

*Biologie - Partie IV - La biodiversité et sa dynamique*

**A - Génomique structurale et fonctionnelle**

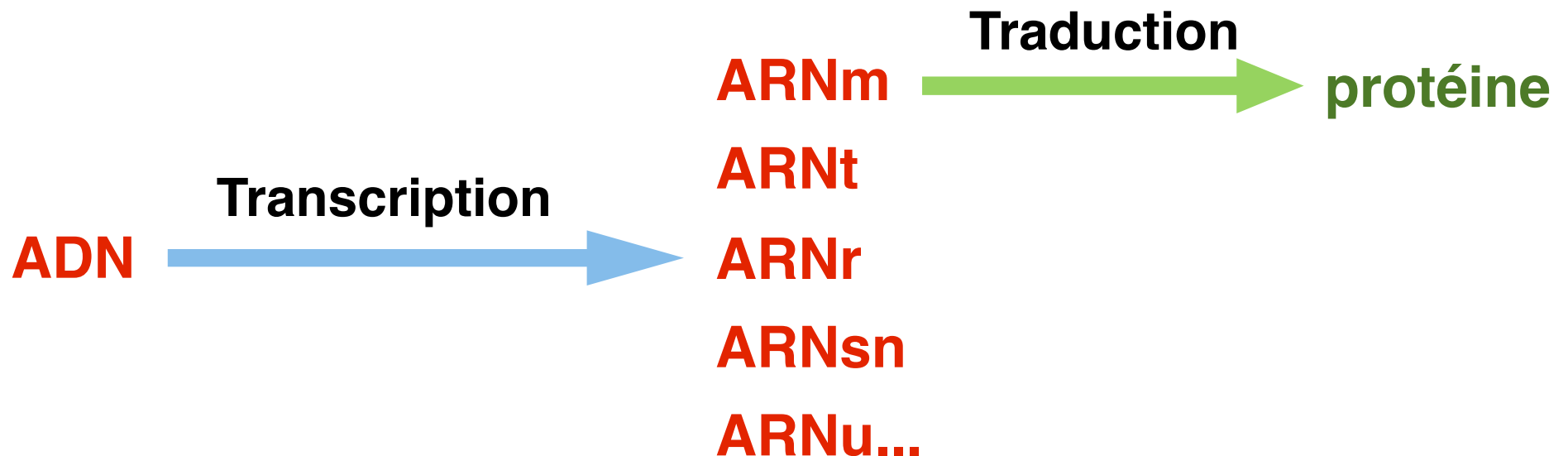
## **Chapitre 2**

**L'expression du génome :  
la transcription et son contrôle**

# La transcription dans la cellule

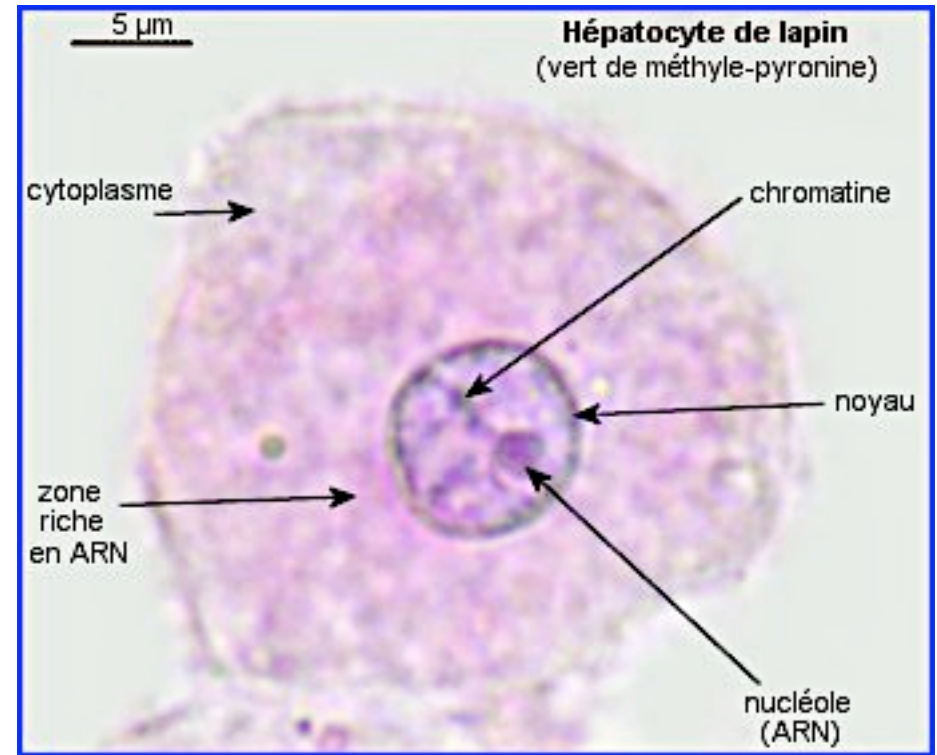
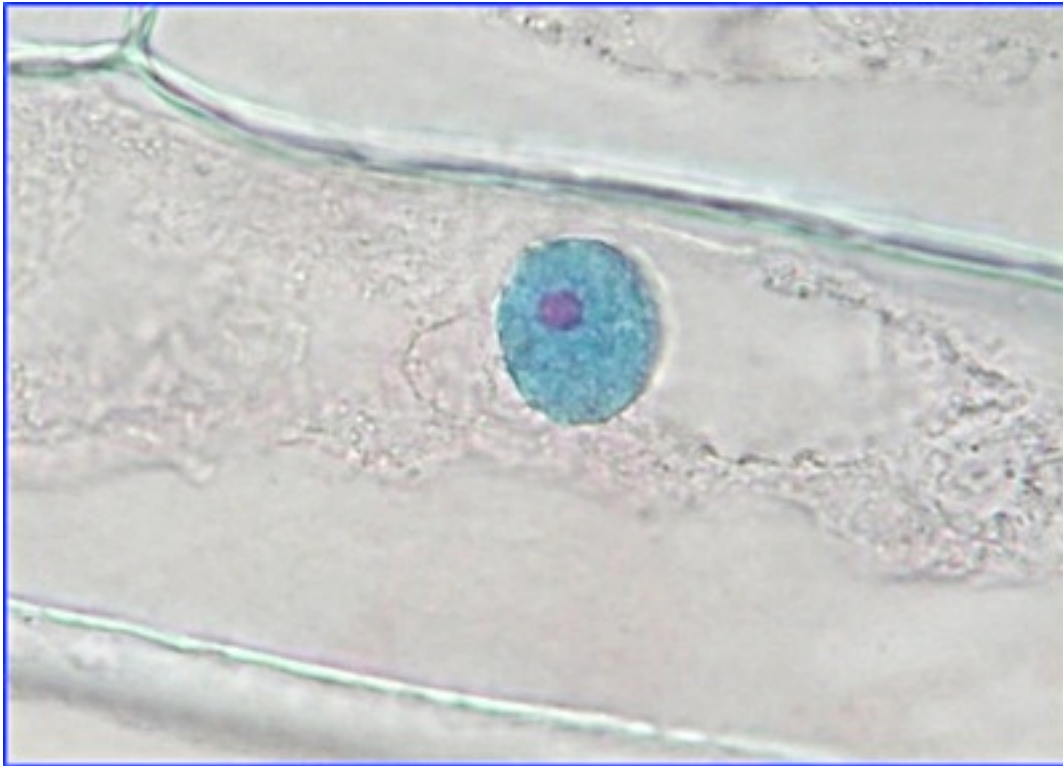


**Transcription = synthèse d'ARN par copie d'un brin d'ADN**



# 1. La transcription, de l'ADN à l'ARN

# Localisation des ADN et ARN



**Vert de méthyl-pyronine**

La coloration de Brachet au vert de méthyl pyronine colore en vert l'ADN et en rouge l'ARN.

# L'ARN polymérase d'*E. coli*



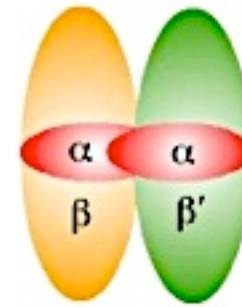
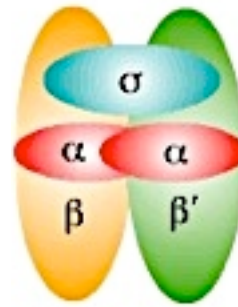
ARNpol

ARN

ADN

holoenzyme

enzyme cœur



initiation, interaction avec les protéines régulatrices



initiation et élongation

= polymérase 5' → 3'



liaison à l'ADN



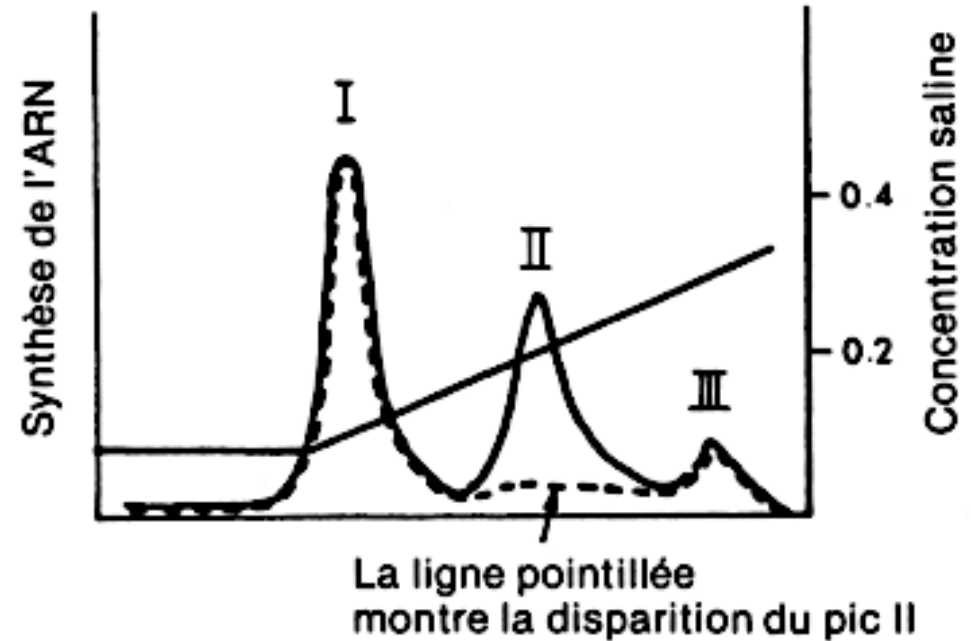
reconnaissance du promoteur

# Plusieurs ARN polymérase eucaryotes



## Séparation des ARN pol I, II et III par chromatographie

(élution par hausse de la concentration saline).  
Ligne pleine sans  $\alpha$ -amanitine et ligne pointillée avec  $\alpha$ -amanitine à  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ .



## Propriétés et fonctions des ARN polymérase eucaryotes

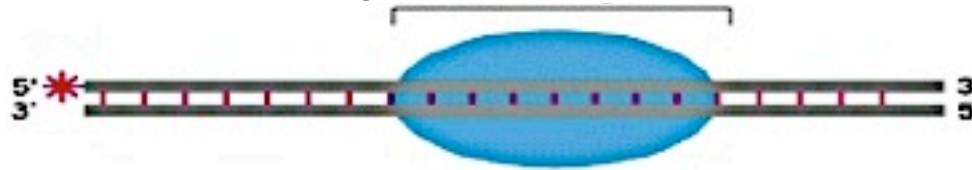
| <i>Enzyme</i> | <i>Localisation</i> | <i>Copies géniques</i> | <i>Inhibition par l'<math>\alpha</math>-amanitine</i> |
|---------------|---------------------|------------------------|---|
| I             | Nucléole            | ARN 18S et 28S         | Insensible  |
| II            | Nucléoplasme        | mARN                   | Sensible à de faibles concentrations                  |
| III           | Nucléoplasme        | tARN, ARN 5S           | Sensible à des concentrations élevées                 |

# Expérience de footprint : protection aux nucléases

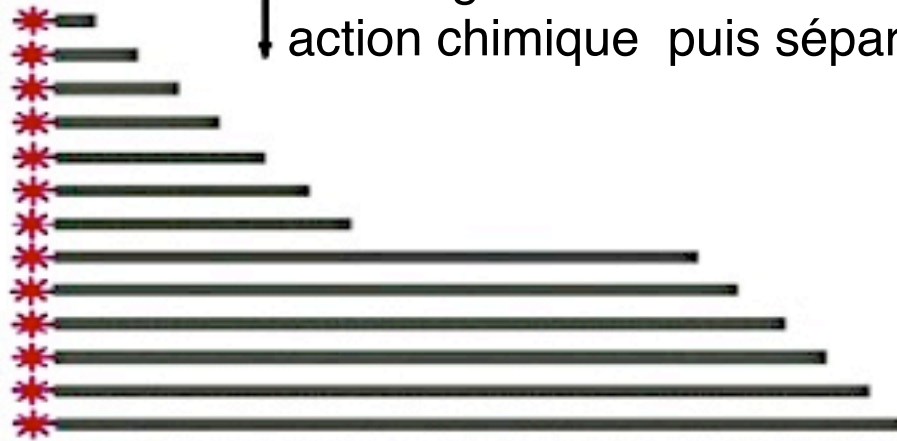
région d'ADN protégée par la protéine de liaison à l'ADN



(A)



clivage aléatoire de l'ADN par une nucléase ou par action chimique puis séparation des brins par chauffage



Familles de molécules d'ADN simple brin marqués en 5'

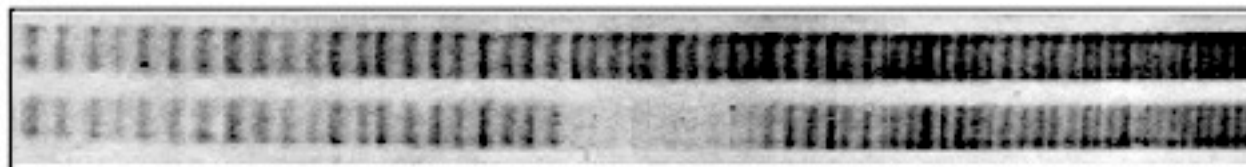
↓ Séparation des brins d'ADN par électrophorèse



«footprint» où aucun clivage n'est observé

↑ haut du gel

(B)



sans protéine

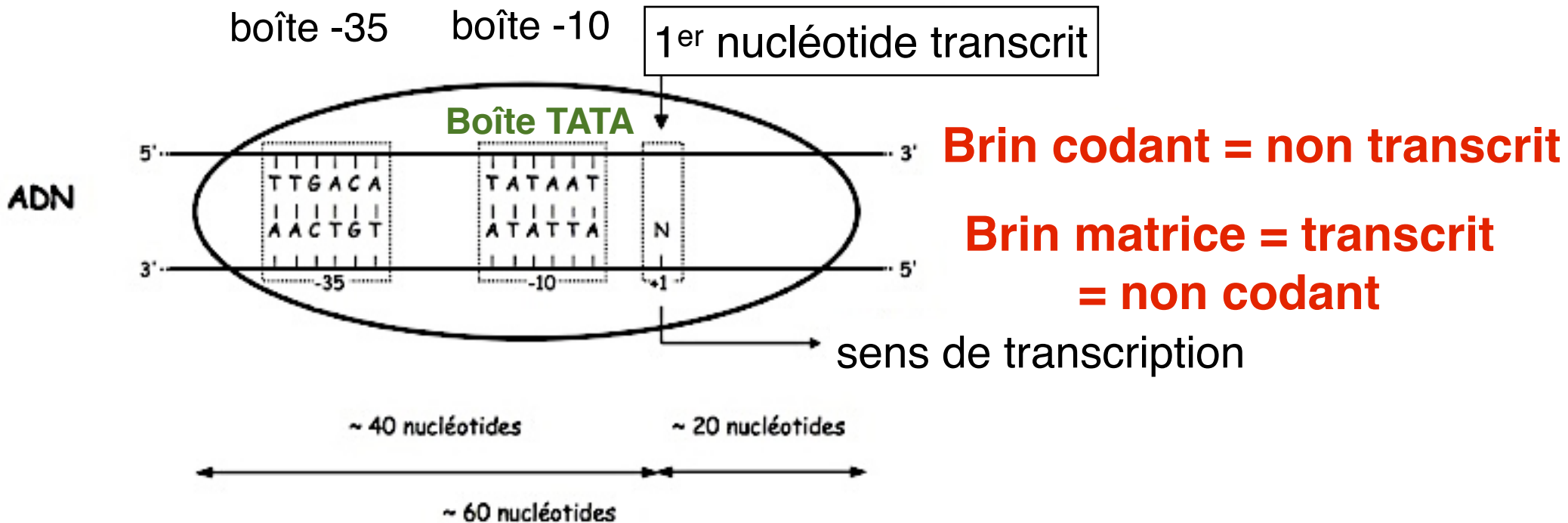
avec protéine

footprint

# Les promoteurs d'*E. coli*



**Le facteur  $\sigma 70$  reconnaît les promoteurs et s'y arrête.**

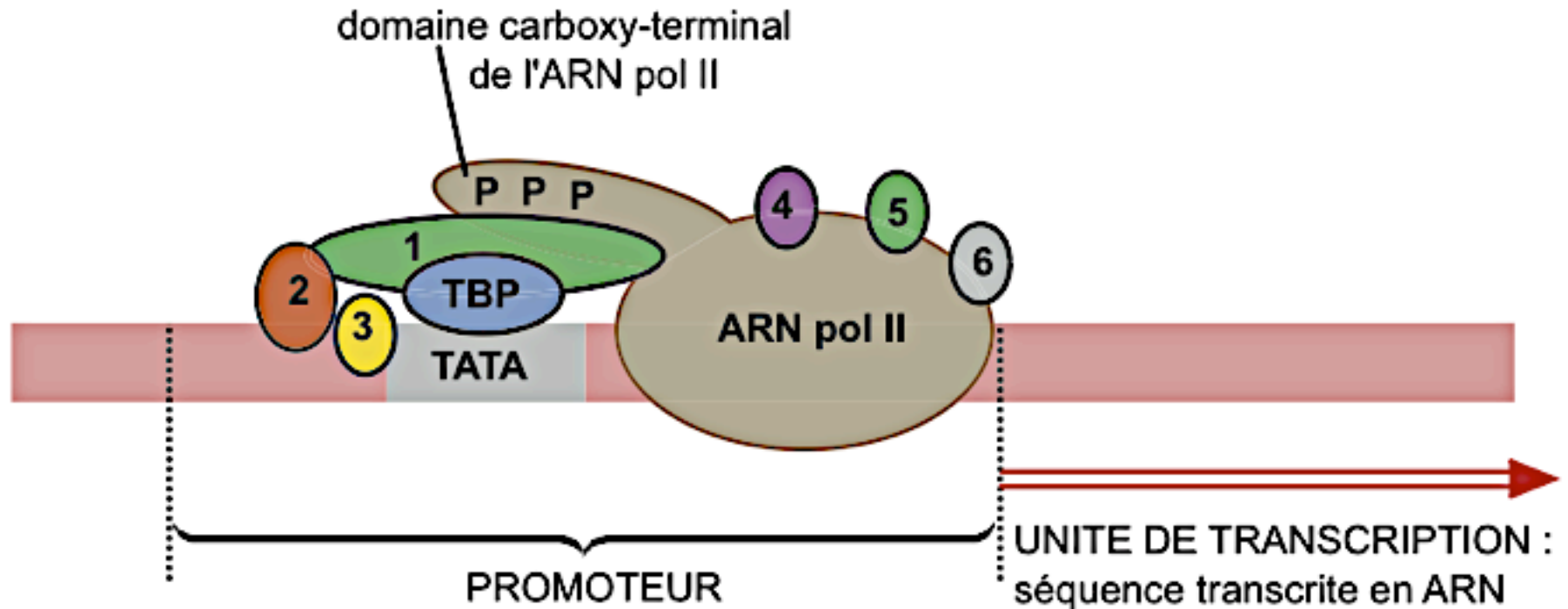


L'ARN polymérase recouvre environ 60 paires de nucléotides sur l'ADN

Il existe d'autres facteurs  $\sigma$  avec d'autres séquences promoteurs.



# Le complexe d'initiation eucaryote



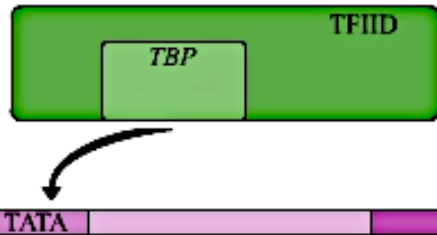
Promoteur et complexe d'initiation des eucaryotes.

Facteurs généraux de transcription numérotés (1, 2, 3...) selon leur ordre d'intervention.

# Un assemblage progressif (1)

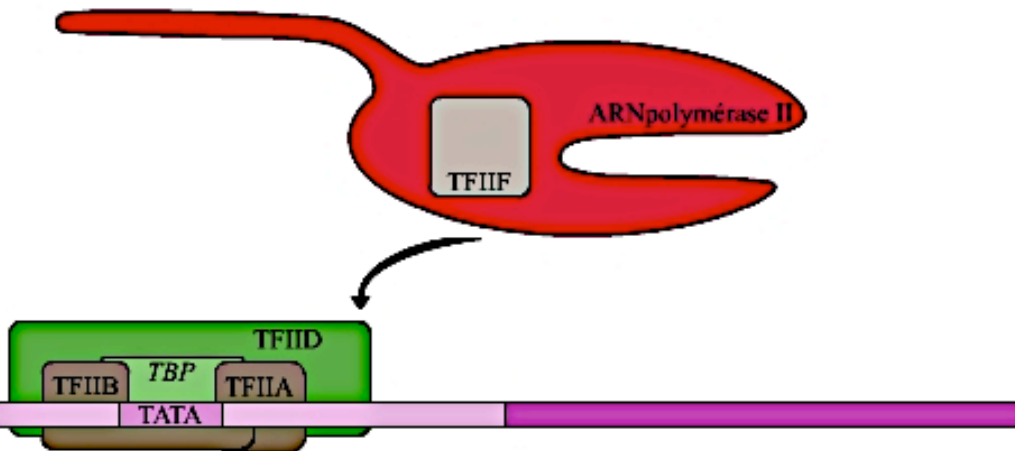


Arrivée de TFIID



Reconnaissance de la boîte TATA par TBP et TFIID

Recrutement de l'ARNpolymérase associée à TFIIF



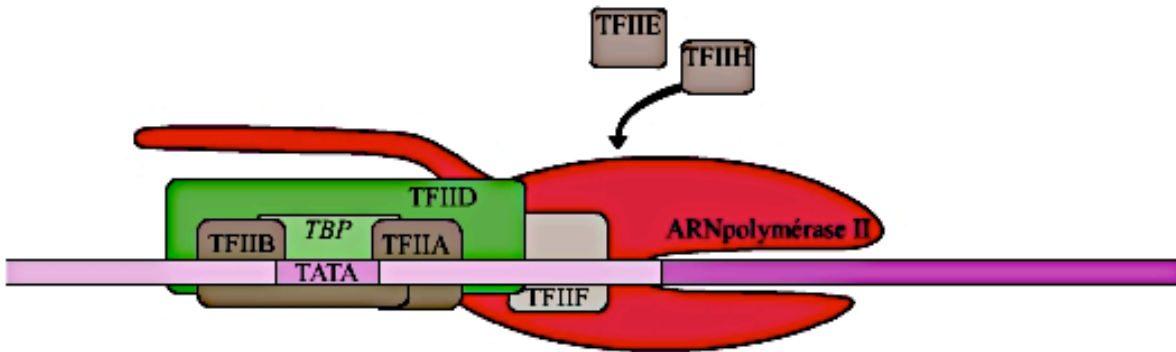
Association de TFII A et B  
Liaison de l'ARN pol II.  
TFIIB place précisément l'ARNpol II de manière à transcrire à partir du nucléotide +1.

# Un assemblage progressif (2)

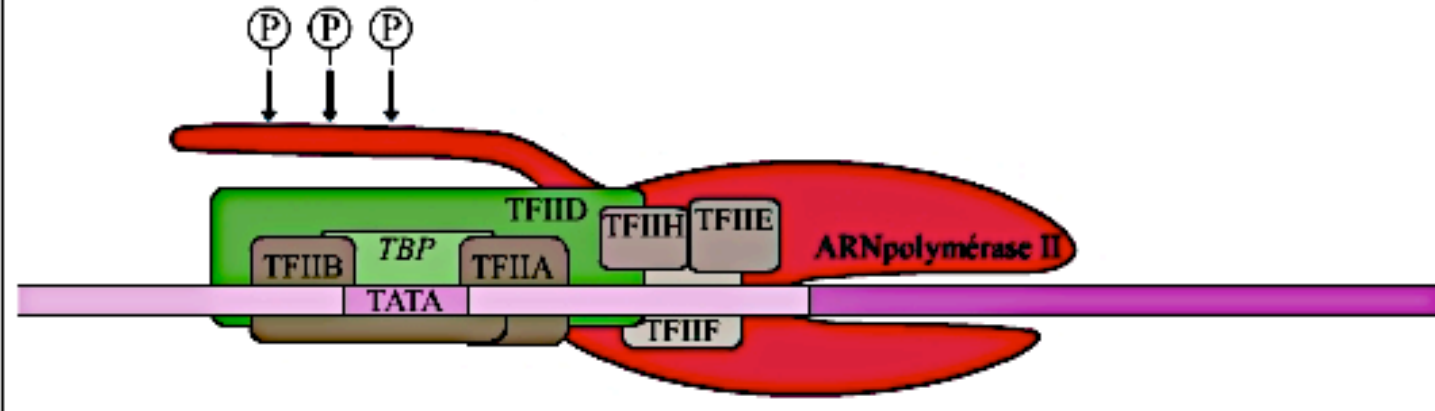


Arrivée de TFII H et E.  
TFIIH est une hélicase (ouvre la double hélice d'ADN) et une kinase.

