

EXPRESSION DE L'INFORMATION GENETIQUE

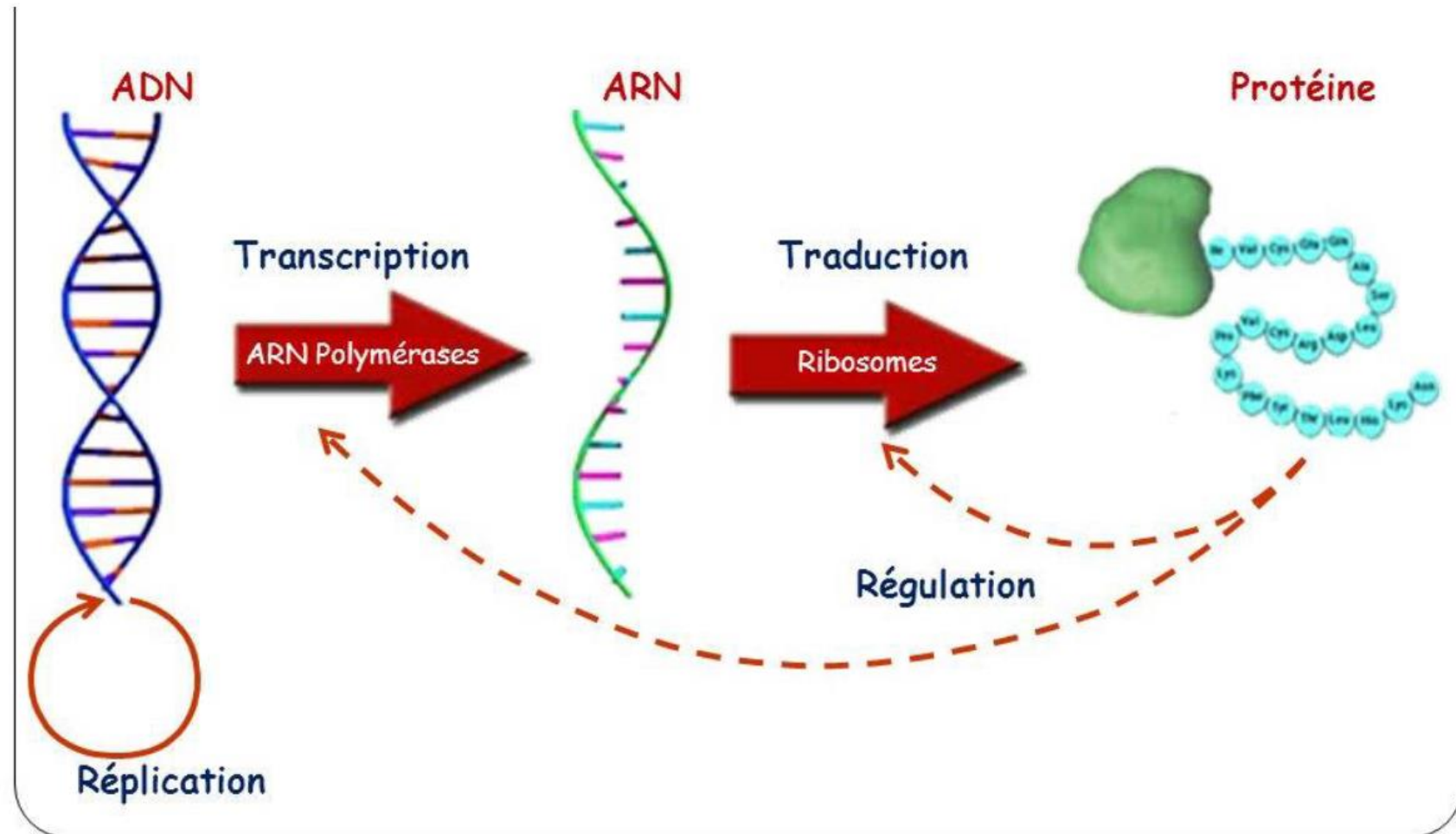
Partie I

DE L'ADN A L'ARNm, LA TRANSCRIPTION DE L'ADN

Nicolas DUBOIS – PRAG USMB – UFR Sciences et Montagne
nicolas.dubois@univ-smb.fr

LE DOGME CENTRAL DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

La synthèse d'une protéine est le résultat de plusieurs étapes résumées dans le dogme de la biologie moléculaire :



NOTION DE GENE

La notion de gène est essentielle en biologie. Le mot gène vient du grec *genos* = espèce. A l'origine, ce terme désigne l'information reçue des ascendants et transmissible aux descendants.

Au sens structural du terme, la notion de gène est issue de la transcription. On appelle gène l'ensemble des séquences d'ADN indispensables à la transcription d'une région d'ADN. Les gènes, qui codent des protéines, sont constitués de deux parties :

➤ **Une région transcrite :**

Il s'agit de la région qui sera transcrite en ARN. Elle est bornée par deux séquences essentielles :

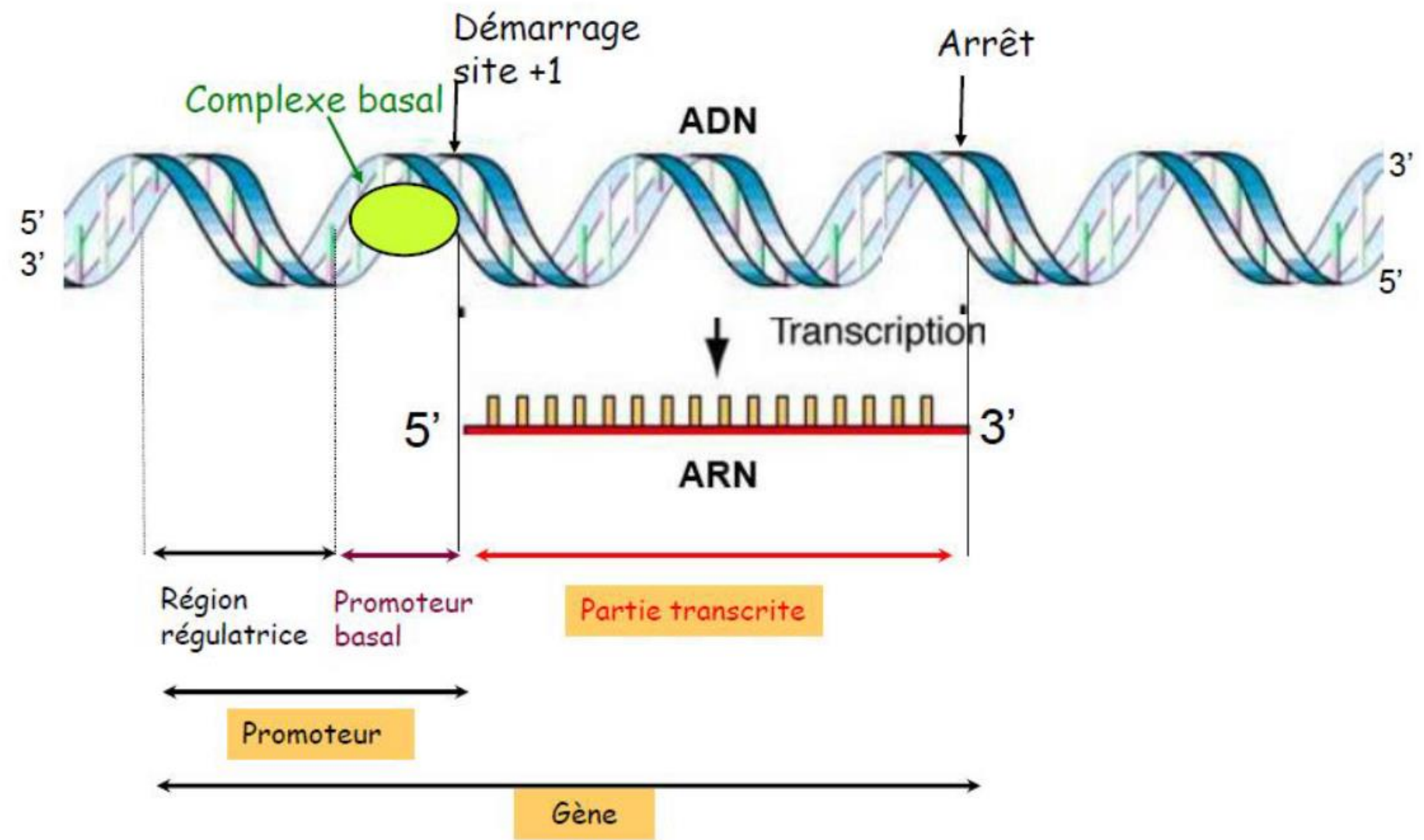
- Le site de début de transcription = site d'initiation de la transcription,
- Le site de terminaison de la transcription.

