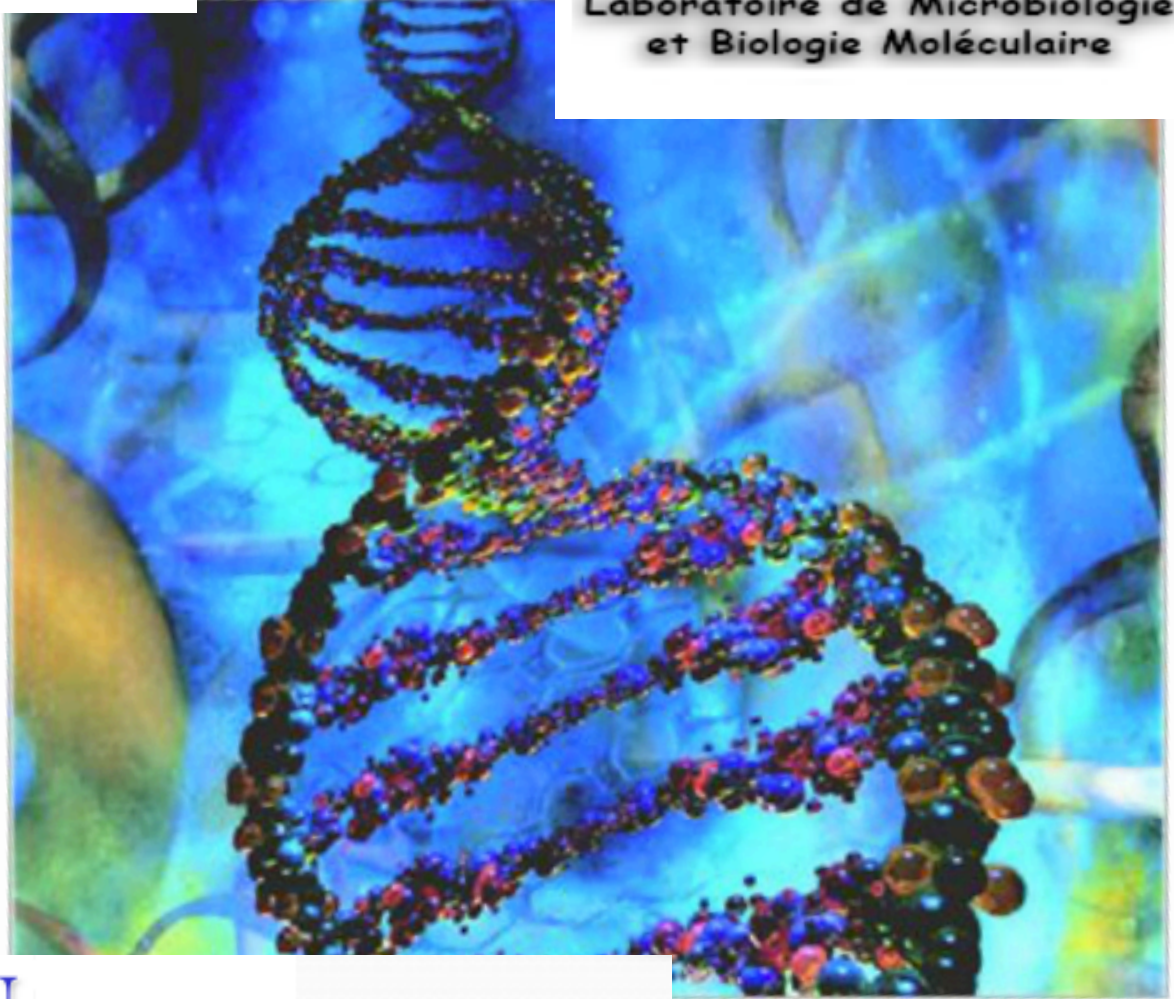




Université Mohammed V
Faculté des Sciences
Rabat



Laboratoire de Microbiologie
et Biologie Moléculaire



Cours de

Biologie Moléculaire

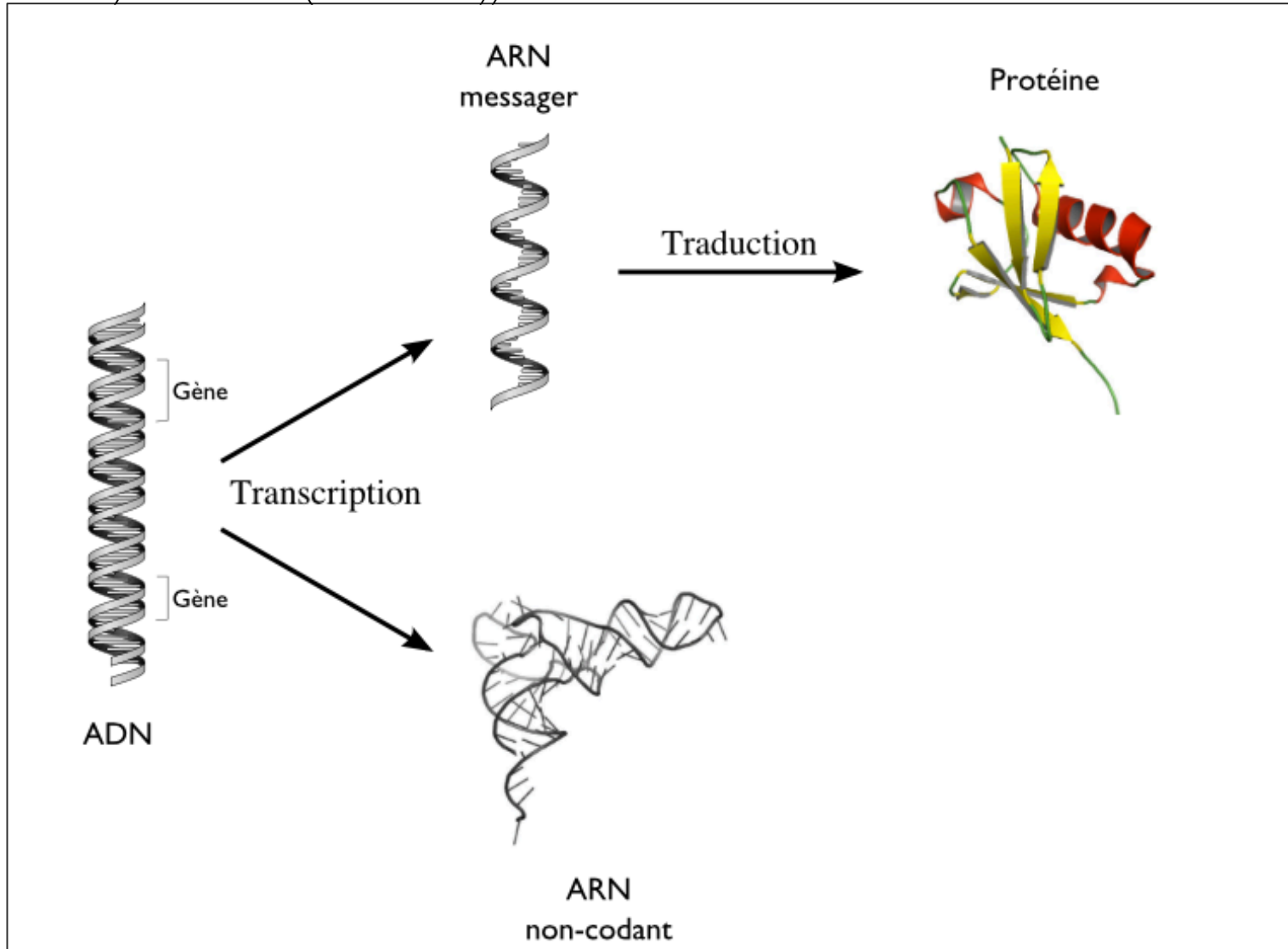
SVI- S5
(2014-15)

Pr. Laila SBABOU

lailasbabou@gmail.com

Le dogme centrale de la Biologie Moléculaire

Représente le mécanisme d'expression de l'information génétique (Francis Crick (fin des années 50) et Nature (années 70))



La transcription

- ✓ = La Copie d'ADN en ARN
- ✓ Besoin d'un ADN et d'une ARN polymérase

L'expression des gènes

Processus entier qui permet le décodage de l'information portée par un gène donnée. Cette information qui sera traduite en protéine.

La transcription différentielle des gènes dans une cellule (spatio-temporelle) qui permet de déterminer sa fonction et ses propriétés.

Introduction:

Les types d'ARN

Structure d'ARN

Transcription et ARN polymérase

Les types d'ARN:

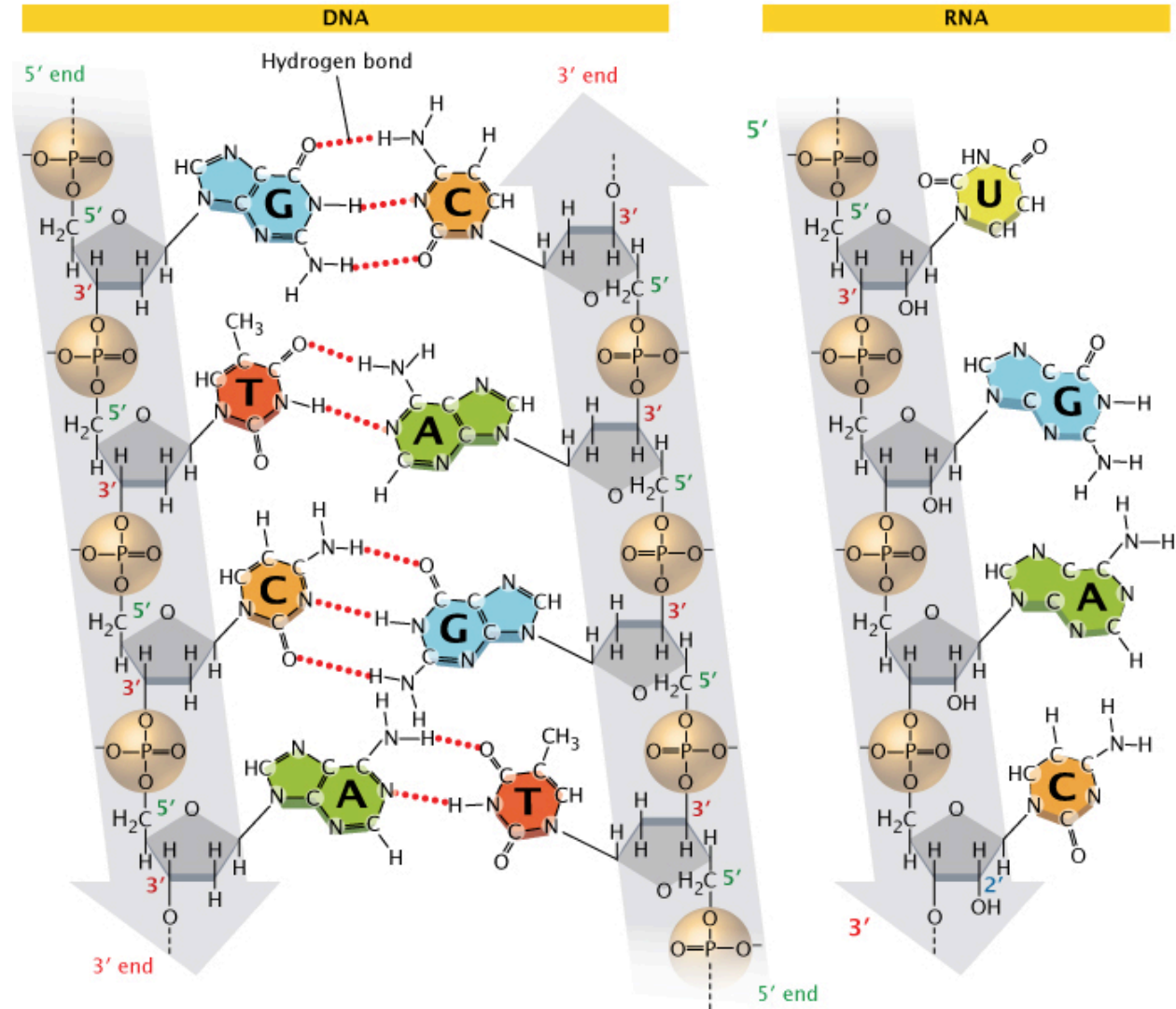
ARN codant: ARN messenger (ARNm)

ARN non codant:

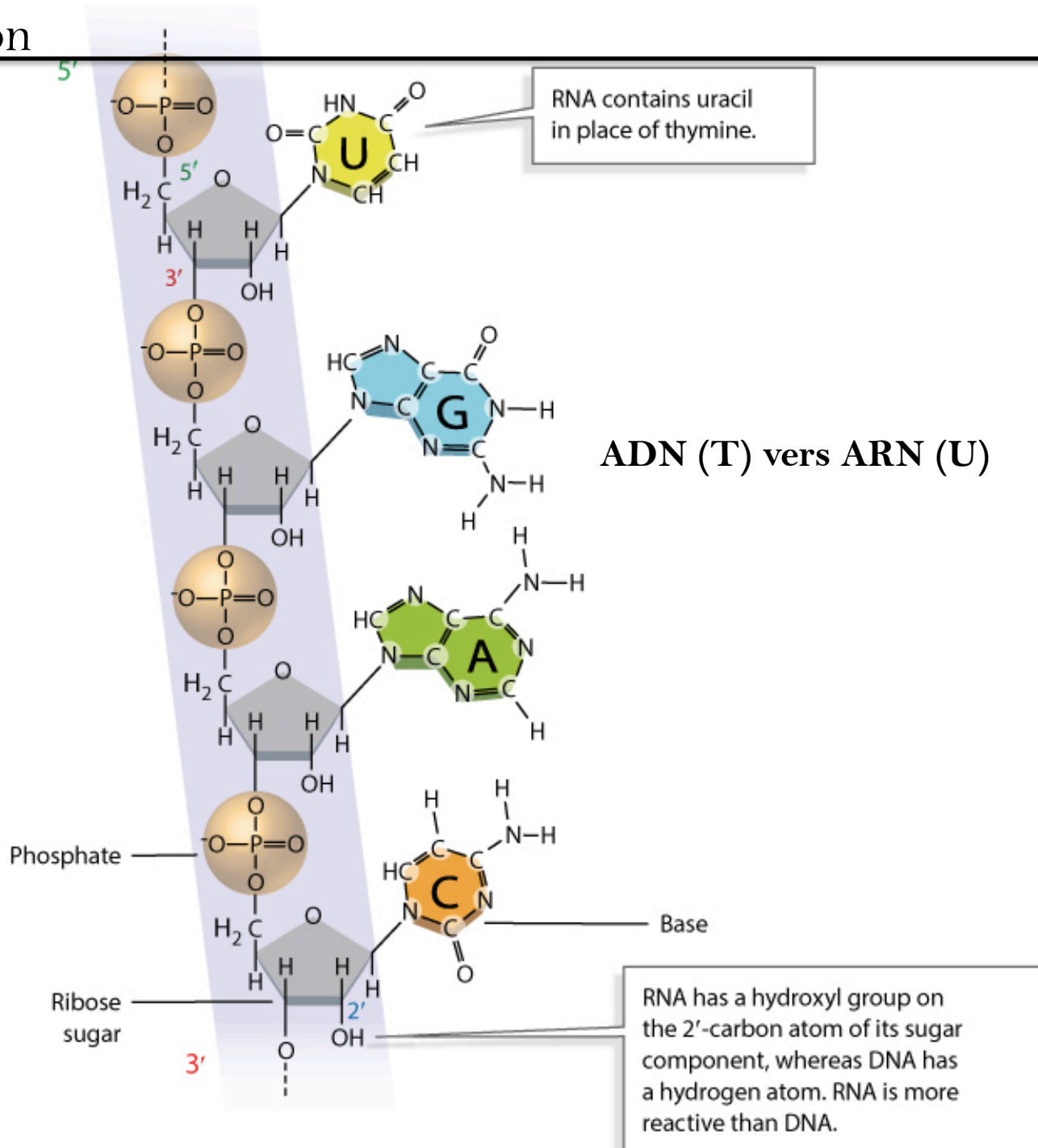
- ARN ribosomique (ARNr)
 - > Chez les procaryotes on trouve les 16S – 5S – 23
 - > Chez les eucaryotes on trouve les 18S -- 5,8S – 28S – 5S
- ARN de transfert (ARNt)
- Small ARN
 - > Small nuclear ARN
 - > Micro ARN

Structure de l'ARN

- Simple brin
- Sucre: Ribose
- L'Adénine est complémentaire à l'Uracile



Introduction



Introduction

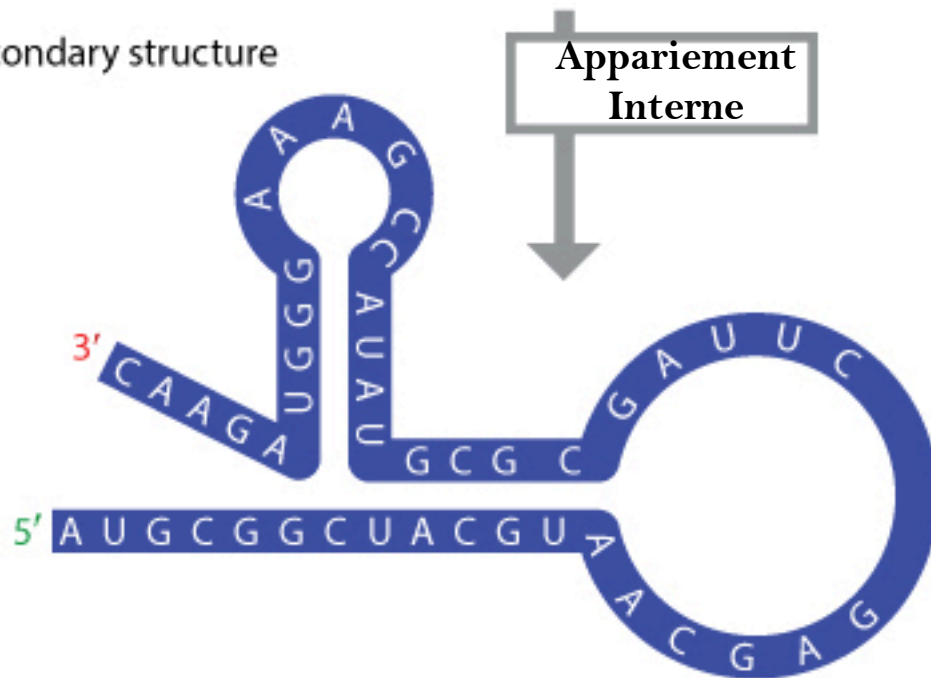
La même structure de base pour les différents ARN:

Structure primaire & structure secondaire

(b) Primary structure

5' AUGCGGCUACGUAACGAGCUUAGCGCGUAUACCGAAAGGGUAGAAC 3'

Secondary structure



Appariement due à la liaison faite entre les hydrogènes de deux bases complémentaires du même brin

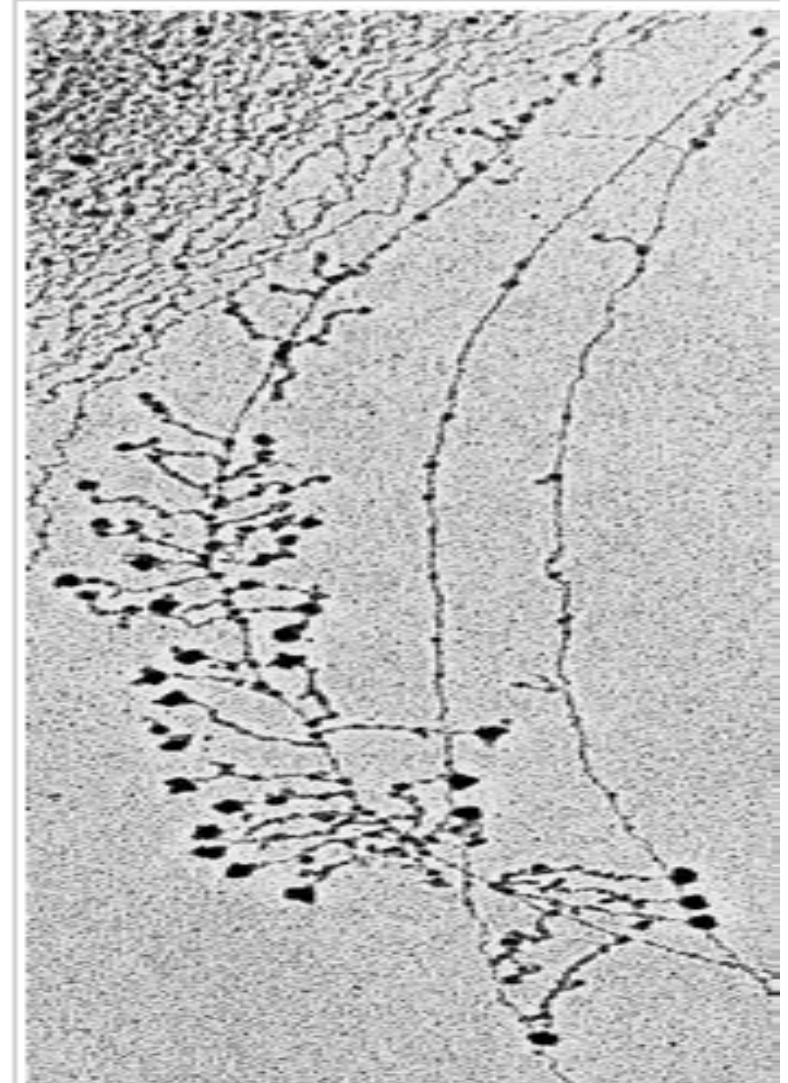
Visualisation de la transcription

Le processus de la transcription peut être visualiser par microscopie électronique (première fois en 1970)

Les molécules d'ADN: filaments

Les molécules d'ARN: Branches

L'ADN est double brin et seulement un des brins sert comme matrice pour la transcription: le brin non codant
Le brin complémentaire (qui ne sert pas de matrice): brin codant



Le processus de la transcription

1^{ère} étape de synthèse d'une protéine = copie du gène (ADN) en une molécule d'ARN

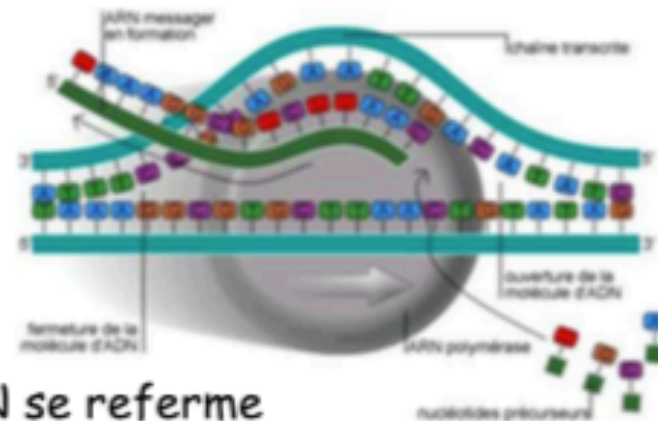
➤ **Assurée par l'ARN polymérase**

- Nécessite ADN double brin (matrice), des précurseurs (ribonucléosides triphosphates: ATP, GTP, UTP et CTP) et pas d'amorce
- Formation des liaisons phosphodiester entre les ribonucléotides dans la direction 5' - 3'
- Un seul brin servira à la synthèse d'ARN

➤ **Déroulement en 3 étapes:**

Initiation, élongation, terminaison

- L'ARNm se détache et la molécule d'ADN se referme

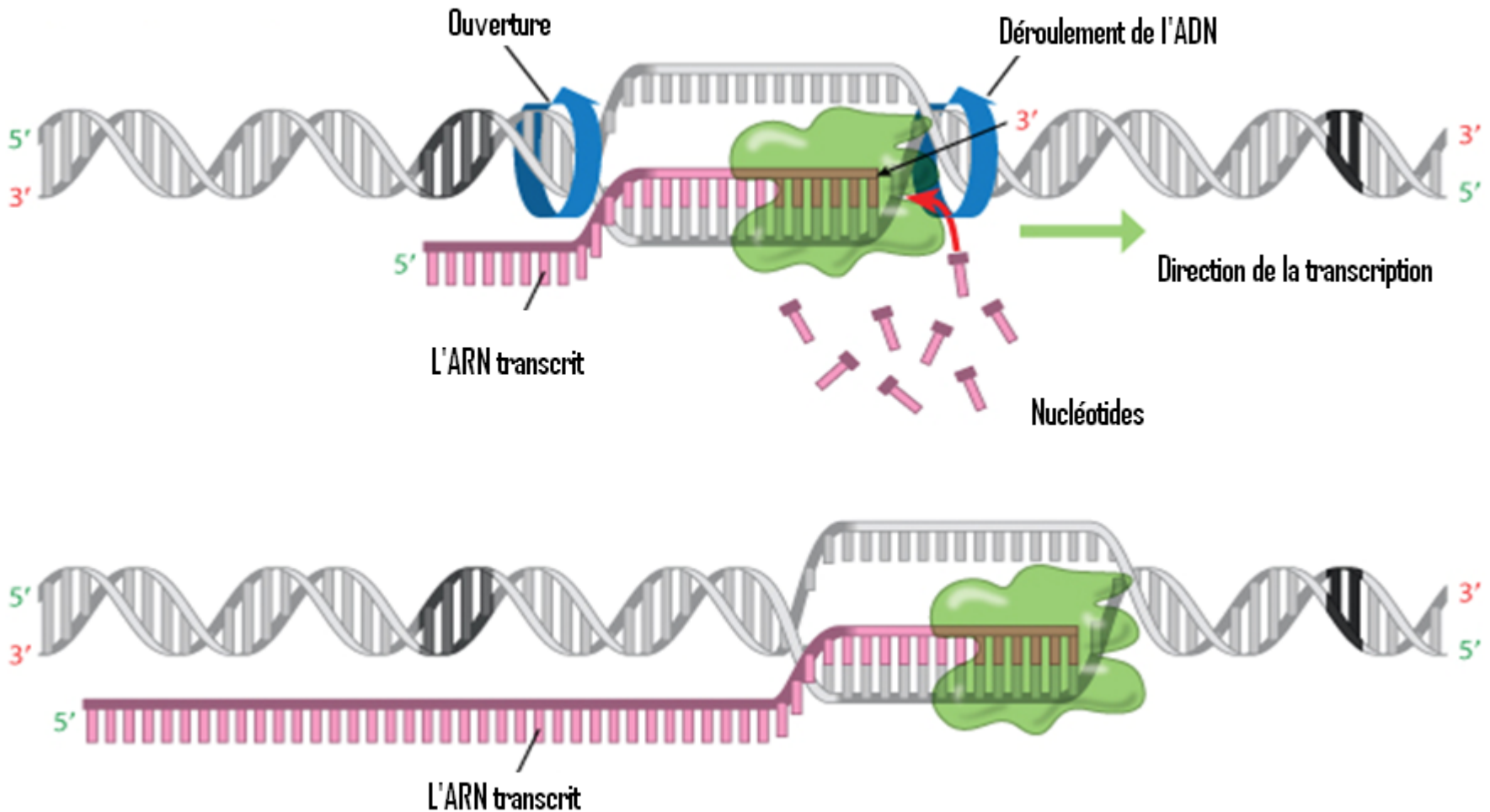


1~ Initiation



Le processus de transcription est initié quand l'ARN polymérase se fixe sur un ADN modèle au niveau d'un promoteur