Arrivée de TFII E et H complétant le complexe de préinitiation

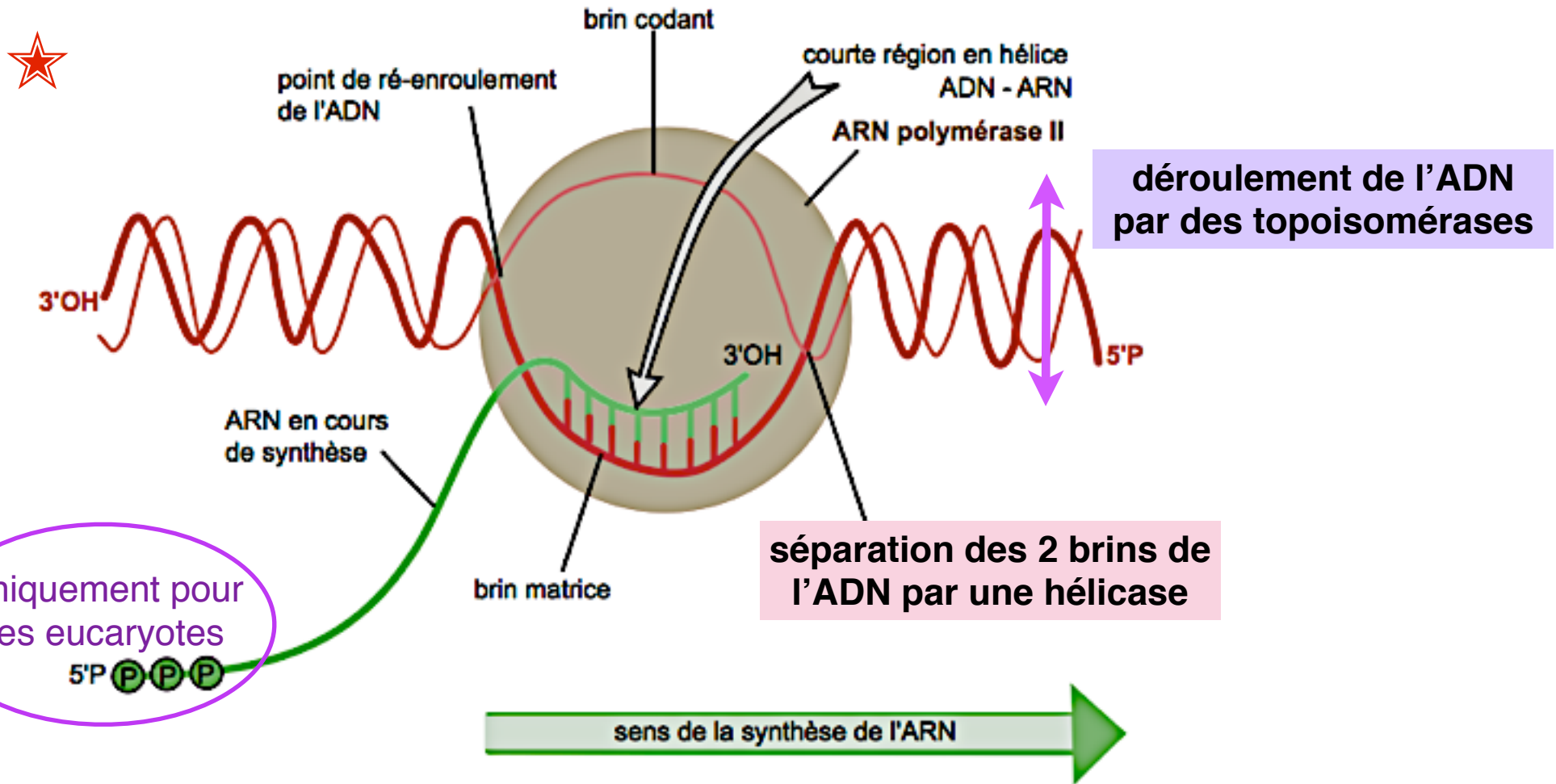


Phosphorylation de l'ARNpolymérase II, dissociation du complexe et début de la transcription



La phosphorylation de l'ARN pol II détache l'enzyme du complexe de pré-initiation (PIC) et déclenche le début de la transcription.

# Élongation de la transcription



ADN ouvert sur 17 paires de bases = **bulle de transcription**

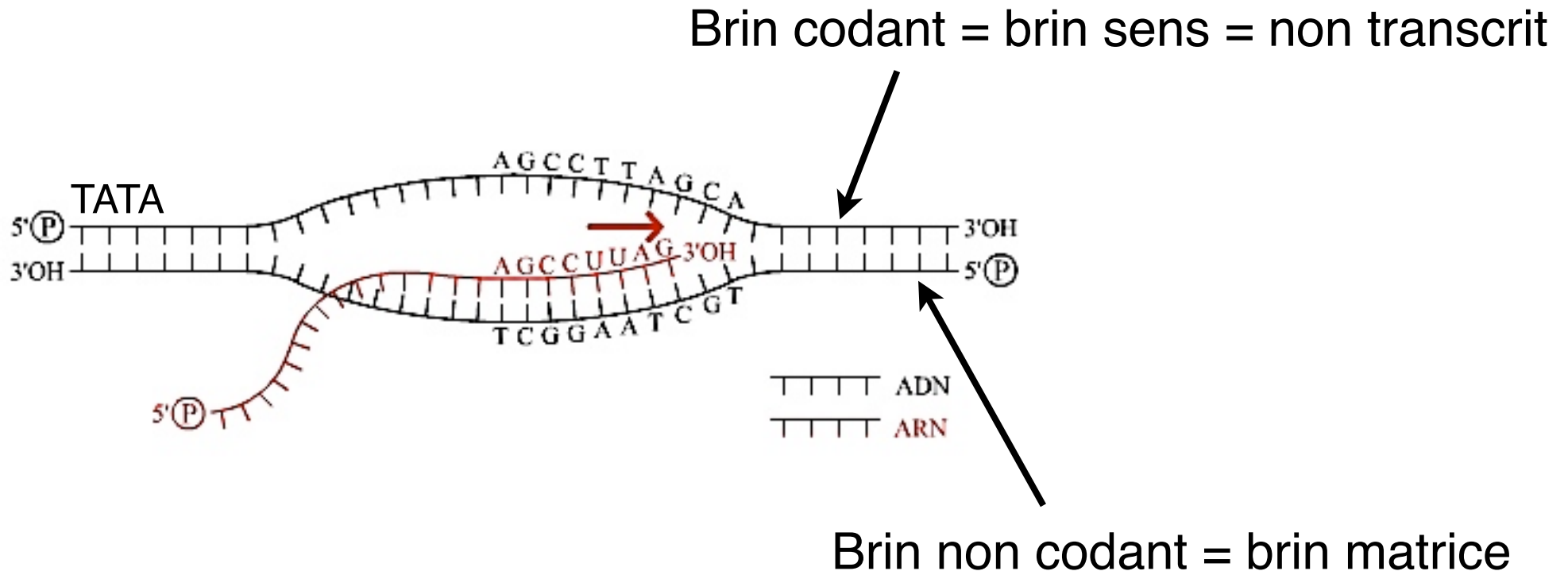
Hybridation ADN - ARN sur 8 à 12 nucléotides

Complexe protéique (ARN pol II + facteurs) recouvrant l'ADN sur 60 pb

# Orientation de la bulle de transcription



Synthèse d'ARN dans le sens 5' vers 3'.

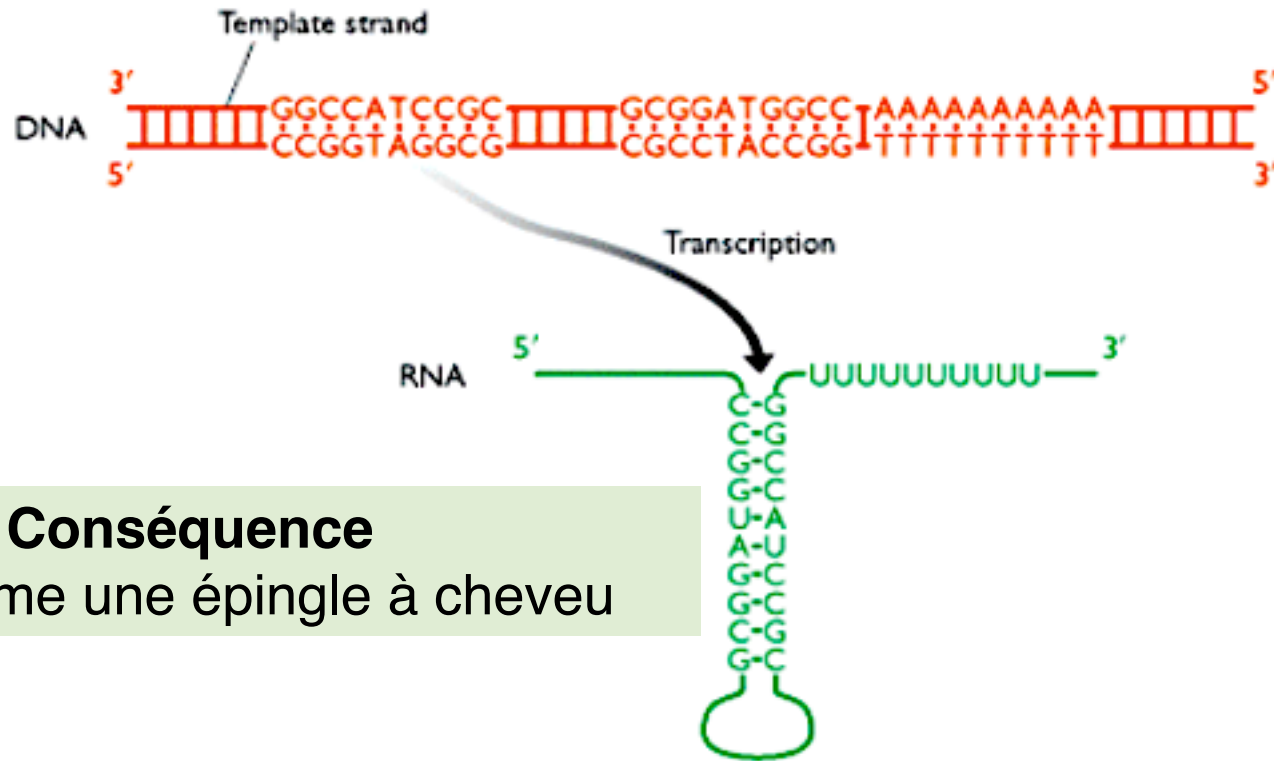


Le brin codant a la même séquence que l'ARN, hormis les T en place des U.

# La terminaison chez les Eubactéries



signal = séquence particulière en palindrome



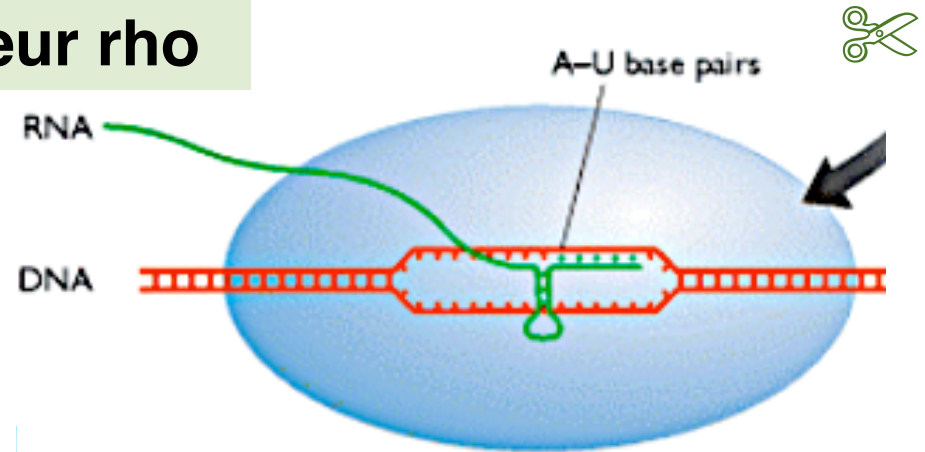
## Conséquence

l'ARN forme une épingle à cheveu

# Terminaison chez les Eubactéries : 2 cas

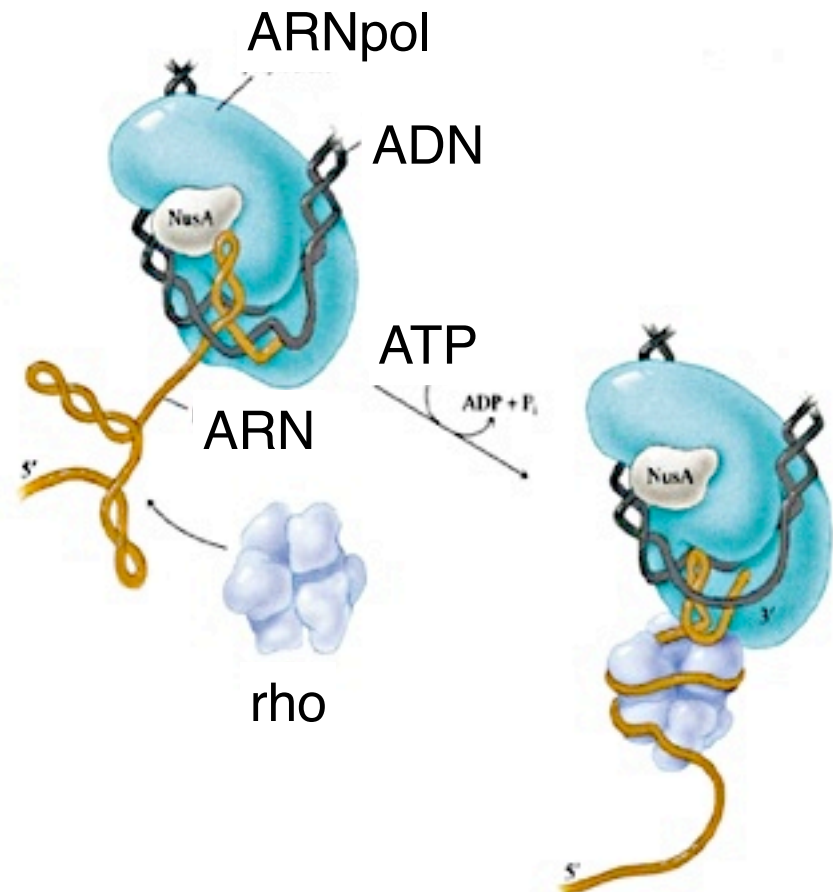
## Terminaison indépendante du facteur rho

La structure en épingle à cheveu est solide, l'ARN pol est bloquée et la transcription s'arrête



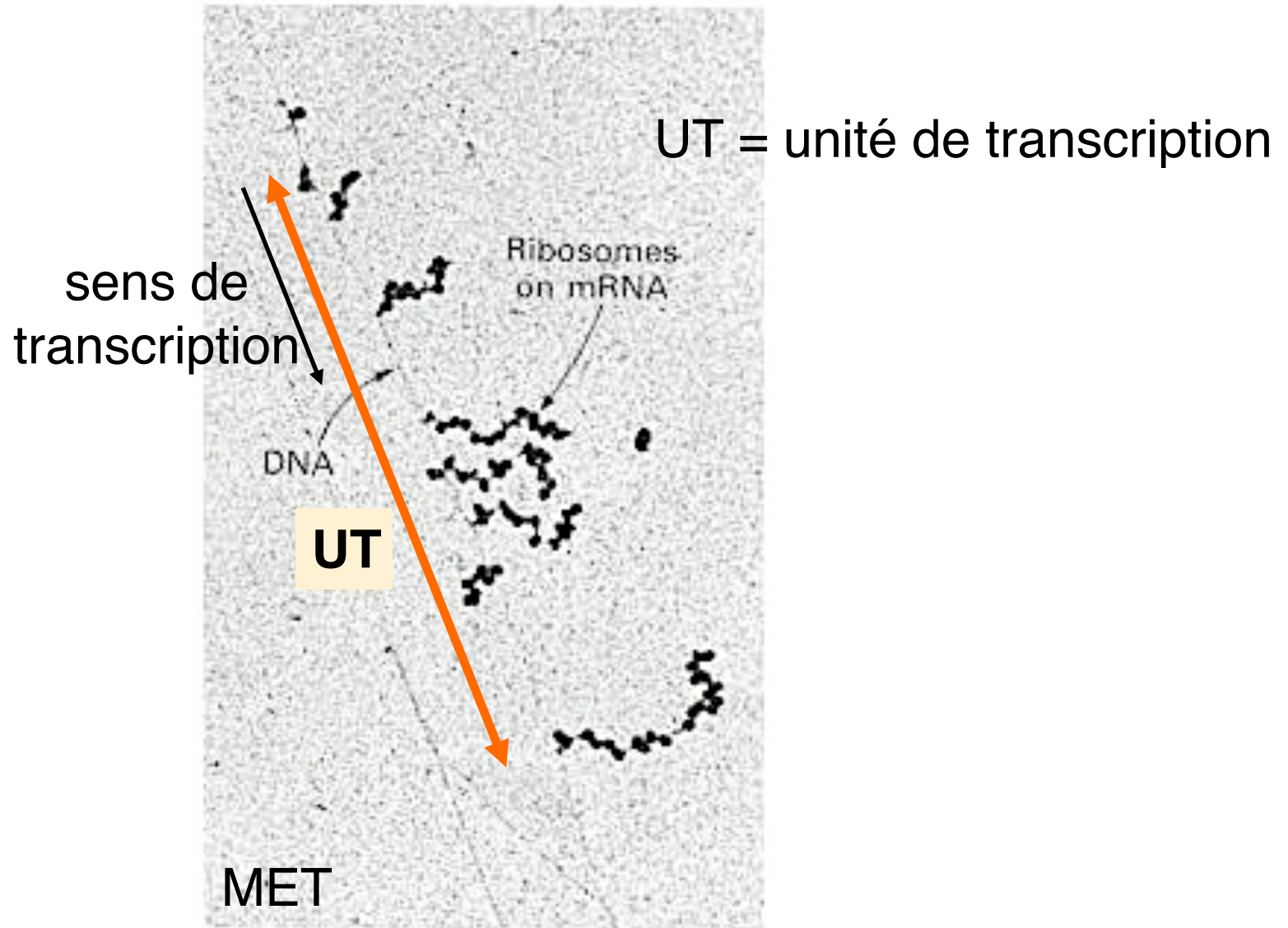
## Terminaison dépendante du facteur rho

L'épingle à cheveu est reconnue par un facteur protéique de terminaison, le facteur rho, qui arrête la transcription et dissocie le complexe.





# Plusieurs transcriptions simultanées



Cas des Procaryotes



# BILAN



**Transcription** = copie d'une séquence d'ADN en ARN

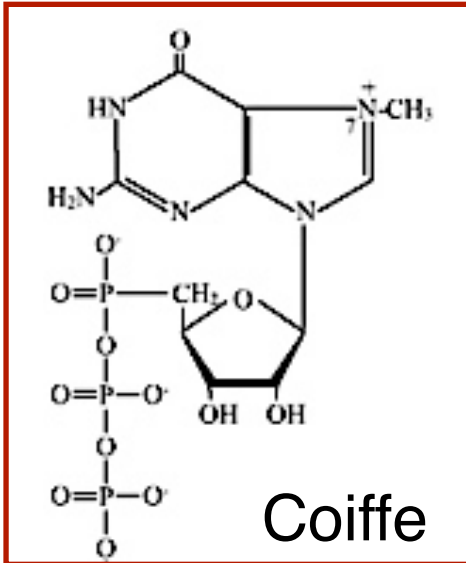
Plusieurs types de molécules d'ARN sont produits.

La transcription est déclenchée au niveau d'une séquence = **promoteur**, reconnue par des facteurs de transcription ( = facteur sigma pour les Eubactéries et facteurs de transcription généraux (TF) pour les eucaryotes).

Des signaux de fin de transcription arrêtent la polymérisation de l'ARN : séquence en palindrome pour les Eubactéries ou séquence riche en T pour les Eucaryotes.

## **2. La maturation des ARN eucaryotes**

# La coiffe en 5'



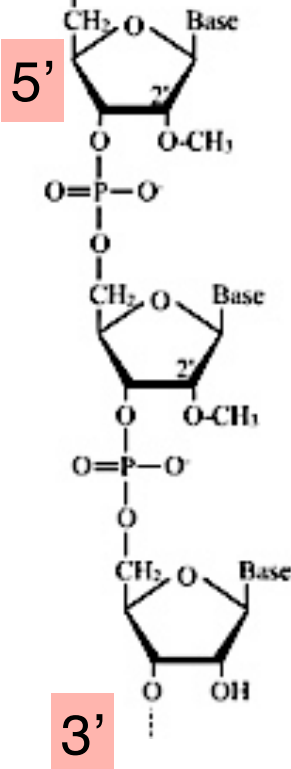
5'

G - PPP - ARN ----- 3'

3'

représentation simplifiée

ARN

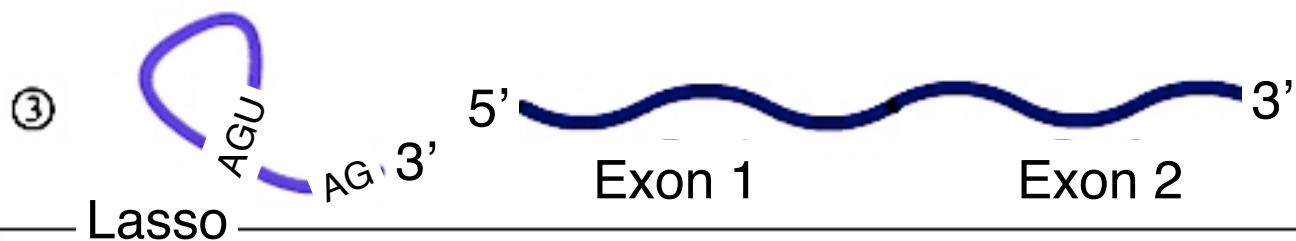
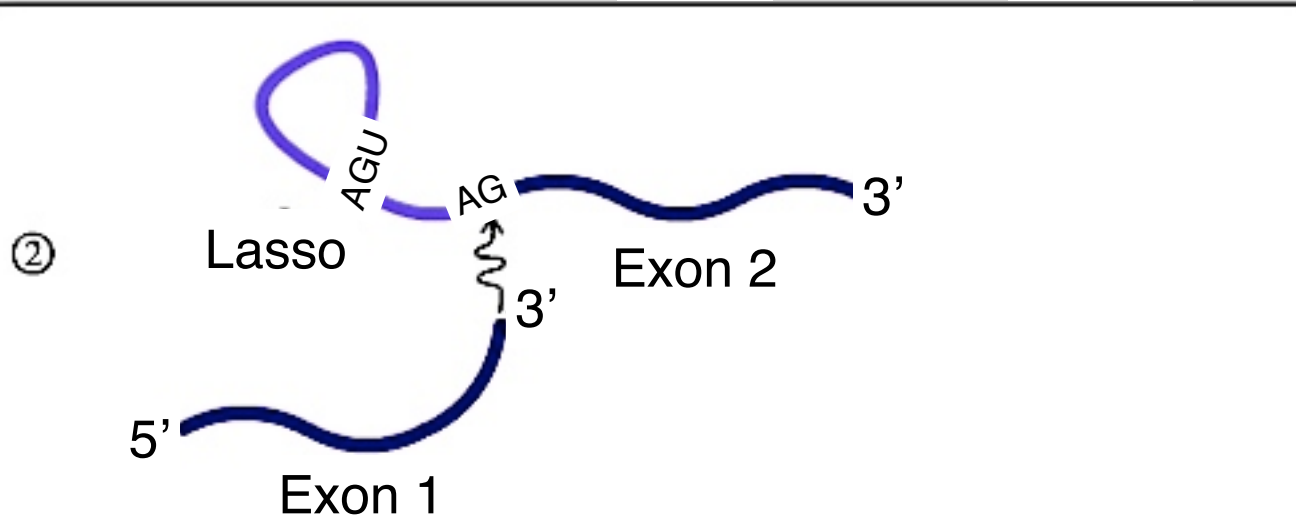
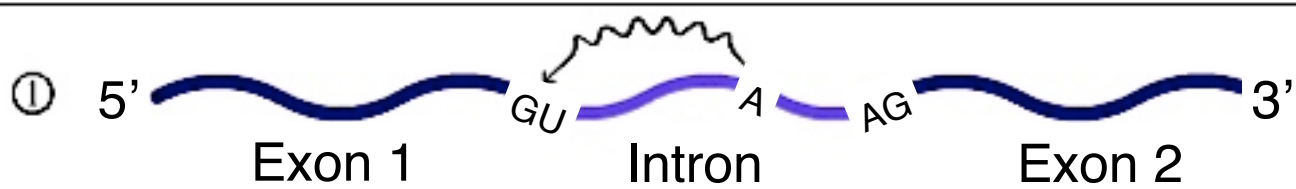


## Rôles de la coiffe

- protection contre la dégradation
- nécessaire à l'exportation hors du noyau
- nécessaire à la traduction



# Excision et épissage : mécanisme

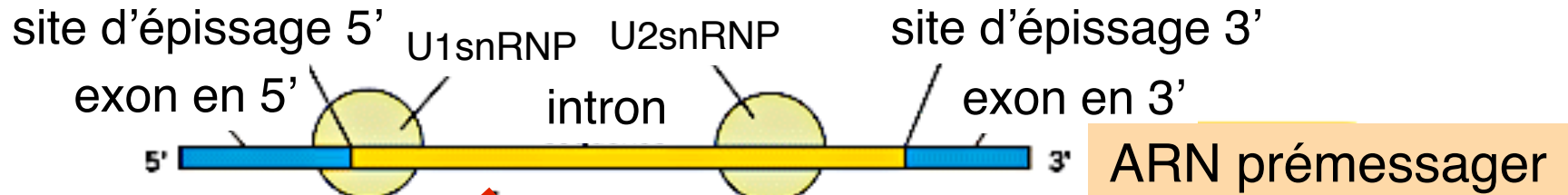


1) Attaque nucléophile du OH du A sur le groupement phosphate de G => lasso et libération de l'exon 1

2) l'extrémité 3'OH de l'exon 1 procède à une attaque nucléophile sur le G en 3' de l'intron => lasso libéré et les 2 exons sont liés

Les séquences GU et AG qui bordent l'intron sont les **séquences de Chambon**, médaille d'or du CNRS en 1979 et prix Gairdner en 2010, à Strasbourg, fondateur de l'IGBMC et l'ESBS.