La séquence de cette région est essentielle car elle code la séquence en acides aminés de la protéine à synthétiser, s'il s'agit d'un ARNm. Mais il peut également s'agir de gènes codant les ARNt, les ARNr et les autres ARN...

➤ **Une région régulatrice (dont le promoteur) :**

Cette région est située en amont de la région codante. Elle permet l'initiation de la transcription ainsi que son contrôle (auquel il faut ajouter d'autres séquences régulatrices modulant le niveau de transcription)

STRUCTURE TYPE D'UN GENE



ELEMENTS NECESSAIRES A LA TRANSCRIPTION

La transcription nécessite :

➤ **Une ARN polymérase ADN dépendante :**

C'est l'enzyme qui utilise l'ADN simple brin (comme pour la réplication, une dénaturation locale de la molécule d'ADN est nécessaire) mais elle polymérise des ribonucléotides en regard des désoxyribonucléotides de 5' vers 3'. Le fonctionnement de cette enzyme nécessite du Mg^{2+} . Contrairement aux ADN polymérases de la réplication, les ARN polymérases de la transcription ne nécessitent pas d'amorce pour leur fonctionnement. De nombreuses autres enzymes interviennent également (dérroulement et ouverture de l'ADN, régulation de la transcription...).

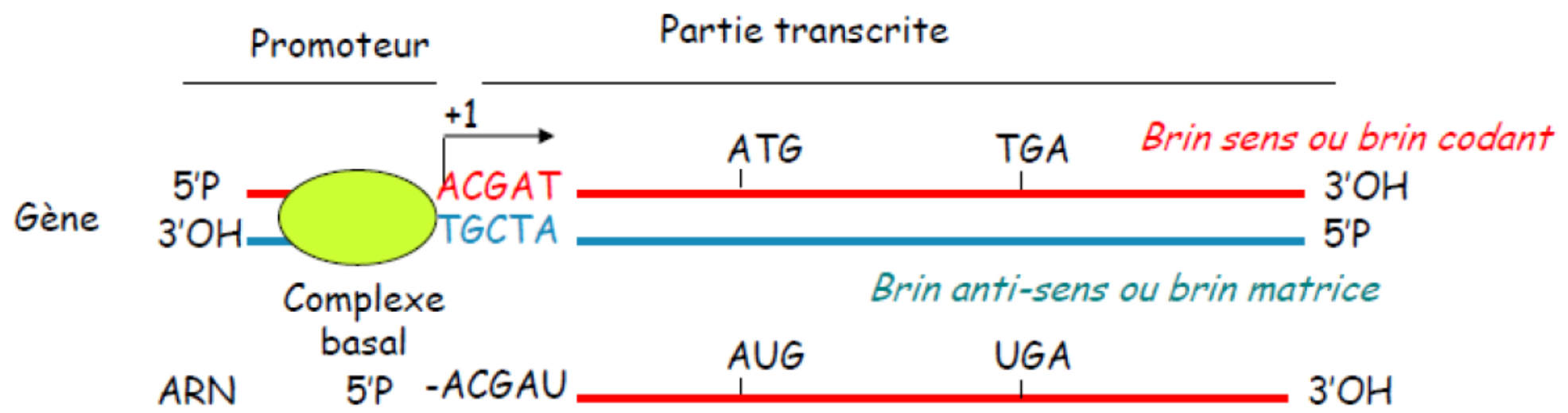
➤ **Une matrice ADN = le gène**

Un seul brin d'ADN est transcrit, c'est à dire sert de modèle à la polymérisation des ribonucléotides :

- Ce brin est appelé **brin transcrit** ou **brin antisens**. Il est présenté dans son orientation 3'→5'.
- Le brin complémentaire est appelé **brin sens** ou **brin codant** car il possède la même séquence que l'ARN (à l'exception des T de l'ADN remplacés par des U dans l'ARN). Il est présenté dans le sens 5'→3'.

