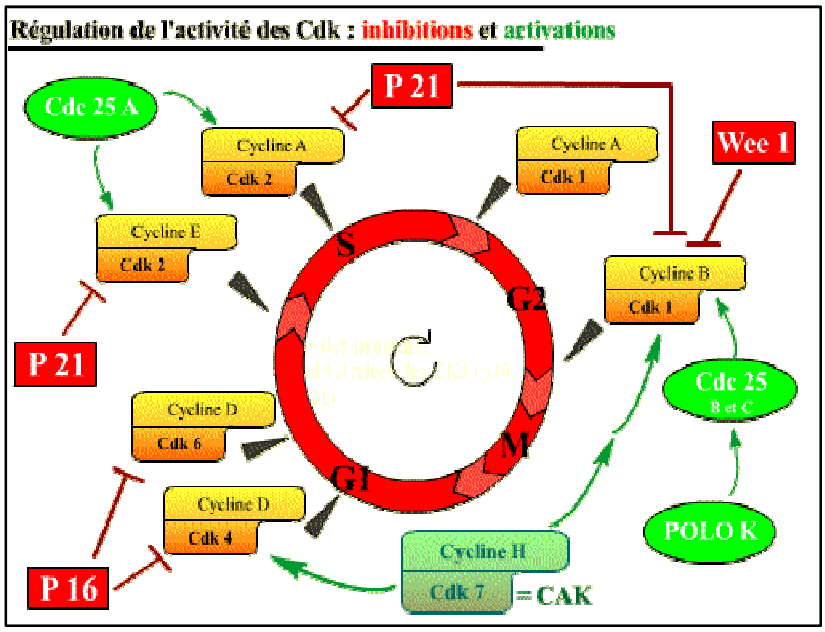
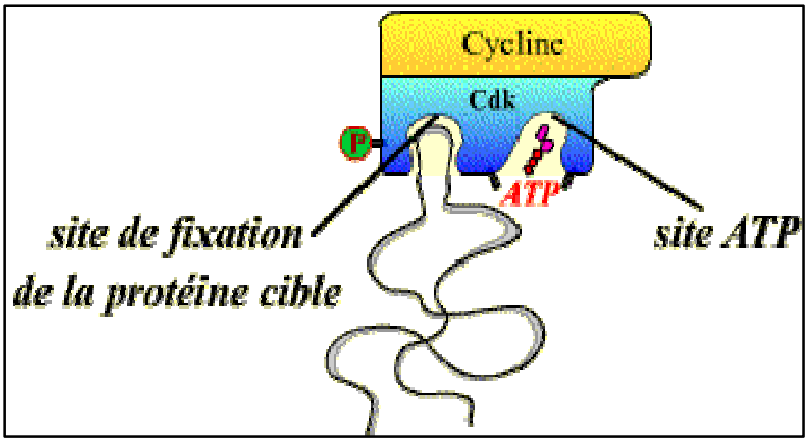


Schéma complet intégrant les activations et les inhibitions

I.4.5. Structure tridimensionnelle et activation des Cdk : comment les sites de reconnaissance de la protéine cible et de l'ATP s'ouvrent et se ferment

- Toutes les Cdk présentent une structure tridimensionnelle similaire, caractérisée par l'existence de deux poches de fixation :

1. l'une pour la protéine cible (différents substrats spécifiques des complexes Cycline / Cdk)
2. l'autre pour l'ATP
3. d'autre part des acides aminés jouent un rôle particulier suivant qu'ils sont phosphorylés ou non. Pour la Cdk1, il s'agit des acides aminés thréonine 161, thréonine 14 et tyrosine 15.



Les deux sites de reconnaissance de la protéine et de l'ATP.

- Pour pouvoir agir, les Cdk doivent présenter une conformation où ces deux poches sont accessibles. Les activateurs (Cyclines, Cdc 25, CAK) et les inhibiteurs (p16, p21, kinase Wee 1) induisent des changements de conformation des sites pour le substrat et pour l'ATP.

Changement de conformation induit par la liaison de la cycline :

- Avant la liaison de la Cdk à la Cycline, le site catalytique de la Cdk est inaccessible pour l'ATP : les boucles PSTAIRE (noms des acides aminés) et T-loop ferment l'entrée du site. Sans cycline la Cdk est inactive.

La liaison de la cycline provoque :

1. Un léger déplacement de la boucle T, domaine qui bloque l'**accès du substrat** dans la Cdk monomérique, ce qui a pour effet de rendre accessibles la thréonine 161d'une part et les thréonine 14 et tyrosine 15 d'autre part, aux molécules régulatrices.
2. Un changement de conformation à l'intérieur du site de **liaison de l'ATP**du à une rotation du domaine PSTAIRE qui provoquera l'alignement des 3 phosphates de l'ATP quand celui-ci se mettra en place, alignement nécessaire pour le transfert du phosphate sur la protéine cible.

Changement de conformation induit par la CAK :

- La CAK **phosphoryle** la Thréonine 161 qui se situe au sommet de la boucle T et qui est devenue accessible après la liaison de la cycline à la Cdk. Ceci a pour effet un changement de conformation qui dégage l'entrée du site substrat et permet la fixation du substrat sur la Cdk. La phosphorylation de la Cdk par la CAK **est donc "activatrice"**.

Changement de conformation induit par Wee 1 puis par Cdc 25 :

- Wee1 phosphoryle la Cdk sur la Thréonine 14 et la Tyrosine 15. Ces phosphorylations provoquent une répulsion électrostatique qui interdit l'entrée de l'ATP dans son site, elles sont donc inhibitrices. et, dans ce cas, **même si la Cdk est phosphorylée sur Th 161 par la CAK (elle accepte alors le substrat), elle reste inactive car l'ATP ne peut pas prendre sa place**.
- C'est la raison pour laquelle les phosphorylations inhibitrices dominent la phosphorylation activatrice. Cdc 25, en déphosphorylant Thréonine 14 et Tyrosine Y15, permet à l'ATP d'entrer dans son site, ce qui correspond à l'activation de la Cycline B/ Cdk1

Changement induit par les CKi

- Quand la P 21 se lie à la cycline, elle bloque la poche de l'ATP.
- P16 se lie à la Cdk et empêche la fixation de la Cycline.

Conclusion

En bref, on peut retenir trois mécanismes fondamentaux qui interviennent dans la régulation de l'activité des Cdk :

1. Les **cyclines** se lient aux kinases du cycle pour les rendre potentiellement actives.
2. L'activité des complexes Cycline / Cdk peut être inhibée par la phosphorylation de 2 acides aminés (tyrosine 15 et thréonine 14) : la phosphorylation de ces acides aminés se fait par les **kinases WEE-1** et Myt 1. Au contraire, la **phosphatase Cdc-25** les déphosphoryle et ainsi active les complexes ; la phosphorylation d'un autre acide aminé (thréonine 161) par la **CAK** est nécessaire pour l'activation des complexes (liaison du substrat).
3. L'activité des complexes peut être inhibée à tout moment par des protéines inhibitrices, les **CKI** (importantes dans le contrôle de G1 et S).