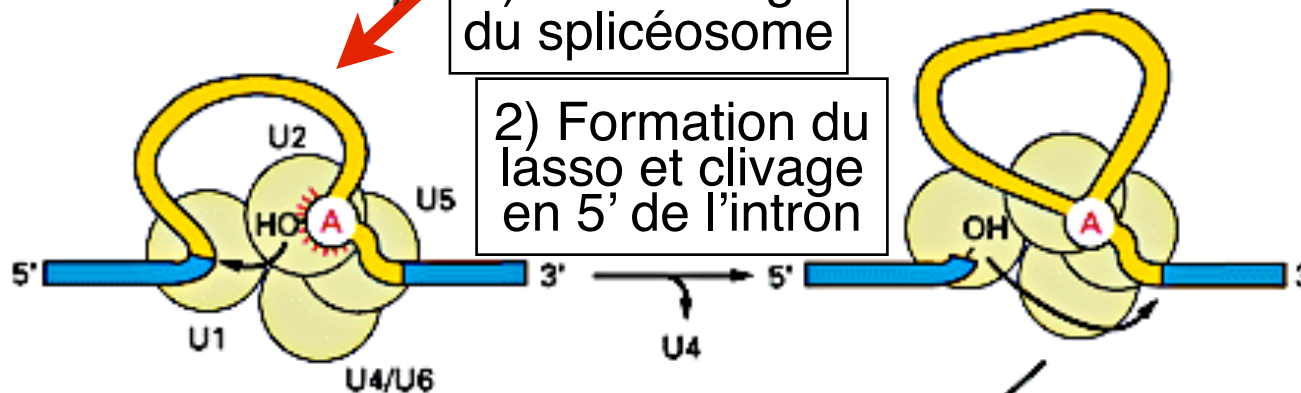
# Mécanisme d'excision / épissage



U4, U5, U6...

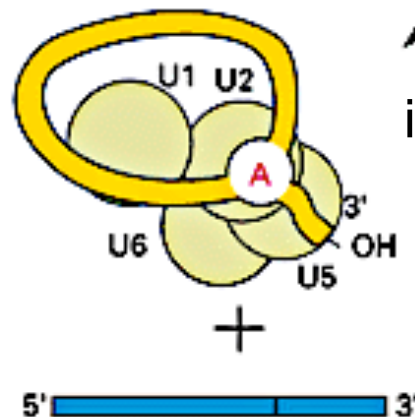
1) Assemblage du spliceosome

2) Formation du lasso et clivage en 5' de l'intron



3) clivage en 3' et ligation des 2 exons

intron excisé en forme de lasso (sera détruit dans le noyau)



ARNm mature

**Splicéosome** 

= snRNP (small nuclear RiboNucleoParticle)

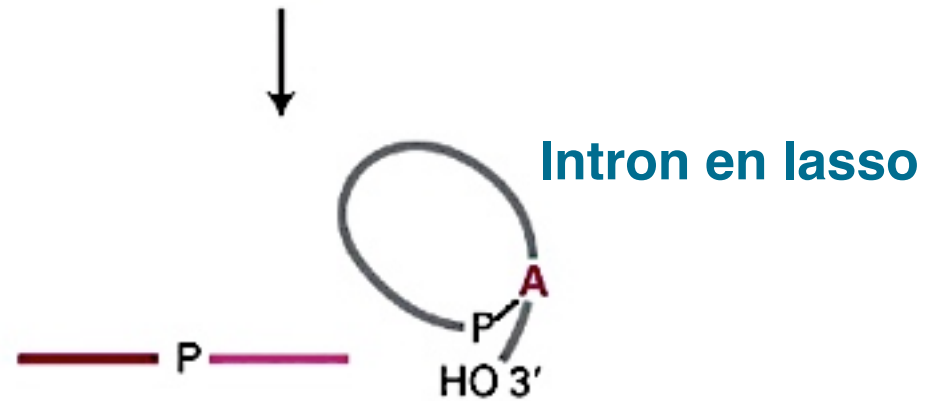
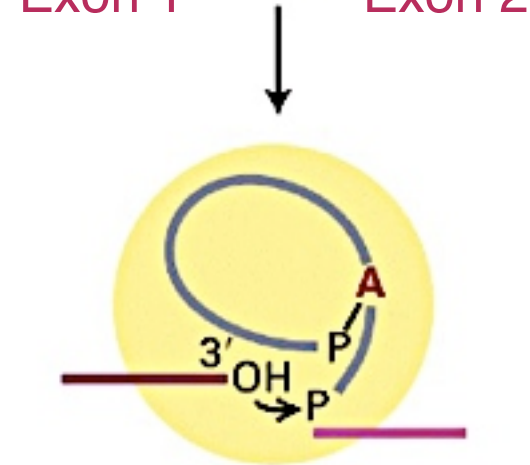
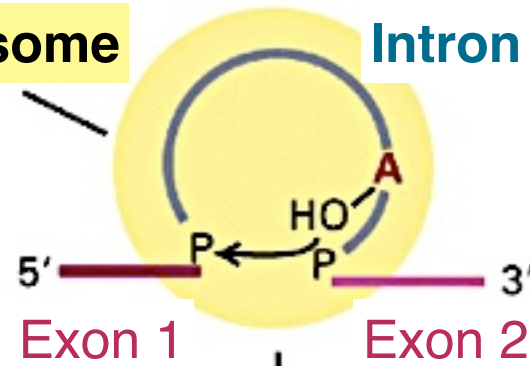
= assemblage de protéines et d'ARNsn

# Excision et épissage



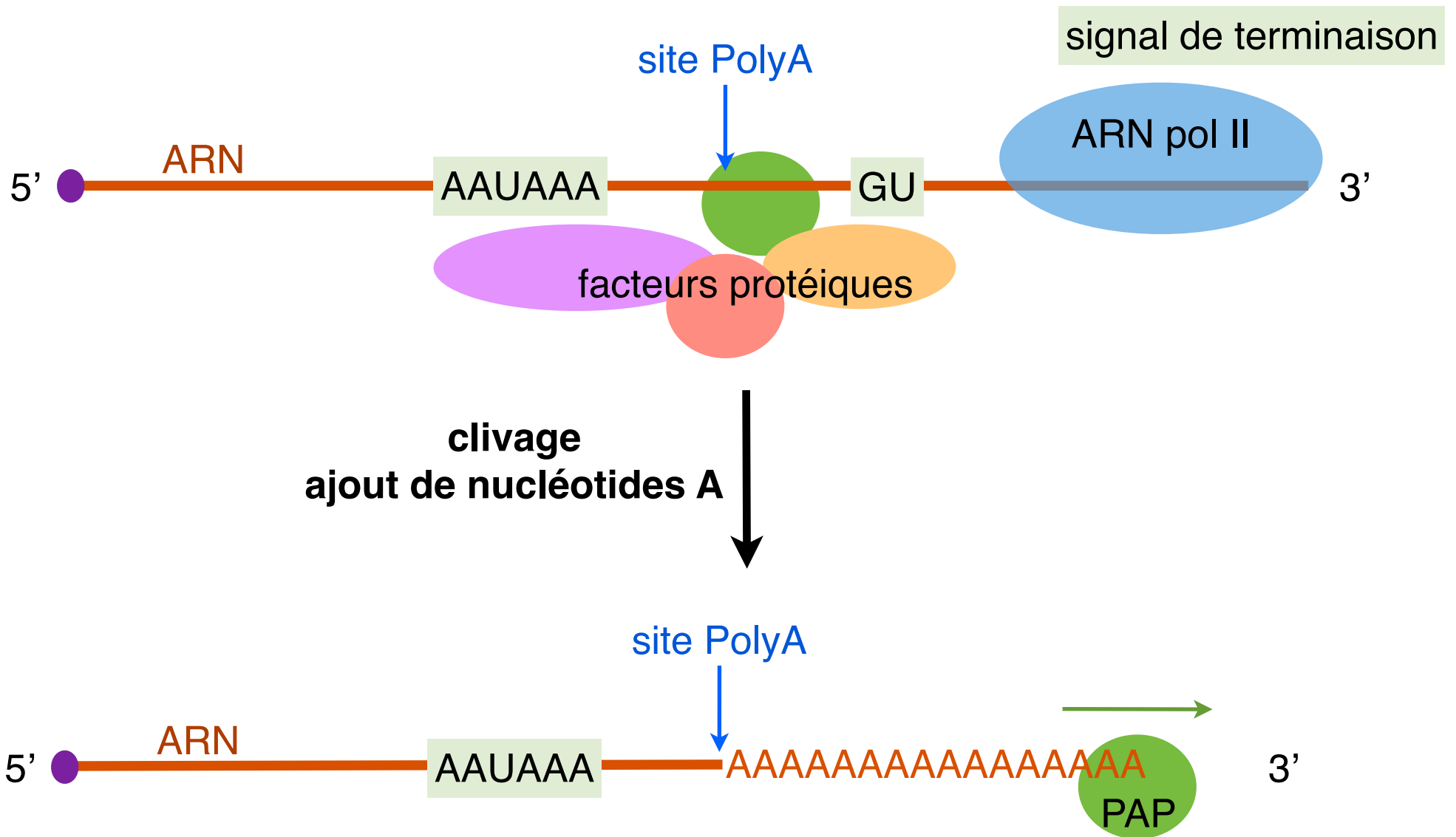
Splicéosome

Intron

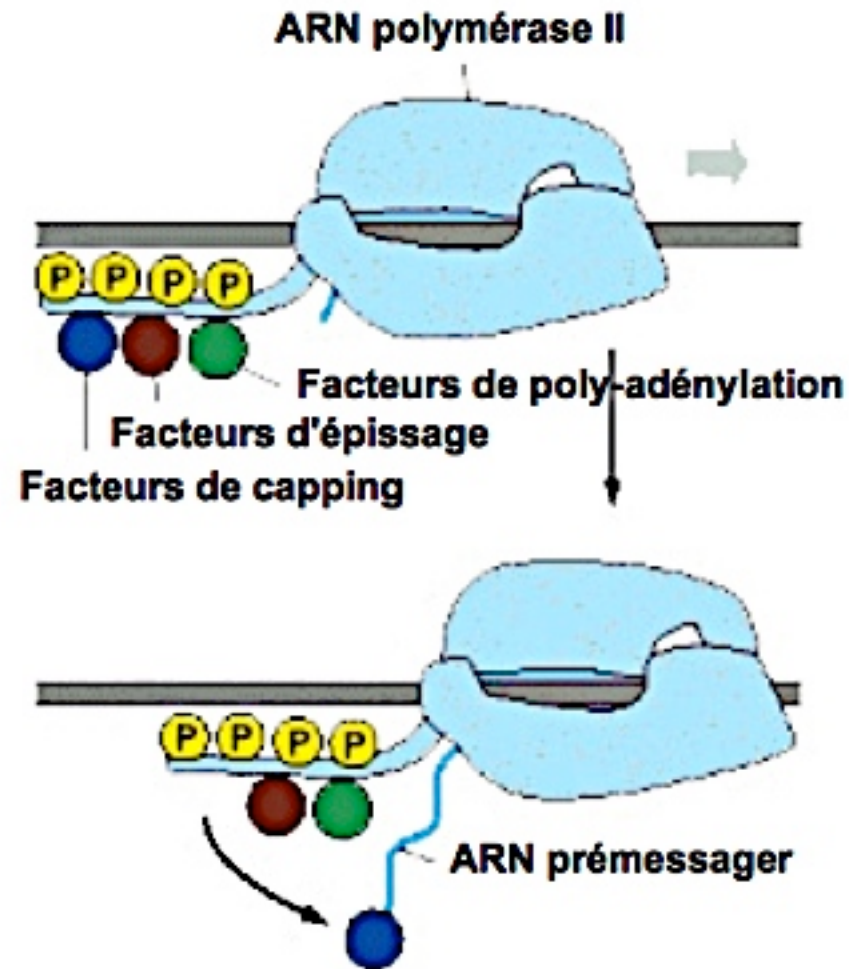


version simplifiée

# Ajout de la queue polyA en 3'



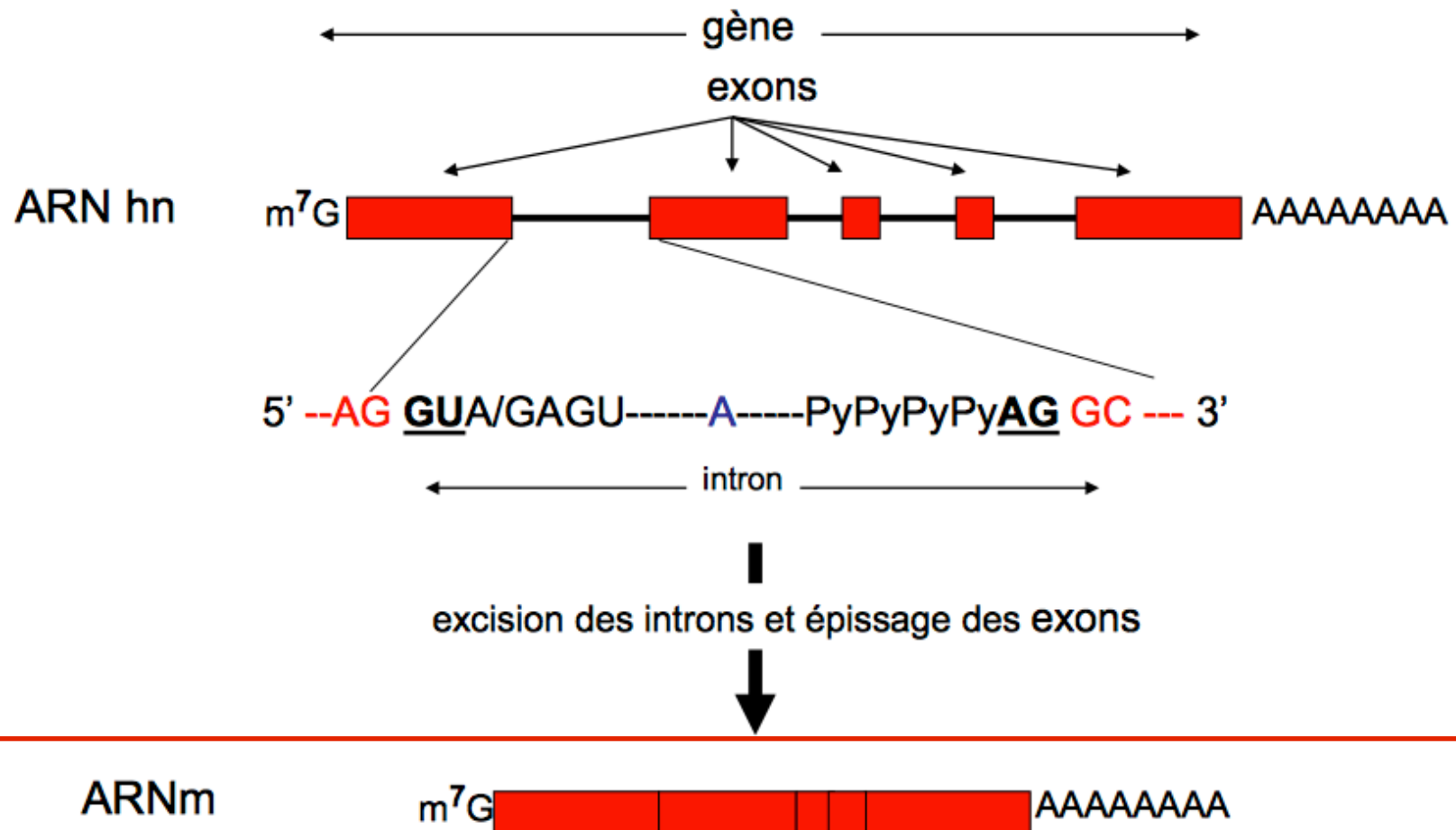
# La maturation a lieu pendant la transcription



capping = mise en place de la coiffe



# Bilan

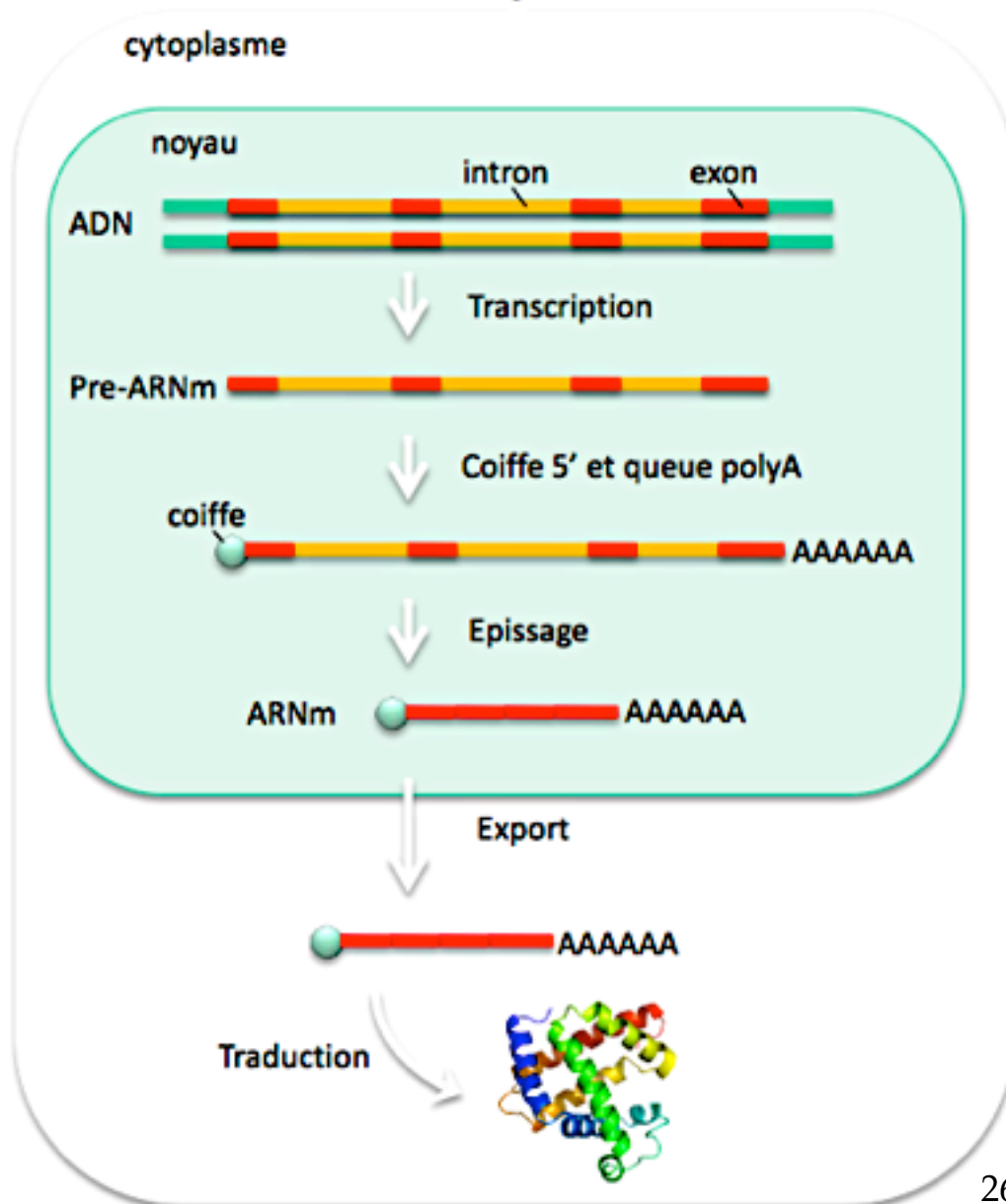


ARNm mature : coiffe + queue polyA + exons seulement

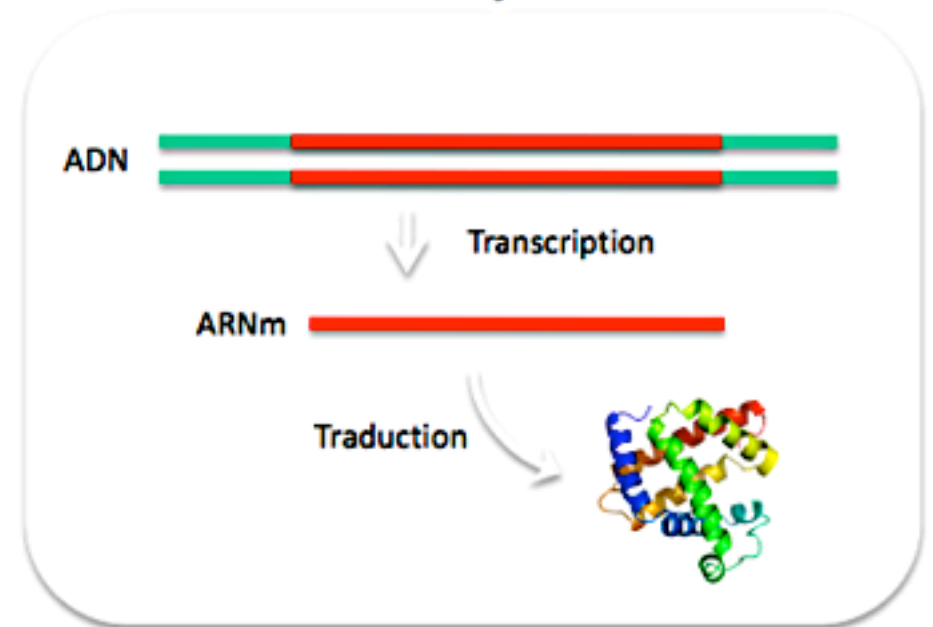
# BILAN pour les ARNm



## Eucaryotes

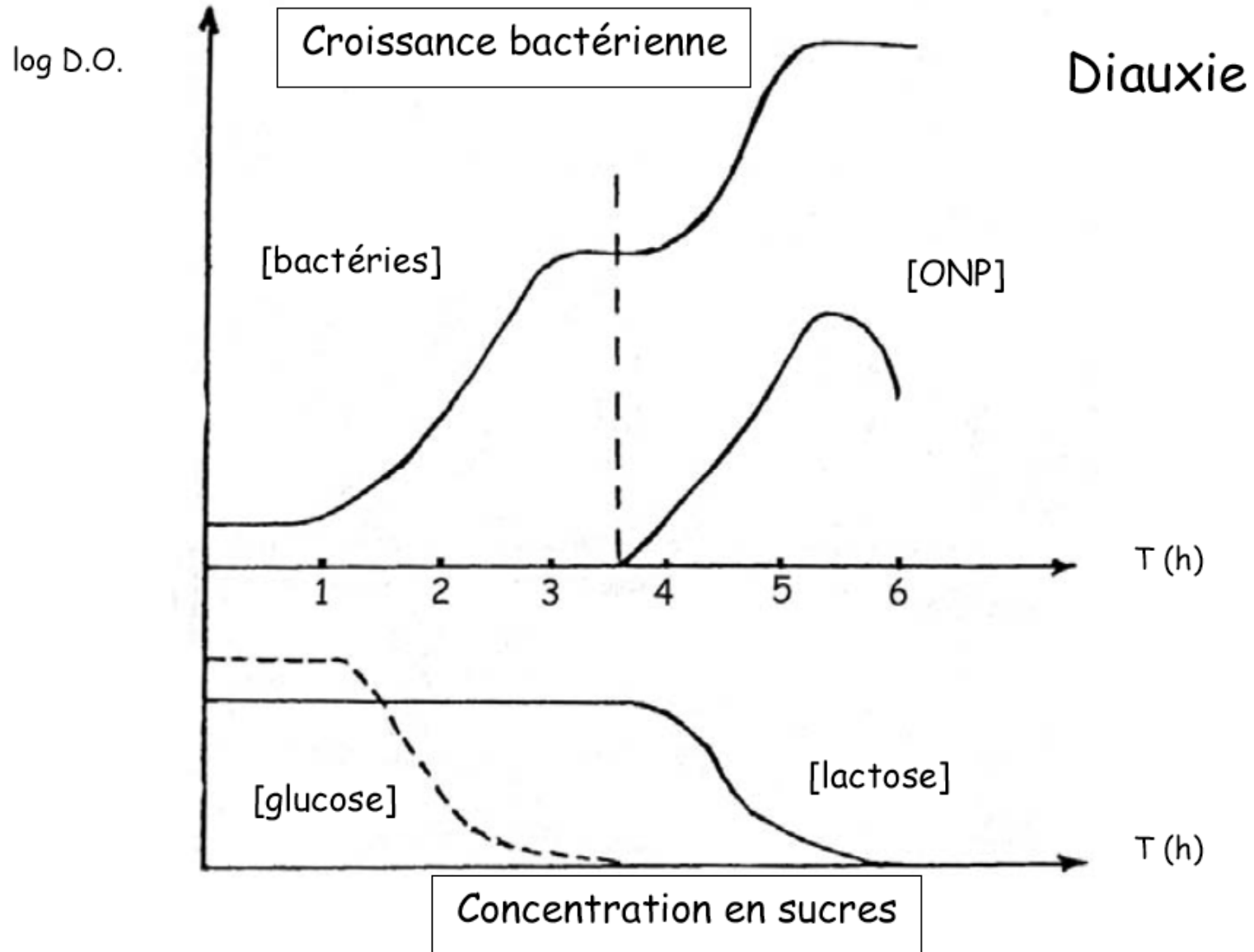


## Procaryotes



# 3. Le contrôle de la transcription

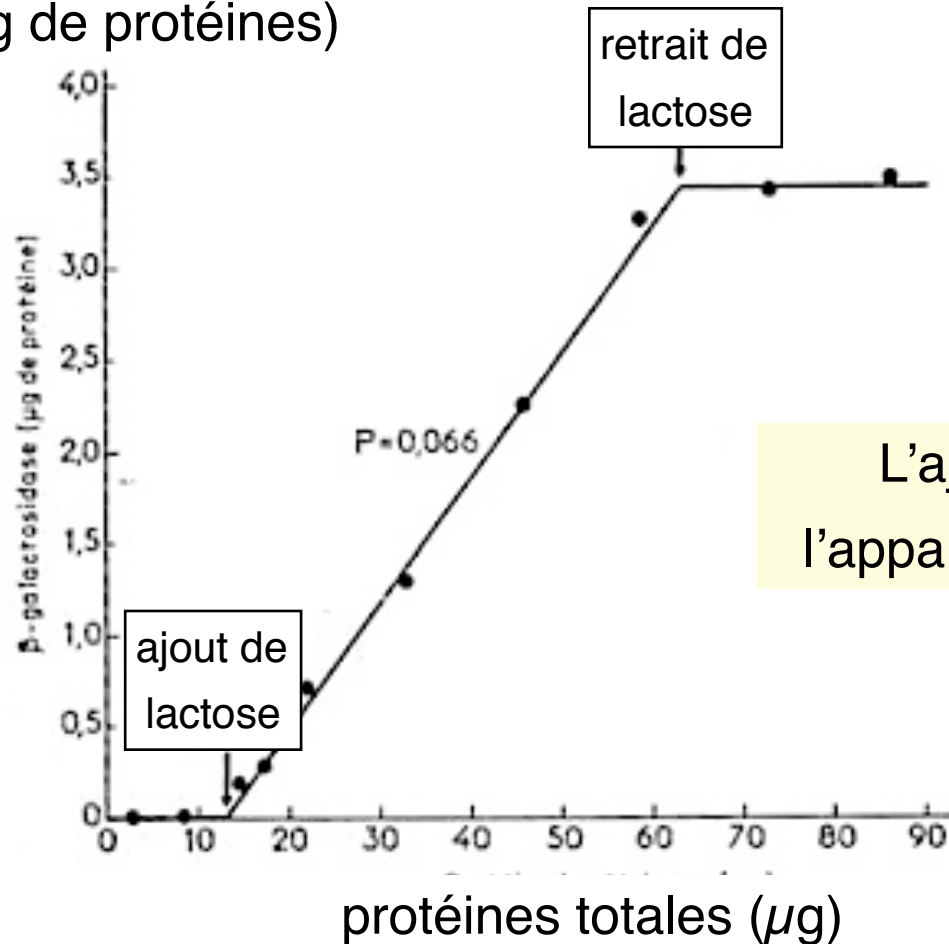
# La diauxie



# L'opéron lactose



$\beta$ galactosidase ( $\mu\text{g}$  de protéines)