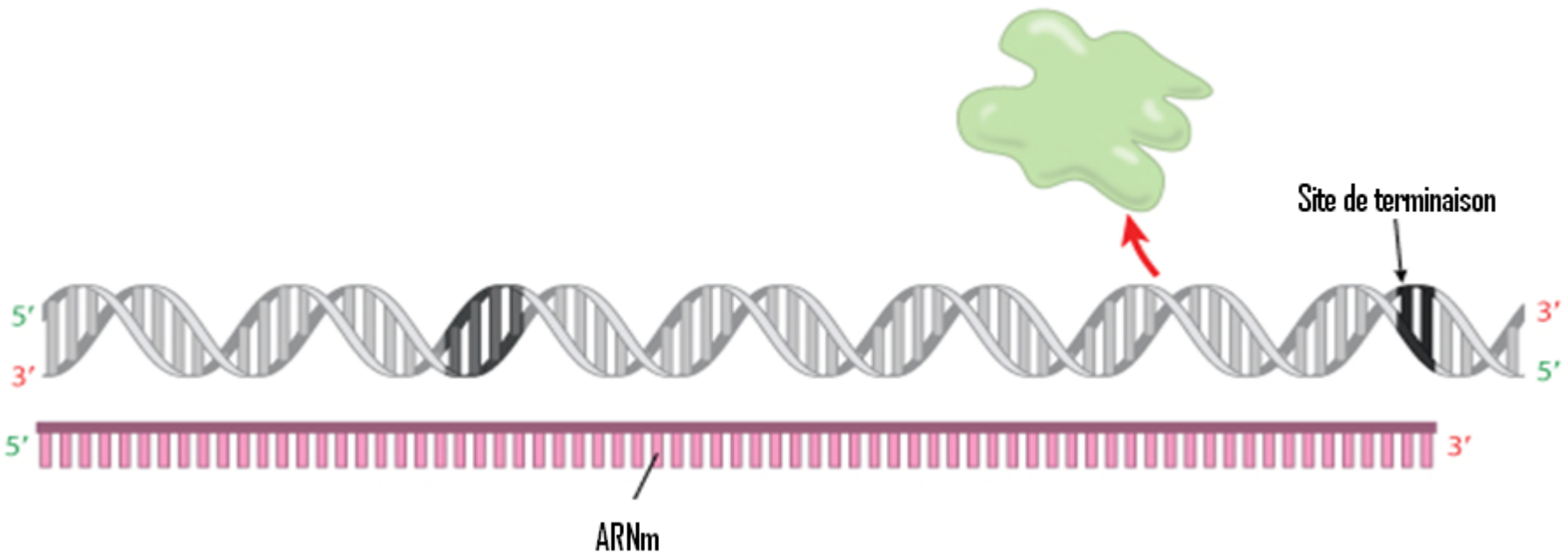
2~ Elongation



L'ADN double brin se dénoue.

L'ARN polymérase fait la lecture de l'ADN matrice et ajoute les nucléotides à l'extrémité 3' d'un ARN croissant

3~ Terminaison



Arrêt de la transcription

Quand l'ARN polymérase rencontre une séquence de terminaison au niveau du brin d'ADN matrice:

- Relâchement de l'ARNm et de l'ARN polymérase (du complexe)

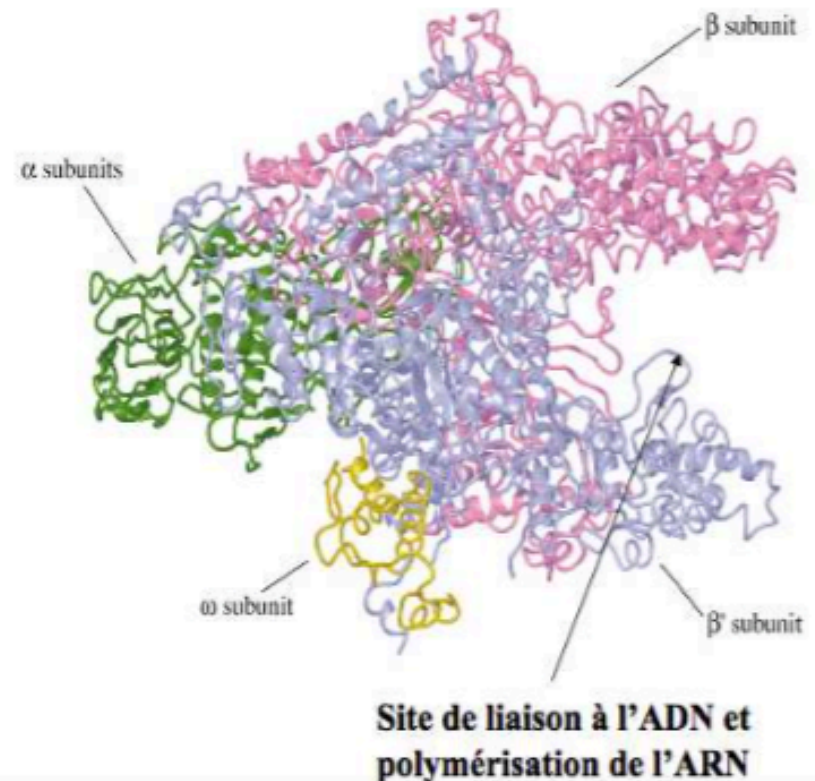
Les ARN polymérases

Chez les procaryotes Une seule ARN polymérase

Le core de l'enzyme est un complexe protéique multimérique: 4 sous-unités α_2 , β , β' et ω ($\alpha_2\beta\beta'\omega$).

L'association du facteur σ au core de l'enzyme = holoenzyme ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$)

- La sous unité β assure la liaison à l'ADN.
- La sous unité β' possède le site actif de la polymérase
- Les 2 sous unité α permettent l'assemblage des autres sous unités
- La sous unité ω rétablit la fonctionnalité de l'ARNp dénaturée in vitro
- Intervention du facteur σ pour la reconnaissance du site d'initiation.



Les ARN polymérase

Chez les eucaryotes

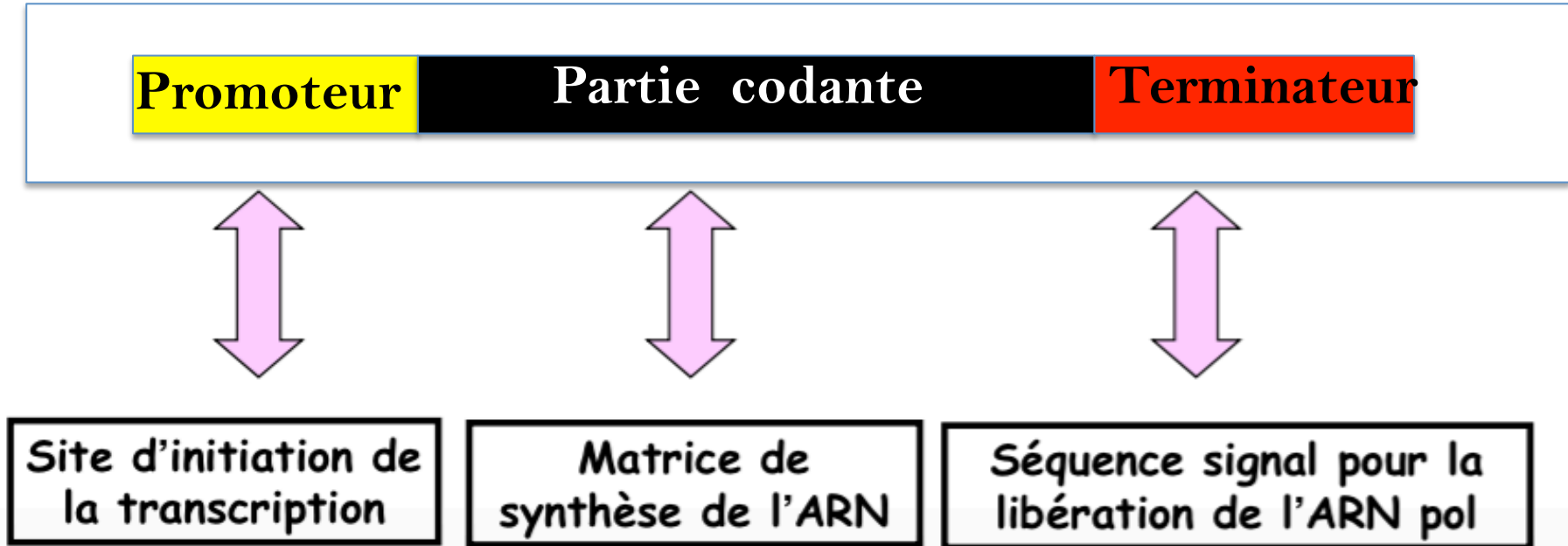
4 types d'ARN polymérase

- ✓ **RNA-polymérase I** qui synthétise les RNA cytoplasmiques : RNA ribosomiques (18S- 5,8S- 28S)
- ✓ **RNA-polymérase II** qui synthétise les RNA messagers certains des snRNA
- ✓ **RNA-polymérase III** qui synthétise les petits RNA (tRNA, rRNA 5 S, snRNA, 7SL-RNA).
- ✓ **RNA-polymérase IV** spécialisé dans la transcription de l'ADN mitochondrial et la synthèse de l'hétérochromatine chez les plantes

Transcription chez les bactéries

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

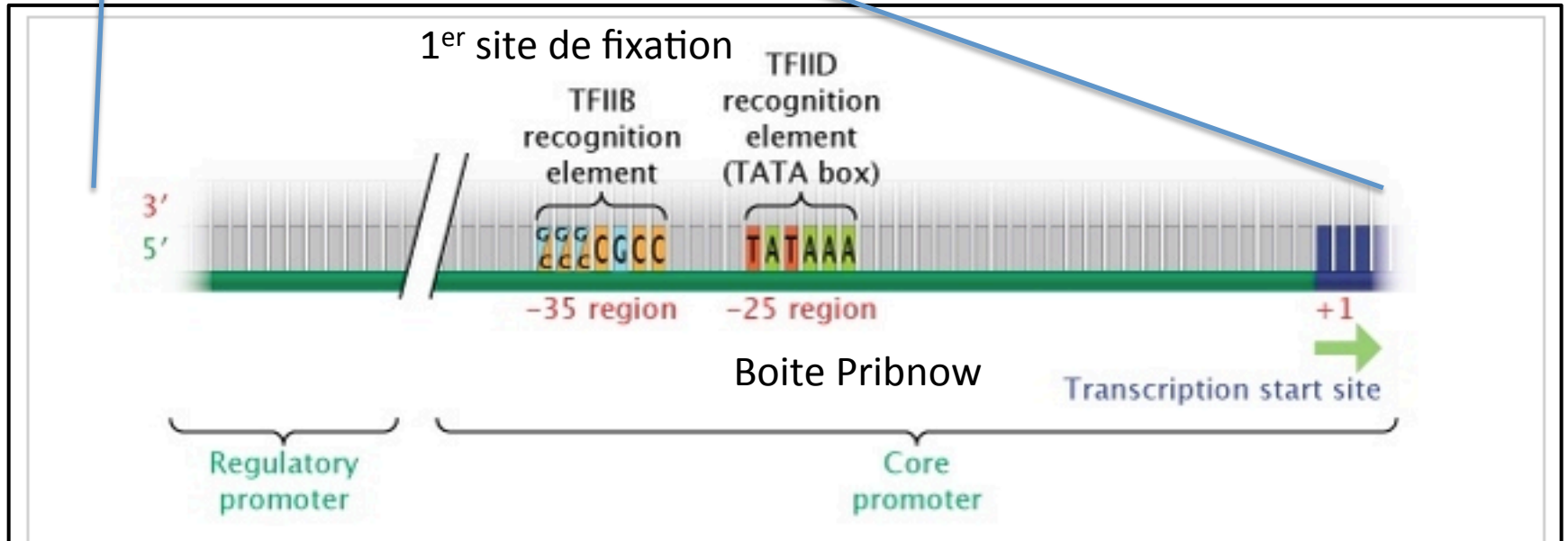


Promoteur Procaryote

Promoteur

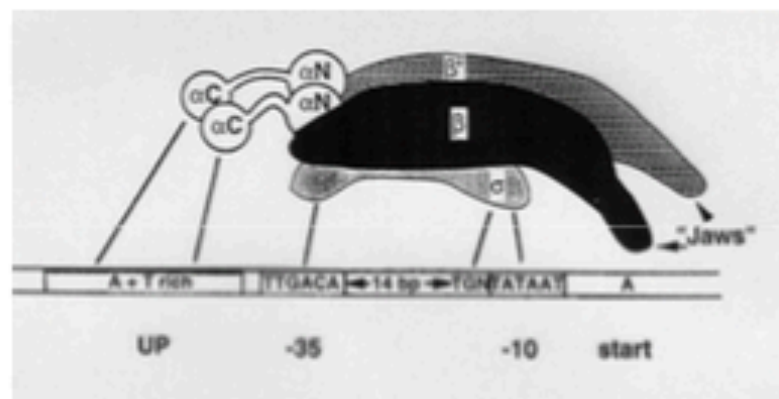
Partie codante

Termineur



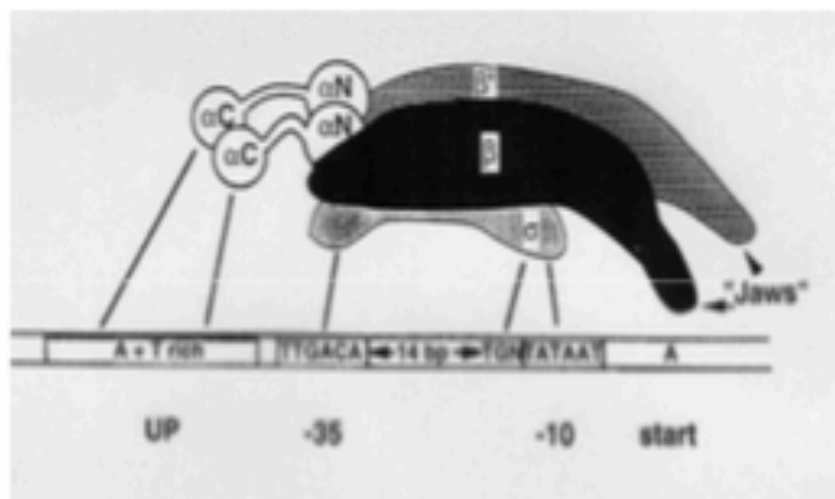
Initiation de la polymérisation et rôle du facteur sigma :