IX.5. Propriétés physico-chimiques des acides nucléiques

Propriétés importantes pour l'isolation et l'étude des acides nucléiques

- **Stabilité** : Liaisons H = spécificité de l'appariement des bases.
  - ✓ Interactions hydrophobes et aromatiques
- **Solubilité** : solubles dans du phénol, solutions salines et alcalines.
  - ✓ Précipités par l'alcool et les solutions acides fortes

✓ En solution aqueuse, ils sont très acides

- **Viscosité** : ADN long et mince donc solution très visqueuse.
- **Densité** : environ 1,7 g/cm^3, isolation possible sur gradient de césium
- **Dénaturation** : chimique par l'urée ou le formamide
  thermique : ARN dénaturation progressive à la chaleur
  ADN dénaturation à une température précise (Tm) dépendant du contenu en G-C (propriété ayant permis la création de la PCR)

Propriétés importantes pour l'isolation et l'études des acides nucléiques

- **Absorption UV** : Les bases absorbent dans l'UV avec un maximum à 260 nm
- **Quantification**: concentration déterminée par l'absorption à 260 nm
  solution à 1mg/ml dans une cuve de 1 cm, A_{260}=20
- **Pureté de l'ADN** : utilisation du rapport A_{260}/A_{280}
  Si A_{260}/A_{280} > 1,8 contamination par ARN
  Si A_{260}/A_{280} < 1,8 contamination par protéines

IX.6. Propriétés thermiques de l'ADN

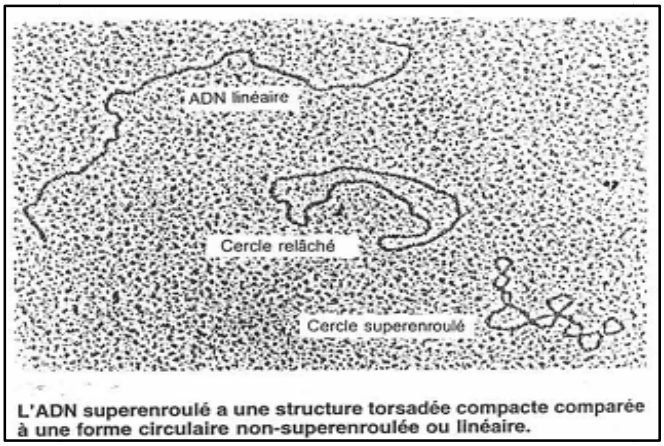
- Que les cellules se divisent il est nécessaire que l'ADN être copié (répliqué), de telle sorte que chaque cellule fille acquiert la même quantité de matériel génétique.
- Pour que ce processus puisse se dérouler les deux brins de l'hélice doit d'abord être séparés, dans un processus appelé la dénaturation.
- Ce processus peut également être réalisé*in vitro*. Si une solution d'ADN est soumis à une température élevée, les liaisons H entre les bases deviennent instables et les brins de l'hélice séparée dans un processus de dénaturation thermique.
- La composition de base de l'ADN varie largement d'une molécule à l'intérieur et même les différentes régions de la même molécule. Régions du duplex qui ont principalement AT paires de bases seront moins stables thermiquement que ceux riches en GC paires de bases.
- Dans le processus de dénaturation thermique, un point est atteint au cours de laquelle 50% de la molécule d'ADN existe en tant que simples brins. Ce point est la température de fusion ($T_{m)}$, et est caractéristique de la composition de base de ladite molécule d'ADN. La Tm dépend de plusieurs facteurs, en plus de la composition de base.
- Il s'agit notamment de la nature chimique du solvant et les identités et les concentrations des ions dans la solution.
- Lorsque l'ADN thermiquement fondu est refroidi, les brins complémentaires de nouveau reformer les paires de bases correctes, dans un processus de recuit est appelé ou par hybridation. Le taux de recuit est fonction de la séquence nucléotidique des deux brins d'ADN.

IX.7. Surenroulement de l'ADN

- L'ADN non-linéaire peut, en général, être considéré comme circulaire.
- Le surenroulement entraîne un compactage de l'ADN. Pour retirer cet enroulement, il faut libérer un brin(couper un des deux brins). On passe alors à une forme circulaire ouverte (forme relaxée). Si l'on coupe le secondbrin, on obtient une forme linéaire.
- Les **enzymes gyrases**(ou **topo-isomérases II**) coupent un brin et l'amène à effectuer un super-tour négatif(consommation d'ATP).
- La **reveregyrase**fait effectuer à l'ADN un super-tour positif.
- La **topo-isomérase I** coupe un brin, attend qu'il se déroule puis ressoude la coupure. Cette enzyme fonctionnependant la réplication de l'ADN.

Le rôle du surenroulement :

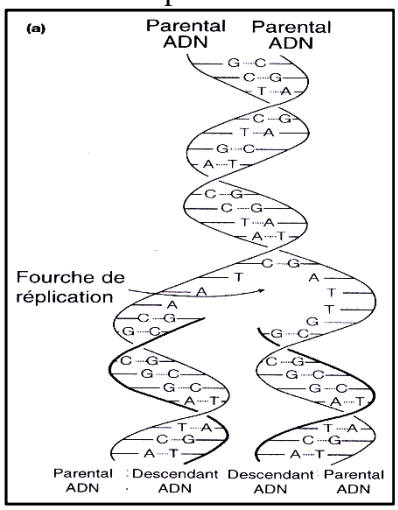
- L'ADN est beaucoup plus compact.
- Le surenroulement négatif aide à la séparation des brins alors que le surenroulement positif resserre les brins.
- Il régule l'expression génique en permettant ou non la transcription de la partie surenroulée.

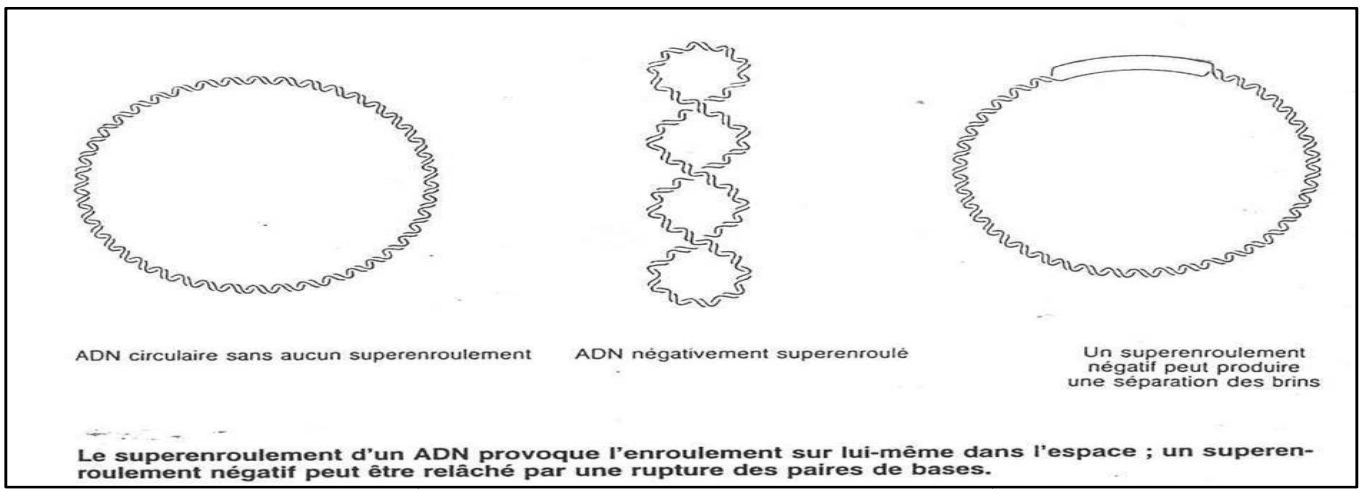


L'ADN superenroulé a une structure torsadée compacte comparée à une forme circulaire non-superenroulée ou linéaire.