L'ajout de lactose induit l'apparition de  $\beta$ galactosidase

=> 2 hypothèses

soit l'enzyme existait sous forme de précurseur inactif et a été activée  
soit elle est apparue par synthèse

# Nature de l'induction



## Expérience A :

- culture de bactéries en milieu :
  - + **glucose**
  - + **méthionine <sup>35</sup>S**pendant 1 heure à 37°C
- transfert de ces bactéries en milieu :
  - + **lactose**pendant 1 heure à 37°C

⇒ la  $\beta$ -galactosidase synthétisée **n'est pas marquée.**

## Expérience B :

- culture de bactéries en milieu :
  - + **glucose**pendant 1 heure à 37°C
- transfert de ces bactéries en milieu :
  - + **lactose**
  - + **méthionine <sup>35</sup>S**pendant 1 heure à 37°C

⇒ la  $\beta$ -galactosidase synthétisée **est marquée.**

**Conclusion :** le lactose régule la synthèse *de novo* de l'enzyme et non une régulation allostérique qui affecterait la conformation d'une enzyme **déjà présente.**

# Etape régulée



## Expérience A :

- culture de bactéries en milieu :  
+ **lactose + méthionine  $^{35}\text{S}$  + rifampicine**  
(inhibiteur de la transcription)  
pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$

➔ la  $\beta$ -galactosidase n'est pas synthétisée.

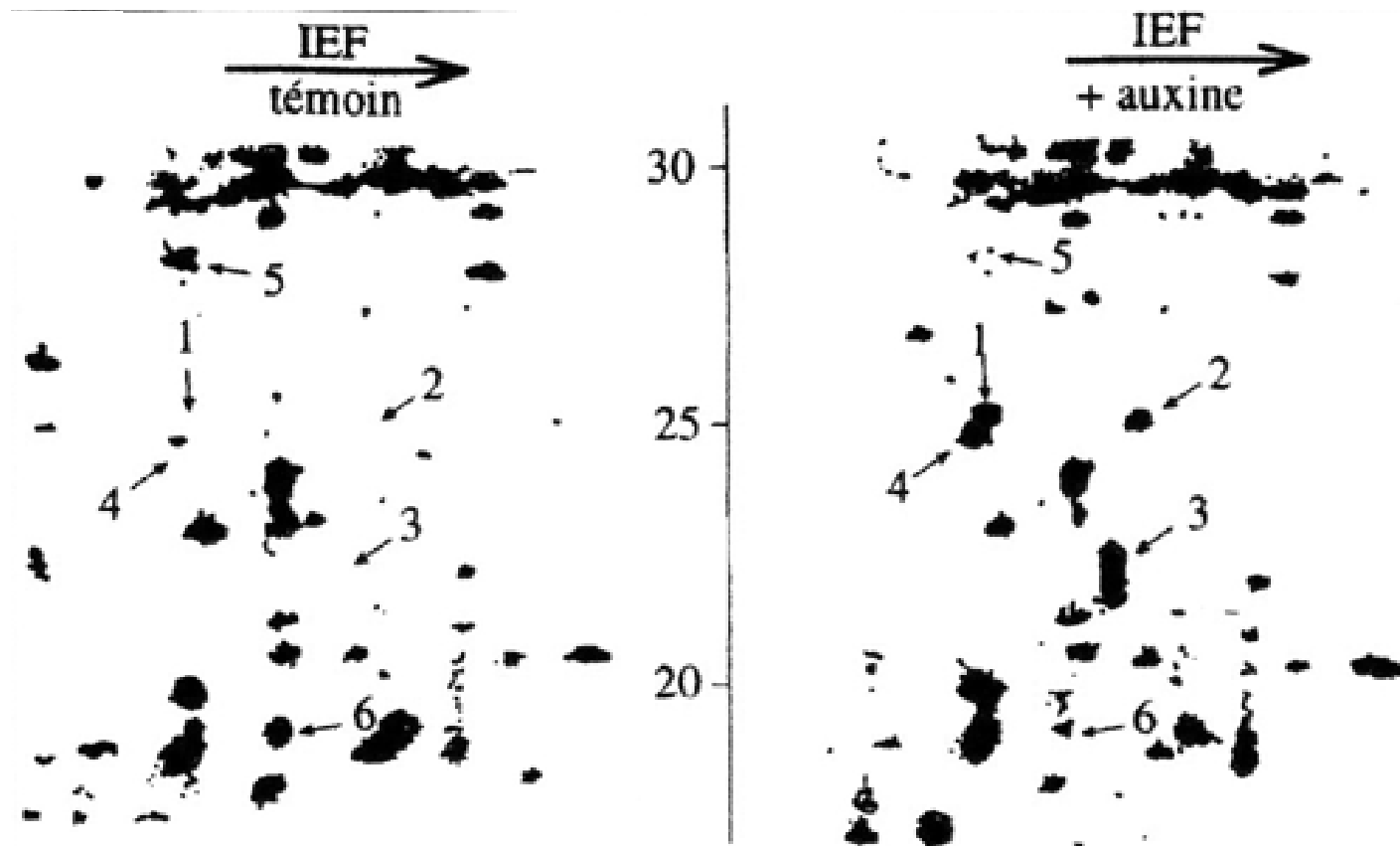
## Expérience B :

- culture de bactéries en milieu :  
+ **lactose + méthionine  $^{35}\text{S}$  + puromycine**  
(inhibiteur de la traduction)  
pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$

➔ la  $\beta$ -galactosidase n'est pas synthétisée.

**Conclusion :** le lactose régule la synthèse *de novo* de l'enzyme au niveau transcriptionnel : l'ARN messenger transcrit est ensuite traduit en  $\beta$ -galactosidase.

# Effets de l'auxine sur les cellules végétales



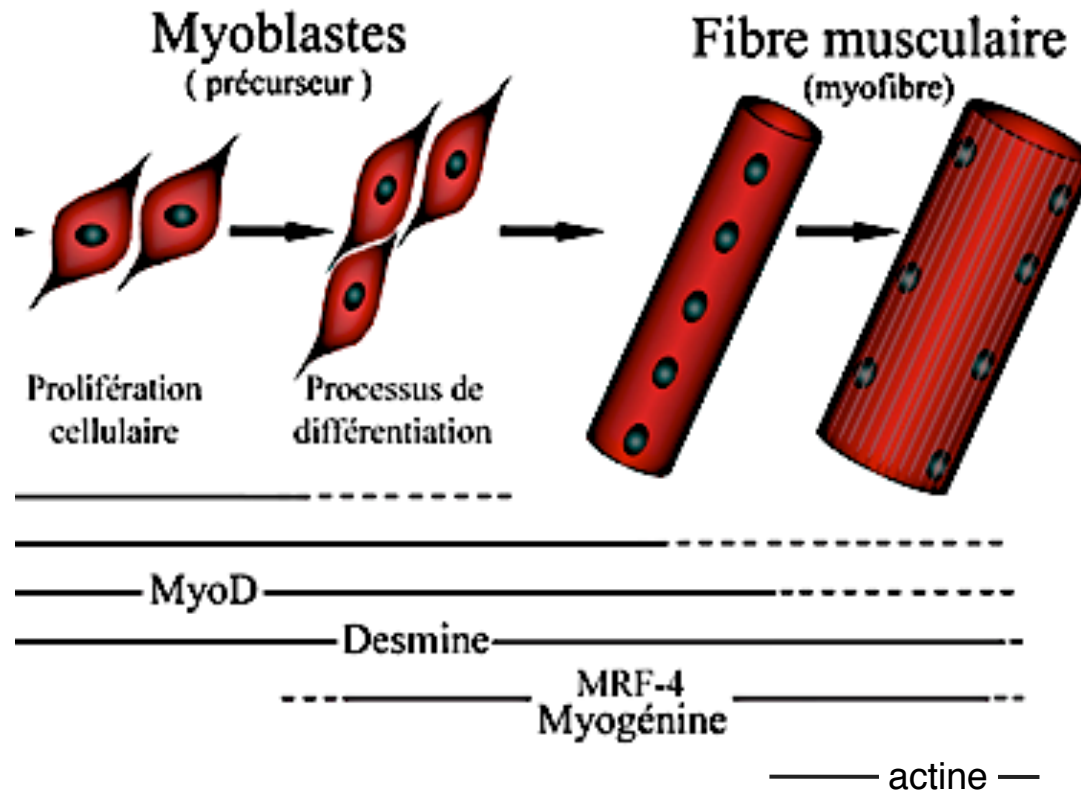
*Résultats obtenus par électrophorèse bidimensionnelle montrant les ARNm extraits d'épicotyles de Pois. Les spots remarquables sont numérotés.*



# Une chronologie d'expression génétique



## Du myoblaste à la cellule musculaire

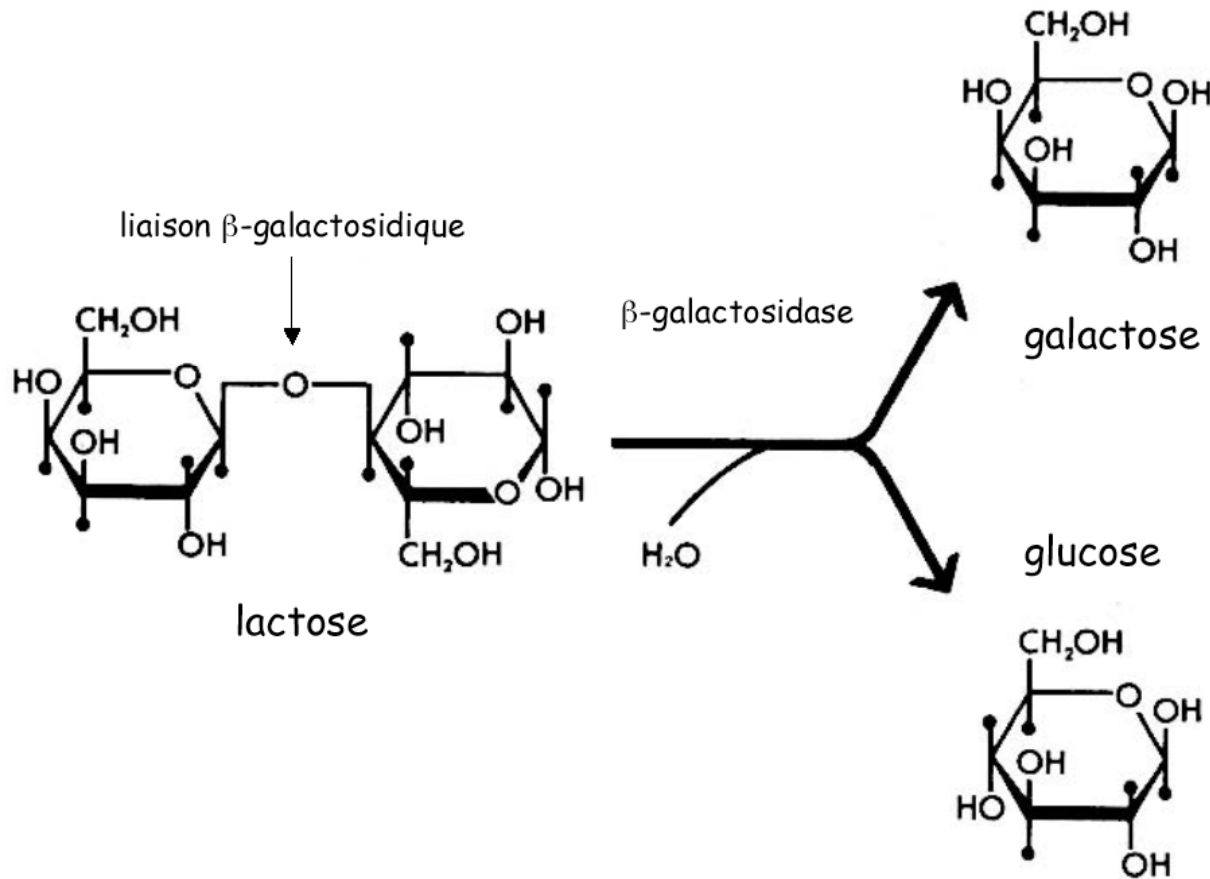


L'expression des gènes change au cours du temps, permettant la différenciation de la cellule

# Rappel : le lactose



## STRUCTURE DU LACTOSE



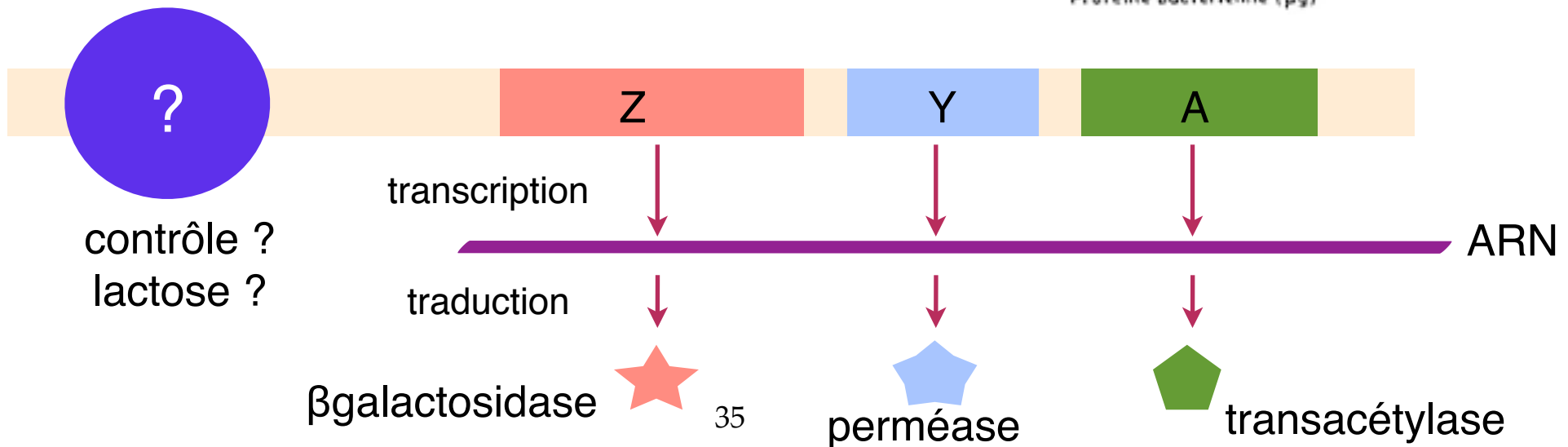
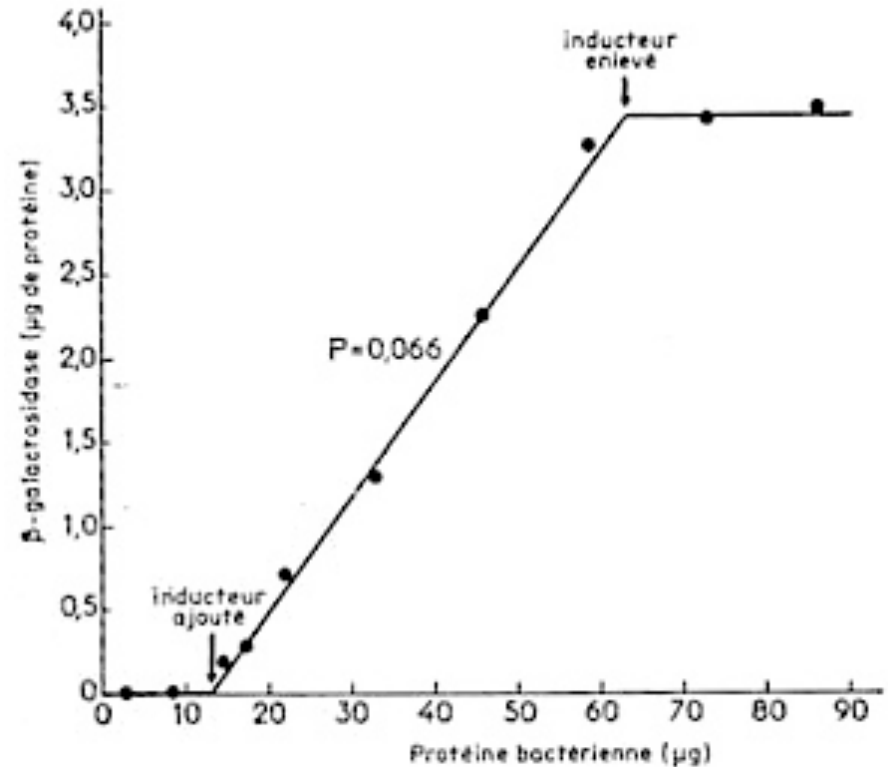
# L'opéron lactose



L'ajout de lactose induit l'apparition

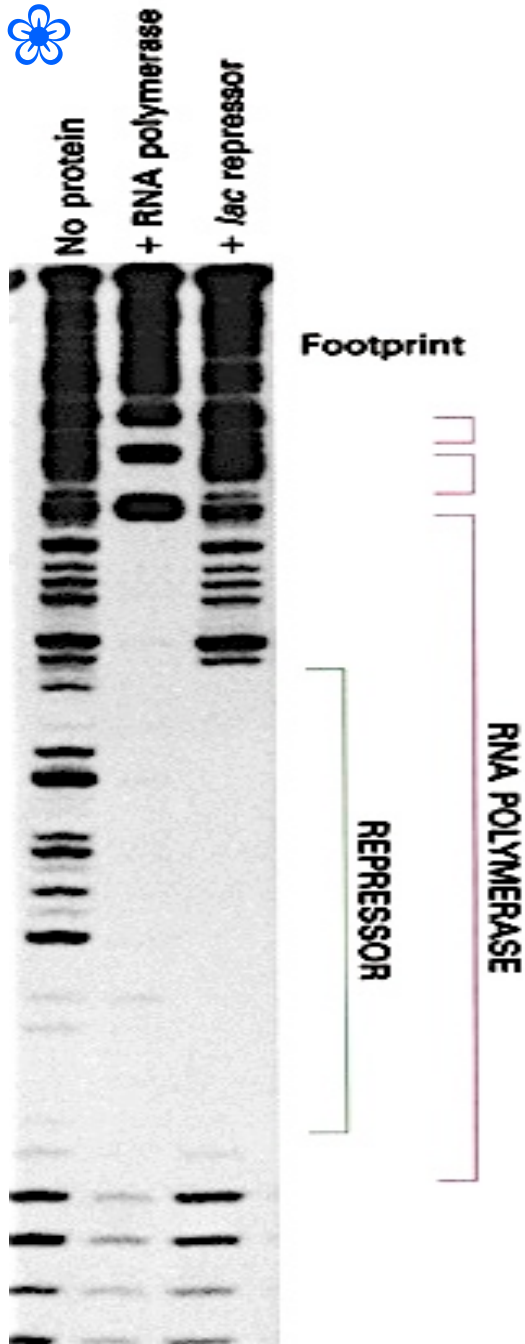
de trois enzymes à un taux égal :

- $\beta$ -galactosidase
- lactose perméase
- thiogalactoside transacétylase



# Rôle de la protéine I

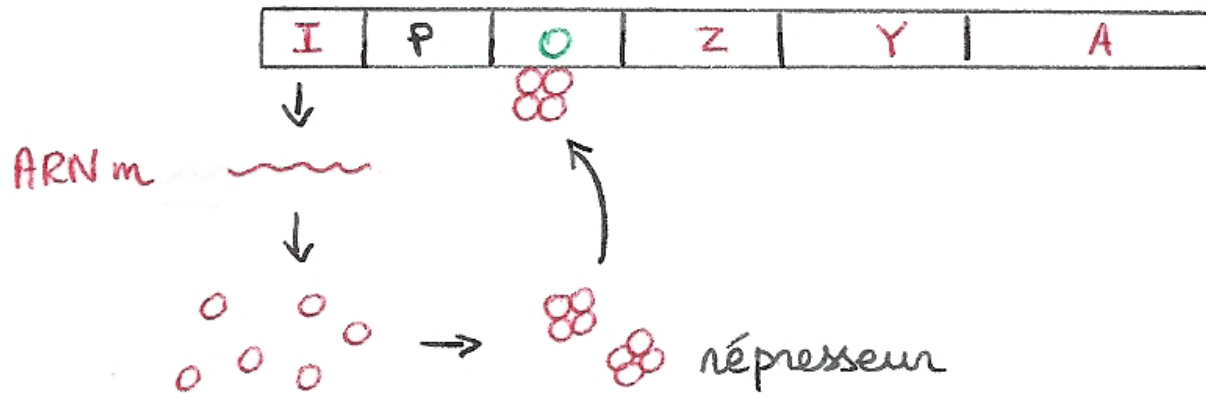
## Expérience de footprinting sur le promoteur de lacZ



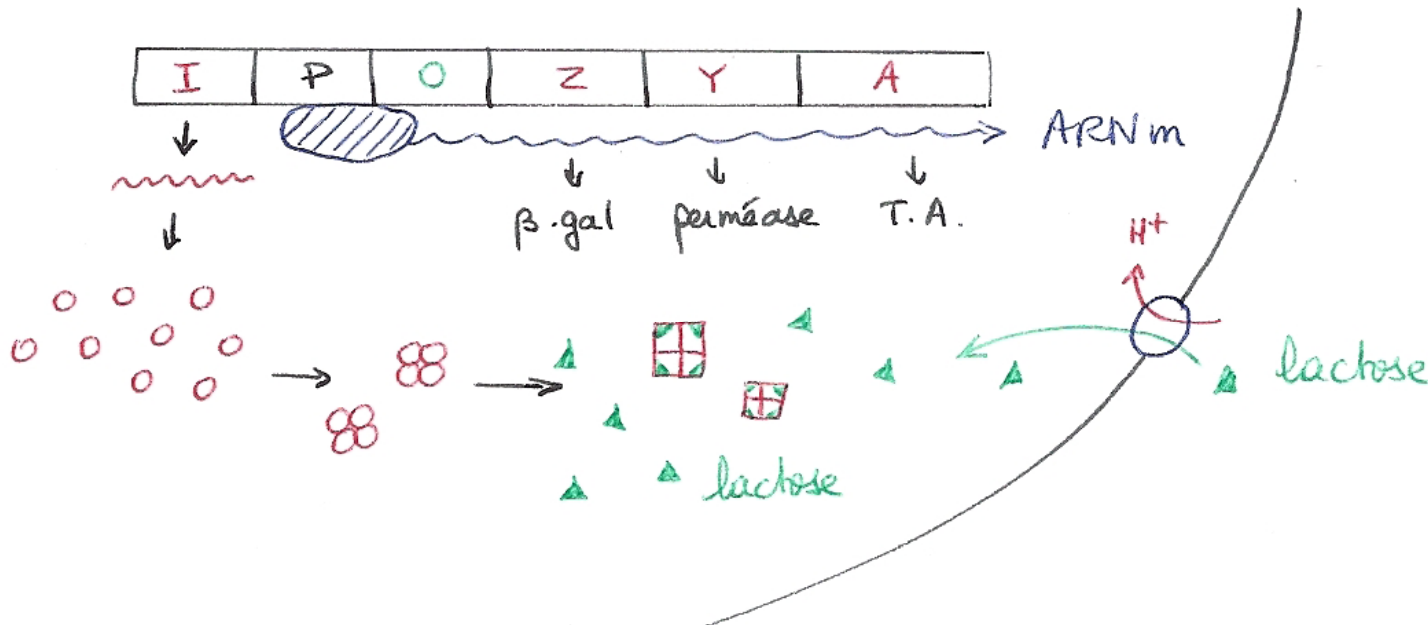
Digestion de fragment d'ADN portant l'opéron lactose par une DNase puis électrophorèse. Certaines régions de l'ADN sont protégées de la digestion : elles sont donc en contact avec un élément protéique (ou non).

