



Université Paris-VI

Biologie Moléculaire

Objectifs au cours de

Biochimie PCEM1

2006 - 2007

Pr. C. Housset (Chantal.Housset@st-antoine.inserm.fr)

Pr. A. Raisonier (raisonni@ccr.jussieu.fr)

Mise à jour : 16 juin 2006
Relecture : Pr. A. Raisonier

Plan du cours

3	Plan du cours
9	Objectifs PCEM1 commun DHU Paris-Est
15	Partie I : La structure des acides nucléiques
17	Chapitre 1 : Molécules simples
18	1.1 Phosphates
19	1.2 Ribose, désoxyribose
20	1.3 Purine, Pyrimidine
21	1.4 Bases puriques
22	1.5 Bases pyrimidiques
23	1.6 Nucléosides et nucléotides
24	1.7 Nomenclature des unités nucléotidiques
25	1.8 Adénosine
26	1.9 Désoxyguanosine
27	1.10 Uridine MonoPhosphate
28	1.11 Désoxythymidine MonoPhosphate
29	1.12 Adénosine Tri Phosphate
30	1.13 Désoxycytidine Tri Phosphate
31	1.14 Liaisons hydrogène
32	1.15 Hybridation A - T
33	1.16 Hybridation G - C
35	Chapitre 2 : Les acides nucléiques
36	2.1 Acide ribonucléique
37	2.2 Les extrémités 5' et 3' d'un acide nucléique
38	2.3 Structure secondaire du RNA
39	2.4 Acides ribonucléiques
40	2.5 Acide désoxyribonucléique
41	2.6 La double hélice (modèle rubans)
42	2.7 La double hélice (travers)
43	2.8 La double hélice (axe)
44	2.9 Surenroulement
45	2.10 Nucléosome
46	2.11 Fibre de chromatine
47	2.12 Condensation et hydrolyse des nucléotides
48	2.13 Complémentarité des bases

49 Partie II : Biosynthèse des macromolécules**53 Chapitre 3 : DNA Définitions**

- 54 3.1 La double hélice
- 55 3.2 Séquence d'un gène (apoA-II)
- 56 3.3 Gène
- 57 3.4 Expression d'un gène

59 Chapitre 4 : La transcription

- 60 4.1 Transcription
- 61 4.2 Promoteur
- 62 4.3 Brins sens et antisens
- 63 4.4 Régulation de l'expression
- 64 4.5 Cis et trans régulateurs
- 66 4.6 DNA binding proteins
- 67 4.7 Interaction Protéine DNA
- 68 4.8 Récepteurs nucléaires
- 69 4.9 Régulation du jeûne
- 70 4.10 Régulation de l'effort
- 71 4.11 RNA polymérase II
- 72 4.12 Initiation de la transcription
- 73 4.13 Liaison TFIID sur le DNA
- 74 4.14 Régulation de la RNA polymérase
- 75 4.15 Elongation de la transcription
- 76 4.16 Elongation de la transcription
- 77 4.17 Discontinuité des gènes
- 78 4.18 Exon
- 79 4.19 Exon 1
- 80 4.20 Fin de la transcription
- 81 4.21 Modifications du transcrit
- 82 4.22 Enzyme coiffante
- 83 4.23 Coiffe d'un messenger
- 84 4.24 Queue polyA
- 85 4.25 Le transcrit primaire
- 86 4.26 Excision - épissage
- 87 4.27 Formation du lasso
- 88 4.28 Epissages alternatifs
- 89 4.29 Maturation des RNA ribosomiques
- 90 4.30 Stabilité du messenger
- 91 4.31 Messenger

93 **Chapitre 5 : La traduction**

94	5.1	Traduction
95	5.2	Expression d'un gène
96	5.3	Signifiants
97	5.4	Codon
98	5.5	Code génétique
99	5.6	Code génétique
100	5.7	Code dégénéré
101	5.8	Ribosome eucaryote
102	5.9	Polyribosome
103	5.10	RNA de transfert (trèfle)
104	5.11	RNA de transfert (ruban)
105	5.12	Activation d'un acide aminé
106	5.13	Sérine tRNA synthétase
107	5.14	Cystéine tRNA synthétase
108	5.15	Initiation de la traduction
109	5.16	Cadre de lecture
110	5.17	Elongation de la traduction
111	5.18	Incorporation d'un acide aminé
112	5.19	Transfert du peptide
113	5.20	Translocation des codons
114	5.21	Liaisons riches en énergie
115	5.22	Terminaison de la traduction
116	5.23	Signal-peptide
117	5.24	Polyribosomes liés
118	5.25	Carboxylation de l'acide glutamique
119	5.26	Modifications post-traductionnelles

121 **Chapitre 6 : La réplication**

122	6.1	Réplication
123	6.2	Le cycle cellulaire
124	6.3	Chromatine et ADN
125	6.4	Réplication semi-conservative
126	6.5	Synthèse et hydrolyse du DNA
127	6.6	DNA polymérase
128	6.7	DNA polymérase (exonucléase 3'→5')
129	6.8	DNA polymérase : fonction d'édition
130	6.9	Boucle de réplication
131	6.10	Fourche de réplication
132	6.11	Topoisomérase I
133	6.12	Primase
134	6.13	DNA ligase
135	6.14	Téломérase

137	Chapitre 7 : La réparation
138	7.1 Réparation
139	7.2 Bases endommagées
140	7.3 Excision de base
141	7.4 Mésappariements
142	7.5 Transmission du mésappariement
143	7.6 Excision de fragment long
144	7.7 Modèle Holliday
145	7.8 Crossing-over
147	Partie III : Les événements génétiques
149	Chapitre 8 : Substitutions
150	8.1 Substitution
151	8.2 Somatique, germinale
152	8.3 Faux-sens, non-sens
153	8.4 Polymorphisme Xba I de l'apoB
154	8.5 Marqueur génétique
155	Chapitre 9 : Mutations
156	9.1 Mutation
157	9.2 Mutation Arg3500→Gln de l'apoB-100
159	Chapitre 10 : Insertions - délétions
160	10.1 Délétion
161	10.2 Décalage du cadre de lecture
162	10.3 Délétion Phe 508 de CFTR
163	10.4 Délétion de l'exon 9 de la lipoprotéine-lipase
164	10.5 Mutation d'un site d'épissage
165	10.6 Insertion
167	Chapitre 11 : Transpositions
168	11.1 Transposition
169	11.2 Séquence Alu
170	11.3 Virus
171	11.4 Cycle d'un rétrovirus
172	11.5 Duplication de gène
173	11.6 Pseudogène

174	11.7	Conversion de gène
175	Partie IV : L'évolution	
177	Chapitre 12 : Divergence	
178	12.1	Divergence
179	Chapitre 13 : Familles de gènes	
180	13.1	Famille de gènes
181	13.2	Gènes des β -globines
182	13.3	Famille des β -globines
183	Partie V : Le DNA au laboratoire	
185	Chapitre 14 : Méthodes d'étude	
186	14.1	Extraction et purification du DNA
187	14.2	Synthèse d'un cDNA
188	14.3	Electrophorèse de DNA
189	14.4	Hae III (enzyme de restriction)
190	14.5	EcoR I
191	14.6	Polymorphisme de restriction
192	14.7	Polymorphisme Msp I de l'apoA-II
193	14.8	Cartes de restriction
194	14.9	Hybridation d'une sonde
195	14.10	Calcul de la Tm
196	14.11	Sonde hybridée
197	14.12	Sonde spécifique d'allèle (ASO)
198	14.13	Southern blot
200	14.14	PCR
201	14.15	Didésoxyadénosine triphosphate
202	14.16	Réaction de séquence
203	14.17	Séquençage d'ADN
204	14.18	Gel de séquence

Objectifs PCEM1 commun DHU Paris-Est

Biologie moléculaire : étude des acides nucléiques

Objectifs Généraux

1. Sur la base d'une bonne connaissance de la structure et des propriétés des acides nucléiques, l'étudiant doit avoir assimilé les grands principes de base impliqués dans la transmission et la réparation du matériel génétique, ainsi que l'expression des gènes et sa régulation.
2. L'étudiant doit être capable d'interpréter des résultats expérimentaux obtenus par les techniques les plus courantes de biologie moléculaire appliquées à la recherche biomédicale ou à l'exploration de matériel génétique par les laboratoires de biologie médicale.
L'étudiant doit ainsi avoir acquis les bases nécessaires à la compréhension ultérieure des mécanismes moléculaires de la physiopathologie ou de l'action des médicaments.

Structure et fonction des acides nucléiques

- *Connaître la structure des acides nucléiques, savoir reconnaître¹ les molécules simples dont ils sont constitués, les classer d'après leurs propriétés ou leurs fonctions.*

Cette partie nécessite la reconnaissance des structures de l'acide phosphorique, du ribose et du désoxy-ribose, des bases puriques et pyrimidiques.

L'étudiant doit savoir reconnaître n'importe quelle base, nucléoside, nucléotide ou nucléoside polyphosphate. Il doit savoir identifier les liaisons riches en énergie des nucléosides polyphosphates et distinguer les groupements phosphates (α , β , γ) présents dans ces molécules.

Il doit savoir interpréter et manipuler les différentes représentations de la structure primaire du DNA et du RNA, préciser la nature des liaisons impliquées dans l'enchaînement des nucléotides, distinguer une extrémité 5' d'une extrémité 3' et manipuler les unités de taille (kb, kpb, Mpb...).

Sur des schémas qui lui seront présentés, il doit savoir reconnaître les liaisons impliquées dans la complémentarité des bases ainsi que les éléments structuraux essentiels d'une double hélice de DNA, de la chromatine ou des différentes espèces de RNA.

Connaissant la composition en bases de deux DNA de même taille, il doit savoir prédire les différences de température de fusion et expliciter les raisons de leur choix.

1. Savoir reconnaître

corps chimique : nommer un corps dont on voit la formule développée ;

réaction : désigner l'enzyme au vu de l'équation chimique ;

voie métabolique : désigner la voie métabolique au vu de son bilan chimique.

Méthode d'étude des acides nucléiques

- *Connaître les méthodes permettant d'étudier le DNA des malades (obtention, purification, conservation) y compris dans leur aspect éthique.*
- *Décrire l'activité de quelques enzymes qui permettent l'étude des acides nucléiques et être capable de montrer l'effet de ces enzymes sur un exemple détaillé (séquence d'acide nucléique). Cet objectif comprend au moins les activités des endonucléases de restriction, les polymérases, les ligases et les topoisomérases.*
- *Expliquer le mécanisme de l'amplification du DNA par PCR (il ne s'agit pas des méthodes ou des techniques, seulement du principe qui est utilisé).*
 - *Expliquer le principe de la PCR et de la RT-PCR*
 - *Enumérer les principaux constituants du milieu de réaction d'une PCR*
 - *Citer un exemple d'application de la PCR en diagnostic médical*
- *Donner un exemple¹ de diagnostic fondé sur une variation de longueur de fragments d'acides nucléiques (RFLP).*
- *Enumérer les facteurs qui permettent l'hybridation de deux brins d'acides nucléiques.*
- *Savoir interpréter² les résultats d'une technique d'hybridation avec une sonde (Southern ou Northern blots, puces à DNA) et son application à un diagnostic.*
- *Expliquer le mécanisme d'un séquençage d'acide nucléique.*
- *Donner un exemple de préparation et d'utilisation d'un DNA complémentaire.*

Sans avoir à mémoriser les détails des modes opératoires, l'étudiant doit avoir acquis la notion que des méthodes simples permettent d'extraire et de purifier, à partir de cellules eucaryotes, les différentes formes de DNA et de RNA qu'elles renferment. Il doit avoir acquis la notion des problèmes éthiques soulevés par la constitution d'une banque de DNA génomique humain.

Il doit savoir reconnaître/représenter le mode d'action des principales enzymes impliquées dans la manipulation du DNA : endonucléases, incluant les endonucléases de restriction, ligases, DNA polymérases.

Il doit être capable d'interpréter des données expérimentales obtenues par les méthodes couplant électrophorèse et hybridation sur filtre (Southern blots).

Ayant acquis la notion d'oligonucléotides de synthèse (sans aucun détail sur les méthodes mises en œuvre), de cDNA, de vecteurs plasmidiques ou phagiques, il doit savoir expliquer les grands principes de l'étude du DNA génomique, en maîtrisant la notion de clonage.

Il doit savoir lire un gel de séquence et, à l'aide de la table de code génétique, convertir une séquence nucléique en séquence peptidique, manipulant ainsi les notions de brin sens et non-sens et de cadre de lecture. Sur des séquences comparées, il doit savoir identifier des mutations, ponctuelles ou étendues, et leurs conséquences fonctionnelles (arrêt prématuré de la traduction, décalage du cadre de lecture...). La connaissance ainsi acquise du séquençage doit lui permettre de maîtriser les notions de discontinuité des gènes, en distinguant

1. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation dans laquelle un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.
2. **Savoir interpréter un examen** : savoir les valeurs usuelles (95 % de la population adulte saine), savoir les circonstances physiopathologiques des variations du paramètre, savoir faire la critique de la valeur d'un résultat en fonction des conditions de son prélèvement ou de sa mesure.

les exons et les introns, et de modifications post-transcriptionnelles, incluant pose de la coiffe, épissage et polyadénylation.

L'étudiant doit savoir interpréter des résultats expérimentaux obtenus par une technique d'amplification génique (PCR), qu'il s'agisse d'analyse du génome, d'étude d'expression de gène ou de préparation de matériel pour un clonage ultérieur.

Transcription et régulation de l'expression des gènes

- Définir¹ les termes : gène, transcription, brin sens, promoteur, exon, intron, coiffe, queue poly-A, excision-épissage.
- Montrer le mécanisme² de la transcription d'un gène, en distinguant les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.
- Montrer les mécanismes de la régulation de la transcription. Donner un exemple de régulation d'un gène eucaryote sous le contrôle d'une grande voie endocrinienne (exemples : CREB, GlucocorticoidRE).
- Enumérer et décrire les principales modifications post-transcriptionnelles : enzyme coiffante, polyadénylation, édition, excision-épissage. Donner un exemple d'expression alternative d'un gène eucaryote.

L'étudiant doit être capable de définir un certain nombre de termes indispensables à la compréhension de la transcription : brin sens et brin antisens, RNA polymérase, promoteur, initiation de la transcription, élongation, terminaison. Il doit savoir décrire le mécanisme biochimique de la RNA polymérase et mentionner les rôles spécifiques des trois types de polymérases impliquées dans la transcription chez les eucaryotes.

Il doit savoir commenter un schéma résumant de façon intégrée la régulation d'un gène dont la transcription est sous le contrôle d'un messenger agissant sur un récepteur membranaire (exemple de CREB) ou d'un messenger interagissant avec un récepteur nucléaire (hormones stéroïdiennes).

En ce qui concerne les modifications post-transcriptionnelles, il doit simplement pouvoir définir ce qu'est une coiffe, une polyadénylation ou l'épissage (éventuellement alternatif) en identifiant et en explicitant les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Traduction

- Définir les termes : traduction, codon et anticodon, polyribosome, signal-peptide.
- Montrer le mécanisme de la traduction d'un messenger, en distinguant les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.
- Montrer les mécanismes de la régulation de la traduction. Donner un exemple d'antibiotique intervenant sur la régulation de la traduction des procaryotes.
- Enumérer et décrire les principales modifications post-traductionnelles (en complément de ce qui aura été traité dans le thème 2)

L'étudiant doit être capable de définir un certain nombre de caractéristiques ou de termes indispensables à la compréhension de la traduction : aminoacyl-tRNA synthétase, sens de

1. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.
2. **Montrer le mécanisme** (d'une réaction) ou **Décrire les étapes** (d'une voie métabolique) : définir les corps chimiques en présence, écrire et équilibrer la (les) réaction(s) ; faire le bilan chimique et énergétique.

la traduction, codon, anticodon, codon d'initiation, code génétique, ribosomes, polyribosomes.

Sur un schéma synthétique décrivant le mécanisme de la traduction, il doit être capable d'identifier et d'expliquer les grandes étapes mises en jeu.

Il doit avoir la notion que chacune des étapes de la traduction chez les procaryotes peut être la cible d'antibiotiques, mais aucune connaissance spécifique ne peut lui être demandée, sauf des exercices de réflexion où ces données lui seraient rappelées.

Il doit pouvoir expliquer en termes simples la différence entre les protéines à localisation cytoplasmique et celles qui empruntent la voie de sécrétion, en précisant les notions de peptide-signal et de modifications post-traductionnelles.

Réplication et réparation du DNA

- Définir les termes : *réplication, réparation.*
- Montrer le mécanisme enzymatique d'une fourche de réplication.
- Décrire les différentes réactions catalysées par les DNA polymérases.
- Décrire un exemple de mécanisme de réparation des mésappariements.
- Décrire la réplication du DNA linéaire et le rôle d'une télomérase.
- Décrire l'activité de la transcriptase inverse et donner un exemple de ses conséquences physiopathologiques.

L'étudiant doit pouvoir citer et expliciter les grandes caractéristiques de la réplication : semi-conservative, continue/discontinue selon le brin, débutant à une même origine. Il doit pouvoir citer les principales protéines impliquées successivement dans la réplication chez les eucaryotes et préciser leur rôle : hélicases, protéines de liaison au DNA simple brin, topoisomérases, primase, DNA polymérases, ligase.

L'étudiant doit savoir illustrer la notion de fidélité de la réplication en explicitant les principaux mécanismes mis en jeu (activité 3'-exonucléasique des DNA polymérases, réparation des mésappariements).

Il doit être capable de résoudre le problème posé par la réplication des DNA linéaires en expliquant le rôle des télomérases.

Il doit savoir décrire les propriétés de la transcriptase inverse sans entrer dans les détails de la réplication des rétrovirus.

- Donner un exemple de réparation du DNA lésé.

En appliquant ses connaissances acquises des principales enzymes agissant sur le DNA, auxquelles seront ajoutées à l'occasion les glycosylases, l'étudiant doit savoir reconnaître sur un schéma les interventions successives des enzymes impliquées dans la réparation par excision de nucléotides.

Recombinaison

Sans avoir à reproduire le modèle de Holliday qui lui aura été présenté, l'étudiant doit être capable de définir le processus d'échange de segments de DNA homologues sur des schémas simples et de mentionner l'implication de la recombinaison dans des phénomènes fondamentaux tels que le « *crossing-over* ».

Les événements génétiques

- Définir les termes : *variation (= substitution ou mutation silencieuse), mutation (= exprimée), délétion/insertion, répétition.*

- *Donner des exemples parmi les événements génétiques suivants qui aboutissent à une pathologie : mutation ponctuelle, délétion (avec ou sans décalage du cadre de lecture), épissage défectueux, répétitions de triplet.*
- *Définir les termes : transposition, pseudogène, conversion de gène, famille ou superfamille de gènes.*
- *Donner un exemple de l'évolution d'une famille de gènes.*

Grâce à des exemples de famille de gènes et de leur évolution ; l'étudiant devra expliciter le rôle des événements génétiques (duplications, conversions de gènes, inactivations de gènes) dans la diversification du patrimoine génétique des espèces, et montrer quels avantages sélectifs les espèces acquièrent avec ces changements pour l'adaptation à leur environnement.

Partie I

La structure des acides nucléiques

Rappel des objectifs

Structure et fonction des acides nucléiques

- *Connaître la structure des acides nucléiques, savoir reconnaître¹ les molécules simples dont ils sont constitués, les classer d'après leurs propriétés ou leurs fonctions.*

Cette partie nécessite la reconnaissance des structures de l'acide phosphorique, du ribose et du désoxy-ribose, des bases puriques et pyrimidiques.

L'étudiant doit savoir reconnaître n'importe quelle base, nucléoside, nucléotide ou nucléoside polyphosphate. Il doit savoir identifier les liaisons riches en énergie des nucléosides polyphosphates et distinguer les groupements phosphates (α , β , γ) présents dans ces molécules.

Il doit savoir interpréter et manipuler les différentes représentations de la structure primaire du DNA et du RNA, préciser la nature des liaisons impliquées dans l'enchaînement des nucléotides, distinguer une extrémité 5' d'une extrémité 3' et manipuler les unités de taille (kb, kpb, Mpb...).

Sur des schémas qui lui seront présentés, il doit savoir reconnaître les liaisons impliquées dans la complémentarité des bases ainsi que les éléments structuraux essentiels d'une double hélice de DNA, de la chromatine ou des différentes espèces de RNA.

Connaissant la composition en bases de deux DNA de même taille, il doit savoir prédire les différences de température de fusion et expliciter les raisons de leur choix.

Méthode d'étude des acides nucléiques

- *Connaître les méthodes permettant d'étudier le DNA des malades (obtention, purification, conservation) y compris dans leur aspect éthique.*
- *Décrire l'activité de quelques enzymes qui permettent l'étude des acides nucléiques et être capable de montrer l'effet de ces enzymes sur un exemple détaillé (séquence d'acide nucléique). Cet objectif comprend au moins les activités des endonucléases de restriction, les polymérases, les ligases et les topoisomérases.*
- *Expliquer le mécanisme de l'amplification du DNA par PCR (il ne s'agit pas des mé-*

1. Savoir reconnaître

corps chimique : nommer un corps dont on voit la formule développée ;

réaction : désigner l'enzyme au vu de l'équation chimique ;

voie métabolique : désigner la voie métabolique au vu de son bilan chimique.

thodes ou des techniques, seulement du principe qui est utilisé).

- *Expliquer le principe de la PCR et de la RT-PCR*
- *Enumérer les principaux constituants du milieu de réaction d'une PCR*
- *Citer un exemple d'application de la PCR en diagnostic médical*
- *Donner un exemple¹ de diagnostic fondé sur une variation de longueur de fragments d'acides nucléiques (RFLP).*
- *Enumérer les facteurs qui permettent l'hybridation de deux brins d'acides nucléiques.*
- *Savoir interpréter² les résultats d'une technique d'hybridation avec une sonde (Southern ou Northern blots, puces à DNA) et son application à un diagnostic.*
- *Expliquer le mécanisme d'un séquençage d'acide nucléique.*
- *Donner un exemple de préparation et d'utilisation d'un DNA complémentaire.*

Sans avoir à mémoriser les détails des modes opératoires, l'étudiant doit avoir acquis la notion que des méthodes simples permettent d'extraire et de purifier, à partir de cellules eucaryotes, les différentes formes de DNA et de RNA qu'elles renferment. Il doit avoir acquis la notion des problèmes éthiques soulevés par la constitution d'une banque de DNA génomique humain.

Il doit savoir reconnaître/représenter le mode d'action des principales enzymes impliquées dans la manipulation du DNA : endonucléases, incluant les endonucléases de restriction, ligases, DNA polymérases.

Il doit être capable d'interpréter des données expérimentales obtenues par les méthodes couplant électrophorèse et hybridation sur filtre (Southern blots).

Ayant acquis la notion d'oligonucléotides de synthèse (sans aucun détail sur les méthodes mises en œuvre), de cDNA, de vecteurs plasmidiques ou phagiques, il doit savoir expliquer les grands principes de l'étude du DNA génomique, en maîtrisant la notion de clonage.

Il doit savoir lire un gel de séquence et, à l'aide de la table de code génétique, convertir une séquence nucléique en séquence peptidique, manipulant ainsi les notions de brin sens et non-sens et de cadre de lecture. Sur des séquences comparées, il doit savoir identifier des mutations, ponctuelles ou étendues, et leurs conséquences fonctionnelles (arrêt prématuré de la traduction, décalage du cadre de lecture...). La connaissance ainsi acquise du séquençage doit lui permettre de maîtriser les notions de discontinuité des gènes, en distinguant les exons et les introns, et de modifications post-transcriptionnelles, incluant pose de la coiffe, épissage et polyadénylation.

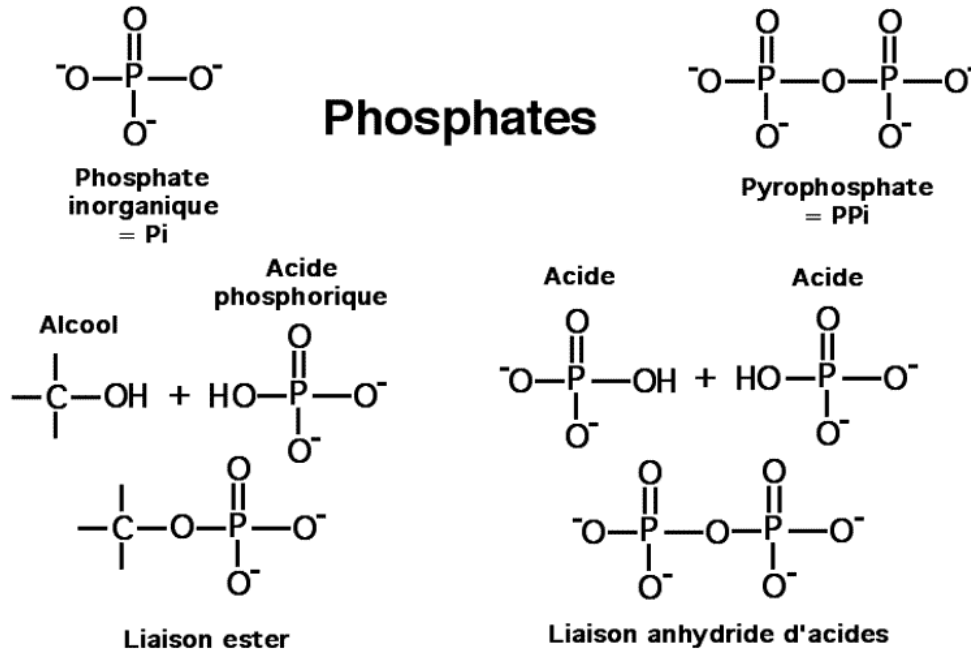
L'étudiant doit savoir interpréter des résultats expérimentaux obtenus par une technique d'amplification génique (PCR), qu'il s'agisse d'analyse du génome, d'étude d'expression de gène ou de préparation de matériel pour un clonage ultérieur.

-
1. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation dans laquelle un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.
 2. **Savoir interpréter un examen** : savoir les valeurs usuelles (95 % de la population adulte saine), savoir les circonstances physiopathologiques des variations du paramètre, savoir faire la critique de la valeur d'un résultat en fonction des conditions de son prélèvement ou de sa mesure.

Chapitre 1

Molécules simples

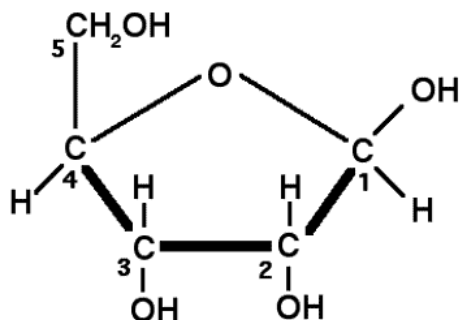
1.1 Phosphates



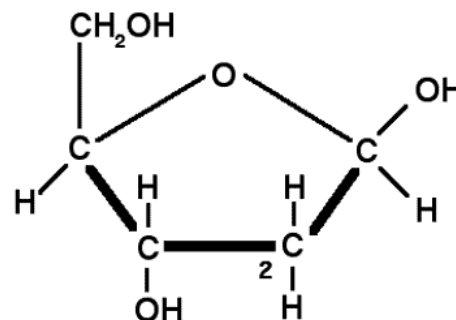
BM 01

- Les molécules biologiques qui contiennent l'information génétique sont les acides nucléiques.
- Les acides nucléiques sont composés de molécules simples comme l'acide phosphorique (PO₄H₃), des oses à 5 carbones (pentoses) et des bases azotées (purines ou pyrimidines).
- Le phosphate inorganique est un ion stable formé à partir de l'acide phosphorique PO₄H₃. On l'écrit souvent Pi.
- Des esters de phosphate peuvent se former entre un phosphate et un groupement hydroxyle libre (alcool, énol, phénol...).
- La condensation d'un phosphate et d'un autre acide, par exemple un autre phosphate, donne un anhydride. Il y a aussi des anhydrides mixtes avec les acides carboxyliques par exemple.
- Le pyrophosphate est un ion dérivé de l'acide pyrophosphorique (P₂O₇H₄), qui est lui même un anhydride d'acide phosphorique.

1.2 Ribose, désoxyribose



β -D-Ribose

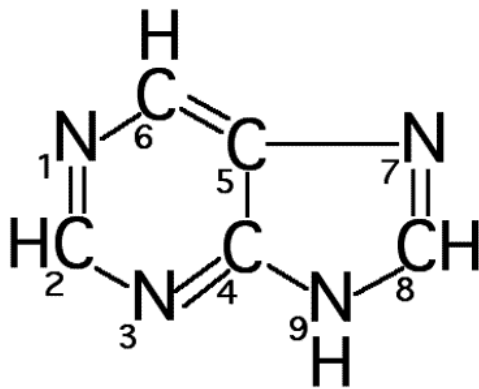


2-désoxy- β -D-Ribose

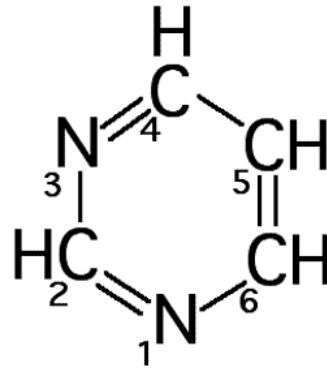
BM 01/1

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

1.3 Purine, Pyrimidine



Purine

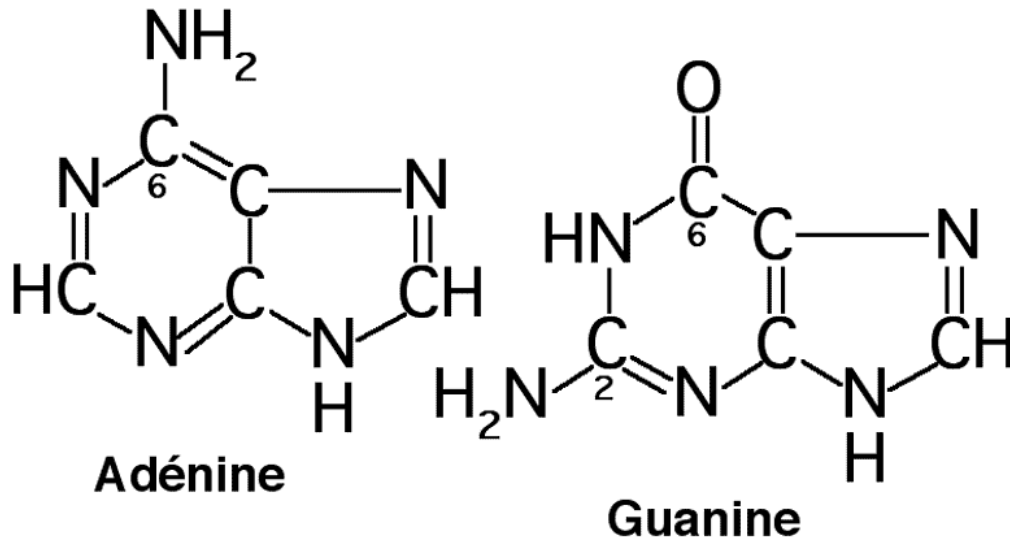


Pyrimidine

BM 02

- Les bases azotées des acides nucléiques appartiennent à deux classes de molécules selon le noyau aromatique qui en constitue le squelette.
- 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).
- 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).
- Les différentes bases rencontrées dans les acides nucléiques en dérivent selon les substituants que portent les atomes de ces noyaux. De nombreux médicaments appartiennent aussi à ces deux classes de bases azotées.

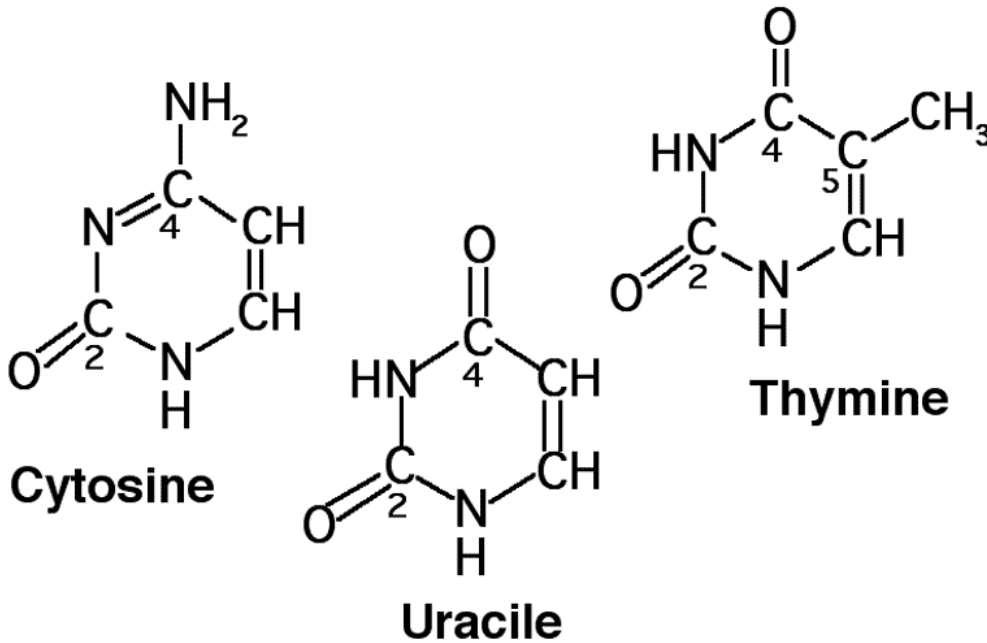
1.4 Bases puriques



BM 02/1

- Les bases azotées sont des molécules aromatiques dont le noyau est soit une purine (bases puriques), soit une pyrimidine (bases pyrimidiques).
- Les bases puriques sont au nombre de 2 : l'adénine et la guanine.
- Les purines ont un double noyau aromatique comportant à gauche un cycle hexagonal de 4 carbones et 2 azotes et à droite un cycle pentagonal de 3 carbones (dont 2 communs avec le précédent) et 2 azotes.
- L'adénine est constituée d'un noyau purine dont le carbone 6 est substitué par une fonction amine. Elle est la seule des bases nucléiques dont la formule ne contient pas d'atome d'oxygène.
- La guanine est constituée d'un noyau purine dont le carbone 2 est substitué par une fonction amine et le carbone 6 par une fonction cétone.

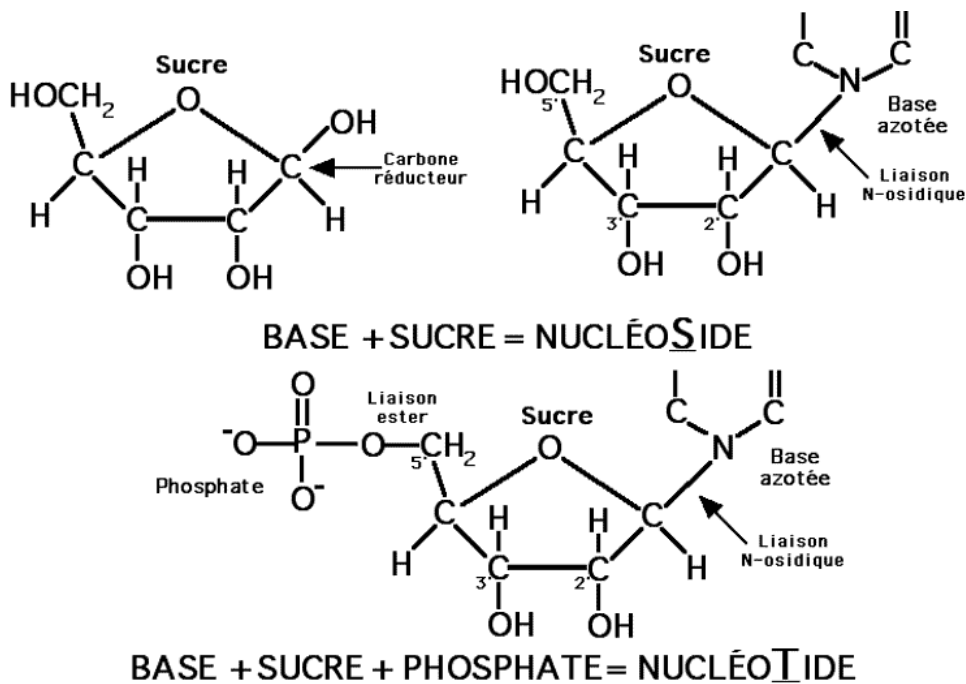
1.5 Bases pyrimidiques



BM 02/2

- Les bases pyrimidiques sont au nombre de 3 : la cytosine, l'uracile et la thymine.
- Les pyrimidines ont un noyau aromatique hexagonal de 4 carbones et 2 azotes.
- La cytosine est constituée d'un noyau pyrimidine dont le carbone 4 est substitué par une fonction amine et le carbone 2 par une fonction cétone.
- L'uracile est constituée d'un noyau pyrimidine dont les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone.
- La thymine est aussi constituée d'un noyau pyrimidine dont les carbones 2 et 4 portent des fonctions cétone, mais dont le carbone 5 est substitué par un méthyle.

1.6 Nucléosides et nucléotides



BM 03

- Les sucres (ribose ou désoxyribose) se lient aux bases azotées par des liaisons impliquant un des azotes de la base (azote n°1 des pyrimidines ou azote n°9 des purines) et le carbone n°1 de l'ose (carbone réducteur ou fonction semi-acétalique). Ce sont des liaisons N-osidiques.
- La liaison d'une base azotée avec un des sucres donne un nucléoside. Un nucléoside est donc formé d'une base et d'un sucre liés par une liaison N-osidique. Dans un nucléoside, on numérote les atomes de la base par des chiffres : 1, 2, 3, etc... et pour les distinguer, les carbones du sucre sont numérotés 1', 2', 3', etc...
- 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.
- L'ester obtenu est un nucléotide. Un nucléotide est donc formé d'une base azotée, liée par une liaison osidique avec un sucre, lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate.
- Dans le métabolisme des acides nucléiques interviennent des substrats riches en énergie, les nucléosides triphosphates. Un nucléoside triphosphate est un nucléotide dont le phosphate est lui-même lié à un ou deux autres phosphates par des liaisons anhydride d'acides.

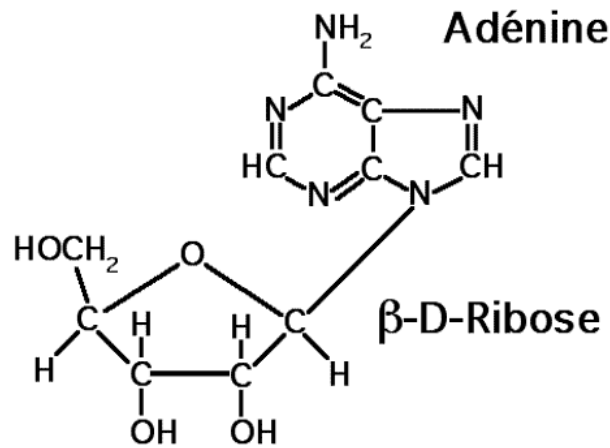
1.7 Nomenclature des unités nucléotidiques

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

BM 03/1

- Les bases azotées sont conventionnellement désignées par une initiale et par une couleur : l'adénine par A et la couleur verte, la guanine par G et la couleur jaune, etc...
- Chaque base peut entrer dans la structure de deux nucléosides, selon que le sucre est un ribose ou un désoxyribose.
- Chaque nucléoside peut être lié à un, deux ou trois phosphates. On les désigne par des sigles conventionnels : GMP pour guanosine monophosphate, CDP pour cytidine diphosphate, ATP pour adénosine triphosphate, etc...
- On désigne par nucléotides les nucléosides monophosphates : AMP ou acide adénylique, dTMP ou acide désoxythymidylique, etc...
- Les nucléosides polyphosphates sont des diphosphates : ADP ou GDP... ou encore des triphosphates, les plus riches en énergie : ATP ou GTP ; etc...
- 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.

1.8 Adénosine

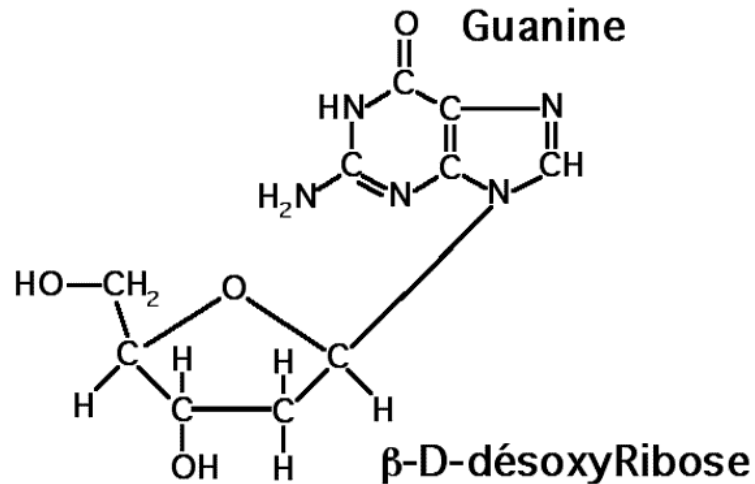


Adénosine

BM 04

- 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 nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides.
- Les autres ribonucléosides sont : la guanosine, la cytidine et l'uridine.

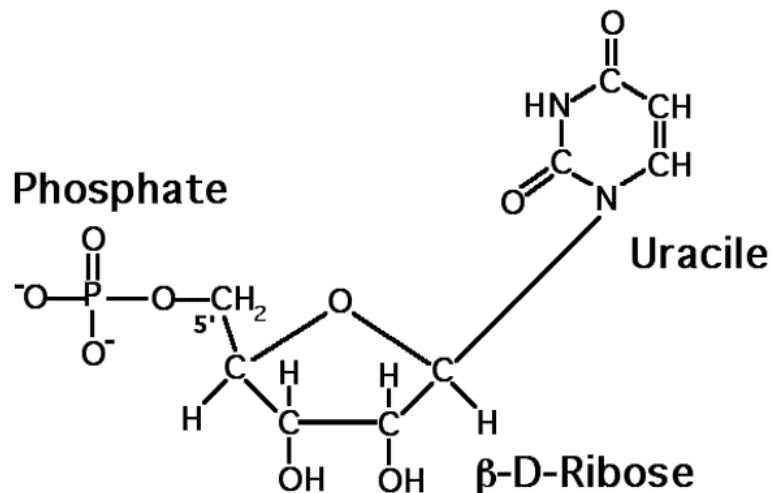
1.9 Désoxyguanosine



BM 04/5

- 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 nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides.
- Les autres désoxyribonucléosides sont : la désoxyadénosine, la désoxycytidine et la désoxythymidine, souvent appelée thymidine tout court.

1.10 Uridine MonoPhosphate

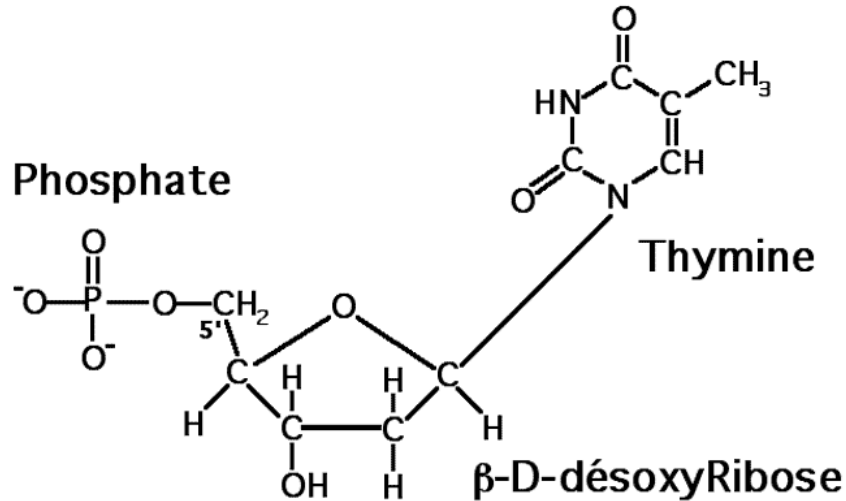


Uridine Mono Phosphate = Uridylate

BM 05/3

- Un nucléotide est une molécule composée d'un nucléoside lié par une liaison ester à un acide phosphorique.
- Les acides nucléiques sont des macromolécules résultant de la condensation de très nombreux nucléotides, liés par des liaisons phosphodiester.
- L'uridine mono phosphate (UMP) ou acide uridylique est un exemple de nucléotide.
- Les autres ribonucléotides sont : l'AMP, le GMP et le CMP.

1.11 Désoxythymidine MonoPhosphate

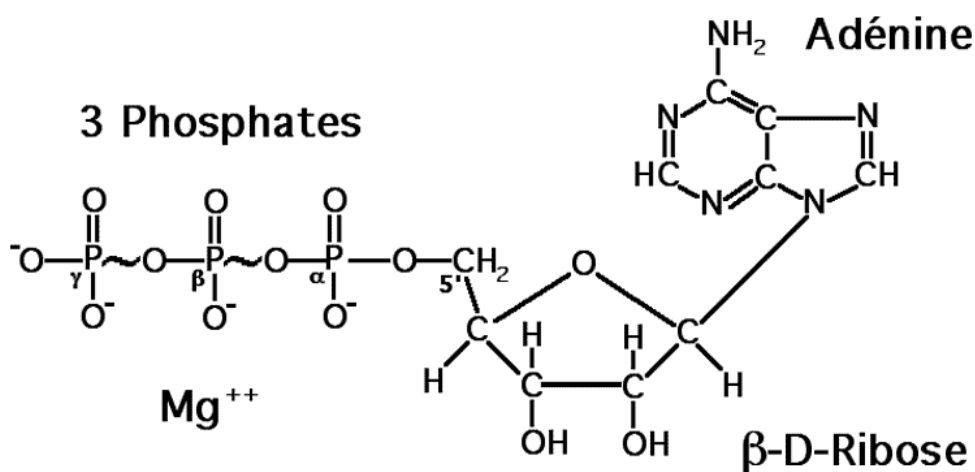


Désoxythymidine Mono Phosphate

BM 05/7

- Un nucléotide est une molécule composée d'un nucléoside lié par une liaison ester à un acide phosphorique.
- Les acides nucléiques sont des macromolécules résultant de la condensation de très nombreux nucléotides, liés par des liaisons phosphodiester.
- Le thymidine monophosphate (dTMP ou TMP) ou acide thymidylique est un exemple de nucléotide. La thymine étant toujours liée à un désoxyribose on néglige souvent de préciser désoxythymidine monophosphate ou dTMP.
- Les autres désoxyribonucléotides sont : le dAMP, le dGMP et le dCMP.

1.12 Adénosine Tri Phosphate

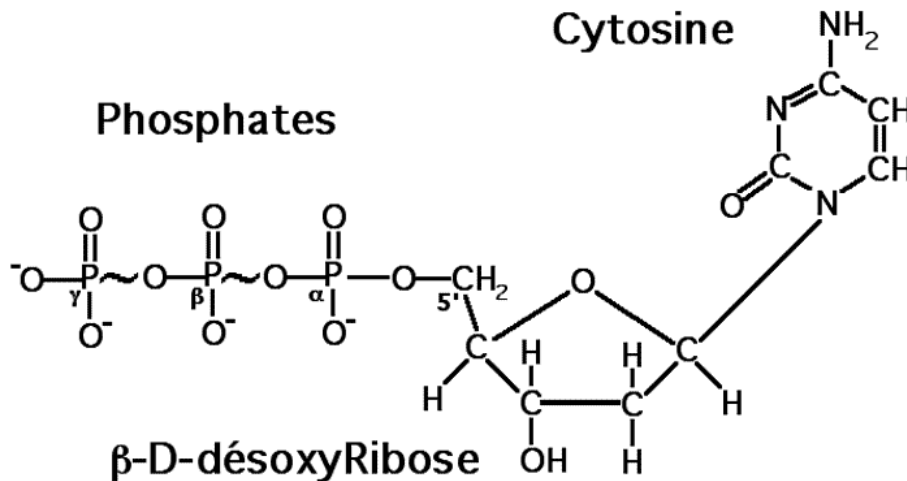


Adénosine Tri Phosphate

BM 06

- L'adénosine triphosphate est un nucléotide composé. Sa structure comporte une base azotée, l'adénine, liée par une liaison N-osidique au β -D-ribose et trois phosphates.
- Les fonctions acides des acides phosphoriques distaux sont fortement ionisées au pH physiologique. Les liaisons anhydrides unissant les acides phosphoriques sont des liaisons riches en énergie ($\Delta G \geq 31$ kJ/mol).
- L'ATP est un des substrats des RNA-polymérase.
- Le coenzyme ATP/ADP est un coenzyme transporteur d'énergie universel.
- Les enzymes utilisant un nucléoside triphosphate comme substrat ou comme coenzyme, nécessitent en même temps la présence du cation Magnésium comme cofacteur.
- Les autres nucléosides triphosphates sont en fonction du sucre ou de la base qu'ils contiennent : le GTP, le CTP, l'UTP, le dATP, le dGTP, le dCTP (voir BM 06/6) et le dTTP.