- ❑ Assure la reconnaissance des séquences clé du promoteur
- ❑ Positionne l'ARNp sur le promoteur qui l'oriente dans une direc
- ❑ Facilite l'ouverture de la double hélice



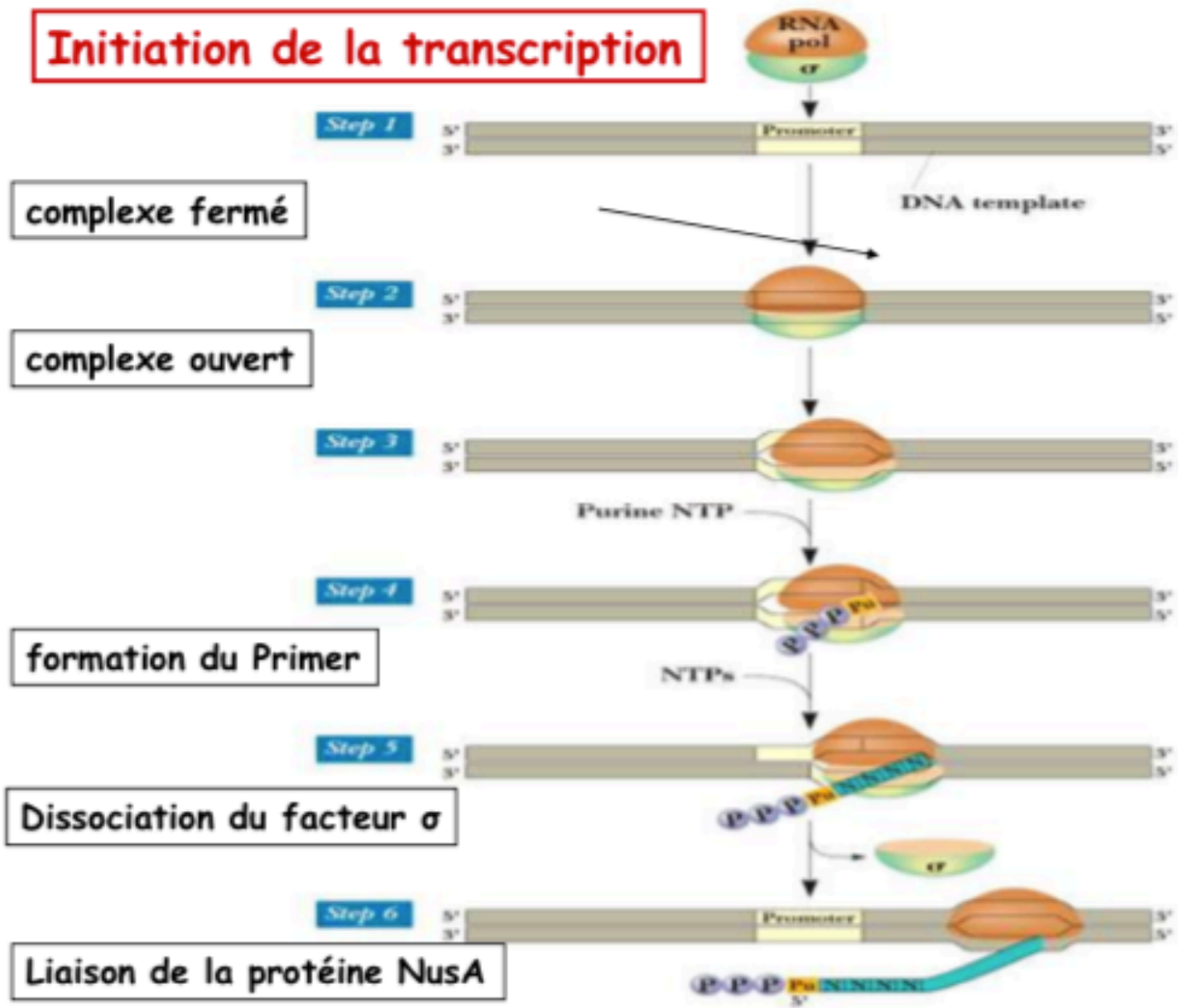
- ❑ Association de 7 ou 8 ribonucléotides sous forme d'un polymère hybridé au brin matrice ADN
- ❑ Forte affinité de l'ARNp avec l'hybride ADN/ARN d'où décrochage du facteur sigma et liaison de la protéine NusA permettant la stabilisation de l'enzyme

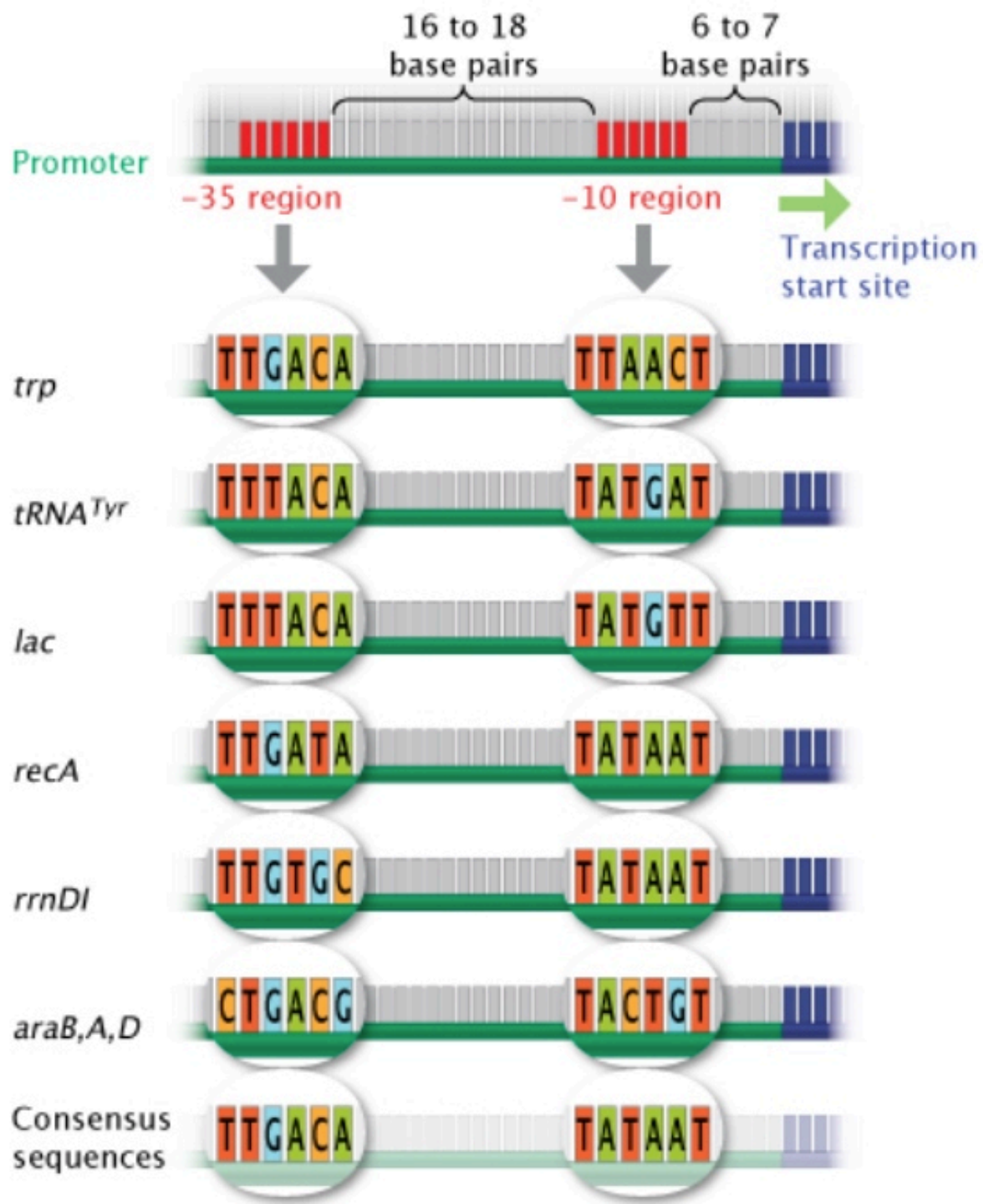
- ❑ Positionne l'ARNp sur le promoteur qui l'oriente dans une direction
- ❑ Facilite l'ouverture de la double hélice



- ❑ Association de 7 ou 8 ribonucléotides sous forme d'un polymère hybridé au brin matrice ADN
- ❑ Forte affinité de l'ARNp avec l'hybride ADN/ARN d'où

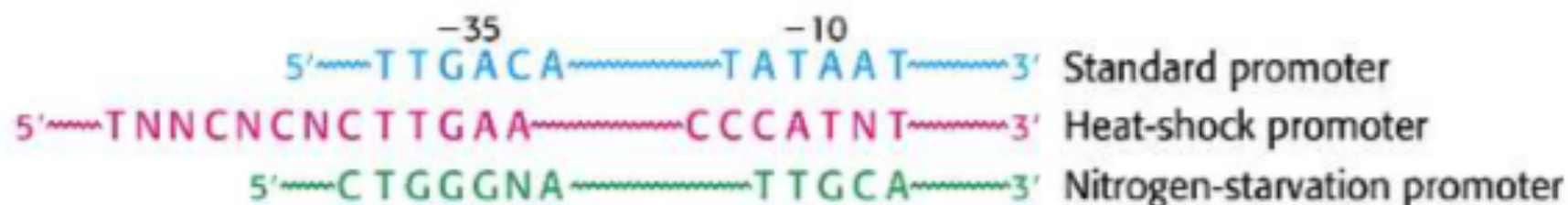
Initiation de la transcription



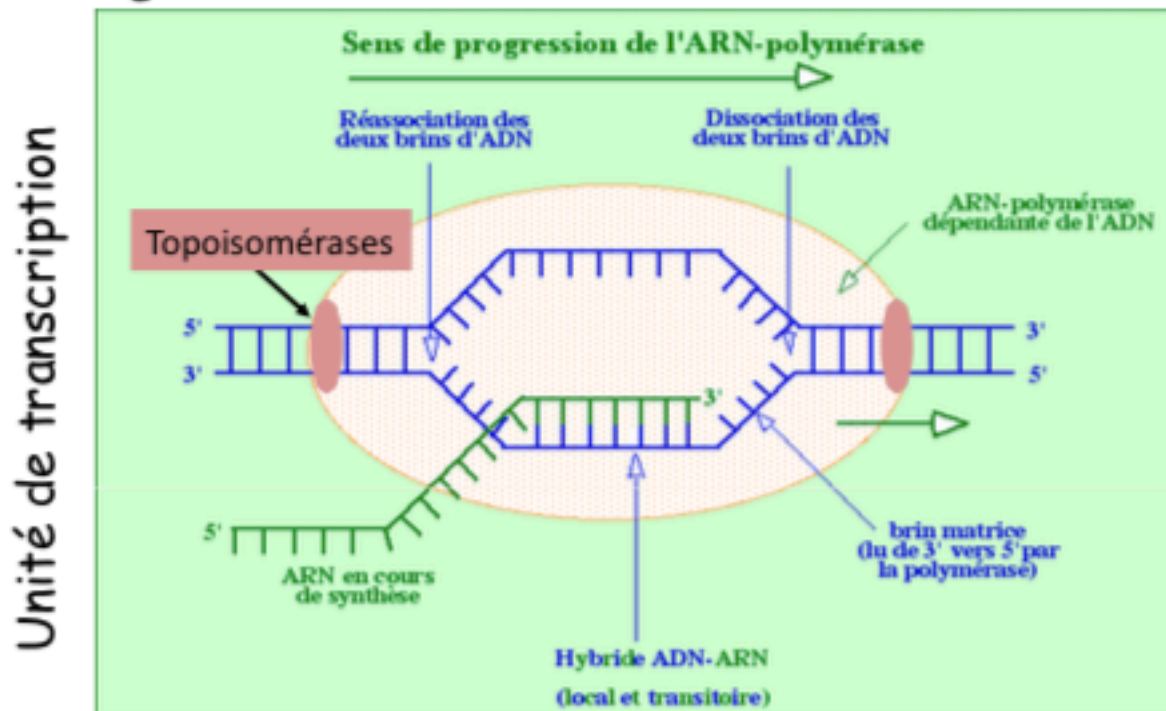


Chez *E.coli*, 7 facteurs sigma qui reconnaissent des séquences différentes

- Sigma de la famille 70: σ^{70} standards (reconnait différentes séquences de promoteurs)
- Sigma de la famille 32: σ^{32} spécifique à la réponse au choc thermique
- Sigma de la famille 54: σ^{54} spécifique à l'assimilation de l'azote