Chevauchement des séquences protégées par la protéine I et l'ARN Pol

# L'opéron lactose : en présence de glucose



absence de lactose

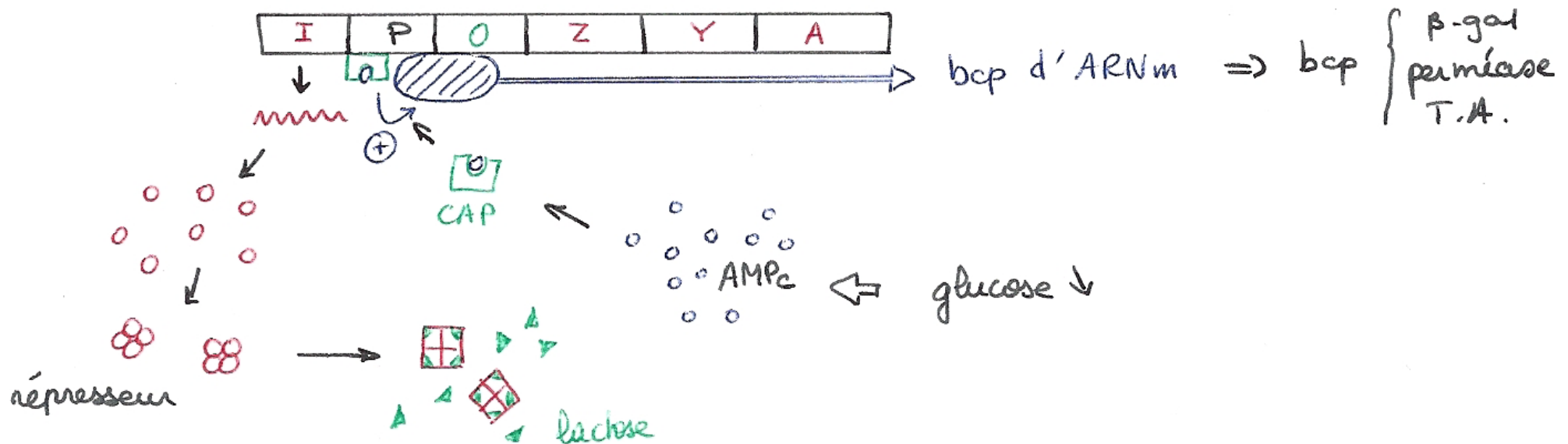


glucose + lactose

# L'opéron lactose : en absence de glucose



lactose + carence en glucose



# Utilisation de l'opéron lactose en biologie moléculaire



- **Promoteur inducible**

- **Activité lacZ** : X-Gal incolore  $\xrightarrow{\beta\text{-Gal}}$  bleu

- > **sélection blanc/bleu des bactéries transfectées**

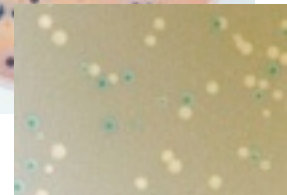
- par un plasmide comportant lacZ

- par un plasmide dont le site de clonage est au sein de lacZ

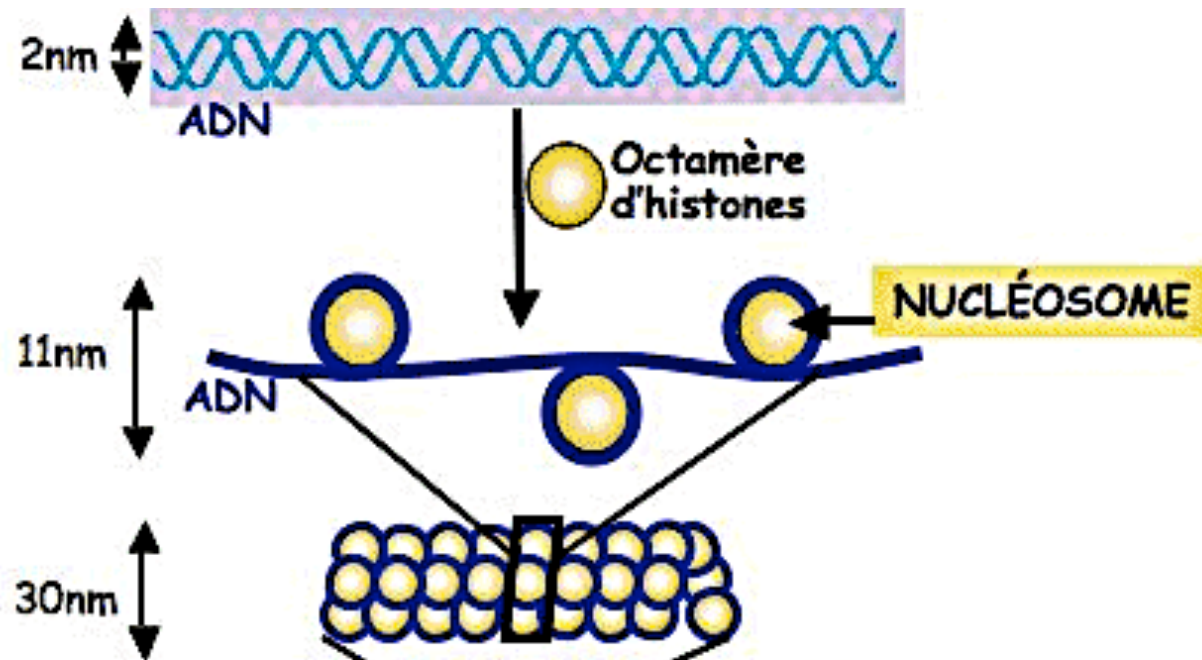
- > **gène rapporteur :**

- construction prom+lacZ:**

- patron spatio-temporel d'expression déterminé par le promoteur**



# Rappel : la chromatine

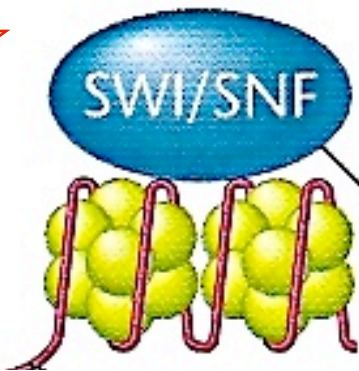


Euchromatine = fibre nucléosomique enroulée en solénoïde, de diamètre 30 nm

Hétérochromatine = repliement encore plus compact de la fibre nucléosomique.



# Le remodelage de la chromatine (1)

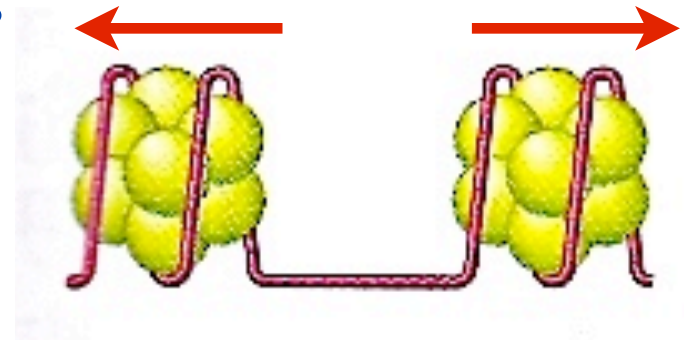


ATP

ADP

Les complexes SWI dégagent l'accès de l'ADN pour les enzymes.

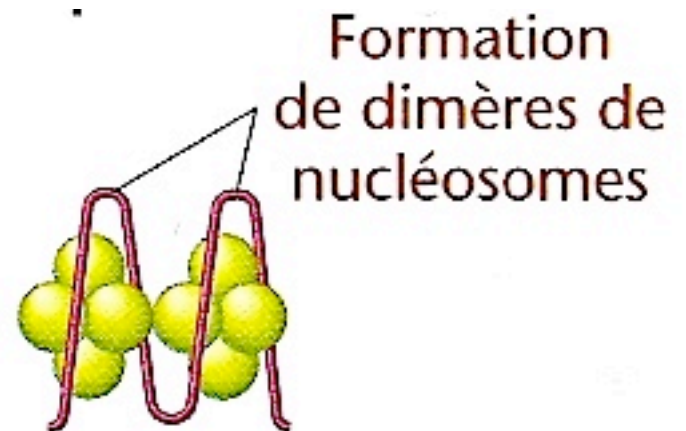
glissement des nucléosomes  
dégageant de l'ADN libre



éloignement de l'ADN  
et des histones



nucléosome scindé en  
deux donc ADN plus  
accessible



# Le remodelage de la chromatine (2)



**Les histones ou l'ADN peuvent être modifiés et rendre l'accès plus ou moins facile aux enzymes**

## TRANSCRIPTION FACILITÉE

Acétylation des histones par HAT

=> nucléofilament relâché

=> promoteur accessible

## TRANSCRIPTION BLOQUÉE

Désacétylation des histones par DHAT

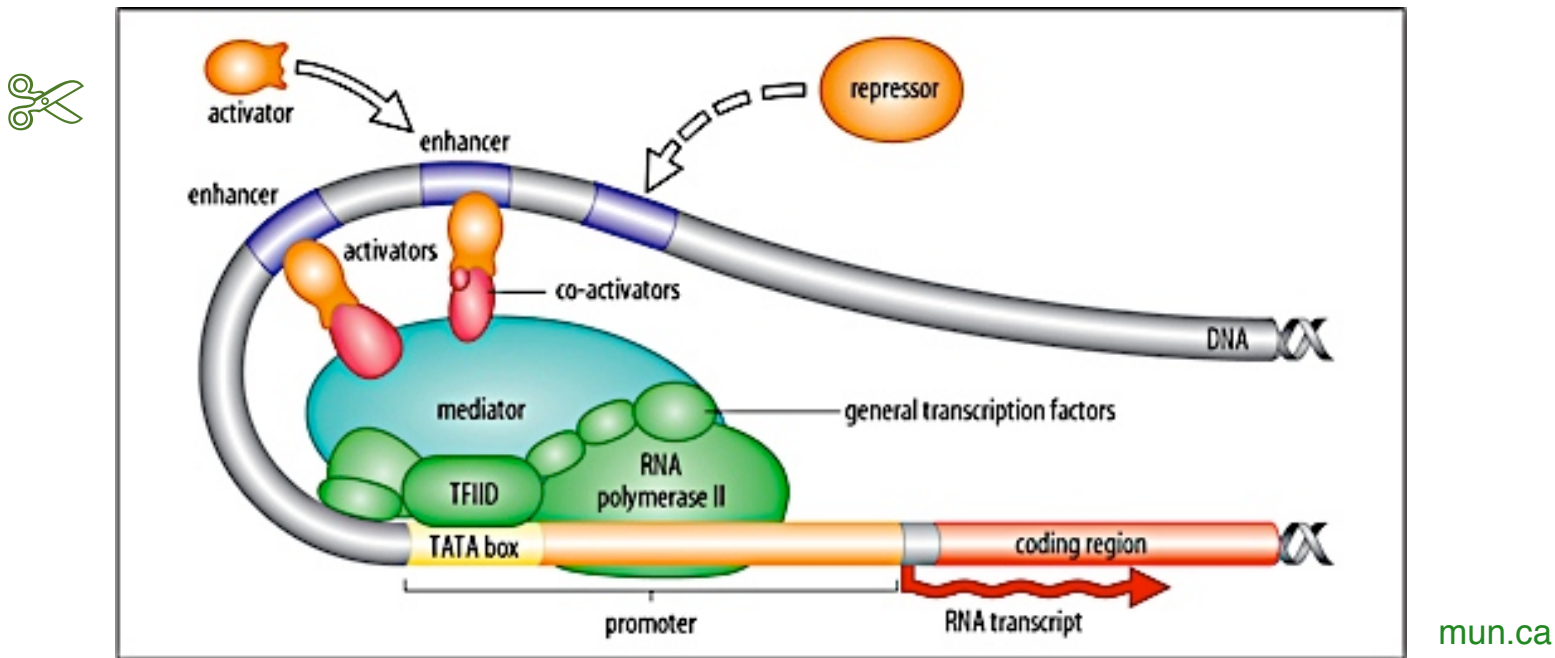
Phosphorylation des histones H2

Méthylation de l'ADN sur des cytosines

# Contrôle à distance du complexe d'initiation

## Activation de l'expression d'un gène

L'activateur stabilise le complexe d'initiation et favorise le démarrage de la transcription



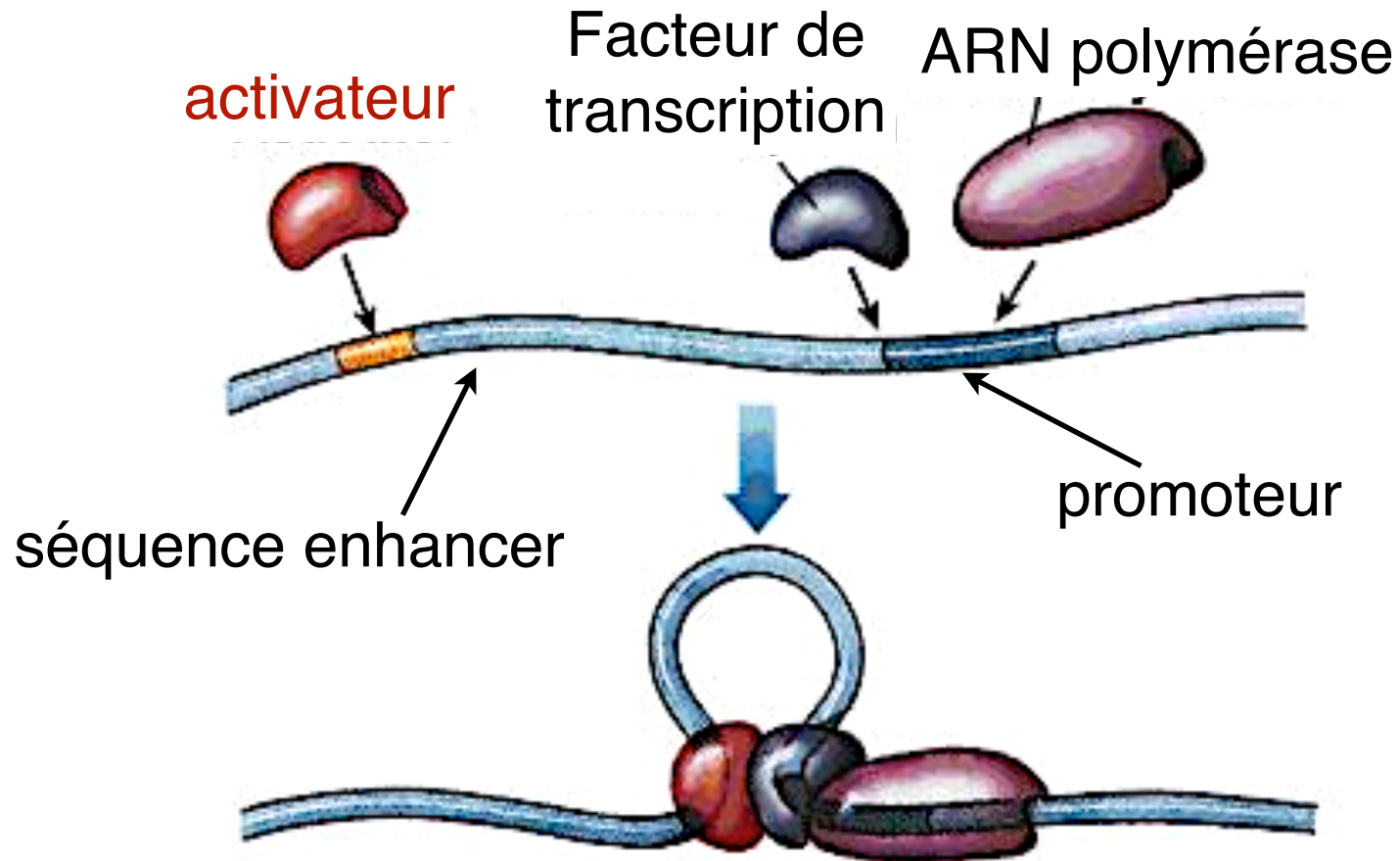
★ séquence «enhancer» = amplificateur : c'est un élément cis  
protéine activatrice se liant à l'amplificateur = activateur (élément trans)

## Répression de l'expression d'un gène

★ séquence «silencer» = atténuateur : c'est un élément cis  
protéine inhibitrice se liant à l'atténuateur = répresseur (élément trans)

# Action d'un activateur

★ Version simplifiée

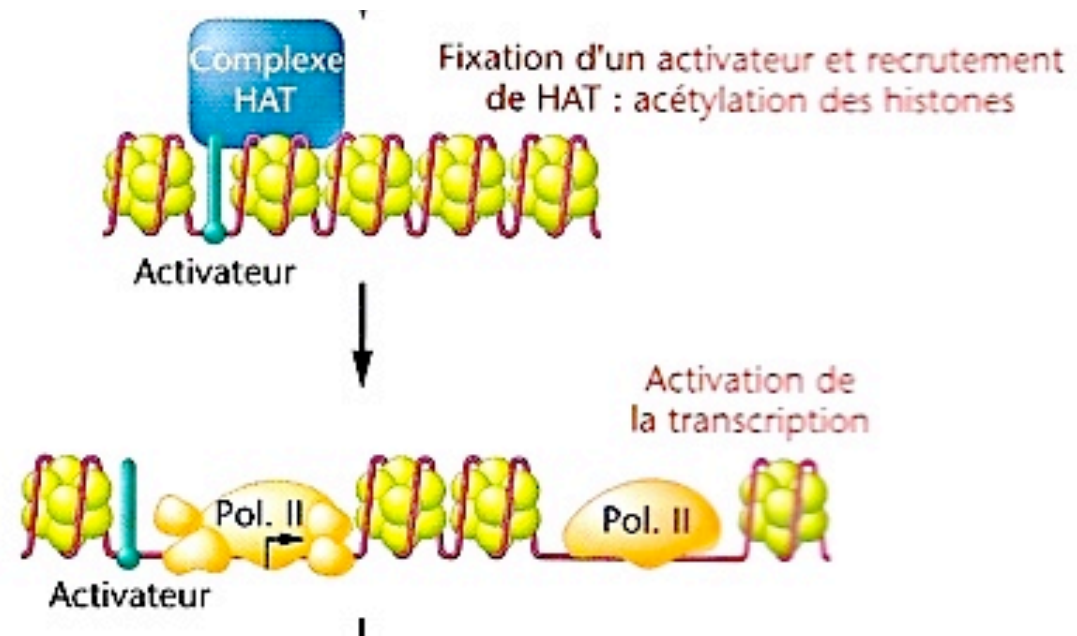


# Contrôle au niveau du complexe d'initiation



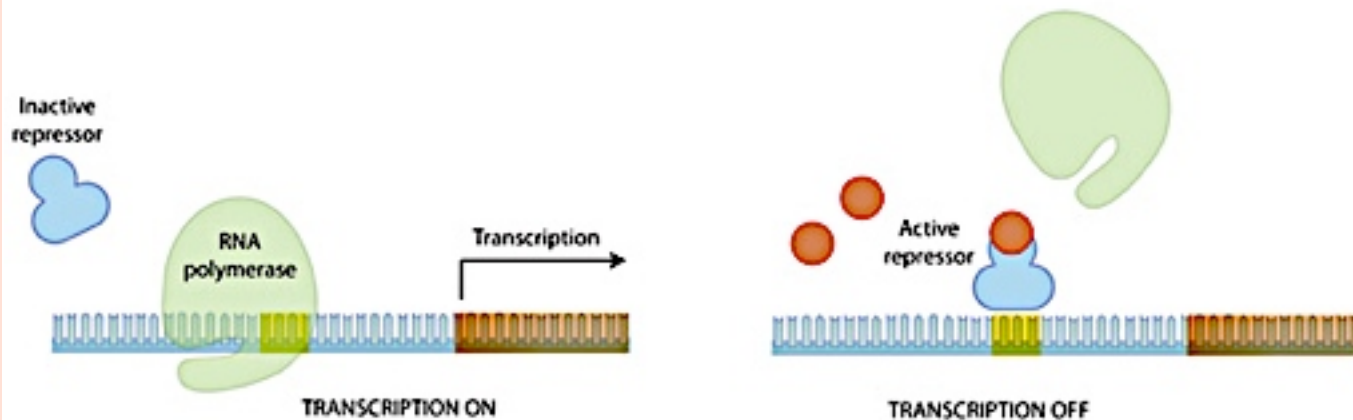
## Activation de l'expression d'un gène

L'activateur recrute SWI ou une enzyme qui acétyle les histones donc libère l'ADN des histones



## Répression d'un gène

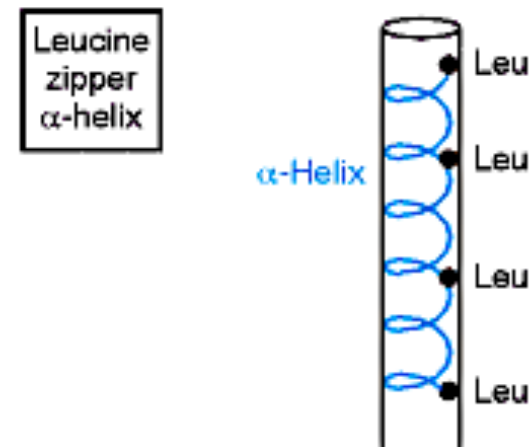
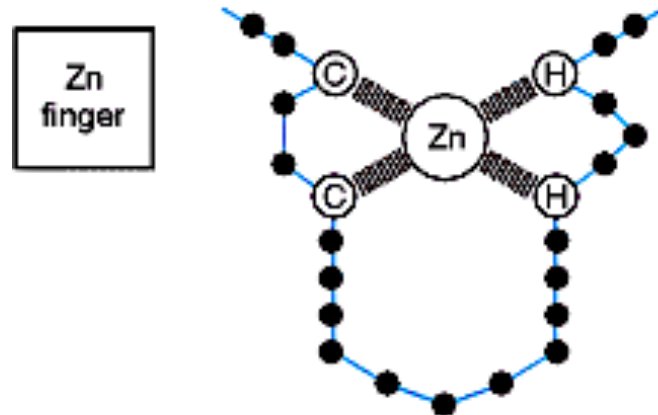
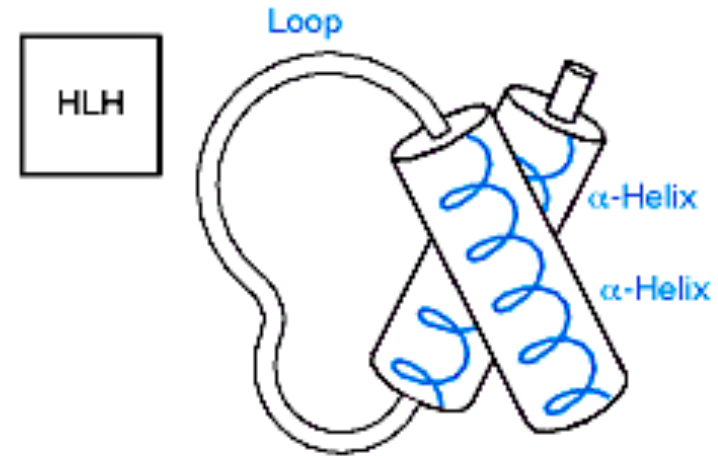
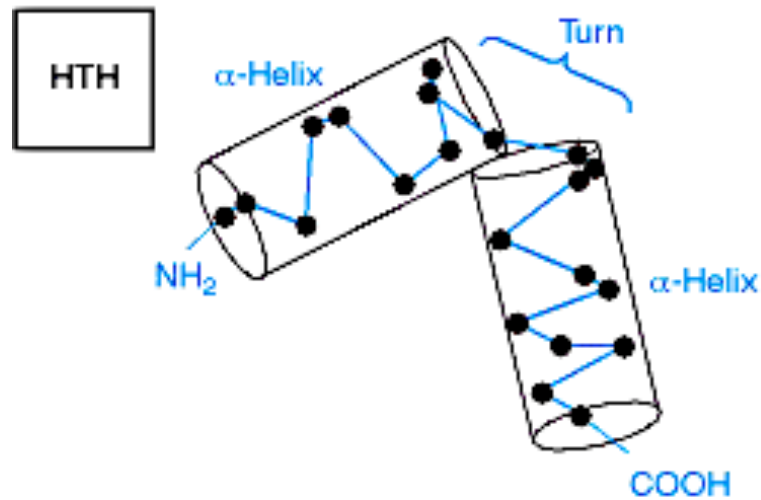
Le répresseur se lie à une séquence opératrice qui empêche la formation du complexe d'initiation



# Biochimie des facteurs de transcription



## Motifs protéiques permettant l'interaction ADN / protéines

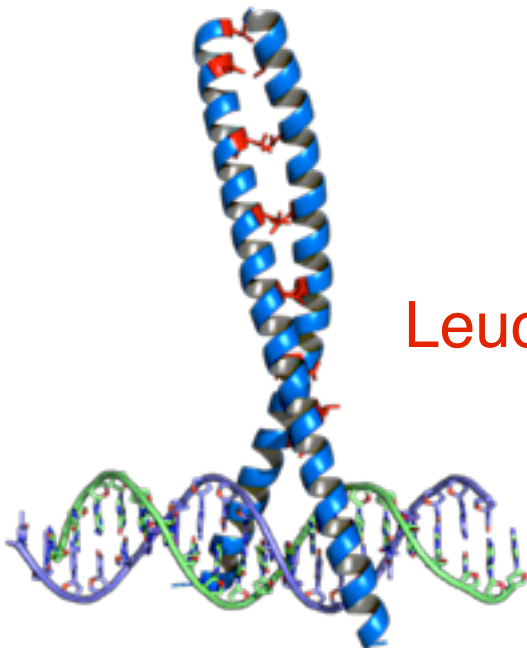
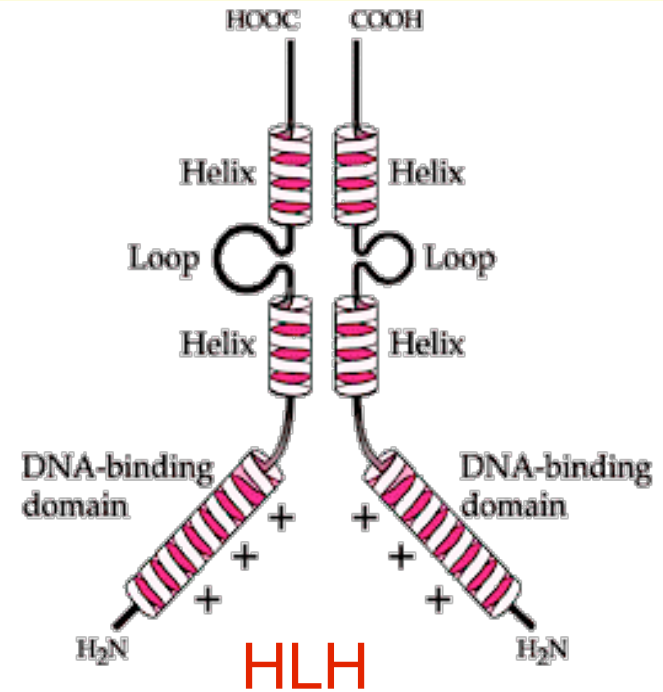
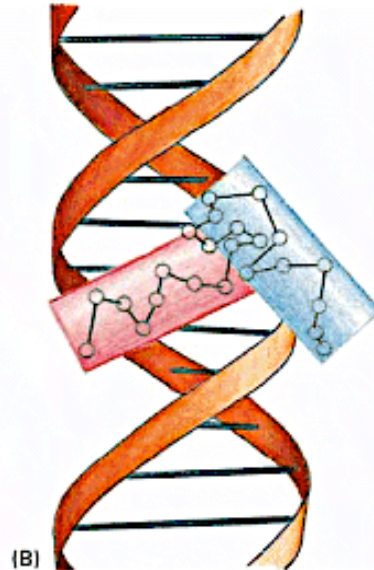
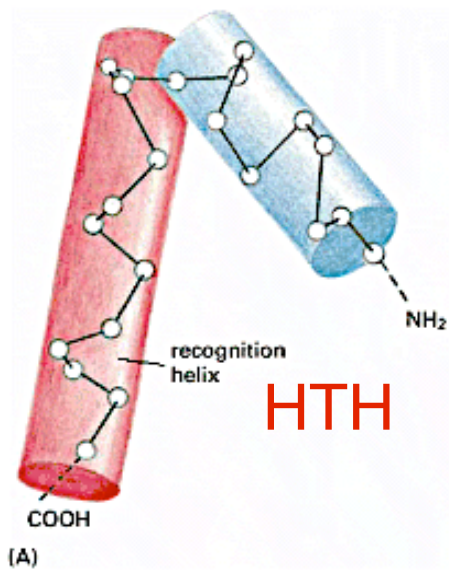




# Biochimie des facteurs de transcription



## Motifs protéiques permettant l'interaction ADN / protéines

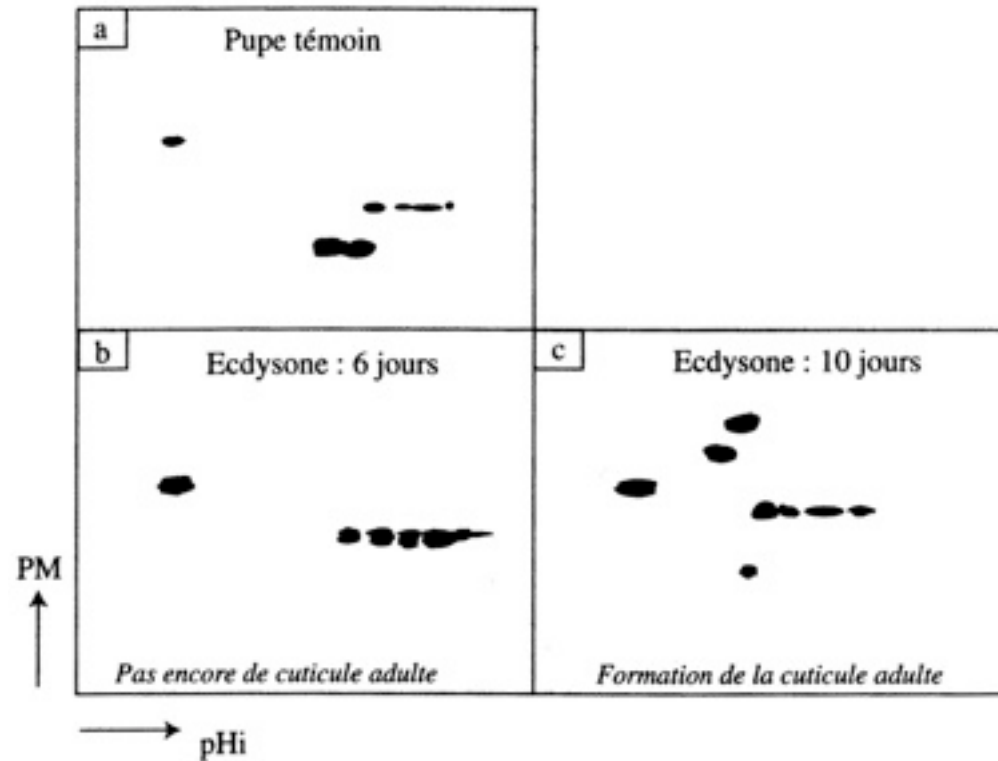


Leucine zipper

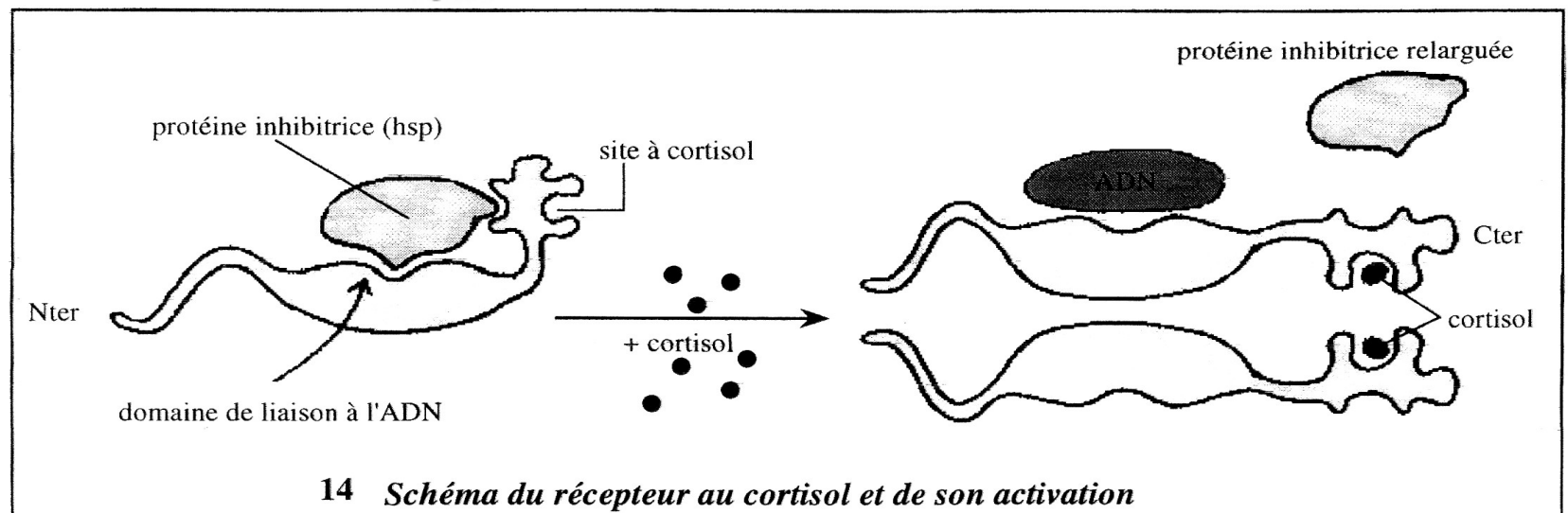


# Réponse aux hormones lipophiles

## Réponse à l'ecdysone

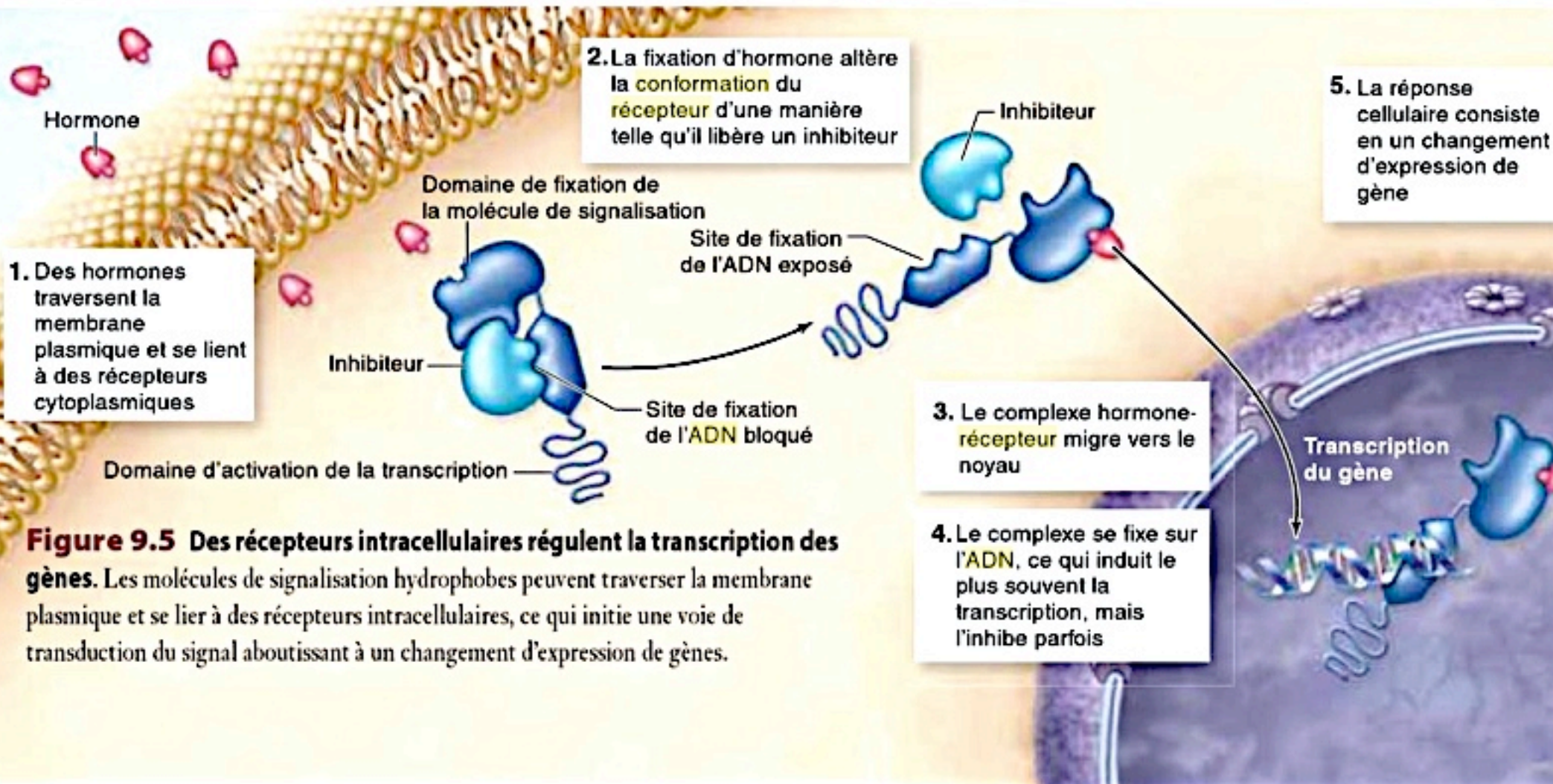


Le récepteur à cortisol est un facteur de transcription





# Action d'une hormone lipophile

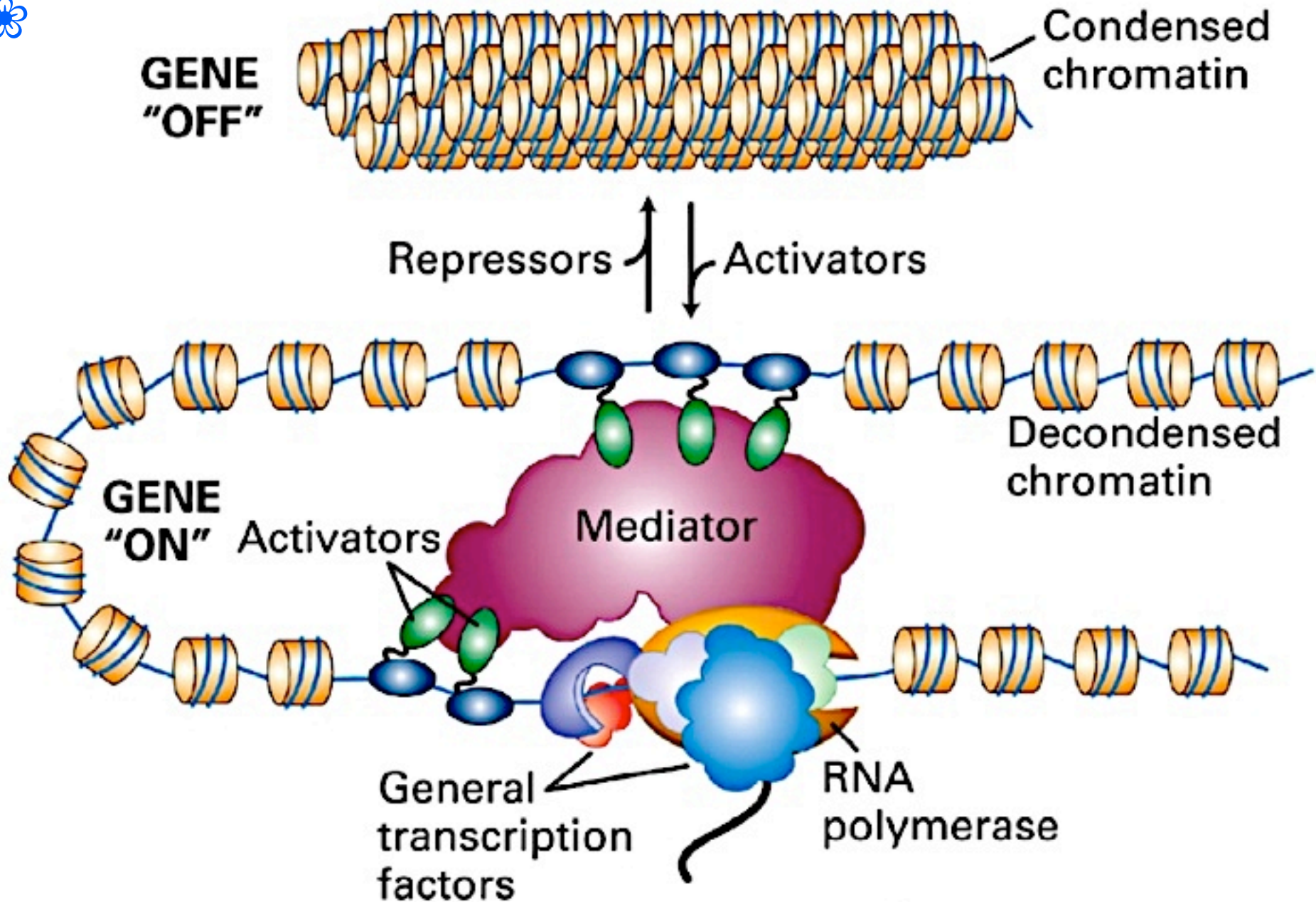


**Figure 9.5** Des récepteurs intracellulaires régulent la transcription des gènes. Les molécules de signalisation hydrophobes peuvent traverser la membrane plasmique et se lier à des récepteurs intracellulaires, ce qui initie une voie de transduction du signal aboutissant à un changement d'expression de gènes.

## Biologie

Par Peter H. Raven, Georges B. Johnson, Kenneth A. Mason, Jonathan B. Losos, Susan S. Singer

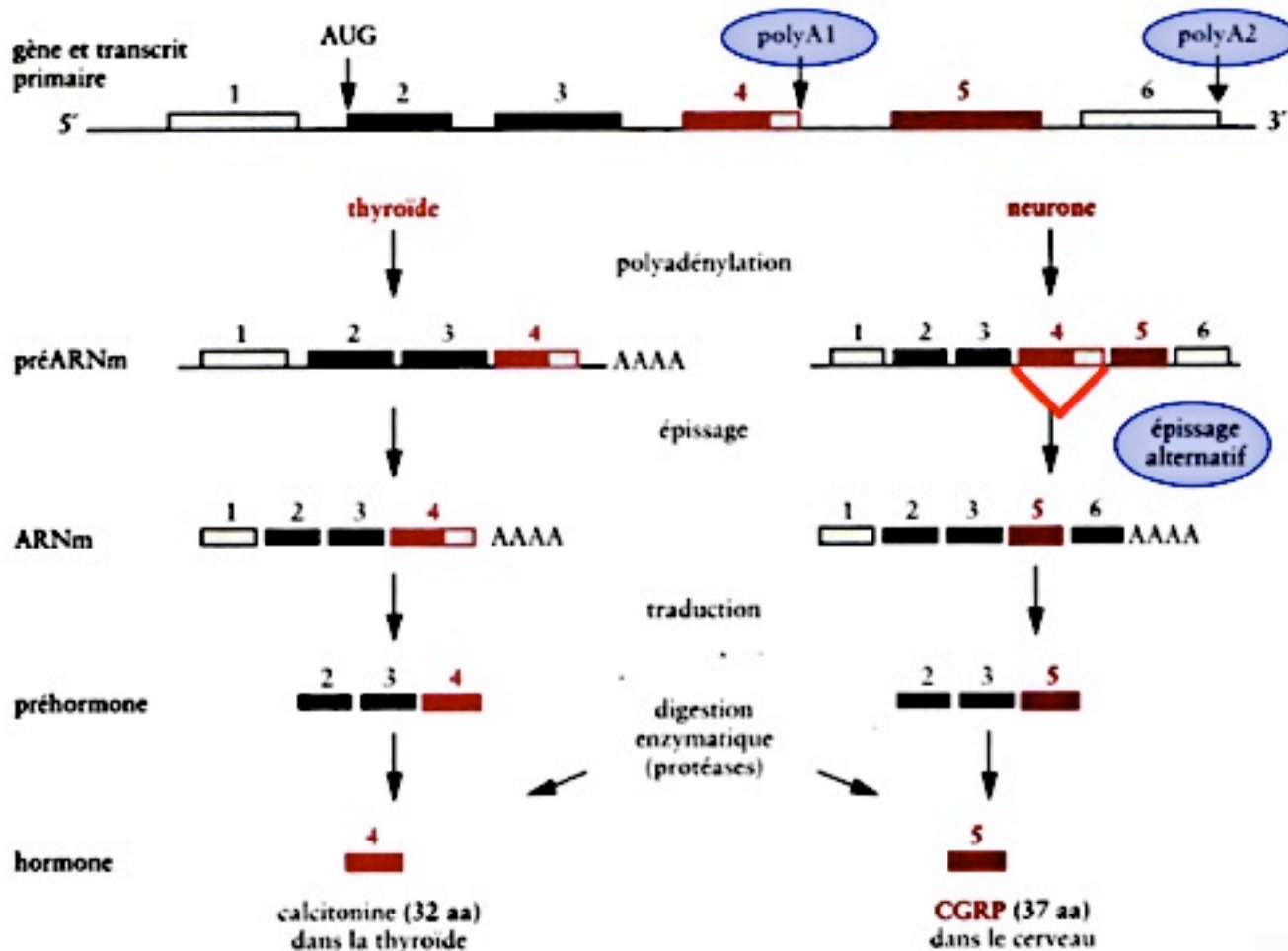
# Bilan : des actions combinées





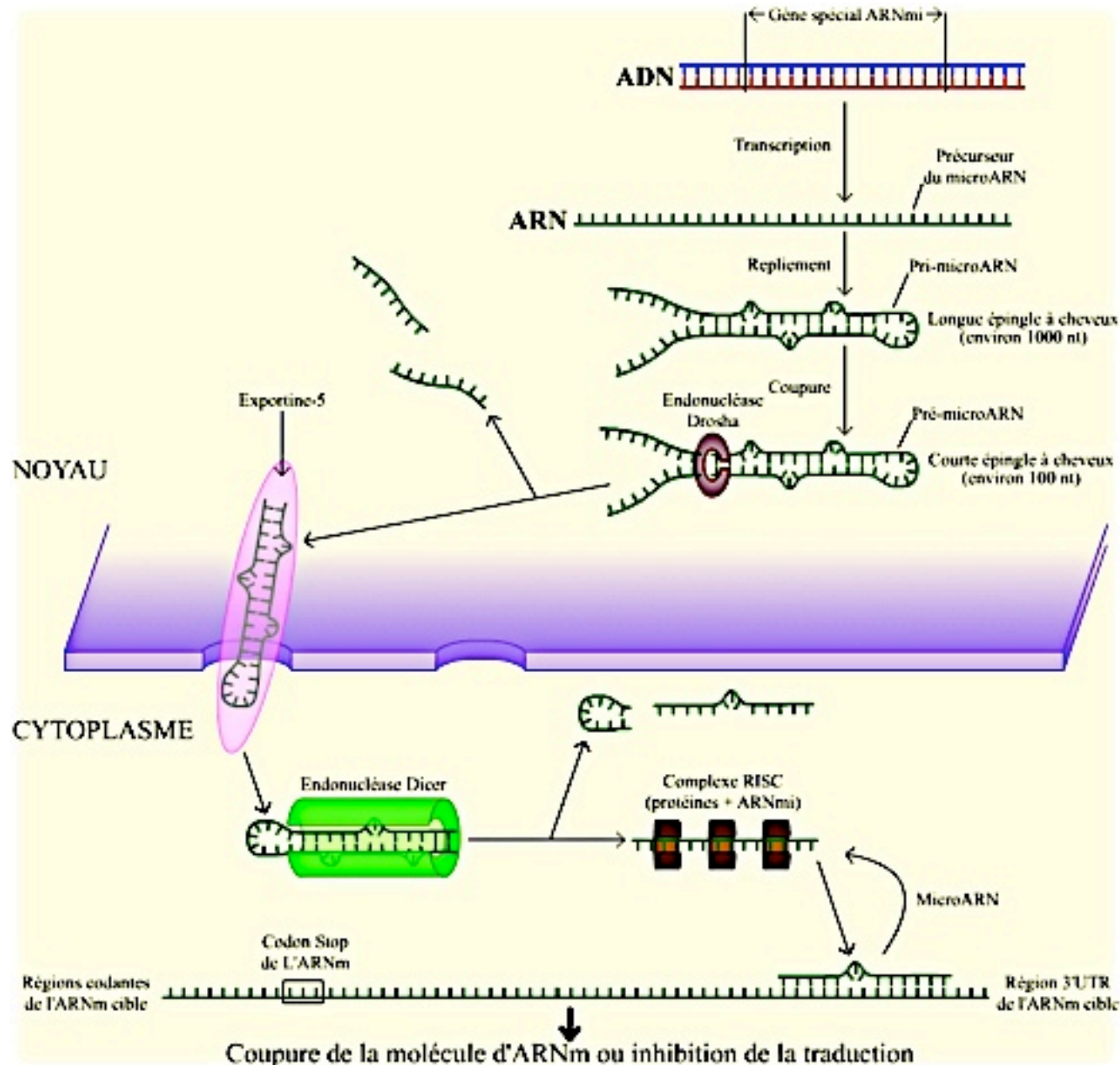
# L'épissage alternatif

À partir du même transcrit, 2 ARNm différents sont possibles

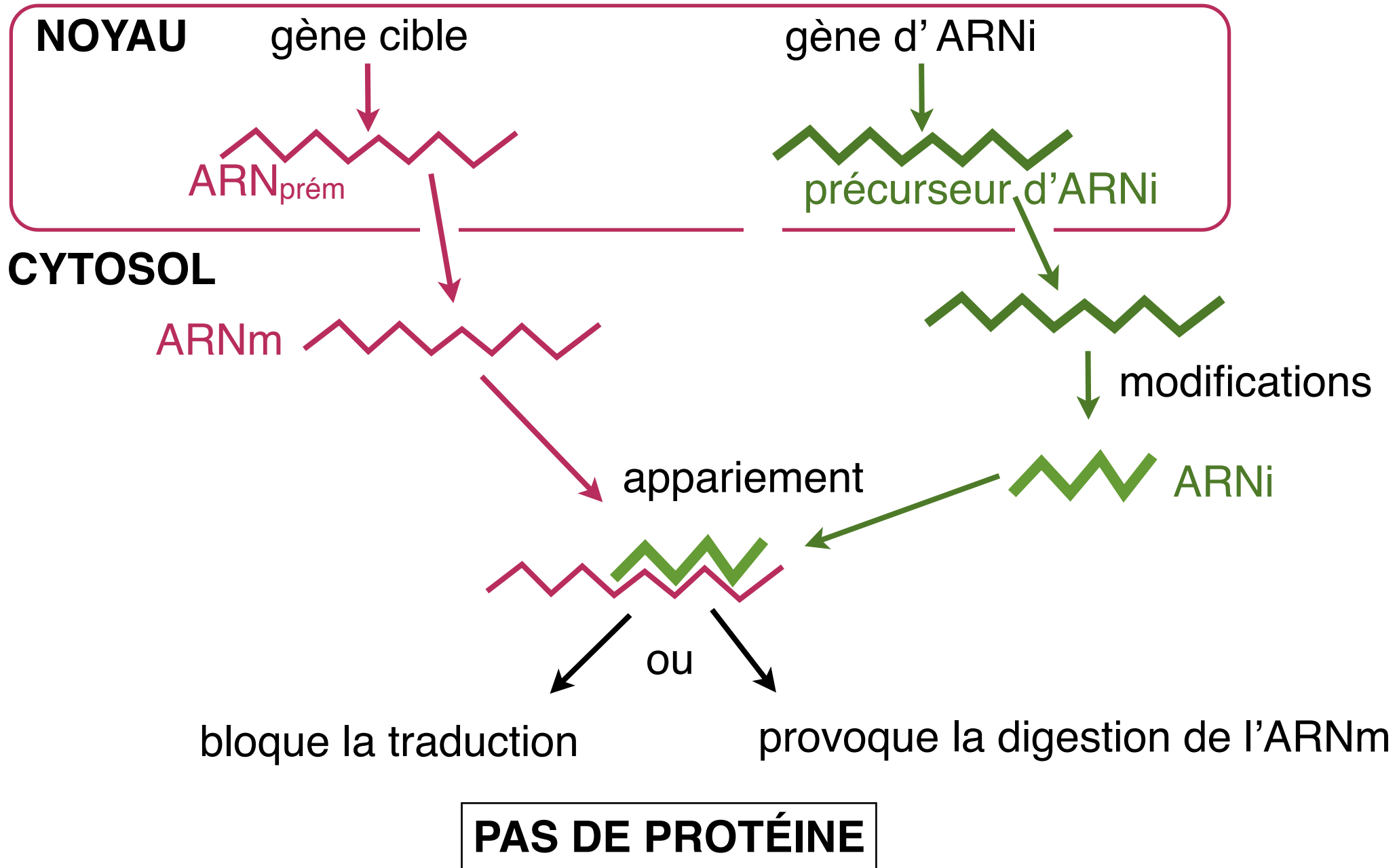


- exon non traduit
- exon traduit en protéine et éliminé par digestion enzymatique
- exon alternatif, transcrit et traduit dans la thyroïde, éliminé dans le cerveau au cours de l'épissage
- exon traduit en protéine et conservé dans le cerveau : hormone active CGRP