IX. 8. La réplication de l'ADN

- C'est le mécanisme de transmission de l'information génétique d'une cellule mère à ses cellules filles
- L'ADN des cellules filles est identique à celui de la cellule mère
- La réplication est semi-conservative
  Chaque molécule d'ADN est constituéed'un brin parental etd'un brin néoformé.





Le superenroulement d'un ADN provoque l'enroulement sur lui-même dans l'espace ; un superenroulement négatif peut être relâché par une rupture des paires de bases.

IX. 8. 1.<u>La réplication chez les procaryotes</u>

- Les différents acteurs :
  - L'ADN parental = matrice
  - Les nucléotides : sous forme triphosphate dATP (désoxy Adénosine TriPhosphate)
  - Les enzymes (séparation des brins, incorporation des nucléotides…)
  - Co-facteurs (ex : Mg^{++})
- La réplication se déroule de 5' vers 3', de façon complémentaire et antiparallèle
- La réplication est bidirectionnelle

IX.8.2.<u>La réplication chez les procaryotes</u>

- La réplication est discontinue pour l'un des deux brins
- Brin avancé : synthèse dans le sens de la propagation
- Brin retardé : synthèse « à reculons »

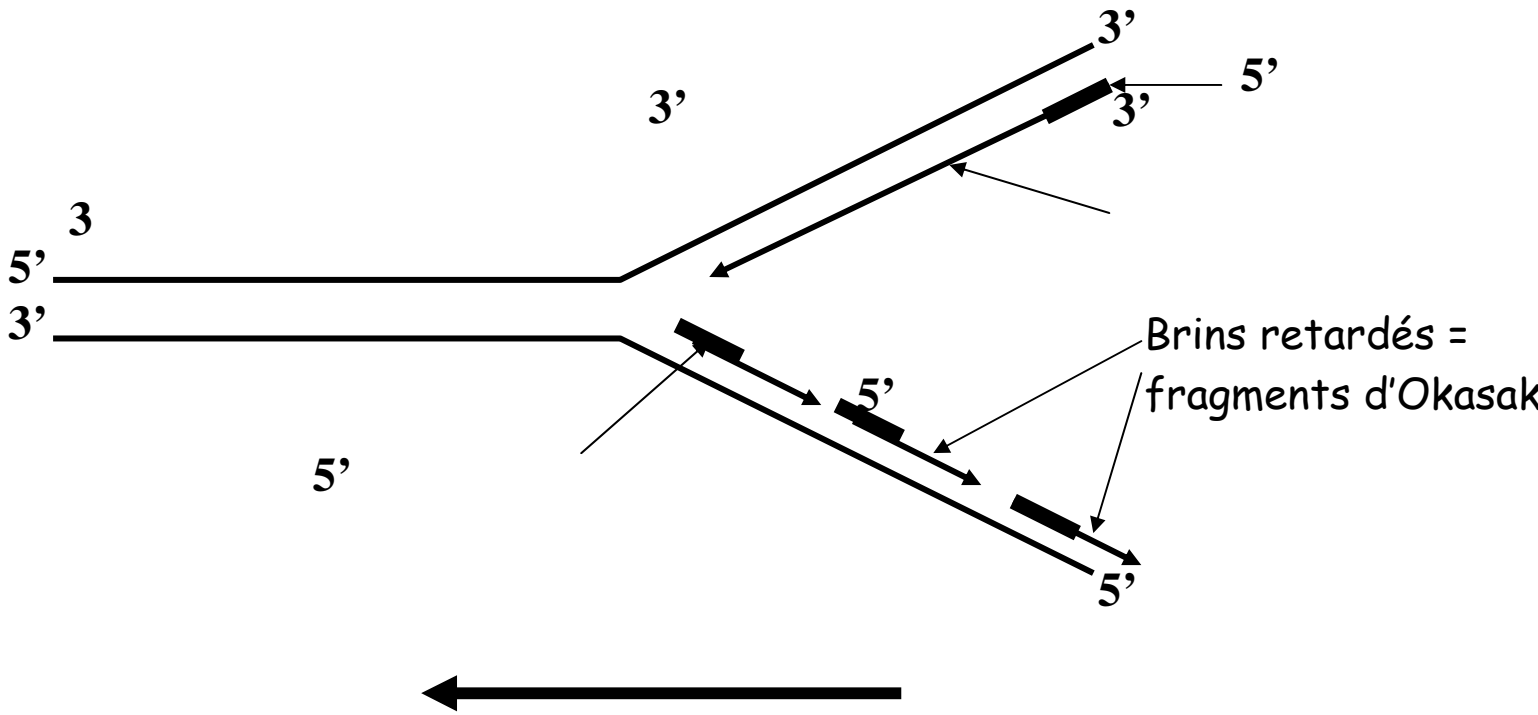
Exemple : *E.Coli*

<u>L'initiation de la réplication</u> :

- Réplication débute dans une région précise (l'origine deréplication) : ORI C
- Fixation du complexe multimérique de DnaA
- Ouverture de la double hélice
- Fixation des protéines DnaB (hélicase)
- Fixation des protéines SSB : stabilise les simples brins d'ADN
- Fixation de l'ADN polymérase (Pol I et Pol III)

<u>L'élongation :</u>

- L'hélicase DnaB ouvre la double hélice en aval de la polymérase
- Synthèse des amorces ARNs par la primase
- L'incorporation des nucléotides du brin avancé s'effectue par Pol III
- La synthèse des fragments d'Okasaki débute par Pol III et se termine par la digestion et le remplacement des amorces d'ARN par la polymérase I (Pol I) et leur liaison par la ligase



<u>La terminaison :</u>

- Les deux fourches de réplication se rencontrent à 180° d'ORI, au niveau des sites Ter
- La protéine Tus inhibe l'action de l'hélicase, donc les deux molécules d'ADN double brins restent liées
- Dissociation par la topoisomérase IV

IX.9. Altérations et réparation de l'ADN

Mutations :

- Accidents de copie des bases
- Le plus souvent au cours de la réplication
- ADN fils ≠ ADN parental

Mutations ponctuelles :

- substitution : remplacement d'une base par une autre
- délétion : perte d'une base
- insertion : ajout d'une base

Transmission des mutations :

- Procaryotes : mutation transmise aux descendants
- Eucaryotes supérieurs : mutation transmise uniquement si elle touche les cellules sexuelles

Mutations ARN :

- Possible mais moins importante car pas de transmission à la descendance et nombre de mutant < nombre de sauvage

Effet des mutations :