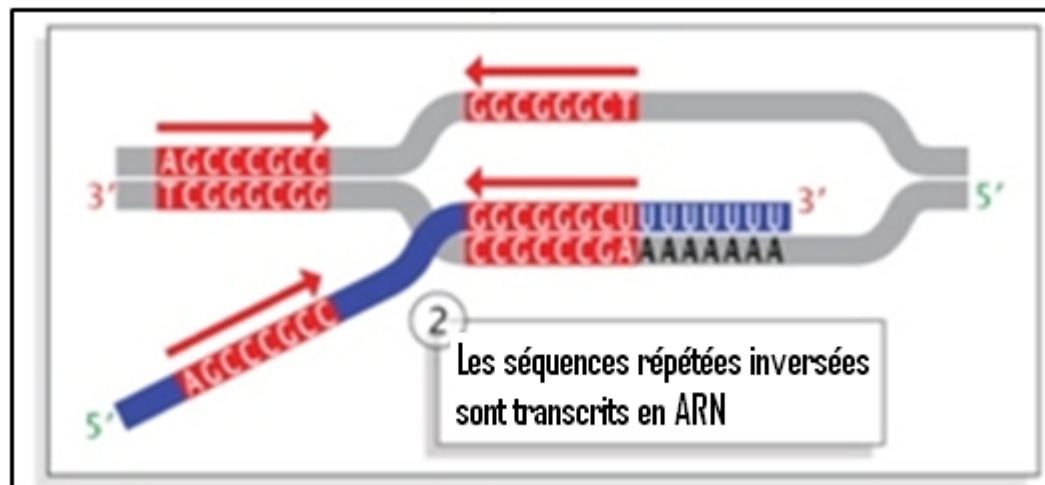
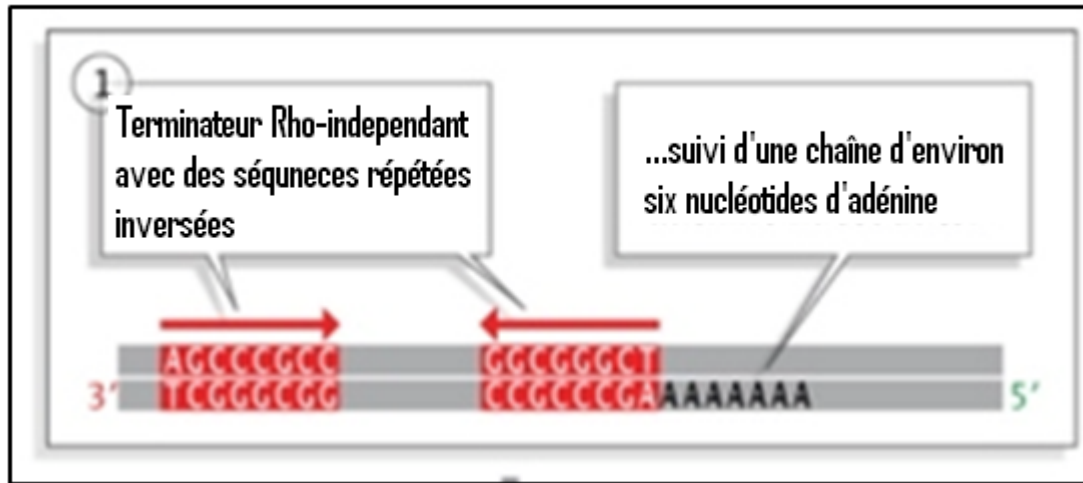
3- Élongation de la chaîne d'ARN:

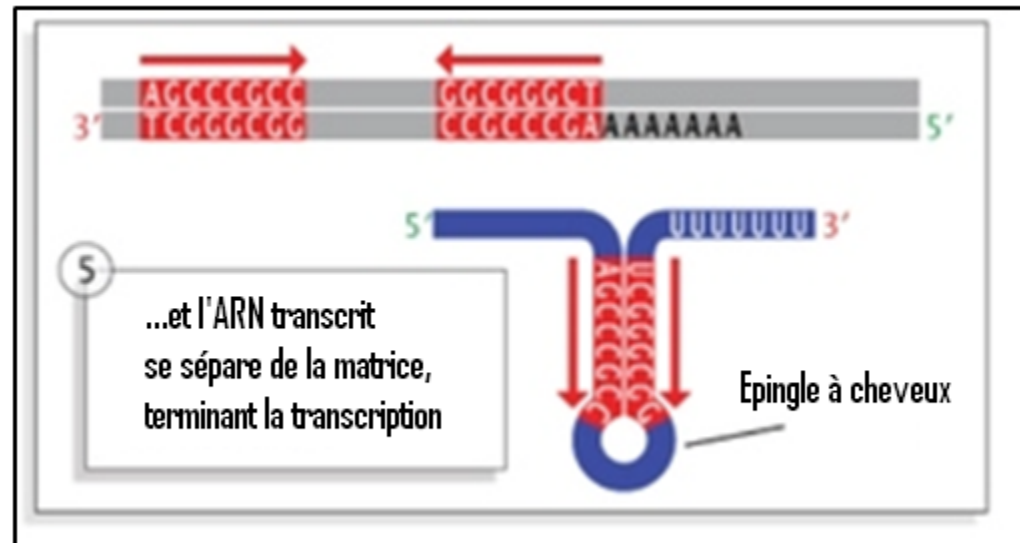
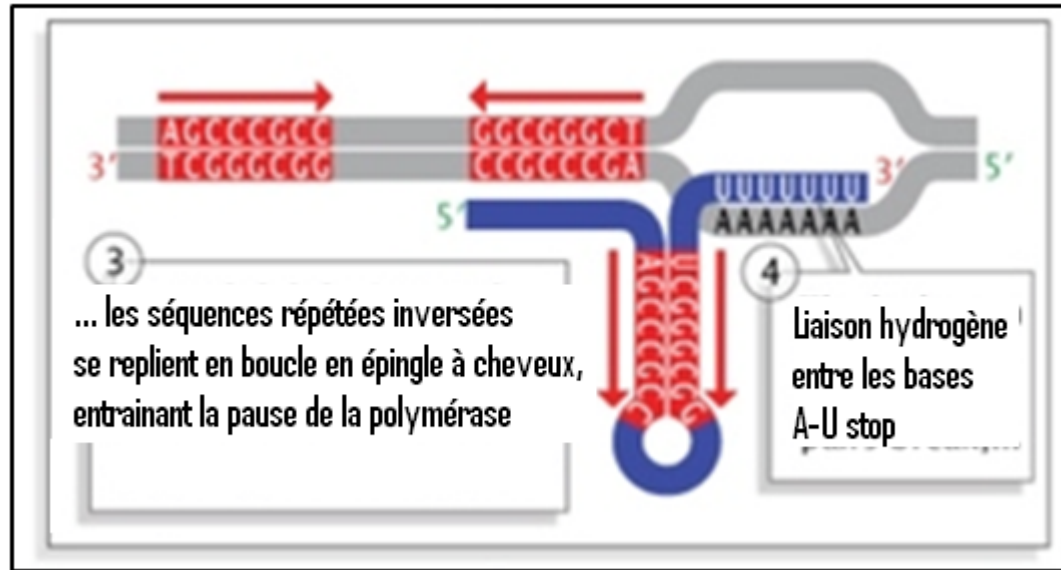


- assurée par le core de la polymérase à une vitesse d'environ 30 nucl/sec
- Topoisomérases précèdent et suivent la polymérase
- Souvent plusieurs transcrits de la même matrice



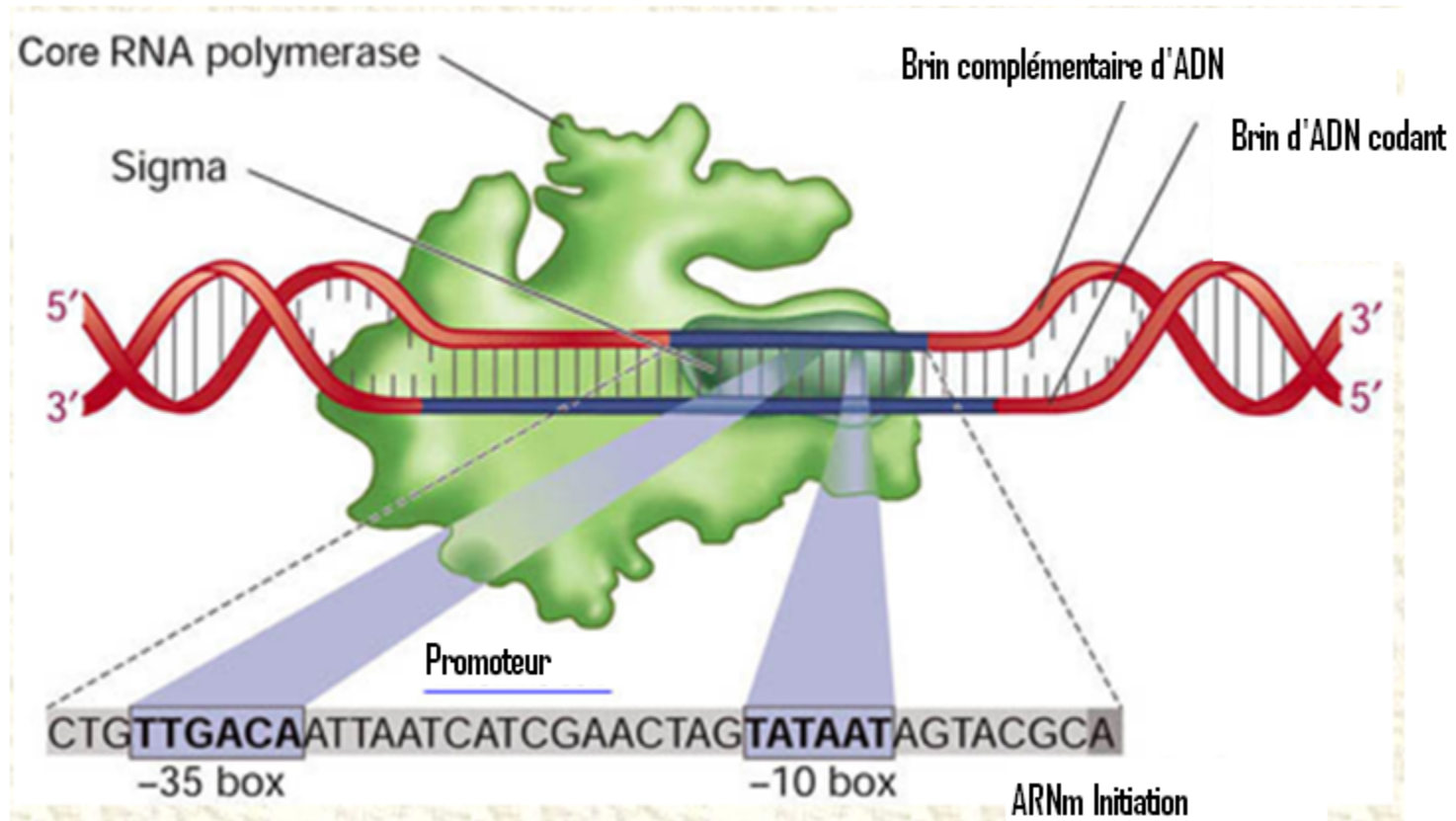
• Unité de transcription mono ou polycistronique



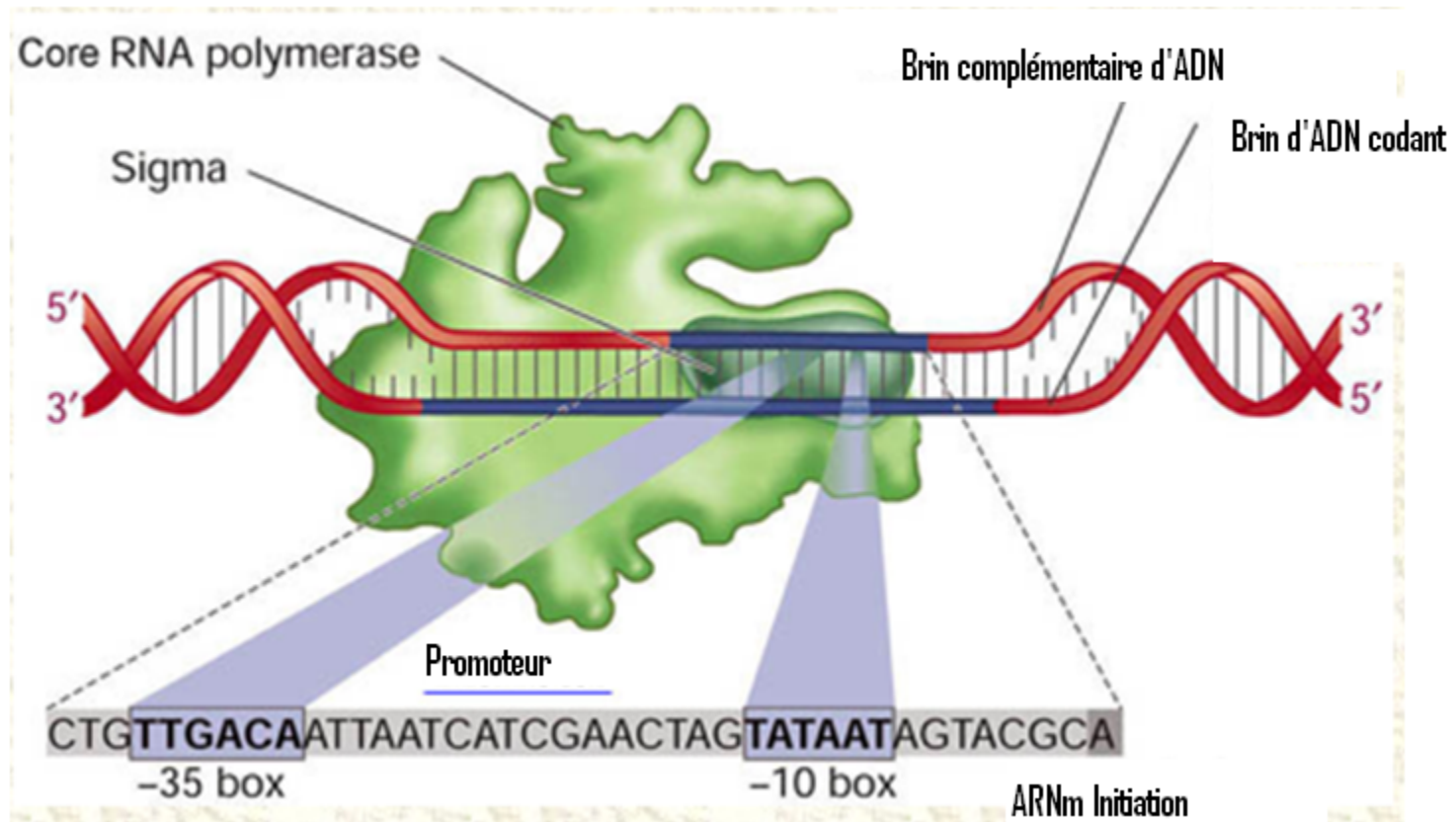


A- Transcription chez les procaryotes

L'initiation de la transcription nécessite que la sous-unité sigma σ de l'ARN polymérase se fixe sur l'oligomère $\alpha_2\beta\beta'$ « Core-enzyme » pour former l'holoenzyme $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.