# Les ARN interférents



# Les ARN interférents



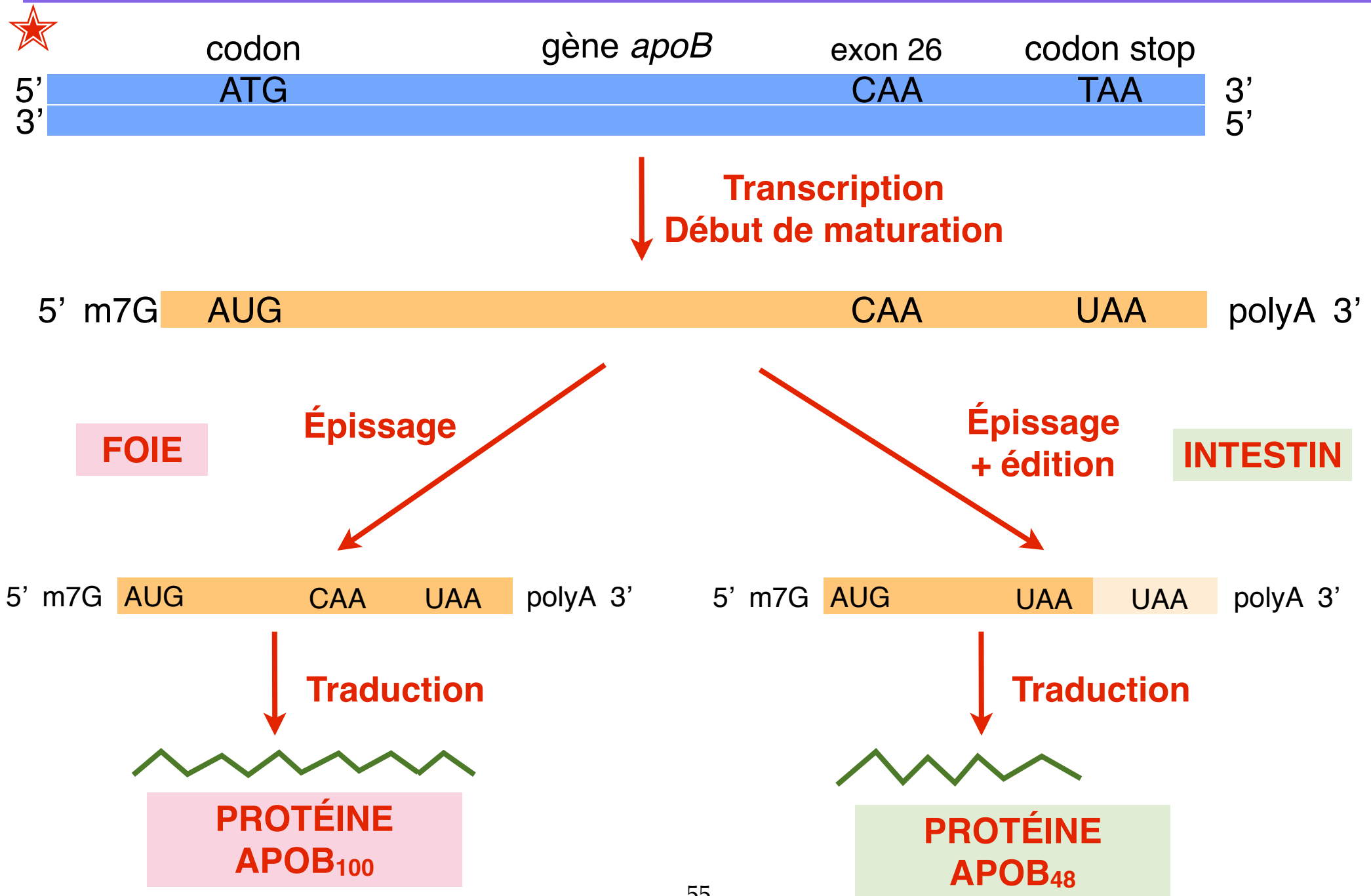
# 2 apolipoprotéines B pour un seul gène



Les apolipoprotéines transportent le cholestérol dans le sang.

|           |  | organ               | Apo type | kDa | $t_{1/2}$ |
|-----------|--|---------------------|----------|-----|-----------|
| N ——— C   |  | intestine,<br>liver | $B_L$    | 210 | 10 min    |
| N ————— C |  | liver               | $B_H$    | 520 | 10hrs     |

# L'édition : exemple de l'apolipoprotéine B



# L'éditosome



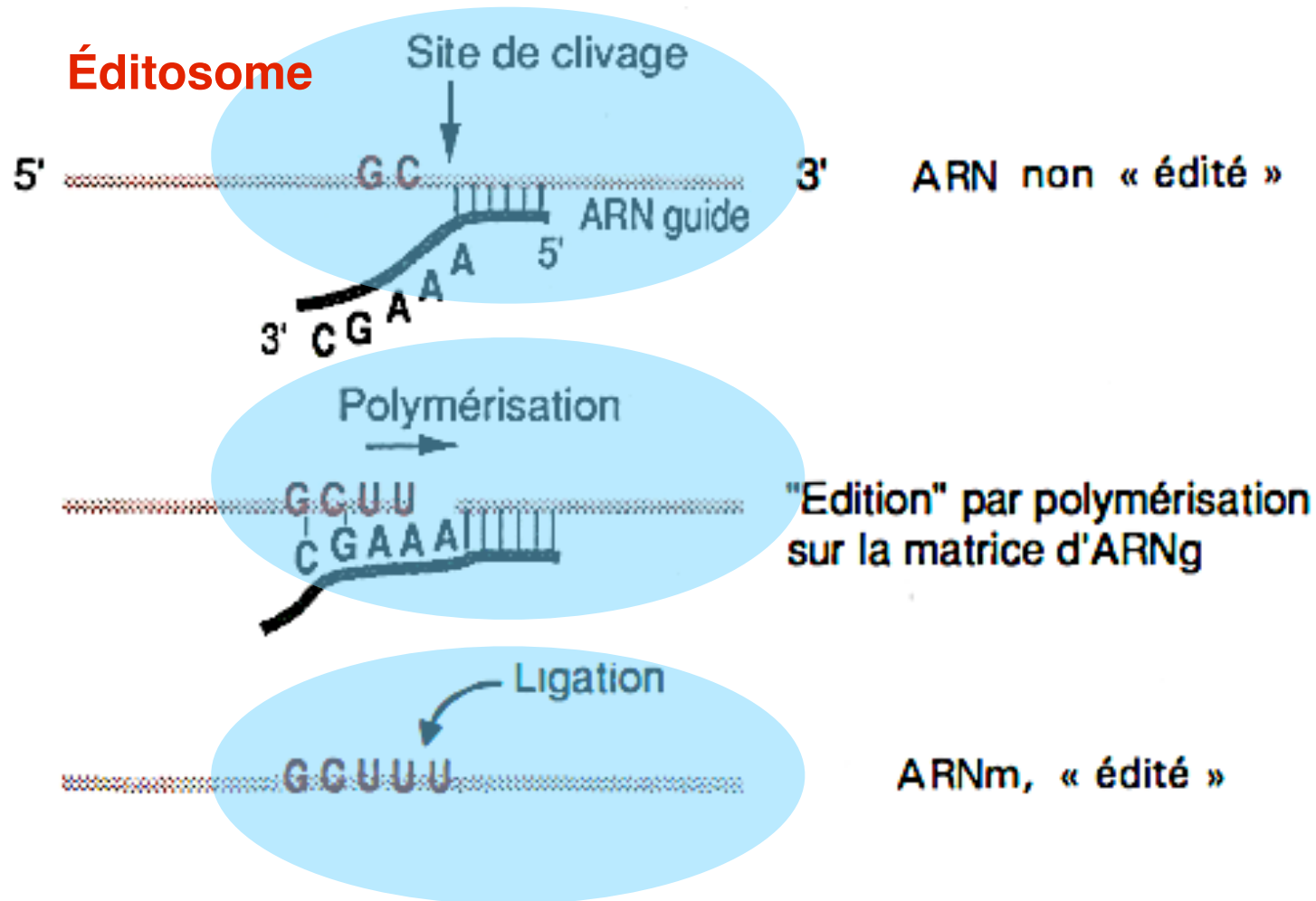
## The Minimal Editosome *In Vitro*



Smith *et al.*, PNAS 1991  
Shah *et al.*, PNAS 1991  
Mehta *et al.*, MCB 2000  
Lellek *et al.*, JBC 2000  
Dance *et al.*, JBC 2002



# L'édition des ARNm par insertion



**L'Éditosome contient l'ARNg mais aussi des protéines dont les 3 enzymes de clivage, polymérisation et ligation**

# 4. La diversité des transcriptomes et l'épigénétique

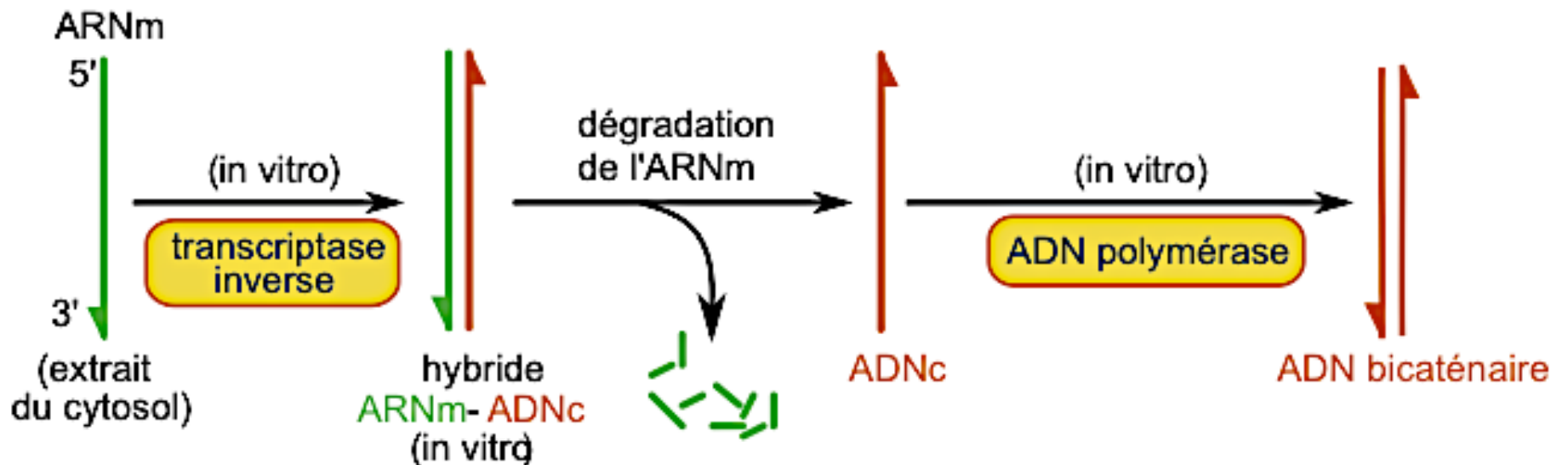
# Recueillir et amplifier les ARN d'une cellule



## 1 - Purification des ARN d'une culture cellulaire

Les ARNm peuvent être isolés en utilisant leur queue polyA, retenue spécifiquement sur un gel de chromatographie contenant des billes recouvertes de thymidine ou uracile.

## 2 - Reverse transcription des ARN en ADNc



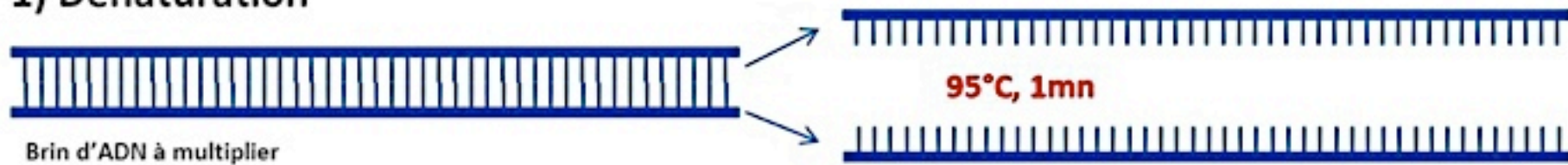
# Recueillir et amplifier les ARN d'une cellule



## 3 - Amplification des ADNc par PCR

La PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne) permet d'obtenir des milliers de copies d'ADN.

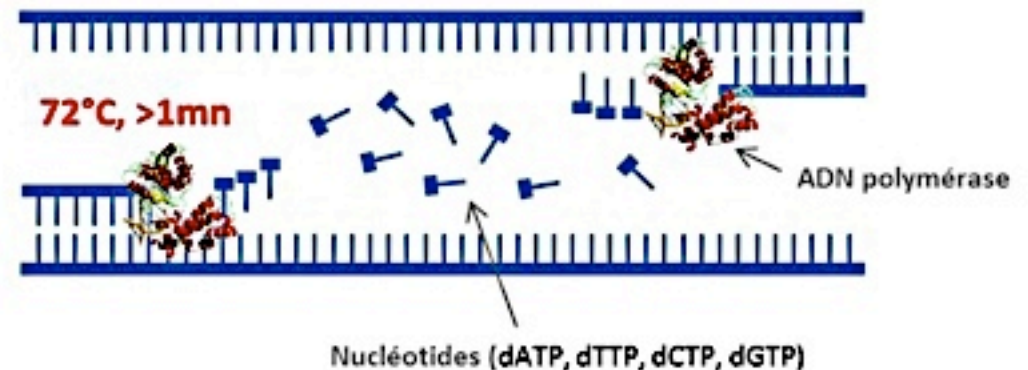
### 1) Dénaturation



### 2) Hybridation



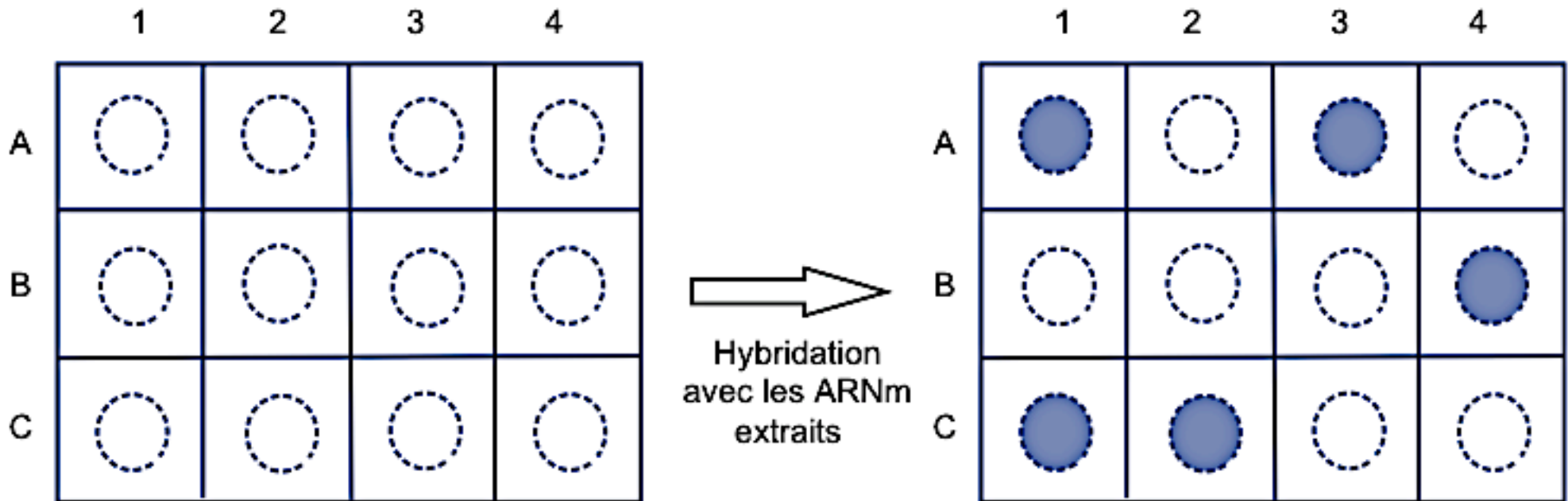
### 3) Polymérisation



# Les puces à oligonucléotides



Chaque case (= cible) d'une lame de verre abrite un oligo-nucléotide identique à une courte séquence d'un gène : chaque cible correspond donc à un gène connu. On fait incuber la lame de verre avec les ARNm d'une culture de cellules, rendus fluorescents. Les ARNm sont retenus dans la cible correspondant à leur gène.



Puces de 12 oligonucléotides d'ADN

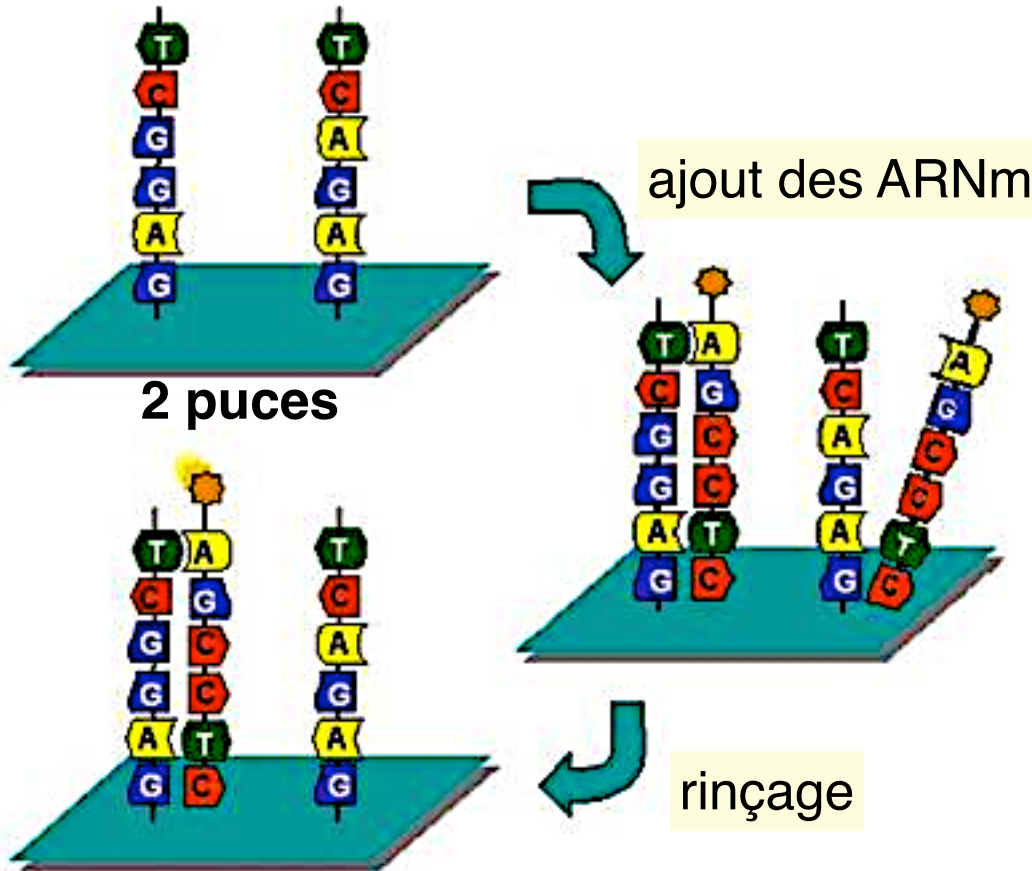
Les ARNm extraits s'hybrident aux bio-puces A1,A3, B4, C1 et C2.

La cellule exprime donc les gènes fixés dans ces puces.