- Mutations silencieuses :changement de base ne modifie pas l'AA (ex : UUU → UUC = Phe)
  - Mutations conservatrices :changement de base induit un changement d'AA, mais ayant les mêmes propriétés (ex : AAA (Lys) → AGA (Arg) : 2 AA basiques)
  - Mutations faux sens :changement de base induit un changement d'AA, n'ayant pas les mêmes propriétés (ex : AAA (Lys, basique) → GAG (Gly, acide)
  - Mutations du codon stop :changement d'un codon AA en codon stop = protéine tronquée. Changement d'un codon stop en codon AA = protéine allongée
  - Mutations avec changement du cadre de lecture :due aux délétions ou insertions

- **Conséquences des mutations** :

  - **Avantages** : principe de l'évolution : individus portant la mutation sont mieux adaptés à leur environnement

  - **Maladies** : ex : Anémie falciforme = maladie génétique caractérisée par une hémoglobine anormale. Anomalie dans la chaîne ß de l'hémoglobine :

    6e acide aminé = VAL alors qu'il devrait être GLU (T remplace A)

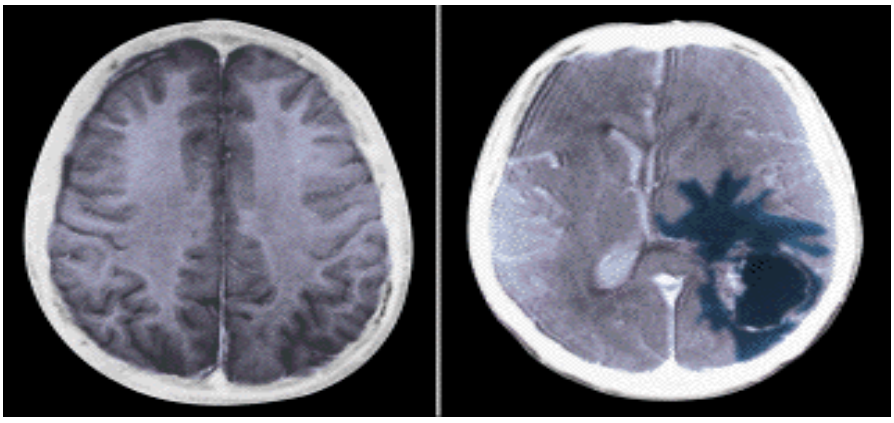
```
Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys-Val-
Asp-Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-
Pro-Try-Thr-Glu-Arg-Phé-Phé-Glu-Ser-Phé-Gly-Asp-Leu-Ser-Thr-Pro-Asp-
Ala-Val-Met-Gly-Asp-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-
Ala-Phé-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala-His-Leu-Asp-Asp-Leu-Lys-Gly-Thr-Phé-Ala-
Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asp-Phé-
Arg-Leu-Leu-Gly-Asp-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu-Ala-His-His-Phé-Gly-Lys-
Glu-Phé-Thr-Pro-Pro-Val-Glu-Ala-Ala-Tyr-Glu-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-
Ala-Asp-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His
```

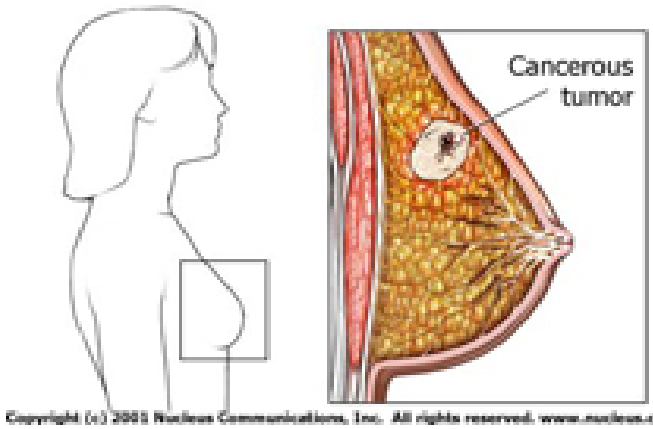
- **<u>Mutation de certains gènes peut participer à l'apparition de tumeur</u>** :
  Ex : gènes contrôlant la division cellulaire
  - Tumeur bénigne :
    - ✓ Les cellules demeurent regroupées et ne se séparent pas.
    - ✓ La tumeur demeure bien circonscrite.

  - **Tumeur maligne**:

    - ✓ Des cellules se détachent de la tumeur principale et vont former d'autres tumeurs dans le corps = **cancer**

- **<u>Mutation de certains gènes peut participer à l'apparition de tumeur</u>** :
  Ex : gènes contrôlant la division cellulaire





- **<u>Réparation de l'ADN</u> :**
  - La plupart des mutations sont corrigées par des enzymes de réparation au cours de la réplication
  - Enzymes reconnaissent brin néoformé car il n'est pas encore méthylé
  - Endonucléases coupent l'ADN en amont ou en aval de la mutation
  - Exonucléases : coupent l'ADN jusqu'à la mutation
  - ADN polymérase III comble la brèche selon le modèle du brin parental
  - Ligase relie les deux parties du brin néoformé.

IX. 9. <u>La transcription</u>

- Mécanisme de synthèse des ARNs
- ARNm : copie d'une portion d'ADN (gène)
- Tout l'ADN n'est pas transcrit (région codante/non codante)
- Synthèse : dans le sens 5'-3'
  - ✓ de manière antiparallèle par rapport à l'ADN copié

- ✓ de façon complémentaire

- ➢ Les différents acteurs :
  - ✓ Matrice d'ADN
  - ✓ Nucléotides sous forme triphosphate ATP, CTP, GTP UTP
  - ✓ RNA polymérase (plusieurs sous-unités : abb's)
  - ✓ Cofacteurs (Mg^{++})

IX. 9.1.<u>La transcription</u> : chez les procaryotes

<u>Initiation de la transcription</u> :

- ➢ Par convention : +1 = 1er nucléotide transcrit

  -1 = nucléotide précédent le 1er nucléotide transcrit
- ➢ ARN polymérase doit reconnaître les gènes à transcrire
- ➢ Le promoteur = séquence d'ADN en amont de la région transcrite du gène, qui est spécifiquement reconnue par l'ARN polymérase
- ➢ Séquences –35 et -10 : séquences à environ 35 et 10 paire de base en amont du site d'initiation, 3 bases fortement conservées (<u>TTG</u>ACA et <u>TA</u>TAT<u>T</u>)

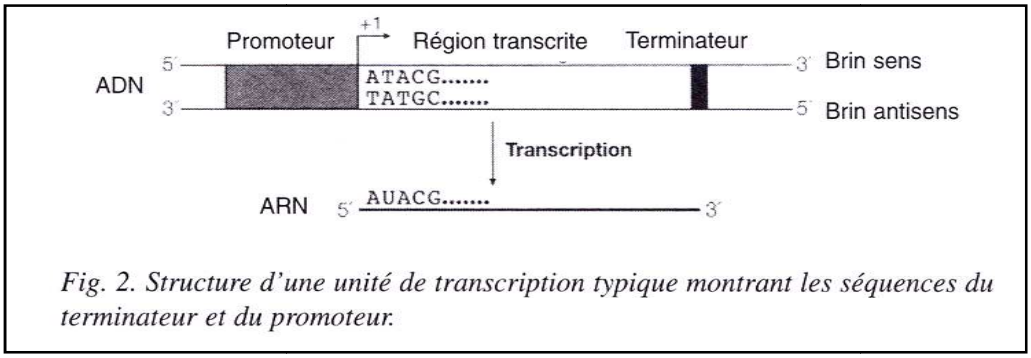


Fig. 2. Structure d'une unité de transcription typique montrant les séquences du terminateur et du promoteur.