- Fixation non spécifique du complexe à l'ADN moyennant la sous-unité sigma
- Déplacement jusqu'au promoteur entre les séquences:
 - Boite TATA située à -10 pb
 - Boite pribnow située à -35 p



Gene	-35 region	Pribnow box (-10 region)	Initiation site (+1)
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTT	TACTGTTTCTCCATA	ACCCGTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTT	TGTCATGGCTTTGGT	CCCGCTTTG
<i>bioA</i>	TTCCAAAACGTGTTTTTTT	TGTTAATTCGGTG	TAGACTTGTAACCTAAATCTTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTAACCAAAT	TGAAAAGATT	TAGGTTTACAAGTCTACACCGAAT
<i>galP2</i>	ATTTATTCCATGTCACACTTTT	TCGCATCTTTGT	TATGCTATGGTTATTTTCATACCAT
<i>lac</i>	ACCCAGGCTTTACACTTTAT	GCTTCCGGCTCG	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATGGCGCAAAACCT	TTCGCGGTATGG	CATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTC
<i>rrnA1</i>	AAAATAAATGCTTGACTCTGT	AGCGGGMAGGCGTATT	TCACACCCTCCGCGCCGCTG
<i>rrnD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCAAAAAA	ATTGGGATCCCTATA	TGCGCCTCCGTTGAGACGA
<i>rrnE1</i>	CAATTTTTCTATTGCGGCCTG	CGGAGAMCTCCCTATA	TGCGCCTCCATCGACACGG
<i>rRNA^{Tyr}</i>	CAACGTAAACACTTTACAGCGG	CGCGTCAATTGATAT	ATGCGCCCGCTTCCCGATA
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAATTAAT	CATCGMACTAGTTA	CTAGTACGCAAGTTTCACGTA

Consensus sequence:	-35 region	Pribnow box	Initiation site
	T C T T G A C A T ... [11-15 bp] ...	T A T A A T ... [5-8 bp] ...	A C G
	42 38 82 84 79 64 53 45 41	79 95 44 59 51 96	51 48 55 42

Chez *E.coli*, 7 facteurs sigma qui reconnaissent des séquences différentes

- Sigma de la famille 70: σ^{70} standards (reconnait différentes séquences de promoteurs)
- Sigma de la famille 32: σ^{32} spécifique à la réponse au choc thermique
- Sigma de la famille 54: σ^{54} spécifique à l'assimilation de l'azote

5- Terminaison de la transcription

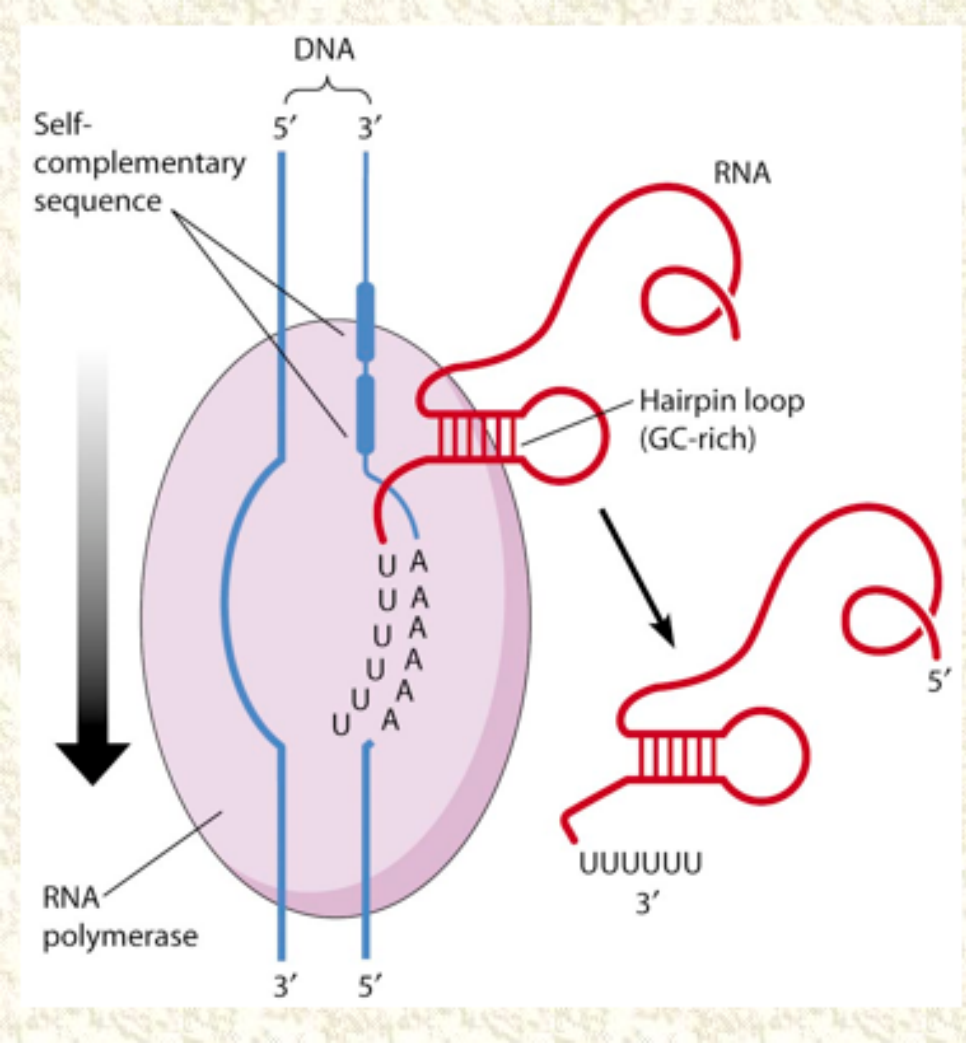
Processus conduisant à la **dissociation** des sous unités de l'ARNp après la rencontre des **signaux de terminaison**

Deux mécanismes:

- ❖ Terminaison « rô-indépendante »: terminateurs intrinsèques
- ❖ Terminaison « rô-dépendante »: dépend de la présence d'une protéine rho

Terminaison Rho-dépendante

- Transcription en épingle à cheveux d'une courte séquence d'ADN riche en paires G-C suivie de plusieurs U, et arrêt de l'ARN polymérase.
- Fixation sur l'ARN d'une protéine de terminaison appelée Rho (une hélicase ARN-ADN/ATP-dépendante sous forme d'homohexamère) et le complexe d'élongation est dissocié.
- Libération du brin néo-synthétisé du brin d'ADN matrice.
- Enroulement de l'ARN autour de la protéine Rho au niveau d'une région d'environ 70 nucléotides (jusqu'à 100 nucléotides)

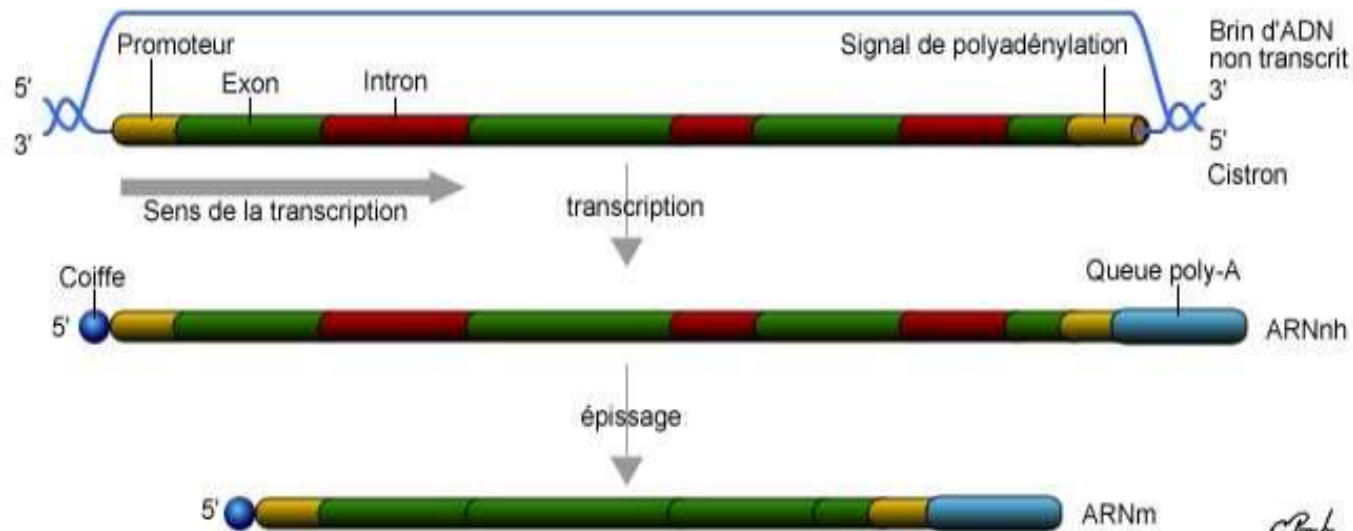


Terminaison Rho-indépendante ou intrinsèque

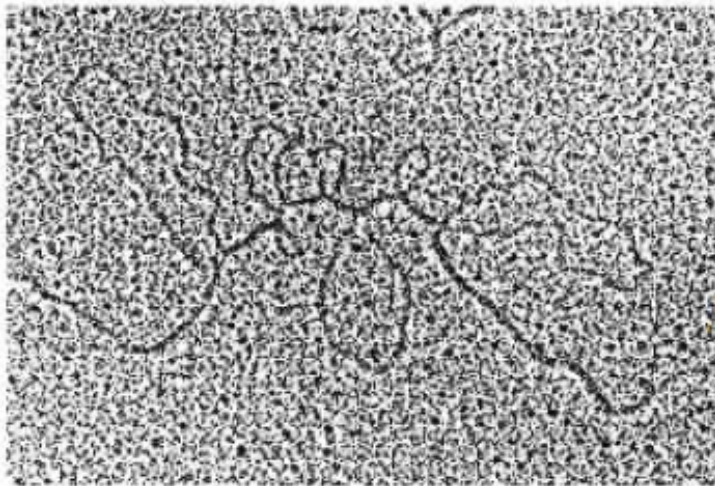
- Au niveau d'une séquence répétée inversée située après la partie codante et riche en G-C et suivie de 6A
- Formation d'une structure en épingle à cheveux dans l'ARN transcrit et bloque la transcription.
- Rupture des liaisons entre le brin complémentaire néo-synthétisé polyU et le brin complémentaire poly-U et libération du brin d'ARN de l'ADN matrice.

Particularités du génome des eucaryotes

- Diploïde
- Éclaté ou en mosaïque: introns et exons
- Expression compartimentée
- Unité de transcription est monocystronique