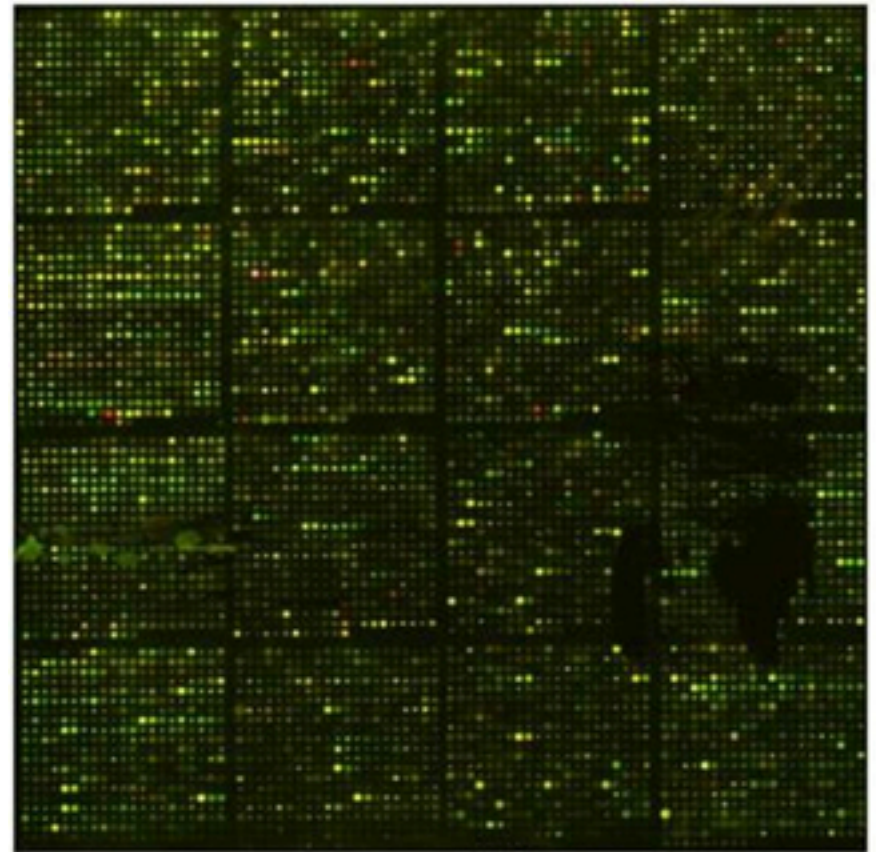
# Résultats de puces à oligonucléotides



2 oligo-nucléotides  
correspondant à 2 gènes



16 000 oligonucléotides  
ont été déposés



Seul le gène de gauche  
est exprimé : il apparaît  
une tâche fluorescente

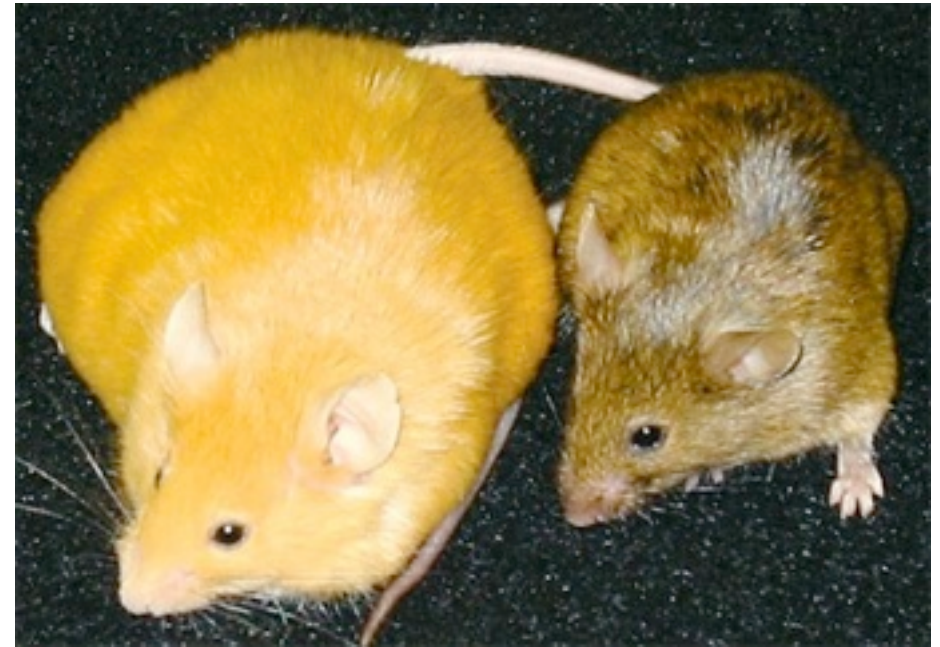
[http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot\\_05001/polymorphisme/snp.html](http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/snp.html)



# L'épigénétique



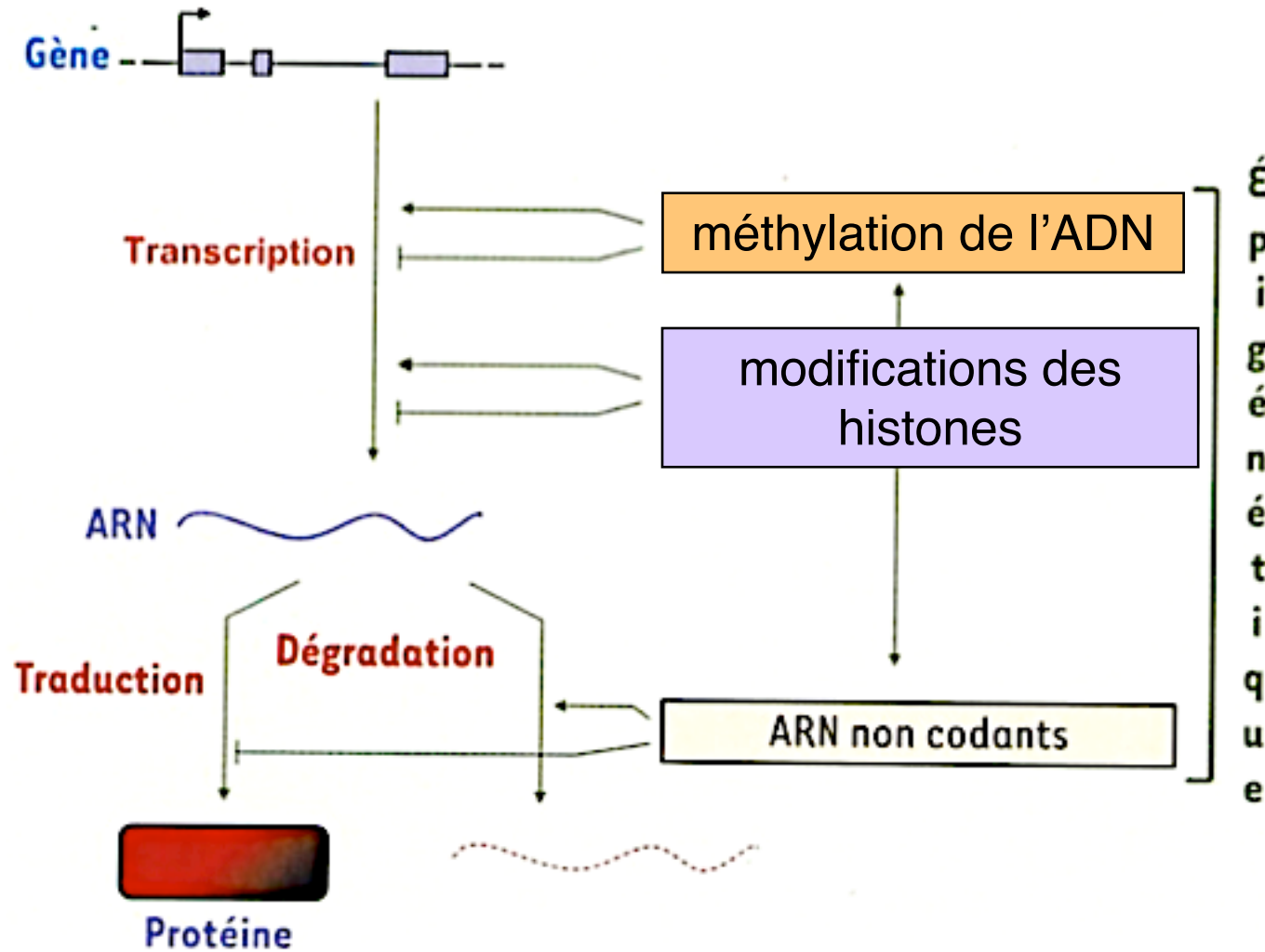
Deux plants de Linaire de même génotype mais de phénotypes fort différents.



Des souris agouti de même génotype mais de phénotypes différents liés à une variation d'expression du gène *avy*

★ **Epigénétique** = ensemble des phénomènes transmis héréditairement qui modulent l'expression du génome **sans changer sa séquence.**

# Les niveaux d'action de l'épigénétique



d'après A. Kahn, médecine-sciences



# La méthylation du gène *avy* est liée à l'alimentation maternelle

Souris gestante témoin, non supplémentée



59% jaunes  
25% agoutis  
16% intermédiaires

Souris gestante supplémentée



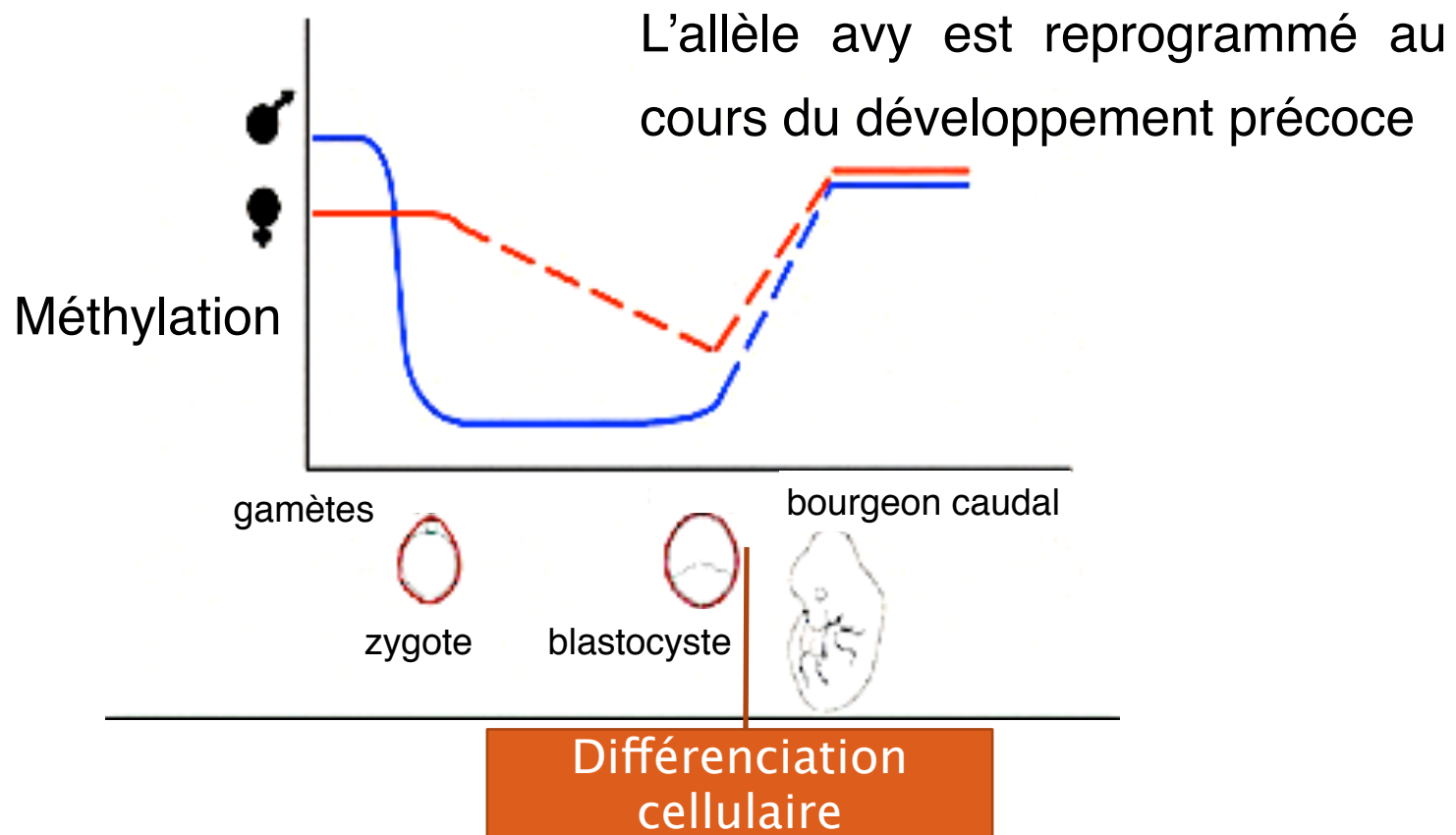
35% jaunes  
51% agoutis  
14% intermédiaires

Source: Waterland & Jirtle, Mol Cell Biol (2003)  
Also Wolff & Cooney, FASEB J (1998)

Souris gestante dont le régime alimentaire est supplémenté en molécules impliquées dans la méthylation (acide folique, bêtaïne, zinc et méthionine).

# La méthylation des gènes au cours de la vie

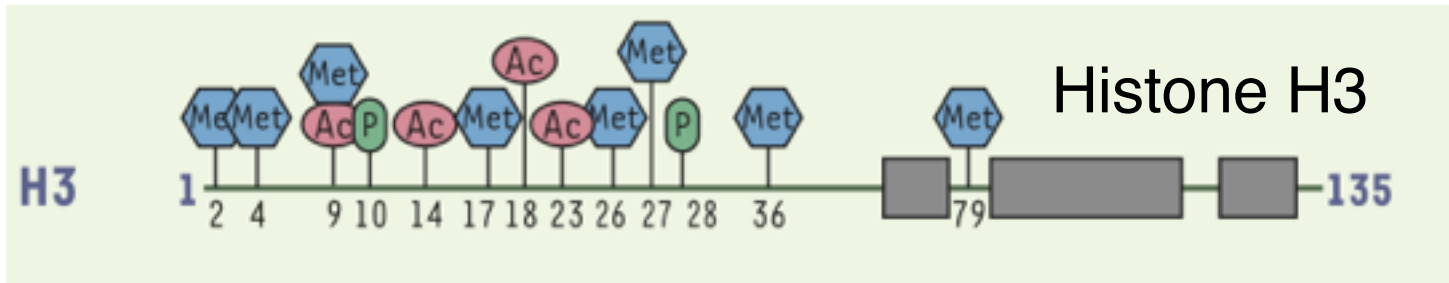
1) **Déméthylation massive du génome des gamètes** sauf d'une certaine de gènes qui sont protégés de cette déméthylation par des ARN non codants : on les dit «soumis à empreinte parentale».



2) La **méthylation est rétablie *in utero*** et liée à l'alimentation de la mère.

# Le code histone

✂ L'extrémité N-terminale de l'histone H3 peut être modifiée par méthylation, acétylation, phosphorylation...



médecine-sciences

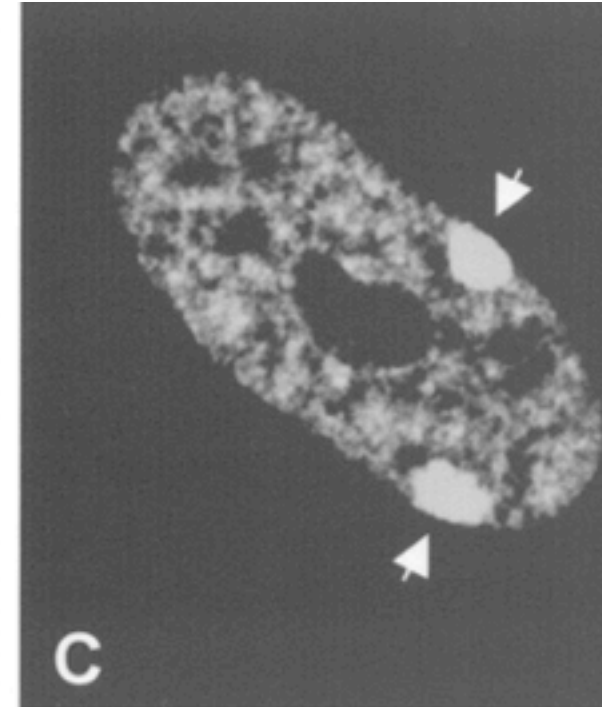
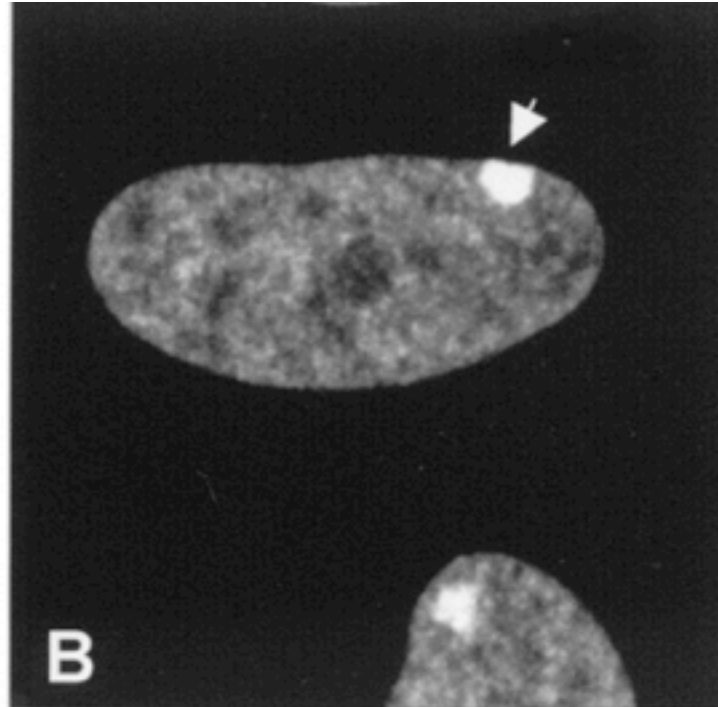
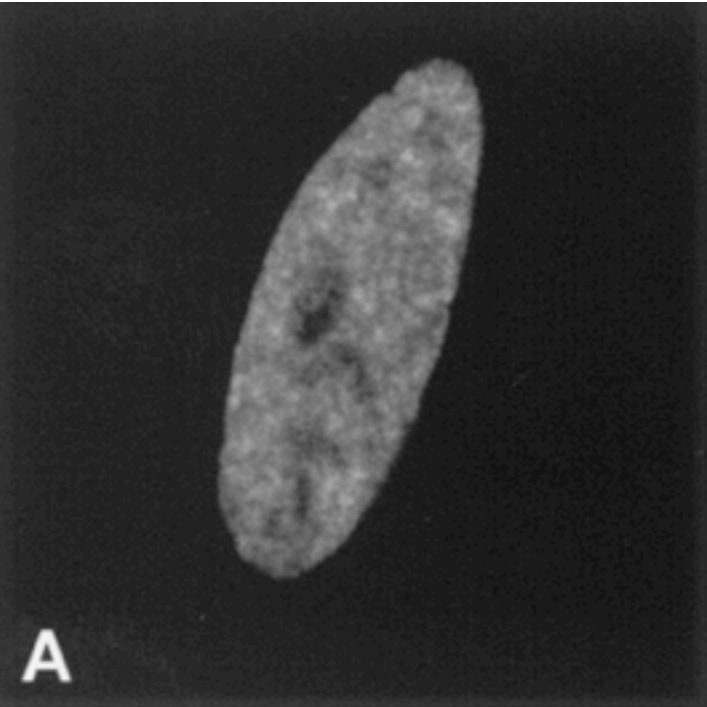
Selon la modification de l'histone H3, le gène est rendu silencieux ou s'exprime.

|    | N termini                          | Modification state | Function            |
|----|------------------------------------|--------------------|---------------------|
| H3 | Residue: 1 4 9 10 14 18 23 28<br>N | Unmodified         | Silencing           |
|    | <br>N                              | Acetylated         | Transcription       |
|    | <br>N                              | Acetylated         | Histone deposition? |
|    | <br>N                              | Phosphorylated     | Mitosis/meiosis     |
|    | <br>N                              | Phos/acetyl        | Transcription       |
|    | <br>N                              | Methylated         | Transcription?      |

nature.com

# Le corpuscule de Barr

❁ Noyau de cellule d'homme XY (A) ou de femme XX (B) ou encore XXX (C)



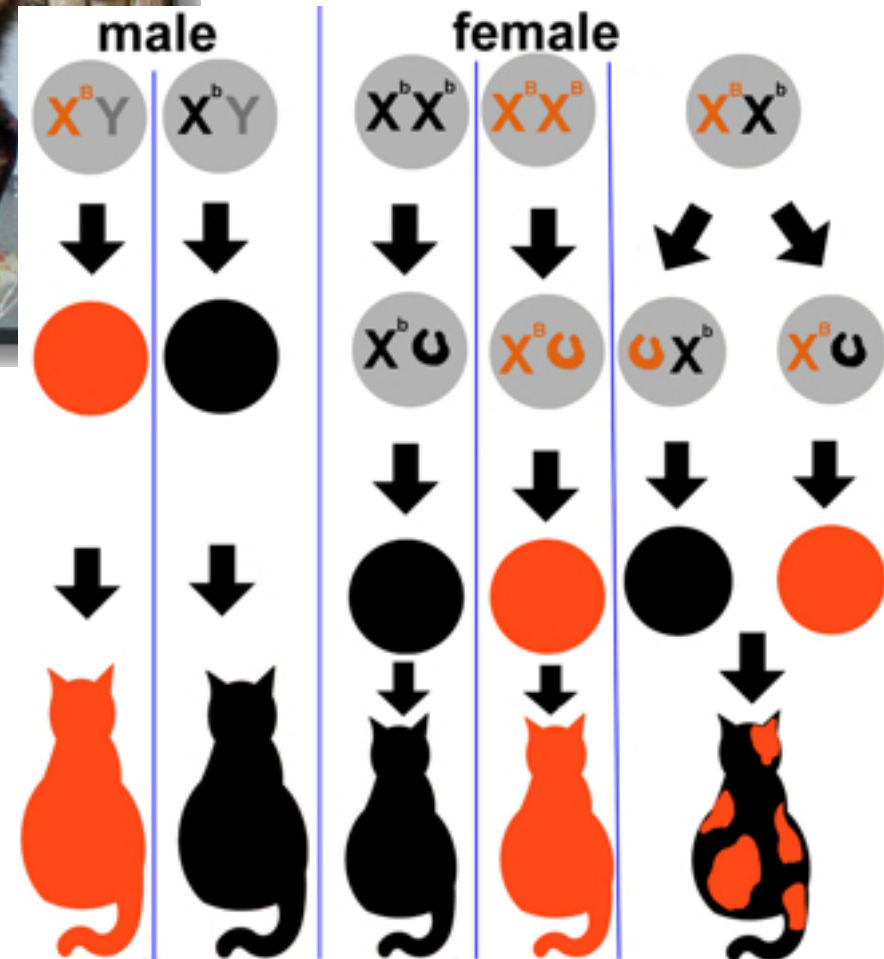
Détection du corpuscule de Barr par immunofluorescence  
(flèche blanche)

# Les chats femelles tricolores



Femelle écaille de tortue

**Femelle calico** : les territoires noirs et orangés sont acquis très tôt dans le développement et seront invariables au cours de la vie. Le blanc est d'origine autosomale.



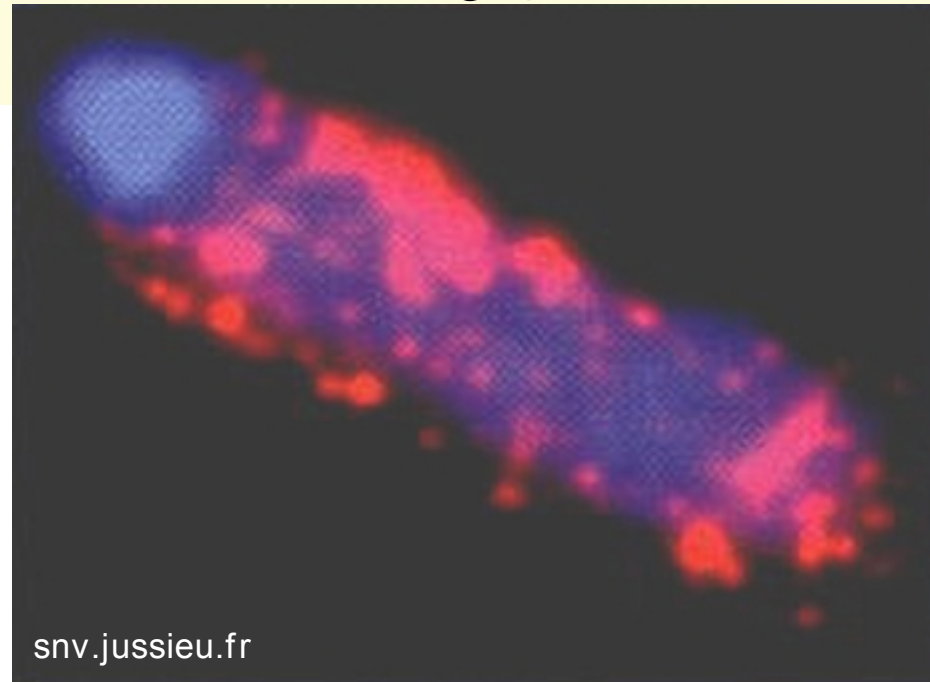


# Mécanisme d'inactivation



## 1) Inactivation

Chromosome X murin métaphasique (fluorescence bleue) recouvert par l'ARN Xist (fluorescence rouge) => inactivation du chromosome X enrobé.



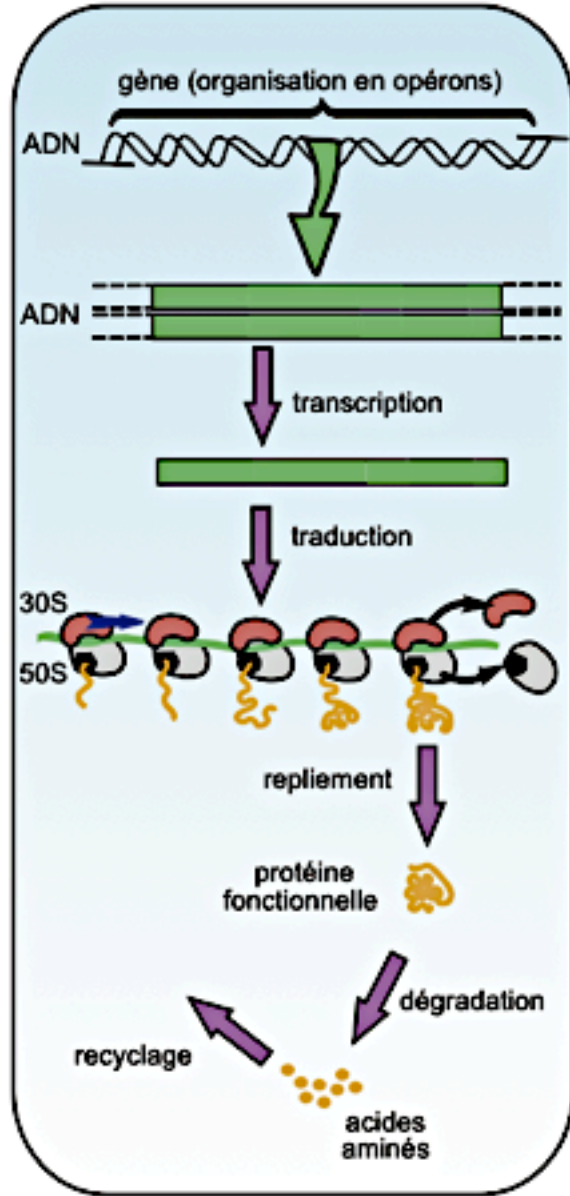
## 2) Maintien de l'état inactivé

Puis, le chromosome X inactivé subira des modifications épigénétiques durables (corpuscule de Barr) : méthylations de l'ADN, méthylation de H3 et désacétylation de H4.

# CONCLUSION



### Cellule d'eubactérie



### Cellule d'eucaryote