- ➢ L'ARN polymérase se fixe sur l'ADN grâce aux séquences –35 et –10
- ➢ L'ADN double brin est dénaturer entre les position –10 et +1

<u>Élongation</u> :

- ➢ ARN polymérase ajoute des nucléotides à l'extrémité 3' de l'ARN en cour de synthèse.
- ➢ Elle avance dans la direction 3' vers 5' du brin matrice

<u>Terminaison</u> :

- ➢ Terminateur = séquence d'ADN formant une structure secondaire de type épingle à cheveux, suivie d'une région riche en AT
- ➢ Transcription du terminateur
- ➢ Formation de l'épingle à cheveux sur l'ARN
- ➢ Ralentissement de l'ARN polymérase
- ➢ Arrêt et décrochage de l'ARN polymérase

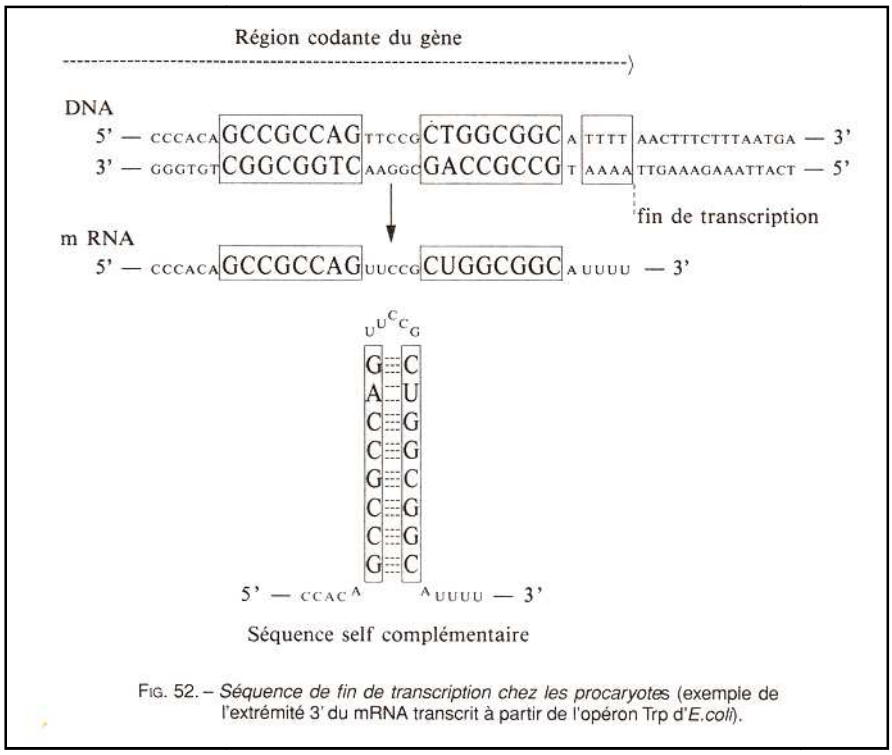


FIG. 52. – *Séquence de fin de transcription chez les procaryotes* (exemple de l'extrémité 3' du mRNA transcrit à partir de l'opéron Trp d'*E.coli*).

IX.9.2.Modification post-traductionnelle

- Peu ou pas de modification des ARNm
- Traduction débute avant la fin de la transcription

IX.9.3.La régulation de la transcription: chez les procaryotes

L'opéron Lactose :

- Séquence d'ADN contenant :
  - ✓ Gènes lac Z, lac T et lac A, codant pour enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose par la bactérie (gènes de structure)
  - ✓ Un promoteur unique pour les trois gènes (ARN polycystronique)
  - ✓ Séquence opérateur =élément de contrôle de la transcription
  - ✓ Gène régulateur : lac I codant pour le répresseur

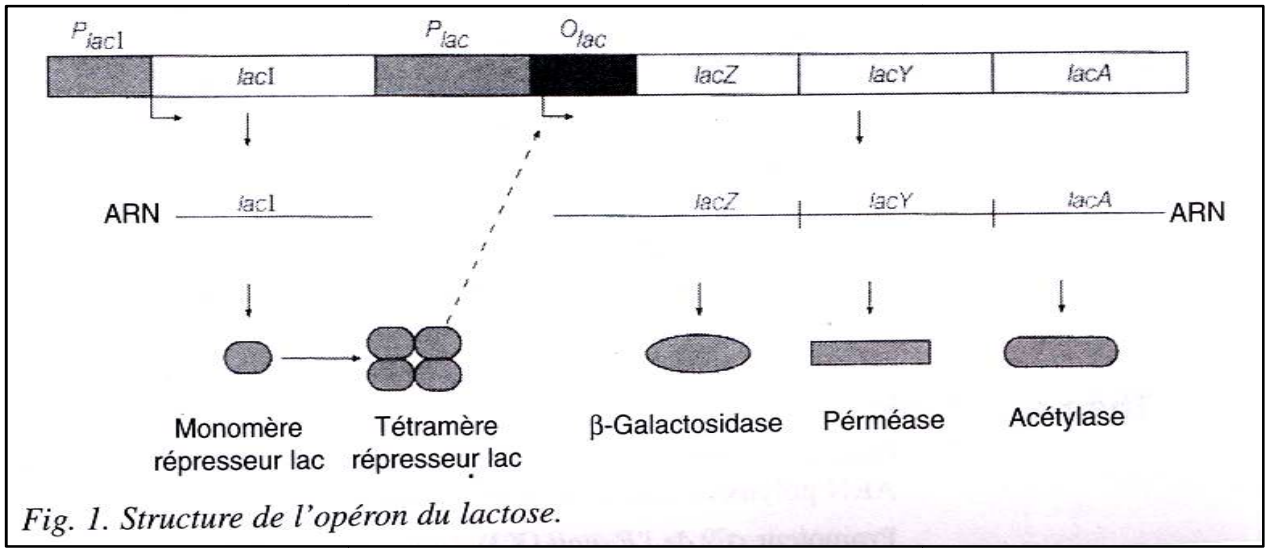
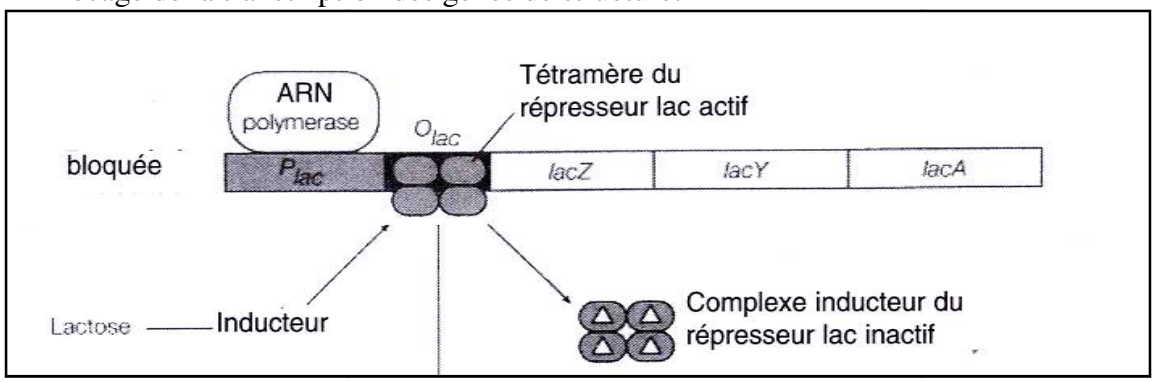


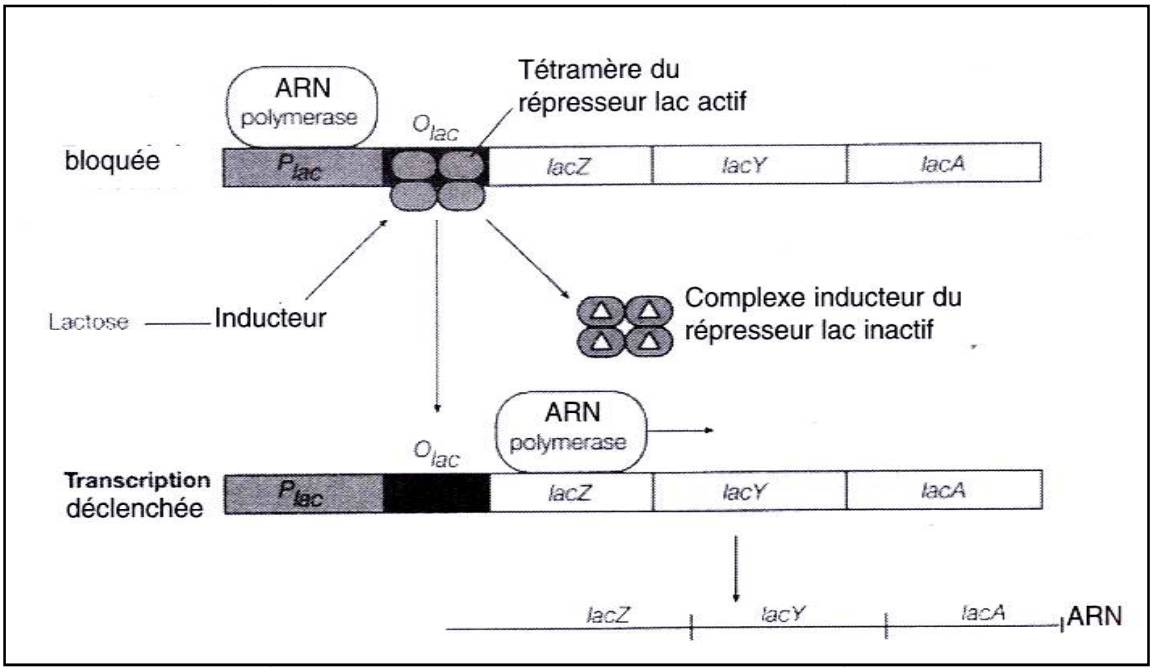
Fig. 1. Structure de l'opéron du lactose.

- *E. coli* utilise le lactose quand il est la seule source de carbone disponible
- **Fonctionnement** :
- **Inducteur** : lactose, allolactose et IPTG (isopropylthiogalactopyranoside)

- **Absence d'inducteur** : Le promoteur de lac I permet la transcription du gène lac I, donc la synthèse du répresseur (lac)
  - ✓ Formation de tétramère lac.
  - ✓ Fixation du tétramère lac sur la région opératrice O lac.
  - ✓ Blocage de la transcription des gènes de structure.



- **Présence d'inducteur** :
  - ✓ Inducteur se fixe sur le tétramère lac.
  - ✓ Changement de conformation et perte de l'affinité pour Olac.
  - ✓ Transcription des gènes de structure.



- **Inducteur épuisé** :
  - ✓ Tétramère lac se fixe sur Olac
  - ✓ Transcription bloquée

IX.9.4. La transcription : chez les eucaryotes

- Mécanisme similaire, mais beaucoup plus complexe
- Plusieurs ARN polymérase :
  ARN polymérase I : ARNr
  ARN polymérase II : ARNm, ARNsn
  ARN polymérase III : ARNt
- Nombreux cofacteurs protéiques nécessaire à la fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN
- Structure des gènes des eucaryotes :
  - ✓ Gènes fragmentés

- ✓ Exons : ADN contenant l'information génétique (traduit en acides aminés)
- ✓ Introns : séquences intercalaires, fonctions ?

A. <u>Les différentes phases de la transcription</u> :

- ✓ Étapes nucléaires :
  - Transcription intégrale du gène (exons + introns)
  - Addition du « cap » en 5' :
    GMP méthylé sur l'azote 7 (donc charge +)
    Mise en place rapide (avant la fin de la transcription)
    Liaison au 1er nucléotide par une liaison anhydride
    Protection de l'ARNm des enzymes de dégradation
  - Addition de polyA
    Après transcription, addition d'environ 250 A
    Aide passage vers cytoplasme
- ✓ Étapes cytoplasmiques :
  - Maturation du pré-ARNm
  - Épissage = coupure et élimination des introns

<u>IX.10. Le code génétique</u>

- ➢ ADN = Lieu de stockage de l'information génétique
- ➢ Sous forme CODÉE = chaque protéine est codée par un gène (ou plusieurs si la protéine est polymérique) :
  - ✓ L'unité de base des protéines est l'acide aminé
  - ✓ Chaque acide aminé est codé par un codon
  - ✓ Codon = triplet de nucléotides (ex : AGC = Ser)
  - ✓

Pourquoi utiliser un code de trois nucléotides ?

- ➢ 4 nucléotides :
  - ✓ Si 2 nucléotides = 1 acide aminé : on ne disposerait que de 16 acides aminés (2^4)
  - ✓ Si 3 nucléotides = 1 acide aminé : on disposerait de 64 acides aminés (3^4)
- ➢ Or il existe 20 acides aminés différents
- ➢

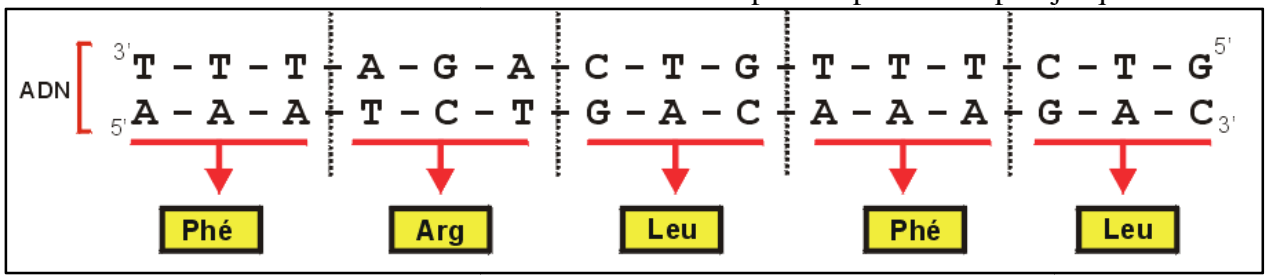
IX. 10.1. Le code génétique : (déchiffré entre 1960 et 1964)