➤ **Des ribonucléotides triphosphates précurseurs**

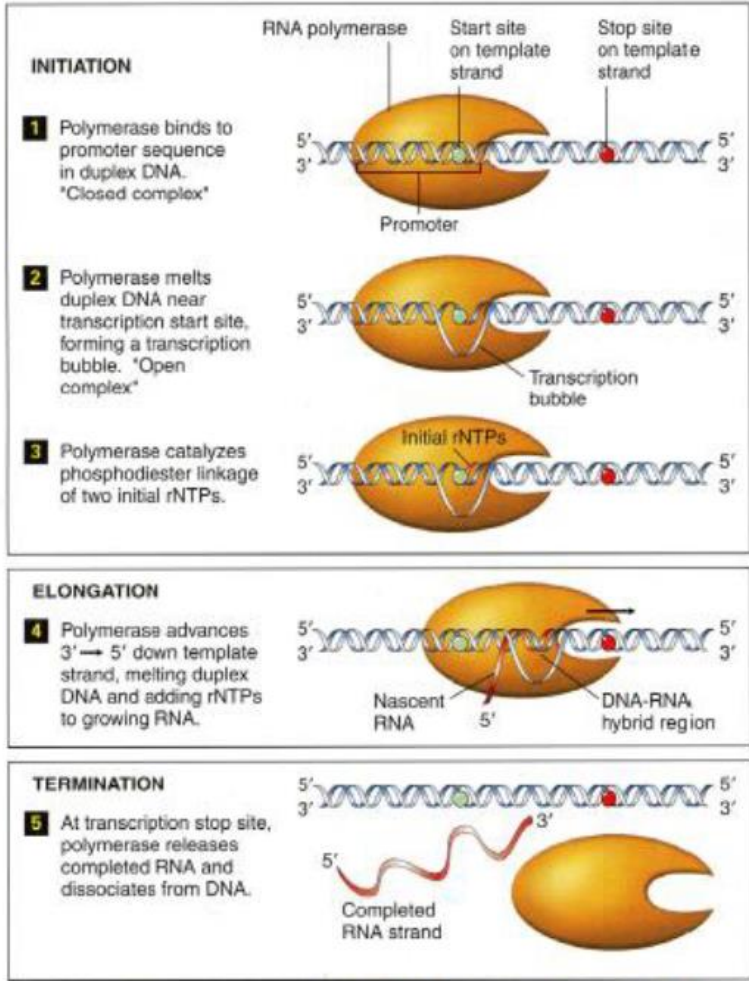
BRIN SENS ET BRIN ANTISENS



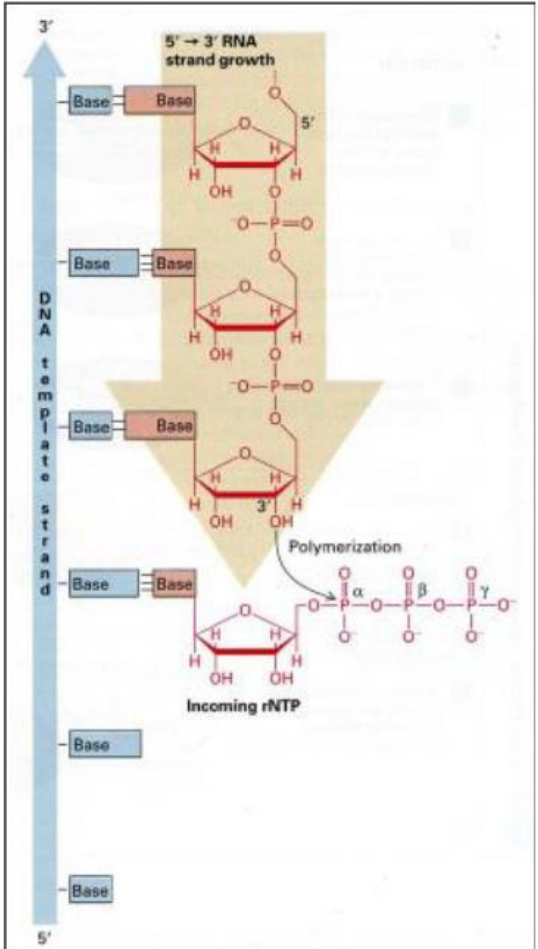
La synthèse d'ARN commence au site +1 (1ère base transcrite).
Le brin sens a la même séquence que l'ARN synthétisé (en remplaçant les T par des U).

MECANISME GENERAL DE LA TRANSCRIPTION

3 étapes :
1. Initiation 2. Elongation 3. Terminaison



Lodish, H., et al. (2004) *Molecular Cell Biology*



Lodish, H., et al. (2004) *Molecular Cell Biology*

La réaction de polymérisation

1. LA TRANSCRIPTION PROCARYOTE

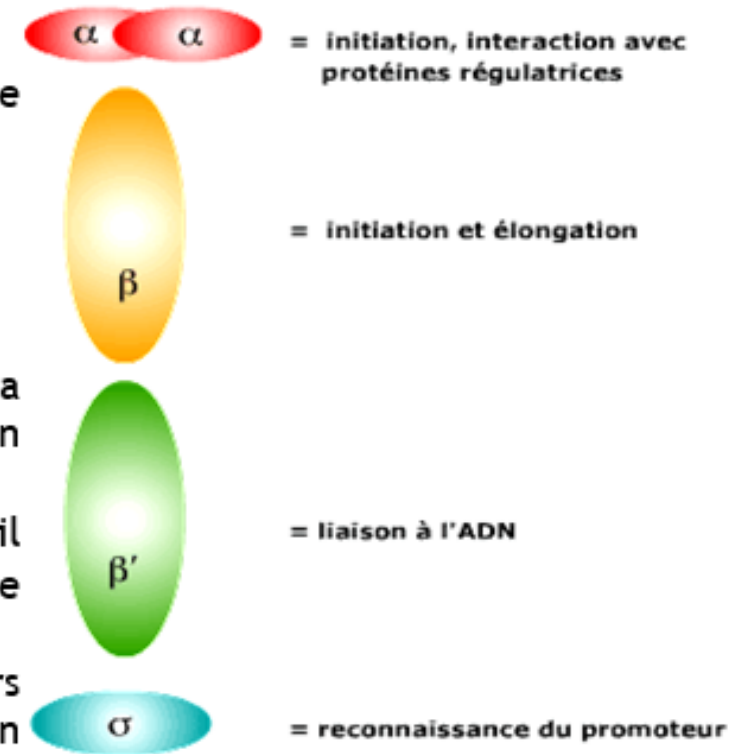
L'ARN POLYMERASE BACTERIENNE

L'ARN polymérase d'*E.coli* est une enzyme assez complexe composée de quatre sous unités :

Le core-enzyme ($\alpha_2\beta\beta'$) a une grande affinité pour l'ADN ($K_D = 10^{-14}$ mol/L) mais aucune spécificité de fixation.

Le(s) facteur(s) sigma σ (*rpoD*), est capable, *in vivo* d'assurer la reconnaissance de séquences spécifiques situées légèrement en amont du point d'initiation de la transcription : les promoteurs.

- σ assure la spécificité de fixation au promoteur car il possède une hélice α qui se fixe spécifiquement à une séquence du promoteur.
- Il existe plusieurs facteurs σ qui permettent alors l'expression spécifique de groupes donnés de gènes en fonction de la séquence promotrice.



L'installation de l'ARN polymérase au niveau précis de ces promoteurs (grâce au facteur σ) va permettre la transcription du bon brin en commençant par le bon nucléotide. C'est le point crucial de l'initiation. Au démarrage de l'élongation, le facteur σ quitte le complexe.

L'ARN POLYMERASE BACTERIENNE

Ce qu'une ARN polymérase [$\alpha_2\beta\beta'\omega$] ne sait pas faire !

- ▶ reconnaître *spécifiquement* le site de démarrage de la transcription
- ▶ ouvrir *efficacement* la double-hélice
- ▶ franchir *efficacement* certaines séquences nucléotidiques
- ▶ terminer la transcription au site de terminaison *spécifique*

→ [$\alpha_2\beta\beta'\omega$] est donc une unité catalytique, qui a besoin de facteurs auxiliaires permettant de conférer la spécificité et l'efficacité de la transcription.

Ces facteurs sont appelés « facteurs généraux de transcription ».

L'ARN POLYMERASE BACTERIENNE

Activité catalytique : cœur de l'ARN polymérase $\alpha_2\beta\beta'\omega$

Initiation de la transcription : holoenzyme $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ (475 kDa)

α : RpoA (40 kDa) → NTD : dimérisation - CTD : liaison ADN

β : RpoB (155 kDa)

β' : RpoC (160 kDa)

ω : RpoZ (10 kDa)

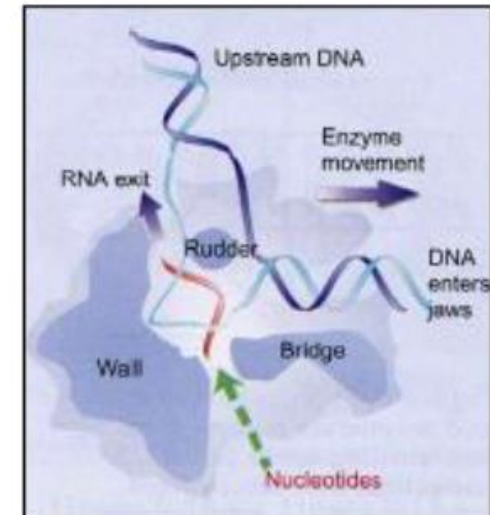
σ : RpoD (70 kDa)

} Site catalytique

Affinité $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ / Affinité $\alpha_2\beta\beta'\omega$:

1/10 000 pour l'ADN en dehors des promoteurs

1000 pour les promoteurs



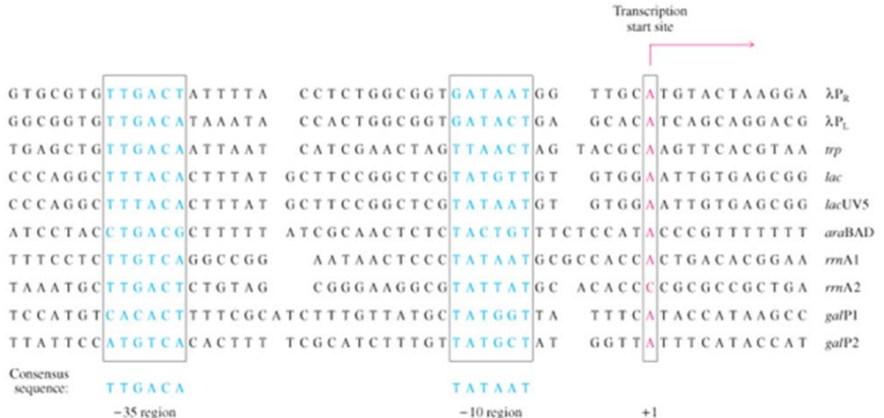
INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Fixation de l'ARN polymérase sur un promoteur

Promoteurs procaryotes

Le promoteur d'un gène correspond à l'ensemble des séquences permettant l'initiation de la transcription. C'est au niveau de ces séquences que l'ARN polymérase se fixe durant la phase d'initiation.

Plus d'une centaine de promoteurs d'*E. coli* ont été séquencés et l'alignement des séquences par rapport au point de départ de la transcription fait ressortir ce que l'on appelle des séquences consensus c'est à dire qui se retrouvent très fréquemment, au même endroit dans les différents promoteurs.



Boîte -35

Boîte -10

Site +1 = site de démarrage de la transcription

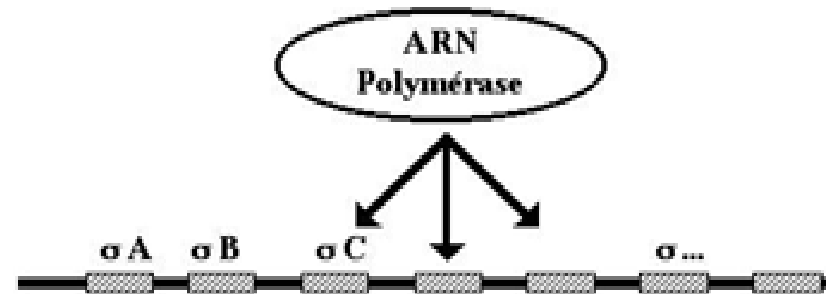
La boite -35 permet la reconnaissance du promoteur par le facteur σ
La boite -10 permet l'ouverture de la double hélice d'ADN une fois que l'ARN polymérase s'est fixée au promoteur.
La région de 15 à 17 pb intercalée entre ces deux boîtes est appelée séparateur.

INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Fixation spécifique de l'ARN pol sur le gène à transcrire grâce aux facteurs sigma

L'ARN polymérase bactérienne est capable de transcrire de nombreux gènes différents. Étant donné que le facteur sigma régule la spécificité de reconnaissance du promoteur, c'est ce facteur qui dirige la polymérase vers les gènes qu'elle doit transcrire. La bactérie dispose de plusieurs types de facteurs sigma, et chacun est spécifique d'un type de promoteur.

Importance du Facteur Sigma



Gène Activé	Masse	Situation	Séquence -35	Séparation	Séquence -10
rpoD	70 kD	Général	TTGACA	16-18 pdb	TATAAT
rpoH	32 kD	Stress	CCCTTGAA	13-15 pdb	CCCGATNT
rpoE	24 kD	Stress	Inconnue	Inconnue	Inconnue
rpoN	54 kD	Nitrogène	CTGGNA	6 pdb	TTGCA
fliA	28 kD	Flagelle	CTAA	15 pdb	GCCGATAA

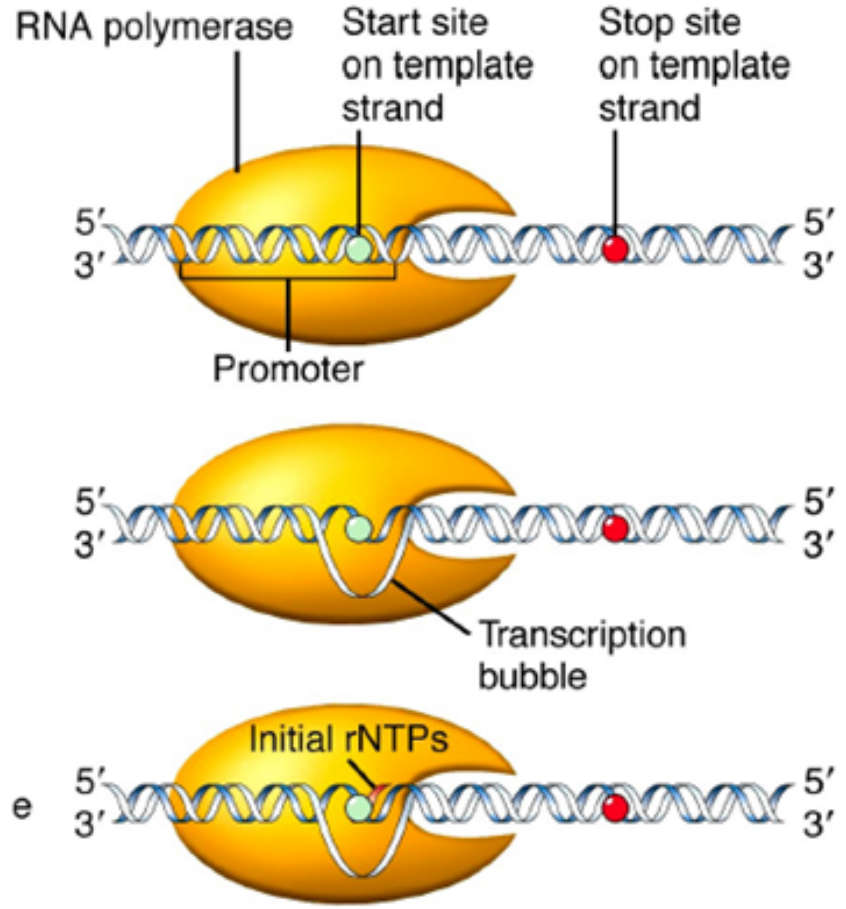
Facteurs σ chez *E. coli*

- Facteur général : σ^{70}
- Situation de stress : σ^{32} et σ^{24}
- Carence en azote : σ^{54}

...

INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Étapes de la fixation



Une hélice α de la sous unité σ reconnaît une séquence spécifique sur le promoteur et permet la fixation de l'ARNpol en amont de la séquence à transcrire. On parle de complexe fermé de transcription.

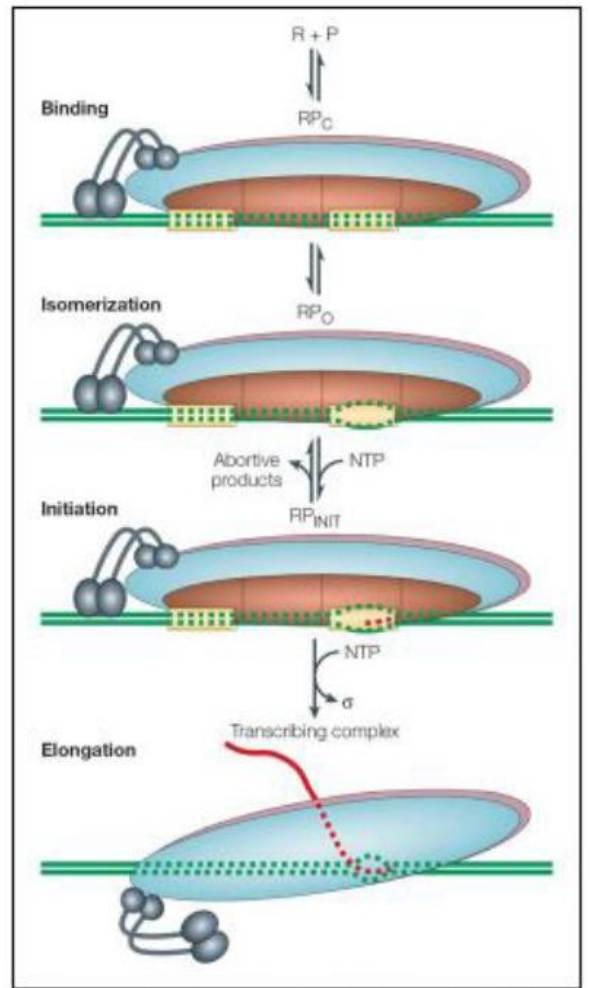
Puis, la polymérase provoque l'ouverture de la double hélice en amont du point d'initiation de la transcription sur une longueur d'environ 17 pb

On parle alors de complexe ouvert de transcription

Enfin la polymérase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les 2 premiers ribonucléotides incorporés au niveau du site catalytique par complémentarité avec les 2 premiers nucléotides de la séquence à transcrire sur le brin non codant.

Départ de la sous unité sigma.

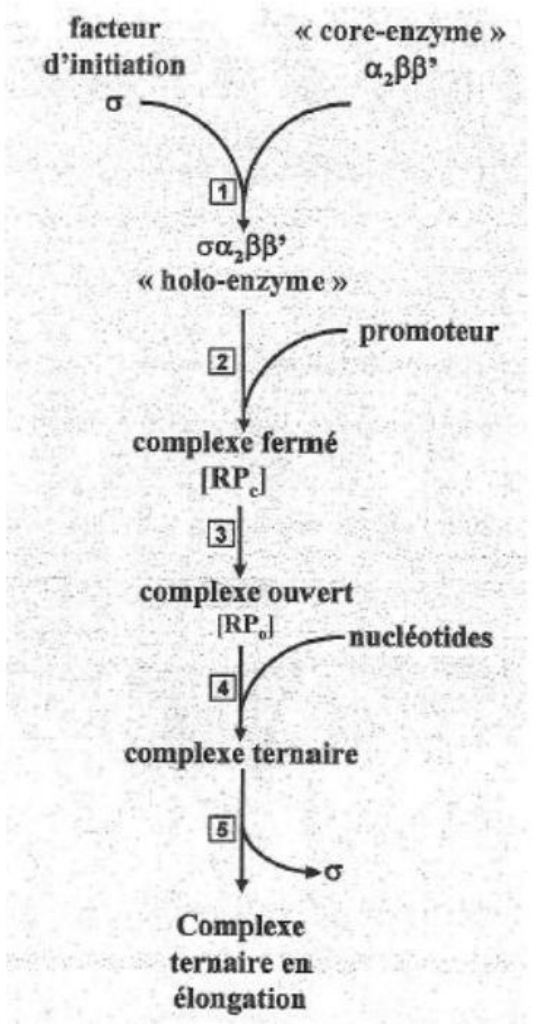
INITIATION DE LA TRANSCRIPTION



Browning, D. F., and Busby, S. J. W. (2004) *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 1-9.

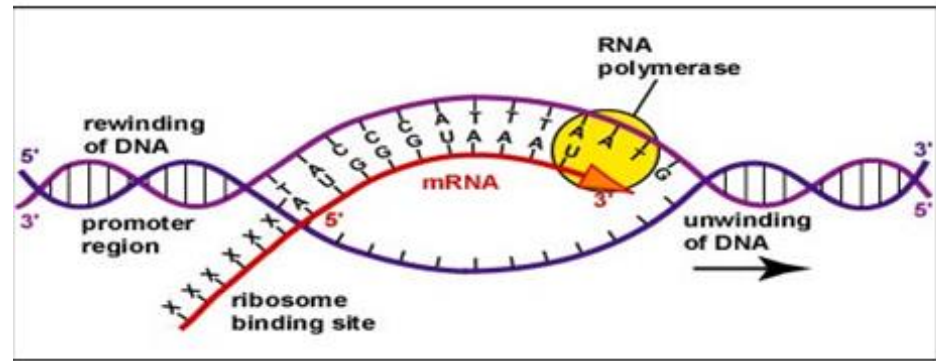
- 1 assemblage de l'holoenzyme
- 2 recrutement de l'holoenzyme
- 3 fusion de l'ADN
- 4 synthèse abortive ou itérative
- 5 départ (ou clairance) du promoteur

<u>Empreinte</u>	<u>Bulle</u>
[-50, +20]	0 pb
[-30, +20]	10 pb
[-20, +20]	10 pb
40 pb	18±2 pb



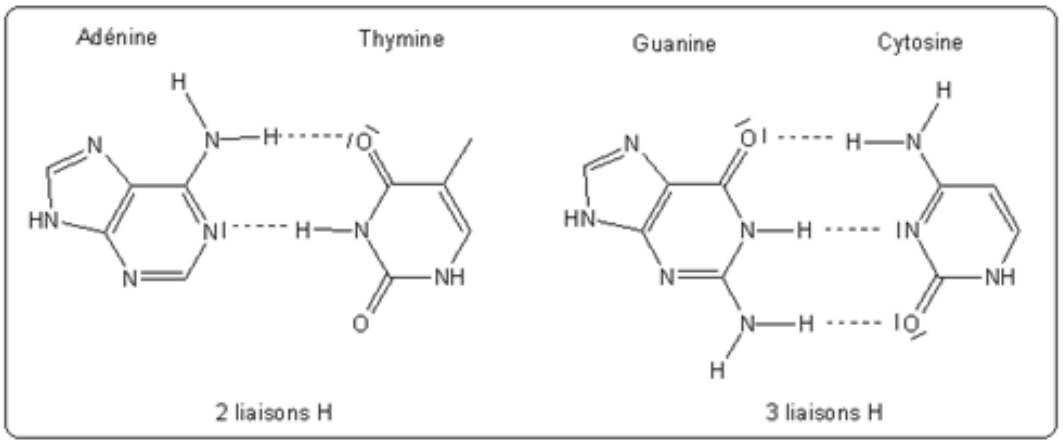
ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION

NB : chez les Procaryotes, l'élongation est couplée avec la traduction.



Formation d'un brin d'ADN complémentaire au brin non codant

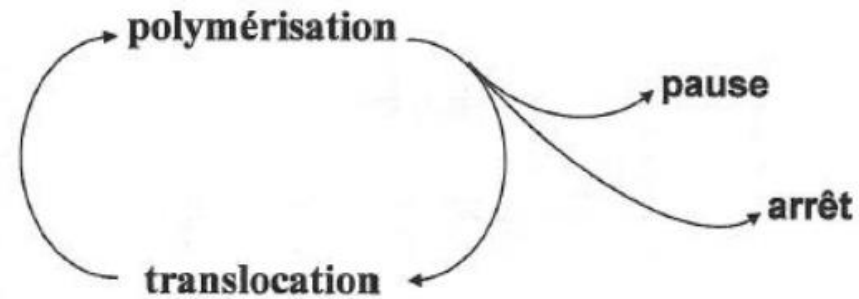
La séquence de l'ARN en formation est imposée par la séquence d'ADN « lue » par la polymérase. En effet, le nucléotide ajouté est le nucléotide complémentaire du désoxynucléotide porté par le gène :



- Importances des liaisons hydrogènes responsables de l'appariement des bases
- ARN composé des bases AUGC alors que l'ADN est composé des bases ATGC

ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION

Processus cyclique ou acyclique



▸ **Redémarrage après une pause :**

- **intrinsèque : lent**
- **accéléré par un facteur d'élongation au sens strict (NusA-NusB-S10)**

▸ **Redémarrage après un arrêt :**

- **intrinsèque : aucun (blocage transcriptionnel)**
- **accéléré par un facteur de clivage (GreA-GreB)**

TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

Terminateurs intrinsèques

(à la fin de la plupart des unités de transcription)

Terminateurs Rho-dépendants

(intragéniques, rarement à la fin des unités de transcription : *trp t'*)

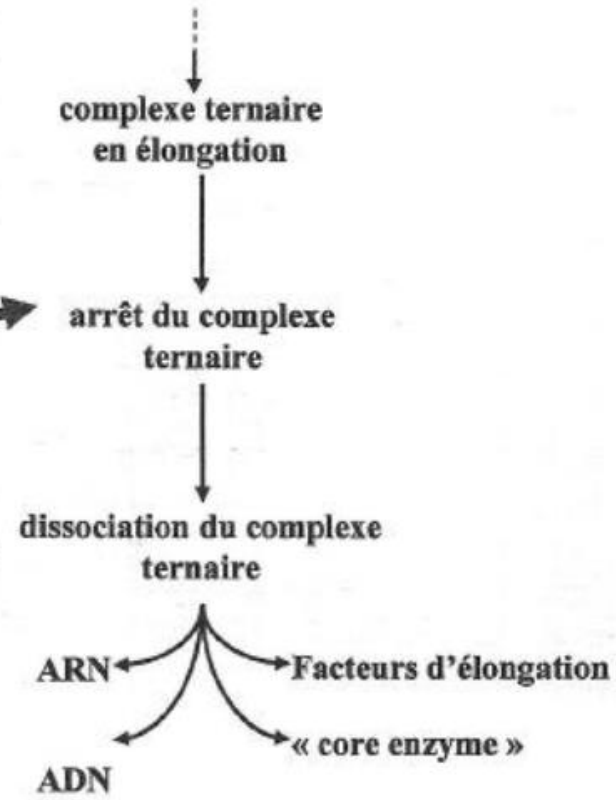
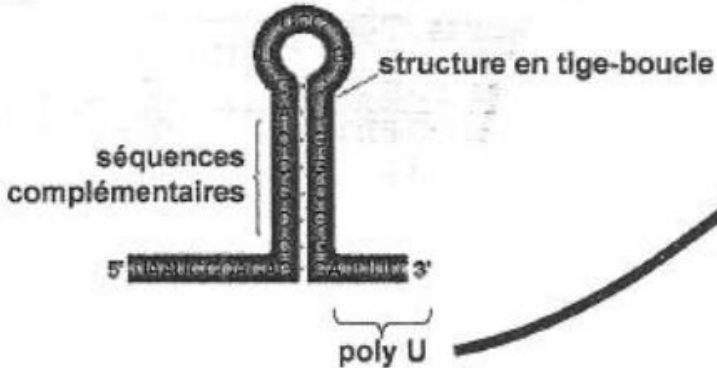
TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

Terminaison intrinsèque

L'ARN en cours de synthèse forme une structure tige-boucle qui provoque l'arrêt de la polymérase puis la dissociation du complexe transcriptionnel.

▸ La terminaison intrinsèque est un processus bi-phasique

▸ La structure de l'extrémité 3' de l'ARN est déterminante

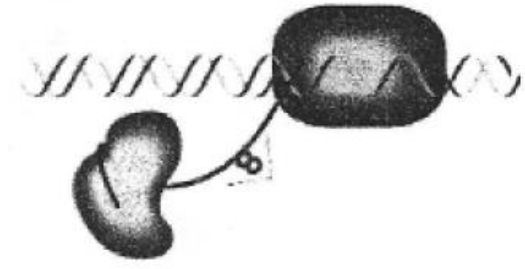


TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

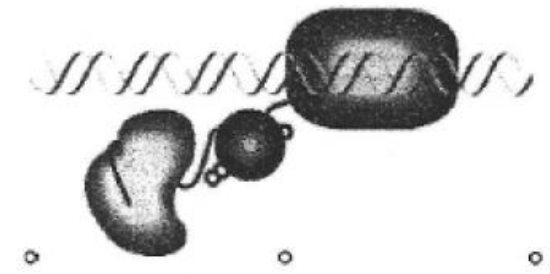
Terminaison Rho-dépendante

- Rho →
- facteur hexamérique (6 x 45 kDa)
 - domaine de fixation de l'ARN simple brin
 - domaine ATPase
 - Activité ADN-ARN hélicase

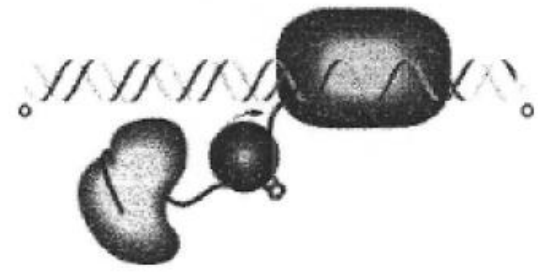
1 complexe ternaire en élongation



3 translocation de Rho vers l'extrémité 3' de l'ARN (hydrolyse d'ATP)



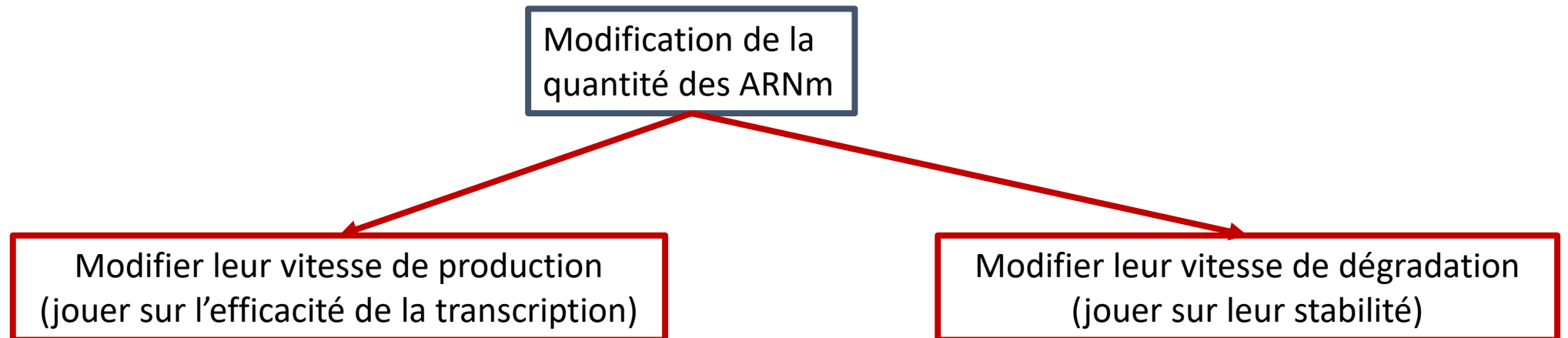
2 fixation du facteur Rho



4 dissociation du complexe ternaire par l'activité ADN-ARN hélicase du facteur Rho

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

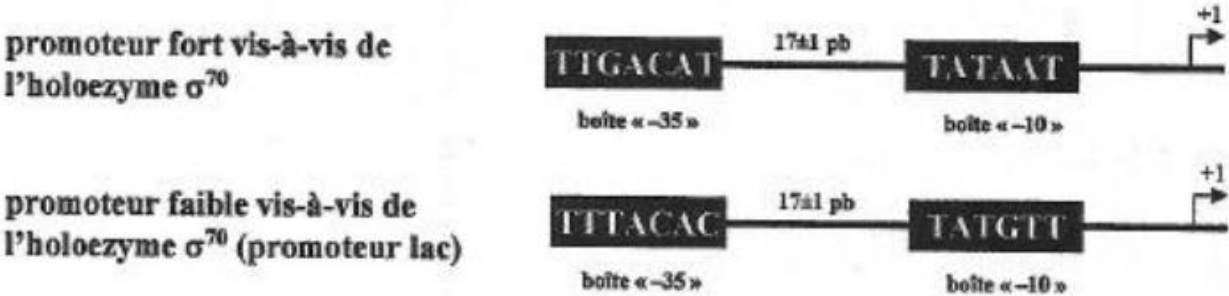
Les ARN produits par la transcription ont une durée de vie limitée (quelques minutes avant dégradation). Cela permet une régulation quantitative très dynamique de la production des protéines codées par les gènes transcrits, passant notamment par une régulation de la quantité des ARN messagers correspondants.



Les principaux mécanismes de régulation de la transcription se jouent lors de l'étape d'**initiation**.

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

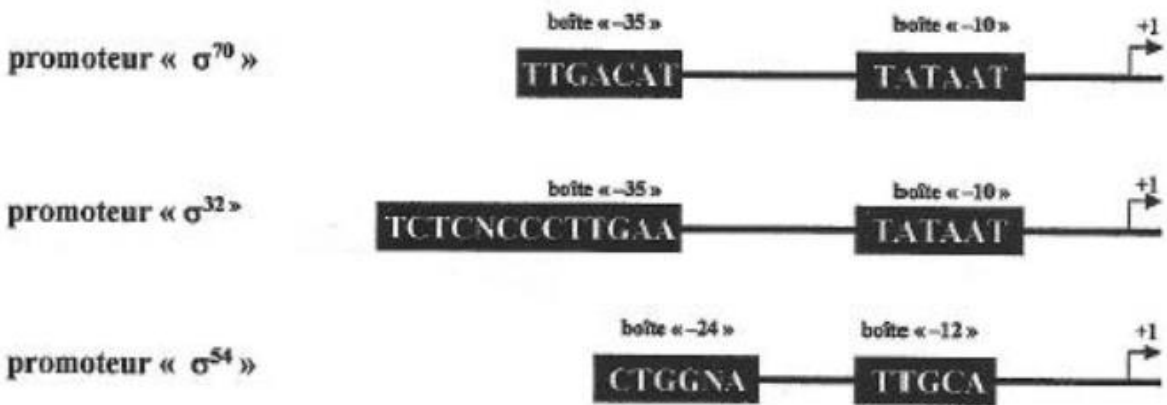
► Promoteur fort versus promoteur faible



Promoteur fort
 =
 Séquence très proche du consensus
 Haut niveau de transcription

Promoteur faible
 =
 Séquence plus éloignée du consensus
 Faible niveau de transcription
 Régulation possible

► Promoteur « σ^{70} » versus promoteur « σ^{32} » ou « σ^{54} »



Régulation de l'utilisation des promoteurs par changement du facteur σ ; notion de **régulon** (ensemble des gènes dont le promoteur est sous le contrôle du même facteur σ).

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Contrôle négatif :

transcription uniquement en l'absence d'inhibition par un répresseur (*lac/LacI*)

Contrôle positif :

transcription uniquement en présence d'un activateur (*lac/CRP*)

Induction par une petite molécule :

activation d'un facteur à effet positif (CRP)
inhibition d'un facteur à effet négatif (LacI)

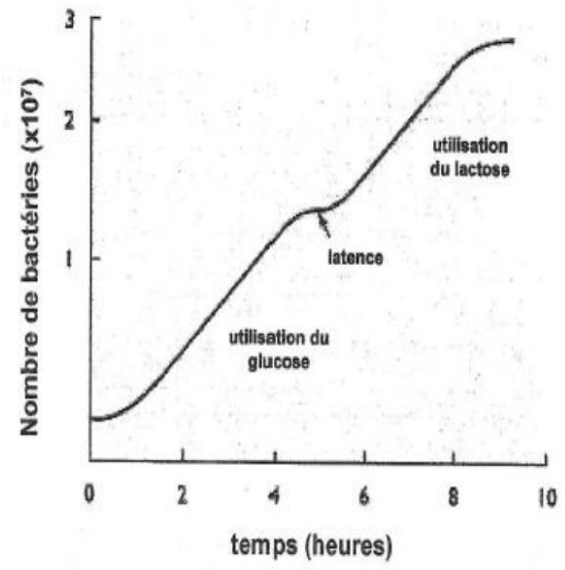
Corépression par une petite molécule :

permet l'action d'un répresseur (TrpR)
empêche l'action d'un activateur

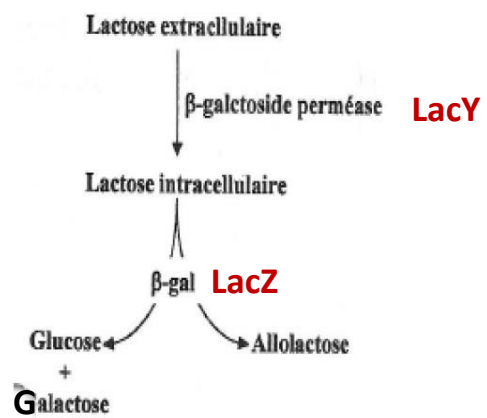
Un facteur régulateur peut être activé/inactivé par modification covalente
ex. phosphorylation (NtrC)

REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Phénomène de diauxie : croissance d'une souche d'E. coli quand on la cultive en présence d'un mélange glucose + lactose

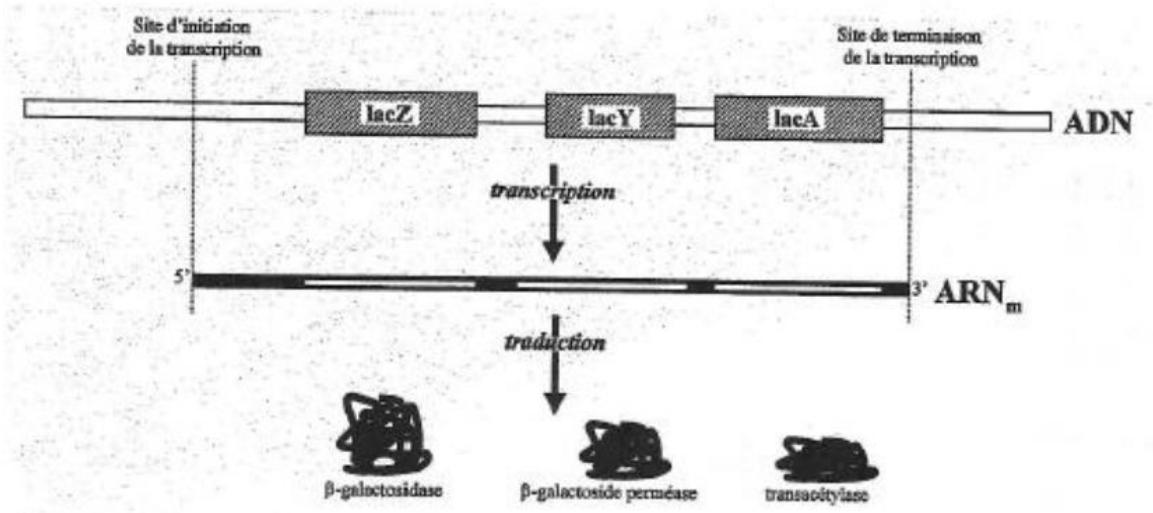


Prise en charge du lactose par les bactéries

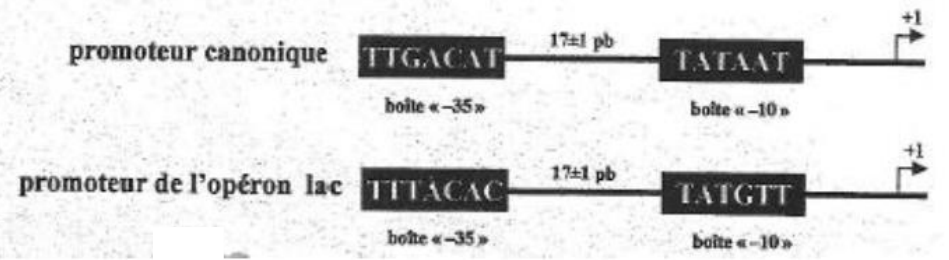


En l'absence de lactose : 5 molécules de β gal par cellule
 En présence de lactose : 5000 molécules de β gal par cellule

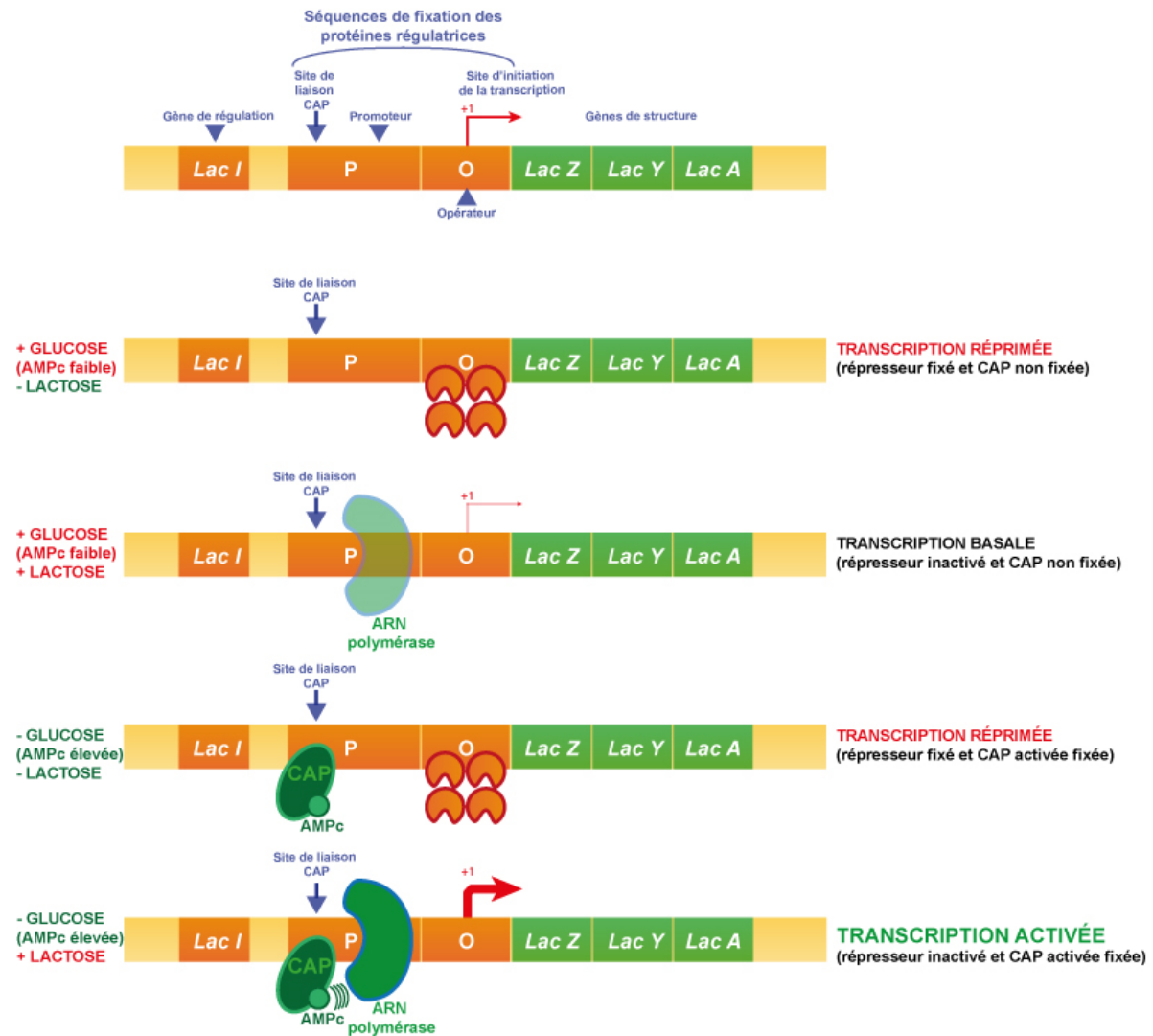
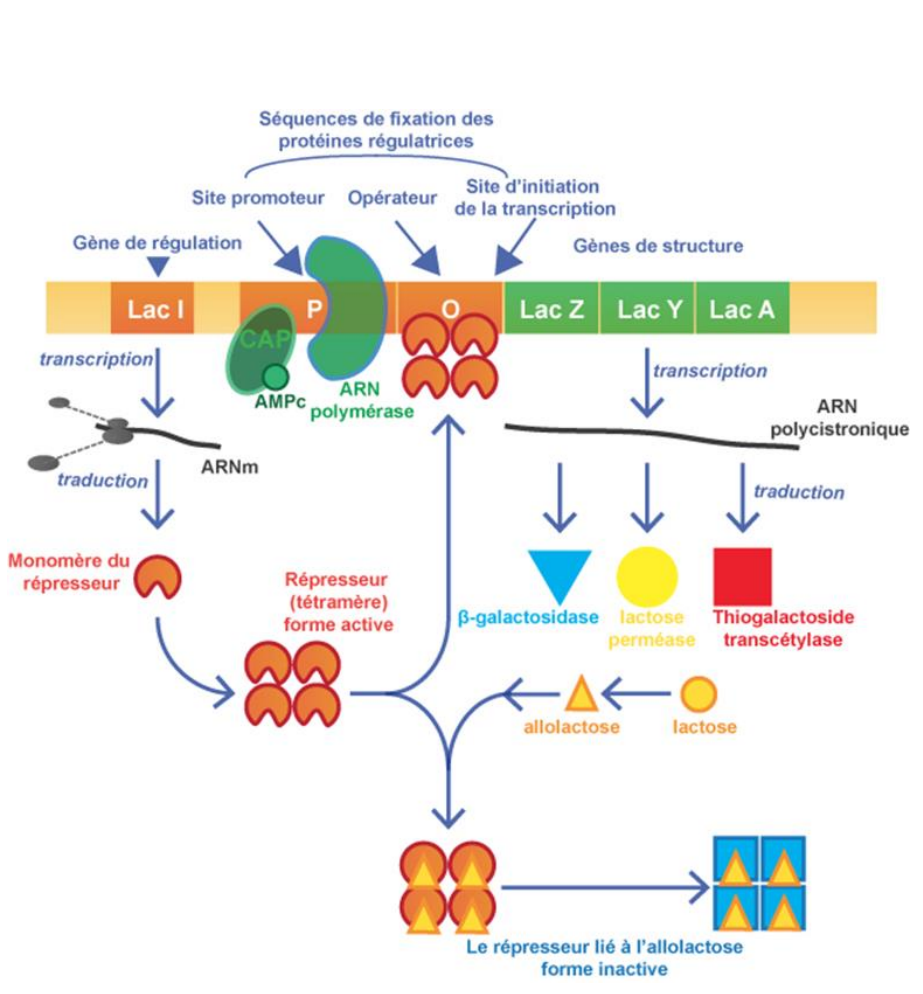
⇒ La transcription de l'opéron lactose est activée en présence de lactose (la β -galactosidase est le produit du gène lacZ)



L'opéron lactose est régulé par un promoteur faible



REGULATION DE LA TRANSCRIPTION



REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

En l'absence de lactose, le promoteur est inhibé par le produit du gène lacI qu'on appelle le répresseur, qui a de l'affinité pour une séquence appelée opérateur. En présence de lactose, des molécules d'allolactose produites par le métabolisme du lactose se fixent au répresseur, et diminuent très fortement son affinité pour l'opérateur. Il s'agit donc d'un mécanisme de **levée d'inhibition**.

Cela ne suffit pourtant par pour que la transcription de l'opéron lactose soit significative. En effet, le promoteur de cet opéron est un promoteur faible et l'ARN polymérase ne s'y fixe pas efficacement sans l'intervention d'un activateur. Cet activateur, c'est la protéine CAP, qui se comporte comme un activateur de l'ARN polymérase lorsqu'elle a fixé des molécules d'AMP cyclique (AMPc) (en absence d'AMPc, la protéine CAP n'a aucun effet sur la polymérase...). Or, en présence de glucose, la concentration d'AMPc est maintenu à un niveau faible, alors qu'en absence de glucose, cette concentration augmente. (mécanisme de **répression catabolique**)

Le lactose ne sera consommé que s'il est la seule source d'énergie

	lac I	opérateur	CRP	association CRP-Holo σ 70	activité du promoteur
lactose	[lac I-allo]	non occupé	[CRP-AMPc]	oui	forte
glucose	lac I	occupé	CRP	non	basale
lactose + glucose	[lac I-allo]	non occupé	CRP	non	basale

CRP = CAP