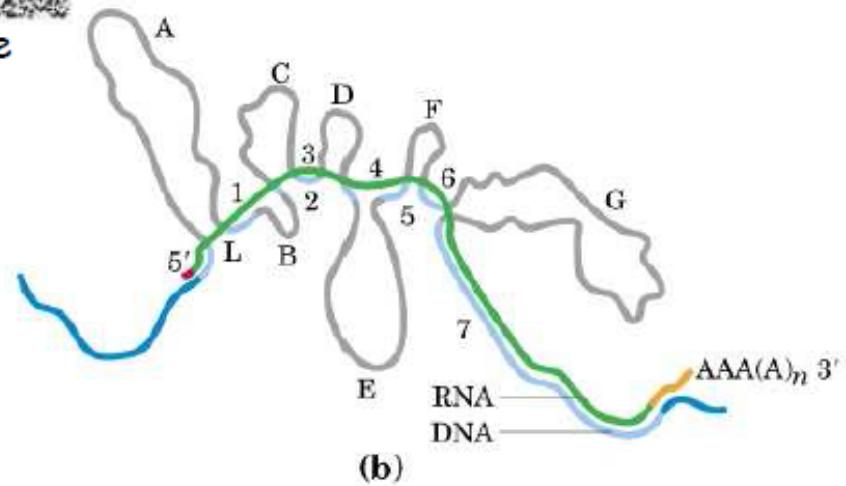


C. Proulx

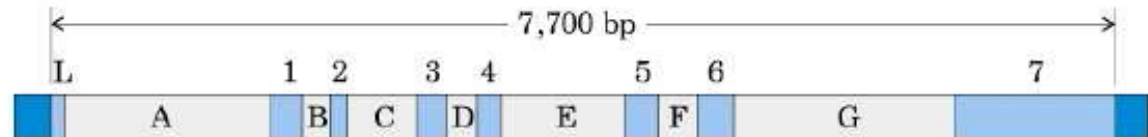


Génome en mosaïque

Hybridation ARNm épissé avec le gène correspondant d'ADN



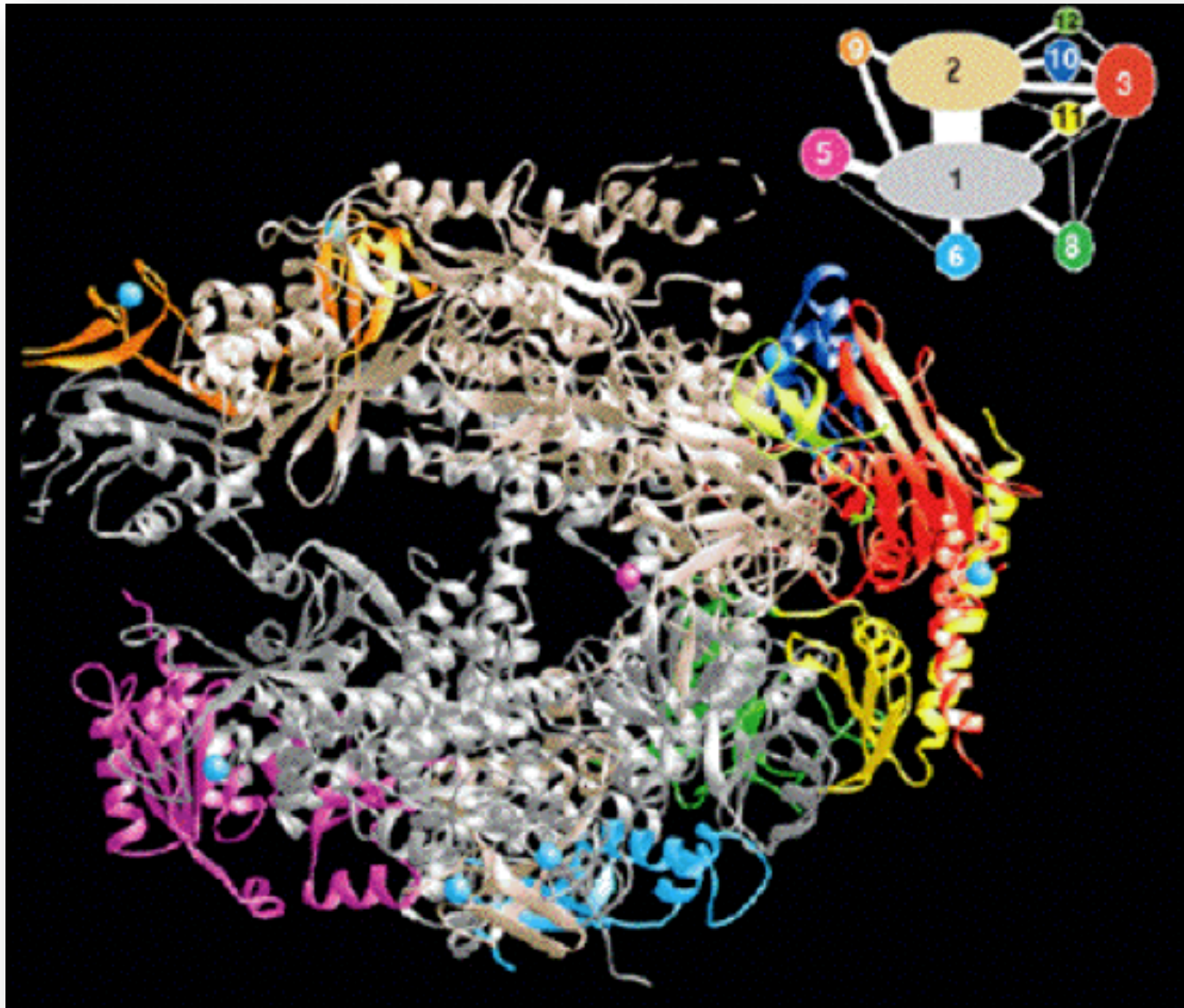
Introns: A, B, C, D, E, F, G



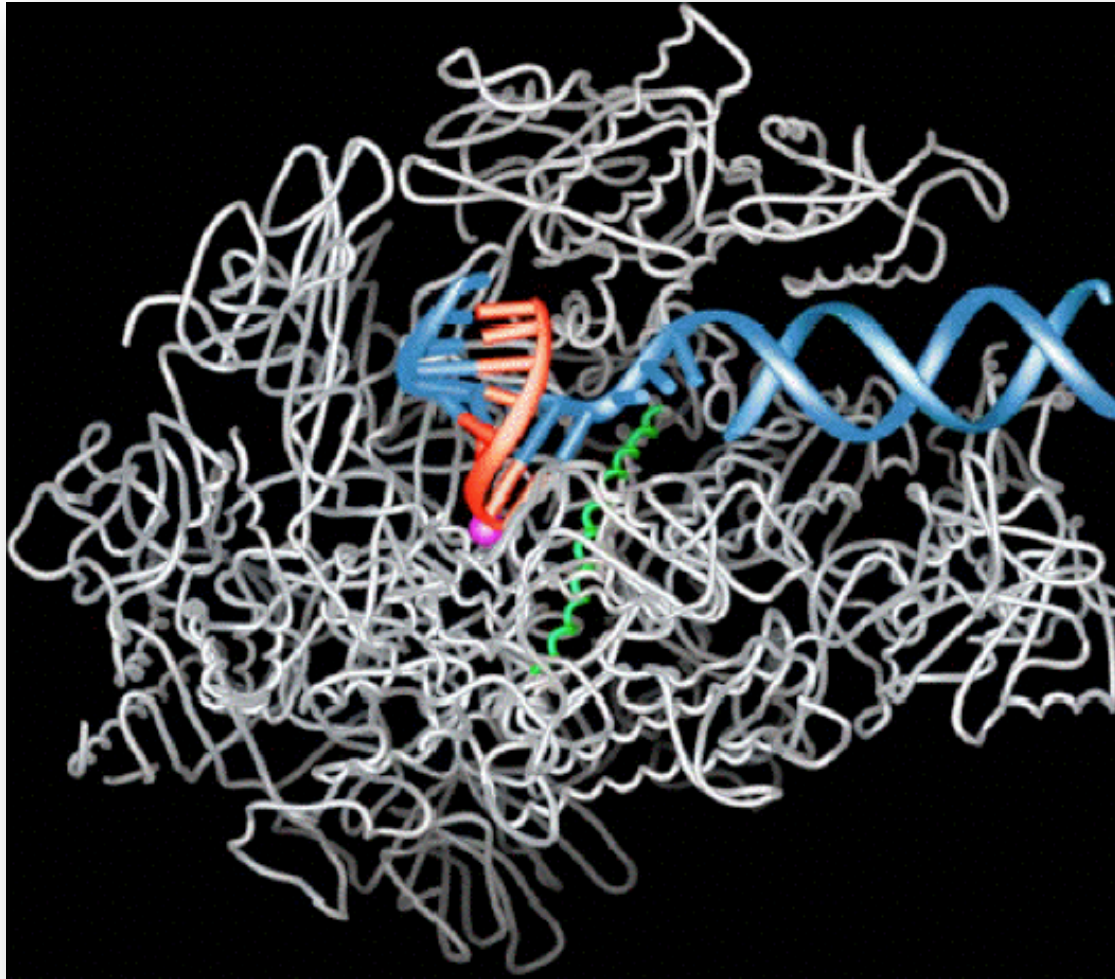
A- Transcription chez les eucaryotes

A chaque type d'ARN correspond une ARN polymérase

ARN polymérase	ARN transcrits
type I (Pol I)	ARN ribosomique 5,8 S, 18 S et 28 S
type II (Pol II)	ARN messagers et petits ARN nucléaires
type III (Pol III)	ARN de transfert, ARN ribosomique 5 S et petits ARN nucléaires
des organites	ARN mitochondriaux et chloroplastiques



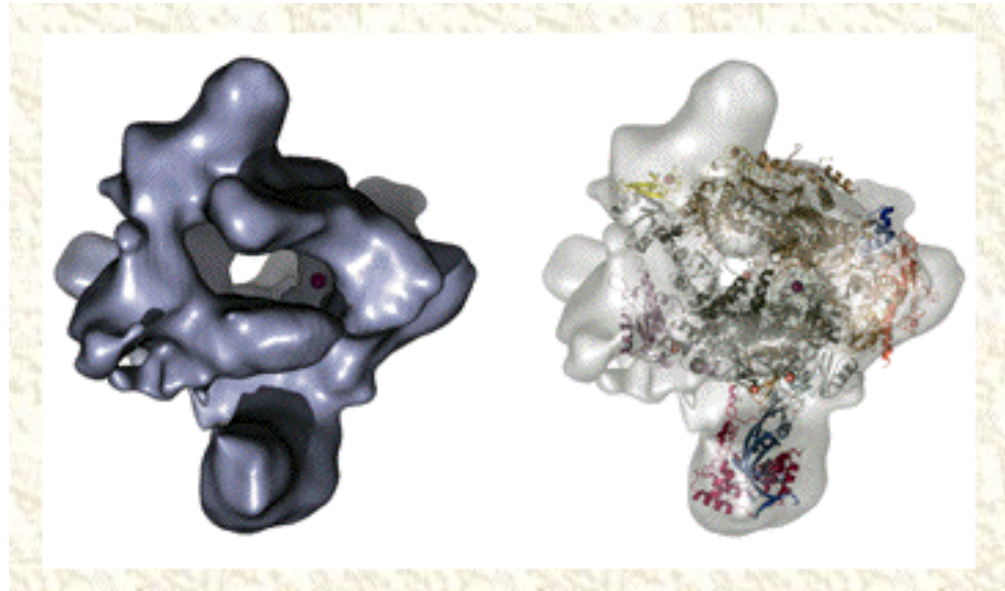
La structure de l'ARN polymerase II à une résolution de 2,8 A.



En blanc, l'ARN polymerase II; En bleu, la double hélice d'ADN; En rouge, L'ARN en cours de formation; En vert, La structure qui fait avancer le brin d'ADN dans l'enzyme

L'ARN polymérase III

Par Cryo-microscopie électronique (2007) on a obtenue la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase .



-Présence de cinq sous-unités supplémentaires qui interviennent dans la transcription (étapes initiale et finale).

- Les sous-unités assurent la fixation des facteurs de transcription et la reconnaissance de l'ADN.

L'initiation de la transcription chez les Eucaryotes

Elle est plus complexe chez les eucaryotes car les ARN polymérases ne reconnaissent pas directement leurs séquences promotrices :

→ 5 facteurs de transcription généraux (Transcription Factor) :

TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F et TFII-H)

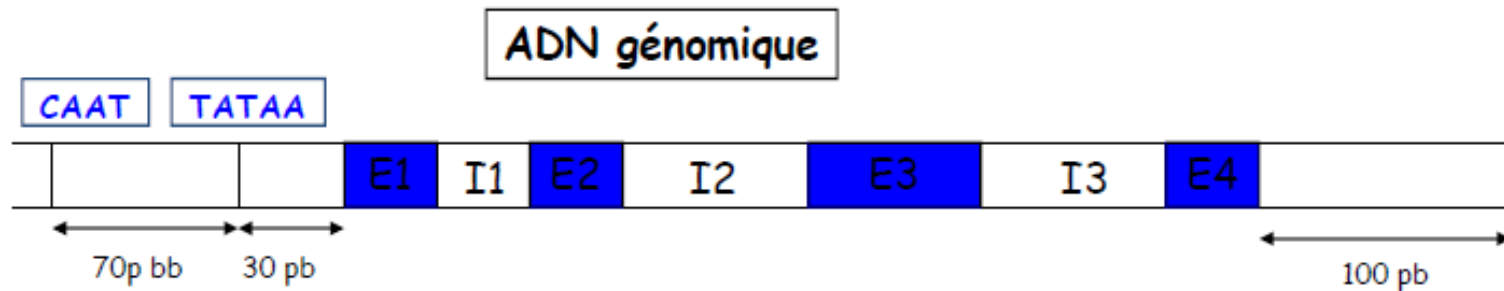
doivent d'abord médier la fixation des ARN polymérases et l'initiation de la transcription.

Le complexe complet [*ARN polymérase - facteurs de transcription - séquence ADN du promoteur*] est appelé **complexe de pré-initiation de la transcription**.

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 relarguage de Pol II du promoteur*

1 - Initiation de la transcription et terminaison



Signaux moléculaires nécessaires à l'initiation:

- ❖ 30 PB: Boite **TATA** (équivalente de la Pribnow des procaryotes)
- ❖ 70 PB: **CAAT** ou **Enhancer** (virus): stabilisation du complexe ADN-ARNp

Signal de terminaison:

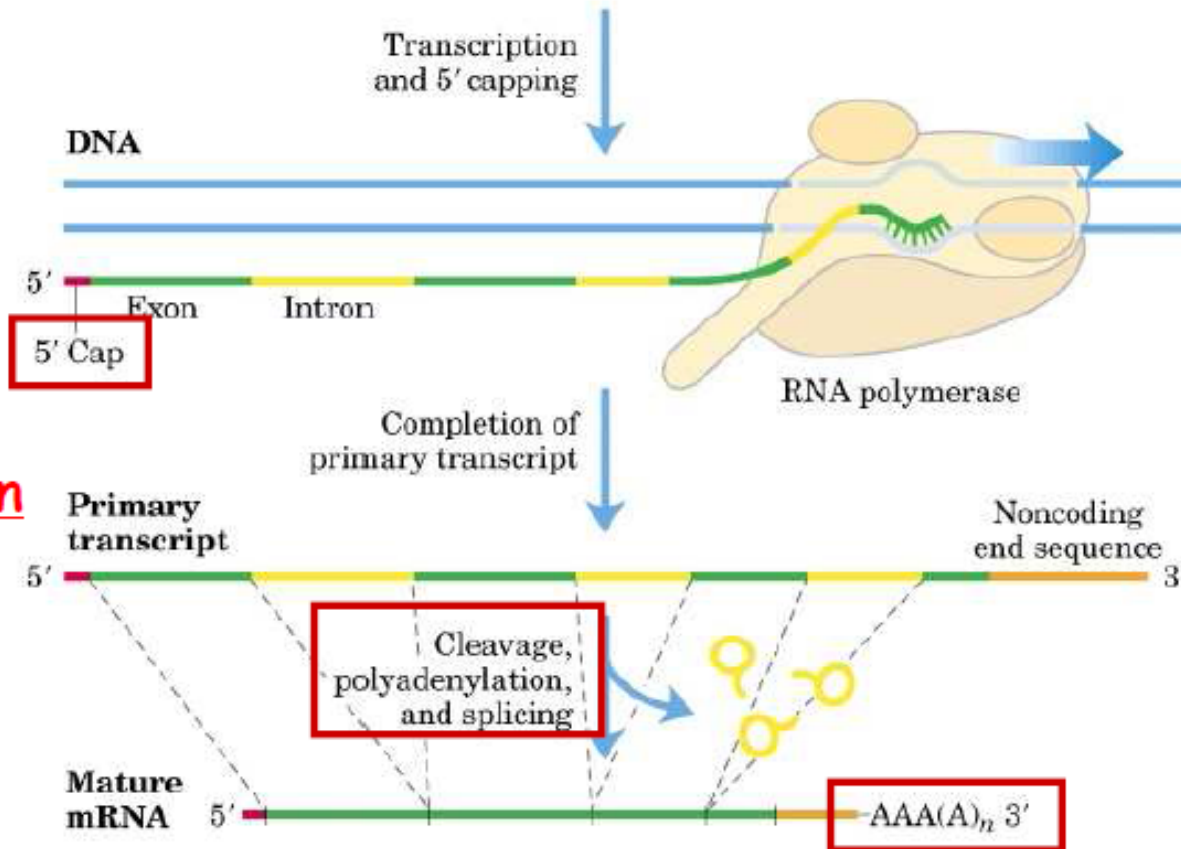
- ❖ Séquence de 6 pb à la fin du gène reconnue par ARN-endonucléase
- >>> Extrémité 3' formée est polyadénylée dans le nucléoplasme