AAA	Phénylalanine	AGA	Sérine	ATA	Tyrosine	ACA	Cystéine
AAG	Phénylalanine	AGG	Sérine	ATG	Tyrosine	ACG	Cystéine
AAT	Leucine	AGT	Sérine	ATT	**STOP**	ACT	**STOP**
AAC	Leucine	AGC	Sérine	ATC	**STOP**	ACC	Tryptophane
GAA	Leucine	GCA	Proline	GTA	Histidine	GCA	Arginine
GAG	Leucine	GCG	Proline	GTG	Histidine	GCG	Arginine
GAT	Leucine	GCT	Proline	GTT	Glutamine	GCT	Arginine
GAC	Leucine	GCC	Proline	GTC	Glutamine	GCC	Arginine
TAA	Isoleucine	TGA	Thréonine	TTA	Asparagine	TCA	Sérine
TAT	Isoleucine	TGG	Thréonine	TTG	Asparagine	TCG	Sérine
TAG	Isoleucine	TGT	Thréonine	TTT	Lysine	TCT	Arginine
TAC	Méthionine	TGC	Thréonine	TTC	Lysine	TCC	Arginine
CAA	Valine	CGA	Alanine	CTA	Asparagine	CCA	Glycine
CAT	Valine	CGG	Alanine	CTG	Asparagine	CCG	Glycine
CAG	Valine	CGT	Alanine	CTT	Ac. glutamique	CCT	Glycine
CAC	Valine	CGC	Alanine	CTC	Ac. glutamique	CCC	Glycine

N.B. 64 combinaisons pour 20 acides aminés.
Code redondant (il est dit *dégénéré*): plusieurs triplets différents peuvent coder pour le même acide aminé.
Trois triplets signifient la fin du message = triplets STOP

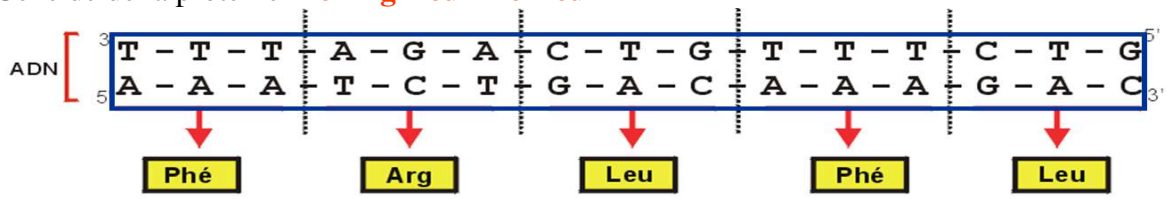
Le code génétique : Propriétés

- Dégénéré : Un acide aminé est codé par plusieurs codons
- Universel : Identique chez tous les êtres vivants
  Exception : ADN mitochondrial (4 codons sont différents)
- Non chevauchant : Les codons sont lus en série depuis un point de départ jusqu'au codon stop



La notion de gène

- Un segment d'ADN portant toute l'information nécessaire pour la synthèse d'une protéine = **gène**
- Gène de de la protéine**Phé-Arg-Leu-Phé-Leu**



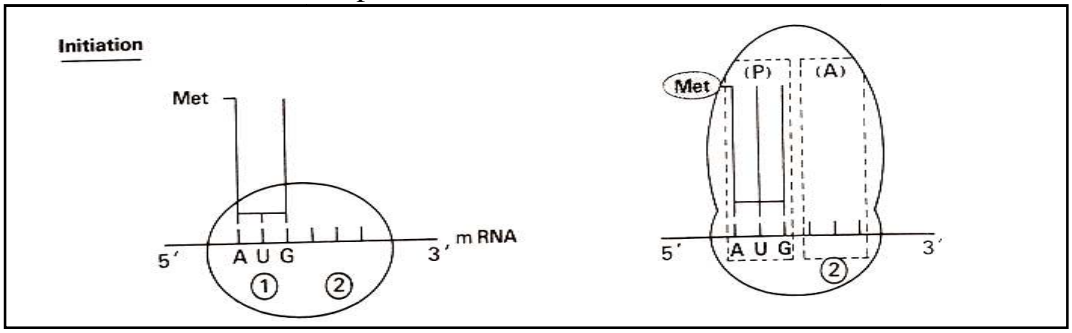
IX.10. 2. La traduction

Les éléments nécessaires :

- Les acides aminés :
  - ✓ 20 acides aminés
  - ✓ Relié entre eux par une liaison peptidique
  - ✓ = Liaison entre –COOH porté par le Ca de l'acide aminé n°1 et le $–NH_2$ porté par le Ca de l'acide aminé n°2
- Les ARNm
- Les ARNt :
  - ✓ adaptateurs entre l'ARNm et les acides aminés
  - ✓ Fait correspondre un codon à un acide aminé précis par l'intermédiaire d'un anticodon complémentaire

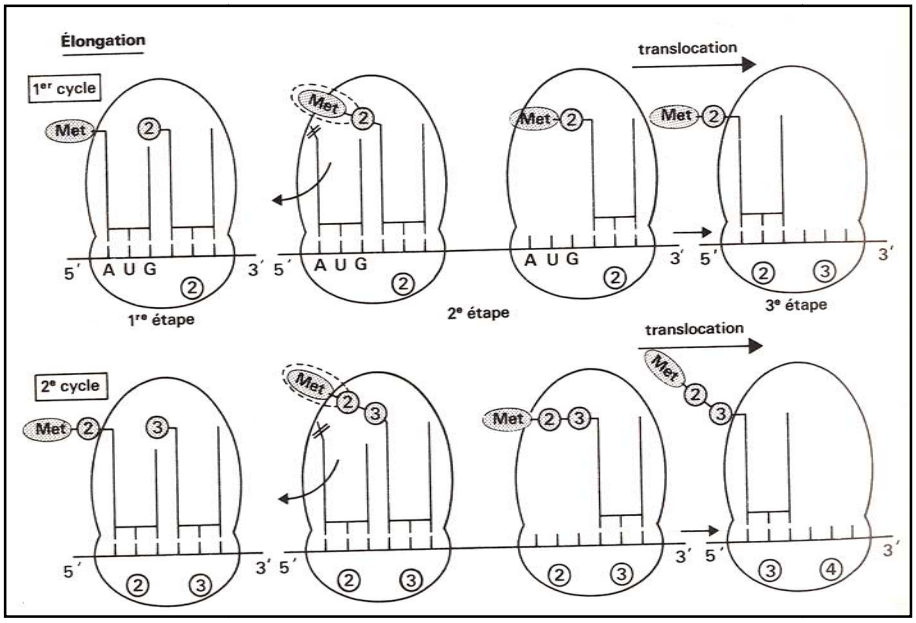
L'initiation:

- « codon initiateur », « codon signal » : AUG situé à environ 100 pbde l'extrémité 5' de l'ARNm, indiquant le début de la traduction
- AUG = Met : toutes les protéines commencent par une méthionine (qui sera clivée lors de la maturation de la protéine)
- Ribosome : complexe protéiques + ARNr permettant la formation de la liaison peptidique
- Petite sous-unité s'associe avec l'ARNm au niveau du codon AUG et avec l'ARNt portant la Met
- Grande sous-unité se fixe à la petite sous-unité



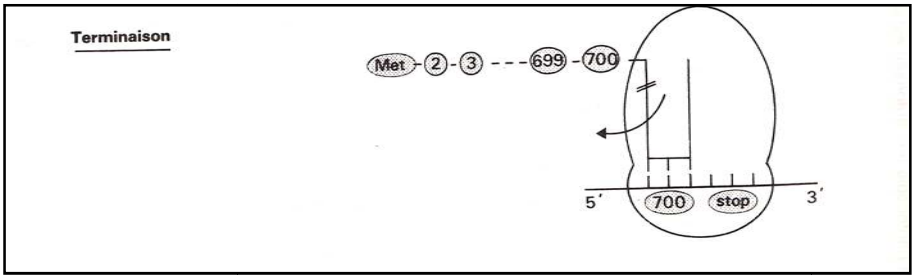
L'élongation:

- 1ère étape :
  - ✓ Accrochage d'un nouvel ARNt-AA dans le site A
  - ✓ Codon n°2 (après l'AUG) détermine l'ARNt, donc l'AA
- 2ème étape :
  - ✓ Rupture liaison entre Met et le premier ARNt (élimination)
  - ✓ Formation de la liaison peptidique entre la Met et l'AA n°2
- 3ème étape :
  - ✓ Translocation : le ribosome se décale d'un codon vers 3' de l'ARNm, donc l'ARNt n°2 passe sur le site P et le site A (libre) acceille l'ARNt n°3



La terminaison :

- S'effectue quand le ribosome rencontre un codon stop
- Aucun ARNtne se fixe en face de ce codon
- Coupure liaison entre le dernier AA et son ARNt
- Dissociation du ribosome et libération de l'ARNm



N.B : un même ARNm peut servir de matrice à plusieurs ribosome en même temps = polysome

IX.11. Régulation de l'expression des gènes

IX. 11. 1.GENERALITES

- La régulation de l'expression des gènes passe avant tout par la régulation de la transcription et de l'expression des ARNm, qui aboutit à réguler la production et la nature des protéines.
- Elle est assurée de plusieurs façons :
  - ✓ Régulation quantitative : Modulation du niveau de transcription d'un gène et Régulation

de l'accumulation des ARNm.

- ✓ Régulation qualitative : Structure des ARNm et Modifications de la séquence codante.

IX. 11. 2. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

- La régulation est une réponse de la cellule à son milieu environnant pour s'adapter, nécessitant la production d'un équipement protéique adéquat.
- Toutes les cellules n'auront pas le même rôle, et la transcription des différents gènes se fera alors en fonction du tissu, mais aussi de l'environnement physiologique (présence d'hormones...).
- La régulation est donc fortement dépendante de l'environnement.

A. CHEZ LES PROCARYOTES

- Chez les procaryotes, l'ARNm est polycistronique : il présente plusieurs séquences codantes indépendantes, chacune entourée d'un codon start et d'un codon stop.
- En général, toutes les protéines codées par un même ARNm polycistronique sont produites simultanément et de manière coordonnée, et interviennent dans une même séquence biochimique.

NB : - Un cistron est une séquence codante encadrée par AUG puis STOP ;
- Certains ARNm peuvent avoir plus de 2 cadres de lectures.

- Les gènes vont donc souvent être organisés en opérons.
- Un opéron est un ensemble de gènes ayant vocation à fonctionner de manière coordonnée de façon à produire les protéines répondant à une voie physiologique bien intégrée, ainsi qu'à apporter les mécanismes de régulation de cette voie.
- Exemple : **voir régulation transcriptionnelle de l'opéron lactose (plus haut)**

B. CHEZ LES EUCARYOTES

1. Structure générale des régions assurant le contrôle de la transcription des gènes eucaryotes

Région promoteur :

- **Boite TATA de -25 à -30** : lieu de fixation du facteur général de transcription TFIID et du complexe basal de transcription.
- **Boite DPE** (dans certains gènes) : lieu de fixation de facteurs qui constituent des éléments du complexe basal de transcription.
- **Inr** : site d'initiation de transcription.

Séquences amont :

- **Boites CG et CCAAT = séquences amont proximales**→ lieux de fixation des protéines indispensables à la transcription (pas spécifiques du tissu).
- **Boites « séquences régulatrices » = séquences amont distales** : très éloignées du promoteur
  - ✓ Fixation des facteurs régulateurs de la transcription (activité très spécifique du tissu, assurant une spécificité de réponse).
  - ✓ Induisent une modulation de l'intensité de la transcription = régulation quantitative
  - ✓ Peuvent être très proche ou très éloigné du gène concerné
  - ✓ Assurent une interaction indirecte avec le médiateur

  L'unité de transcription des eucaryotes comporte **une origine** (base +1, Inr) et **un point de fin** de la transcription (avec une séquence de terminaison).
  Le transcrit primaire comporte aussi bien les portions codantes (**exons**) que non codantes (**introns**).

- L'unité de transcription va de la première à la dernière base transcrite.

2.Les facteurs régulateurs eucaryotes

- Les facteurs régulateurs eucaryotes ont un rôle de régulation de la transcription.
- Ils permettent de moduler positivement ou négativement la transcription en réponse à des stimuli externes spécifiques.
- Ils sont soit synthétisés, soit activés à des instants précis et/ou dans des tissus spécifiques et permettent donc le contrôle de la transcription dans le temps et dans l'espace et en fonction des conditions environnantes.
- Ils se lient sur des séquences régulatrices aussi appelés éléments de réponse (ou RE pour responseelement).

Structure générale des facteurs régulateurs chez les eucaryotes:

Les facteurs régulateurs contiennent :

- Un domaine de liaison a l'ADN (en N-ter) : souvent composé d'AA basiques favorisant l'adhésion à l'AN.
- Un domaine d'action sur la transcription (en C-ter) : rôle d'activation ou d'inhibition, interaction avec les protéines impliquées directement dans la transcription (riche en Gln).
- Un domaine flexible entre les deux.

- Les protéines fonctionnent souvent sous formes de dimères (association avec une autre protéine de la même famille). On retrouve **4 grandes familles de facteurs régulateurs**.
- Ces facteurs protéiques ont un domaine de fixation à l'ADN dont les motifs structuraux sont :
  - ✓ Les motifs de type **hélice – tour – hélice** : structure courbe qui peut s'enchâsser dans le grand sillon de l'ADN, composée de 2 hélices alpha unies par une petite séquence. Ils agissent souvent sous forme monomérique.
  - ✓ Les **doigts de zinc** : structure stabilisée par un atome de zinc (Zn2+) qui établit des liaisons covalentes avec 4 Cys ou avec 4 His ou avec 2Cys et 2 His. Ils fonctionnent en dimère.
  - ✓ **Les glissières à leucines** : structure en hélice alpha avec répétition de Leu tous les 7 AA ce qui crée un alignement de leucine (plateau hydrophobe) permettant l'appariement des protéines par liaisons hydrophobes. Il s'agit d'une structure hélicoïdale très stable. Elles fonctionnent en dimère.
  - ✓ Les homéodomaines à charge positive avec des structures **hélice – boucle – hélice**: fixation au grand sillon de l'ADN, sous forme de dimère. C'est une structure composée de deux hélices alpha unies par une boucle.