1.13 Désoxycytidine Tri Phosphate

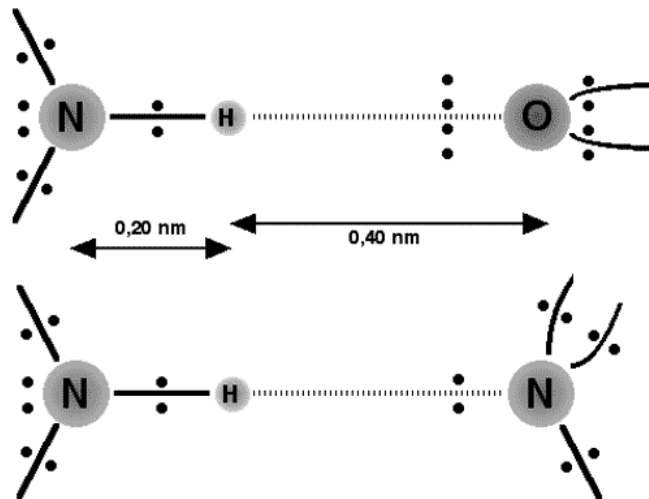


Désoxycytidine Tri Phosphate

BM 06/6

- Le désoxycytidine-triphosphate est un nucléotide composé. Sa structure comporte une base azotée, la cytosine, liée par une liaison N-osidique au β-D-ribose et trois phosphates.
- Les fonctions acides des acides phosphoriques distaux sont fortement ionisées au pH physiologique. Les liaisons anhydrides unissant les acides phosphoriques sont des liaisons riches en énergie ($\Delta G \geq 31$ kJ/mol).
- Le dCTP est un des substrats des DNA-polymérase.
- Les enzymes utilisant un nucléoside triphosphate comme substrat ou comme coenzyme, nécessitent en même temps la présence du cation Magnésium comme cofacteur.
- Les autres nucléosides triphosphates sont en fonction du sucre ou de la base qu'ils contiennent : l'ATP (voir BM 06), le GTP, le CTP, l'UTP, le dATP, le dGTP et le dTTP.

1.14 Liaisons hydrogène

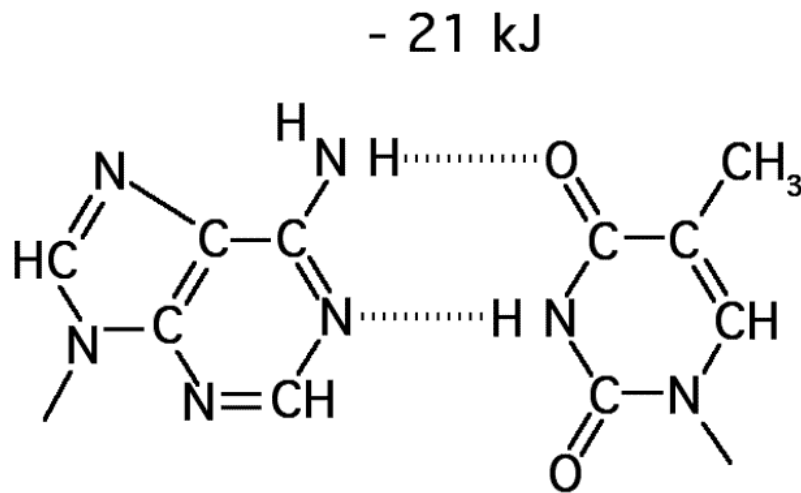


Liaisons hydrogène

BM 07

- Une liaison hydrogène est une liaison de faible énergie entre deux atomes attirés l'un vers l'autre pour des raisons électrostatiques l'un étant riche en électrons donc nucléophile et l'autre n'ayant que les protons de son noyau donc électrophile.
- Ainsi l'atome d'hydrogène, dont l'unique électron est par nécessité dans l'orbitale qui unit cet atome au reste de la molécule, ne peut qu'être électrophile et comme tel attiré par les atomes ayant des doublets électroniques libres.
- Les atomes d'azote et surtout d'oxygène possèdent respectivement deux et quatre électrons de leur couche périphérique qui ne participent pas aux orbitales des liaisons covalentes de la molécule. Ceci leur confère un caractère nucléophile qui leur permet d'exercer une attraction sur les atomes électrophiles voisins, en particulier les atomes d'hydrogène : cette attraction constitue une liaison hydrogène.
- Lorsque les orbitales qui unissent d'un côté l'atome d'hydrogène à la molécule de gauche et de l'autre côté les doublets électroniques libres avec l'atome nucléophile sont dans le même axe, la liaison hydrogène est plus forte.

1.15 Hybridation A - T

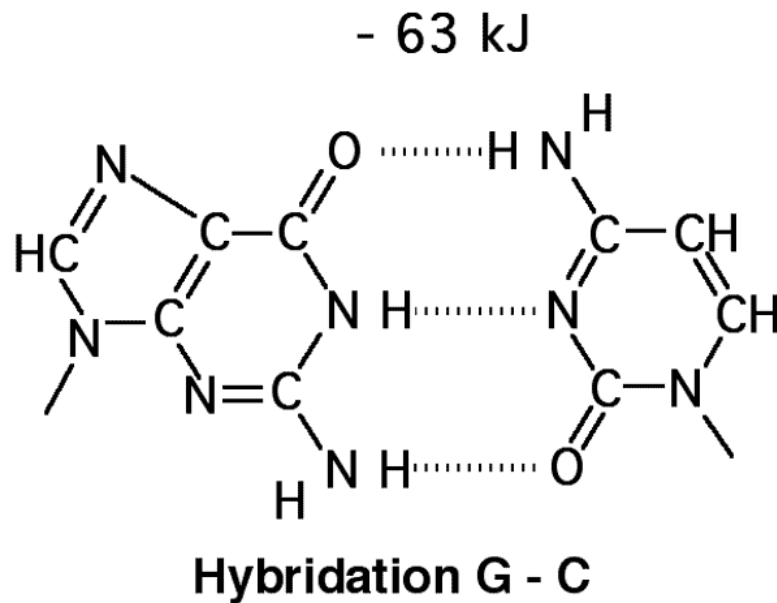


Hybridation A - T

BM 07/1

- Lorsqu'un acide nucléique est en solution les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans un RNA) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine.
- On désigne cette liaison sous le terme d'hybridation.
- L'hybridation adénine-thymine est moins stable (2 liaisons hydrogène, -21 kJ) que celle entre guanine et cytosine.

1.16 Hybridation G - C



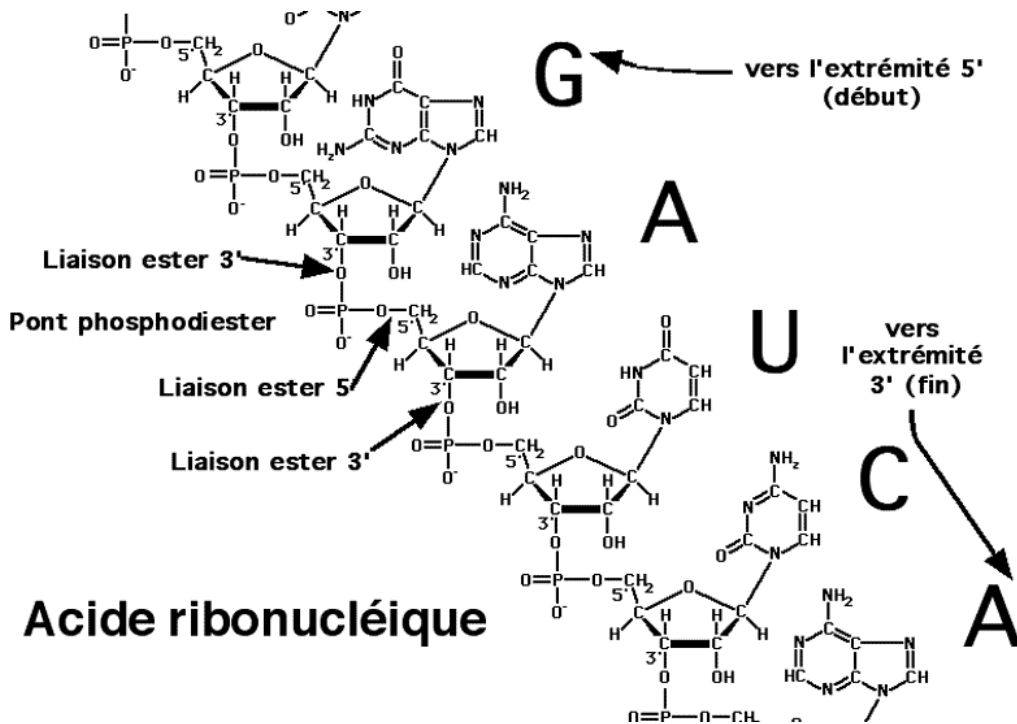
BM 07/2

- Lorsqu'un acide nucléique est en solution les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans un RNA) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine.
- On désigne cette liaison sous le terme d'hybridation.
- L'hybridation guanine-cytosine est plus stable (3 liaisons hydrogène, -63 kJ) que celle entre adénine et thymine.

Chapitre 2

Les acides nucléiques

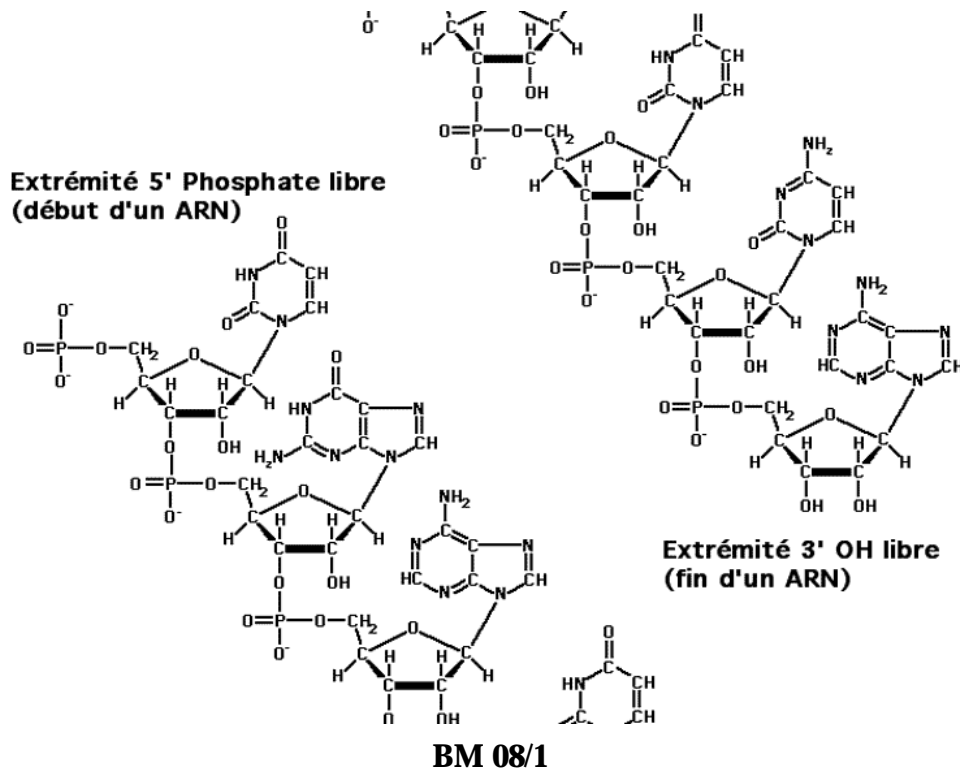
2.1 Acide ribonucléique



BM 08

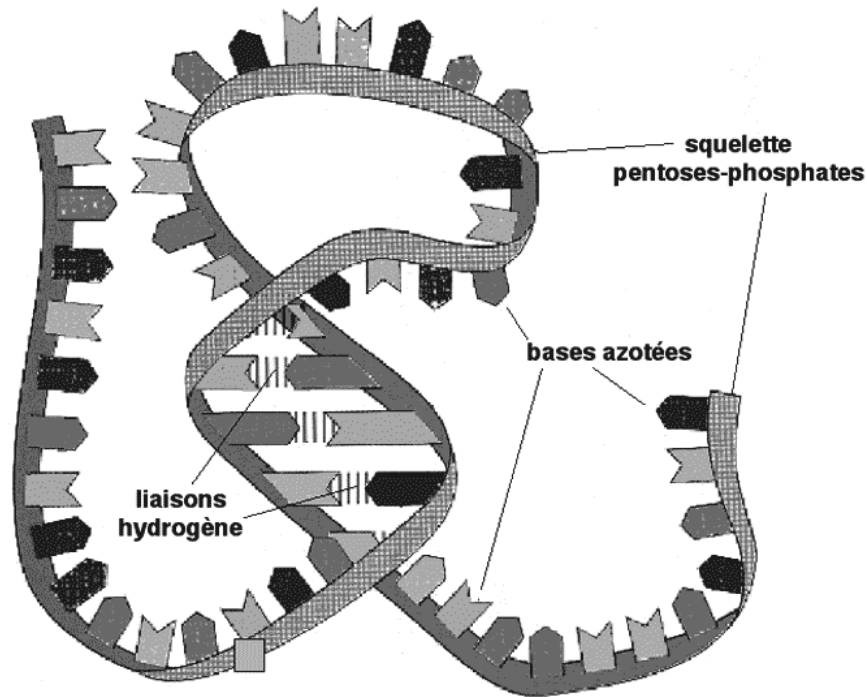
- Pour former un acide ribonucléique les nucléotides (GMP, AMP, UMP, CMP), sont condensés les uns sur les autres avec des liaisons phosphodiester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant.
- De sorte que ces liaisons définissent un sens à la molécule : le début 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.
- Selon leurs fonctions, on distingue plusieurs espèces d'acides ribonucléiques :
 - rRNA = acide ribonucléique ribosomique, qui participe à la structure des ribosomes ;
 - tRNA = acide ribonucléique de transfert, transporteur des acides aminés activés pour la traduction ;
 - mRNA = acide ribonucléique messenger, produit de la transcription d'un gène qui porte l'information à traduire.

2.2 Les extrémités 5' et 3' d'un acide nucléique



- Le premier nucléotide de la chaîne porte, par une liaison ester sur le carbone 5' de son ribose un phosphate dont les deux autres fonctions acides ne sont pas estérifiées. C'est l'extrémité 5'-phosphate terminale de l'acide nucléique, qu'on désigne par convention comme le début de la séquence ou du fragment d'acide nucléique.
- Le dernier nucléotide de la chaîne porte une fonction alcool sur le carbone 3' de son ribose. Cette fonction alcool n'est pas estérifiée. C'est l'extrémité 3'-OH terminale de l'acide nucléique, qu'on désigne par convention comme la fin de la séquence ou du fragment d'acide nucléique.

2.3 Structure secondaire du RNA



BM 09/1

- 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).

2.4 Acides ribonucléiques

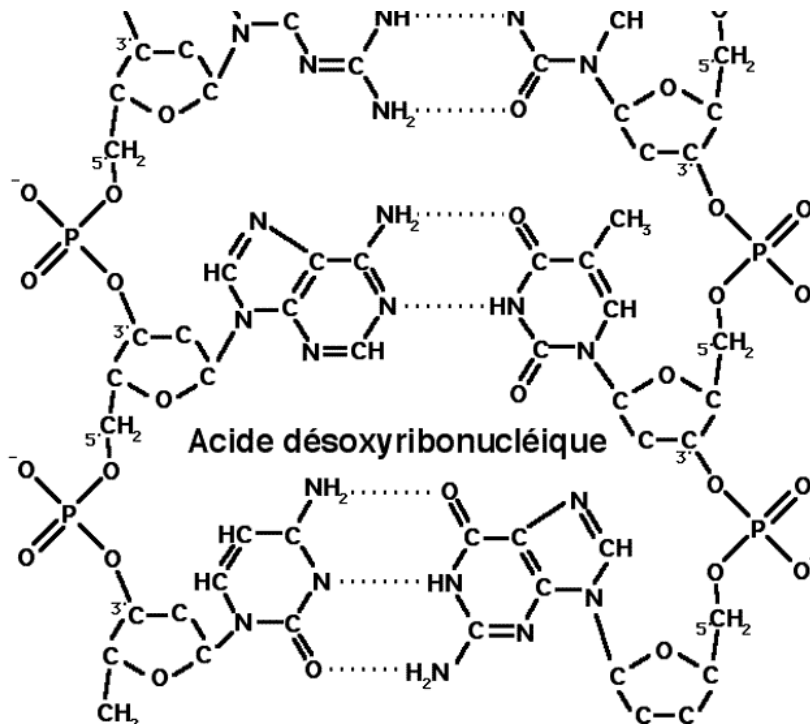
Acides ribonucléiques

- **rRNA = Acides ribonucléiques ribosomiques (82 %)**
 - RNA 28 S : 4718 nt RNA 5,8 S : 160 nt
 - RNA 18 S : 1874 nt RNA 5 S : 120 nt
- **tRNA = Acides ribonucléiques de transfert (16%)**
 - tRNA-Phe : 76 nt, au moins un par acide aminé ≥ 20
- **snRNA (<1%)**
 - riches en Uracile, participent à l'excision-épissage des introns
- **RNA 7 S (<1%)**
 - dans la particule de reconnaissance du signal-peptide
- **mRNA = Acides ribonucléiques messagers (2%)**
 - produits de la transcription, modèles pour diriger la traduction

BM 10

- Il existe de nombreuses molécules d'acides ribonucléiques dans presque tous les compartiments de la cellule et ayant des fonctions variées.
- Certains (rRNA) font partie de la structure des ribonucléoprotéines du ribosome, particule responsable de la synthèse des protéines.
- D'autres sont des coenzymes transporteurs d'acides aminés pour la synthèse des protéines, ce sont les tRNA.
- Certains, beaucoup plus rares, participent à la structure de ribonucléoprotéines diverses, responsable de l'excision-épissage des transcrits, de la sélection des polyribosomes liés pour l'adressage des protéines ou encore d'autres activités enzymatiques du métabolisme (ex. : Δ -ALA synthétase).
- Enfin les mRNA sont les produits de la transcription des gènes, grâce auxquels les ribosomes reçoivent l'information nécessaire à la synthèse des protéines.

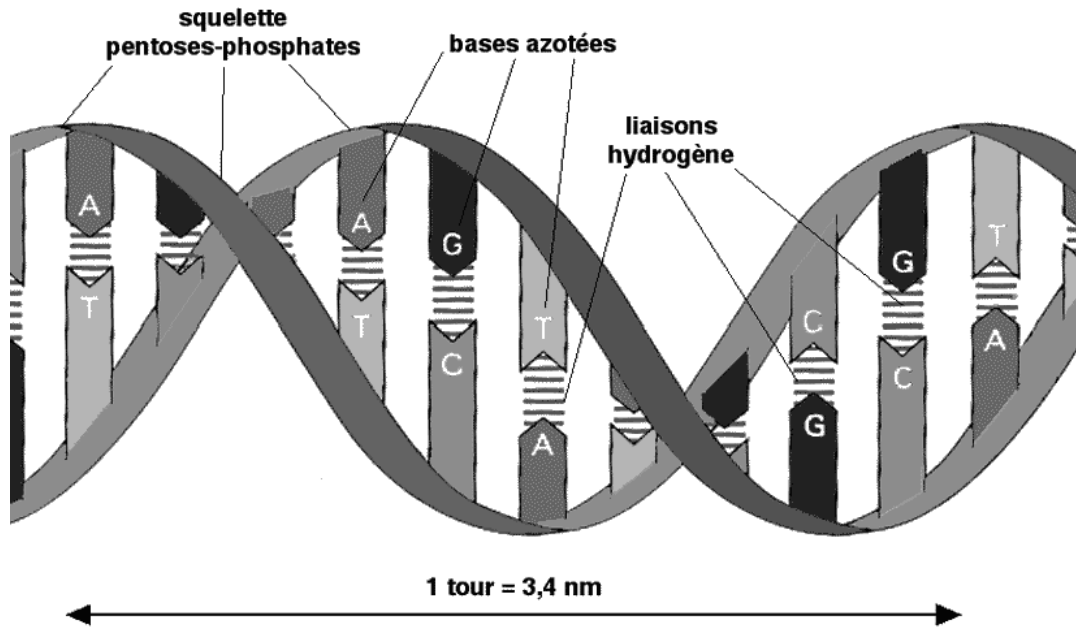
2.5 Acide désoxyribonucléique



BM 11

- Les molécules d'acide désoxyribonucléiques sont formées de deux chaînes dont les nucléotides sont hybridés deux à deux sur toute la longueur.
- Les deux chaînes sont antiparallèles, c'est à dire que l'extrémité 5' de l'une est du côté de l'extrémité 3' de l'autre.
- Pour que tous les nucléotides puissent s'hybrider ; il faut que l'ordre dans lequel ils sont liés ensemble soit complémentaire de la chaîne opposée.
- Les bases azotées liées par les liaisons hydrogènes sont tournées vers l'intérieur, tandis que les riboses et les acides phosphoriques, hydrophiles sont tournés vers l'extérieur.
- La chaleur peut dissocier les deux chaînes : c'est la fusion du DNA. Cette fusion est réversible : les deux chaînes peuvent s'hybrider à nouveau.

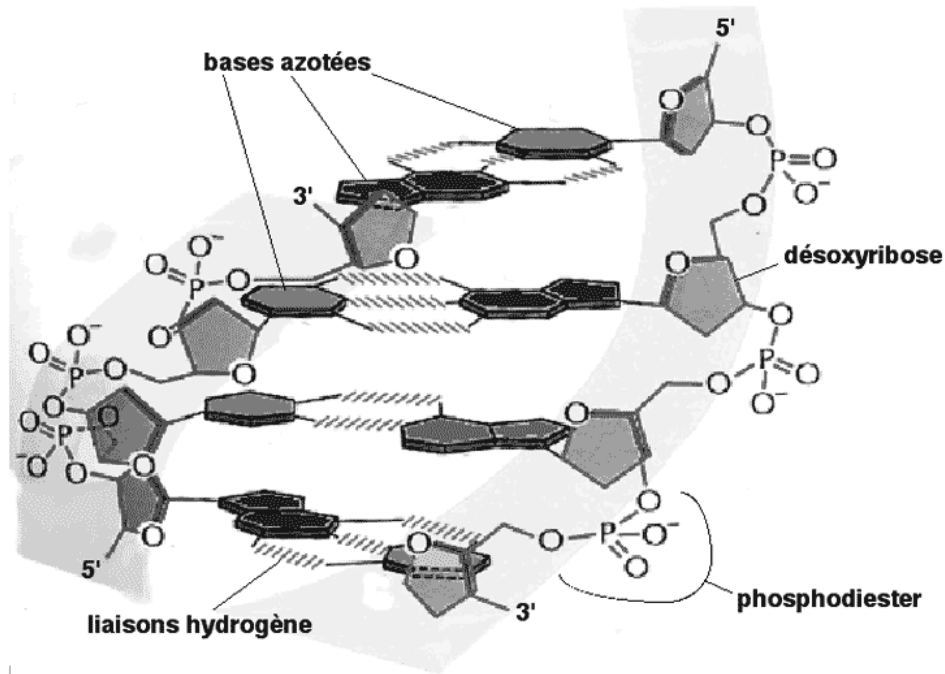
2.6 La double hélice (modèle rubans)



BM 11/1

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

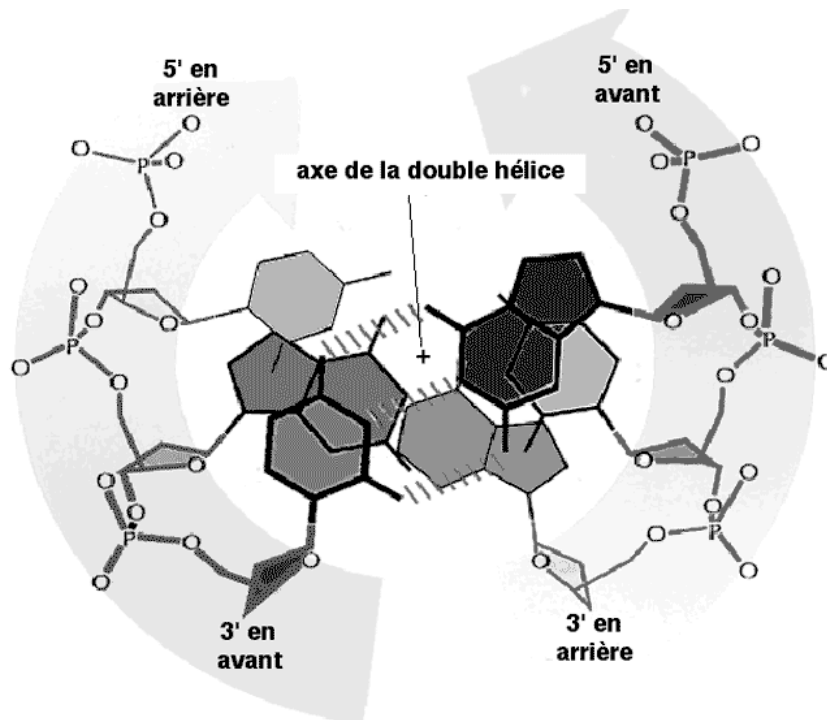
2.7 La double hélice (travers)



BM 11/2

- Une vue perspective de la double hélice montre bien comment les bases azotées sont parallèles entre elles, leurs noyaux empilés comme des assiettes au centre de la double hélice.

2.8 La double hélice (axe)

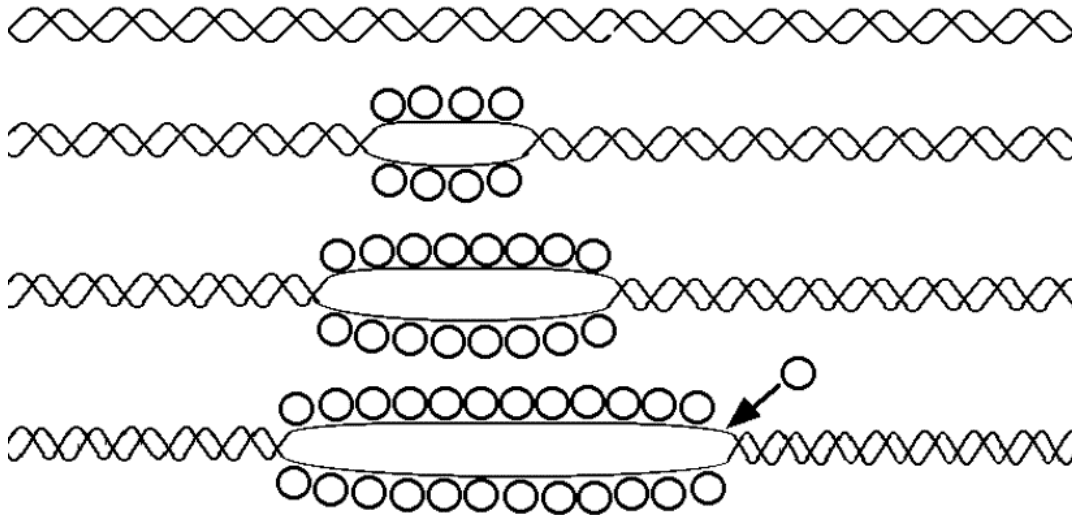


BM 11/3

- Lorsqu'on représente la double hélice selon son axe, on met en évidence deux particularités.
- L'ensemble des désoxyriboses et des phosphates se trouve à l'extérieur de la molécule et les fonctions acides des phosphates sont orientées vers l'extérieur.
- Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice et unies à la base complémentaire par des liaisons hydrogène. Les nucléotides complémentaires n'étant pas tout à fait diamétralement opposés, l'axe de l'hélice est vide.

2.9 Surenroulement

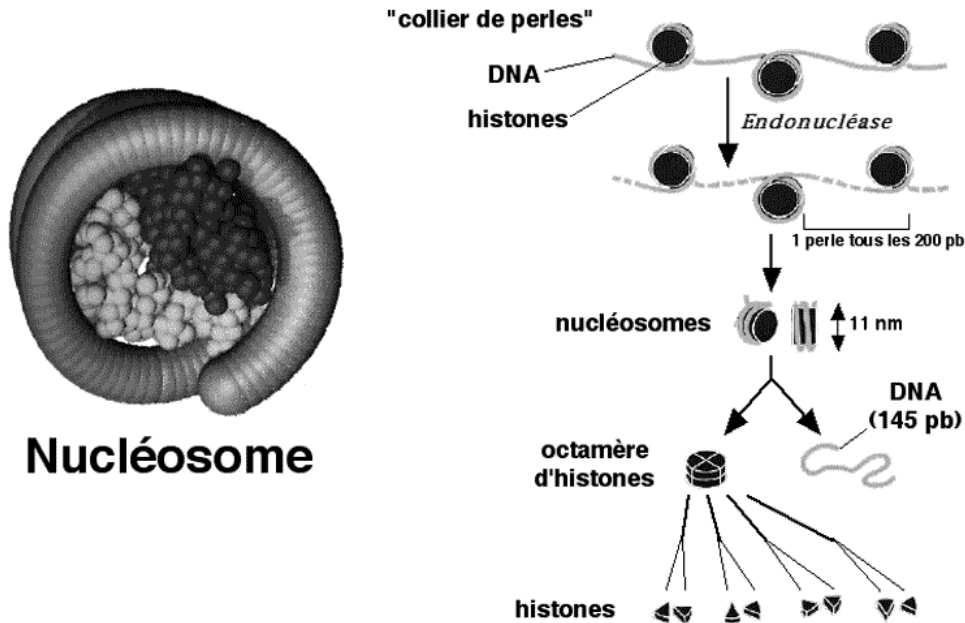
Surenroulement



BM 12

- Lors de la transcription ou de la réplication, l'hélice du DNA est ouverte par une topoisomérase (hélicase) qui permet aux enzymes l'accès au brin modèle.
- Le fait de séparer les bases complémentaires et les deux brins de la double hélice sur plusieurs dizaines de nucléotides se traduit par un resserrement des tours d'hélice de part et d'autre de la boucle ainsi ouverte.
- Ce surenroulement nécessite l'intervention d'une topoisomérase qui va desserrer les tours d'hélice en coupant un brin ou les deux brins du DNA, puis en les faisant tourner l'un autour de l'autre jusqu'à revenir à 10 nucléotides par tour d'hélice.
- Des protéines de stabilisation du DNA simple brin viennent se fixer sur la partie déroulée pour protéger la molécule.

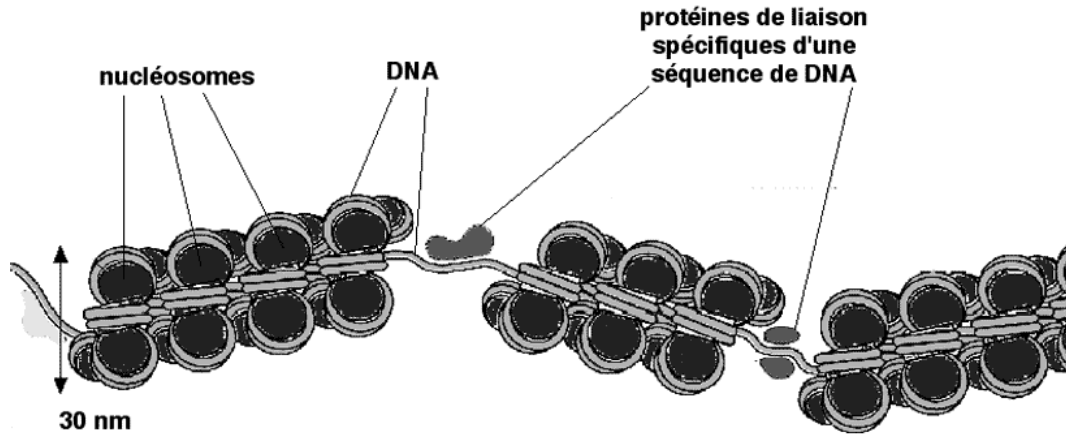
2.10 Nucléosome



BM 12/1

- Le DNA a besoin d'être protégé par des protéines lorsqu'il n'est pas utilisé comme modèle pour l'expression des gènes ou la réplication.
- Cette protection se fait par enroulement autour de protéines basiques (cationiques) capables de se lier avec le DNA qui est un polyanion. Des octamères d'histones sont au centre de particules qu'on trouve tous les 200 nucléotides et autour desquels le DNA s'enroule. La structure évoque un « collier de perles ».
- Le DNA ainsi lié aux histones est protégé contre l'action des enzymes. Une endonucléase peut digérer le DNA entre les « perles » et détacher des particules de 11 nm de diamètre appelées nucléosomes.
- Chaque nucléosome est constitué d'un fragment de DNA de 145 paires de nucléotides et de huit molécules d'histones.

2.11 Fibre de chromatine

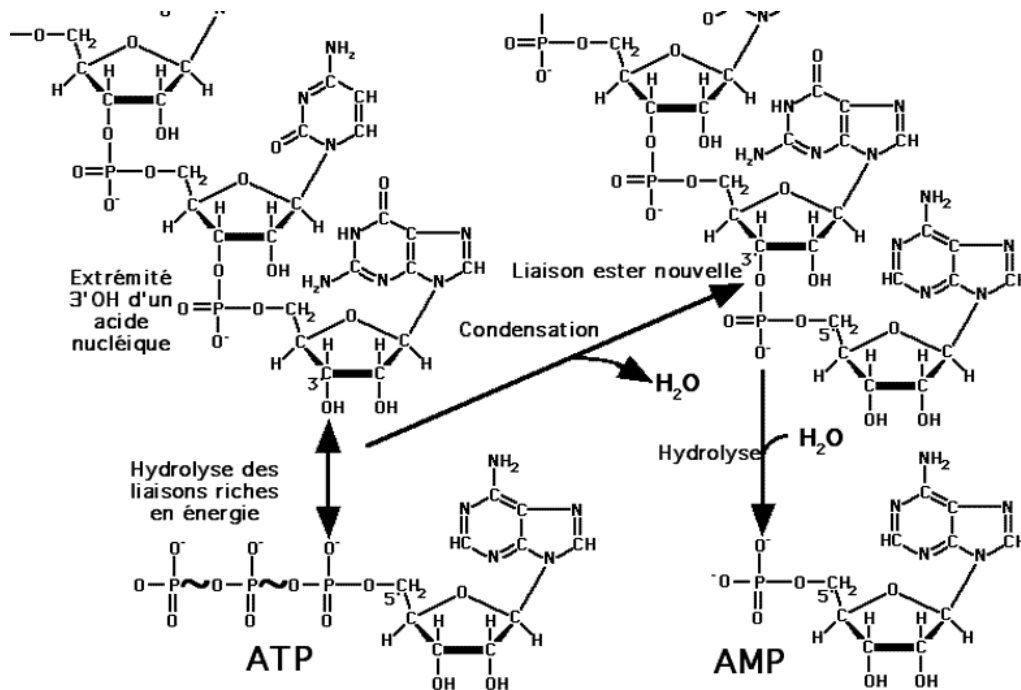


Fibre de chromatine

BM 12/2

- Le DNA qui entoure chaque nucléosome et le relie en « collier de perles » aux nucléosomes suivants, forme la trame d'une structure hélicoïdale qui enroule les colliers de perles sur eux-mêmes. On décrit aussi cette structure comme un solénoïde.
- Le diamètre de cette hélice est de 30 nm et forme une grande partie de la chromatine dite « compactée » où le DNA n'est pas accessible.
- Toutefois, des séquences reconnues spécifiquement par des protéines de liaison au DNA interrompent de place en place cette structure compacte.

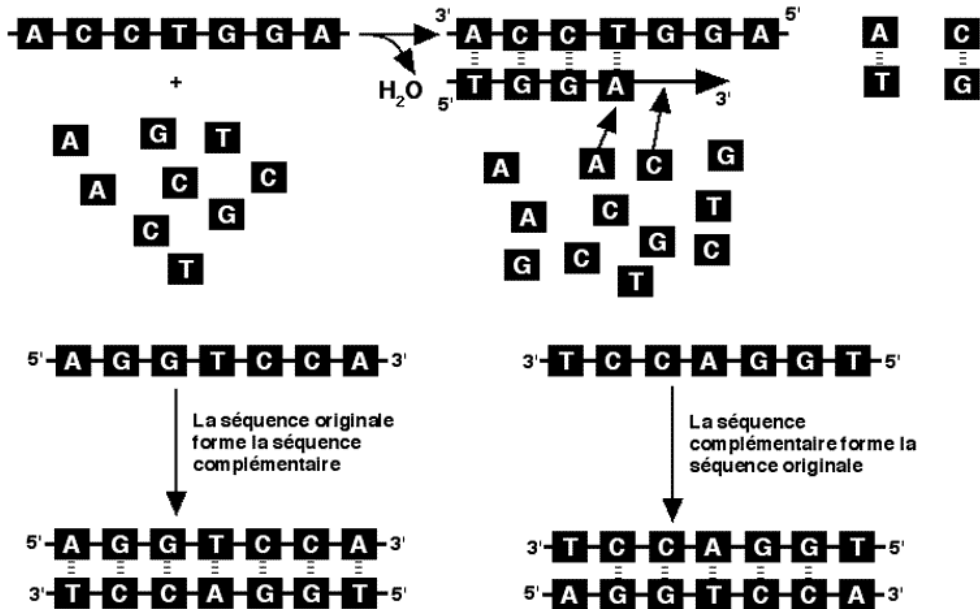
2.12 Condensation et hydrolyse des nucléotides



BM 13

- La croissance des brins d'acides nucléiques se fait toujours par leur extrémité 3'-OH terminale.
- La condensation se fait à partir d'un substrat « activé » : un des nucléosides triphosphates. L'hydrolyse des deux derniers phosphates fournira l'énergie nécessaire à la condensation. Le nucléoside monophosphate restant sera estérifié par une fonction acide de son phosphate sur la fonction alcool libre du carbone 3' du ribose qui constitue l'extrémité de l'acide nucléique. Une molécule d'eau sera ôtée.
- Inversement, en ajoutant une molécule d'eau sur cette liaison ester, on provoquera une réaction d'hydrolyse qui détachera le dernier nucléotide et libérera le carbone 3' du nucléotide précédent.

2.13 Complémentarité des bases



BM 13/1

- L'hybridation des nucléotides complémentaires peut se faire sur toute la longueur d'un brin d'acide nucléique : par des liaisons hydrogène, on associe systématiquement les C avec des G et les G avec des C, les A avec des T et les T avec des A.
- En réunissant tous les nucléotides ainsi associés par des liaisons phosphodiester on constitue une séquence complémentaire de la séquence originale. Ces deux séquences sont obligatoirement orientées dans des sens opposés : on dit qu'elles sont antiparallèles.
- De cette façon, grâce à des enzymes spécifiques, une séquence d'acide nucléique dite « originale » est capable de diriger la synthèse d'une séquence d'acide nucléique complémentaire.
- Dans un second temps, cette séquence complémentaire isolée, sera elle aussi capable de diriger la synthèse de la séquence originale dont elle est le complément.

Partie II

Biosynthèse des macromolécules

Rappel des objectifs

Transcription et régulation de l'expression des gènes

- Définir¹ les termes : gène, transcription, brin sens, promoteur, exon, intron, coiffe, queue poly-A, excision-épissage.
- Montrer le mécanisme² de la transcription d'un gène, en distinguant les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.
- Montrer les mécanismes de la régulation de la transcription. Donner un exemple de régulation d'un gène eucaryote sous le contrôle d'une grande voie endocrinienne (exemples : CREB, GlucocorticoidRE).
- Enumérer et décrire les principales modifications post-transcriptionnelles : enzyme coiffante, polyadénylation, édition, excision-épissage. Donner un exemple d'expression alternative d'un gène eucaryote.

L'étudiant doit être capable de définir un certain nombre de termes indispensables à la compréhension de la transcription : brin sens et brin antisens, RNA polymérase, promoteur, initiation de la transcription, élongation, terminaison. Il doit savoir décrire le mécanisme biochimique de la RNA polymérase et mentionner les rôles spécifiques des trois types de polymérases impliquées dans la transcription chez les eucaryotes.

Il doit savoir commenter un schéma résumant de façon intégrée la régulation d'un gène dont la transcription est sous le contrôle d'un messenger agissant sur un récepteur membranaire (exemple de CREB) ou d'un messenger interagissant avec un récepteur nucléaire (hormones stéroïdiennes).

En ce qui concerne les modifications post-transcriptionnelles, il doit simplement pouvoir définir ce qu'est une coiffe, une polyadénylation ou l'épissage (éventuellement alternatif) en identifiant et en explicitant les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Traduction

- Définir les termes : traduction, codon et anticodon, polyribosome, signal-peptide.

-
1. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.
 2. **Montrer le mécanisme** (d'une réaction) ou **Décrire les étapes** (d'une voie métabolique) : définir les corps chimiques en présence, écrire et équilibrer la (les) réaction(s) ; faire le bilan chimique et énergétique.

- *Montrer le mécanisme de la traduction d'un messenger, en distinguant les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.*
- *Montrer les mécanismes de la régulation de la traduction. Donner un exemple¹ d'antibiotique intervenant sur la régulation de la traduction des procaryotes.*
- *Enumérer et décrire les principales modifications post-traductionnelles (en complément de ce qui aura été traité dans le thème 2)*

L'étudiant doit être capable de définir un certain nombre de caractéristiques ou de termes indispensables à la compréhension de la traduction : aminoacyl-tRNA synthétase, sens de la traduction, codon, anticodon, codon d'initiation, code génétique, ribosomes, polyribosomes.

Sur un schéma synthétique décrivant le mécanisme de la traduction, il doit être capable d'identifier et d'expliciter les grandes étapes mises en jeu.

Il doit avoir la notion que chacune des étapes de la traduction chez les procaryotes peut être la cible d'antibiotiques, mais aucune connaissance spécifique ne peut lui être demandée, sauf des exercices de réflexion où ces données lui seraient rappelées.

Il doit pouvoir expliquer en termes simples la différence entre les protéines à localisation cytoplasmique et celles qui empruntent la voie de sécrétion, en précisant les notions de peptide-signal et de modifications post-traductionnelles.

Réplication et réparation du DNA

- *Définir les termes : réplication, réparation.*
- *Montrer le mécanisme enzymatique d'une fourche de réplication.*
- *Décrire les différentes réactions catalysées par les DNA polymérase.*
- *Décrire un exemple de mécanisme de réparation des mésappariements.*
- *Décrire la réplication du DNA linéaire et le rôle d'une télomérase.*
- *Décrire l'activité de la transcriptase inverse et donner un exemple de ses conséquences physiopathologiques.*

L'étudiant doit pouvoir citer et expliciter les grandes caractéristiques de la réplication : semi-conservative, continue/discontinue selon le brin, débutant à une même origine. Il doit pouvoir citer les principales protéines impliquées successivement dans la réplication chez les eucaryotes et préciser leur rôle : hélicases, protéines de liaison au DNA simple brin, topoisomérases, primase, DNA polymérase, ligase.

L'étudiant doit savoir illustrer la notion de fidélité de la réplication en explicitant les principaux mécanismes mis en jeu (activité 3'-exonucléasique des DNA polymérase, réparation des mésappariements).

Il doit être capable de résoudre le problème posé par la réplication des DNA linéaires en expliquant le rôle des télomérases.

Il doit savoir décrire les propriétés de la transcriptase inverse sans entrer dans les détails de la réplication des rétrovirus.

- *Donner un exemple de réparation du DNA lésé.*

En appliquant ses connaissances acquises des principales enzymes agissant sur le DNA,

1. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation dans laquelle un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.

auxquelles seront ajoutées à l'occasion les glycosylases, l'étudiant doit savoir reconnaître sur un schéma les interventions successives des enzymes impliquées dans la réparation par excision de nucléotides.

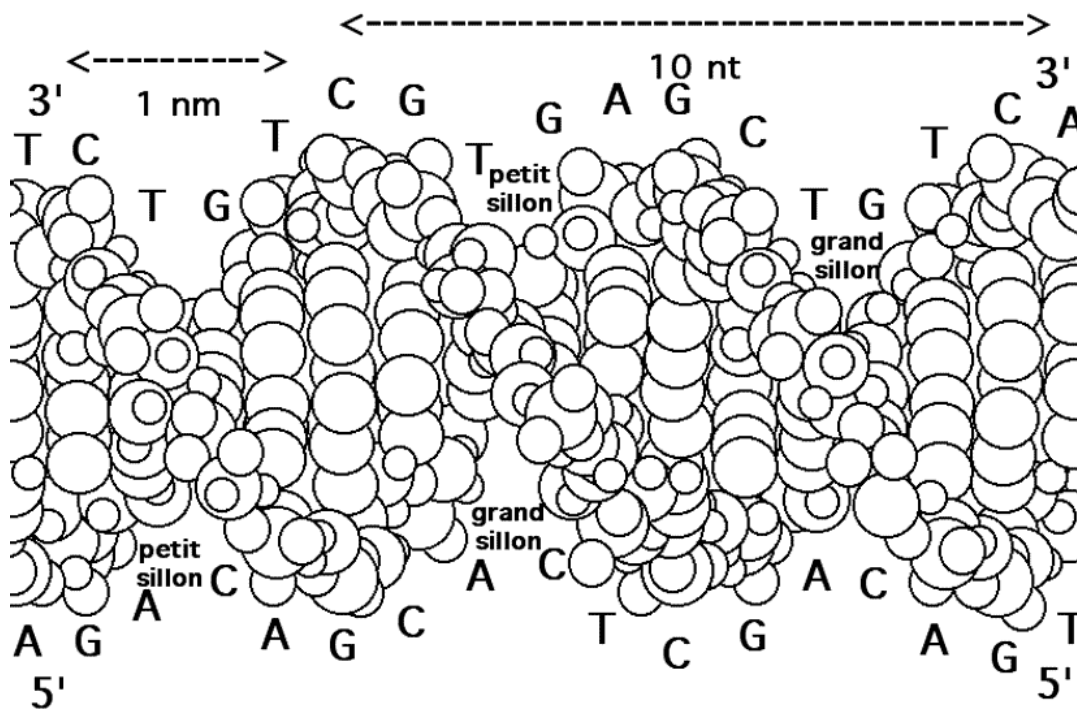
Recombinaison

Sans avoir à reproduire le modèle de Holliday qui lui aura été présenté, l'étudiant doit être capable de définir le processus d'échange de segments de DNA homologues sur des schémas simples et de mentionner l'implication de la recombinaison dans des phénomènes fondamentaux tels que le « *crossing-over* ».

Chapitre 3

DNA Définitions

3.1 La double hélice



BM 21

- L'acide désoxyribonucléique (ADN ou DNA) est constitué de deux chaînes de nucléosides monophosphates liés chacun par une liaison ester entre son carbone 3' (alcool secondaire) et le carbone 5' (alcool primaire) du nucléotide suivant.
- Ces deux chaînes de nucléotides sont unies entre elles par des liaisons hydrogènes pour former un hybride en forme de double hélice (modèle de J.D. Watson et F.H.C. Crick, 1953) dont les deux brins sont :
 - antiparallèles : l'un est constitué d'un enchaînement commençant à gauche et se poursuivant vers la droite, l'autre commençant à droite et se poursuivant vers la gauche ;
 - complémentaires : chaque adénine (A) d'un des deux brins est liée par deux liaisons hydrogène avec une thymine (T) de l'autre brin, et chaque guanine (G) d'un brin est liée par trois liaisons hydrogène avec une cytosine (C) de l'autre brin.
- De sorte que si on désigne les nucléotides par les lettres A, C, G et T en fonction des bases azotées qu'ils contiennent, on peut lire sur cette figure le texte suivant :

...AGAGTCGTCTCGAGTCA...
 ...TCTCAGCAGAGCTCAGT...

3.2 Séquence d'un gène (apoA-II)

```

CTAAGAGCTGTACCCCTGCCTCTCACCCATCACCATGAGTCTTCCATGTGCTTGTCTCTC
CTCCCCATTTCTCCAACCTGTTTATCCTCACATAATCCCTGCCCACTGGCCATCCATAGT
CCCTGTCACCTGACAGGGGTGGGTAACAGACAGGTATATAGCCCTTCTCTCCAGCCAGGG
CAGGCACAGACACCAAGGACAGAGACGCTGGCTAGGTAAAGATAAGGAGGC AAGATGTGTGAGC
AGCATCCAAAGAGGCCTGGGCTTCAGTTGTGGAGAGGGAGAGAGCCAGGTTGGAATGGGCAGC
AGGTAGGGAGATCCCTGGGGAGGAGCTGAAGCCATTTGGCTTCAGTGTCCCCAAACCCCA
CCACCTCTTCTTAGGCCGCCCTCCCCACTGTTACC AACATGAAGCTGCTCGCAGCAACTGTG
CTACTCCTCACCATCTGCAGCCTTGAAGGTGGGTGTGATATGGAGAGGGGGCCAAAAGGGAGA
ATGTGCTGGTGGTTATAGCTACCTATCTGCCTGTGCTCTTATATCCAGGTC TGGCAACCAAAG
GGCTCAAAGGAAGATCATTCCTCTCTAAAGCCAGAAAGCCATCCAAAGATCTGGCTGGA
TACCTTTTGGGGAGGGGGCAGAGAGCTGGGGTGGGTACTGGCAGAGGTATGGCAGGAGGCCA
AGATTC ACTGCTGTGGACCCAGCTGAAAAGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GGGCAGGAGCTTTGGTTCGGAGACAGGCAAAGGAGCCATGTGTGGAGAGCCTAGTTTCTCAGT
ACTTCCAGACCGTACTGACTATGGCAAGGACCTGATGGAGAAGGTC AAGAGCCCAGAGCTTC
AGGCCGAGGCCAAGTAAGTCTCAGGGCAAGGGGTTCAGGGGCTGTGGAAC TGTGGAGAGAAAAG
AAGGGAAGATGAGAGGTCCCACAGAAGTCTGAACCCAGGGGTGGGGATTAGGGCAGATTAGGC
TTAAATTGCAGAGAAAAAGTATTTTCATCACCCAAAGATCCACACGTCTCTTAGATAGAGAGG
AACAGCAAGAAGCTGGCCCTGGAATTTAGTCTCTAGAGTCTGTCCCTCTACCTAGCAAAGGTC
TTGACTCTATTCTACCTAGGGGCTTTGCCATGCGATGGACCAGGCACTAGAGTTTGGGGACC
TGAGTCAGTCTGCTCTGACCTCCCACCACCACCAAGGCCCTGCCAGTGCCTAGGGTCCCTCA
GATTAAACTCTAATCCCTCACCTATCCAGGTCTTACTTTGAAAAGTCAAAGGAGCAGCTGAC
ACCCCTGATCAAGAAGGCTGGAACGGAAGCTGGTTAACTTCTTGAGCTATTTCTGTTGGAAGCTGG
AACACAGCCTGCCACCCAGTGAAGTGTCCAGACCATTGTCTTCCAAACCCAGCTGGCCTCTAG
AACACCCACTGGCCAGTCCTAGAGCTCCTGTCCCTACCCACTCTTTGCTACATAAATGCTGA
ATGAATCCAGCTCTGAGCCTGGTATGTTTGGGGACTGGGAAAAGTAGGGGAGTAAGGGAGGA

```

BM 22

- Ecrire à la suite les lettres A, C, G et T dans l'ordre où on rencontre les nucléotides sur l'un des brins du DNA de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' aboutit à un texte indéchiffrable (voir l'image).
- Pourtant sur cette diapositive le texte ainsi transcrit contient toute l'information nécessaire pour la synthèse d'une protéine (l'apolipoprotéine A-II). C'est pourquoi on appelle ce brin de DNA le brin « sens ». L'autre brin est le brin complémentaire ou brin « antisens ».
- L'ensemble de l'information génétique transmise par chacun des parents à un enfant (génome haploïde) peut s'écrire ainsi en 3 milliards de lettres (une bibliothèque de 7000 livres de 300 pages chacun !)
- Les protéines du noyau savent chercher sur les brins de la double hélice du DNA des suites de lettres (séquences) sur lesquelles elles se fixent spécifiquement. Les effets de cette fixation de protéines sur le DNA vont permettre l'expression de l'information contenue dans le DNA pour faire vivre un individu.

3.3 Gène

GENE

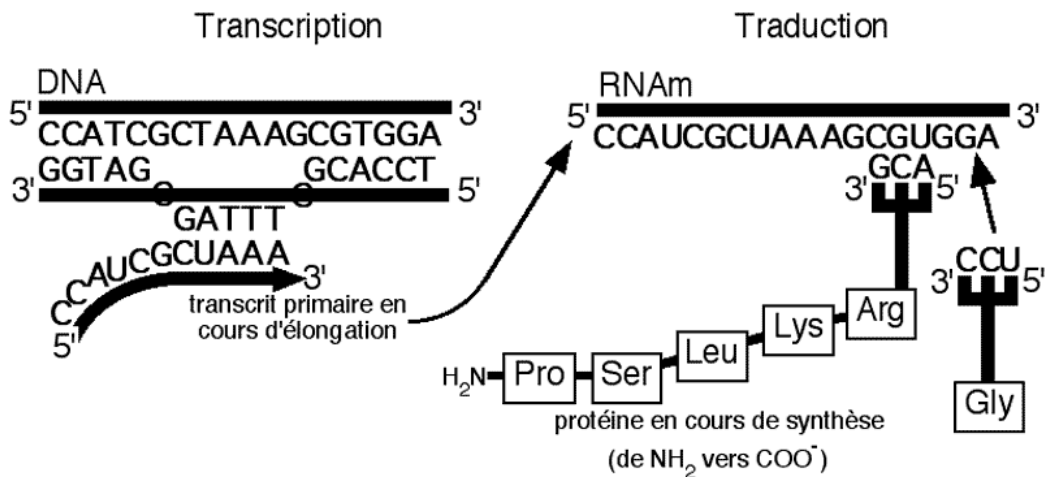
- **Séquence de nucléotides de l'acide désoxyribonucléique contenant l'information nécessaire pour la synthèse d'un acide ribonucléique ou d'une protéine.**

BM 23

- Pour permettre la biosynthèse d'une protéine, il doit y avoir dans la structure du DNA d'un sujet, une séquence de nucléotides qui constitue le gène de cette protéine.
- Dans la séquence du gène on distingue des séquences en amont (éléments régulateurs, promoteur), un site d'initiation de la transcription, une suite variable d'exons et d'introns : exons non-traduits ou traduits, introns comportant éventuellement d'autres séquences régulatrices, et enfin la fin de la transcription à la fin du dernier exon.
- L'ensemble des mécanismes qui à partir de la séquence du gène conduisent à la production d'un acide ribonucléique ou d'une protéine est désigné sous le terme d'expression de ce gène.

3.4 Expression d'un gène

Expression d'un gène



BM 23/1

- L'expression d'un gène est une suite de synthèses chimiques et de réactions aboutissant à la production d'un acide ribonucléique ou d'une protéine.
- Dans un premier temps a lieu la synthèse d'un acide ribonucléique, dont la séquence est complémentaire d'un des deux brins du gène donc identique à celle de l'autre brin : c'est la transcription.
- La séquence de l'acide ribonucléique est identique à celle du brin sens et orientée dans le même sens. Elle se construit de 5' vers 3' en complémentarité de celle qui est « lue » sur le brin antisens.
- Après des réactions de maturation le transcrit primaire (RNA) devient RNA messenger (mRNA) et sort du noyau vers le cytoplasme.
- Dans le second temps, le RNA messenger est « lu » par groupe de trois nucléotides (lettres) grâce à un RNA complémentaire qui porte l'acide aminé correspondant.
- La « lecture » du mRNA se fait de 5' vers 3' et la synthèse de la protéine se fait en même temps de l'extrémité NH₂ terminale vers l'extrémité COOH terminale.
- Après des réactions de maturation, la protéine « mature » est prête à remplir sa fonction dans la cellule.

Chapitre 4

La transcription

4.1 Transcription

TRANSCRIPTION

- **Lecture d'un gène par une RNA-polymérase qui synthétise un acide ribonucléique dont la structure primaire reproduit celle du brin "sens" de ce gène.**

BM 24

- L'expression du génome aboutit à la synthèse dans les cellules de macromolécules acides nucléiques et protéines, dont la structure primaire est déterminée par celle du DNA.
- Cette expression se fait par deux mécanismes principaux :
 - la structure primaire du DNA s'exprime d'abord par la synthèse d'acides ribonucléiques dont la structure primaire est parallèle à celle du DNA. C'est la transcription.
 - la structure transcrite sur certains RNA, dits « messagers », s'exprime enfin par la synthèse de protéines dont la structure primaire traduit en acides aminés l'information portée par la structure primaire du DNA. C'est la traduction.
- La transcription est conduite par plusieurs enzymes :
 - RNA-polymérase I qui synthétise les RNA cytoplasmiques : RNA ribosomiques (18 S-5,8 S- 28 S)
 - RNA-polymérase II qui synthétise les RNA messagers qui contiennent l'information destinée à la traduction et certains des snRNA
 - RNA-polymérase III qui synthétise les petits RNA (tRNA, rRNA 5 S, snRNA, 7SL-RNA).

4.2 Promoteur

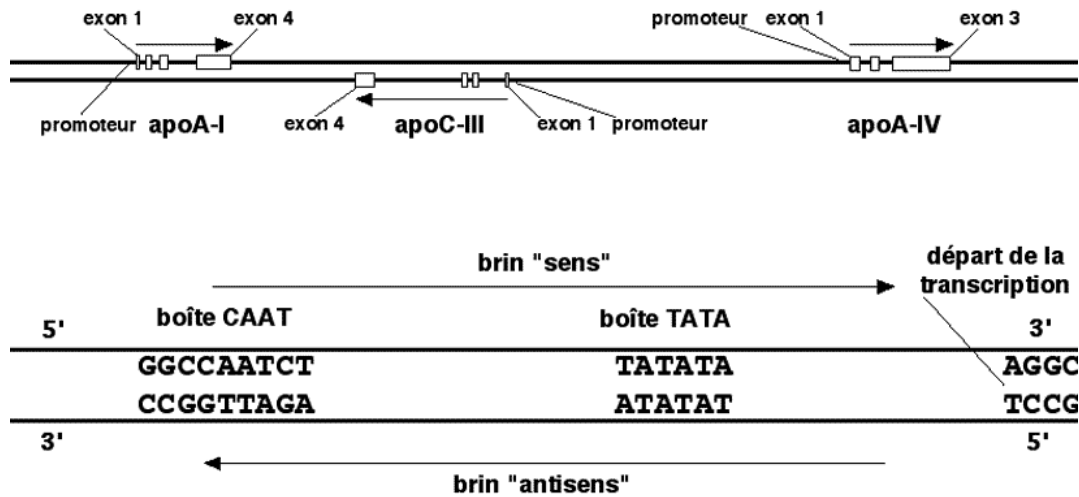
TATTTAACTGATTTACCCAAATGCTTTGAACCTGGGAATGTACCTCTC
CCCCCCCCACCCCAACAGGAGTGAGACAAGGGCCAGGGCTATTGCC
CTGCTGACTCAATATTGGCTAATCACTGCCTAGAAGCTGATAAGGTGATC
AAATGACCAGGTGCCTTCAACCTTTACCCTGGTAGAAGCCTCTTATTCA
CCTCTTTTCTGCCAGAGCCCTCCATTGGGAGGGGACGGGC GGAAGCTG
TTTTCTGAATTTGTTTTACTGGGGGTAGGGTATGTTTCAAGTGATCAGCAT
CCAGGTCATTCTGGGCTCTCCTGTTTTCTCCCCGTCTCATTACACATTA
ACTCAAAAACGGACAAGATCATTTACACTTGCCCTCTTACCCGACCCTC
ATTCCTTAACCCCATAGCCCTCAACCCTGTCCCTGATTTCAATTCTT
TTCTCCTTTCTTCTGCTCCCAATATCTCTCTGCCAAGTTGCAGTAAAG
TGGGATAAGGTTGAGAGATGAGATCTACCCATAATGGAATAAAGACACC
ATGAGCTTTCATGGTATGATGGGTTGATGGTATTCCATGGGTTGATAT
GTCAGAGCTTTCAGAGAAATAACTTGAATCCTGCTTCTGTTGCATT
CAAGTCCAAGGACCTCAGATCTAAAAGAATGAACCTCAAATATACCTGA
AGTGTACCCCTTAGCCTCCACTAAGAGCTGTACCCCTGCCTCTCACC
CCATCACCATGAGTCTTCCATGTGCTTGTCTCTCCTCCCCATTTCTC
CAACTTGTTTATCTCACATAATCCCTGCCCCACTGGCCCATCCATAGT
CCCTGTCACCTGACAGGGGTGGGTAAACAGACAGGTATATAGCCCTTC
CTCTCCAGCCAGGGCAGGCACAGACACCAAGGACAGAGACGCTGGCTAG

BM 25

- La dernière ligne de cette image (en bleu) est la séquence du premier exon du gène de l'apolipoprotéine A-II.
- Les 900 nucléotides qui précèdent contiennent de nombreuses séquences reconnues par des protéines nucléaires qui permettent le début de la transcription ou la régulation de cette étape.
- On distingue en particulier :
 - vers -20 -30 (20 à 30 nucléotides en amont de l'exon 1 en direction de l'extrémité 5' du brin sens) une séquence TATATA appelée « boîte TATA », qui est spécifiquement reconnue par la protéine TFIID, cofacteur de la RNA-polymérase II ;
 - vers -80 une séquence GGCCATCCAT à la fois « boîte CAT ou CAAT » et « boîte GC », sur laquelle viennent se fixer d'autres protéines de la transcription (CTF et Sp-1) ;
 - de nombreuses autres séquences (en jaune) où se fixent des protéines régulatrices de la transcription. Par exemple, une séquence TRE (TGAAGTCA) au début de la troisième ligne de cette image, sur laquelle vont se fixer des protéines de la famille AP-1 pour activer la transcription.

4.3 Brins sens et antisens

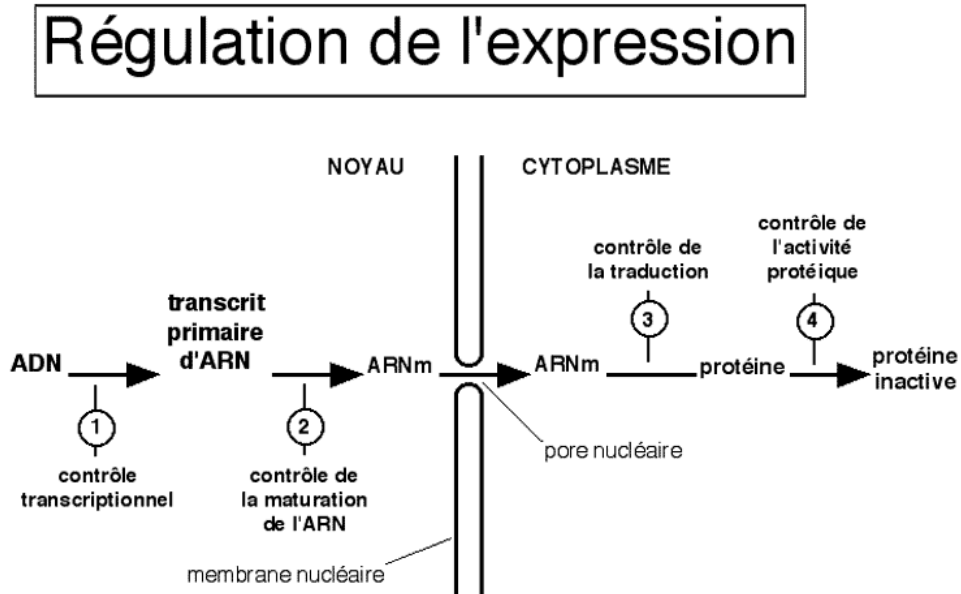
Brins sens et antisens



BM 25/1

- Les gènes sont situés sur les deux brins du DNA, de gauche à droite ou de droite à gauche, indifféremment. Ainsi les gènes des apolipoprotéines A-I et C-III qui sont voisins sont orientés en sens opposés. Le début du message (exon 1) est à gauche pour l'apoA-I et à droite pour l'apoC-III. Le message codé doit être lu en commençant par le début donc dans un sens différent pour ces deux gènes.
- Pour servir de modèle la transcription doit faire la copie de la séquence d'un brin de DNA, qualifié de brin « sens » ; l'autre brin en est le complémentaire on le dit « antisens ». La transcription se fait en synthétisant un RNA complémentaire de la séquence du brin antisens, donc identique à celle du brin sens.
- Lors de la formation du complexe d'initiation de la transcription la fixation de TFIID sur la boîte TATA se fait en premier et sur les deux brins de façon symétrique. Lors de la fixation des autres protéines du complexe (NF-I ou NF-Y sur la boîte CAAT) il y a un brin sur lequel la boîte TATA est en aval (côté 3') de la boîte CAAT, c'est le brin « sens » qui contient le message et un brin sur lequel la boîte CAAT est en aval (côté 3') de la boîte TATA, c'est le brin « antisens » qui doit servir de modèle pour la transcription.

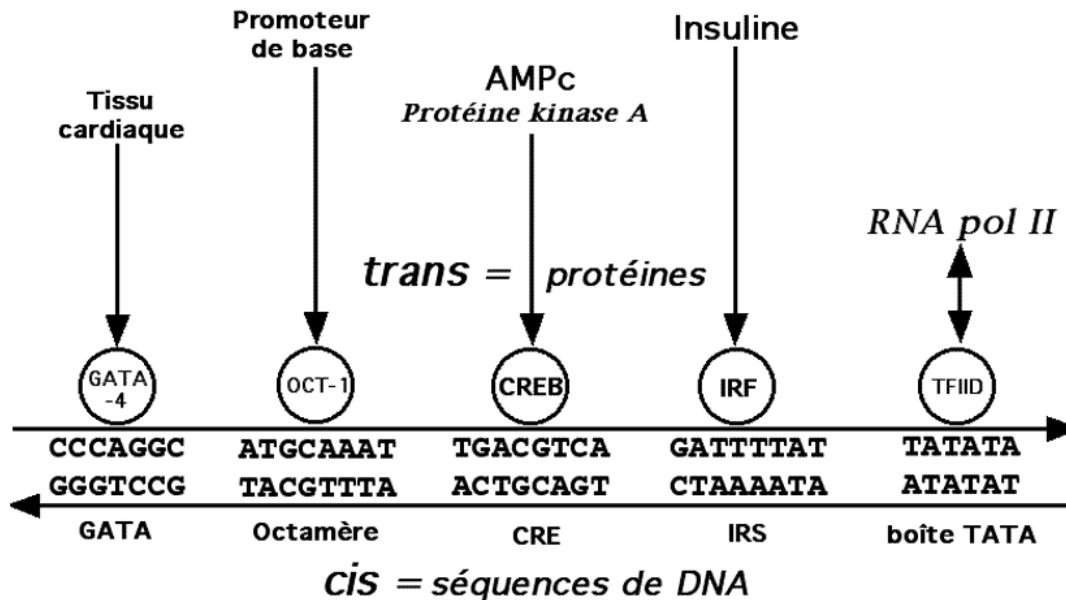
4.4 Régulation de l'expression



BM 26

- La régulation de toute voie métabolique se fait principalement à la première réaction pour ne pas synthétiser d'intermédiaires inutiles.
- Pour l'expression d'un gène, la régulation a lieu à quatre niveaux :
 1. lors de la transcription
 2. lors de la maturation du transcrit
 3. lors de la traduction
 4. lors de l'activation de la protéine mature.
- Le point de contrôle principal est la transcription : la RNA polymérase est l'enzyme-clé de l'expression d'un gène.

4.5 Cis et trans régulateurs



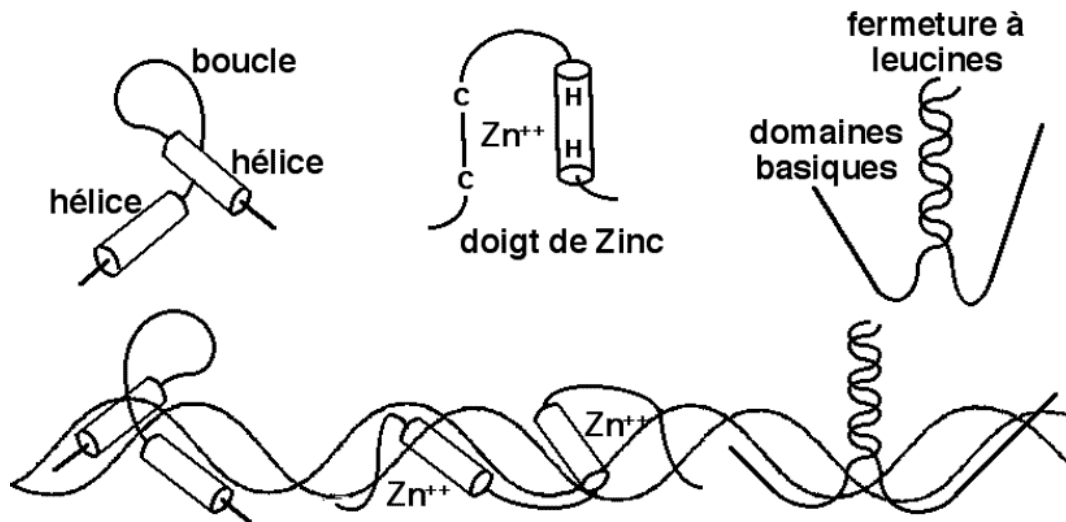
BM 26/1

- Les séquences de nucléotides du promoteur (facteurs cis-régulateurs) sont reconnues par une classe de protéines spécifiques (facteurs trans-régulateurs) dont la structure permet une liaison avec le DNA (*DNA binding proteins*).
- Les facteurs trans-régulateurs ont des effets sur la vitesse de la transcription : activateurs (séquences *enhancer*) ou inhibiteurs (séquences *silencer*). Leur liaison avec le DNA dépend le plus souvent de circonstances physiologiques qui induisent ou répriment l'expression du gène.
- Il existe des éléments essentiels et présents dans la plupart des gènes :
 - élément principal comme la boîte TATA,
 - éléments de base comme l'octamère reconnu par le facteur OCT-1 présent dans presque toutes les cellules.
- Il existe des éléments qui répondent à des facteurs dont la présence dépend des signaux qui parviennent à la cellule, principalement les hormones comme l'insuline ou les second messagers comme l'AMP cyclique.
- Il y a encore des éléments spécifiques d'un type cellulaire permettant l'expression différente des gènes dans chaque tissu.
- Ainsi, le promoteur de la lipoprotéine lipase contient la boîte TATA, des éléments du promoteur de base, des éléments de réponse aux hormones et des éléments d'expression tissulaire spécifique. Dans le promoteur des gènes il y a souvent 20 ou 30 sites de fixation pour des fac-

teurs trans-régulateurs dont beaucoup ont un effet inducteur ou répresseur sur l'expression du gène.

4.6 DNA binding proteins

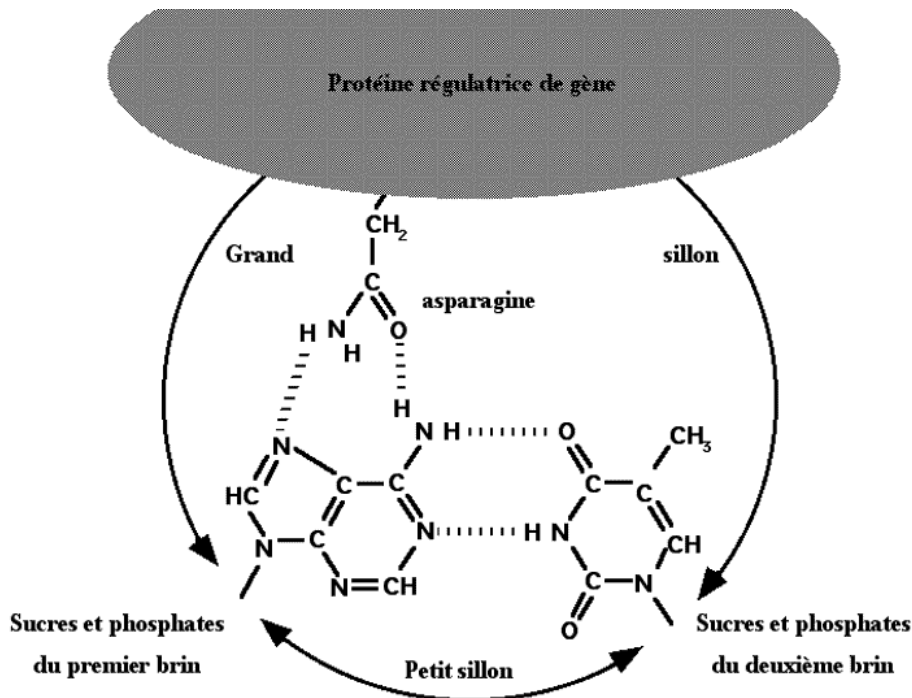
DNA binding proteins



BM 26/2

- Les protéines qui reconnaissent et se lient au DNA (*DNA binding proteins*) sont des enzymes, des protéines de structure, des facteurs de transcription et des éléments trans-régulateurs.
- Dans la structure spatiale de ces protéines, on reconnaît des domaines propres à cette liaison spécifique :
- Le domaine **hélice-boucle-hélice** permet le lien spécifique des hélices α avec les nucléotides dans le grand sillon sur une longueur de 10 paires de bases environ.
- Les **doigts de Zinc** sont des domaines formés d'un ion Zn^{++} tétracoordonné avec deux histidines (H) et deux cystéines (C) de la protéine. Chaque doigt de Zinc se lie à cinq nucléotides dans le grand sillon du DNA. Il y a souvent plusieurs doigts de Zinc à la suite dans la même protéine.
- Certaines protéines ont un domaine riche en acides aminés basiques (K,R) qui se lie aux phosphates des nucléotides. Ces protéines se lient à des séquences répétées inverses sur le DNA, lorsqu'elles sont associées en dimères par la liaison hydrophobe de deux domaines riches en leucine (**fermeture « Eclair » à leucines**).

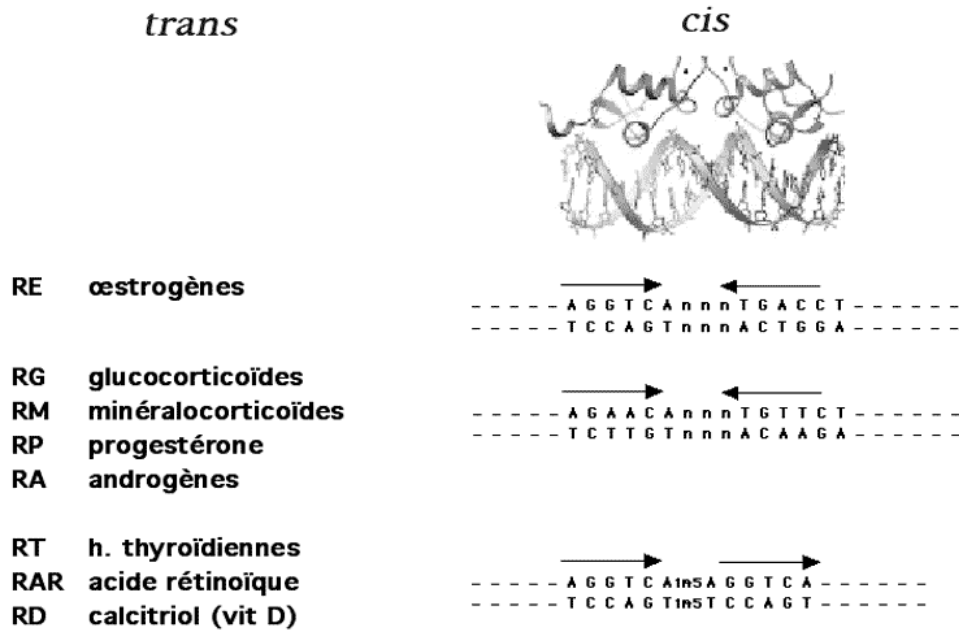
4.7 Interaction Protéine DNA



BM 26/21

- Les protéines régulatrices (facteurs trans-régulateurs) ont la capacité de se lier de façon spécifique à de courtes séquences de DNA et de réguler de façon positive ou négative la transcription d'un gène.
- Dans la plupart des cas la protéine s'insère dans le grand sillon de l'hélice et réalise une série de contacts moléculaires avec les paires de bases. La liaison avec le DNA se fait par l'intermédiaire de plusieurs types interactions (liaisons hydrogène, liaisons ioniques ou interactions hydrophobes).
- Ici on a représenté un point de contact entre un résidu asparagine d'une protéine régulatrice et une adénine d'un brin du DNA.
- L'interaction DNA-protéine comporte 10 à 20 de ces points de contact, impliquant chacun un acide aminé.

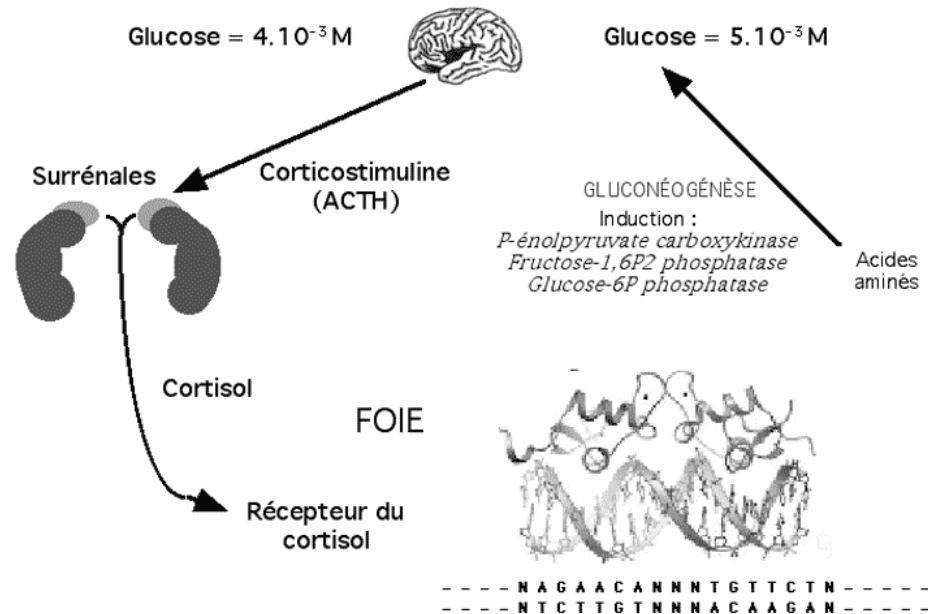
4.8 Récepteurs nucléaires



BM 26/22

- Les hormones stéroïdes, thyroïdiennes et les rétinoïdes se lient à des protéines qu'on appelle récepteurs nucléaires. Ces récepteurs nucléaires forment une famille de protéines homologues se liant au DNA.
- L'ensemble hormone-récepteur constitue un facteur trans-régulateur.
- Les séquences de DNA qu'ils reconnaissent (éléments cis-régulateurs) sont des répétitions de six nucléotides directes (dans le même sens) ou inversées, séparées par quelques nucléotides.

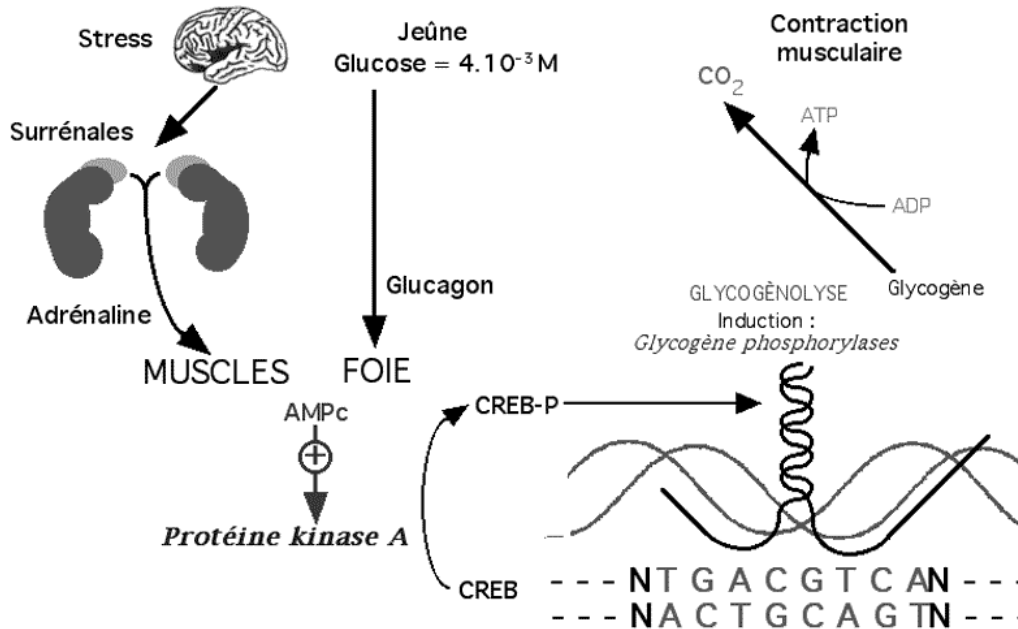
4.9 Régulation du jeûne



BM 26/3

- Au cours du jeûne le taux de glucose dans le sang diminue (hypoglycémie). Le cerveau dont le nutriment majeur est le glucose réagit en faisant sécréter par l'hypophyse une stimuline : la corticotrophine (ou ACTH). Celle-ci provoque la sécrétion d'une hormone par les surrénales : le cortisol.
- Le cortisol agit dans le foie en se liant avec une protéine spécifique : le récepteur du cortisol. Cette protéine liée à l'hormone constitue un facteur trans-régulateur.
- Le facteur transrégulateur va dans le noyau des hépatocytes se lier au DNA au niveau du promoteur de certains gènes qui ont un élément cis-régulateur spécifique : le GRE (*glucocorticoid responsive element*).
- La liaison du facteur trans-régulateur (protéine + hormone) sur la séquence de l'élément cis-régulateur (séquence AGAACA) va activer la transcription du gène en aval de ce promoteur, d'où une synthèse accrue de messager.
- Les messagers ainsi produits vont induire la synthèse d'enzymes appartenant à la voie de la gluconéogénèse. L'augmentation du taux de ces enzymes dans les hépatocytes va permettre la transformation des acides aminés en glucose qui sera sécrété dans la circulation et gagnera le cerveau : la glycémie va remonter.

4.10 Régulation de l'effort



BM 26/4

- Les stress provoquent la mise en éveil de l'organisme et sa préparation à l'effort physique qui nécessite l'utilisation du glycogène pour la contraction musculaire. Le cerveau active les médullosurrénales par voie nerveuse pour produire de l'adrénaline. Si le taux de glucose dans le sang est bas (hypoglycémie), le pancréas sécrète du glucagon.
- Ces deux hormones agissent sur les muscles et sur le foie en activant la synthèse de l'AMP cyclique. Ce dernier est un activateur de la protéine kinase A qui est capable de phosphoryler la CREB (*cyclic AMP responsive element binding protein*). La CREB phosphorylée constitue un facteur trans-régulateur.
- Le facteur trans-régulateur (CREB-P) va dans le noyau des cellules se lier au DNA au niveau du promoteur de certains gènes qui ont un élément cis-régulateur spécifique : le CRE (*cyclic AMP responsive element*).
- La liaison du facteur trans-régulateur (CREB phosphorylée) sur la séquence de l'élément cis-régulateur (séquence TGACGTCA) va activer la transcription du gène en aval de ce promoteur, d'où une synthèse accrue de messager.
- Les messagers ainsi produits vont induire la synthèse d'enzymes appartenant à la voie de la glycogénolyse. L'augmentation du taux de ces enzymes dans les muscles va permettre la transformation du glycogène en énergie qui sera utilisée pour la contraction musculaire.

4.11 RNA polymérase II

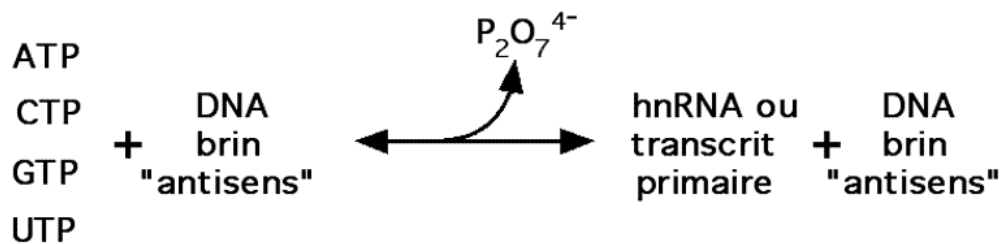
500000
10 sous-unités

2.7.7.6

RNA polymérase II

Facteurs TFIIA, TFIIIB, TFIIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH, TFIIJ,

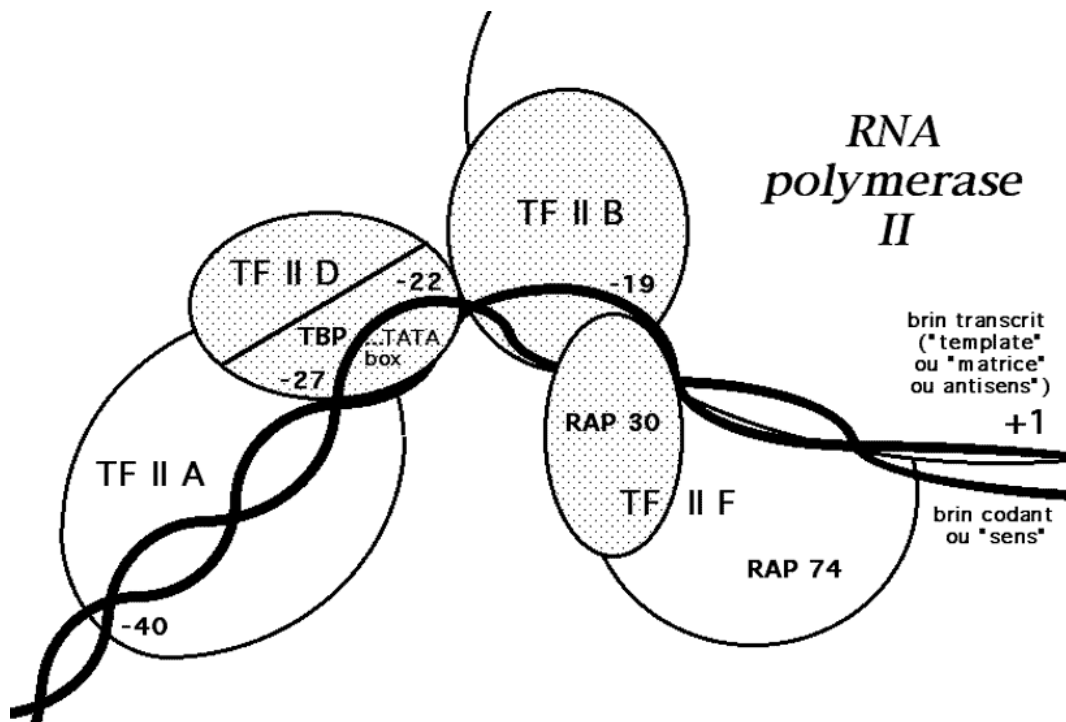
Mg⁺⁺



BM 27

- La RNA polymérase II est l'enzyme de la transcription des gènes exprimés sous forme de protéines. Elle est inhibée spécifiquement par un poison extrait de l'Amanite phalloïde, l' α -amanitine.
- Elle est présente dans tous les noyaux cellulaires. Sa masse moléculaire est de 500000 daltons pour 10 sous-unités.
- La transcription qu'elle catalyse nécessite des ribonucléosides triphosphates comme substrats (ATP, CTP, GTP et UTP), plusieurs cofacteurs protéiniques (*transcription factors* TFIIA à TFIIJ). L'énergie de la réaction est fournie par l'hydrolyse des liaisons riches en énergie des nucléosides triphosphates.

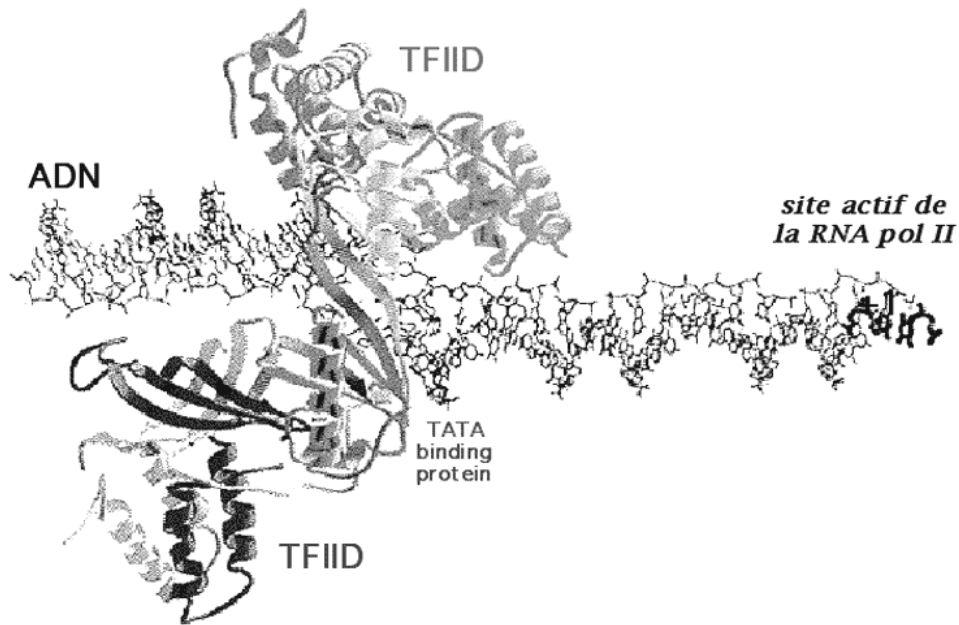
4.12 Initiation de la transcription



BM 28

- L'initiation de la transcription sur un promoteur humain implique plusieurs facteurs de transcription, connus sous les noms de TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF, TFIIF et TFIIF en plus de la RNA polymérase II elle-même.
- Au centre de ce mécanisme initial, il y a l'association de TBP, la sous-unité reconnaissant le DNA du facteur TFIID, avec la boîte TATA du promoteur. L'adjonction successive de TFIIB et de RAP30, petite sous-unité de TFIIIF, sont ensuite nécessaires pour la fixation de la polymérase et déterminent à la fois le brin transcrit et le sens de la transcription. A ce complexe DNA-TFIID-TFIIB-RAP30-polymérase II, s'ajoutent encore successivement la grande sous-unité de TFIIIF (RAP74), TFIIE et TFIIF. Alors la transcription peut commencer si les ribonucléosides substrats sont présents.
- Le complexe d'initiation de la transcription recouvre une séquence d'environ 100 nucléotides du brin antisens du DNA. TFIIF provoque l'ouverture et le déroulement partiel de la double hélice à cet endroit.
- La transcription commence à environ 22 nucléotides de la boîte TATA en direction opposée à celle des éléments GC-CAAT et se poursuit en remontant le brin antisens en direction de son extrémité 5'.
- La formation de ce complexe est activée ou inhibée par les facteurs trans-régulateurs liés aux séquences cis-régulatrices du même promoteur.

4.13 Liaison TFIID sur le DNA

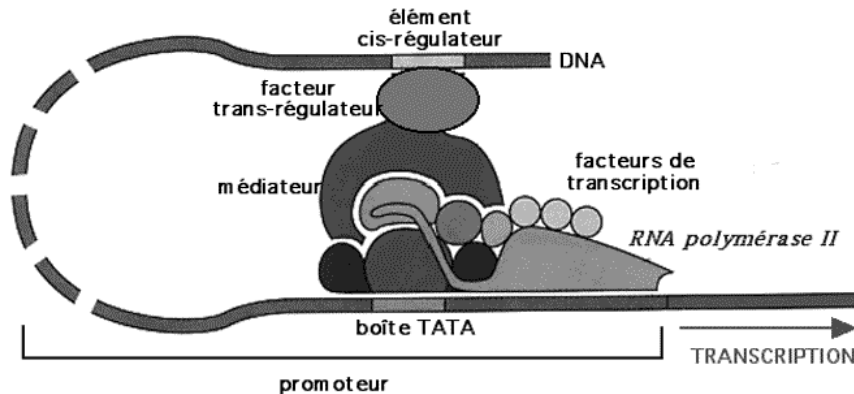


BM 28/1

- La fixation du facteur TFIID sur la boîte TATA est la première étape de la constitution du complexe d'initiation de la transcription.
- La boîte TATA est symétrique, c'est à dire qu'elle est identique sur les deux brins antiparallèles et complémentaires du DNA.
- La protéine TFIID se fixe sur le DNA, en reconnaissant l'élément TATA et déforme la double hélice de façon importante en se fixant.
- Cet ensemble va servir de point d'ancrage pour les autres facteurs d'initiation de la transcription.

4.14 Régulation de la RNA polymérase

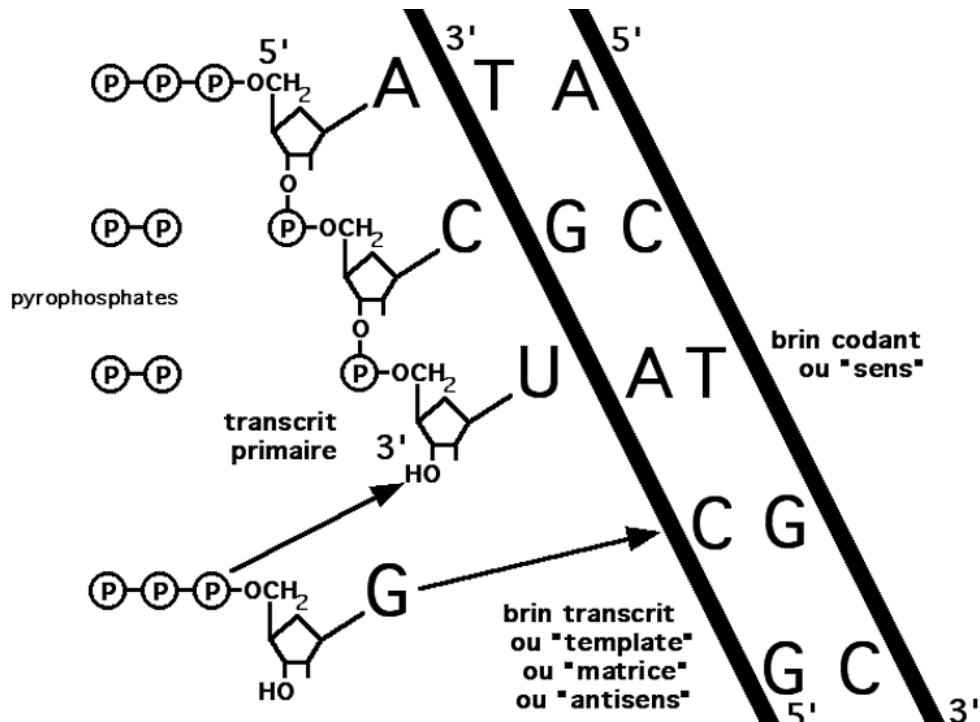
Régulation de la RNA polymérase



BM 28/2

- Les activateurs ou inhibiteurs de la transcription (facteurs trans-régulateurs) sont des protéines produites par d'autres gènes qui interviennent pour activer ou pour inhiber la RNA polymérase II et par suite induire ou réprimer l'expression du gène à transcrire.
- Ces facteurs trans-régulateurs se lient au DNA (*DNA binding proteins*) dans la région du gène située en amont de la partie transcrite. Les sites de fixation de ces facteurs trans-régulateurs sur le DNA sont des séquences spécifiques appelées éléments cis-régulateurs.
- Le couple élément cis-régulateur plus facteur trans-régulateur lié entre en contact avec le complexe d'initiation de la RNA polymérase par l'intermédiaire d'un ensemble de protéines appelé médiateur.
- La RNA polymérase peut donc démarrer la transcription lorsqu'elle est activée par les facteurs de transcription dont certains sont liés à ces éléments comme les boîtes TATA ou CAAT et lorsque par l'intermédiaire du médiateur elle reçoit un signal d'activation ou d'inhibition. Ce signal dépend de la présence d'un facteur trans-régulateur lié à un autre élément du promoteur. La liaison du régulateur et du médiateur nécessite un repliement du DNA du promoteur pour permettre la liaison de ces protéines.

4.15 Elongation de la transcription

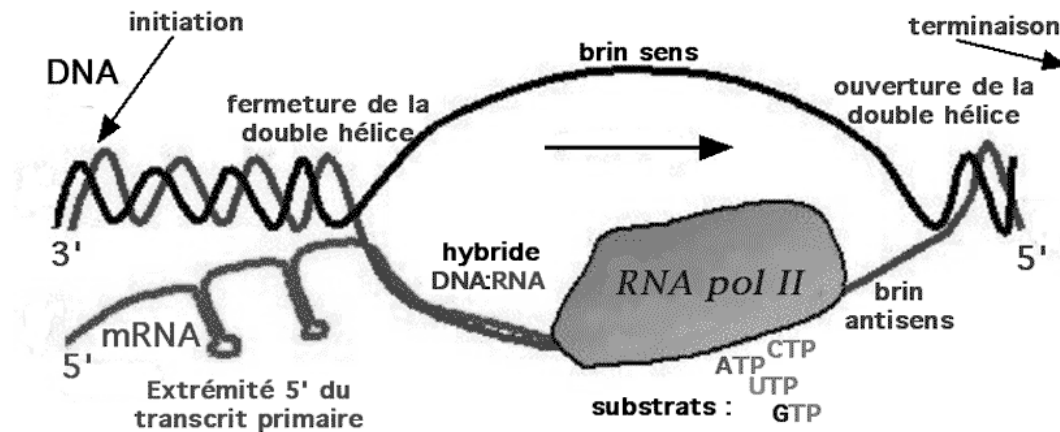


BM 29

- Chaque nucléoside triphosphate est choisi spécifiquement pour être complémentaire de la base du brin antisens qui va lui faire face. La liaison riche en énergie entre le premier phosphate estérifiant le carbone 5' du ribose et les deux autres phosphates est hydrolysée, libérant un pyrophosphate qui sera hydrolysé ensuite par une pyrophosphatase. Le phosphate restant est lié par une liaison ester au carbone 3' libre du dernier nucléotide du transcrit en cours de synthèse.
- La RNA polymérase construit un RNA hybridé avec le brin antisens du DNA, dont la séquence primaire est la copie du brin sens mais composée de ribonucléotides au lieu des désoxyribonucléotides et d'uracile à la place des thymines.
- Au cours de cette élongation la RNA polymérase II est accompagné d'une série de facteurs d'élongation qui modifient la chromatine pour permettre l'avancée de l'enzyme, empêchent la formation d'obstacles comme des épingles à cheveux ou facilitent l'avancée de la polycondensation.

4.16 Elongation de la transcription

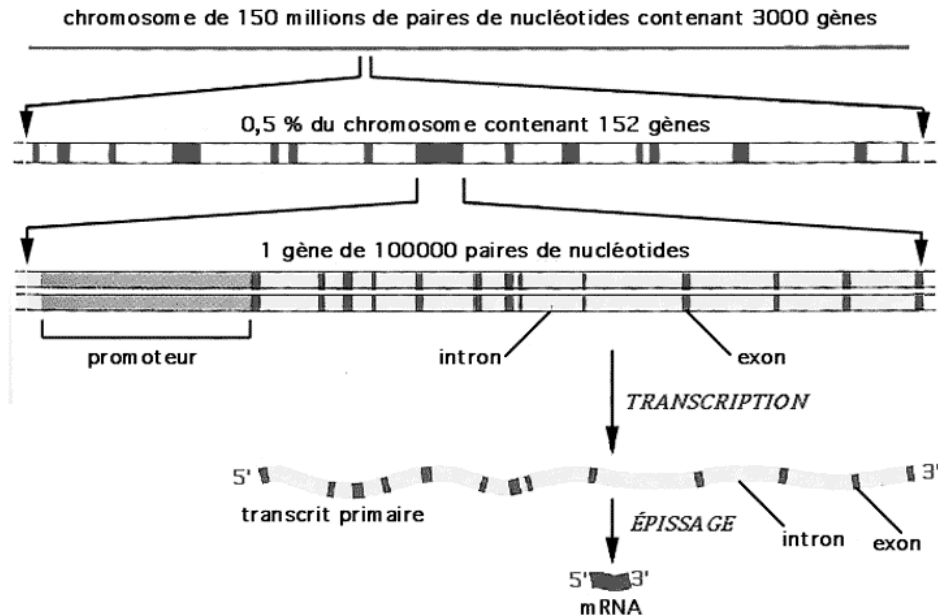
Elongation de la transcription



BM 29/1

- La transcription commence au point d'initiation (environ 25 nucléotides avant la boîte TATA sur le brin antisens) par l'hybridation et la condensation des premiers ribonucléotides du transcrit primaire (futur mRNA).
- La double hélice est ouverte en une boucle où se place la RNA polymérase II.
- Le transcrit primaire reste hybridé sur quelques nucléotides avec le brin antisens puis s'en détache pour permettre à la double hélice de se reformer après le passage de la polymérase. L'extrémité 5' du transcrit primaire libérée se condense en diverses structures secondaires (épingles à cheveux).
- Les substrats de la RNA polymérase sont les quatre ribonucléosides triphosphates.
- La polymérase lit le brin antisens en allant dans le sens 3' → 5'. Elle poursuit la synthèse du transcrit primaire en condensant les ribonucléotides jusqu'à ce qu'elle rencontre les signaux de terminaison.
- A la rencontre des signaux de terminaison, la polymérase se détache du DNA, libère le transcrit primaire et la double hélice se referme.

4.17 Discontinuité des gènes



BM 30

- Les molécules de DNA de chaque chromosome sont très longues : jusqu'à plusieurs centaines de millions de paires de nucléotides et contiennent plusieurs milliers de gènes. Chez l'homme, les gènes sont très dispersés et ne représentent que 10 % du DNA génomique total.
- Chaque gène comprend des régions qui contiennent les séquences codées qui seront traduites, les exons ; mais aussi, des régions de régulation comme le promoteur et des régions non traduites appelées introns qui séparent les exons. Un gène peut ne contenir qu'un seul exon et pas d'intron, mais il y a des gènes de plus de cent exons.
- Après la transcription le RNA produit de la RNA polymérase ou transcrit primaire contient encore les introns et les exons, mais pas le promoteur.
- Après l'excision des introns et l'épissage des exons, le messenger ne contient plus que les exons réunis en une seule séquence codante.

4.18 Exon

EXON

- **Partie de la séquence d'un gène transcrite et conservée dans la structure de l'acide ribonucléique messenger jusqu'à la traduction.**

BM 30/1

- Les exons sont des fragments de séquence primaire d'un gène qui seront copiés dans la structure primaire du RNA messenger, après l'épissage.
- Il existe des exons de longueur très variable : courts (34 nucléotides pour l'exon 1 de l'apoA-II) longs (7572 nucléotides pour l'exon 26 de l'apoB).
- Un exon code le plus souvent pour un domaine fonctionnel de la protéine ou une partie d'un tel domaine, de sorte que les protéines des eucaryotes formées de plusieurs domaines, sont codées par des gènes possédant au moins autant d'exons.
- Au cours de l'évolution le gène peut être modifié par la substitution, l'insertion ou la délétion d'un exon entier (conversion de gènes) ce qui modifie, apporte ou retire à la protéine un domaine fonctionnel en entier.

4.19 Exon 1

CCAAGGACCTCAGATCTAAAAGAATGAACCTCAAATA
TACCTGAAGTGTACCCCTTAGCCTCCACTAAGAGCT
GTACCCCTGCCTCTCACCCCATCACCATGAGTCTTC
CATGTGCTTGTCCTCTCCTCCCCATTTCTCCTCAACTT
GTTTATCCTCACATAATCCCTGCCCCACTGGCCCATC
CATAGTCCCTGTACCTGACAGGGGTGGGTAAACAGA
CAGGTATATAGCCCCTTCCTCTCCAGCCAGGGCAGGC
ACAGACACCAAGGACAGAGACGCTGGCTAGGTAAGAT
AAGGAGGCAAGATGTGTGAGCAGCATCAAAGAGGCC
TGGGCTTCAGTTGTGGAGAGGGAGAGAGCCAGGTTGG
AATGGGCAGCAGGTAGGGAGATCCCTGGGGAGGAGCT
GAAGCCATTTGGCTTCAGTGTCCCCAAACCCAC
CACCCTCTTCCTAGGCCGCCCTCCCCACTGTTACCAA
CATGAAGCTGCTCGCAGCAACTGTGCTACTCCTCACC
MetLysLeuLeuAlaAlaThrValLeuLeuLeuThr

BM 31

- Après la fixation de la RNA-polymérase sur la boîte TATA par l'intermédiaire du facteur TFIID, la transcription va commencer 23 nucléotides au delà de cette boîte.
- A ce point, la séquence du brin sens est 5'AGGCACAGA...3', celle du brin antisens est donc 3'TCCGTGTCT...5' (complémentaire et antiparallèle).
- En choisissant comme substrats les ribonucléotides complémentaires de ce brin antisens, la RNA-polymérase va composer 5'AGGCACAGA...3' qui sera le début de la séquence du RNA transcrit. Lorsque la polymérase rencontre un A sur le brin antisens, elle incorpore un nucléotide à Uracile dans le mRNA : 5'...GCUGGCUAG...3'.
- La séquence du RNA transcrit recopie donc celle du brin sens du DNA.
- La transcription se poursuit alors tout au long du brin antisens en incorporant 1329 nucléotides dans le RNA transcrit de l'apoA-II.

4.20 Fin de la transcription

GTCTTACTTTGAAAAGTCAAAGGAGCAGCTGACACCCCTG
sSerTyrPheGluLysSerLysGluGlnLeuThrProLeu
ATCAAGAAGGCTGGAACGGAAGTGGTAACTTCTTGAGCT
IleLysLysAlaGlyThrGluLeuValAsnPheLeuSerT
ATTCGTGGAAGTGGAACACAGCCTGCCACCCAGTGAAG
yrPheValGluLeuGlyThrGlnProAlaThrGlnStop
TGTCCAGACCATTGTCTTCCAACCCAGCTGGCCTCTAGA
ACACCCACTGGCCAGTCCTAGAGCTCCTGTCCCTACCCAC
TCTTTGCTACAATAAATGCTGAATGAATCCAGCTCTGAGC
CTGGTATGTTTGGGGGACTGGGAAAAGTAGGGGAGTAAGG
GAGGAGAAGAGGAAGGAAAAGGAAAAATCTGCTTCTAGAA
GGAGAGAGGTTTGTAGTGTGGAGGGGTGAAGAAAGGATTGA
AGACACAACCTGATGAAAATGACAGGATGAGGGTGCCGTGA
TTCTCCAAACCCAGAGTCTCCTACAGCCTGGGCACGACTC
TGCAGGTGAACACTAAGAGGGCTTTGCATTGCACAAGGAA

BM 32

- La transcription du gène de l'apoA-II se poursuit donc durant 1329 nucléotides.
- Vers la fin du gène des facteurs liés à la RNA-polymérase reconnaissent sur le brin antisens une séquence 3'-TTATTT-5' suivie dans la plupart des gènes d'un autre signal 3'-ATA-CAAAC-5' qui libèrent la RNA polymérase. La transcription s'arrête en effet peu après le premier signal et la fin du transcrit s'écrit 5'-AAUAAAUGCUGAAUGAAUCC-3'OH.
- La RNA-polymérase ayant libéré le DNA et le transcrit primaire qui contient la copie de l'information génétique qui va permettre l'expression du gène sous forme de protéine.

4.21 Modifications du transcrit

Modifications du transcrit

- **Coiffe : Me-G-ppp-5'**
- **Queue poly-A :**
3'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
- **Edition : CAA → UAA**
- **Excision - épissage :**
exon-intron-exon-intron-exon
exon-exon-exon

BM 33

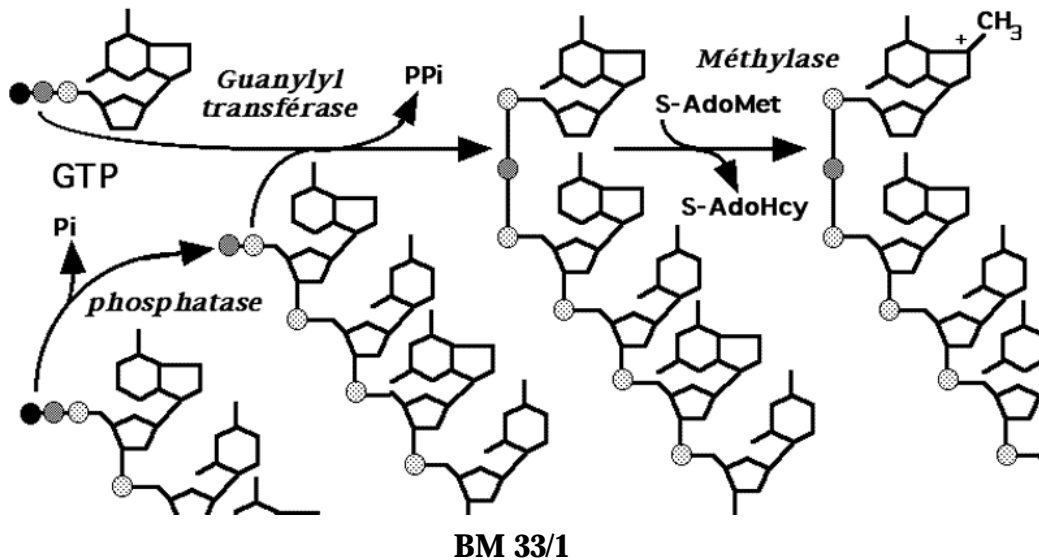
- **Chapeau :** une enzyme ajoute un nucléotide à Guanine sur les phosphates du Carbone 5' du premier nucléotide du transcrit et transfère des radicaux méthyl sur les premiers nucléotides. Ces modifications font un début commun à tous les transcrits primaires, précurseurs des RNA messagers.
- **Queue poly-A :** une enzyme coupe le transcrit environ 10 à 20 nucléotides au delà de la séquence AAUAAA et synthétise sur le Carbone 3' libre du dernier nucléotide du transcrit restant une longue chaîne de 500 à 2000 nucléotides à Adénine polycondensés.
- **Edition :** Des enzymes peuvent « éditer » (au sens anglais du terme) la structure primaire du transcrit en modifiant certaines bases (exemple : C→U par une cytosine désaminase spécifique dans les apolipoprotéines B).
- **Excision - épissage :** les parties non codantes de la structure primaire du transcrit sont coupées et les parties codantes réassemblées.

4.22 Enzyme coiffante

68000
Multienzyme
2.7.7.50

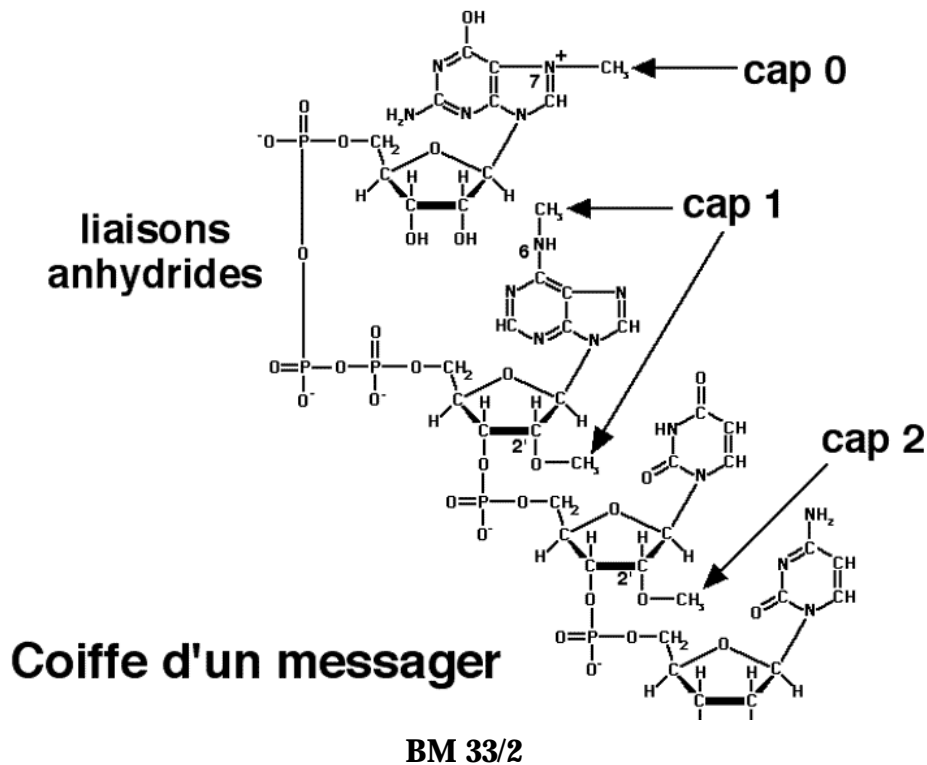
Enzyme coiffante

57000
Sous-unité
2.1.1.56



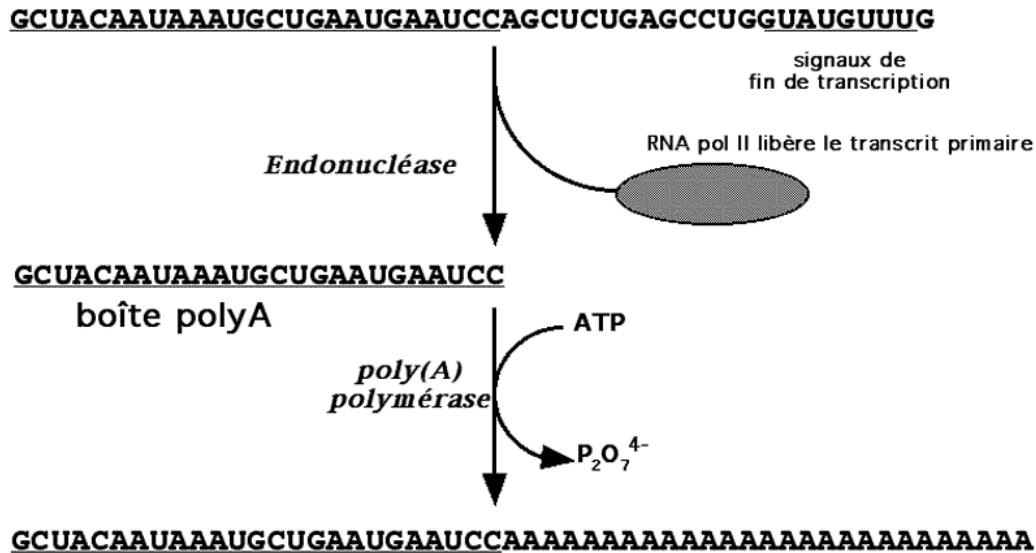
- Lorsque l'élongation du transcrit primaire commence, l'extrémité COOH terminale de la polymérase est phosphorylée. Cette phosphorylation permet de libérer les protéines du complexe d'initiation et de commencer aussitôt les modifications sur la partie du RNA qui est déjà transcrite.
- Pour ajouter la coiffe, un complexe multienzymatique exerce trois activités :
 1. l'hydrolyse du phosphate γ du nucléotide 5' terminal du transcrit primaire
 2. le transfert sur le phosphate β restant d'un guanylate à partir d'un GTP
 3. la méthylation de ce guanylate sur l'azote n°7.
- Les deux premières activités sont catalysées par une protéine de 68 kDa et la méthylation par une autre sous-unité de 57 kDa.

4.23 Coiffe d'un messenger



- Les RNA messagers sont détruits par des ribonucléases dans le cytoplasme. Leur hydrolyse libère des nucléotides qui seront réemployés à la synthèse de nouveaux acides nucléiques.
- Pour protéger les RNA messagers de ce catabolisme, une structure particulière dissimule l'extrémité 5' terminale de ces RNA aux exonucléases spécifiques de cette partie du RNA. Cette structure est appelée coiffe du messenger (cap).
- Au minimum, il y a fixation d'un GMP sur le deuxième phosphate du nucléoside triphosphate qui se trouve à l'extrémité 5' du transcrit. Ce GMP est méthylé sur son azote n°7.
- Si le nucléotide initial comprend une adénine celle-ci peut être méthylée sur l'azote n°6. Les riboses des nucléotides initiaux sont quelquefois méthylés sur l'oxygène de la fonction alcool en 2'.

4.24 Queue polyA



BM 33/3

- Des signaux de fin de transcription se retrouvent à la fin de la plupart des gènes des Mammifères : TATGTTTC.
- A la lecture de ces signaux la RNA polymérase II s'arrête de transcrire et quitte le DNA en libérant le transcrit primaire.
- Aussitôt une endonucléase coupe la fin du transcrit environ une quinzaine de nucléotides après un autre signal : AAUAAA dit boîte de polyadénylation (ou boîte polyA).
- Sur l'extrémité 3'OH de cette coupure, une polyA polymérase va condenser un grand nombre de nucléotides, tous à adénine. Le transcrit primaire se trouve allongé d'une « queue poly(A) » de plus de mille nucléotides.
- Cette queue polyA est indispensable à la maturation et à l'activité du RNA messenger qui la porte. Elle sera lentement digérée par les exonucléases du cytoplasme lorsque le messenger sera actif. Lorsqu'elle sera réduite à quelques centaines de nucléotides le messenger vieilli sera détruit totalement pour être remplacé par un messenger neuf.

4.25 Le transcrit primaire

capAGGCACAGACACCAAGGACAGAGACGCUGGCUAGGUAAAGUAAGGAGGCAAGAUGUGU
GAGCAGCAUCCAAAGAGGCCUGGGCUUCAGUUGUGGAGAGGGAGAGAGCCAGGUUGGAAUG
GGCAGCAGGUAGGGAGAUCUCCUGGGGAGGAGCUGAAGCCC AUUUGGCUUCAGUGUCCCCA
AACCCACCACCCUCUUCUAGGCCGCCUCCACUGUUACC AAC AUGAAGCUGCUCGC
AGCAACUGUGCUACUCCUACCAUCUGCAGCCUUGAAGGUGGGUGUGAU AUGGAGAGGGGG
CCAAAAGGGAGAAUGUGCUGGUGGUUAUAGCUACCUAUCUGCCUGUCUUAU AUCCAGG
UCUGGCAACC AAAGGGCUC AAAAGGAAGAUCAUCCUCUAAAAGCCAGAAAAGCCC AUC
CAAAGAUCUGGCUGGAUACUUUUUGGGGAGGGGGCAGAGAGCUGGGGUGGGUACUGGCAG
AGGUAUGGCAGGAGGCCAAGAUUCACUGCUGUGGACCCAGCUGAAAAGAGUGUGUGUGU
GUGUGUGUGUGUGUGUGUGGGCAGGAGCUUUGGUUCGGAGACAGGCCAAAGGAGCC AUGU
GUGGAGAGCCUAGUUUCUCAGUACUCCAGACCGUGACUGACUAUGGCAAGGACUGAUGG
AGAAGGUCAAGAGCCCAGAGCUUCAGGCCGAGGCCAAGUAAGUCUCAGGGCAAGGGGUUCA
GGGGCUGUGGAACUGUGGAGAGAAAGAAAGGAAGAUGAGAGGUCCCACAGAAGUCUGAAC
CAGGGGUGGGGAUUAGGGCAGAUUAGGCUUAAAUUGCAGAGAAAAGUAUUUCAACCCA
AAGAUCACACGUCUCUAGAUAGAGAGGAACAGCAAGAACUGGGCCUUGAAUUUCAGUC
UCUAGAGUCUGUCCUCUACCUAGC AAAGGUCUUGACUCUAUCCUACCUAGGGGUUUGC
CAUGC GAUGGACCAGGCACUAGAUUUUGGGGACCUGAGUCAGUCUCUGACCUCCACC
ACCACCAAGGCCUCCAGUGCCUAGGGUCCUCAGAUUAAACUCUAUCCUCCUACCUA
UCCAGGUCUUAUUUGAAAAGUCAAGGAGCAGCUGACACCCUGAUAAGAAGGUGGAA
CGGAACUGGUUAAACUUCUUGAGCUAUUUCUGGAACUUGGAACACAGCCUGCCACCCAGUG
AAGUGUCCAGACC AUUGUCUCC AACCCAGCUGGCCUCUAGAACACCCACUGGCCAGUCC
UAGAGCUCCUGUCCUACCCACUCUUUGCUACAUAUAAUGCUGAAUGAAUCCAAAAAAAAA
AAA

BM 34

- Le transcrit primaire de l'apoA-II contenait donc 1329 nucléotides.
- Il a reçu une coiffe (cap), GMP méthylé qui se fixe sur le phosphate β de l'ATP en 5' du transcrit primaire.
- Il reçoit une queue poly-A synthétisée en 3' après la fin du transcrit.
- Trois introns vont être excisés : ils seront reconnus par
 - un site donneur GU en 5' de chaque intron, suivi d'une séquence riche en purines
 - un site receveur AG en 3' de chaque intron, précédé d'une séquence riche en pyrimidines.
- Après cette maturation le transcrit primaire devenu RNA messager sera transporté vers le cytoplasme pour la traduction.

4.26 Excision - épissage

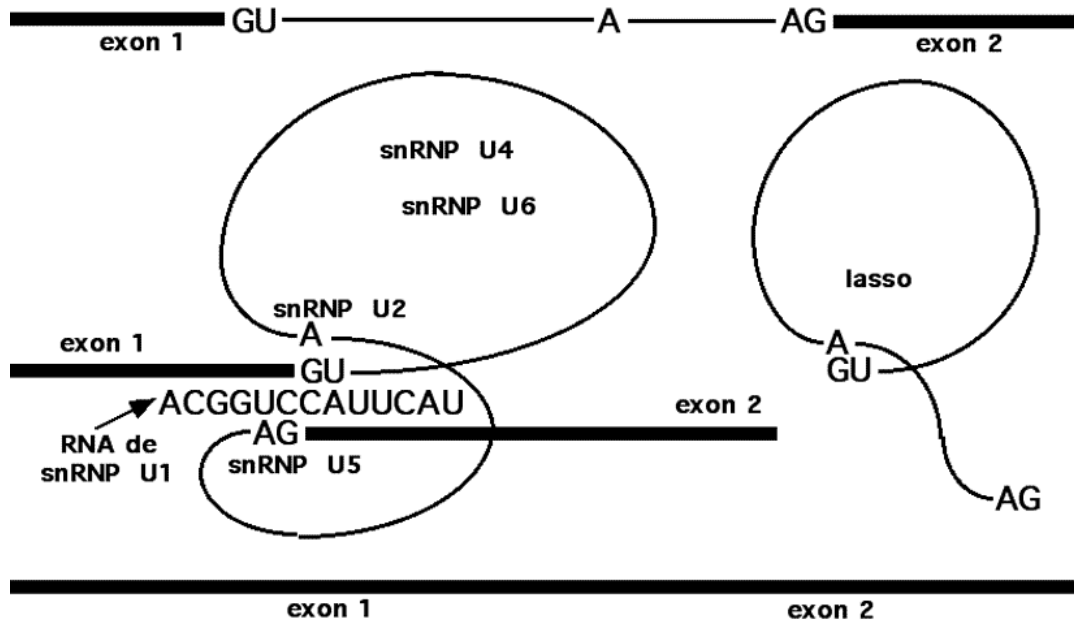
EXCISION - EPISSAGE

- **Etape de la maturation des acides ribonucléiques messagers, où les introns sont coupés de la structure primaire et les exons liés les uns à la suite des autres.**

BM 35

- Les introns, parties non codantes des gènes des eucaryotes, sont coupés (excision) de la structure primaire des RNA au cours de la maturation des messagers.
- Les exons, parties codantes, sont ensuite liés entre eux bout à bout (épissage), pour établir la séquence primaire du RNA messenger.
- L'excision et l'épissage représentent donc l'action d'enzymes et de ribozymes qui catalysent la coupure du RNA (endoribonucléase) et la fermeture de la brèche (RNA ligase).
- L'épissage peut être alternatif, c'est à dire peut conduire à plusieurs structures de RNAm : les RNAm alternatifs ont chacun en propre certains exons ainsi que des exons en commun.

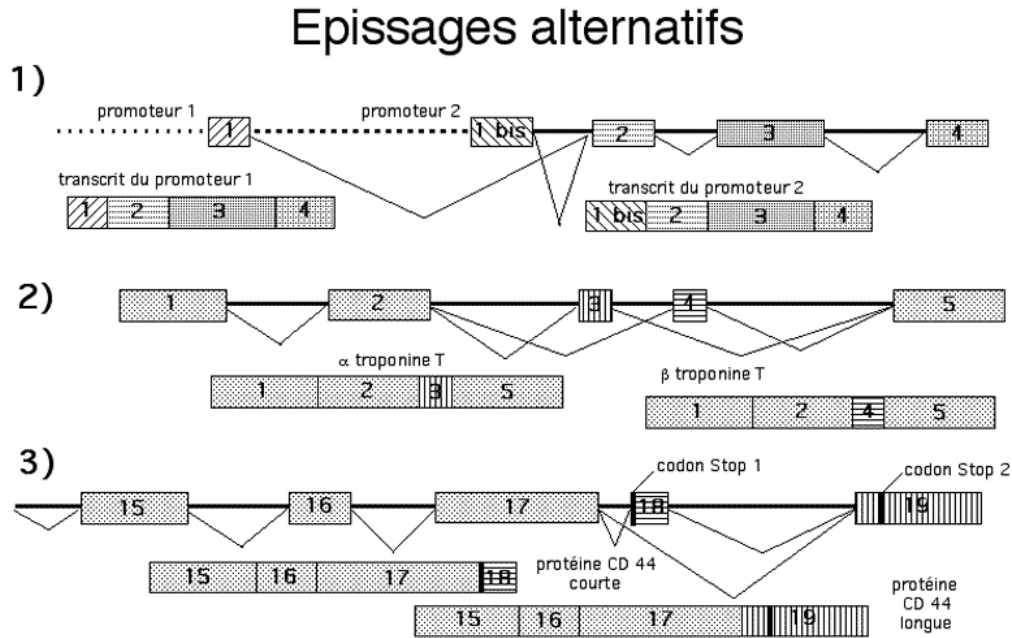
4.27 Formation du lasso



BM 36

- L'excision des introns et l'épissage des exons est l'étape la plus importante de la maturation du transcrit dans le noyau cellulaire.
- Elle fait appel à des facteurs spécifiques : ribonucléoprotéines contenant des petits RNA (snRNP), ribozymes (RNA ayant des propriétés catalytiques), enzymes spécifiques (maturases)...
- La structure secondaire du transcrit met en contact trois séquences de l'intron : la séquence du début de l'intron (extrémité 5' ou site donneur), la séquence de la fin de l'intron (extrémité 3' ou site accepteur) et un nucléotide à adénine (A du branchement) environ 40 nucléotides avant le site receveur.
- Le site donneur commence habituellement par un nucléotide à guanine dont le phosphate est détaché de l'exon précédent pour être transféré sur le carbone 2' de l'A du branchement. Le dernier nucléotide du site accepteur, aussi une guanine, est détaché de l'exon suivant, dont le premier nucléotide est lié par son phosphate 5' au carbone 3' du dernier nucléotide de l'exon précédent.
- L'intron, libéré sous forme de lasso, est détruit par des nucléases. Le transcrit perd successivement tous ses introns et les exons épissés constituent la séquence codante du messager.

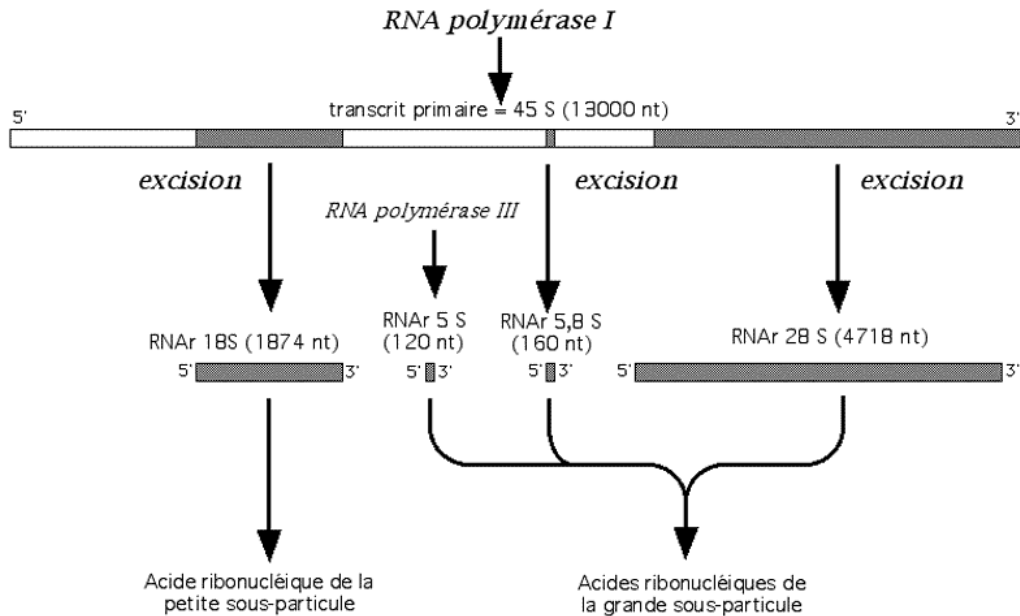
4.28 Epissages alternatifs



BM 36/1

- Du fait de la présence de protéines régulatrices sur le transcrit primaire, l'épissage peut quelquefois se faire de façon différente d'une cellule à l'autre.
- Il est possible de garder alternativement soit l'exon 3 soit l'exon 4 du gène de la troponine T (exemple n°2). Si l'exon 3 est conservé on obtient l' α -troponine T et si l'exon 4 est conservé on obtient la β -troponine T. Cet épissage alternatif est à l'origine de nombreuses protéines isoformes.
- Il est aussi possible (exemple n°1) de faire dépendre l'expression d'un gène de deux promoteurs différents, répondant à des régulations différentes. Chacun de ces promoteurs est lié à un exon 1 ou 1bis qui seront épissés alternativement avec la suite du transcrit.
- On peut encore (exemple n°3) avoir plusieurs exons à la fin du gène contenant des codons Stop en phase. Dans ce cas l'épissage alternatif donnera des protéines de longueurs différentes.

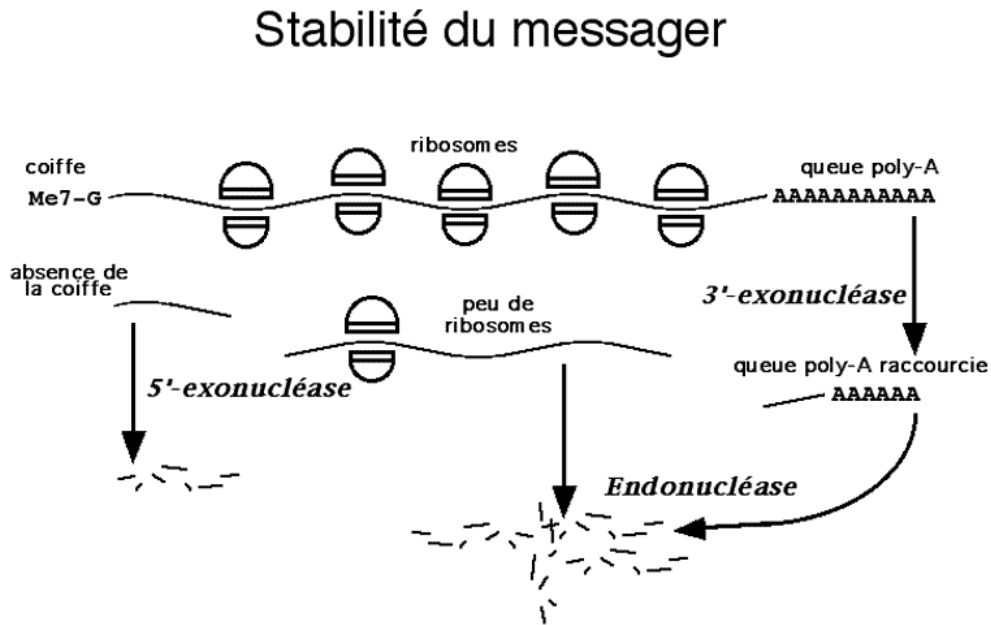
4.29 Maturation des RNA ribosomiques



BM 36/2

- Pour transcrire les RNA des ribosomes, la RNA polymérase I synthétise un transcrit primaire de 13000 nucléotides (nt), et la RNA polymérase III synthétise le petit rRNA 5 S de 120 nt.
- La maturation du transcrit primaire précurseur des rRNA se fait par excision de trois fragments : le rRNA 28 S de 4718 nt, le 18 S de 1874 nt et le 5,8 S de 160 nt.
- Les rRNA 28 S, 5,8 S et 5 S vont s'associer avec 49 protéines pour former la grande sous-particule. Le rRNA 18 S formera la petite sous-particule avec 33 protéines.

4.30 Stabilité du messager



BM 36/3

- L'acide ribonucléique messager est une copie de travail du gène destiné à diriger la traduction catalysée par les ribosomes.
- Son extrémité 5'-phosphate est protégée par la coiffe sans laquelle le RNA est dégradé dès la transcription par des 5' exonucléases.
- Son extrémité 3'-OH est constituée d'une longue queue poly(A) qui est lentement digérée par des 3' exonucléases. Lorsque cette hydrolyse est avancée, le messenger est alors inapte à la traduction et sera détruit par les endonucléases.
- Les messagers qui portent peu de ribosomes (parce que l'initiation de la traduction est ralentie ou inhibée) sont détruits directement par les endonucléases.
- Certains messagers ont une durée de vie courte : beaucoup de ceux qui interviennent dans les mécanismes post-prandiaux (après les repas) ont une durée de vie de l'ordre de 2 heures et doivent être entièrement resynthétisés à chaque repas.
- D'autres messagers, dans le système nerveux central par exemple, sont complètement stables durant des années.

4.31 Messenger

cap-AGGCACAGACACCAAGGACAGAGACGCUGGCUAGGCCGCCUCCC
CACUGUUACCAACAUGAAGCUGCUCGCAGCAACUGUGCUACUCCUACC
MetLysLeuLeuAlaAlaThrValLeuLeuLeuThr
AUCUGCAGCCUUGAAGGAGCUUUGGUUCGGAGACAGGCAAAGGAGCCAU
IleCysSerLeuGluGlyAlaLeuValArgArgGlnAlaLysGluProC
GUGUGGAGAGCCUAGUUUCAGUACUUCAGACCGUGACUGACUAUGG
ysValGluSerLeuValSerGlnTyrPheGlnThrValThrAspTyrGl
CAAGGACCUGAUGGAGAAGGUCAAGAGCCAGAGCUUCAGGCCGAGGCC
yLysAspLeuMetGluLysValLysSerProGluLeuGlnAlaGluAla
AAGUCUUACUUUGAAAAGUCAAGGAGCAGCUGACACCCUGAUCAAGA
LysSerTyrPheGluLysSerLysGluGlnLeuThrProLeuIleLysL
AGGCUGGAACGGAACUGGUUAAUCUUCUUGAGCUAUUUCUGGAAUCUUG
ysAlaGlyThrGluLeuValAsnPheLeuSerTyrPheValGluLeuGl
AACACAGCCUGCCACCCAGUGAAGUGUCCAGACCAUUGUCUCCAACCC
yThrGlnProAlaThrGlnStop
CAGCUGGCCUCUAGAACACCCACUGGCCAGUCCUAGAGCUCCUGUCCCU
ACCCACUCUUUGCUCACAAUAAAUGCUGAAUGAAUCCAAAAAAAAAAAAA
AA
AA

BM 37

- Le RNA messenger comprend plusieurs séquences :
 - une séquence 5' non-codante, qui ne sera pas traduite, qui correspond à l'exon 1 et à une partie de l'exon 2 dans le gène de l'apoA-II ;
 - un codon AUG qui fixe le tRNA de la méthionine initiale ;
 - des séquences de codons pour incorporer les acides aminés du signal-peptide (en vert) et du propeptide (soulignée) ;
 - la séquence des codons dont les acides aminés formeront la séquence primaire de la protéine ;
 - le codon de terminaison (ici, UGA) ;
 - une séquence 3' non-traduite qui s'achève par la queue poly-A.
- Sur la séquence 5' non-traduite, va se construire le complexe d'initiation de la traduction où les ribosomes vont s'assembler successivement pour commencer la traduction.

Chapitre 5

La traduction

5.1 Traduction

TRADUCTION

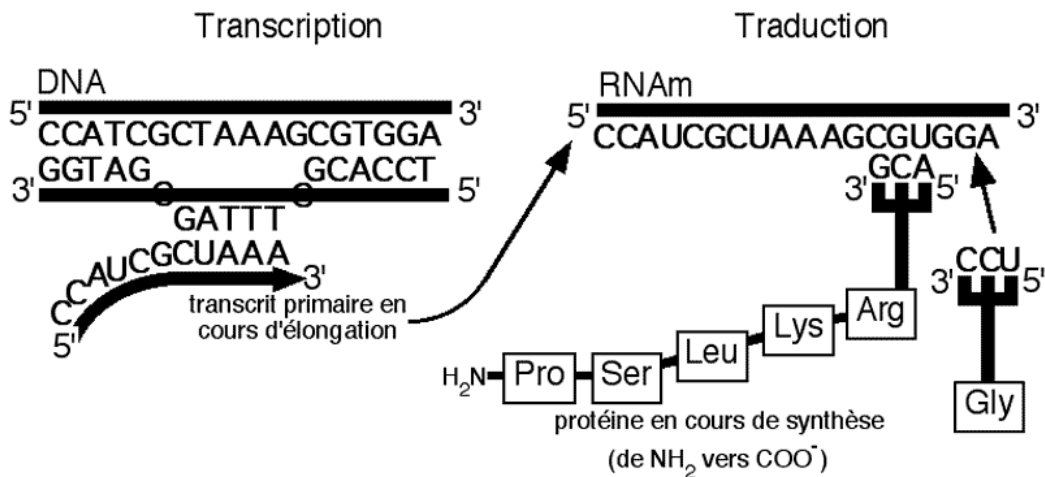
- **Lecture d'un RNA-messager par des ribosomes qui synthétisent des protéines dont la structure primaire est déterminée par celle de ce RNA-messager.**

BM 38

- L'expression du génome aboutit à la synthèse dans les cellules de macromolécules acides nucléiques et protéines, dont la structure primaire est déterminée par celle du DNA.
- Cette expression se fait par deux mécanismes principaux :
 - la structure primaire du DNA s'exprime d'abord par la synthèse d'acides ribonucléiques dont la structure primaire est parallèle à celle du DNA. C'est la transcription.
 - la structure transcrite sur certains RNA, dits « messagers », s'exprime enfin par la synthèse de protéines dont la structure primaire traduit en acides aminés l'information portée par la structure primaire du DNA. C'est la traduction.
- La traduction est faite dans le cytoplasme des cellules :
 - soit pour libérer des protéines cytoplasmiques,
 - soit pour conduire ces protéines dans les membranes ou les organites de la cellule (reticulum endoplasmique, appareil de Golgi, membrane plasmique, lysosomes, mitochondries, noyau, etc...),
 - soit pour excréter ces protéines à travers les membranes vers l'extérieur de la cellule.

5.2 Expression d'un gène

Expression d'un gène



BM 23/1

- L'expression d'un gène est une suite de synthèses chimiques et de réactions aboutissant à la production d'un acide ribonucléique ou d'une protéine.
- Dans un premier temps a lieu la synthèse d'un acide ribonucléique, dont la séquence est complémentaire d'un des deux brins du gène donc identique à celle de l'autre brin : c'est la transcription.
- La séquence de l'acide ribonucléique est identique à celle du brin sens et orientée dans le même sens. Elle se construit de 5' vers 3' en complémentarité de celle qui est « lue » sur le brin antisens.
- Après des réactions de maturation le transcrit primaire (RNA) devient RNA messager (mRNA) et sort du noyau vers le cytoplasme.
- Dans le second temps, le RNA messager est « lu » par groupe de trois nucléotides (lettres) grâce à un RNA complémentaire qui porte l'acide aminé correspondant.
- La « lecture » du mRNA se fait de 5' vers 3' et la synthèse de la protéine se fait en même temps de l'extrémité NH₂ terminale vers l'extrémité COOH terminale.
- Après des réactions de maturation, la protéine « mature » est prête à remplir sa fonction dans la cellule.

5.3 Signifiants

Signifiants					
A	C	AA	AC	CA	CC
G	U	AG	AU	CG	CU
		GA	GC	UA	UC
		GG	GU	UG	UU

AAA	AAC	ACA	ACC	CAA	CAC	CCA	CCC
AAG	AAU	ACG	ACU	CAG	CAU	CCG	CCU
AGA	AGC	AUA	AUC	CGA	CGC	CUA	CUC
AGG	AGU	AUG	AUU	CGG	CGU	CUG	CUU
GAA	GAC	GCA	GCC	UAA	UAC	UCA	UCC
GAG	GAU	GCG	GCU	UAG	UAU	UCG	UCU
GGA	GGC	GUA	GUC	UGA	UGC	UUA	UUC
GGG	GGU	GUG	GUU	UGG	UGU	UUG	UUU

Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	STOP
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

BM 39

- Le « langage » nucléique s'écrit avec 4 lettres.
- Le « langage » protéine s'écrit avec 20 termes correspondant aux 20 acides aminés, plus des ponctuations de début et de fin de message.
- Si une lettre nucléique se traduisait par un acide aminé, il ne pourrait y avoir que 4 acides aminés.
- En groupant les lettres nucléiques en « mots » de 2 lettres on pourrait avoir 16 mots, mais cela ne permettrait de coder que 16 acides aminés.
- En groupant les lettres nucléiques en « mots » de 3 lettres on peut avoir 64 mots, ce qui permet d'exprimer les 20 acides aminés et des ponctuations.
- Le code génétique est donc fondé sur des mots de trois lettres : les codons.
- Il y a plus de codons dans le code génétique que d'acides aminés et de ponctuations dans les protéines, il y aura donc plusieurs codons traduits par le même acide aminé (homonymes). Ces homonymies représentent une perte d'information entre le langage nucléique (64 signifiants) et le langage protéique (21 signifiants), c'est pour cela qu'on dit que le code génétique est dégénéré.

5.4 Codon

CODON

- **Ensemble de trois nucléotides de la séquence d'un acide nucléique portant l'information génétique permettant l'incorporation d'un acide aminé dans la séquence primaire d'une protéine.**

BM 39/1

- La liaison de l'acide ribonucléique de transfert (tRNA) avec l'acide ribonucléique messenger (mRNA) porteur de l'information, se fait par complémentarité entre 3 nucléotides de chacun de ces deux RNA. Les 3 nucléotides du mRNA constituent un codon et les 3 nucléotides du tRNA un anticodon. Au cours de la traduction l'anticodon et le codon se lient de manière antiparallèle, et l'acide aminé porté par le tRNA est incorporé à la protéine en cours de synthèse.
- La séquence primaire du mRNA est donc traduite par groupes de 3 nucléotides (codons). Un nucléotide du mRNA au cours de la traduction peut se trouver en position 1, 2 ou 3 dans un codon si le nombre de nucléotides qui le séparent du codon d'initiation AUG est ou n'est pas un multiple de 3. Cette position porte le nom de cadre de lecture.

5.5 Code génétique

1 ^{er} nucléotide	2 ^{ème} nucléotide				3 ^{ème} nucléotide
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

BM 40

- La séquence codante est une suite de codons dont chacun permet d'incorporer spécifiquement un acide aminé dans la synthèse d'une protéine.
- Le code génétique est le même pour tous les êtres vivants de la biosphère (universel). Il existe quelques variations (codons propres à la biosynthèse des protéines dans les mitochondries).
- Le code génétique comporte 61 codons pour signifier les 20 acides aminés qui participent à la synthèse des protéines : chaque acide aminé peut être codé par plusieurs codons (de un à six) qui diffèrent en général par leur troisième nucléotide. On dit que le code est dégénéré.

5.6 Code génétique

1er nucléotide	2ème nucléotide				3ème nucléotide
	U	C	A	G	
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	C
	Leu (L)	Ser (S)	Stop	Stop	A
	Leu (L)	Ser (S)	Stop	Trp (W)	G
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	U
	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	C
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	A
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	G
A	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	U
	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	C
	Ile (I)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	A
	Met (M)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	G
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	U
	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	C
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	A
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	G

BM 40/1

- Le code génétique est le fruit d'une longue évolution et sa disposition n'est pas due au hasard. Les correspondances entre les codons et les acides aminés ont été sélectionnées pour que les changements de bases aient le moins d'effet possible sur la protéine exprimée.
- Ainsi, tous les codons dont la deuxième lettre est un U correspondent à des acides aminés hydrophobes, donc ayant des propriétés physiques proches.
- De même, les acides aminés acides correspondent aux codons commençant par GA, de telle sorte que le changement de la troisième base ne fera pas disparaître la charge anionique du radical.
- Le codon le plus proche des codons Stop est celui du tryptophane. Un changement de chacun ou des deux G engendre un codon Stop et donc un arrêt de la traduction. Mais ce codon correspond à l'acide aminé le plus rare des protéines habituellement traduites.

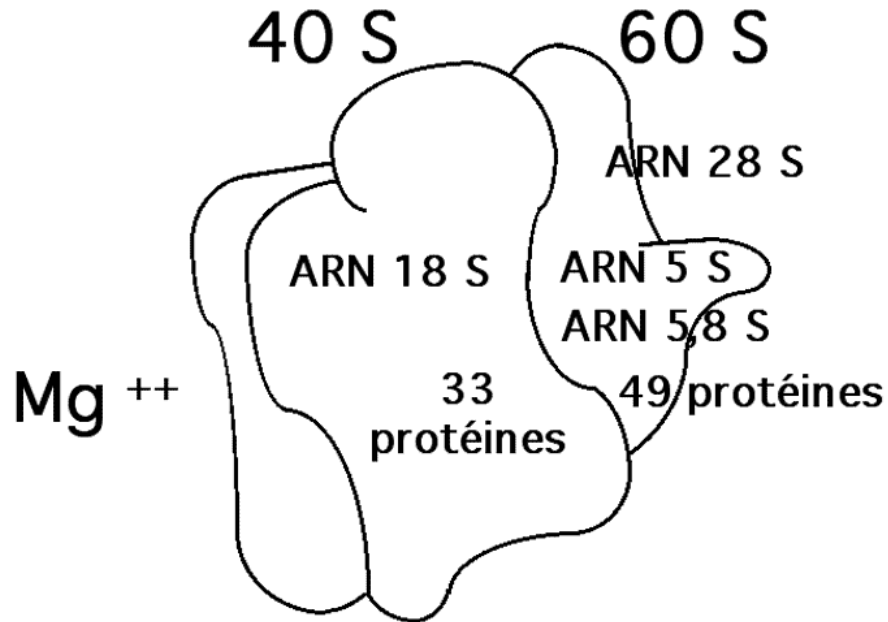
5.7 Code dégénéré

Code dégénéré	
Arg = CGA, CGC, CGG, CGU (CGN) AGA, AGG (AGR)	Ile = AUA, AUC, AUU (AUH) STOP = UAA, UAG, UGA (UGH)
Leu = CUA, CUC, CUG, CUU, (CUN) UUA, UUG (UUR)	Asn = AAC, AAU (AAY)
Ser = UCA, UCC, UCG, UCU (UCN) AGC, AGU (AGY)	Asp = GAC, GAU (GAY)
Ala = GCA, GCC, GCG, GCU (GCN)	Cys = UGC, UGU (UGY)
Gly = GGA, GGC, GGG, GGU (GGN)	His = CAC, CAU (CAY)
Pro = CCA, CCC, CCG, CCU (CCN)	Phe = UUC, UUU (UUY)
Thr = ACA, ACC, ACG, ACU (ACN)	Tyr = UAC, UAU (UAY)
Val = GUA, GUC, GUG, GUU (GUN)	Gln = CAA, CAG (CAR)
	Glu = GAA, GAG (GAR)
	Lys = AAA, AAG (AAR)
	Met = AUG
	Trp = UGG

BM 40/2

- En écrivant le code génétique dans l'autre sens, de l'acide aminé vers les codons, on montre que beaucoup d'acides aminés ont des codons homonymes.
- Certains ont six codons différents, d'autres quatre, trois ou deux.
- Ces codons homonymes ne sont pas employés au hasard parce que les tRNA correspondants n'existent pas dans toutes les cellules aux mêmes concentrations. De sorte que certains codons auront moins de chances de s'exprimer dans les tissus où le tRNA correspondant est rare.
- Il existe de nombreux tRNA dont l'anticodon ne se lie pas de façon spécifique avec la troisième base du codon. Cette base est donc reconnue moins spécifiquement ou pas du tout, ce qui explique la dégénérescence habituelle de cette troisième lettre.

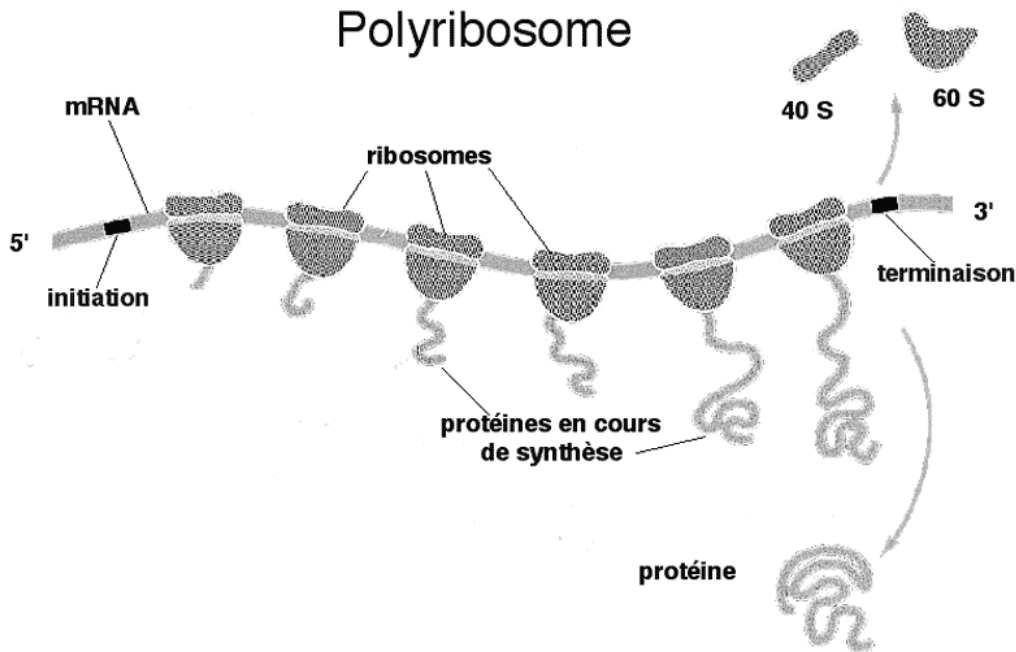
5.8 Ribosome eucaryote



BM 41

- Les ribosomes du cytoplasme des cellules eucaryotes sont des complexes multienzymatiques qui associent 82 chaînes d'acides aminés et 4 acides ribonucléiques. Ces molécules sont associées entre elles pour former deux particules distinctes : la sous-unité 60S (*Large* = 2800000 daltons) et la sous-unité 40S (*Small* = 1400000 daltons) qui peuvent se dissocier facilement.
- Les acides ribonucléiques ribosomiaux et les protéines ont des sites de fixation pour la séquence du messenger, pour les RNA de transfert qui portent l'acide aminé à incorporer (site A) et le peptide en cours de synthèse (site P), un site catalytique pour former les liaisons peptidiques, des sites de fixation pour les cofacteurs protéiques de l'initiation (eIF2, eIF3), de l'élongation et de la terminaison et des sites de régulation (protéine S6).

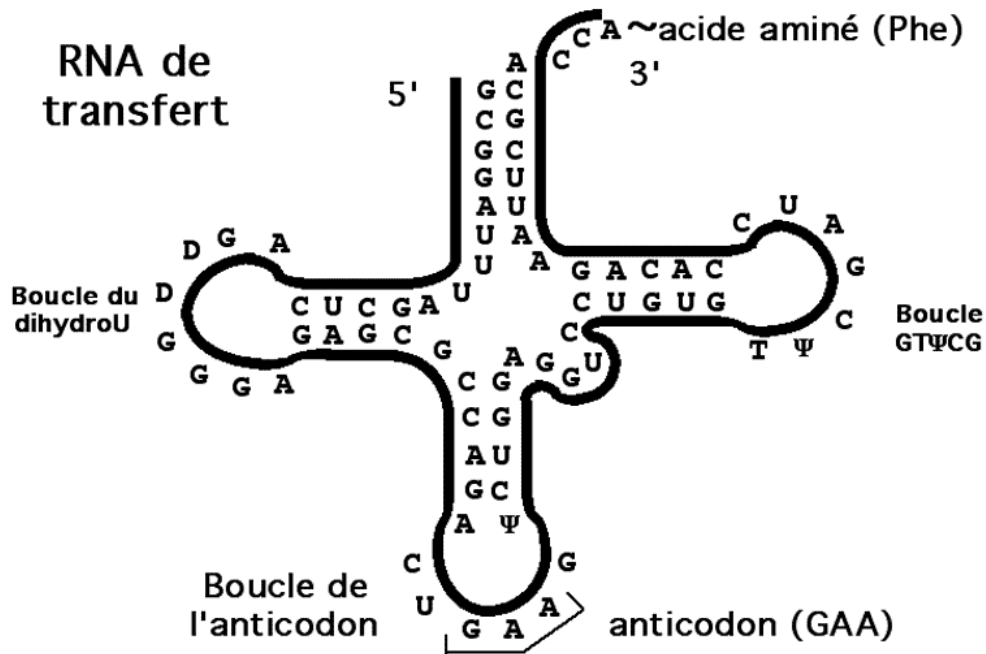
5.9 Polyribosome



BM 42/1

- Sur le même messager plusieurs ribosomes effectuent la traduction de la même protéine les uns après les autres : le tout constitue un polyribosome.
- L'initiation est un phénomène permanent à l'extrémité 5' d'un RNA messager et les ribosomes se succèdent sur le messager à raison d'un tous les 100 nucléotides environ. Le premier acide aminé incorporé constitue l'extrémité NH₂ terminale de la protéine.
- A l'extrémité 3', en arrivant au codon de terminaison, les sous-particules du ribosome se séparent et libèrent la protéine synthétisée. Le dernier acide aminé incorporé constitue l'extrémité COOH terminale de la protéine.
- Les polyribosomes présentent un aspect différent selon la régulation des différentes étapes de la traduction. Plus l'initiation est active plus les ribosomes sont nombreux sur le messager. Si l'élongation est lente, les ribosomes vont mettre plus de temps à lire la séquence codante. Une activation brutale de la terminaison dissocie tous les ribosomes du messager. De nombreux antibiotiques sont capables d'interférer avec chacune des étapes de la synthèse des protéines (streptomycine, cycloheximide, puromycine).

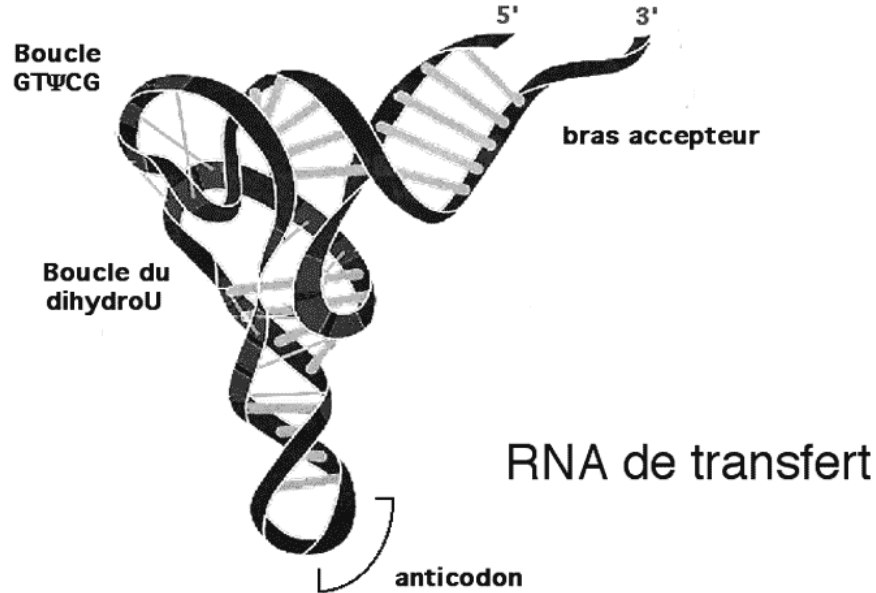
5.10 RNA de transfert (trèfle)



BM 43

- Les RNA de transfert constituent le lien chimique nécessaire entre la structure du codon, reconnu par l'anticodon, et l'acide aminé spécifique porté par le tRNA. C'est en quelque sorte le dictionnaire de la traduction.
- L'anticodon est une séquence de trois nucléotides située à l'extrémité de la boucle inférieure du tRNA, complémentaire et antiparallèle de la séquence du codon de l'acide aminé correspondant.
- Chaque acide aminé est lié spécifiquement (code génétique) par une amino-acyl-tRNA-synthétase à l'extrémité 3' du tRNA dont l'anticodon lui correspond (tRNA chargé).
- Les ribosomes lient les tRNA chargés sur le site A de l'élongation si leur anticodon s'apparie avec le codon du messager à cet endroit. L'élongation transfère alors le peptide sur l'acide aminé nouveau, lui-même porté par le RNA de transfert.

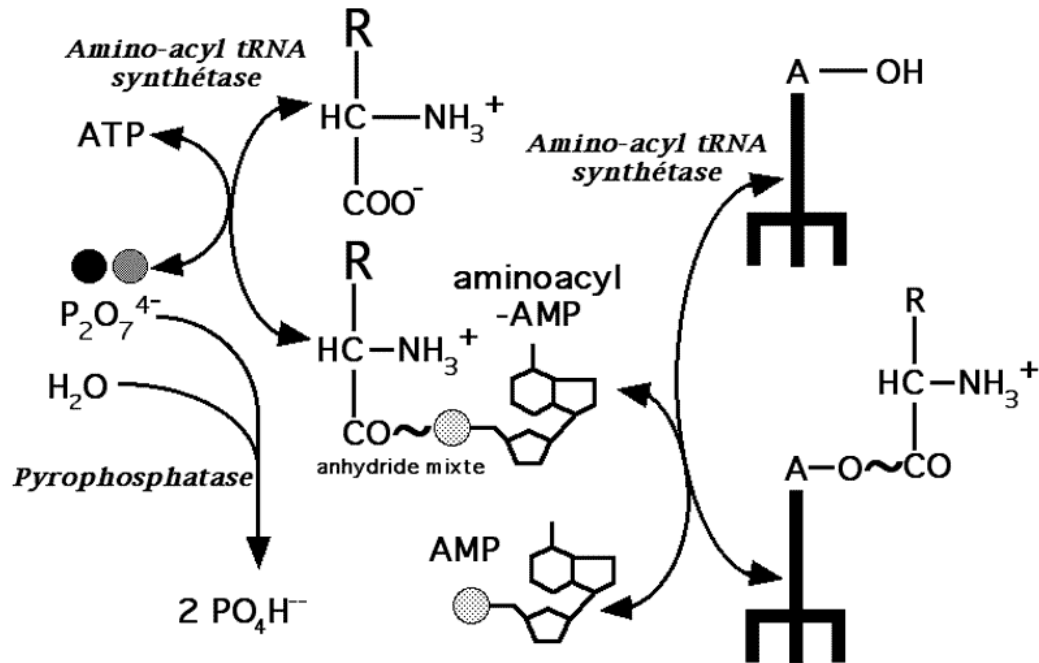
5.11 RNA de transfert (ruban)



BM 43/1

- L'analyse cristallographique des RNA de transfert a montré que les extrémités des deux bras, boucle des dihydrouraciles et boucle GTΨCG, se referment l'une sur l'autre en échangeant des liaisons hydrogène. En sorte que dans ce modèle le RNA de transfert affecte une forme en L où seuls le bras de l'anticodon et le bras accepteur de l'acide aminé sont aux extrémités de la molécule.

5.12 Activation d'un acide aminé



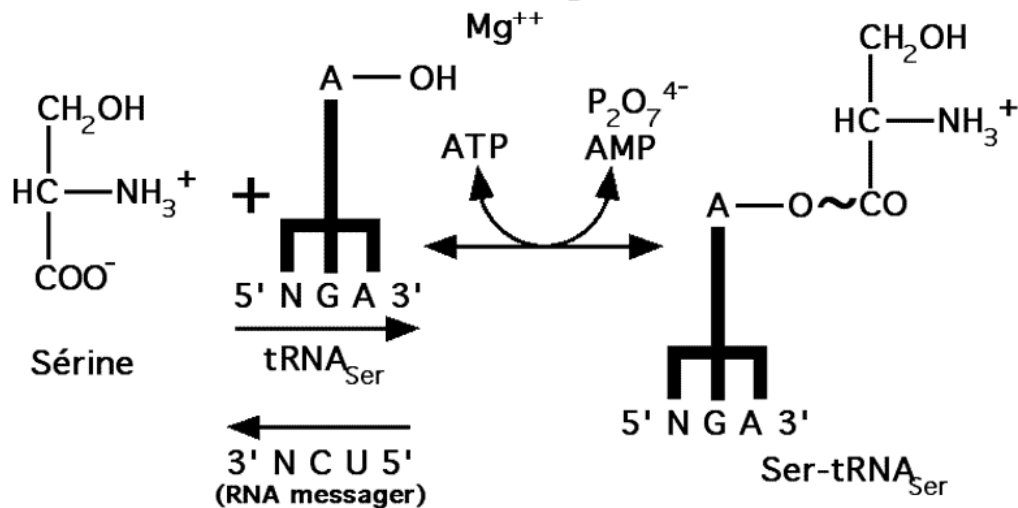
BM 44

- Les acides aminés libres du cytoplasme sont les substrats de la synthèse des protéines. Pour y participer ils doivent être activés.
- L'activation des acides aminés est catalysée par des enzymes spécifiques : les aminoacyl-tRNA synthétases. Il en existe au moins une pour chacun des 20 acides aminés.
- Ces enzymes ont une double spécificité : elles reconnaissent spécifiquement un acide aminé et elles reconnaissent spécifiquement le tRNA non chargé correspondant.
- L' aminoacyl-tRNA synthétase hydrolyse un ATP en AMP (liaison riche en énergie) puis active l'acide aminé en liant sa fonction acide avec la fonction acide du phosphate α de l'AMP (liaison anhydride mixte riche en énergie). Le pyrophosphate est aussitôt détruit par une pyrophosphatase.
- L'acide aminé ainsi activé est transféré ensuite avec sa liaison riche en énergie sur une des fonctions alcool secondaires du ribose de l'AMP 3'-terminal du tRNA. Le tRNA chargé se lie ensuite au ribosome pour la synthèse de la protéine.

5.13 Sérine tRNA synthétase

6.1.1.11

Sérine tRNA synthétase



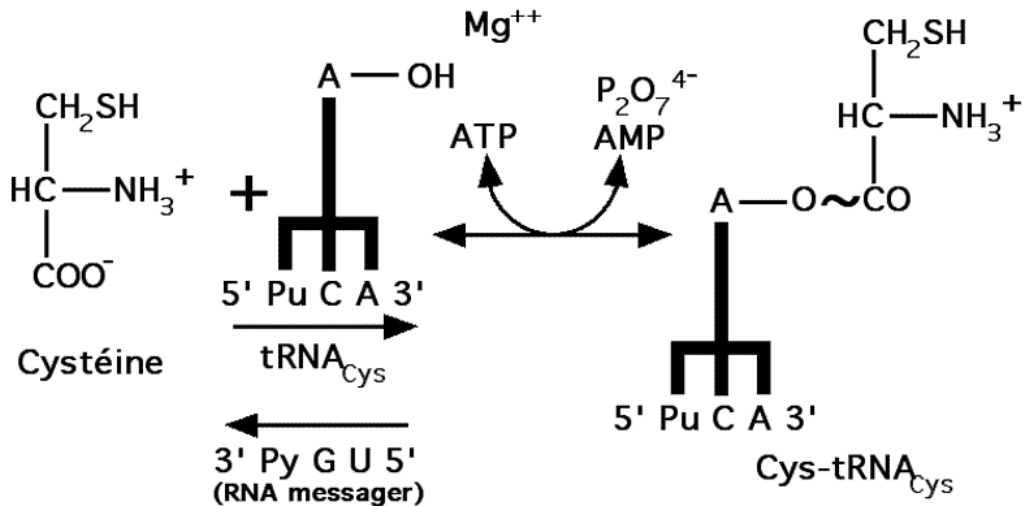
BM 44/1

- Les aminoacide-tRNA-synthétases sont les enzymes qui chargent les acides aminés libres du cytoplasme sur les RNA de transfert correspondants. Le coenzyme ATP est hydrolysé en AMP et en pyrophosphate pour fournir l'énergie nécessaire. La liaison ester constituée entre l'acide aminé et son tRNA est riche en énergie et sera hydrolysée au cours de l'étape d'élongation de la traduction.
- Les aminoacide-tRNA-synthétases ont une double spécificité très étroite pour les deux substrats : l'acide aminé reconnu (ici, la sérine) et les tRNA dont les anticodons sont complémentaires des codons correspondant à cet acide aminé dans le code génétique. L'exactitude de la traduction repose entièrement sur cette double spécificité.
- Les aminoacide-tRNA-synthétases sont en quelque sorte les auteurs du dictionnaire de la traduction.
- La reconnaissance du tRNA se fait par l'anticodon dans certains cas (l'enzyme ne tenant pas toujours compte de la première base de l'anticodon, ce qui explique la dégénérescence du code génétique) ou bien encore par d'autres séquences du tRNA communes aux tRNA synonymes. Certaines aminoacide-tRNA-synthétases sont régulées par phosphorylation.

5.14 Cystéine tRNA synthétase

6.1.1.16

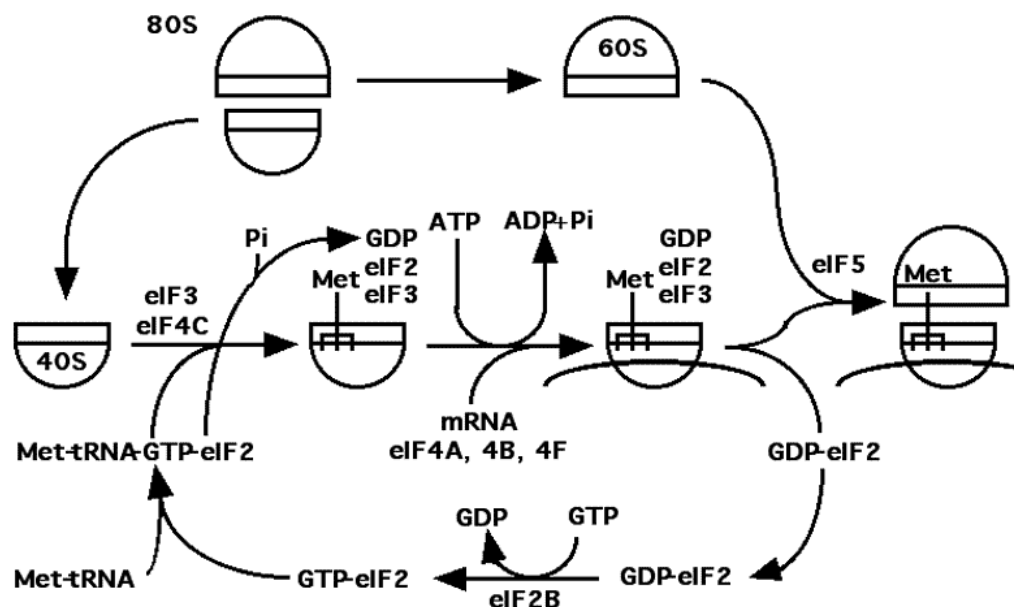
Cystéine tRNA synthétase



BM 44/2

- Les aminoacide-tRNA-synthétases sont les enzymes qui chargent les acides aminés libres du cytoplasme sur les RNA de transfert correspondants. Le coenzyme ATP est hydrolysé en AMP et en pyrophosphate pour fournir l'énergie nécessaire. La liaison ester constituée entre l'acide aminé et son tRNA est riche en énergie et sera hydrolysée au cours de l'étape d'élongation de la traduction.
- Les aminoacide-tRNA-synthétases ont une double spécificité très étroite pour les deux substrats : l'acide aminé reconnu (ici, la cystéine) et les tRNA dont les anticodons sont complémentaires des codons correspondant à cet acide aminé dans le code génétique. L'exactitude de la traduction repose entièrement sur cette double spécificité.
- Les aminoacide-tRNA-synthétases sont en quelque sorte les auteurs du dictionnaire de la traduction.
- La reconnaissance du tRNA se fait par l'anticodon dans certains cas (l'enzyme ne tenant pas toujours compte de la première base de l'anticodon, ce qui explique la dégénérescence du code génétique) ou bien encore par d'autres séquences du tRNA communes aux tRNA synonymes. Certaines aminoacide-tRNA-synthétases sont régulées par phosphorylation.

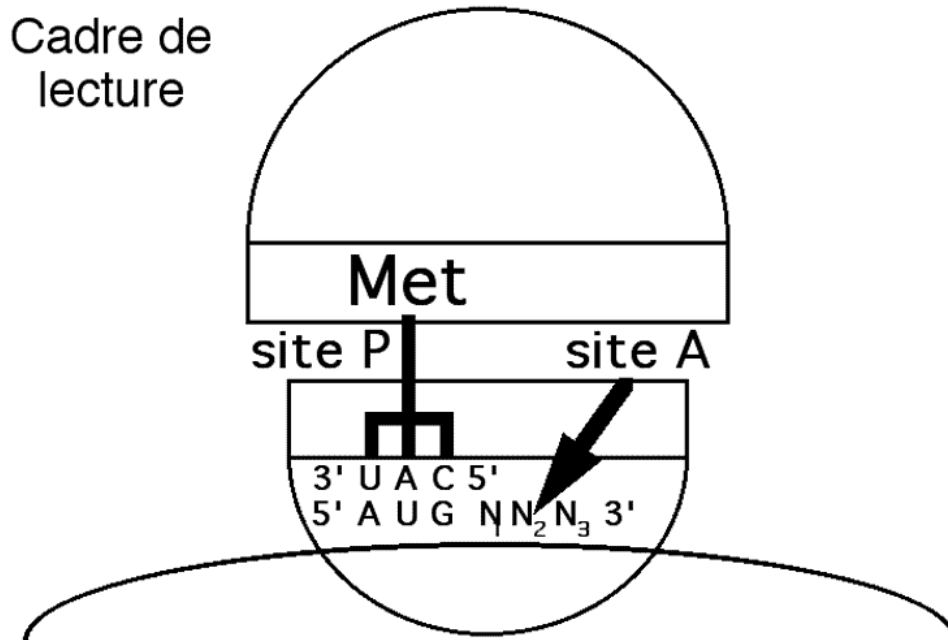
5.15 Initiation de la traduction



BM 45

- L'initiation de la traduction est l'étape limitante de la traduction.
- Les sous-unités des ribosomes sont dissociées dans le cytoplasme. Une cascade d'événements va former un complexe d'initiation.
- Au repos, le facteur eIF2 (*eucaryotic initiation factor 2*) est porteur d'un GDP, coenzyme qu'il a hydrolysé au cours du cycle d'une initiation précédente. En présence du facteur eIF2B, un nouveau GTP est substitué à ce GDP. Le facteur eIF2 ainsi activé, peut alors lier le tRNA chargé d'une méthionine dont l'anticodon est complémentaire du codon d'initiation (AUG) du messenger. En présence du cofacteur eIF4C, la petite sous-unité va fixer le facteur eIF3 et le facteur eIF2 activé qui porte le tRNA chargé de la méthionine initiale. L'énergie de la formation de ce complexe a été fournie par l'hydrolyse de la liaison riche en énergie du GTP porté par le facteur eIF2.
- La séquence 5' non traduite du RNA messenger est reconnue par les cofacteurs eIF4A, eIF4B et eIF4F qui s'y fixent. Grâce à l'hydrolyse d'un ATP pour fournir l'énergie, le messenger est alors transféré sur la petite sous-unité, en regard du site P, de façon à hybrider les nucléotides du codon d'initiation avec ceux de l'anticodon de le tRNA de la méthionine initiale.
- En présence du dernier cofacteur eIF5, le complexe va se lier à une grande sous-unité pour constituer un ribosome fonctionnel. Les cofacteurs d'initiation sont libérés et la traduction commence. Le cofacteur eIF2 toujours porteur de son GDP, se libère pour recommencer un nouveau cycle d'initiation.

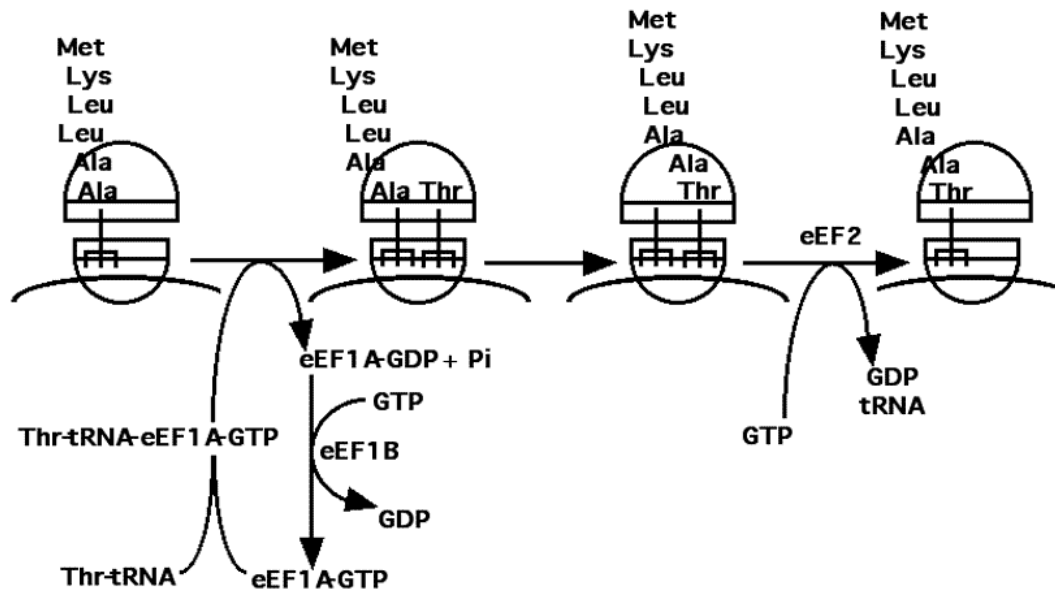
5.16 Cadre de lecture



BM 45/1

- Le positionnement du messenger par rapport au RNA de transfert de la Méthionine initiale détermine le cadre de lecture de la traduction du messenger.
- Le RNA de transfert de la méthionine occupe un des deux sites de fixation des tRNA sur le ribosome : site P (ou peptidique, car il contiendra le peptide en cours de synthèse). Le codon AUG du messenger, en s'hybridant dans le site P avec l'anticodon CAU du RNA de transfert de la méthionine, place le messenger de telle sorte que le codon suivant (N₁N₂N₃) apparaisse dans l'autre site de fixation : site A (ou acide aminé, car il servira à la fixation des nouveaux acides aminés incorporés).
- Le nucléotide N₁ sera toujours le premier de chaque codon.

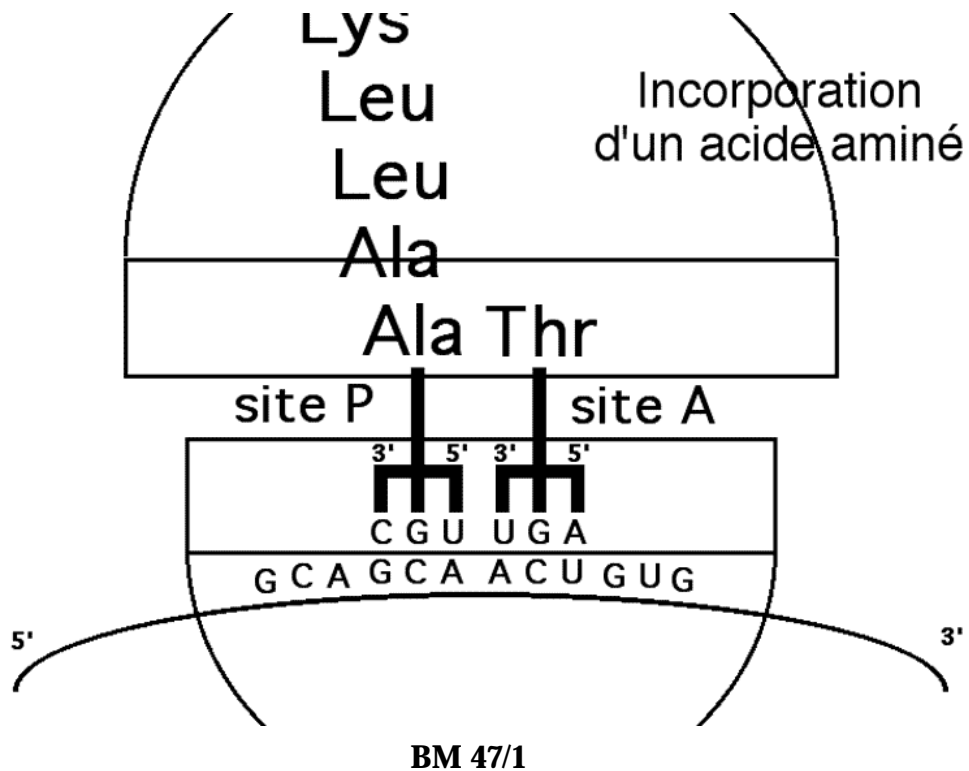
5.17 Elongation de la traduction



BM 47

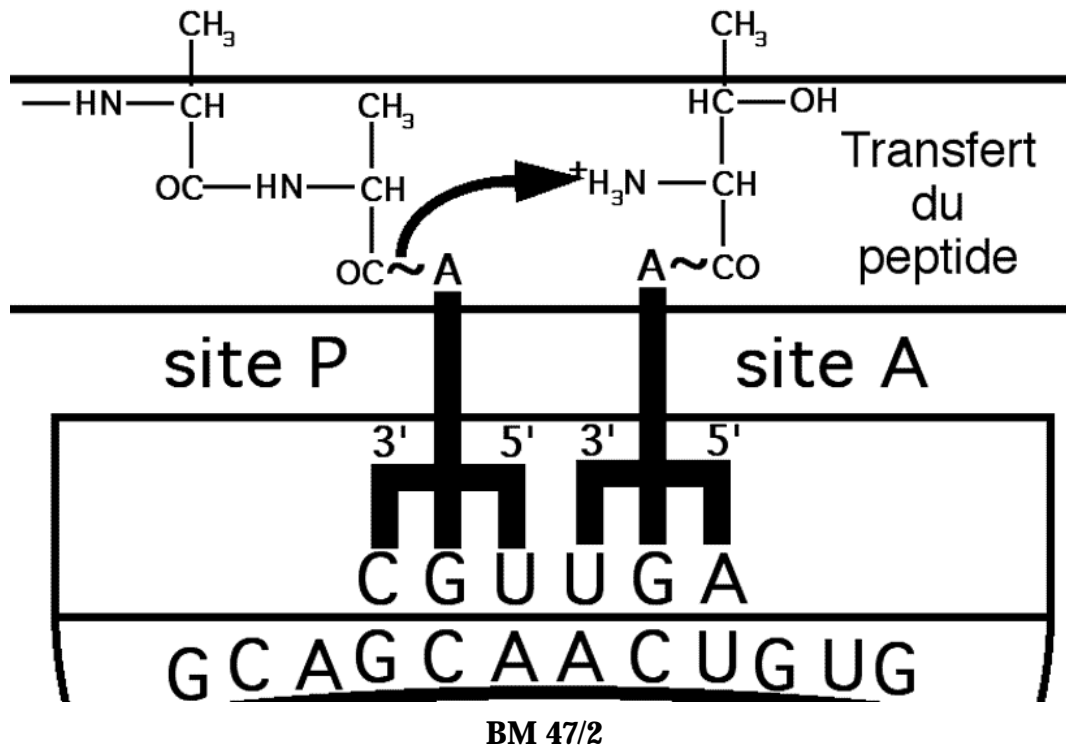
- Les ribosomes initiés ont leur site A vacant. Le facteur d'élongation eEF1B catalyse l'échange du GDP par un GTP sur le facteur eEF1A. Celui-ci, activé, va recevoir un tRNA chargé qu'il viendra fixer sur ce site A, en hydrolysant le GTP en GDP. Dès que le codon du messenger au fond du site A a pu se lier complémentaiement avec l'anticodon du tRNA apporté, le facteur eEF1A est libéré avec son GDP.
- Le ribosome catalyse alors le transfert du peptide situé sur le tRNA du site P sur la fonction amine de l'acide aminé du tRNA du site A. Il utilise pour cela, l'énergie de l'hydrolyse de la liaison ester riche en énergie entre le peptide et le tRNA du site P.
- Enfin, grâce au facteur eEF2 et à l'hydrolyse d'un autre GTP, le tRNA du site P est libéré, le messenger, le tRNA restant et le peptide en cours de synthèse sont alors déplacés (translocation) du site A vers le site P, sans qu'il y ait de séparation entre le codon et l'anticodon.
- Le site A est à nouveau libre pour recevoir le tRNA de l'acide aminé suivant.

5.18 Incorporation d'un acide aminé



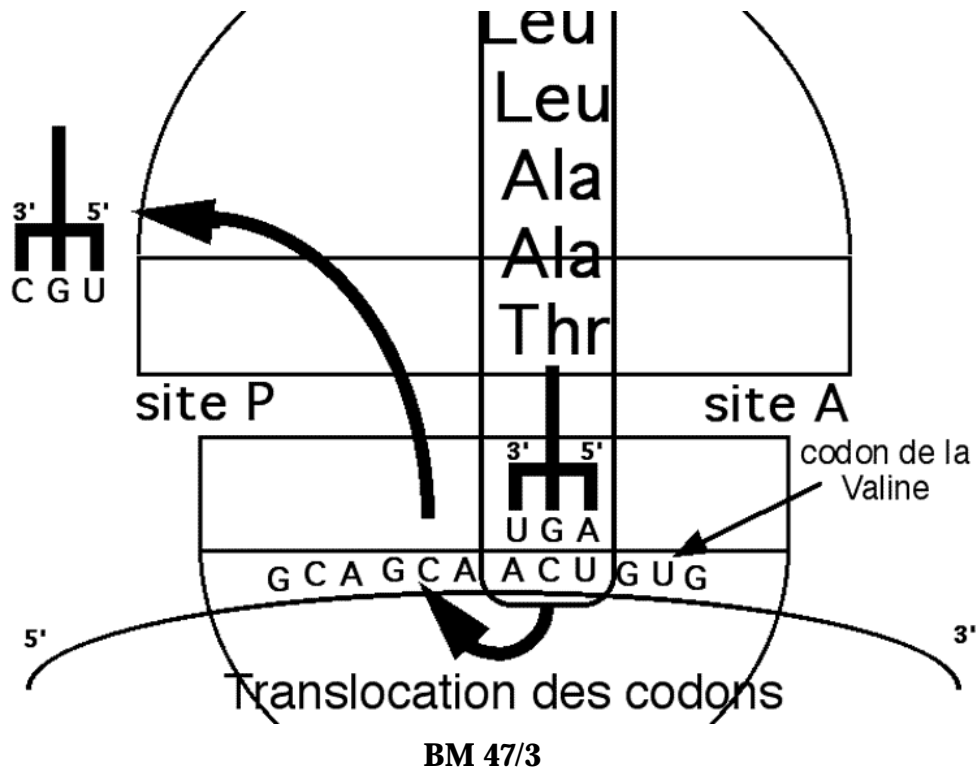
- Un tRNA chargé vient se fixer sur le site A libre. Le codon du messager au fond du site A va se lier complémentaiement avec l'anticodon du tRNA du nouvel acide aminé ce qui va permettre l'incorporation de cet acide aminé dans le peptide en cours de synthèse.

5.19 Transfert du peptide



- Le ribosome catalyse alors le transfert du peptide situé sur le tRNA du site P sur la fonction amine de l'acide aminé du tRNA du site A. Il utilise pour cela, l'énergie de l'hydrolyse de la liaison ester riche en énergie entre le peptide et le tRNA du site P.

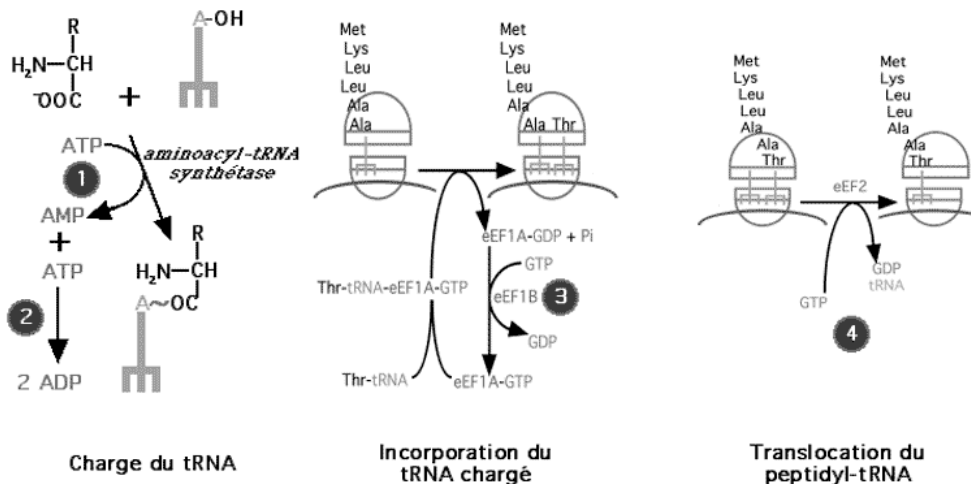
5.20 Translocation des codons



- Le tRNA libre du site peptidique quitte le ribosome.
- Le messager, le tRNA restant et le peptide en cours de synthèse sont alors déplacés (translocation) du site A vers le site P, sans qu'il y ait fusion de l'hybride entre le codon et l'anticodon.

5.21 Liaisons riches en énergie

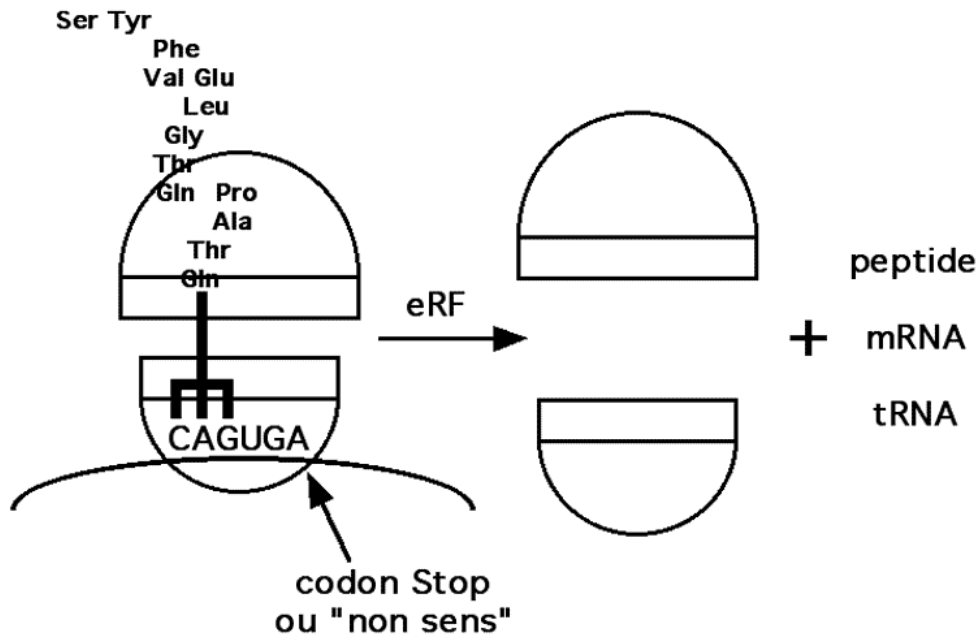
Liaisons riches en énergie



BM 47/4

- Le bilan énergétique de la traduction dépend du nombre d'acides aminés de la protéine synthétisée.
- Pour chaque acide aminé, on utilise d'abord un ATP → AMP pour la synthèse du tRNA chargé (aminoacyl-tRNA synthétase). L'AMP produit est réactivé en ADP par un autre ATP (nucléoside-P2 kinase). L'ensemble équivaut à la consommation de deux liaisons riches en énergie ATP → ADP.
- Pour l'incorporation de ce tRNA chargé dans le site acide aminé du ribosome, le facteur eEF1B utilise un GTP → GDP.
- Pour la translocation du peptidyl-tRNA du site acide aminé au site peptidique, le facteur eEF2 utilise encore un GTP → GDP.
- En tout chaque acide aminé incorporé dans la protéine coûte à la cellule quatre liaisons riches en énergie.

5.22 Terminaison de la traduction



BM 48

- Lorsque le site A se trouve en regard d'un codon non-sens annonçant la fin de la traduction, le complexe va se dissocier du messager en présence d'un dernier cofacteur eRF.
- Les deux sous-unités du ribosome se dissocient, la protéine synthétisée est libérée, ainsi que le dernier tRNA.

5.23 Signal-peptide

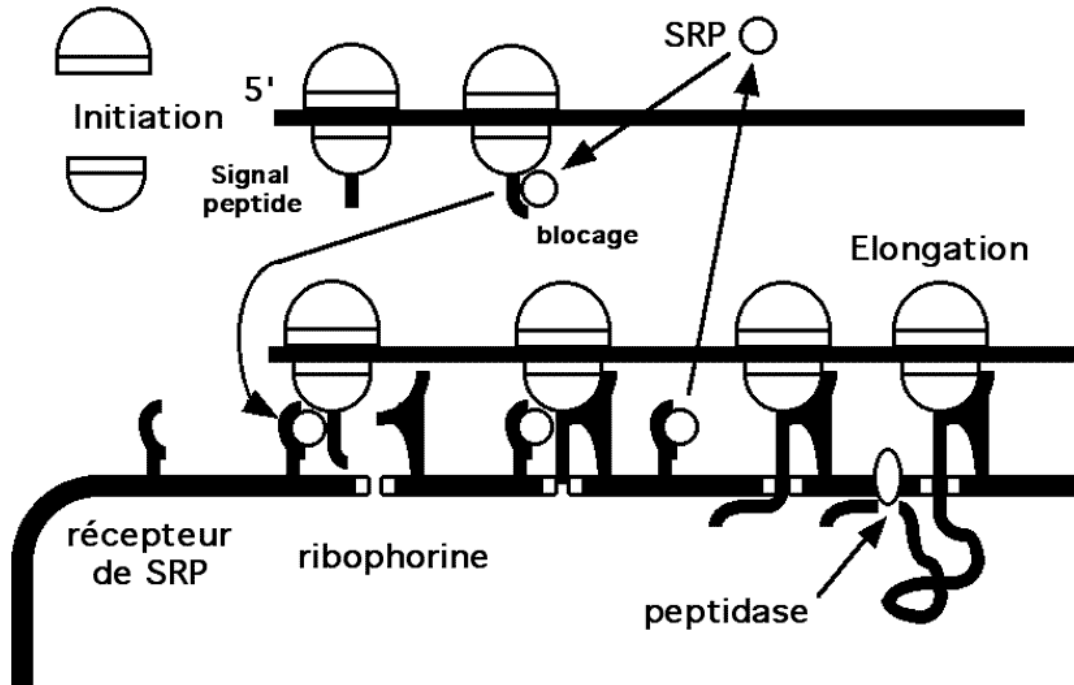
SIGNAL-PEPTIDE

- **Chaînon de quelques acides aminés (15 à 20) à l'extrémité N-terminale de la forme traduite de certaines protéines qui doivent être excrétées hors de la cellule.**

BM 50

- Lorsqu'une protéine est synthétisée, sa structure secondaire ou tertiaire se construit au fur et à mesure de la traduction et elle est libérée dans le cytoplasme.
- Lorsque cette protéine est destinée à être incorporée dans les membranes ou les organites de la cellule, la partie codante du RNA messager commence par une séquence de quelques acides aminés qui sert d'adresse pour l'incorporation de cette protéine dans la membrane.
- Ces peptides orientent la destinée de la protéine : incorporation dans les membranes (reticulum endoplasmique, appareil de Golgi, membrane plasmique, lysosomes...), entrée dans les mitochondries, excrétion hors de la cellule via l'appareil de Golgi, etc...
- Le signal-peptide est un peptide d'adressage situé à l'extrémité NH₂-terminale des protéines à excréter. Parce que sa fonction est de pénétrer dans la membrane du reticulum endoplasmique, sa structure est riche en acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, Ile, Met, Val).

5.24 Polyribosomes liés

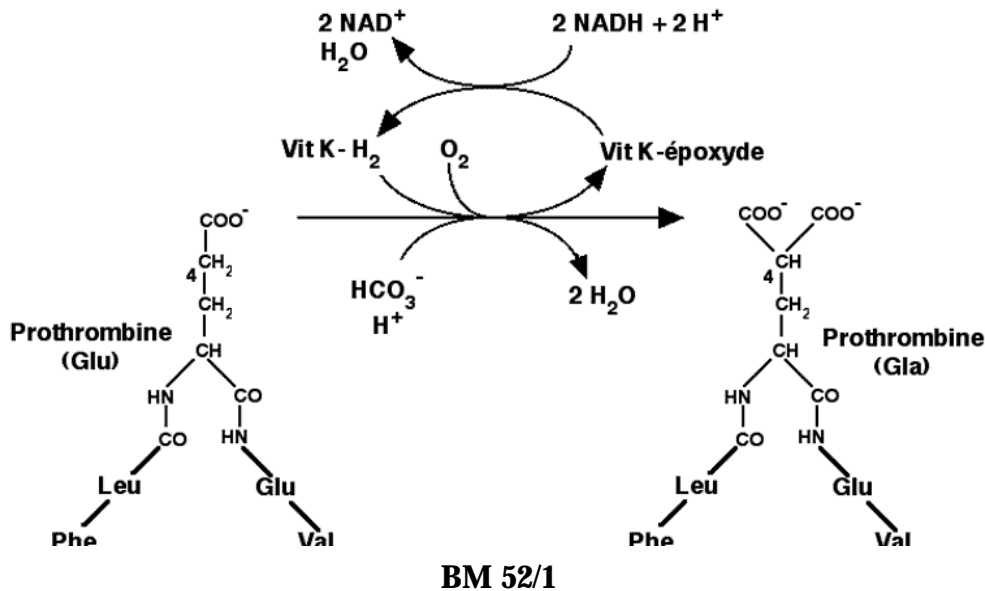


BM 51

- Les polyribosomes qui se forment sur un message comportant un signal peptide ont une évolution légèrement différente. La traduction s'arrête peu après la synthèse du signal-peptide, dès que celui-ci apparaît hors de la structure du ribosome et se lie avec la SRP (SRP = *Signal Recognition Particle*), qui inhibe l'élongation.
- Pour que l'élongation puisse se poursuivre, il faut que la SRP soit reconnue spécifiquement par un récepteur de la membrane du reticulum endoplasmique. Dès que cette liaison est établie, le ribosome est lié par la ribophorine, toujours dans la membrane du reticulum, près d'une protéine qui ouvre un pore à travers cette membrane. Le SRP écarté, l'élongation va reprendre. Le peptide en cours de synthèse est alors dirigé à travers cette membrane pour se développer dans la lumière du reticulum endoplasmique.
- A la face interne de la membrane une endopeptidase spécifique va couper le signal peptide et la synthèse se poursuivra jusqu'à la terminaison. La protéine sera enfin incorporée dans une membrane ou exportée, à travers l'appareil de Golgi, vers l'extérieur de la cellule.
- L'adressage des protéines vers les mitochondries fait appel à un autre type de peptide d'adressage qui conduit les peptides à traverser la membrane mitochondriale.

5.25 Carboxylation de l'acide glutamique

Carboxylation du glutamate



- L'acide carboxyglutamique est un acide aminé propre aux protéines fixant le calcium : protéines des os, protéines de la coagulation du sang.
- Cet acide aminé est créé par une modification post-traductionnelle de ces protéines.
- L'enzyme qui effectue la carboxylation a pour coenzyme la vitamine K (ou naphthoquinone), aliment indispensable qu'on trouve dans les feuilles vertes. Cette vitamine K est un transporteur d'hydrogène qui en s'oxydant, va retirer un hydrogène au carbone n°4 d'un acide glutamique, et transférer à cet endroit une molécule de gaz carbonique issue d'un ion bicarbonate.
- La vitamine K oxydée doit être réduite par une diaphorase à NADH pour retrouver sa forme initiale avant de participer à nouveau à cette carboxylation.
- Les inhibiteurs de la réduction de la vitamine K (antivitamines K) vont empêcher la réaction de carboxylation, faute de vitamine K réduite, et par conséquent empêcher la coagulation du sang.

5.26 Modifications post-traductionnelles

Modifications post-traductionnelles

- 1) Protéolyse : signal-peptide, fragmentation
- 2) Glycosylation : Ser-O, Asn-N
- 3) Acylation : Farnésyl, Géranyl, Myristyl, Palmityl,
- 4) Hydroxylation (OH-Pro, OH-Lys, OH-Asp),
méthylation (CH₃-His), carboxylation (CO₂-Glu)
- 5) Désamination (Cit)
- 6) Phosphorylation : P-Ser, P-Thr, P-Tyr, P-His
- 7) Liaison d'un cofacteur : Métal, flavine, hème
- 8) Blocage des extrémités (pyroGlu, carboxylamide)

BM 53

- De nombreuses modifications chimiques se produisent après l'incorporation des acides aminés dans la structure primaire de la protéine (traduction) ; on les appelle modifications post-traductionnelles.
- On distingue des modifications cotraductionnelles qui se produisent alors que la traduction se poursuit encore et que le peptide naissant est encore attaché au ribosome qui l'a construit, des modifications post-traductionnelles proprement dites qui ont lieu dans la cellule, dans les organites ou hors de la cellule.
- On appelle protéine mature la forme chimique définitive que la protéine montrera au moment où elle remplira sa fonction dans l'organisme.

Chapitre 6

La réplication

6.1 Réplication

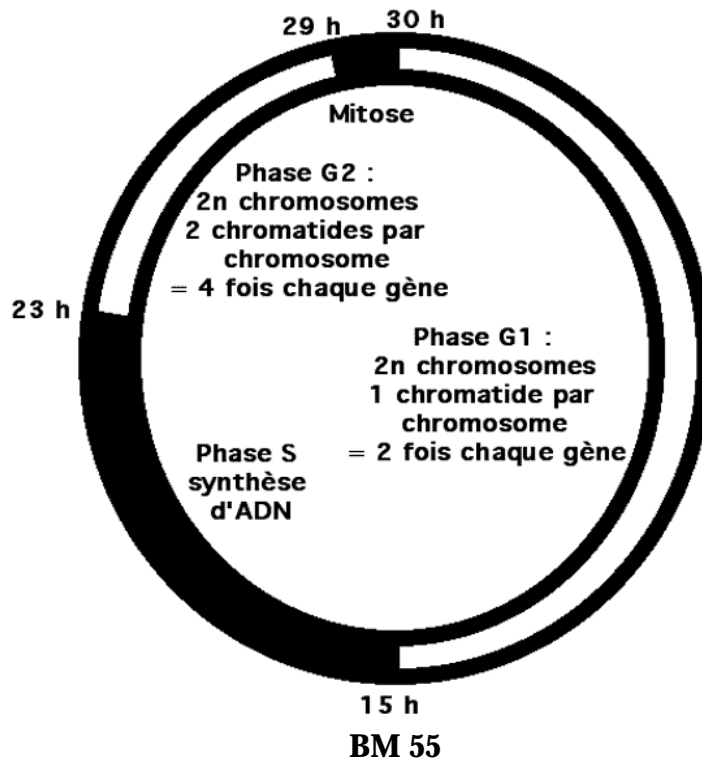
REPLICATION

- **Synthèse d'acide désoxyribonucléique qui reproduit exactement le génome d'une cellule au cours du cycle cellulaire afin de préparer la division de cette cellule.**

BM 54

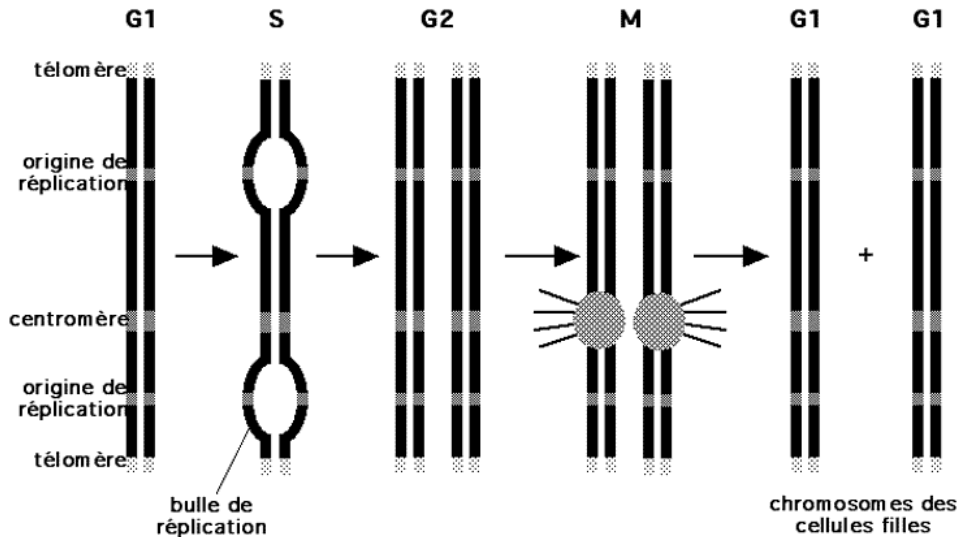
- Au cours de la vie de la cellule (cycle cellulaire, d'une division mitotique à la suivante), le DNA doit être dédoublé pour que chaque cellule fille reçoive un génome complet dans son noyau.
- Cette synthèse se produit à la phase S (au milieu du cycle cellulaire) grâce à l'activité de la DNA-polymérase δ et α . D'autres DNA-polymérases participent à la réparation du DNA lésé (DNA-polymérase β) ou à la réplication du DNA mitochondrial (DNA-polymérase γ).

6.2 Le cycle cellulaire



- La vie de la cellule se déroule entre deux mitoses. Chez les Mammifères, cette période dure en moyenne 30 heures bien qu'il y ait des cellules dont la vie soit très courte ou au contraire très longue.
- Durant ces trente heures la cellule traverse quatre phases :
 - la phase G1 où le génome étant diploïde, chaque gène est représenté en deux exemplaires. La chromatine est accessible aux RNA-polymérases qui transcrivent les gènes en messagers, qui seront à leur tour traduits.
 - vers la moitié du cycle commence la réplication du DNA : les DNA-polymérases vont mettre environ 8 heures (phase S) pour recopier en double le DNA de chaque chromosome. Durant cette phase la transcription est inhibée.
 - puis la cellule entre en phase G2 où chaque gène est représenté en quatre exemplaires. La chromatine est à nouveau accessible aux RNA-polymérases qui recommencent à transcrire.
 - enfin survient la mitose, qui donne naissance à deux cellules filles. Chacune recevra une des copies identiques du DNA de chaque chromosome et chaque gène y sera représenté en deux exemplaires.

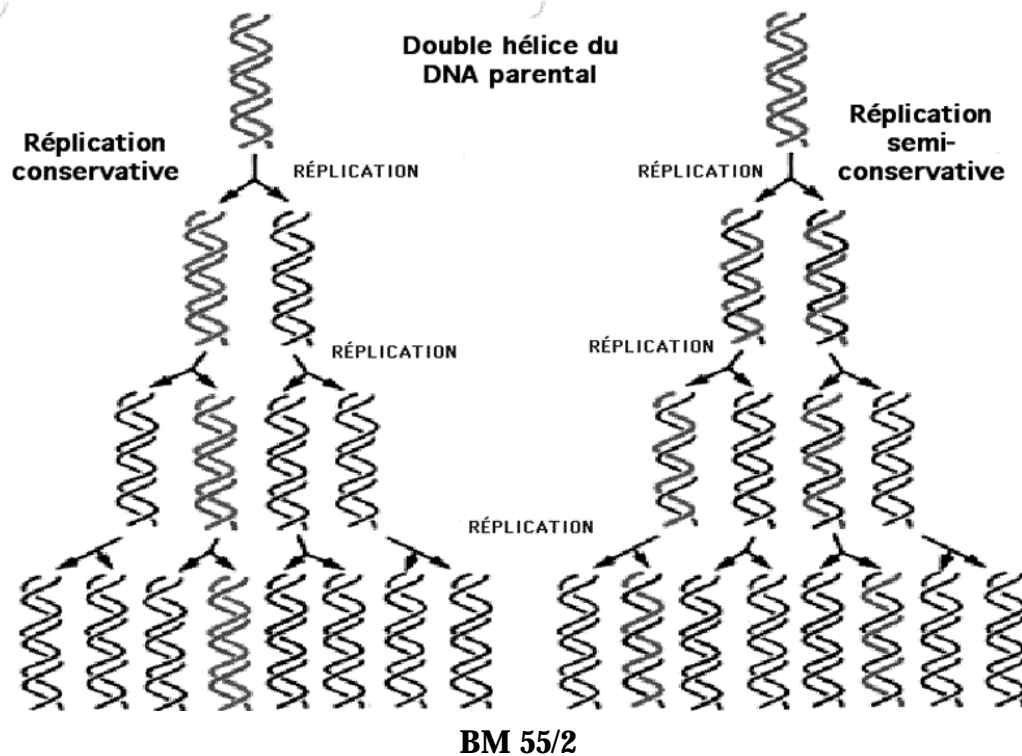
6.3 Chromatine et ADN



BM 55/1

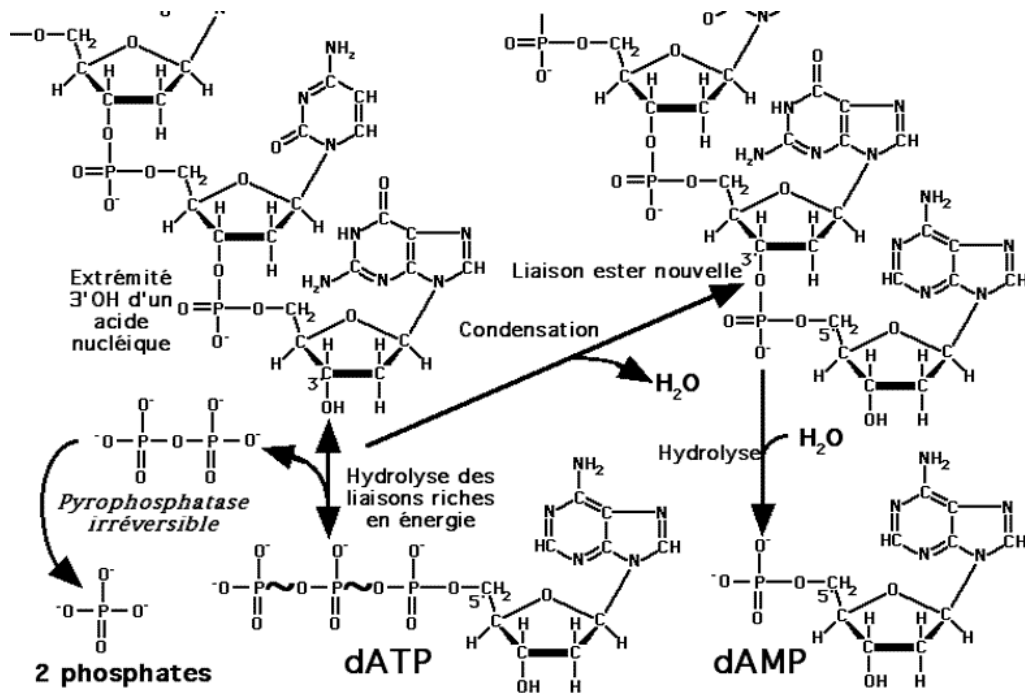
- Au cours des phases du cycle cellulaire les chromosomes évoluent pour préparer les mitoses.
- Pendant la phase G1 la chromatine est décompactée et les gènes peuvent s'exprimer. Chaque chromosome ne contient qu'une chromatide.
- Pendant la phase S, les bulles de réplication s'ouvrent et la réplication commence.
- Pendant la phases G2 les deux chromatides issues de la réplication sont liés par leurs centromères : il y a deux chromatides par chromosome.
- Pendant la mitose le centromère se lie au fuseau achromatique et prépare la séparation. La chromatine est compactée au maximum.
- Après la mitose, la chromatine est décompactée et les gènes peuvent s'exprimer dans chacune des deux cellules filles.

6.4 Réplication semi-conservative



- Les deux brins du DNA parental au cours de la réplication servent chacun de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin.
- De cette façon les deux brins, au lieu de rester ensemble à chaque synthèse (réplication conservative), se séparent toujours à chaque cycle (réplication semi-conservative)
- A la première génération un brin de chaque double hélice provient de la cellule-mère. A la deuxième génération il n'existe plus que deux brins de DNA de la cellule-mère pour quatre doubles hélices, etc...

6.5 Synthèse et hydrolyse du DNA



BM 55/3

- La croissance des brins d'acides nucléiques se fait toujours par leur extrémité 3'-OH terminale.
- La condensation se fait à partir d'un substrat « activé » : un des nucléosides triphosphates. L'hydrolyse des deux derniers phosphates fournira l'énergie nécessaire à la condensation. Le nucléoside monophosphate restant sera estérifié par une fonction acide de son phosphate sur la fonction alcool libre du carbone 3' du ribose qui constitue l'extrémité de l'acide nucléique. Une molécule d'eau sera ôtée.
- Le pyrophosphate résultant de l'hydrolyse des deux derniers phosphates sera lui-même aussitôt détruit par une pyrophosphatase, de sorte que la condensation des nucléotides sera irréversible.
- Inversement, en ajoutant une molécule d'eau sur cette liaison ester, on provoquera une réaction d'hydrolyse qui détachera le dernier nucléotide et libérera le carbone 3' du nucléotide précédent.

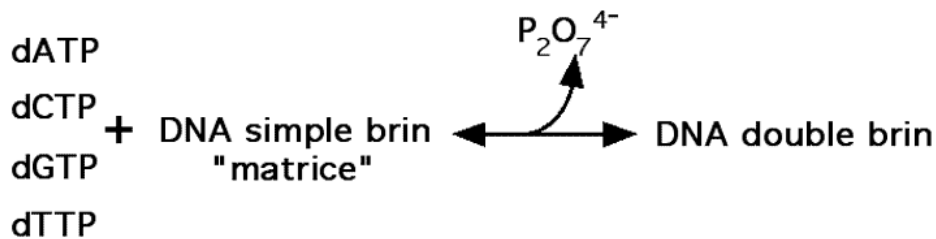
6.6 DNA polymérase

2 sous-unités
Isoenzymes

2.7.7.7

DNA polymérase

Primase, DNA-ligase, Hélicase,... Mg^{++}



BM 56

- Les DNA-polymérases sont des enzymes du noyau cellulaire qui agissent en phase S du cycle pour doubler systématiquement l'ensemble du génome diploïde.
- D'autres DNA polymérases interviennent dans la synthèse des amorces RNA/DNA, dans la réplication du génome mitochondrial ou dans la réparation du DNA.
- Elles ne peuvent démarrer la condensation des nucléotides que sur la fonction alcool en 3' du ribose du dernier nucléotide d'une amorce, nucléotide qui doit être hybridé avec le nucléotide complémentaire qui sert de modèle.
- Elles utilisent comme substrats des désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et des amorces de RNA et de DNA synthétisées par une primase (RNA polymérase capable de synthétiser un brin de RNA complémentaire d'un brin de DNA sur 10 nucléotides) suivie d'une DNA polymérase α (qui prolonge l'amorce de RNA de 20 désoxyribonucléotides environ).
- Elles synthétisent le DNA nouveau par fragments qui, après excision des amorces, sont liés entre eux par une DNA-ligase.
- Elles ont aussi une activité exonucléasique, qui leur permet en particulier d'hydrolyser le dernier nucléotide en 3' du brin synthétisé si celui-ci ne s'apparie pas correctement avec le nucléotide complémentaire du brin modèle.

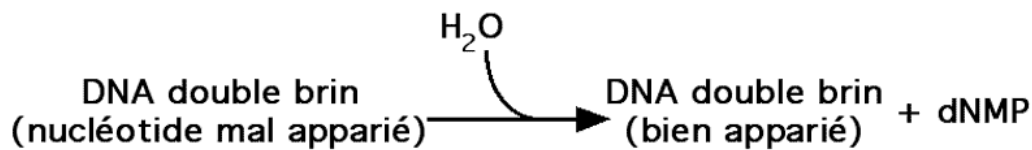
6.7 DNA polymérase (exonucléase 3' → 5')

2 sous-unités
Isoenzymes

3.1.11.1

DNA polymérase (*exonucléase 3' → 5'*)

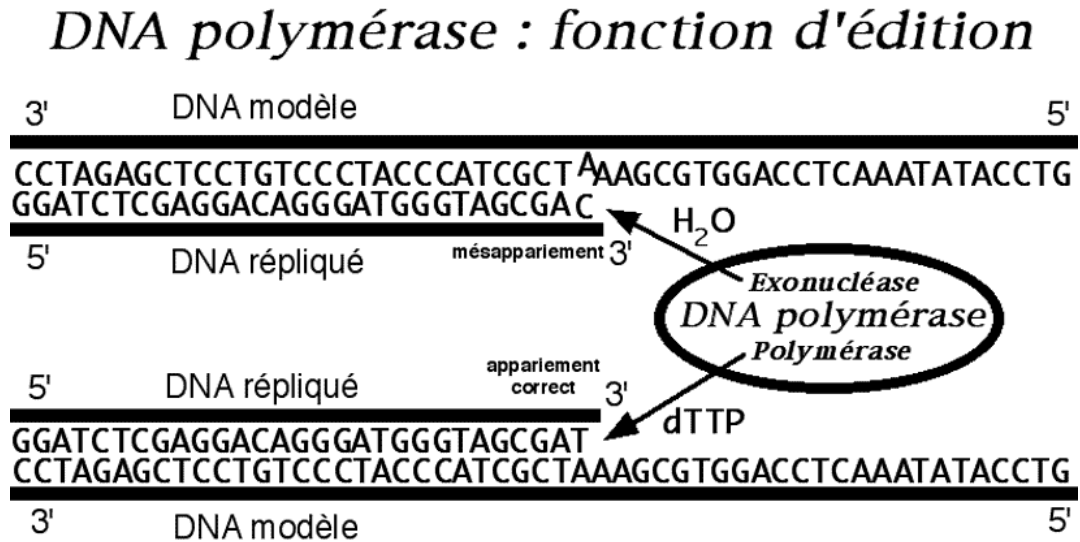
Primase, DNA-ligase, Hélicase,... Mg^{++}



BM 56/1

- Les DNA-polymérases sont des enzymes du noyau cellulaire qui agissent en phase S du cycle pour doubler systématiquement l'ensemble du génome diploïde.
- D'autres DNA polymérases interviennent dans la synthèse des amorces RNA/DNA, dans la réplication du génome mitochondrial ou dans la réparation du DNA.
- Elles ne peuvent démarrer la condensation des nucléotides que sur la fonction alcool en 3' du ribose du dernier nucléotide d'une amorce, nucléotide qui doit être hybridé avec le nucléotide complémentaire du brin modèle.
- Elles utilisent comme substrats des désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et des amorces de RNA et de DNA synthétisées par une primase (RNA polymérase capable de synthétiser un brin de RNA complémentaire d'un brin de DNA sur 10 nucléotides) suivie d'une DNA polymérase α (qui prolonge l'amorce de RNA de 20 désoxyribonucléotides environ).
- Elles synthétisent le DNA nouveau par fragments qui, après excision des amorces, sont liés entre eux par une DNA-ligase.
- Elles ont aussi une activité exonucléasique, qui leur permet en particulier d'hydrolyser le dernier nucléotide en 3' du brin synthétisé si celui-ci ne s'apparie pas correctement avec le nucléotide complémentaire du brin modèle.

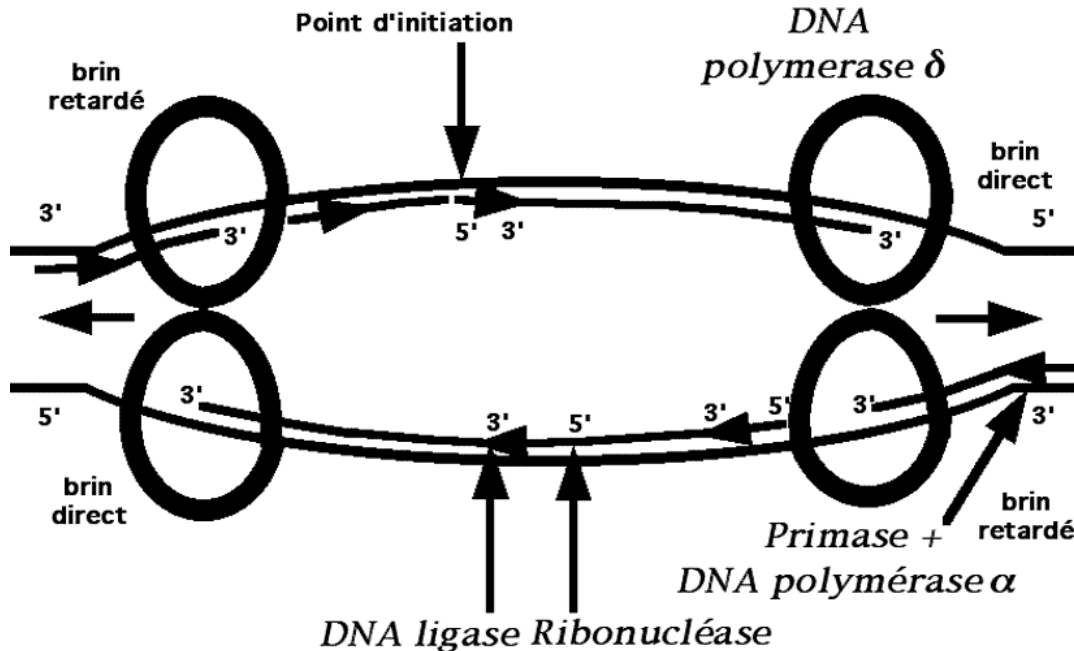
6.8 DNA polymérase : fonction d'édition



BM 56/2

- Les DNA polymérases ont à la fois une activité de polymérase pour ajouter des nucléotides au nouveau brin de DNA, et une activité de 3'→5' exonucléase pour hydrolyser le dernier nucléotide incorporé.
- Si le nucléotide incorporé est complémentaire du nucléotide du brin modèle et donc que l'hybridation des bases se fait normalement, l'activité de polymérase est plus rapide que celle d'exonucléase et le nucléotide suivant va être incorporé.
- Si le nucléotide incorporé n'est pas complémentaire du nucléotide du brin modèle et donc qu'il y a mésappariement, l'activité d'exonucléase est plus rapide que celle de polymérase et ce nucléotide sera hydrolysé.

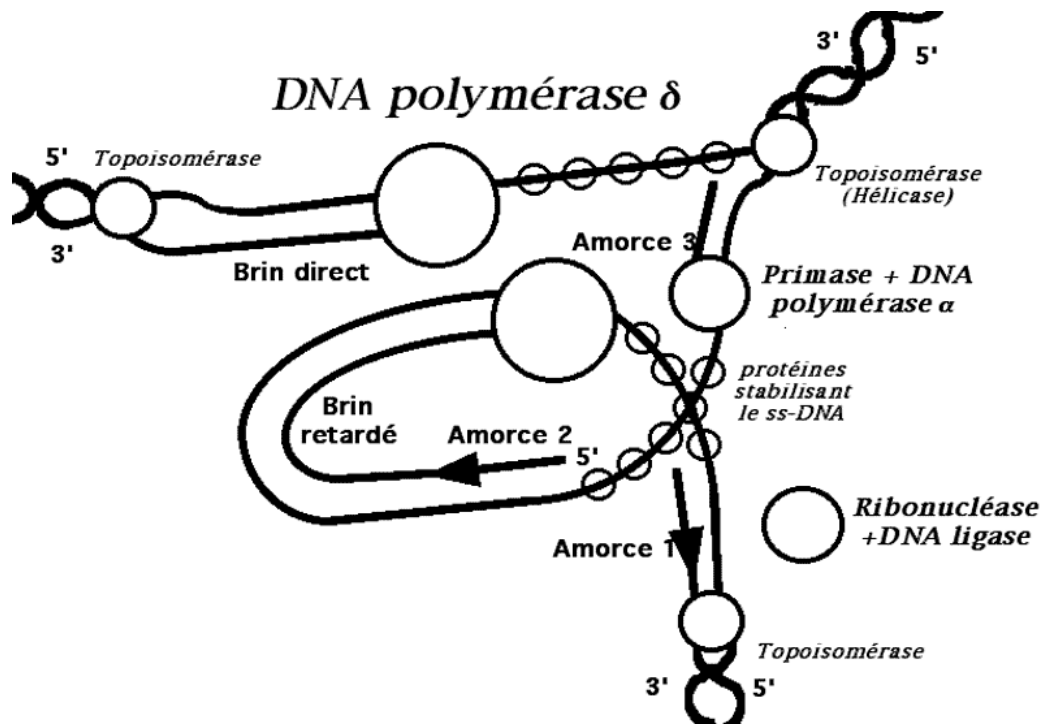
6.9 Boucle de réplication



BM 57

- Les DNA-polymérases commencent leur synthèse en de nombreux points d'initiation. Suite à la liaison de protéines spécifiques, la double hélice s'ouvre pour permettre le démarrage.
- La synthèse de DNA commence sur des amorces de RNA/DNA constituées par la primase et la DNA polymérase α . La réplication se poursuit dans une direction : dans ce sens l'un des deux brins du DNA (brin « direct ») est parcouru par l'enzyme dans le sens $3' \rightarrow 5'$ ce qui permet la synthèse d'un autre brin dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Les DNA-ligases assurent ensuite la liaison entre les différents fragments du DNA nouveau.
- La synthèse de l'autre brin (brin « retardé ») est plus complexe parce que l'enzyme parcourt ce brin de $5' \rightarrow 3'$. La primase et la DNA polymérase α synthétisent des amorces de 30 nucléotides en avant de la zone de réplication, et la DNA polymérase construit à la suite de petits fragments de DNA dans le sens $5' \rightarrow 3'$ (environ 200 nucléotides ; fragments d'Okazaki). Des ribonucléases détruisent les amorces de RNA/DNA du fragment précédent et les fragments sont ensuite reliés entre eux par la DNA-ligase.
- Il existe une dizaine d'isoenzymes de DNA polymérases chez les eucaryotes. La DNA polymérase α , associée à la primase est responsable de la synthèse des amorces. La DNA polymérase δ est la principale enzyme de la réplication en synthétisant sur le brin direct aussi bien que sur le brin retardé. Les autres DNA polymérases interviennent dans la synthèse du DNA mitochondrial ou dans les processus de réparation du DNA génomique.

6.10 Fourche de réplication



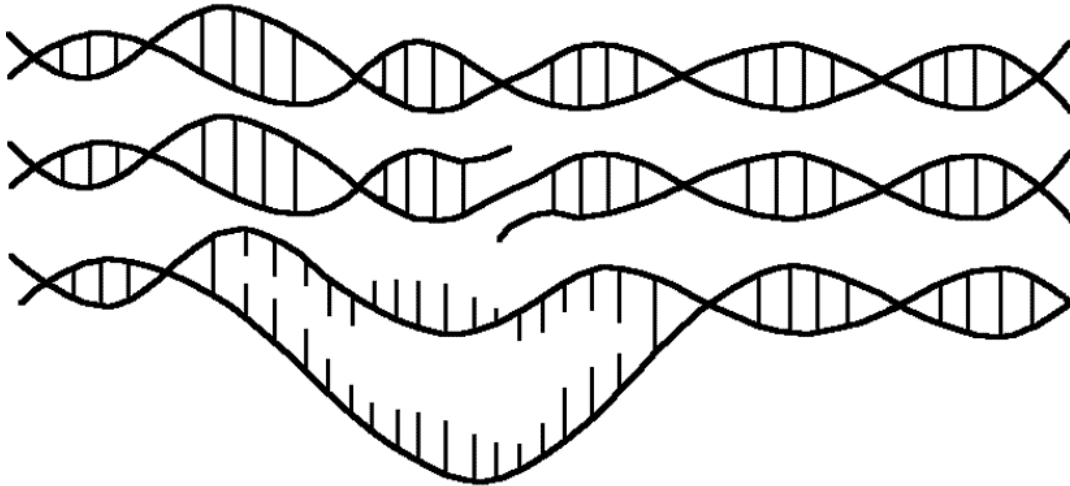
BM 57/1

- La réplication commence par la séparation des deux brins du DNA par l'hélicase. Chacun des deux brins est stabilisé par des protéines SSB (*single strand bound*).
- Sur le brin direct, en remontant de 3' vers 5', une DNA polymérase δ synthétise un brin complémentaire en ajoutant des désoxyribonucléosides triphosphates à l'extrémité 3'OH libre. Une nouvelle double hélice se forme entre le brin modèle direct et le nouveau brin synthétisé.
- Sur le brin retardé, une DNA polymérase δ progresse de 5' vers 3'. Pour pouvoir synthétiser un brin complémentaire, il faut que la primase et la DNA polymérase α fabriquent des amorces assez rapprochées (amorce 3 sur l'image) à quelques centaines de nucléotides de distance sur le brin modèle au fur et à mesure que celui-ci est détaché du brin direct. A partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce (amorce 2 de l'image) la DNA polymérase δ synthétise un fragment d'Okazaki jusqu'à ce qu'elle rencontre l'extrémité 5'-triphosphate de l'amorce précédente (amorce 1 sur l'image). Cette dernière est hydrolysée par une nucléase, ce qui permet à la DNA polymérase δ d'achever la synthèse du fragment d'Okazaki que la DNA ligase va lier définitivement avec le DNA du fragment précédent. Une nouvelle double hélice se forme entre le brin modèle direct et le nouveau brin synthétisé.
- Toutes ces protéines sont associées en une structure du noyau (usine à réplication) que traversent les molécules de DNA. Cette usine à réplication comprend aussi des enzymes de préparation des substrats : nucléotide kinases, ribonucléotide réductase, etc...

6.11 Topoisomérase I

5.99.1.2

Topoisomérase I

**BM 58/1**

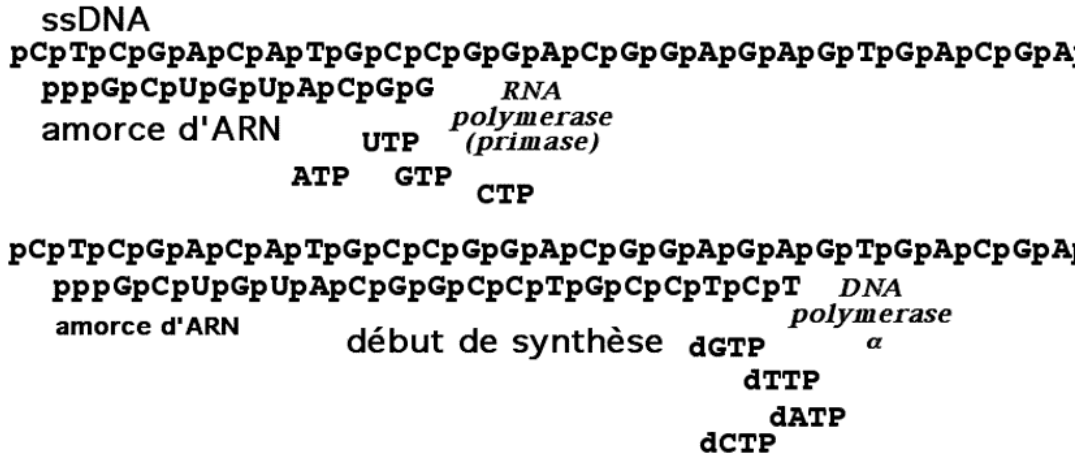
- La réplication ou la transcription du DNA nécessite une fusion partielle de la double hélice et modifie l'enroulement des deux brins.
- Afin de permettre ces réactions, la topoisomérase est capable de modifier l'enroulement en hydrolysant un brin du DNA et en le reconstituant après avoir fait le tour de l'autre brin.
- Après cette opération, la torsion de la double hélice tend à se rapprocher de la valeur normale : pas de l'hélice = 10 paires de nucléotides par tour. Au cours de la réplication et de la traduction le pas de l'hélice diminue en avant des polymérases et l'hélicase (une des topoisomérases) travaille alors pour augmenter le pas. Au contraire en arrière des polymérases les topoisomérases ajoutent des tours pour reconstituer la double hélice.

6.12 Primase

liée à la DNA
polymérase
 α

2.7.7.6

Primase

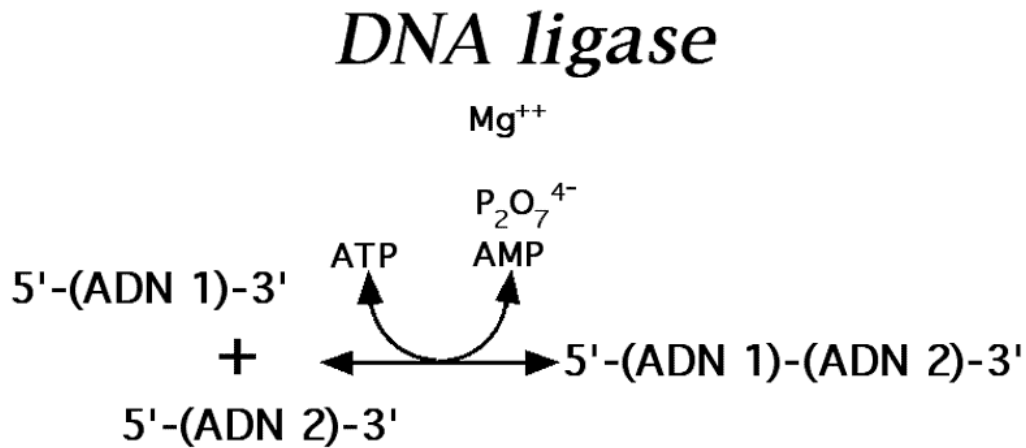


BM 58/2

- La DNA polymérase δ , enzyme principale de la réplication chez les eucaryotes, nécessite de démarrer son action à l'extrémité 3'OH terminale d'un brin de DNA dont le dernier nucléotide soit hybridé avec le brin de DNA servant de modèle. Si ce nucléotide n'est pas apparié, elle l'hydrolysera au lieu de pour suivre la synthèse. C'est pourquoi elle ne peut pas démarrer une synthèse de DNA sans amorce.
- L'amorce est créée au départ par une RNA polymérase particulière (sans rapport avec celles de la transcription) qui peut commencer sur environ 10 nucléotides la synthèse d'un RNA hybridé avec le DNA modèle. Le premier ribonucléotide de cette amorce garde ses 3 phosphates.
- Au bout de 10 ribonucléotides, une DNA polymérase α prend le relais et poursuit la condensation de 20 désoxyribonucléotides.
- L'amorce sera donc constituée d'un brin mixte comprenant RNA puis DNA sur 30 nucléotides environ. Le dernier désoxyribonucléotide de l'amorce, lié avec le brin de DNA qui sert de modèle, servira de point d'initiation à l'activité de la DNA polymérase δ .

6.13 DNA ligase

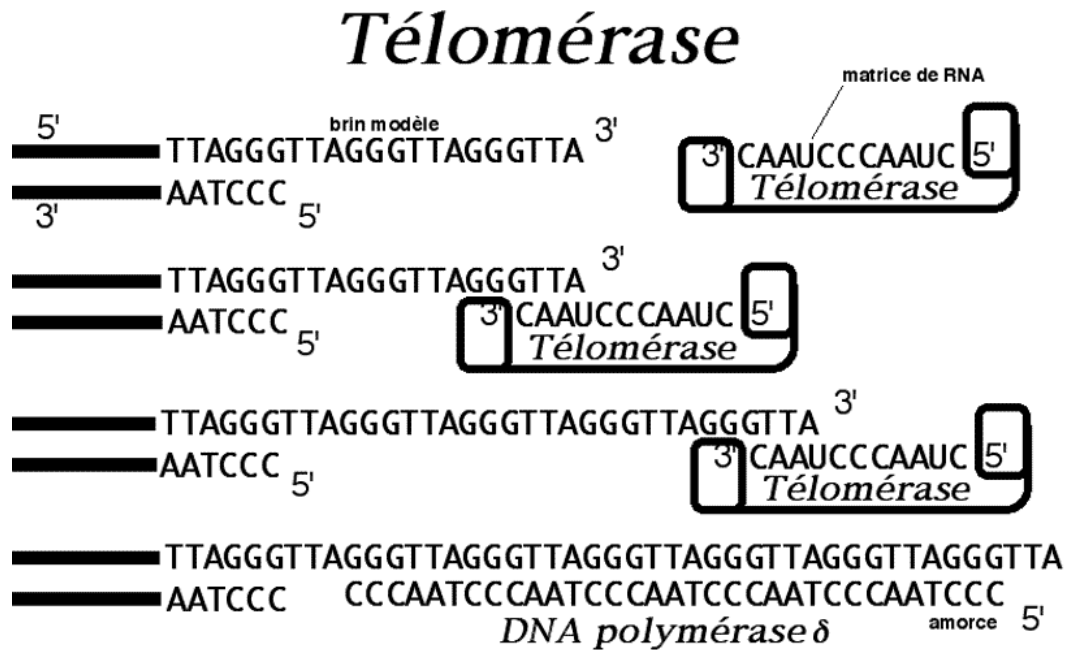
6.5.1.2



BM 58/3

- Les DNA ligases sont des enzymes qui sont capables de reconstituer la liaison phosphoester entre le carbone 3'-OH et le phosphate-5' de deux nucléotides voisins sur un brin de DNA.
- Elles interviennent dans la réplication pour lier ensemble les brins de DNA ou les fragments d'Okazaki synthétisés par les DNA polymérases.
- Elles interviennent aussi dans de nombreux processus de réparation du DNA génomique.

6.14 Télomérase



BM 58/4

- La synthèse du brin retardé du DNA ne peut pas se faire lorsque la DNA polymérase atteint l'extrémité 3' du brin modèle, faute de place pour une amorce complémentaire. S'il n'y avait pas de mécanisme particulier, à chaque réplication le DNA du chromosome serait raccourci.
- Le télomère ou séquence du DNA à l'extrémité des chromosomes humains est une séquence 5'-TTAGGG-3' répétée quelques centaines de fois avant le 3'OH final.
- La télomérase est une DNA polymérase qui peut continuer la synthèse d'un DNA simple brin. Cette enzyme comprend un RNA de 450 nucléotides dont l'extrémité 5' terminale est 5'-CUAACCCUAAC... Cette extrémité sert de modèle pour l'enzyme en vue de la synthèse de quelques unités de la répétition TTAGGG. Après cette synthèse l'enzyme glisse le long du brin de DNA et recommence de nouvelles unités.
- L'extrémité 3' du brin modèle ainsi allongée peut servir à la pose d'une amorce nouvelle : l'extrémité 3'-OH de cette amorce sert alors de point de départ pour la DNA polymérase δ pour synthétiser l'autre brin.

Chapitre 7

La réparation

7.1 Réparation

REPARATION

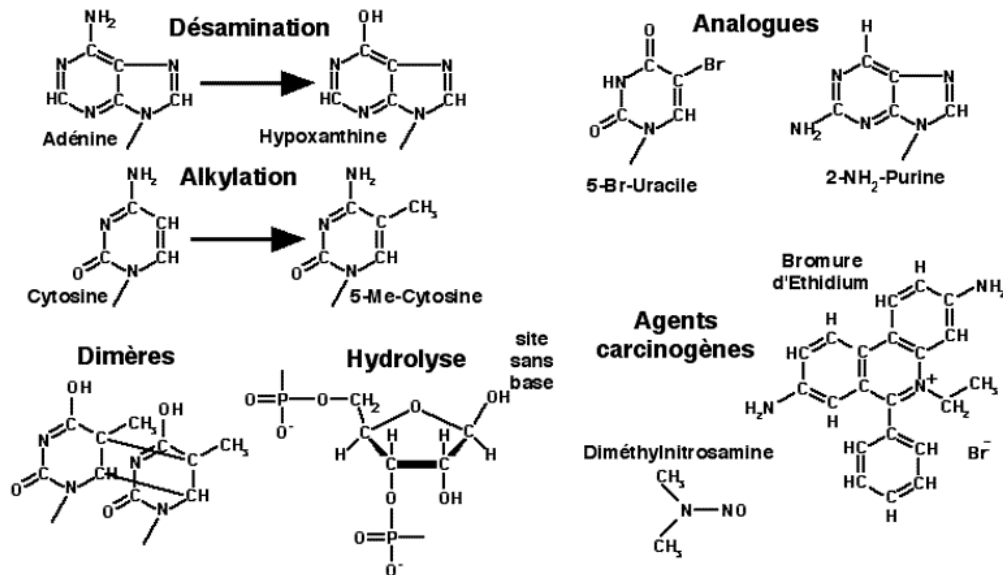
- **Correction d'un mésappariement, c'est-à-dire d'une absence de complémentarité entre les nucléotides des deux brins d'un fragment d'acide désoxyribonucléique.**

BM 59

- La réplication ou la conservation de la structure primaire du DNA peuvent n'être pas parfaites. Lorsque le DNA est endommagé ou répliqué de façon incorrecte, il en résulte que les nucléotides situés sur les deux brins ne sont plus complémentaires (A-T ou C-G). On dit qu'il y a mésappariement entre les nucléotides.
- La réparation vise à remplacer une base azotée, ou un nucléotides ou un fragment d'acide nucléique par des nucléotides complémentaires de la séquence de l'autre brin.
- La réplication étant semi-conservative, l'un des deux brins est identifié en tant que matrice et c'est l'autre brin qui sera réparé en cas de mésappariement.
- Plusieurs mécanismes de réparation permettent respectivement de remplacer une base, un nucléotide ou un fragment plus ou moins long d'un brin de DNA.

7.2 Bases endommagées

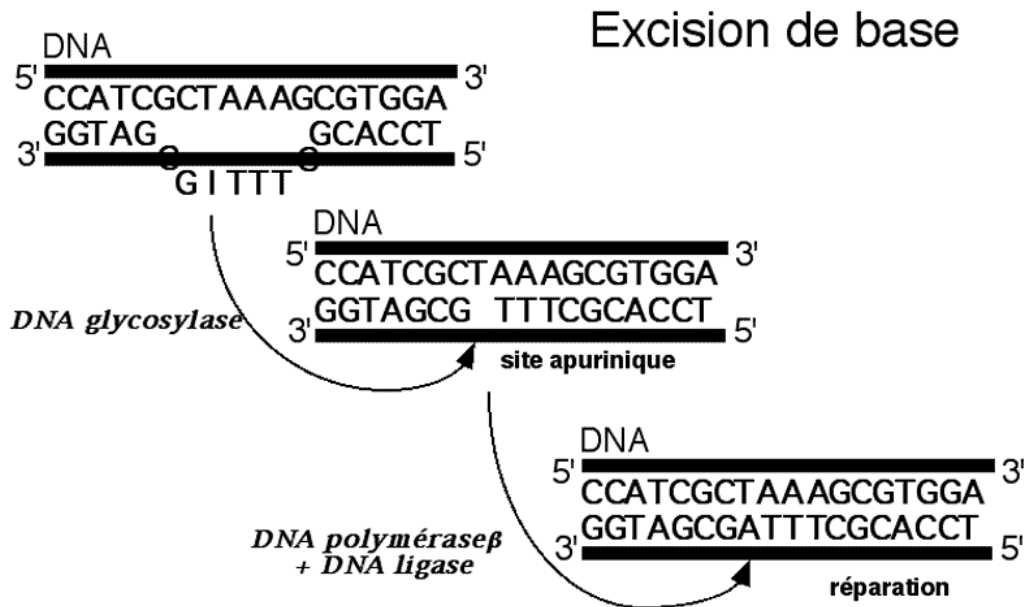
Bases endommagées



BM 60

- La nature chimique des bases azotées est essentielle pour le message génétique. De nombreuses modifications de ces bases peuvent entraîner des mutations.
- Des modifications chimiques (nitrites) comme la désamination des adénines en hypoxanthines. Or, l'hypoxanthine est préférentiellement complémentaire de C plutôt que de T. De même la méthylation des cytosines en 5-méthyl cytosine qui est le complément de A plutôt que de G.
- Des mutations résultent de liaisons anormales entre les bases de nucléotides voisins, comme les dimères de thymine. La chaleur engendre des réactions d'hydrolyse des bases, surtout des purines, aboutissant à des sites sans bases ou des sites apuriniques (sans purines)
- Des agents chimiques de l'environnement peuvent être mutagènes. Ainsi il y a des analogues structuraux des bases qui donnent des nucléotides anormaux comme le 5-bromouracile qui s'hybride préférentiellement avec les guanines ou la 2-aminopurine qui se lie aux cytosines.
- Certains agents mutagènes comme la 2-méthyl nitrosamine réagissent avec les bases en ajoutant des radicaux (alkylations) ou en s'intercalant entre les bases au sein de la double hélice (bromure d'éthidium).

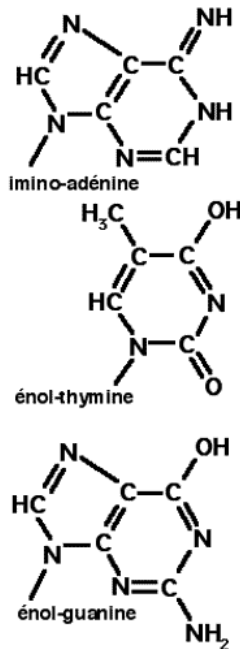
7.3 Excision de base



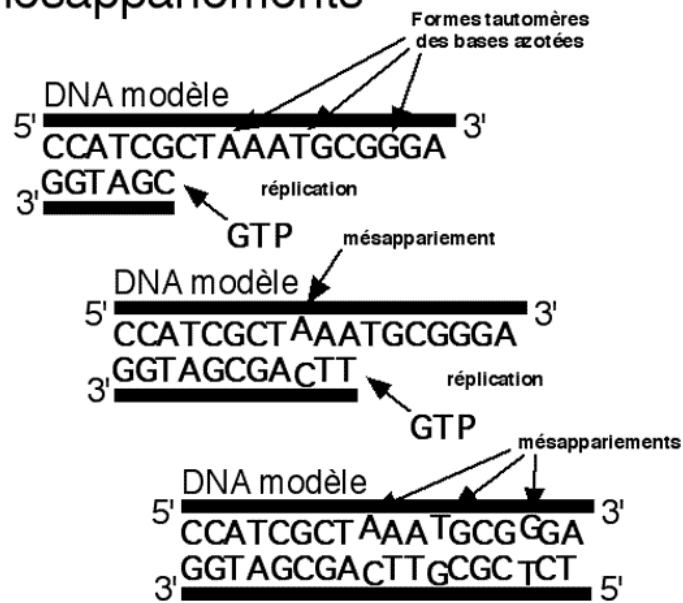
BM 60/1

- Devant une base endommagée, la réparation peut être faite par une simple excision de base suivie du remplacement de la base par un nucléotide normal.
- L'excision est faite par une DNA glycosylase qui ouvre la double hélice, puis hydrolyse la liaison N-glycosidique de la base endommagée et laisse un nucléotide apurinique (dépourvu de base).
- La réparation sera faite par une des DNA polymérases de réparation : la DNA polymérase β qui hydrolyse le nucléotide apurinique, puis le remplace par le nucléotide attendu sur l'extrémité 3'OH libre et la brèche sera refermée par la DNA ligase qui reconstitue la liaison phosphodiester en 3' du nucléotide ajouté.

7.4 Mésappariements



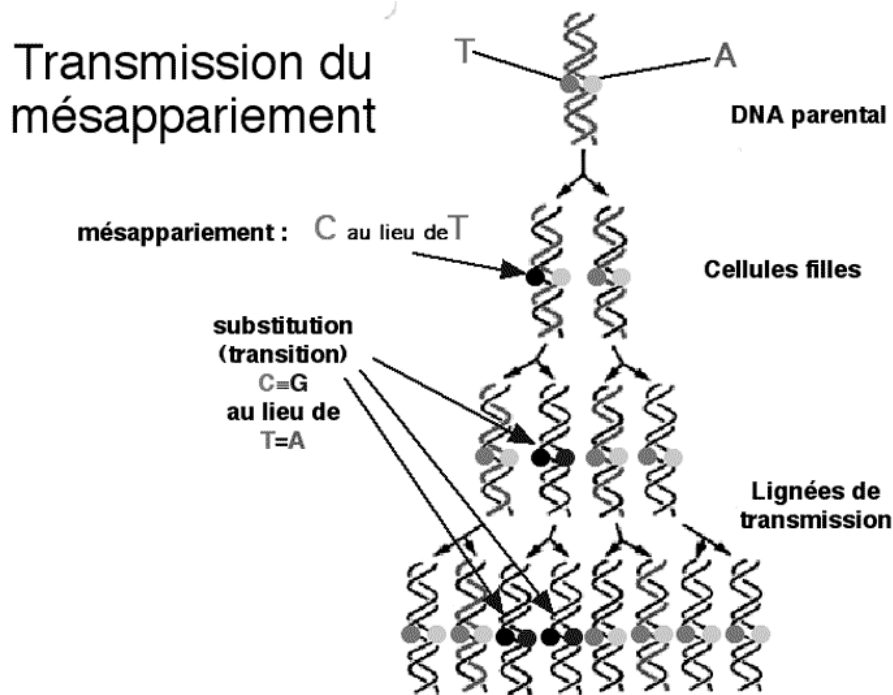
Mésappariements



BM 61

- Certaines bases azotées du DNA existent sous plusieurs formes tautomères résultant du déplacement inconstant des hydrogènes des fonctions amine ou énoïl. Ces formes sont plus rares que les formes habituelles des bases azotées mais dans un DNA modèle en cours de réplication certaines bases peuvent être momentanément sous une forme tautomère.
- La forme tautomère de l'adénine est l'imino-adénine, qui ne s'hybride pas avec la thymine mais avec la cytosine. De même l'énoïl-thymine s'hybride mieux avec la guanine au lieu de l'adénine et l'énoïl-guanine se lie avec la thymine plutôt qu'avec la cytosine. Ainsi la DNA polymérase va condenser sur le DNA qu'elle construit des bases azotées différentes de celles attendues.
- Lorsque la base azotée du brin modèle aura repris sa forme habituelle elle ne pourra plus s'hybrider avec la base du brin nouveau et il en résultera des mésappariements.

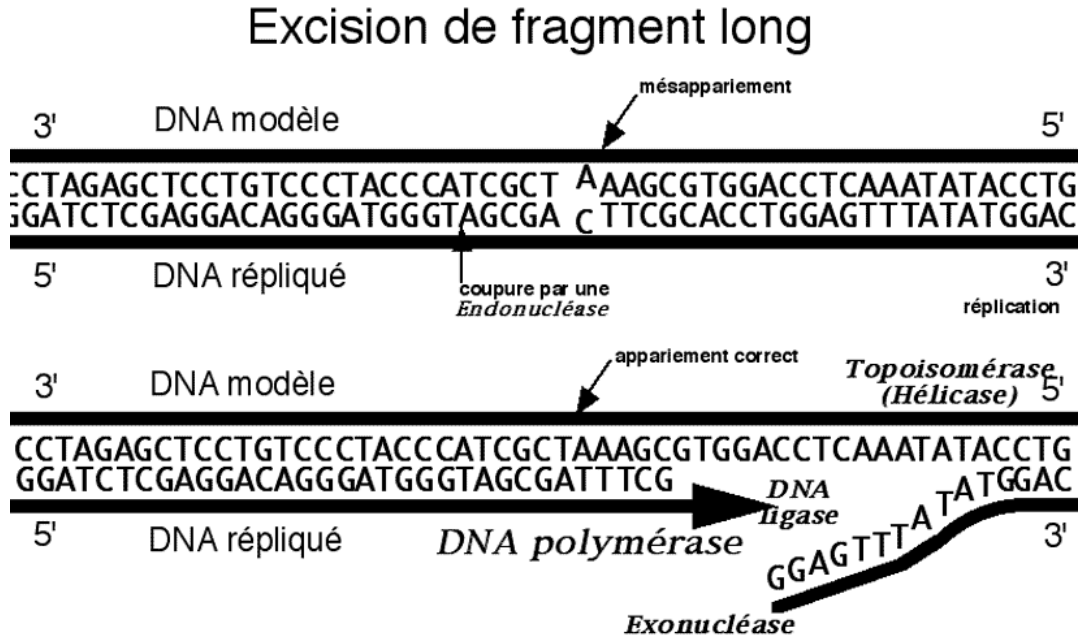
7.5 Transmission du mésappariement



BM 61/1

- Un mésappariement fait apparaître deux nucléotides non complémentaires à la même position sur les brins du DNA.
- Chacun des deux brins au cours de la mitose suivante se répliquera en produisant un nucléotide complémentaire. Le nucléotide anormal engendrera une transition permanente dans une des deux cellules filles.
- Ici nous avons sur les brins parentaux une paire de nucléotides A=T. A la génération suivante le brin qui porte le A, par suite d'une iminisation, produit un brin complémentaire avec un C à la place du T attendu (C=A). Dans l'autre cellule la séquence est normale (T=A).
- A partir de là, toutes les cellules dont le DNA a été répliqué à partir du brin porteur de la substitution auront à ce niveau une paire C≡G. La substitution est devenue permanente. Si elle est située dans un gène, elle peut engendrer une mutation.

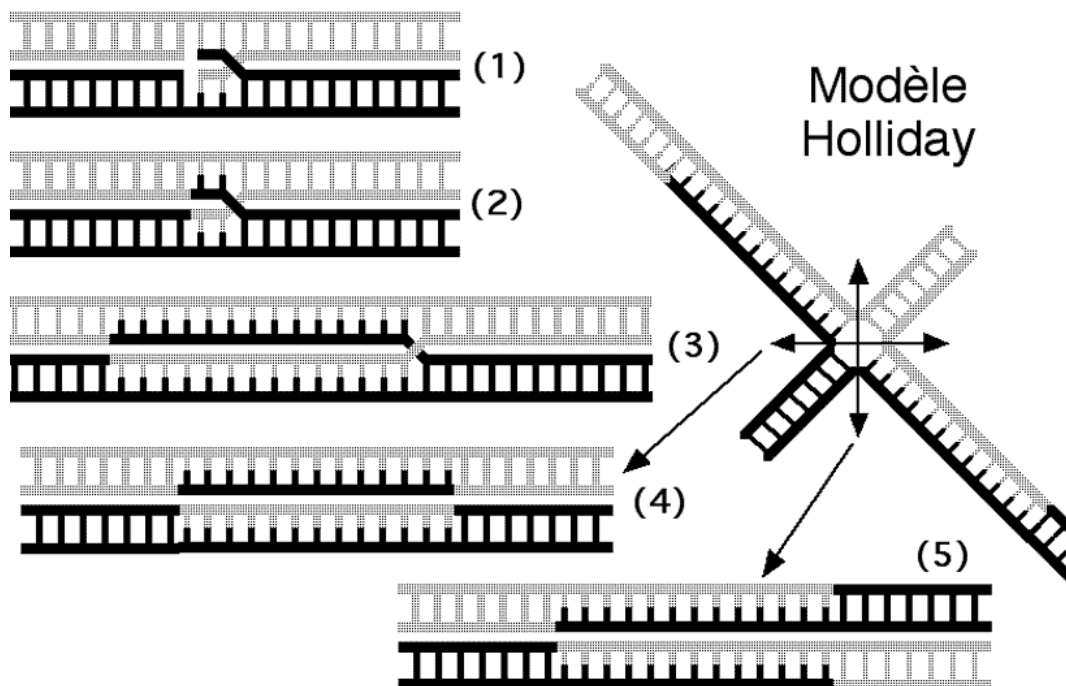
7.6 Excision de fragment long



BM 61/3

- Lorsqu'un fragment de DNA est endommagé, la simple excision de base ne suffit plus à réparer. En particulier les mésappariements qui ne seraient pas réparés par la DNA polymérase δ au cours de la réplication, sont immédiatement repérés parce que la double hélice ne se forme pas normalement.
- Une endonucléase coupe alors le brin porteur de la lésion à une distance de cinq nucléotides. Puis sous l'effet d'une topoisomérase (hélicase ou facteur TFIIH) le brin lésé est séparé du brin sain. A partir de l'extrémité 3'OH de la brèche ainsi créée, une DNA polymérase β reconstitue le fragment complémentaire et la dernière liaison sera refermée par la DNA ligase.

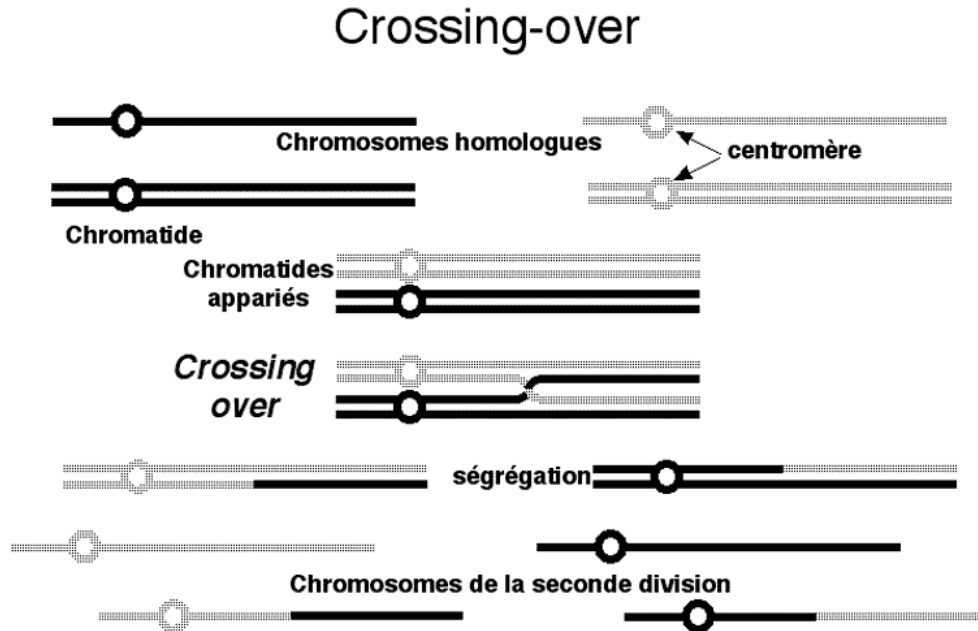
7.7 Modèle Holliday



BM 62

- L'ouverture d'une brèche dans un brin de DNA et le déroulement de la double hélice permet à des fragments de DNA simple brin de s'hybrider de façon anormale.
- L'existence de séquences homologues sur l'autre chromosome de la même paire peut conduire ce brin libre à s'hybrider avec la séquence complémentaire du chromosome homologue (1).
- Dans ce cas les brèches au bout des deux brins échangés peuvent être refermées par la DNA ligase (2).
- Une telle structure avec entrecroisement de brins de deux DNA homologues est appelée structure Holliday (du nom de son découvreur en 1964). Cette structure est mobile et l'échange peut se propager par glissement de la structure le long des deux hélices en allant dans le même sens (3).
- On peut représenter la structure Holliday en séparant les hélices en forme de croix. Cela permet de voir qu'il y a deux façons de séparer les deux hélices : soit en coupant horizontalement (flèche rouge) et on obtient alors un échange de fragment de DNA entre les deux chromosomes (4), soit en coupant verticalement (flèche jaune) et on aboutit alors à un échange complet des DNA des deux chromosomes au delà du point de croisement (5).

7.8 *Crossing-over*



BM 62/2

- Les échanges entre chromosomes homologues peuvent conduire à des échanges de fragments ou à des échanges de brins entiers de DNA.
- Au cours de la méiose en particulier, de tels échanges se produisent fréquemment entre les chromosomes d'origine paternelle ou maternelle de telle sorte que les gènes des chromosomes des cellules filles (gamètes) sont une recombinaison hétérogène de fragments des deux origines.
- Le résultat implique un mélange de caractères héréditaires des deux parents qui constituent le patrimoine du nouvel individu, bien que l'homologie des échanges garantisse le maintien de chaque gène sur chaque locus avec un allèle (homozygote) ou deux (hétérozygote).

Partie III

Les événements génétiques

Rappel des objectifs

- Définir¹ les termes : variation (= substitution ou mutation silencieuse), mutation (= exprimée), délétion/insertion, répétition.
- Donner des exemples² parmi les événements génétiques suivants qui aboutissent à une pathologie : mutation ponctuelle, délétion (avec ou sans décalage du cadre de lecture), épissage défectueux, répétitions de triplet.
- Définir les termes : transposition, pseudogène, conversion de gène, famille ou superfamille de gènes.
- Donner un exemple de l'évolution d'une famille de gènes.

Grâce à des exemples de famille de gènes et de leur évolution ; l'étudiant devra expliciter le rôle des événements génétiques (duplications, conversions de gènes, inactivations de gènes) dans la diversification du patrimoine génétique des espèces, et montrer quels avantages sélectifs les espèces acquièrent avec ces changements pour l'adaptation à leur environnement.

-
1. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.
 2. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation dans laquelle un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.

Chapitre 8

Substitutions

8.1 Substitution

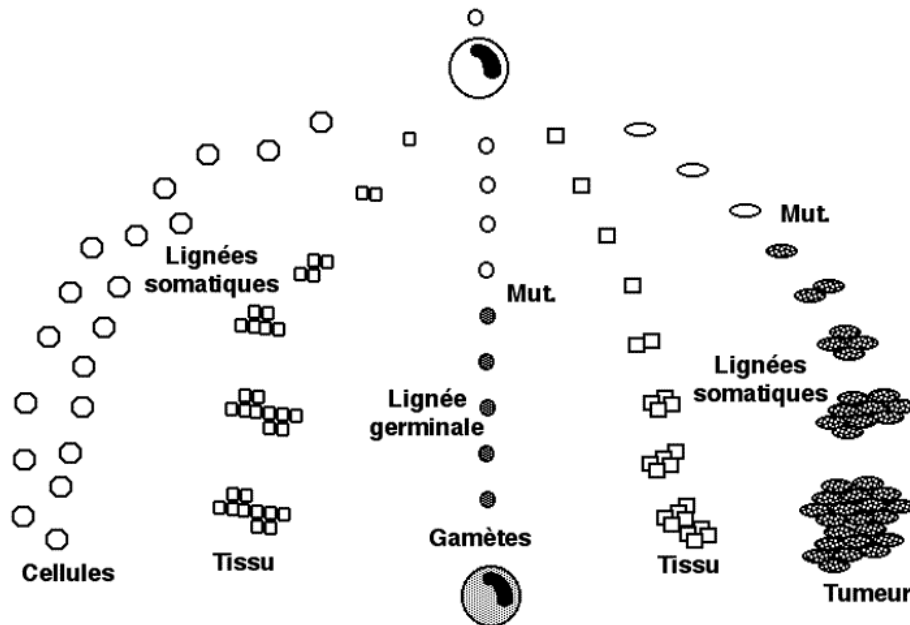
SUBSTITUTION

- **Remplacement d'un nucléotide par un autre dans la structure primaire d'un acide nucléique**
- **Purine ↔ Purine
Pyrimidine ↔ Pyrimidine = Transitions**
- **Purine ↔ Pyrimidine
Pyrimidine ↔ Purine = Transversions**

BM 63

- Au cours de l'évolution, la transmission du message génétique de cellule à cellule, d'individu à individu, d'espèce à espèce se fait avec des modifications ponctuelles de la structure primaire du DNA, qui sont transmises héréditairement si elles sont compatibles avec la reproduction.
- Ces modifications sont de trois sortes :
 - substitution, c'est à dire remplacement d'un nucléotide par un autre
 - délétion, c'est à dire suppression d'un ou de plusieurs nucléotides
 - insertion, c'est à dire addition d'un ou de plusieurs nucléotides.
- Les substitutions de purine à purine ou de pyrimidine à pyrimidine (transitions) sont les plus fréquentes :
 - A → G, C → T, G → A et T → C
- Les autres substitutions sont des transversions :
 - A → C, A → T, C → A, C → G, G → C, G → T, T → A et T → G

8.2 Somatique, germinale



BM 63/1

- L'effet d'une mutation est différent selon que cette mutation affecte le DNA d'une cellule somatique ou d'une cellule de la lignée germinale.
- Lorsque le DNA d'une cellule somatique est modifié et qu'il en résulte une mutation, les cellules issues de cette cellule mutée forment un clone de cellules mutées qui présente des caractères différents de ceux du tissu d'origine. De tels clones constituent souvent des tumeurs cancéreuses. Les mutations somatiques ne sont pas transmises à la descendance.
- Lorsque le DNA d'une cellule germinale est modifié et qu'il en résulte une mutation, celle-ci sera transmise par les gamètes et apparaîtra dans la descendance : la mutation est alors héréditaire.

8.3 Faux-sens, non-sens

T-->C transition

TTT-->TTC Phe --> Phe synonyme

TTT-->CTT Phe--> Leu faux-sens

TTT-->TCT Phe --> Ser faux-sens

A-->T transversion

AAA-->AAT Lys --> Asn faux-sens

AAA-->ATA Lys --> Ile faux-sens

AAA-->TAA Lys --> STOP non-sens

BM 63/2

- Une substitution peut aboutir à des résultats très différents après la traduction. Cela dépend de sa position par rapport au cadre de lecture. Les transversions font plus de mutations que les transitions.
- Une substitution dans un codon peut se traduire par le même acide aminé : on dit qu'elle est synonyme. Il n'y aura pas de modification de l'acide aminé traduit.
- Une substitution dans un codon peut se traduire par un acide aminé différent : on dit qu'elle est faux-sens. Elle sera d'autant plus délétère pour les fonctions de la protéine que le nouvel acide aminé sera différent de celui qui aurait du être traduit.
- Une substitution dans un codon peut se traduire par un codon de terminaison : on dit qu'elle est non-sens. La protéine traduite sera tronquée à cet endroit.

8.4 Polymorphisme Xba I de l'apoB

Génotype X1 (fréquent)

5' 35190 35200 35210 35220 3'

AAG GCC AAA TTC CGA GAG ACI CTA GAA GAT ACA CGA

Hae III Xba I

Lys Ala Lys Phe Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg

2485 2490

Génotype X2 (rare)

5' 35190 35200 35210 35220 3'

AAG GCC AAA TTC CGA GAG ACC CTA GAA GAT ACA CGA

Hae III

Lys Ala Lys Phe Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg

2485 2490

BM 64

- Le polymorphisme de restriction Xba I de l'apolipoprotéine B résulte d'une substitution T → C, synonyme, qui fait disparaître un site de restriction Xba I (TCTAGA) sur le DNA de certains sujets.
- Cette substitution n'entraîne pas de mutation dans l'apoB et n'a donc aucune conséquence directe sur la santé des sujets. Toutefois les sujets porteurs du génotype X2 sur leurs deux gènes d'apoB (homozygotes), ont un taux d'apoB et des lipides sanguins moins élevés que les sujets de génotype X1, et par conséquent un risque plus faible de souffrir d'athérome et de maladies cardio-vasculaires. Le lien entre ce polymorphisme et les lipides sanguins est encore inconnu.

8.5 Marqueur génétique

Marqueur génétique

- **Modification structurale du DNA statistiquement liée à un caractère héréditaire sans en être la cause.**

BM 64/1

- La recherche diagnostique d'un tel marqueur : polymorphisme de fragments de restriction, amplification d'une séquence répétitive, etc... permet de conclure à la probabilité de l'existence d'un caractère lié statistiquement à ce marqueur : mutation inconnue ou pathologie dont l'origine génétique n'est pas expliquée.
- Le diagnostic de la présence d'un marqueur génétique chez un sujet n'est habituellement pas une certitude à 100 % de la survenue de la pathologie liée à ce marqueur : on parle alors de facteur de risque.

Chapitre 9

Mutations

9.1 Mutation

MUTATION

- **Changement permanent de la structure de l'acide désoxyribonucléique conduisant à une structure primaire différente et devenue permanente de la protéine exprimée.**

BM 65

- Les substitutions de base nucléiques dans le DNA conduisent :
 - soit à l'incorporation d'un acide aminé différent dans la protéine (substitution non-synonyme),
 - soit à l'incorporation du même acide aminé dans la protéine (substitution synonyme). Les substitutions synonymes résultent de la dégénérescence du code génétique.
- Lorsqu'une substitution non-synonyme se produit dans le DNA d'un sujet (génotype) et aboutit à l'incorporation d'un acide aminé fonctionnellement différent dans la structure primaire d'une protéine, il en résulte l'apparition d'un caractère différent (mutation) dans le phénotype de l'individu.
- Toute autre modification entraînant une protéine traduite plus longue ou plus courte, ou encore un décalage de la lecture des codons, se traduit par une séquence primaire différente et donc la plupart du temps une mutation dans le phénotype de l'individu.

9.2 Mutation Arg3500→Gln de l'apoB-100

Génotype normal

5' 3'
 TTG AAT TCC AAG AGC ACA CGG TCT TCA GTG AAG CTG
 EcoR I

Leu Asn Ser Lys Ser Thr Arg Ser Ser Val Lys Leu
 3495 3500 3505

Génotype mutant

(déficiência familiale en apoB-100)

5' 3'
 TTG AAT TCC AAG AGC ACA CAG TCT TCA GTG AAG CTG
 EcoR I

Leu Asn Ser Lys Ser Thr Gln Ser Ser Val Lys Leu
 3495 3500 3505

BM 66

- La mutation 3500 de l'apolipoprotéine B-100 résulte d'une substitution G→A non synonyme, qui à la traduction code pour le 3500^e acide aminé de l'apoB-100, Glutamine au lieu d'Arginine.
- La présence de cette mutation n'entraîne pas de modification de sites de restriction et on ne peut pas la détecter directement par un polymorphisme de longueur des fragments de restriction.
- La présence de cette mutation, retrouvée en France chez une personne sur 500, est un facteur de risque vis-à-vis de l'athérome et des maladies cardio-vasculaires, parce qu'elle perturbe la liaison de l'apolipoprotéine B-100 avec le récepteur cellulaire des lipoprotéines de basse densité (LDL).

Chapitre 10

Insertions - délétions

10.1 Délétion

DELETION

- **Suppression d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence primaire d'un acide nucléique.**

BM 67

- Au cours de l'évolution, la transmission du message génétique de cellule à cellule, d'individu à individu, d'espèce à espèce se fait avec des modifications ponctuelles de la structure primaire du DNA, qui sont transmises héréditairement si elles sont compatibles avec la reproduction.
- Ces modifications sont de trois sortes :
 - substitution, c'est à dire remplacement d'un nucléotide par un autre
 - délétion, c'est à dire suppression d'un ou de plusieurs nucléotides
 - insertion, c'est à dire addition d'un ou de plusieurs nucléotides.
- Les délétions sont d'importance variable selon leur longueur :
 - de 1 ou 2 nucléotides, elles décalent le cadre de lecture (codons)
 - de 3 nucléotides, elles aboutissent à la suppression d'un acide aminé dans la protéine exprimée
 - de grande longueur, elles peuvent supprimer l'expression d'un ou de plusieurs exons, voire d'un gène entier.

10.2 Décalage du cadre de lecture

Décalage du cadre de lecture

^{codon 59}
ACGGAACTGGTAACTTCTTGAGCTATTTTCGTGGAACTT
 ThrGluLeuValAsnPheLeuSerTyrPheValGluLeu
GGAACACAGCCTGCCACCCAGTGA
 GlyThrGlnProAlaThrGln

*
ACGAACTGGTAACTTCTTGAGCTATTTTCGTGGAACTTG
 ThrAsnTrpLeuThrSer

GAACACAGCCTGCCACCCAGTGA

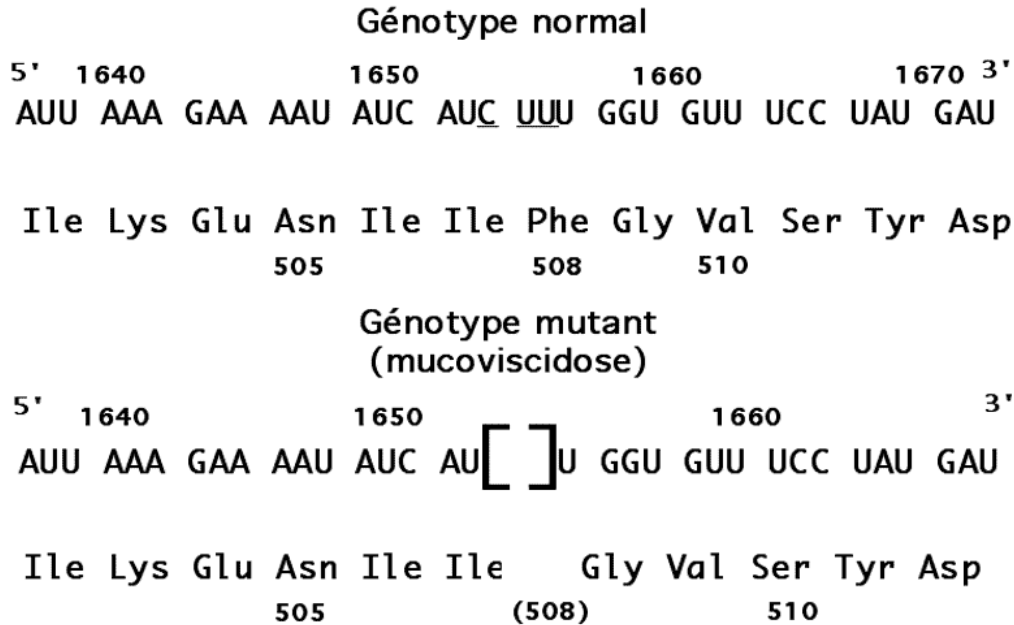
**
ACGACTGGTAACTTCTTGAGCTATTTTCGTGGAACTTG
 ThrThrGly

AACACAGCCTGCCACCCAGTGA

BM 67/2

- Le cadre de lecture, déterminé une fois pour toute la traduction, est essentiel à la synthèse exacte d'une protéine de 77 acides aminés (apoA-II).
- Une délétion *, emportant le premier nucléotide du codon 59 décale d'une lettre le cadre de lecture et aboutit à la synthèse de cinq acides aminés faux, suivis d'un codon Stop. La protéine produite est inexacte et tronquée (63 aa).
- De même si on retire les deux premiers nucléotides ** du codon 59 on aboutit encore à une protéine fautive et tronquée (60 aa). Dans les deux cas, on dit qu'il y a « décalage du cadre de lecture ».
- Si on retirait trois nucléotides, il y aurait un ou deux acides aminés inexacts mais le cadre de lecture resterait le même et la traduction se poursuivrait normalement avec un acide aminé de moins (76 aa).

10.3 Délétion Phe 508 de CFTR

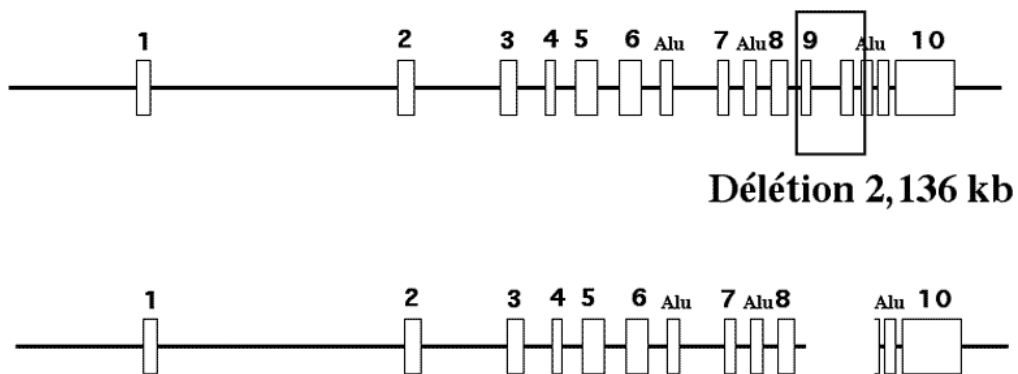


BM 67/3

- La mutation Δ Phe508 du gène CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) résulte d'une délétion qui fait disparaître les nucléotides 1653 à 1655 du messenger (CUU).
- Le gène CFTR code pour un transporteur d'anions (chlore) qui régule les transsudations à travers les épithéliums et la peau.
- La délétion n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture et le changement du troisième nucléotide du codon 507 ne change pas l'acide aminé (isoleucine) ; mais la seule conséquence est l'absence de l'acide aminé 508 (phénylalanine). Cette absence suffit à inhiber l'activité du transporteur.
- La présence de cette délétion, retrouvée en France chez une personne sur 500, est une des causes les plus fréquentes de la mucoviscidose (*cystic fibrosis*).

10.4 Délétion de l'exon 9 de la lipoprotéine-lipase

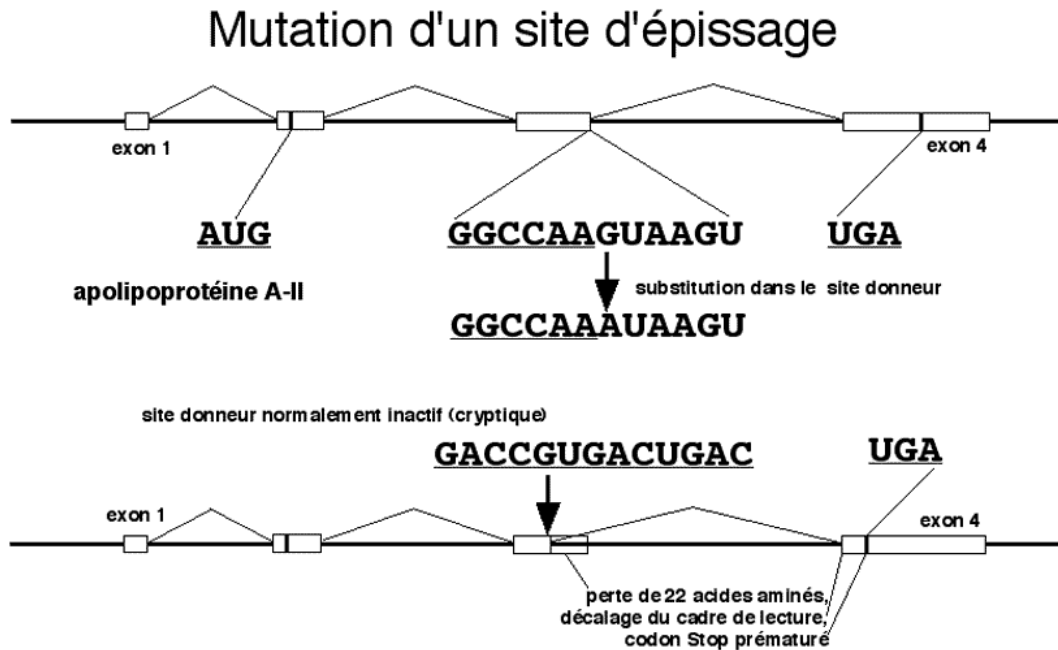
LPL humaine



BM 68

- Une délétion large (dans l'exemple représenté ici 2136 nucléotides) entraîne souvent l'inactivation du gène. Dans le cas présent la délétion s'étend depuis l'intron 8 jusqu'à l'intron 9 du gène de la lipoprotéine lipase, et par conséquent supprime la totalité de l'exon 9 de ce gène.
- Il est probable que l'excision épissage de l'intron coupé ne peut pas se faire avec le site receveur de l'intron 9 et donc que la maturation du transcrit n'est pas possible.
- On constate chez un sujet porteur de cette délétion sur ses deux chromosomes 8 (homozygote), une absence d'expression du gène et par conséquent, l'absence de la lipoprotéine lipase en tant que protéine, ainsi que de son activité enzymatique dans le plasma sanguin.

10.5 Mutation d'un site d'épissage



BM 69/1

- Une substitution peut altérer un site d'épissage. Ainsi le site donneur de l'intron 3 de l'apoA-II est-il transformé de GT en AT dans une famille de malades, ce qui le rend inactif pour l'excision de cet intron.
- Il existe au milieu de l'exon 3 une séquence qui peut servir de site donneur alternatif mais qui est normalement inactive (site donneur cryptique). En l'absence du site donneur normal, c'est ce site cryptique qui va servir à exciser l'intron 3.
- Mais comme ce site cryptique est situé 65 nucléotides en amont du site normal il y aura 22 acides aminés de l'exon 3 qui ne seront pas traduits. En outre, le nombre de nucléotides perdus n'étant pas un multiple de 3 il y aura décalage du cadre de lecture, ce qui entraîne une traduction fautive des 10 premiers acides aminés de l'exon 4 et la rencontre d'un codon Stop prématuré.
- La protéine tronquée ne s'exprime pas et l'apolipoprotéine A-II est absente du plasma de ces malades.

10.6 Insertion

INSERTION

- **Addition d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence primaire d'un acide nucléique.**

BM 70

- Au cours de l'évolution, la transmission du message génétique de cellule à cellule, d'individu à individu, d'espèce à espèce se fait avec des modifications ponctuelles de la structure primaire du DNA, qui sont transmises héréditairement si elles sont compatibles avec la reproduction.
- Ces modifications sont de trois sortes :
 - substitution, c'est à dire remplacement d'un nucléotide par un autre
 - délétion, c'est à dire suppression d'un ou de plusieurs nucléotides
 - insertion, c'est à dire addition d'un ou de plusieurs nucléotides.
- Les insertions sont d'importance variable selon leur longueur :
 - de 1 ou 2 nucléotides, elles décalent le cadre de lecture (codons)
 - de 3 nucléotides, elles aboutissent à l'addition d'un acide aminé dans la protéine exprimée
 - de grande longueur, elles peuvent modifier complètement la traduction des exons
 - dans les introns ou dans les exons non-traduits, on rencontre souvent de longues insertions de structure variable qui sont sans effet apparent sur l'expression du gène.

Chapitre 11

Transpositions

11.1 Transposition

TRANSPOSITION

- **Incorporation d'une séquence d'acide désoxyribonucléique nouvelle dans une coupure du DNA génomique d'une cellule.**

BM 71

- Au cours de l'évolution des espèces, le génome s'agrandit continuellement par suite de duplications de gènes et de transpositions.
- Les duplications se produisent en tandem, une séquence se trouvant répétée deux fois dans le génome à la suite de la duplication. Cette duplication permet à chacune des copies de la séquence d'évoluer pour son propre compte ce qui augmente les chances de produire des caractères nouveaux.
- Les transpositions résultent de l'incorporation d'acides nucléiques synthétisés hors du génome :
 - soit par incorporation du DNA d'un virus,
 - soit par transcription réverse d'un RNA de la cellule ou d'un virus, au moyen d'une reverse-transcriptase qui produit un DNA complémentaire (cDNA) et d'une transposase qui l'incorpore au génome de la cellule.

11.2 Séquence Alu

**ACACCCACTGGCCAGTCCTAGAGCTCCTGTCCCTACCCACTCTTTGCTA
CAATAAATGCTGAATGAATCCAGCTCTGAGCCTGGTATGTTTGGGGGAC
TGGGAAAAGTAGGGGAGTAAGGGAGGAGAAGAGGAAGGAAAAGGAAAA
TCTGCTTCTAGAAGGAGAGAGGTTTGAGTGTGGAGGGGTGAAGAAAGGA
TTGAAGACACAACCTGATGAAAATGACAGGATGAGGGTGCCGTGATTCTC
CAAACCCAGAGTCTCCTACAGCCTGGGCACGACTCTGCAGGTGAACACT
AAAGAGGCTTTGCATTGCACAAGGAAC TAGGAGAGGAAGGAAGGATTCA
CAAACCTGAATCCCTCGATTTCTGGAGGTCATAGAAAATGAGGGTACCCT
GGTGGGGTGCAGTGGCTCACACCTGTAATCCCTGCAC TTTGGGAGGCCA
AGGTAGGTGGATCACTTGAGATCAGGAGTTCCAGACCAGCCTAGCCAAC
ATGGTAAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCAGGTGTTG
TGGCACGTGCCTGTAATCCAGCTACTCGGGAGACTGAGGCATGAGAAT
CTTTTGAACCGGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGACATCGTGCCACT
GCACTCCAGCCTAGGTGACAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGTAAAGAAAAAAAAAGAAAATGAGGGTACCCT
CATAATTTCTGTTAGTCATTCTATGAAGAAAAGAAAGCTT**

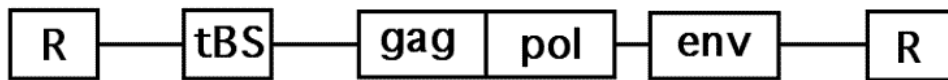
BM 72

- A peu de distance en aval du gène de l'apoA-II, on rencontre une séquence transposée de la famille Alu.
- C'est un pseudogène, entouré de deux séquences répétées (GAAAATGAGGGTACCCT) qui sont caractéristiques des séquences transposées. Entre ces deux séquences on trouve deux séquences homologues séparées par une courte séquence de liaison (TACTAAAATA-CAAAAATTA). Plusieurs sites caractérisent encore cette séquence Alu : site d'initiation de la RNA-polymérase III, site de restriction de l'enzyme Alu I (d'où le nom de séquence Alu), queue poly-A. La séquence Alu résulte d'une transposition de la séquence du RNA 7 S, RNA de structure de la SRP (*Signal Recognition Particle*).
- Il y a près d'un million de séquences Alu de ce type dans le DNA humain, soit une tous les 4 kb. Il en est de même chez la plupart des Primates et des Rongeurs. D'autres séquences transposées sont connues chez l'Homme ou d'autres Mammifères.

11.3 Virus

8500 paires de bases

RNA du virus HIV

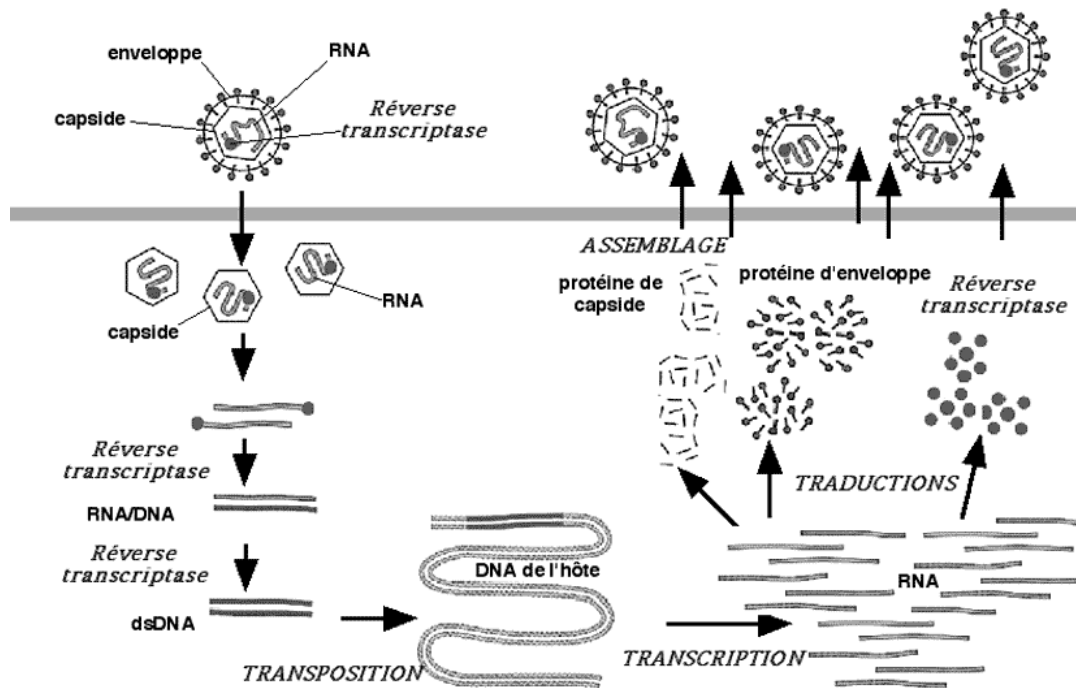


Virus

BM 72/5

- L'acide ribonucléique du virus HIV lorsqu'il pénètre dans le sang est reconnu par le récepteur CD4 des lymphocytes T4. La formation du complexe récepteur CD4 - virus entraîne la fusion de l'enveloppe du virus et de la membrane du lymphocyte, et par conséquent l'entrée du virus dans le cytoplasme.
- Ce noyau contient une enzyme la reverse transcriptase et un RNA viral porteur de l'information génétique. L'enzyme catalyse la rétrotranscription de le RNA viral en DNA et l'incorporation de ce DNA (provirus) dans le DNA du lymphocyte.
- Le provirus engendre de nouvelles particules virales par transcription et traduction et la mort de la cellule par destruction de son DNA. Les particules virales nouvelles sont libérées pour transmettre le « signal » à d'autres lymphocytes T4.
- Le nombre de lymphocytes T4 diminue jusqu'à ce que les défenses immunitaires du sujet deviennent insuffisantes (SIDA) ce qui entraîne le développement d'infections opportunistes et à terme la mort du sujet atteint.

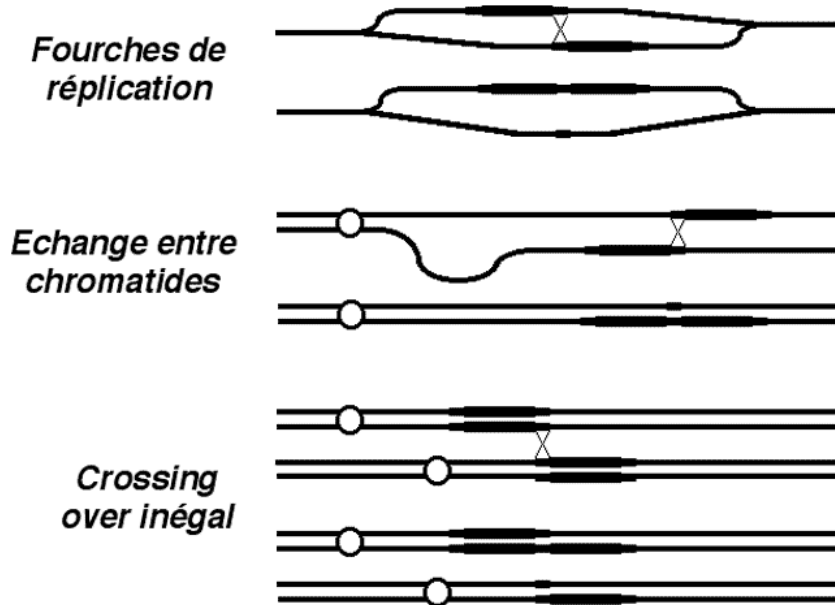
11.4 Cycle d'un rétrovirus



BM 72/6

- La particule du rétrovirus est composée d'une enveloppe protéinique, entourant une « capside » également protéinique qui contient le patrimoine génétique du rétrovirus sous forme d'un RNA simple brin contenant la transcription du gène de la reverse transcriptase et des gènes des protéines des enveloppes.
- Lors de l'infestation d'une cellule, seule la capside pénètre à travers la membrane plasmique puis libère le RNA dans le cytoplasme où il s'exprime comme un messageur. La reverse transcriptase ainsi synthétisée est une enzyme capable de :
 1. transcrire (à l'envers) le RNA du virus en DNA complémentaire (hybride RNA:DNA) puis
 2. détruire le RNA pour le remplacer par un deuxième brin de DNA.
- Le DNA double-brin se transpose alors dans le DNA nucléaire de la cellule-hôte d'où il peut à nouveau être transcrit en multiples copies de RNA du virus. La traduction de ces RNA aboutit à la synthèse de protéines qui s'assemblent autour des RNA pour constituer de nouvelles particules virales en très grand nombre (amplification du virus).
- Enfin la cellule-hôte meurt en libérant les particules virales et le cycle recommence.

11.5 Duplication de gène



BM 72/7

- De nombreuses situations peuvent conduire à la duplication d'un fragment de DNA. Ces duplications sont facilitées par l'existence de séquences répétitives directes (séquences identiques dans le même sens à faible distance sur le même brin de DNA).
- Dans la bulle de réplication, des séquences répétitives directes peuvent conduire à un appariement inégal des deux brins de DNA répliqués et aboutir après échange des deux brins à la répétition d'un fragment de DNA.
- Lorsque l'échange de brins se fait dans la même chromatide après la réplication ; la répétition en tandem du même fragment se retrouve sur un seul des deux brins.
- Au cours de la méiose des échanges peuvent encore se produire entre chromatides, comme dans le « *crossing-over* » normal, mais en répartissant de façon inégales les brins à la suite d'un échange de brins au niveau des séquences répétitives. Dans ce cas les séquences d'origine paternelle et maternelle se retrouvent à la suite sur le même brin de DNA, aboutissant à deux gènes presque identiques (appelés paralogues).
- Dans chacun de ces cas, le DNA porteur de répétitions bénéficie souvent de deux gènes identiques codant pour la même protéine. Cette disposition confère aux individus qui reçoivent ce patrimoine génétique une meilleure résistance aux mutations qui peuvent survenir sur un gène, donc un avantage sélectif en faveur des gènes dupliqués.

11.6 Pseudogène

PSEUDOGENE

- **Gène qui par suite de modifications de sa structure, ne peut plus être transcrit et/ou traduit en protéine.**
- **= gène non exprimé.**

BM 73

- Certains gènes apparus par duplication au cours de l'évolution ont subi des événements génétiques (substitutions, insertions, délétions, etc...) qui empêchent la transcription ou la traduction de se faire.
- A titre d'exemple, une duplication du gène de l'apolipoprotéine C-I a produit un gène apoC-I', il y a 40 millions d'années dans le génome des Primates. Mais, une mutation récente a transformé le dernier acide aminé du signal-peptide de la protéine exprimée par ce gène en codon Stop ! Il en résulte que même si la transcription conduit à un RNA messenger, celui-ci ne peut être traduit que par un signal-peptide sans protéine à sa suite.

11.7 Conversion de gène

CONVERSION DE GENE

- **Transposition d'une séquence de DNA d'un gène, vers une copie du même gène anciennement dupliqué (copies homologues) ayant pour résultat de reconstituer l'homologie des gènes dupliqués.**

BM 74

- Les séquences de gènes peuvent être transformées par échange d'exons complets par une transposition à partir d'un autre gène.
- La transposition d'un exon peut ajouter un domaine nouveau dans la structure d'une protéine ou restaurer un domaine devenu non fonctionnel au cours de l'évolution.

Partie IV

L'évolution

Chapitre 12

Divergence

12.1 Divergence

DIVERGENCE

- **Comparaison de deux séquences alignées d'acide désoxyribonucléique exprimée par le rapport :**
$$\frac{\text{nombre de nucléotides différents}}{\text{nombre de nucléotides total.}}$$

BM 75

- Lorsque deux séquences primaires d'acides nucléiques se ressemblent on tente de les aligner au mieux pour obtenir un nombre minimum de différences entre les deux séquences : substitutions, insertions ou délétions.
- La divergence entre les deux séquences est alors le pourcentage de nucléotides différents par rapport au nombre total de nucléotides alignés.
- La divergence est habituellement très faible entre les séquences d'un même gène à l'intérieur d'une espèce (< 1 %). De même elle reste faible même pour des espèces très éloignées pour des protéines ayant une importance métabolique primordiale.
- La divergence peut-être grande, même d'un individu à l'autre, pour des segments de DNA entre les gènes ou dans les introns sans fonctions génétiques (séquences hypervariables).

Chapitre 13

Familles de gènes

13.1 Famille de gènes

FAMILLE DE GENES

- **Ensemble de gènes, homologues par la structure, la séquence et la fonction de leur produit, qui ont évolué à partir d'un gène ancestral commun.**

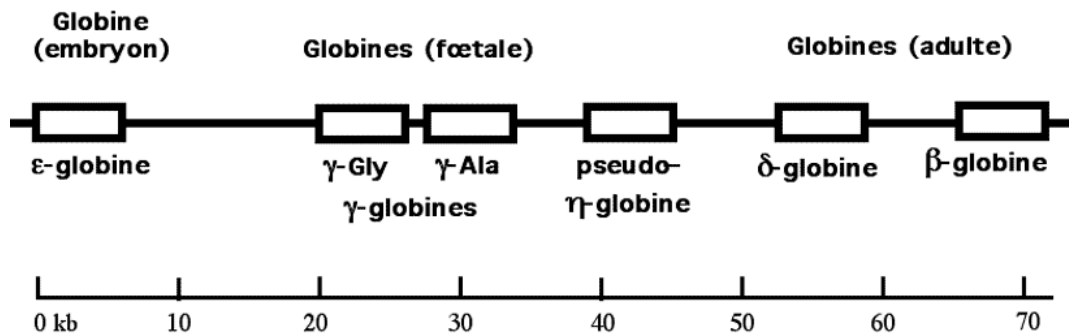
BM 76

- Une forme particulière d'insertion a joué un rôle majeur dans l'évolution des espèces d'eucaryotes : la duplication des gènes. Lorsque la séquence d'un gène a été répétée deux fois dans le même DNA et que les deux gènes continuent à s'exprimer, ils évoluent différemment pour aboutir au bout de nombreux millions d'années à exprimer des protéines différentes, ce qui peut apporter un avantage sélectif à l'espèce.
- Dans les gènes ou dans les protéines qui sont issus d'un gène ancestral unique, on retrouve toujours une homologie de structure (exons, introns) de séquences primaires (DNA, protéines) et de fonctions (activités des protéines). Ces gènes constituent ensemble une famille de gènes dont on peut reconstruire l'arbre phylogénétique en suivant l'évolution du gène ancestral et de ceux qui en sont issus à travers le temps et l'évolution des espèces.

13.2 Gènes des β -globines

Gènes des β -globines

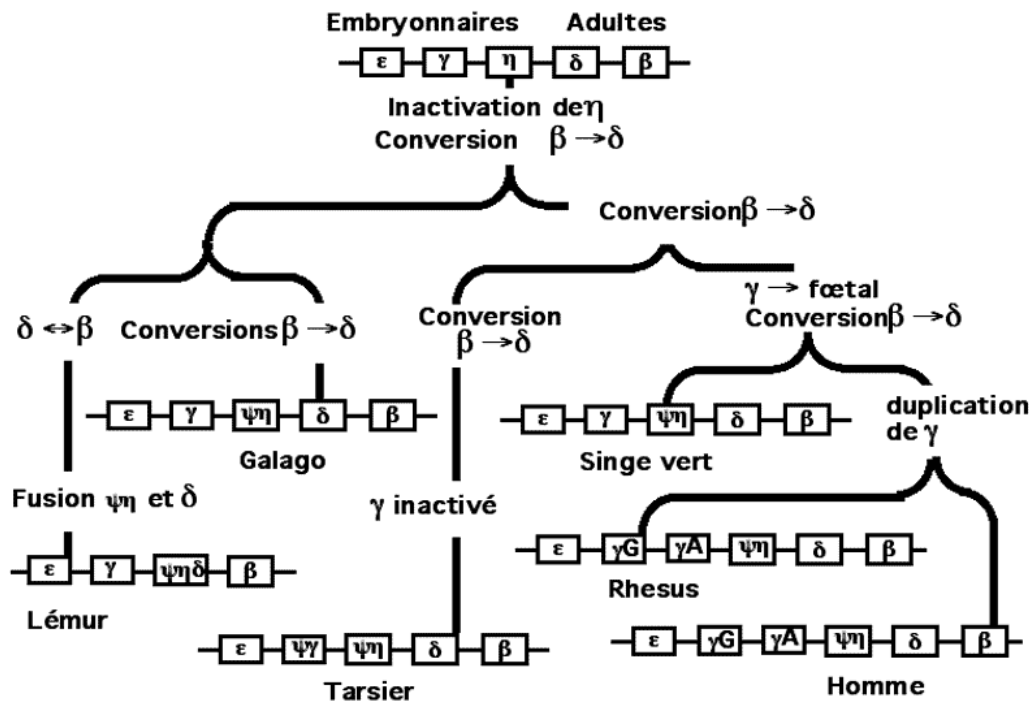
Chromosome 11



BM 78

- Plusieurs gènes existent pour exprimer les chaînes d'acides aminés qui constituent l'hémoglobine : α -globines sur le chromosome 16 et β -globines sur le chromosome 11. Sur ce dernier chromosome il existe cinq gènes exprimés successivement au cours du développement de l'individu dans les hémoglobines embryonnaires, fœtales et adultes.
- L'ensemble des cinq gènes constitue un groupe de gènes (*cluster*). Les cinq gènes sont dérivés dans l'évolution à partir d'un gène ancestral unique (chez les Invertébrés) par duplications successives.
- Le gène ϵ -globine est à l'extrémité 5' du groupe de gènes. Après un long intergène, on rencontre les deux gènes des γ -globines (γ -Gly et γ -Ala). Dans l'intergène suivant se trouve un pseudogène η -globine, qui n'est plus exprimé. Enfin vers l'extrémité 3' se rencontrent successivement les deux gènes exprimés chez les adultes δ -globine et surtout β -globine.

13.3 Famille des β -globines



BM 79

- L'évolution des gènes des β -globines chez les Primates est un bon exemple de l'évolution des gènes dupliqués dans un groupe de gènes.
- A l'origine les Primates reçoivent un ensemble de 5 gènes dont 3 sont destinés au stade de l'hémoglobine embryonnaire et 2 au stade adulte. Un de ces gènes a été inactivé très tôt et donnera le pseudogène η -globine chez tous les Primates.
- Dans toutes les lignées évolutives, il se produit des conversions du gène δ -globine par des séquences provenant du gène β . Chez les Lémurs, on observe une large délétion qui aboutit à la fusion du pseudogène η avec le gène δ . Chez les Tarsiers, le gène γ est inactivé en pseudogène. Chez tous les petits animaux on assiste à une diminution de l'activité des gènes embryonnaires.
- Chez les Singes au contraire, on voit apparaître l'hémoglobine foétale avec une spécialisation du gène γ dans cette fonction. Chez les Anthroïdes enfin, ce gène γ est encore dupliqué pour donner les gènes γ -Gly et γ -Ala des hémoglobines foétales.
- Au cours de l'évolution de ces lignées, l'expression relative des deux gènes de la globine adulte se modifie : les gènes sont exprimés également chez les animaux les plus primitifs, alors que chez l'Homme le gène δ n'est plus exprimé qu'à 1 % par rapport au gène β .

Partie V

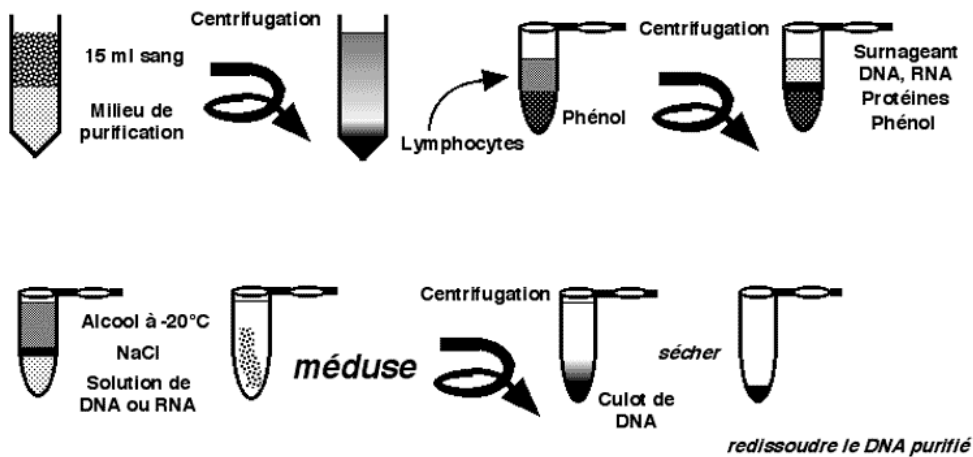
Le DNA au laboratoire

Chapitre 14

Méthodes d'étude

14.1 Extraction et purification du DNA

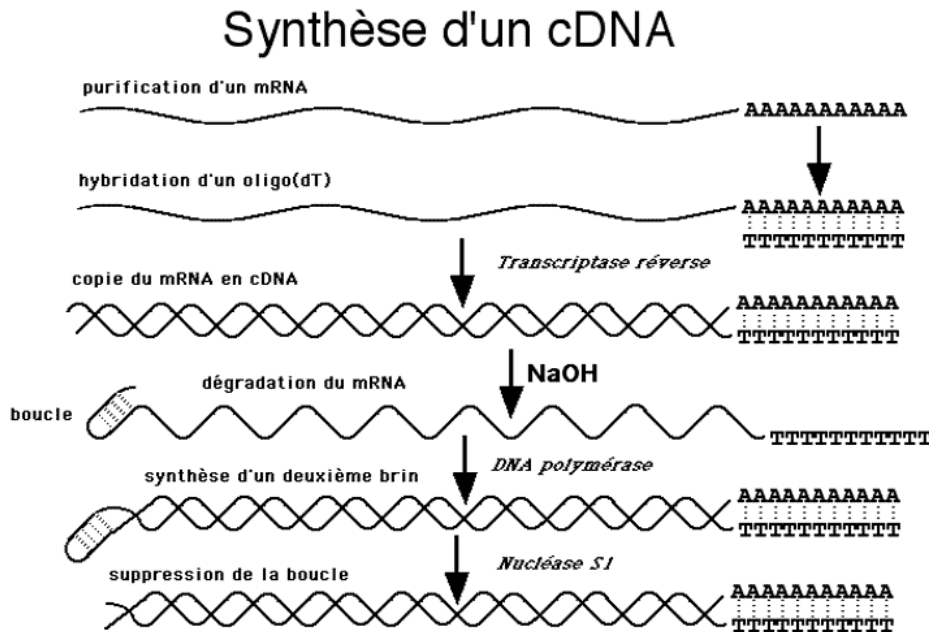
Extraction et purification du DNA



BM 15

- L'acide désoxyribonucléique est extrait à partir des lymphocytes d'une prise de sang sur EDTA (anticoagulant chélateur du Calcium).
- On sépare les lymphocytes des autres cellules sanguines par un gradient de densité, puis on les lave avant de les centrifuger en un culot de lymphocytes.
- On redissout ce culot dans un tampon et on pratique une extraction par le phénol, qui dissout les lipides et précipite les protéines en laissant les acides nucléiques en solution.
- On reprécipite enfin le DNA par l'alcool en présence de sel.
- Le DNA précipite en un nuage cotonneux blanchâtre (la « méduse ») qu'on recentrifuge et qu'on lave avant de redissoudre le DNA purifié dans de l'eau distillée.

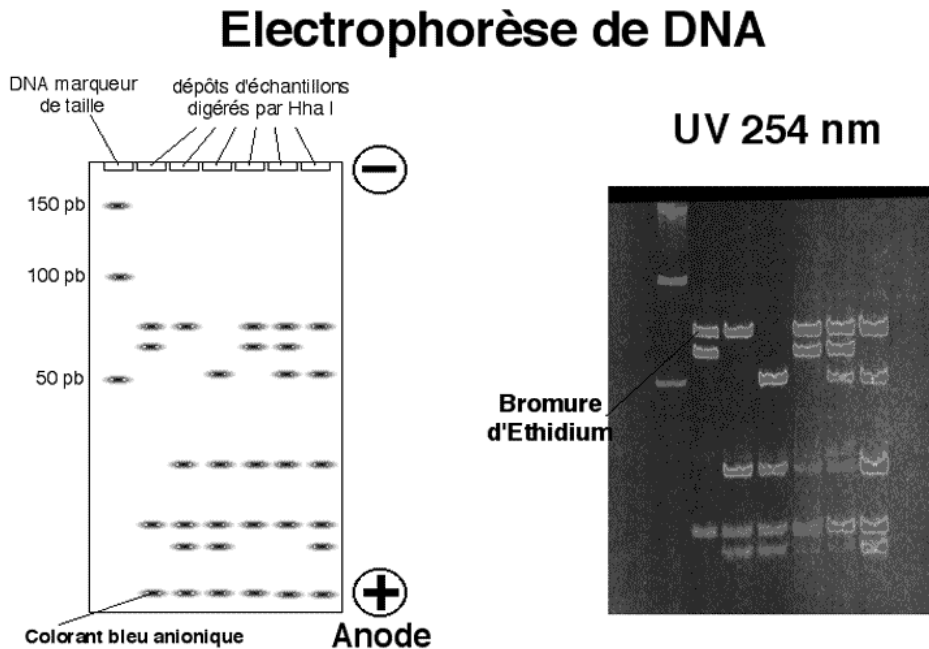
14.2 Synthèse d'un cDNA



BM 15/1

- La manipulation et l'étude des RNA est difficile à cause de leur grande sensibilité aux ribonucléases qui les détruisent.
- Il est nécessaire de recopier la séquence en DNA pour qu'elle soit plus stable et qu'on puisse l'amplifier en fonction des besoins.
- Le mRNA purifié (chromatographie d'affinité sur une colonne d'oligo-d(T)) est lié dans un premier temps avec des oligonucléotides poly(T) qui s'attachent à la queue poly(A).
- A partir de l'extrémité 3' de cette amorce poly(T) la transcriptase réverse, qui est une DNA polymérase, synthétise un brin de DNA complémentaire du messager de départ.
- Une fois cette synthèse achevée on dégrade le RNA par une base forte ou par une ribonucléase spécifique.
- Le brin de DNA fabriqué forme spontanément à son extrémité 3' une boucle en épingle à cheveux en s'hybridant sur lui-même.
- L'extrémité 3' de cette boucle va servir de site de démarrage pour la DNA polymérase qui va synthétiser un brin de DNA complémentaire du premier.
- Une nucléase spécifique du DNA simple brin supprimera la boucle de l'extrémité. Le cDNA double brin est prêt.
- On peut ainsi constituer autant de cDNA qu'il existe de messagers dans une cellule : l'ensemble de ces cDNA forme une « banque de cDNA ».

14.3 Electrophorèse de DNA



BM 16

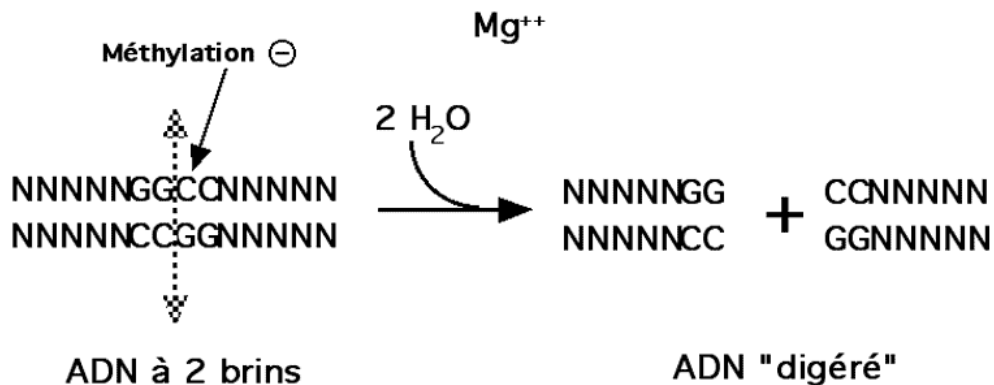
- Les fragments d'un DNA digéré par une enzyme de restriction comme Hha I, sont des anions et si on les soumet dans un gel à un champ électrique, ils migrent vers le pôle positif (anode) à une vitesse d'autant plus grande qu'ils sont de taille plus petite.
- On place dans un des puits de dépôt des fragments de DNA de tailles connues pour servir de marqueurs de taille.
- On ajoute dans les dépôts deux colorants : un bien visible sur le gel qui va migrer très rapidement avant les fragments de DNA pour limiter la distance parcourue au bord de l'anode ;
- un autre, le bromure d'éthidium qui se fixe spécifiquement au DNA quelle que soit la séquence et qui émet une fluorescence mauve lorsqu'on l'éclaire avec des rayons ultra-violets.
- On examine le gel sous lumière ultra-violette à 254 nm et on photographie les fragments de DNA digéré.

14.4 Hae III (enzyme de restriction)

*Hemophilus
aegypticus*

3.1.21.4

Hae III (enzyme de restriction)



BM 16/1

- Hae III est une enzyme de restriction produite par *Haemophilus aegypticus*.
- Le site de liaison à l'ADN est formé de quatre paires de nucléotides :

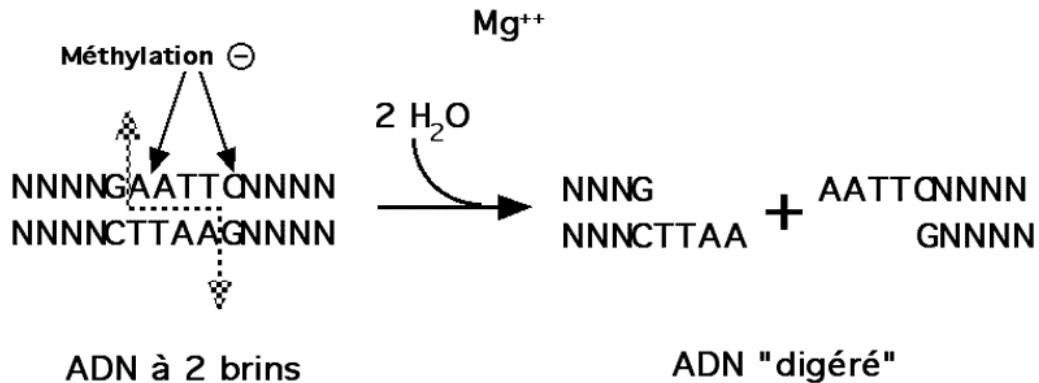
5' GGCC 3'
3' CCGG 5'

- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».
- La méthylation de la cytosine immédiatement en aval du site d'hydrolyse inhibe la reconnaissance du site par Hae III. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

14.5 EcoR I

3.1.21.4

EcoR I (enzyme de restriction)



BM 16/11

- EcoR I est une enzyme de restriction produite par *Escherichia coli*, souche R.
- Le site de liaison à l'ADN est formé de six paires de nucléotides :

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

- Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait loin du centre de symétrie du palindrome certaines paires de nucléotides restent non appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts collants ».
- La méthylation des adénines ou de la cytosine du site d'hydrolyse inhibent la reconnaissance du site par EcoR I. L'ADN de la bactérie ainsi méthylé n'est pas hydrolysé alors que l'ADN parasite qui n'est pas méthylé sera hydrolysé.

14.6 Polymorphisme de restriction

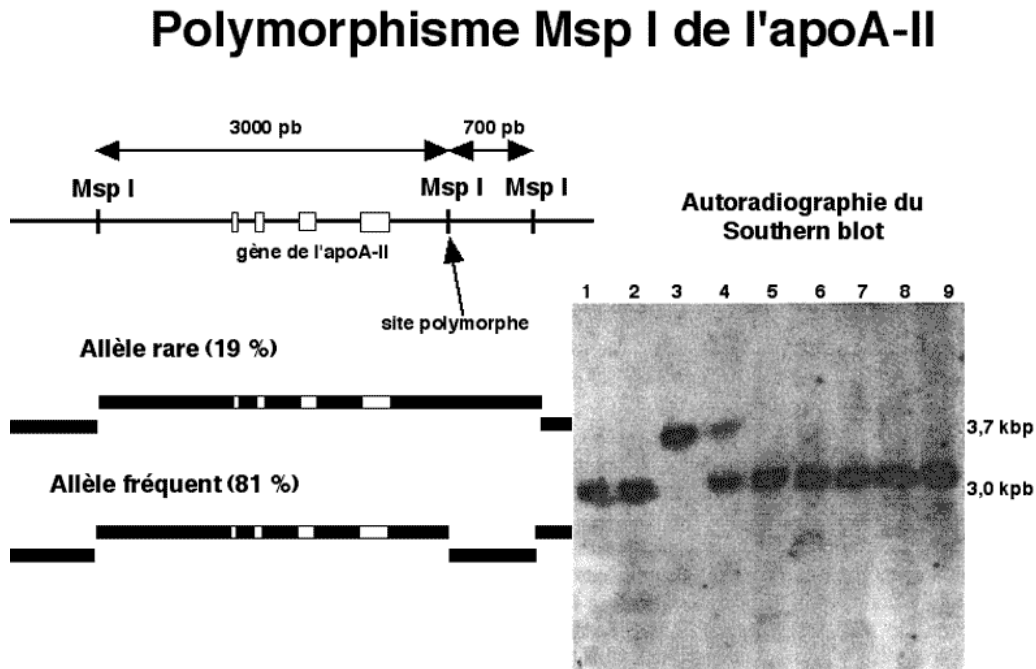
Polymorphisme de restriction

- **Variations individuelles d'une séquence de DNA révélée par des modifications de la longueur des fragments de restriction.**
- **A l'électrophorèse il y a polymorphisme de longueur des fragments de restriction = RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)**

BM 16/2

- Le profil électrophorétique obtenu avec une enzyme de restriction donnée montre des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- Chaque système allélique de restriction définit un locus polymorphe.

14.7 Polymorphisme Msp I de l'apoA-II

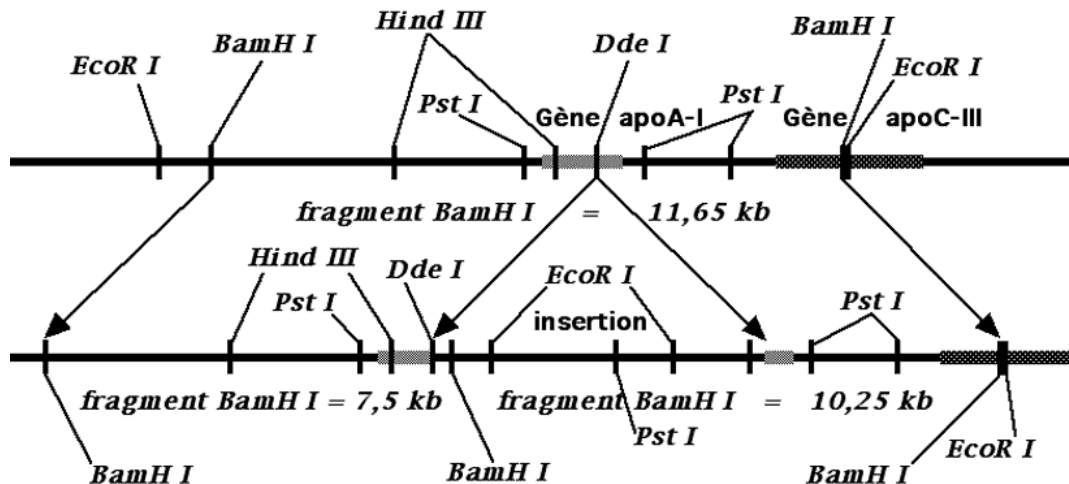


BM 16/3

- Le *Southern blot* permet la détection des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP ou *restriction fragments length polymorphism*).
- Il existe un polymorphisme dans le gène de l'apolipoprotéine A-II. Ce polymorphisme altère la séquence du site reconnu par l'enzyme de restriction Msp I situé en aval du gène, de telle sorte que 19 % des sujets (anglais) ne présentent pas de site de restriction à cet endroit.
- Lorsqu'on digère le DNA génomique de plusieurs individus choisis au hasard on obtient des fragments de taille différente entre chaque point de coupure par l'enzyme. Après électrophorèse pour séparer ces fragments en fonction de leur taille et transfert sur une membrane, on hybride les fragments sur la membrane avec une sonde complémentaire des exons de l'apoA-II puis on fait l'autoradiographie de la membrane pour révéler ces fragments.
- La plupart de ces sujets (81 %) qui possèdent trois sites de coupure autour du gène donnent un fragment de 3000 paires de nucléotides (3,0 kb).
- D'autres sujets, plus rares (19 %) qui ne possèdent pas le site de restriction ont un fragment plus grand = 3700 paires de nucléotides (3,7 kb). Le sujet dont le DNA a été déposé dans l'électrophorèse au n°3 est dans ce cas.
- Il arrive qu'un sujet porte un allèle du type fréquent sur un chromosome et l'autre allèle sur l'autre chromosome. Il est alors hétérozygote pour le polymorphisme et à l'électrophorèse (n°4) on voit les deux fragments révélés par la sonde.

14.8 Cartes de restriction

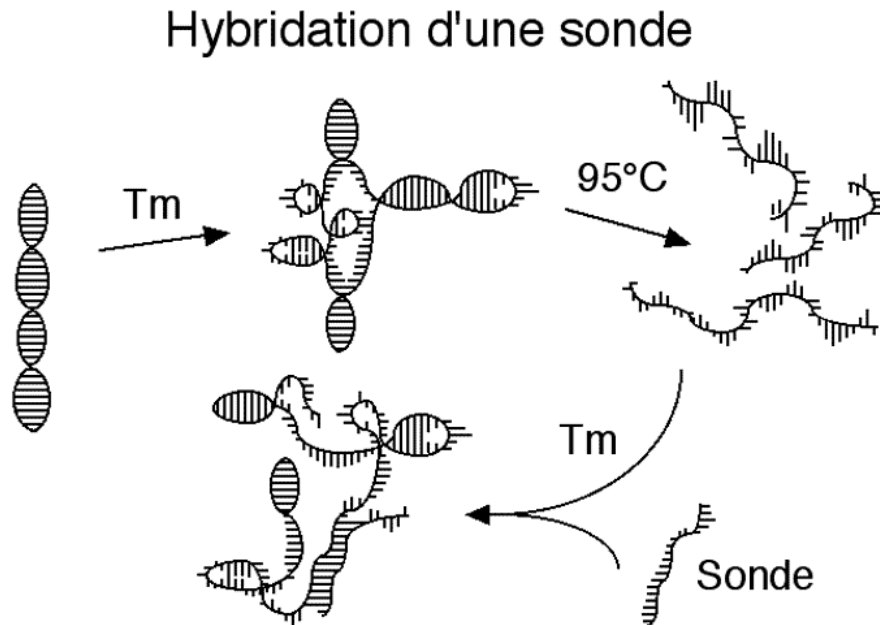
Cartes de restriction



BM 16/4

- Les marqueurs génétiques peuvent aussi caractériser les DNA responsables des maladies héréditaires grâce aux cartes de restriction.
- Le DNA du malade est digéré par de nombreuses enzymes de restriction isolément ou associées entre elles. Les fragments de restriction sont reconnus par une sonde spécifique du gène responsable de la maladie. Il en résulte un grand nombre de fragments possibles dont les longueurs (en kilobases) sont mesurées par électrophorèse à côté d'un marqueur de masse moléculaire.
- Ainsi, le DNA d'un malade atteint d'une dyslipoprotéinémie et celui d'un témoin sain ont été digérés par BamH I : le sujet sain montre un seul fragment long de 11,65 kb reconnaissable par la sonde du gène de l'apoA-I, alors que le DNA du malade en montre deux de 7,5 et 10,25 kb. Le fragment BamH I du sujet témoin peut encore être digéré par d'autres enzymes donnant à chaque fois deux fragments (Dde I) ou trois (Hind III) ou quatre (Pst I).
- Les fragments peuvent être comparés comme les morceaux d'un puzzle pour obtenir une carte des emplacements des sites de restriction sur le DNA. La même carte, chez le sujet malade, montre les mêmes sites de restriction aux deux extrémités du fragment BamH I, mais il apparaît une insertion de 6 kb au milieu du gène de l'apoA-I avec des sites nouveaux : BamH I, EcoR I, Pst I non retrouvés chez le témoin. Cette insertion est responsable d'une absence d'expression de l'apoA-I ce qui se traduit par une dyslipoprotéinémie.

14.9 Hybridation d'une sonde



BM 17

- Un fragment de DNA double brin affecte normalement une structure secondaire en double hélice.
- En élevant la température jusqu'à la T_m , on disjoint 50 % environ des liaisons hydrogène qui unissent les brins de DNA, ce qui dénature partiellement la double hélice.
- Lorsque la température atteint 95°C , toutes les liaisons hydrogène sont rompues et la dénaturation du DNA est complète : DNA simple brin, qualifié de « dénaturé ». Au cours de la dénaturation, le coefficient d'extinction du DNA à 260 nm augmente (hyperchromicité).
- En refroidissant brutalement (glace) les structures secondaires ne se reforment pas et le DNA reste dénaturé. Si on refroidit doucement, la double hélice se reforme progressivement. Un oligonucléotide (sonde) ajouté à ce moment peut s'hybrider avec un fragment complémentaire du DNA, dès que la température descend en-dessous de la T_m .
- L'hybridation d'une sonde marquée (atomes radioactifs, radicaux fluorescents ou ligands spécifiques) sur un DNA dénaturé permet de marquer spécifiquement tous les fragments de ce DNA dont la séquence est complémentaire de la sonde.

14.10 Calcul de la Tm

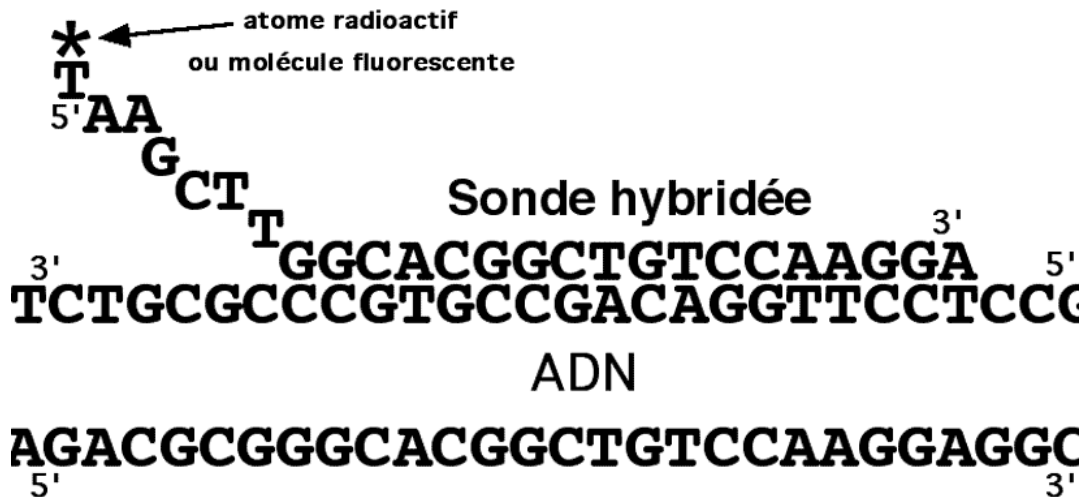
Calcul de la Tm

- **Oligonucléotide inférieur à 20 nt**
 - $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m$ en °C.
- **Oligonucléotide supérieur à 20 nt**
 - $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m$ en °C.

BM 17/1

- Il est possible de mesurer directement la température de fusion (Tm) d'un DNA double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température.
- Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C. A partir de N = 20, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au delà de ce chiffre : $1 + [(N-20)/20]$.
- Lorsqu'il existe des mésappariements il faut soustraire de la Tm calculée autant de degrés C que le pourcentage de séquence non-appariée de l'oligonucléotide.

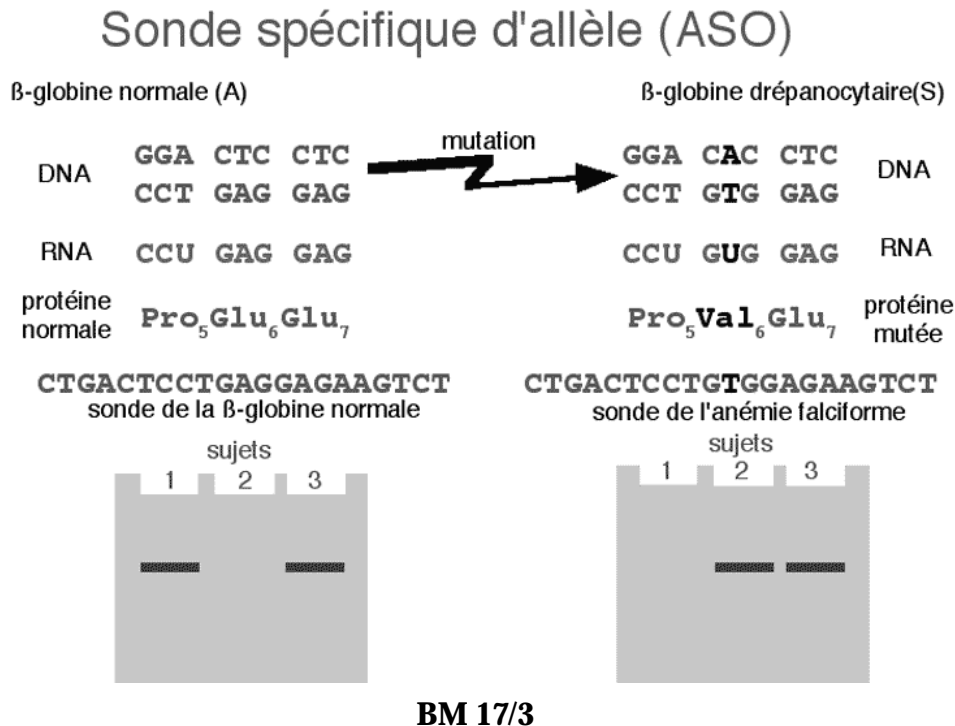
14.11 Sonde hybridée



BM 17/2

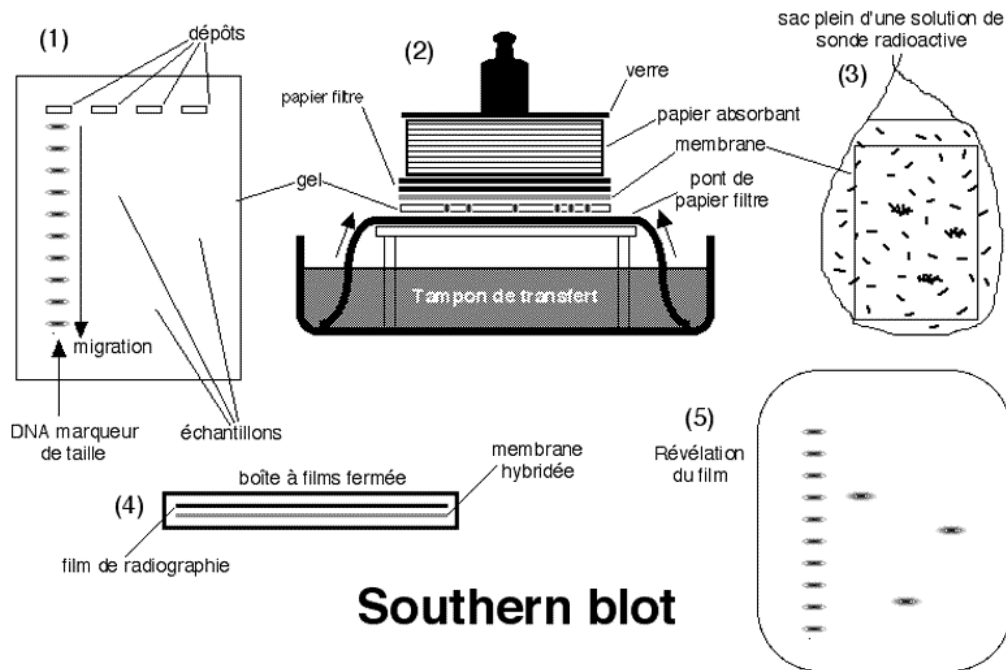
- Pour pouvoir reconnaître spécifiquement une séquence du DNA, on utilise au laboratoire un petit morceau de DNA synthétisé (sonde) dont la séquence correspond au moins en partie à celle d'un des brins du DNA.
- Parce qu'elle est complémentaire de l'autre brin du DNA, la sonde est capable de se fixer spécifiquement sur l'autre brin à l'endroit où se lit la séquence complémentaire.
- En marquant cette sonde par un atome radioactif ou par une molécule fluorescente liés covalentiellement à un des nucléotides de la sonde, on peut détecter la sonde et le morceau de DNA complémentaire qui lui est hybridé.

14.12 Sonde spécifique d'allèle (ASO)



- La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie des globules rouges qui sont déformés par une cristallisation anormale de l'hémoglobine. Cette cristallisation résulte d'une substitution A→T dans le sixième codon.
- Cette substitution s'exprime par une mutation Glu6→Val de la chaîne β de la globine.
- L'électrophorèse de l'ADN du gène HBB, qui code pour la chaîne β des globines est révélée par deux sondes : l'une spécifique de la séquence normale, l'autre de celle de la protéine mutée (ASO = *Allele Specific Oligonucleotide*).
- Le DNA d'un sujet est révélé par la seule sonde normale s'il possède deux gènes HBB normaux (homozygote normal), par la seule sonde de la protéine mutée s'il possède deux gènes HBB responsables de la mutation (homozygote muté) et par les deux sondes s'il possède un gène normal et un gène de la protéine mutée (hétérozygote).
- Les sujets homozygotes mutés sont atteints d'anémie falciforme et sujets à des crises graves. Les sujets hétérozygotes sont porteurs du « trait drépanocytaire », ils n'ont que peu de troubles mais ils transmettent le gène à leurs descendants.

14.13 Southern blot



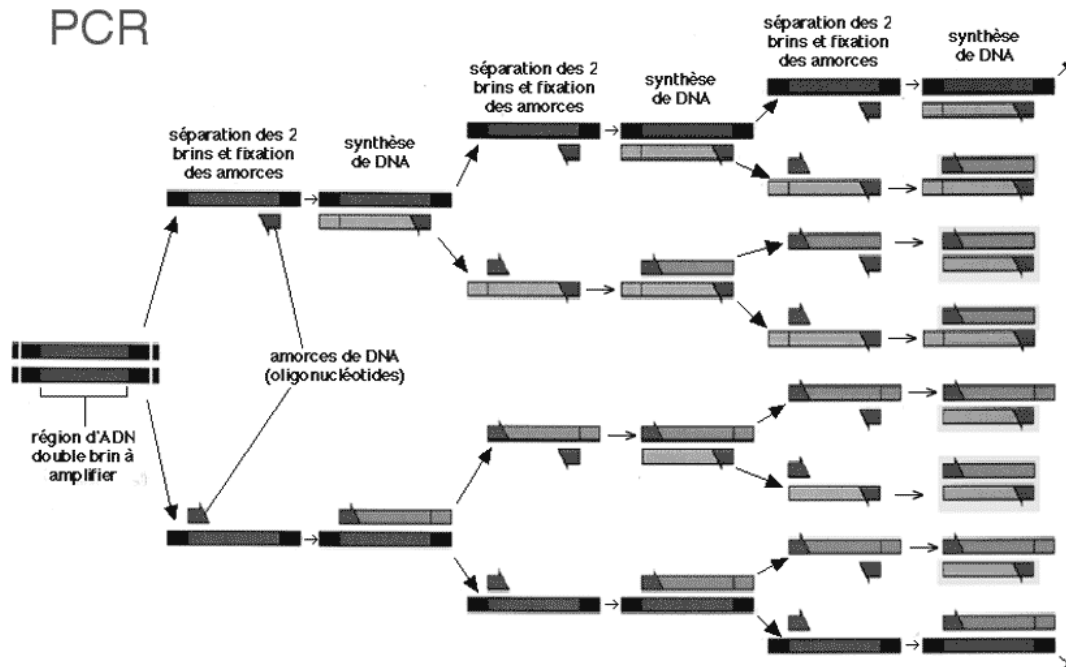
Southern blot

BM 17/4

- Le *Southern blot* est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.
 - Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille.
 - On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables.
 - La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire.
 - On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film.
 - On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments de DNA complémentaires de la sonde. On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui ser-

vent de marqueurs de taille.

14.14 PCR

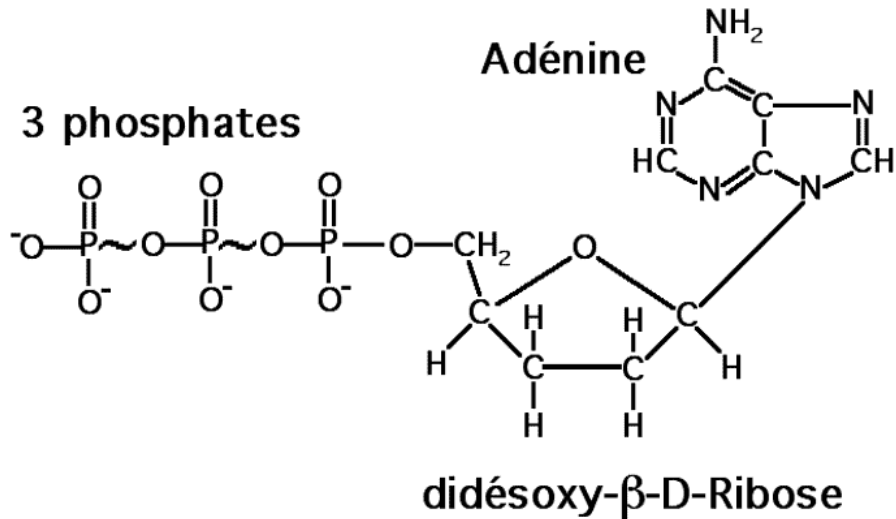


BM 18

- La PCR (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier spécifiquement une région de DNA double brin de quelques centaines de paires de bases. Ce DNA doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95°C).
- On ajoute au DNA de départ une large quantité d'amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier) qui vont s'hybrider à 50-60°C environ avec la séquence complémentaire sur chacun des brins de DNA, et les quatre dNTP qui serviront de substrats.
- On soumet le tout à l'activité d'une DNA polymérase (*Taq polymérase*) qui synthétise à 72°C un brin complémentaire à partir du 3'OH de l'amorce hybridée. On obtient quatre brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins de DNA.
- On recommence à dénaturer ces 8 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 16 brins de DNA.
- Et ainsi de suite 35 fois, ce qui aboutit à 34359738368 brins de DNA (34 milliards), ce qui représente une quantité suffisante pour étudier le fragment de DNA amplifié.

14.15 Didésoxyadénosine triphosphate

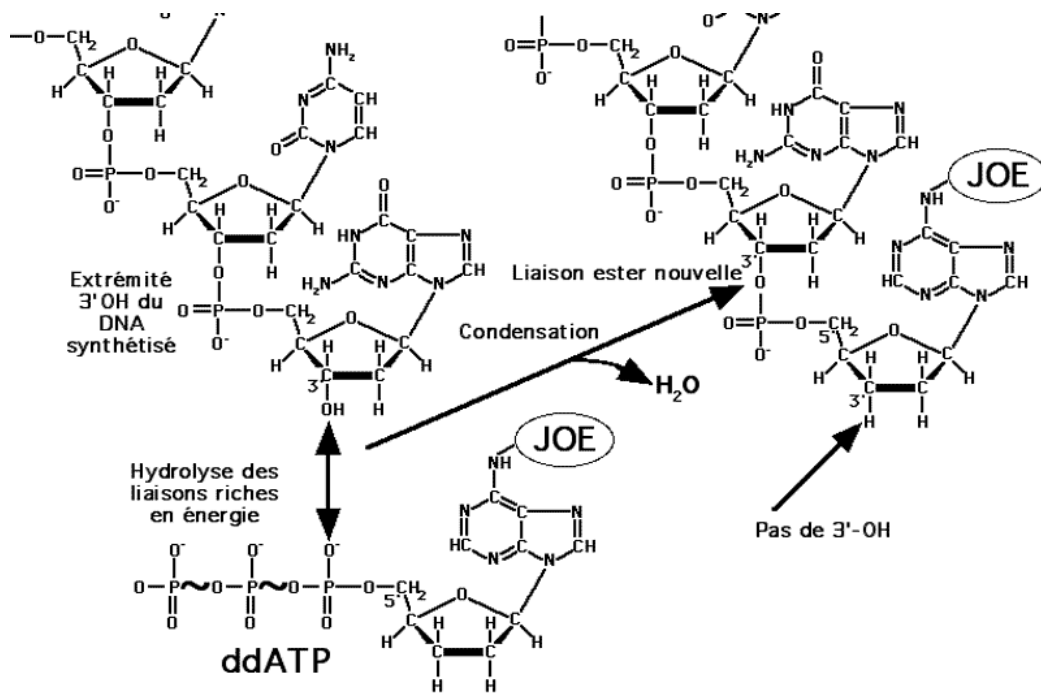
didésoxyadénosine triphosphate



BM 04/9

- Le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) est un nucléoside triphosphate de synthèse. Sa structure est dépourvue de fonction alcool en 3'.
- Analogue structural de nucléotide, le ddA est utilisé comme inhibiteur de la réplication (DNA polymérase). L'absence de fonction alcool en 3' empêche toute condensation avec le nucléotide suivant.
- Cette inhibition est principalement utilisée pour le séquençage des DNA.

14.16 Réaction de séquence



BM 19

- Pour lire la séquence d'un DNA simple brin on hybride une amorce du côté 3' de ce DNA. Puis on effectue avec une DNA polymérase la synthèse d'un brin complémentaire.
- Pour cette synthèse on apporte comme substrats les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). En plus une très petite quantité de didésoxyribonucléosides triphosphates fluorescents (ddATP-JOE, ddCTP-5-FAM, ddGTP-TAMRA et ddTTP-ROX). La polymérase choisira le plus souvent un désoxyribonucléoside normal et la synthèse se poursuivra jusqu'à ce qu'elle incorpore un didésoxyribonucléoside fluorescent.
- A ce stade le brin en cours de synthèse n'a plus d'extrémité 3'-OH et la réaction de polycondensation ne peut plus se poursuivre.
- Le didésoxyribonucléotide incorporé en dernier est fluorescent et émet sous l'excitation une lumière verte pour JOE (ddAMP), bleue pour 5-FAM (ddCMP), jaune pour TAMRA (ddGMP) et rouge pour ROX (ddTMP).
- A chaque lettre de la polycondensation un petit nombre de molécules sont ainsi arrêtées et marquées de la fluorescence correspondant au dernier nucléotide incorporé.
- En séparant ces molécules par électrophorèse en fonction de leur taille on peut lire les lettres successives qui apparaissent comme des zones sur l'électrophorégramme dont la fluorescence correspond à la base de ce dernier nucléotide.

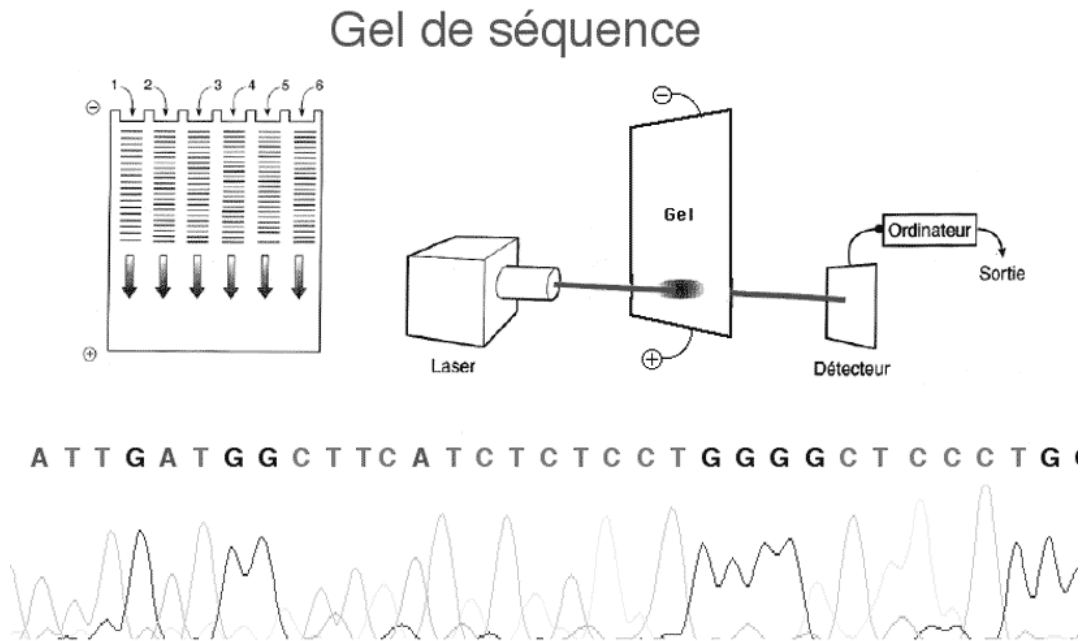
14.17 Séquençage d'ADN



BM 19/1

- Pour connaître la séquence des DNA, on fait synthétiser un brin du DNA par une enzyme spécifique.
- L'enzyme commence son travail à partir de l'extrémité 3' d'une sonde hybridée qui sert d'amorce. Elle ajoute des nucléotides complémentaires de ceux du brin de DNA qu'elle copie.
- On lui donne pour substrats des désoxynucléosides triphosphates normaux mélangés avec des didésoxynucléotides dont la fonction alcool secondaire en 3' est réduite ce qui empêche la synthèse de se poursuivre au delà.
- Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes (vert pour didésoxyA, bleu pour didésoxyC, jaune pour didésoxyG et rouge pour didésoxyT)
- On sépare ensuite les fragments synthétisés dans un champ électrique (électrophorèse : les DNA sont des anions, ils vont donc vers le pôle +), en fonction de leur longueur (les plus petits vont plus vite).
- On lit ensuite les taches successives, identifiées par leur couleur, ce qui révèle la séquence des fragments synthétisés.

14.18 Gel de séquence



BM 19/2

- En utilisant des amorces spécifiques, on fait synthétiser un brin complémentaire du DNA à lire, en présence d'une faible proportion de didésoxyribonucléotides marqués d'un radical fluorescent différent pour chaque base.
- La DNA polymérase lorsqu'elle a incorporé un tel didésoxyribonucléotide ne peut plus continuer la synthèse faute d'extrémité 3'OH libre. Il se forme donc une multitude de brin complémentaires inachevés, chacun terminé par un didésoxyribonucléotide fluorescent caractéristique de la base de ce dernier nucléotide.
- En séparant par électrophorèse ces fragments complémentaires on sépare dans le gel chacun des fragments, du plus petit au plus grand et on les détecte au passage par un faisceau laser qui excite la fluorescence et une cellule photoélectrique qui lit la lumière émise à chacune des longueurs d'onde des fluorescences caractéristiques des quatre bases.
- L'ordinateur reçoit donc une série de mesure d'intensité lumineuses en forme de pics correspondant au passage de chacun des fragments : en interprétant la couleur de la fluorescence de chaque pic l'ordinateur écrit la séquence du DNA.