2- Modification post-transcriptionnelle:

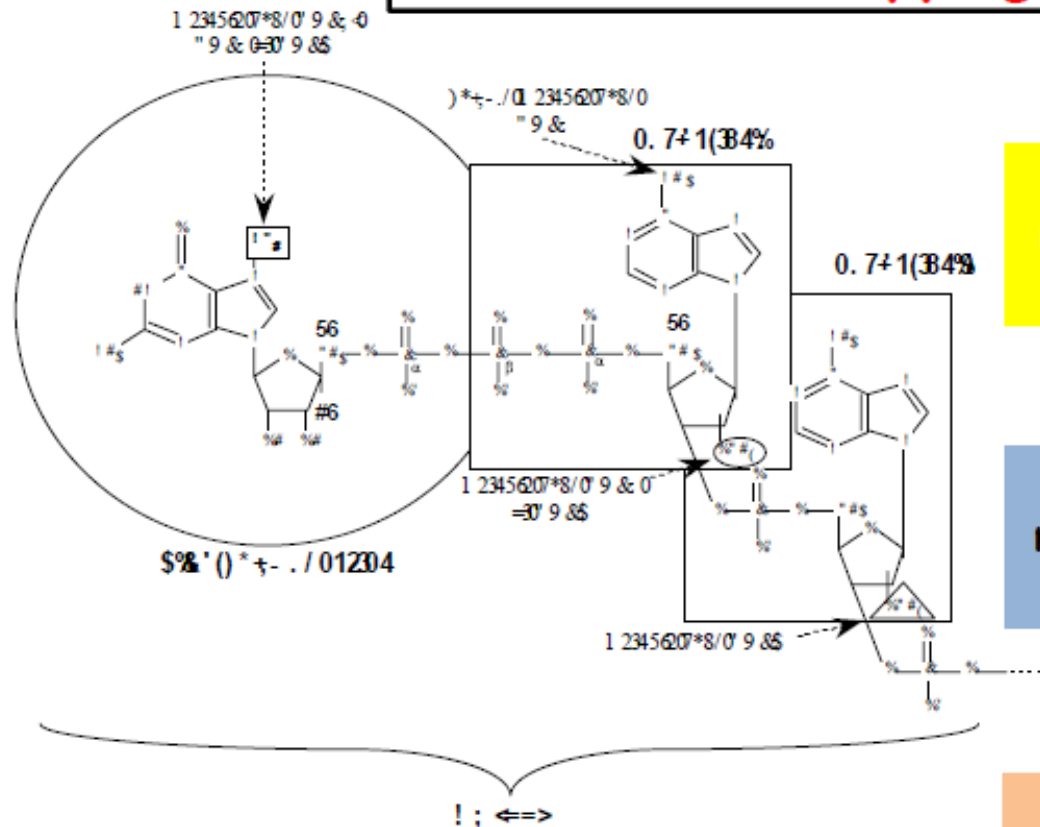
• Capping

• Polyadénylation

• Epissage



α - Coiffe ou capping



signal de reconnaissance pour les ribosomes

Dernière base du messageur inaccessible aux ribonucléases

Augmente l'efficacité de la traduction

Guanosine méthylée sur l'azote 7 fixée à l'extrémité 5' par une liaison pyrophosphate 5'-5' à la première base de l'ARN (A ou G)

b- Polyadénylation

RNA polymerase

Template DNA

5'

Cap

RNA

AAAAAAAA

(a)



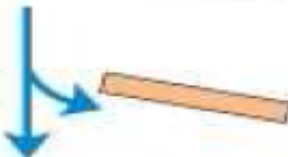
Enzyme complex

5'

AAAAAAAA

3'

(b) endonuclease



5'

AAAAAAAA

-OH(3')

(c) polyadenylate polymerase
PAP

ATP

PP_i



5'

AAAAAAAA

-AAA(A)_n-OH(3')

Fin de transcription

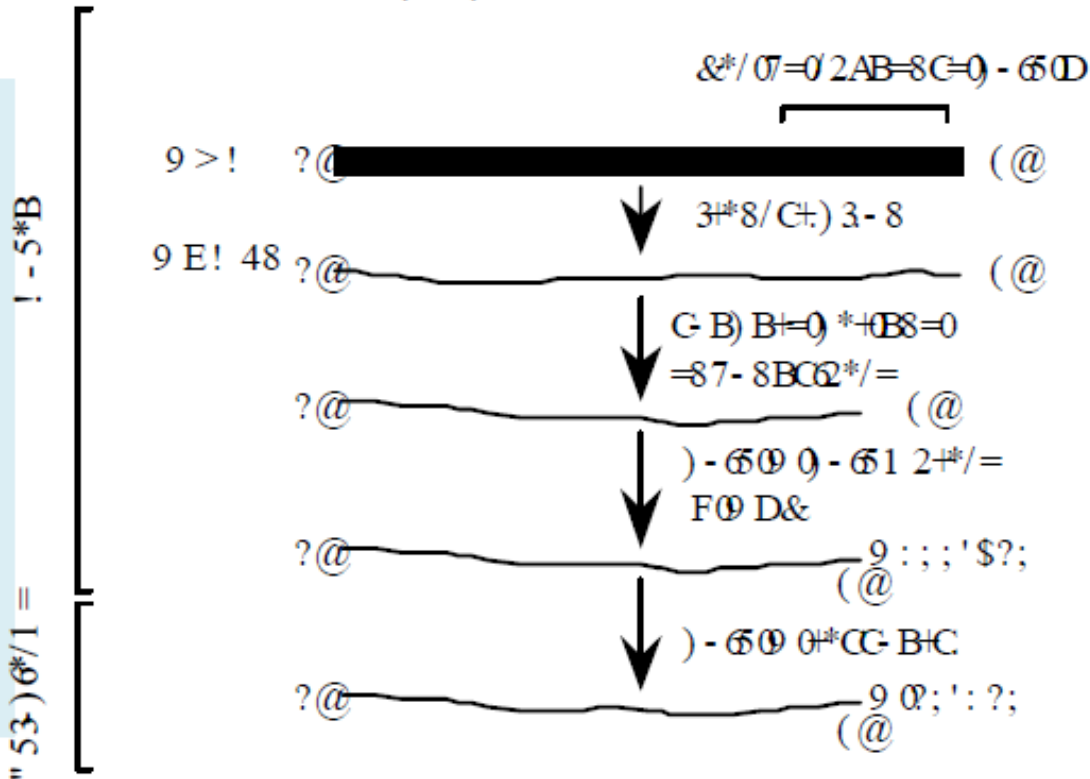
l'ARNm est clivée au niveau d'une séquence conservée hexamérique (AUAUAAA) à l'extrémité 3'

Une extrémité poly A est rajoutée par PAP

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

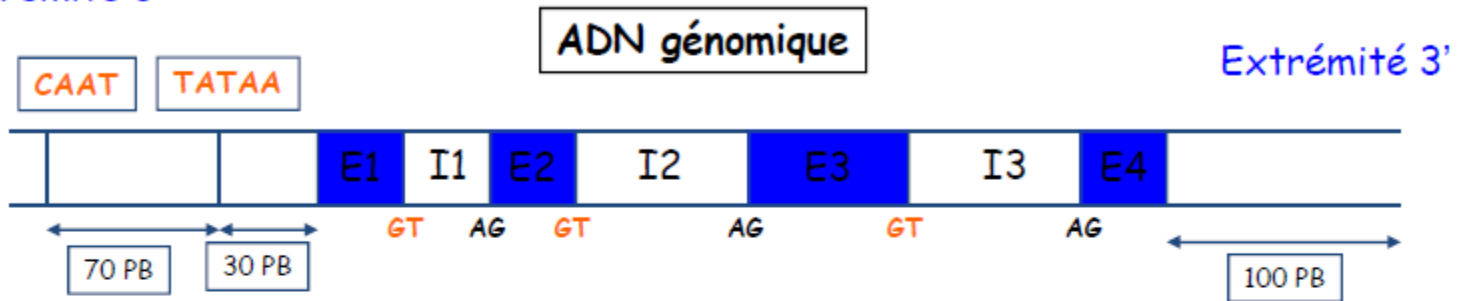
Rôles du polyA

- ❖ Attachement du messenger à la membrane de RE
- ❖ Transfert du messenger au cytoplasme
- ❖ Stabilisation du messenger (demi vie ARN diminue en son absence)



Récapitulatif

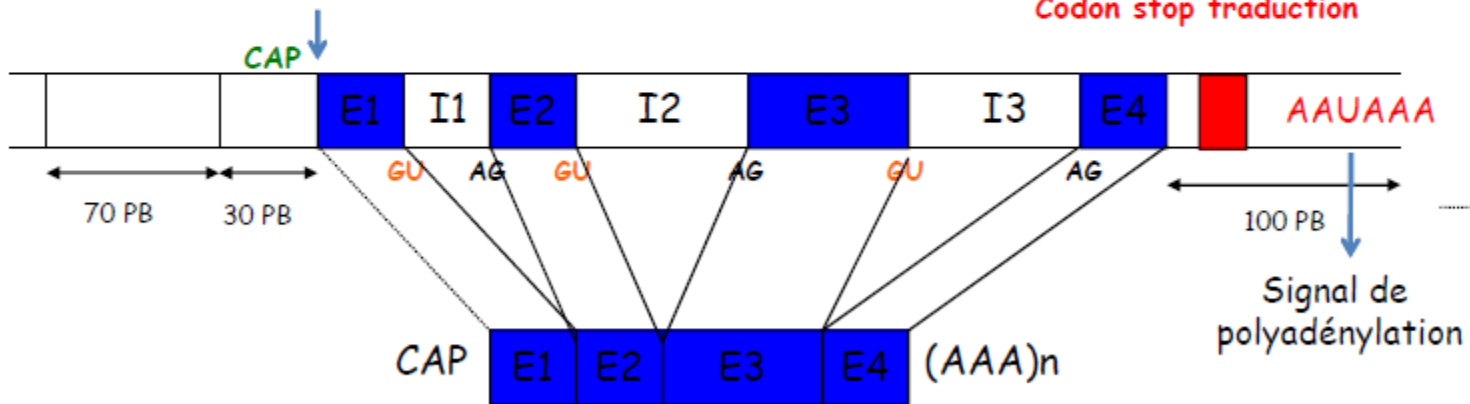
Extrémité 5'



Codon initiateur traduction
AUG

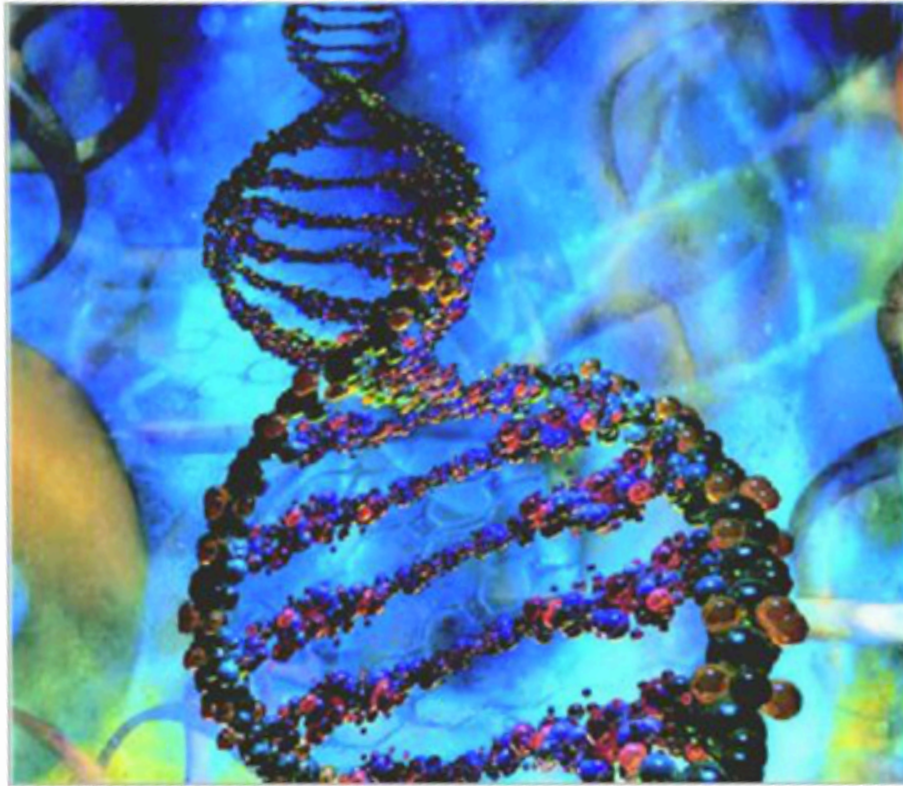
ARN transcrit primaire

(UGA, UAA ou UAG)
Codon stop traduction



GU: site 5' d'épissage
AG: site 3' d'épissage

Références:



<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm>