

L'acide désoxyribonucléique (ADN)

Introduction

L'ADN ou acides désoxyribonucléique est une très grande molécule, elle contient l'ensemble de l'information génétique nécessaire à la structure et au fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Elle est formée de deux chaînes dont chacune est constituée d'un enchaînement linéaire de nucléotides ; ces derniers sont composés d'acide phosphorique, de pentose et de bases azotés :

- L'acide phosphorique est un triacide dont une fonction acide est dissociée permettant de donner une charge négative à l'ADN, et dont les deux autres peuvent former des liaisons phosphodiester.
- Les pentoses sont des glucides cycliques à 5 atomes de carbone qui sont sous forme de β -D-ribofurane et sous forme « désoxy »
- Les bases sont des structures coplanaires présentant une résonance grâce à leurs doubles liaisons conjuguées ce sont : la guanine, la cytosine, l'adénine et la thymine.

• Structure et caractéristiques des deux chaînes d'ADN

Les molécules d'acide désoxyribonucléiques sont formées de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice régulière. Les deux chaînes sont :

1-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 structure secondaire du DNA est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre. Chacun des deux brins est orienté (5'3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'5'). On dit qu'ils sont antiparallèles

2-Complémentaires : 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). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires. Cette complémentarité s'explique par les raisons suivantes :

Raisons stériques (de place) : en face d'une base purique on trouve une base pyrimidique (une base à deux cycles en face d'une base à un cycle), 2 purines ne peuvent jamais s'associer.

Raisons de liaisons hydrogènes : les bases situées face à face se lient entre elles par des liaisons hydrogènes ; en face d'un groupement NH₂ en 6 d'une base purique se trouve un groupement CO d'une base pyrimidique, et inversement en face d'un groupement NH₂ en 6 d'une base pyrimidique on trouve un groupement CO d'une base purique

3- **Hélicoïdales** : les deux chaînes présentent dans l'espace une configuration hélicoïdale, elles s'enroulent autour d'un axe droit central imaginaire en formant une double hélice droite

Remarque : Comme l'ADN est bicaténaire et que les 2 brins sont liés par liaisons hydrogènes **A=T** et **G≡C**:

A/T=1 et **G/C=1** d'où **A+G/T+C=1**. En revanche le rapport d'asymétrie: **R= A+T / G+C ≠1**. Il est caractéristique de chaque organisme

- **Différentes configurations de l'ADN**

Il existe Plusieurs formes d'ADN : **A-ADN**, **B-ADN**, **Z-ADN**, cette classification est fondée sur des critères physicochimiques, ces types d'ADN diffèrent légèrement par leurs diamètres, leurs tailles et par l'orientation de leurs paires de bases.

Conformation B

C'est celle du modèle décrit par Watson et Crick et que l'on trouve comme la forme principale native dans les conditions physiologiques. C'est une hélice droite de pas (La distance entre deux plans de bases successifs) égal à 3,54 nm (10.4 pb par tour).

- L'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 1°.

- Liaison base-sucre: anti

- le diamètre de l'hélice est de 2.37 nm

- Angle entre 2 plateaux de pb successifs: 36°

Conformation A

Lorsque la teneur en eau d'une solution contenant une molécule d'ADN est diminuée, par exemple lors de la cristallisation, la molécule change de conformation et adopte une conformation notée A et ce changement est réversible. La conformation A se caractérise par :

- hélice droite

- hélice plus compacte

- pas de 2,53 nm (11 pb par tour)
- le diamètre de l'hélice est de 26 Å
- les plans des bases sont tournés de 180° par rapport à la conformation B
- Liaison base-sucre: anti
- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 20°.

Cette conformation est trouvée *in vivo* dans :

- l'ADN de certaines spores bactériennes, formées en réponse à la dessiccation du milieu
- les hybrides ADN-ARN qui se forment transitoirement à l'amorce de la réplication, et pendant la transcription.

Conformation Z

Cette conformation est présente dans des régions courtes de l'ADN dans une conformation générale de type B (native). Ces régions spécifiques sont en général des segments de séquence alternée Pur/Pyr (G-C-G-C).

La conformation Z se caractérise par:

- hélice gauche
- Liaison base-sucre: anti pour purine et syn pour pyrimidine
- pas de 4,5 nm (12 pb par tour) : la molécule est plus étirée dans cette conformation
- le diamètre de l'hélice est de 18 Å
- l'inclinaison des bases par rapport à leur axe de rotation perpendiculaire à l'axe principal de l'hélice est de 9°.

Cette conformation est trouvée *in vivo* pour des segments de la molécule d'ADN, avec des enchaînements alternés Pur/Pyr dont les bases sont souvent méthylées. Celle-ci aurait un rôle dans l'expression des gènes

Les propriétés physicochimiques de l'ADN

La structure de la double hélice donne une nature fibreuse à la molécule d'ADN dont les propriétés sont exploitées dans de nombreuses expériences de biologie moléculaire :

- **la densité**

La densité des molécules d'ADN est telle qu'on peut les séparer par ultracentrifugation dans des gradients de densité (chlorure de césium)

- **La charge**

La charge des molécules d'ADN à pH physiologique est négative, elle est proportionnelle à leur longueur, et uniquement du au groupement phosphate. Cette propriété est utilisée pour les séparer par électrophorèse.

- **La solubilité**

Les alcools, et en particulier l'éthanol, précipitent les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en longues fibres. Il précipite aussi en présence d'une forte concentration saline. Par contre en milieu aqueux l'ADN devient un sel d'acide

- **L'absorption UV**

Les nucléotides absorbent dans les UV et cette absorption dépend de l'angle d'incidence des rayons UV : l'absorption est maximale lorsque les rayons d'incidence sont perpendiculaires, et minimale lorsque les rayons d'incidence sont parallèles, l'empilement des bases freinant l'accessibilité.

L'ADN absorbe moins que ne le fait des nucléotides libres en même quantité, on qualifie ce phénomène d'**hypochrome**.

Le chauffage des solutions d'ADN produit une augmentation d'absorbance à 260 nm. Ce phénomène correspond à la dénaturation de l'ADN bicaténaire en 2 brins d'ADN monocaténaire, d'où le doublement de densité optique.

On peut caractériser la température de fusion de l'ADN notée **T_m** qui correspond à la température à la moitié du phénomène (Figure 1)

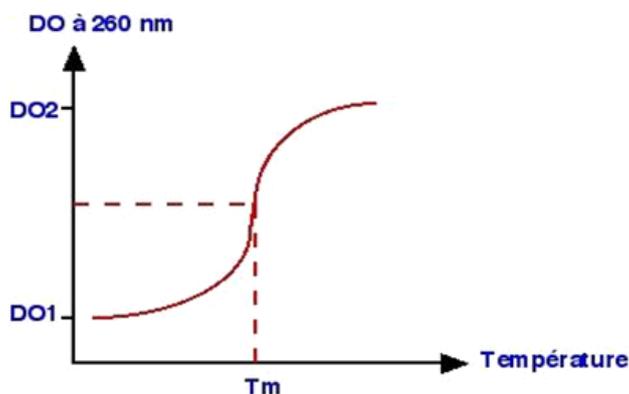


Figure 1 : Absorption de l'ADN à 260 nm en fonction de température

- **Dénaturation thermique**

La dénaturation thermique correspond au fait que les deux brins de l'hélice se dissocient par l'action de la chaleur.

La **température de fusion** ou **T_m** est la température à laquelle la molécule d'ADN est à moitié désappariée. Elle dépend de la longueur de la molécule d'ADN, en effet les petites molécules sont moins stables et ont donc une température de fusion plus faible. Elle dépend également de la richesse en paires de bases C-G.

Pour que la renaturation soit parfaite il faut obtenir le chemin inverse de la courbe de dénaturation et donc un refroidissement lent. Lorsque le refroidissement est trop rapide, la

réassociation est irréversible. La renaturation est seulement possible pour des petites molécules d'ADN. Les possibilités de **renaturation** sont utilisées pour faire de l'hybridation moléculaire. L'augmentation des forces ioniques du milieu réactionnel (NaCl) permet une renaturation plus facile, les cations neutralisant les forces répulsives de l'ADN.

Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN 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 nucléotides on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C :

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

A partir de $N = 20$, on corrige d'un multiplicateur proportionnel à la longueur au-delà de ce chiffre $1 + [(N-20)/20]$:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) \times (1 + [(N-20)/20])$$

- **Les topoisomères**

On appelle topoisomères deux molécules d'ADN ayant exactement la même séquence de bases et qui diffèrent uniquement par le nombre d'enlacements (c'est-à-dire le nombre de tours que fait l'un des brins autour de l'autre brin).

- **Les différents états des topoisomères**

Il existe trois états :

- **L'état relâché** : la contrainte sur l'hélice d'ADN est minimale ; c'est la configuration la plus stable de la double hélice
- **Le surenroulement positif** : le nombre d'enlacement est augmenté, par conséquent la tension produite conduit à la formation d'un super tour gauche.
- **Le surenroulement négatif** : le nombre d'enlacement est diminué et par conséquent la tension produite conduit à la formation d'un super tour droit (un désenroulement) (Figure 2)

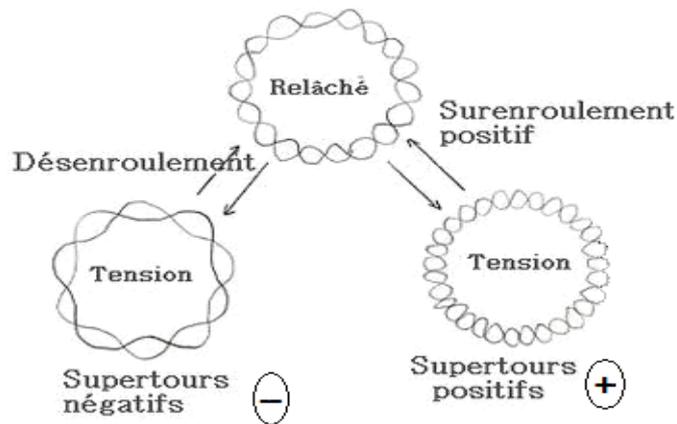


Figure 2 : Les topoisomères de l'ADN

Le superenroulement de l'ADN a des conséquences importantes :

- Rendre la molécule d'ADN plus compact et diminuer ainsi le volume occupé dans la cellule.
- Le degré d'enroulement de la double hélice d'ADN influence sur les interactions de l'ADN avec d'autres molécules (exemple les enzymes)

- **Les topoisomérases**

Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements. Elles sont donc capables d'augmenter ou de diminuer le nombre de super tours dans les molécules d'ADN. On distingue deux grands types de topoisomérases (Fig.11):

- **Les topoisomérases I :** sont capables de couper transitoirement et de ressouder un seul brin d'ADN double brin.
- **Les topoisomérases II :** coupent d'une manière transitoire les deux brins de l'ADN, puis les ressouder. Cette enzyme permet de désenrouler l'ADN (Figure 14).

Les topoisomérases des deux types ont été mises en évidence chez les procaryotes et les eucaryotes leurs importance est capitale dans la réplication et la transcription de l'ADN. Ces enzymes sont également la cible d'agents médicamenteux, soit par exemple les antibactériens de la classe des quinolones qui inhibent les gyrases bactériennes ou les anticancéreux qui agit sur les topoisomérases.

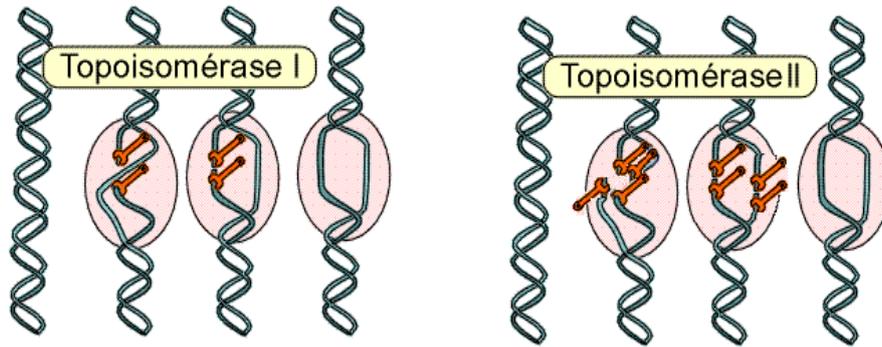


Figure 3 : Les topoisomérases

- **L'ADN des différents êtres vivants**

L'ADN des différents êtres vivants possède le même type de structure c'est-à-dire deux brins (sauf chez certains virus), constituant d'une succession de milliers de bases ce qu'il diffère d'une espèce à l'autre c'est :

- Le nombre de molécules d'ADN (virus et bactérie une molécule, cellule animale et végétale plusieurs molécules)
- La longueur de la molécule (quelques milliers de nucléotides à plusieurs milliards réparties sur les chromosomes)
- La forme de la molécule (linéaire ou circulaire)
- La localisation de la molécule (séparée ou non du cytoplasme par une membrane nucléaire)
- La séquence des bases

1-Les virus : possèdent l'ADN le plus court, il existe des virus à ADN et des virus à ARN, l'ADN des virus est de quelques milliers à plusieurs milliers de bases.

2-Les procaryotes : leur ADN est dans le cytoplasme, de forme circulaire (chromosome unique), 1000 fois plus long que l'ADN viral, on trouve souvent des plasmides qui sont de petits morceaux d'ADN circulaires à côté du chromosome et indépendants de l'ADN principal.

3-Les eucaryotes : possèdent un ADN dans le noyau, chaque chromosome contient une très grande molécule d'ADN, le nombre total de nucléotides dans une cellule est presque 1000 fois plus grand que chez les bactéries. On trouve chez les eucaryotes l'ADN hors noyau : dans la mitochondrie et le chloroplaste.

4- L'ADN des organites

À côté des chromosomes nucléaires qui représentent l'essentiel du génome d'un organisme eucaryote, certains organites comme les mitochondries et les chloroplastes, possèdent des chromosomes circulaires, d'une taille moyenne de 104 à 105 paires de bases, souvent en de nombreuses copies identiques. Pour ces raisons, il arrive que selon les organismes, le nombre de génomes d'organites par cellule s'avère très élevé jusqu'à plusieurs centaines parfois. En général, les génomes d'organites possèdent de l'ordre de 50 à 100 gènes dont certains avec des introns. Ces gènes sont spécifiques des fonctions assurées par l'organite lui même.

LES ARN (ACIDES RIBONUCLEIQUES)

Introduction

Pour former un acide ribonucléique les nucléotides (GMP, AMP, UMP, CMP), sont condensés les uns avec les autres avec des liaisons phosphodiester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant. 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.

- **Caractéristiques générales**

1-La première caractéristique principale dans la structure de l'ARN est la fonction hydroxyle en 2' du ribose qui permet à l'ARN de faire une liaison phosphodiester intramoléculaire en milieu basique avant de faire la liaison 3'-5'. De ce fait les ARN ont une demi-vie très courte.

2-La deuxième caractéristique est le remplacement de la thymine par l'uracile. Les molécules d'ARN sont simple brin et linéaire, et les seuls appariements de paires se font intramoléculaires par des liaisons hydrogènes sous forme de structures en tiges-boucles aux extrémités de l'ARN et des structures en épingles à cheveux à l'intérieur de l'ARN (Figure 1).

3-Les hélices d'ARN formées lors des appariements sont de type A et sont plus courtes et plus trapues que l'hélice de type B de l'ADN. L'effet hypochrome est également présent et dû aux appariements intramoléculaires. La courbe d'absorption UV en fonction de la température est cette fois-ci par palier correspondant aux différentes boucles à épingles à cheveux dénaturées.

- **Différents types d'ARN**

Les cellules contiennent essentiellement cinq types d'ARN :

- _ Les ARN ribosomiques (ou ARNr)
- _ Les ARN messagers (ou ARNm)
- _ Les ARN de transfert (ou ARNt)
- _ Les ARN nucléaires de petite taille (ou snRNA pour small nuclear RNA)
- _ Les ARN cytoplasmique de petite taille (ou scRNA pour small cytoplasmic RNA).

- **Les ARNr (80%)**

Les ARN-ribosomiques rentrent dans la constitution des ribosomes, dans lesquels ils sont associés à des protéines. Leur taille est définie en unité Svedberg (S). L'ARNr constitue environ **60 %** de la masse totale de chaque ribosome. C'est l'ARN cellulaire le plus abondant (plus de **80 %**) ; ce qui représente quelques milliers de ribosomes par cellule.

- **Les ribosomes**

Les ribosomes constituent les particules nécessaires à la synthèse des protéines, ils constituent une véritable usine à protéines dans la cellule. Les ribosomes se trouvent dans le cytosol, et également dans les mitochondries. Ils sont formés de **deux sous-unités (petite SU et grande SU)**. Chaque sous-unité ribosomique consiste en un assemblage d'un grand nombre de protéines ou « **ribonucléoprotéines** » (RNP) et de « **RNA ribosomique** » (rRNA).

En plus du **site de liaison du mRNA**, chaque ribosome possède deux sites de liaison pour le tRNA : le **site P (peptidyle)** retient le tRNA qui porte la chaîne polypeptidique en formation, tandis que le **site A (aminoacyl)** retient le tRNA porteur du prochain acide aminé à ajouter à la chaîne. Le **site E (exit)** correspond au site de sortie ou d'éjection du tRNA qui se trouvait au niveau du site P.

2.2 Les ribosomes des procaryotes

Les ribosomes dits 70S sont formés de deux sous unités :

- Une grande sous unité (50S)
- Une petite sous unité (30S)

Chaque sous unité comporte des protéines dites ribosomales (ou r-protéines) et des ARNr, ainsi :

- La sous unité 50S contient deux ARNr dits 5S et 23S avec au moins 34 protéines désignées par L1, L2...L34 (L pour longht)
- La sous unité 30S ne contient qu'un ARNr dit 16S avec au moins 21 protéines désignées par S1, S2....S21(S pour small) (Figure 2)

2-3 Les ARNr des eucaryotes

Chez les eucaryotes, les ribosomes sont plus gros (80S) avec également une structure à deux sous unités (40 S et 60 S)

- La sous unité 60 S contient trois ARNr différents : 5 S, 5.8 S et 28 S et 45 protéines
- La petite sous unité de 40 S ne contient qu'un seul ARNr de 18 S et 33 protéines

- **2-4 Rôle des ARNr**

Les ARNr jouent un rôle essentiel dans la structure et le maintien de l'intégralité des ribosomes en association avec les protéines, de plus ils facilitent la fixation des autres ARN : ARNm et ARNt.

- **Les ARN de transfert ARNt (15%)**

Les ARNt sont les vecteurs qui vont transporter les acides aminés du cytoplasme vers les ribosomes ou s'effectue la synthèse protéique.

- **Structure des ARNt**

Les chaînes des ARNt sont constituées d'une centaine environ de nucléotides. On présente souvent les ARNt sous forme de trèfle, au niveau des branches :

- Repliement du brin d'ARN monocaténaire,
- Appariements entre bases complémentaires par des liaisons hydrogènes ; et au niveau des boucles :
- Présence de bases atypiques,
- Nucléotides non appariés.

Les sites importants dans les ARNt sont :

- **L'extrémité 3'-OH** : au niveau de cette extrémité on trouve toujours les trois nucléotides 5'CCA3', c'est à cette extrémité qui sera fixé l'acide aminé à transporter.
- **L'anticodon** : c'est un groupe de trois nucléotides situés dans une boucle d'ARNt, joue un rôle important puisque ce triplet va reconnaître le codon correspondant situé sur l'ARNm. Cet appariement codon-anticodon se fait d'une manière complémentaire et antiparallèle
- **L'extrémité 5'** des ARNt comporte un groupement phosphate.

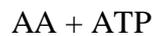
La liaison ARNt ~ Acide aminé

- **Type de liaison**

L'ARNt importe l'AA au ribosome après l'avoir accroché par une liaison covalente (ester), cette liaison s'effectue par élimination d'une molécule d'eau entre la fonction acide de l'AA et une fonction alcool d'un ARNt cette réaction nécessite un apport d'énergie fournit

par l'ATP. L'acide aminé se lie à son tRNA suivant un processus en deux étapes alimenté par l'hydrolyse de l'ATP :

- **Accrochage de l'AA sur l'AMP** : c'est l'étape de l'activation de l'AA, elle aboutit à l'obtention de l'aminocyle ~ AMP



La liaison entre l'AA et l'AMP est une liaison anhydride acide (entre 2 fonctions acides) une de l'AA et l'autre de l'acide phosphorique de l'AMP (extrémité).

- **Transfert de l'AA depuis l'AA ~ AMP sur l'ARNt** : ceci aboutit à la formation de la liaison AA~ ARNt



Il s'agit d'une liaison ester entre l'AA et la fonction alcool du ribose située sur le dernier AMP du ARNt (l'OH peut être de 2'OH ou de 3'OH) (figure 2)

Liaison anhydride riche en énergie

Liaison ester riche en énergie

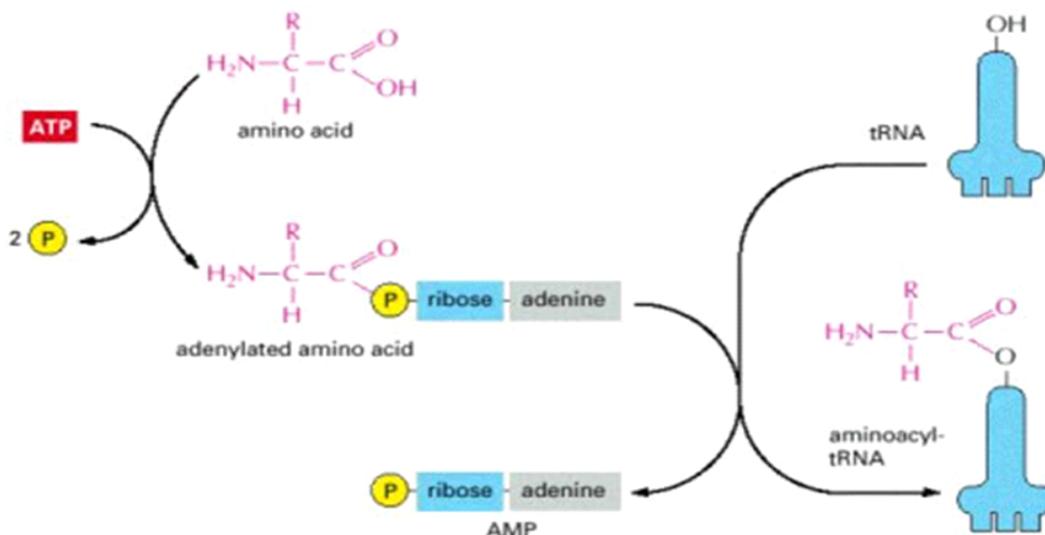


Figure 2 : Les étapes d'accrochage de l'AA sur l'ARNt

- **Enzyme nécessaire**

Pour que cette réaction ait lieu, il faut l'intervention d'une enzyme appelée **aminoacyl-tRNA synthétase**, qui lie spécifiquement chaque acide aminé au tRNA correspondant. Il existe toute une famille de cette enzyme soit une enzyme pour chaque acide

aminé. Le site actif de chaque type d'aminocyl-tRNA synthétase ne peut former qu'une seule combinaison d'acide aminé et de tRNA

Les aminoacyl- synthétases sont très spécifiques et cette étape où l'AA-AMP se forme, il ne faut pas que des erreurs se produisent à ce niveau.

L'aminocyl-tRNA obtenu présente une «**liaison ester**» entre l'acide aminé et la fonction alcool du ribose du dernier nucléotide (A) du côté 3' du tRNA.

Cette liaison ester est riche en énergie. Or, habituellement, une liaison ester ne l'est pas. Dans ce cas particulier, l'énergie qui était contenue dans la liaison anhydride d'acide (AA~AMP) est transférée dans la liaison ester (AA~tRNA).

Ainsi, les différents tRNA apporteront dans leur cargaison non seulement les acides aminés mais également l'énergie nécessaire à l'accrochage des acides aminés les uns aux autres. Ceci a lieu au moment de la synthèse protéique par la formation des liaisons peptidiques. On peut se demander pourquoi un tRNA reconnaît son acide aminé alors que les différents tRNA se terminent tous de la même façon : par « CCA » ?

L'étape où les aminoacyl-tRNA sont formés est très importante et il ne faut pas que des erreurs se produisent à ce niveau. Une valine par exemple est très semblable à une isoleucine. Si par erreur une valine est activée à la place d'une isoleucine, le Val~AMP formé ne sera pas fixé au tRNA de l'Ile. L'isoleucyl-tRNA synthétase est capable de corriger ses propres erreurs. En effet la synthétase est capable d'hydrolyser ce Val~AMP produit par erreur dans un site hydrolytique différent du site de synthèse (**site de correction** ou **editing site**) (figure 5)

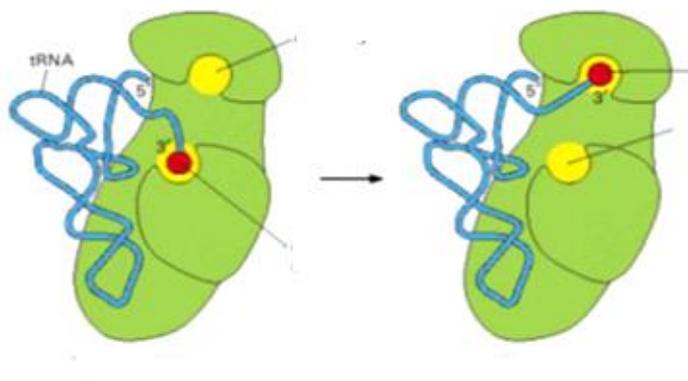


Figure 5 : Structure de l'aminocyl_ tRNA synthétase

- **Les ARN messagers ARNm (2%)**

Les ARNm constituent le support essentiel qui porte l'information génétique de l'ADN au ribosome où s'effectuera la synthèse protéique. Sa durée de vie est très courte, elle suppose à celle d'ARNt qui est très longue. Chez les bactéries la durée de vie de l'ARNm est de quelques minutes environ, chez les eucaryotes les ARNm sont plus stable ; quelques minutes à quelques jours. Ils sont rapidement produits et rapidement dégradés.

Comme les autres ARN, les ARNm sont formés d'une seule chaîne nucléotidique, cette chaîne comporte une succession de triplets nucléotidiques. Chaque triplet nucléotidique constitue un codon spécifique d'un acide aminé donné. Les ARN-messagers correspondent aux séquences complémentaires et antiparallèles du brin matriciel (ou brin anti-codant) de l'ADN qui lui sert, comme son nom l'indique, de matrice, c'est-à-dire de modèle, mais à part que les thymines sont remplacées par les uraciles.

- **Les petits ARN nucléaires (snRNA)**

Les petits ARN nucléaires (ou snRNA) sont présents dans le noyau des cellules et sont impliqués dans certaines étapes de la transcription, c'est-à-dire la copie de l'ADN en ARNm. Ces snRNA sont présents sous forme de particules ribonucléoprotéiques.

- **Les petits ARN cytoplasmiques (scRNA)**

Dans le cytoplasme, on peut retrouver des petits ARN ou scRNA qui existent également sous forme de particules ribonucléoprotéiques. Ils sont impliqués dans la maturation d'ARNm.

LA TRANSCRIPTION

- **Définition**

La transcription est un processus biologique ubiquitaire qui consiste à synthétiser toutes les molécules d'ARN à partir d'une matrice d'ADN. En effet, si la molécule d'ADN est le support universel de l'information génétique, ce sont les molécules d'ARN qui sont reconnues par la machinerie de traduction en séquences protéiques.

Il faut noter que les mécanismes généraux qui assurent la transcription des ARN (messager, ribosomique, de transfert, etc.) sont globalement identiques mais l'organisation des gènes codant ces différents ARN et le contrôle de leur expression sont très différents d'un type de gène à l'autre.

- **Notion du brin matrice et brin codant**

Il est bien important de comprendre que ce n'est pas tout l'ADN qui est transcrit mais seulement certaines parties (les gènes). Seul l'un des 2 brins d'ADN est copié, et ce n'est pas toujours le même brin. En effet, pour certains gènes se sera un brin, pour d'autres gènes se sera l'autre brin. Le brin qui va servir de matrice à l'ARN polymérase est appelé brin matrice. C'est sur ce brin que l'ARN polymérase va se déplacer et synthétiser la copie complémentaire de ce brin matrice qui sera donc la copie conforme du brin opposé : le brin codant (à l'exception de la Thymine qui sera de l'Uracile).

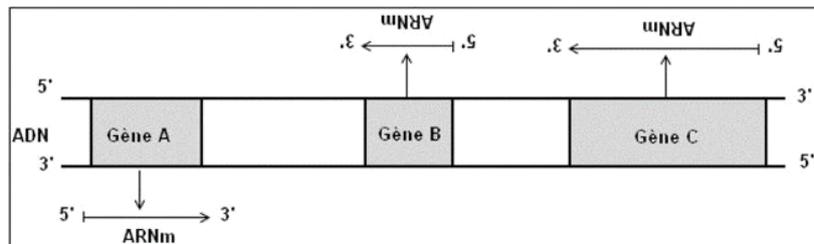


Figure 2 : Brin codant et brin matrice

L'unité de transcription est une partie d'ADN constituée de trois régions essentielles : un site d'initiation de la transcription (promoteur), une région transcrite qui porte l'information génétique (la région codante), et un site de terminaison de transcription (région de terminaison). Sur la même molécule d'ADN on pourra trouver une unité de transcription dans le sens inverse, le brin matrice devient donc codant et vice-versa

Notion de promoteur

Le promoteur est la séquence d'ADN reconnue par une ARN polymérase et indiquant le début d'une unité de transcription, il est constitué de régions très variables et de régions beaucoup plus conservées, nommées séquences consensus

- **Caractéristiques de la transcription**

La synthèse des ARN s'effectue toujours dans le sens 5'→3' de façon antiparallèle par rapport au brin transcrit, et de façon complémentaire.

L'ARN polymérase est l'enzyme spécifique de la transcription ; elle nécessite une matrice d'ADN sur laquelle elle polymérise les ribonucléotides par complémentarité de bases afin de former une chaîne d'ARN.

La réaction de polymérisation nécessite des ribonucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP et UTP), ces derniers apportent à la fois les nucléotides monophosphates (constituant la molécule d'ARNm) et l'énergie nécessaire pour relier chaque nucléotide au précédent. Seulement le premier nucléotide de l'ARNm conserve son groupement triphosphate.

- **L'ARN polymérase : structure et fonctionnement**

L'ARN polymérase est une enzyme à structure quaternaire formée par un assemblage de plusieurs sous unités polypeptidiques identiques ou différentes. On peut distinguer 5 grands types structuraux d'ARN polymérases : un type chez les procaryotes et 4 types chez les eucaryotes

Ces différentes ARN polymérases travaillent globalement de la même façon. Elles ont besoin pour fonctionner d'une matrice d'ADN (double brin préférentiellement), des 4 précurseurs ribonucléotidiques (ATP, UTP, CTP et GTP) et d'un cofacteur apporté sous forme d'ions Mg²⁺.

- **ARN polymérase des procaryotes**

Tous les gènes (codant l'ARNm, l'ARNt et l'ARNr) sont transcrits par la même ARN polymérase. Cette enzyme est variable en fonction des espèces bactériennes considérées, mais globalement son organisation et son fonctionnement reste à peu près comparable dans l'ensemble des procaryotes.

Chez *E. coli* son poids moléculaire est de 390 000d, et est composée de 5 types de sous unités différentes (Tableau I).

Tableau I : caractéristiques de l'ARN polymérase d'*E. coli*

Sous-unité	PM	Fonction
Alpha (α)	2 36 500	Liaison à l'ADN
Beta (β)	1 150 000	Polymérisation ARN
Beta prime (β')	1 155 000	Liaison à l'ADN
Sigma (σ) (plusieurs types)	1 70 à 80 000	Initiation
Omega (ω)	1 11 000	Inconnue

La sous unité sigma est à fixation réversible, l'enzyme peut donc exister sous deux formes (Figure 4):

- Core enzyme = $\alpha_2 \beta \beta' (\omega)$
- Holoenzyme = $\alpha_2 \beta \beta' (\omega) \sigma$

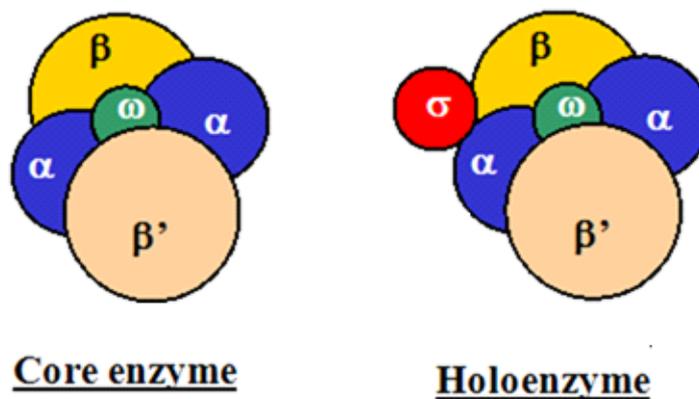


Figure 4 : Core enzyme et Holo enzyme

Il existe plusieurs types de facteurs σ qui permettent l'initiation de la transcription de différents types de gènes.

4-2 ARN polymérase des eucaryotes

Quatre ARN polymérases distinctes spécialisées chacune dans la transcription d'un type de gène :

- **ARN Pol I** : transcription des gènes de classe I (ARNr précurseurs : 5,8S ; 18S et 28S)
- **ARN Pol II** : transcription des gènes de classe II (ARNm et snRNA)
- **ARN Pol III** : transcription des gènes de classe III (ARNr 5S ; ARNt et scRNA)
- **ARN-polymérase IV** : spécialisée dans la transcription de l'ADN mitochondrial et la synthèse de l'hétérochromatine chez les plantes.

La structure des ARN Pol est excessivement variable d'une espèce à l'autre chez les eucaryotes. Elles sont formées de 10 à 15 sous unités réparties en 2 grosses sous unités et 13 petites sous unités.

Ces enzymes sont elles-mêmes peu efficaces pour la transcription. Pour fonctionner, elles nécessitent l'aide et la coopération de facteurs protéiques supplémentaires : les facteurs de transcription. Ils permettent la reconnaissance du site d'initiation mais aussi jouent sur l'élongation.

- **Etapes de la transcription**

Le mécanisme général de la transcription que se soit chez les procaryotes ou chez les eucaryotes est divisé en 3 étapes distinctes :

- **Initiation de la transcription** : reconnaissance du début de l'unité de transcription
- **Elongation de la chaîne ribonucléotidique** : polymérisation de la chaîne d'ARN
- **Terminaison de la transcription** : nécessite la reconnaissance de la région de terminaison.

5-1 Transcription chez les procaryotes

- **Initiation de la transcription**

Cette étape initiale consiste à la fixation de l'ARN polymérase sur le brin matrice, et précisément sur le promoteur du gène. Les deux brins d'ADN se déroulent à cet endroit et la transcription commence

Les promoteurs bactériens sont caractérisés par la présence de deux séquences consensus : **la région -35** et **la boîte de Pribnow (-10)** (Figure 5)

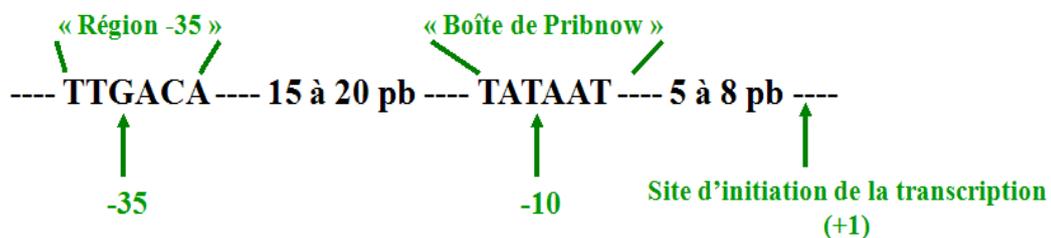


Figure 5 : Promoteur des procaryotes

- **Séquence consensus**

Elles présentent des sites de reconnaissance à l'ARN Pol. C'est le facteur σ qui est responsable de la reconnaissance spécifique des séquences consensus : le core enzyme (sans facteur σ) a une certaine affinité pour l'ADN, il se fixe sur l'ADN pour se déplacer. En

présence du facteur σ , l'holoenzyme va reconnaître spécifiquement les régions promotrices et va se lier à ces régions avec une forte affinité. Cette reconnaissance spécifique va être suivie d'une dénaturation locale (ouverture de la double hélice en **position -10**) et s'accompagne du positionnement du premier nucléotide au niveau du site d'initiation (position +1). Le facteur σ va être relargué après positionnement d'une dizaine de nucléotides : la polymérisation s'effectue uniquement par le core enzyme. Le facteur σ et les séquences consensus qu'il reconnaît permet un contrôle fin et précis de la transcription des gènes.

Chez la bactérie (*E. Coli*) il existe plusieurs dizaines de facteurs σ différents, reconnaissant des promoteurs légèrement différents (par leurs séquences consensus). En conditions normales, chez *E. Coli*, on trouve un facteur σ majoritaire appelé le facteur $\sigma 70$: c'est celui qui reconnaît avec la plus forte affinité les séquences -10 et -35 qui se rapprochent le plus de ces séquences consensus (TTGACA et TATAAT) donc plus efficace. Donc, dans les conditions normales de développement, les gènes possédant des séquences -10 et -35 se rapprochant le plus des séquences TTGACA et TATAAT seront transcrits préférentiellement. Inversement, les gènes possédant des promoteurs dont les séquences -10 et -35 divergent par le facteur σ ne seront pas transcrits. Lorsque les conditions du milieu changent, d'autres types de facteurs σ vont être synthétisés et vont permettre la reconnaissance d'autres promoteurs. Cette nouvelle reconnaissance va permettre d'activer des gènes qui étaient normalement éteints, permettant à la bactérie de réagir rapidement (soit en fabriquant des protéines de réponse au stress, soit en activant la sporulation).

Une fois que l'ARN polymérase a reconnu le promoteur, et qu'elle s'y fixe, elle catalyse l'initiation, c'est-à-dire l'insertion du premier nucléotide du site d'initiation du brin d'ADN matrice. Ce processus se poursuit 3', créant un duplexe ADN-ARN temporaire de 8 pb dans la direction 5'

- **Elongation de la transcription**

Une fois le duplexe temporaire est formé, la sous-unité σ se dissocie de l'holoenzyme et l'élongation de la chaîne se poursuit sous la direction de la partie centrale de l'enzyme. Chez *E. coli* ce processus progresse à la vitesse d'environ 50 nucléotides/seconde à 37°C. Par la suite la polymérase parcourt le gène entier jusqu'à rencontrer une séquence dite de terminaison (Figure 6).

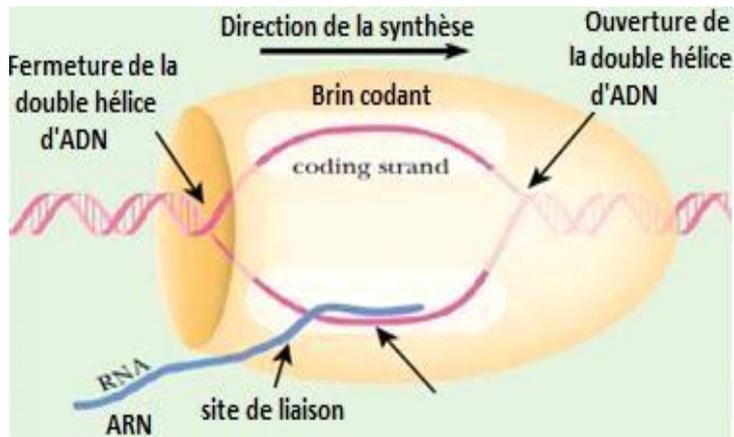


Figure 7 : Elongation de la transcription

- **terminaison de la transcription**

La dissociation de l'ARN polymérase à la fin de la transcription se fait lorsque cette dernière rencontre un signal de terminaison : une séquence de 40 pb qui va être transcrite en ARN et formée une structure en tige boucle par appariement de bases du même brin.

Cette structure secondaire suivie d'une série d'uridines constitue un terminateur efficace de la transcription. Des séquences riches en GC suivie par autres riche en AT sont aussi des sites spécifiques de terminaison. Ces régions qui ne nécessitent pas de facteurs additionnels sont nommées "terminateurs intrinsèques".

D'autres types de terminateurs nécessitent des facteurs protéiques spécifiques. Chez E. coli la protéine Rho se fixe fortement à l'ARN, elle parcourt la chaîne jusqu'au complexe ARN polymérase-ADN. Dès que l'ARN polymérase s'arrête à un site de terminaison Rho dépendant, le facteur Rho favorise la libération de l'ARN et de l'enzyme positionnée sur l'ADN, terminant ainsi la transcription.

5-2 Transcription chez les eucaryotes

- **Promoteur des eucaryotes**

La structure des promoteurs eucaryotes est beaucoup plus complexe que celle des procaryotes. Les 3 ARN Pol vont reconnaître 3 grandes classes de promoteurs réparties en plusieurs milliers de types différents. Dans la plupart des cas, notamment les gènes de classe 2 (codant pour les ARNm) le promoteur est situé en amont de l'unité de transcription (comme chez les procaryotes). Dans d'autres cas, comme dans les gènes de classe 3 (ARNt...) le promoteur peut se trouver dans la séquence codante (unité de transcription) donc il est difficile de dresser un schéma général de la structure des promoteurs eucaryotes.

D'une façon générale : 3 séquences consensus différentes sont reconnues dans les promoteurs des eucaryotes :

TATA box (-25) : séquence consensus = TATAAAA

GC box (-50) : séquence consensus = GGGCGG

CAT box (-80) : séquence consensus = GCCAAT

- **Initiation de a transcription**

Contrairement aux procaryotes qui possèdent un seul type d'ARN polymérase, les eucaryotes ont trois types d'ARN polymérase. Chez les eucaryotes les gènes présentent une structure discontinue, comportant des exons et des introns.

Des régions situées en amont du site d'initiation sont important pour la transcription :

– La boîte TATA fixe un facteur général de transcription appelé TFIID (TF facteur de transcription, II pour l'ARN poly II). Ce facteur est absolument nécessaire pour l'initiation de la transcription

- **Elongation de transcription**

La transcription se fait dans le sens 5' 3' ce qui signifie qu'elle s'agrandit en 3'. Une boucle de transcription comporte environ 17 bases ouvertes. La vitesse de polymérisation est d'environ 30 à 80 nucléotides par seconde.

- **Terminaison de transcription**

La transcription d'un gène s'achève quand l'ARN Pol arrive à la fin de l'unité de transcription. Le signal de fin de transcription est la séquence sur le brin non transcrit, cette séquence est la suivante AATAAA appelée signal de polyadénylation. L'ARN polymérase reconnue cette séquence mais continue à transcrire au-delà, toutefois, les transcrits seront ensuite raccourcis et se terminent par AAUAAA suivie de 10 à 15 N avant de recevoir une queue poly A à l'extrémité 3'. Cette queue est une succession d'environ 250 nucléotides (adénine) on pense qu'elle aiderait au passage de mARN du noyau au cytoplasme et qu'elle protégerait le ARNm au cours de traduction. L'addition de poly A est effectuée par une enzyme poly A polymérase qui utilise l'ATP comme matrice. Le complexe de transcription se désassemble, l'ARN polymérase se décroche de la matrice et la boucle de transcription se referme (figure 6).

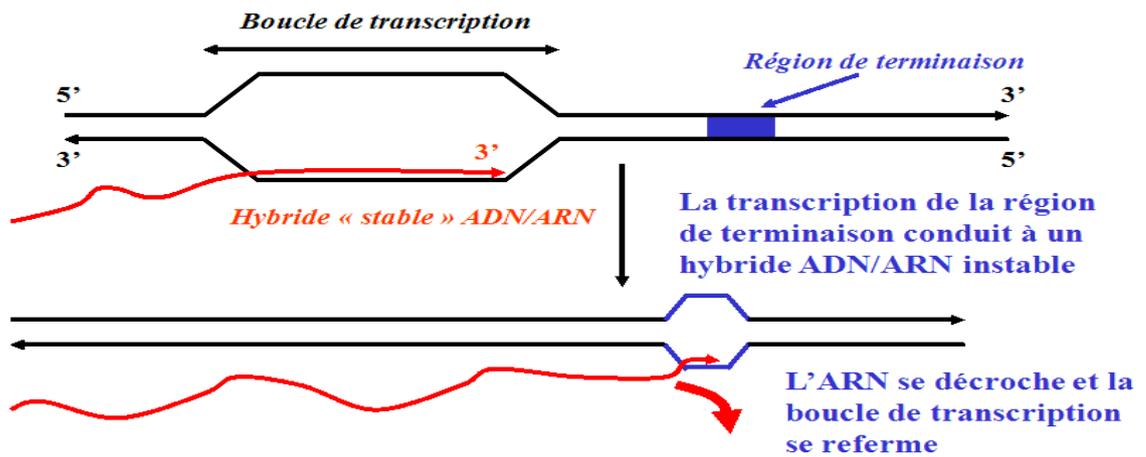


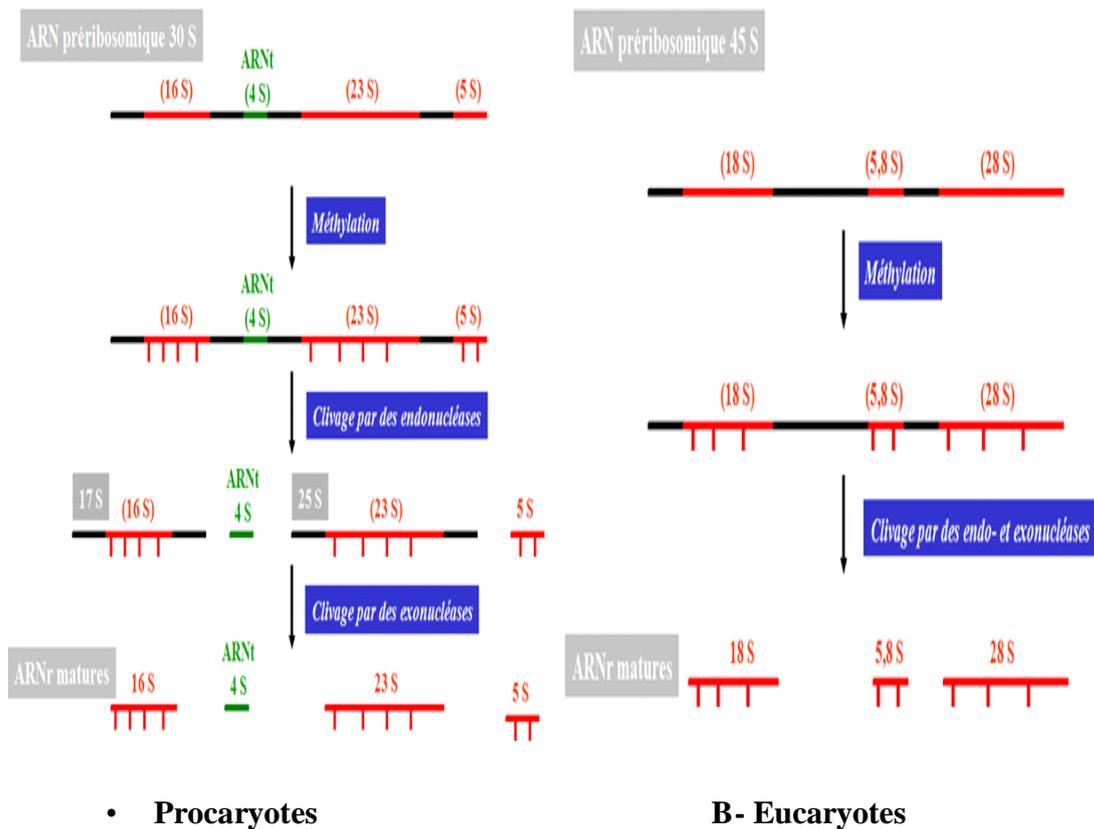
Figure 6 : Terminaison de transcription

- **Modifications post transcriptionnelle des ARN**

Les modifications post transcriptionnelle sont des changements qui aboutissent à la formation d'un ARN fonctionnel ; on les appelle aussi les réactions de maturation de l'ARN. On les observe à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes.

- **Maturation des ARNr**

Le principe général de maturation des ARNr est comparable chez les eucaryotes et les procaryotes : on trouve dans le génome un gène qui va coder un précurseur pré-ribosomique qui va être clivé au cours de ce phénomène de maturation pour libérer 2 ou 3 ARNr (Figure 7)



• **Procaryotes**

B- Eucaryotes

Figure 7 : Maturation des ARNr procaryotes et eucaryotes

- **Maturation des ARNt**
- clivage de quelques bases aux extrémités 5' et 3'
- modifications de certaines bases par méthylation, désamination, réduction...
- parfois, excision d'introns.

- **Maturation des ARNm**

Chez les procaryotes, du fait de l'absence du noyau, la traduction d'un ARNm en protéine débute avant même la fin de la transcription. Il n'y a donc pas le temps de modifier les ARNm avant que la traduction commence, donc peu de maturation des ARNm.

Chez les eucaryotes, les ARNm vont subir de profondes réactions dans le nucléole, pendant presque une heure pour conduire à la formation d'ARNm mature. Ces modifications sont :

- Capping de l'extrémité 5'
- Polyadenylation de l'extrémité 3'
- Excision des introns et réunion des exons

- **Le capping**

C'est la première modification qui affecte les ARNm juste à la fin de la transcription. Cette réaction consiste en la perte de 2 groupements phosphates à l'extrémité 5' triphosphate de la molécule et la fixation d'un GDP par une liaison 5'-5', suivie par une méthylation de la première et la deuxième base (figure 8)

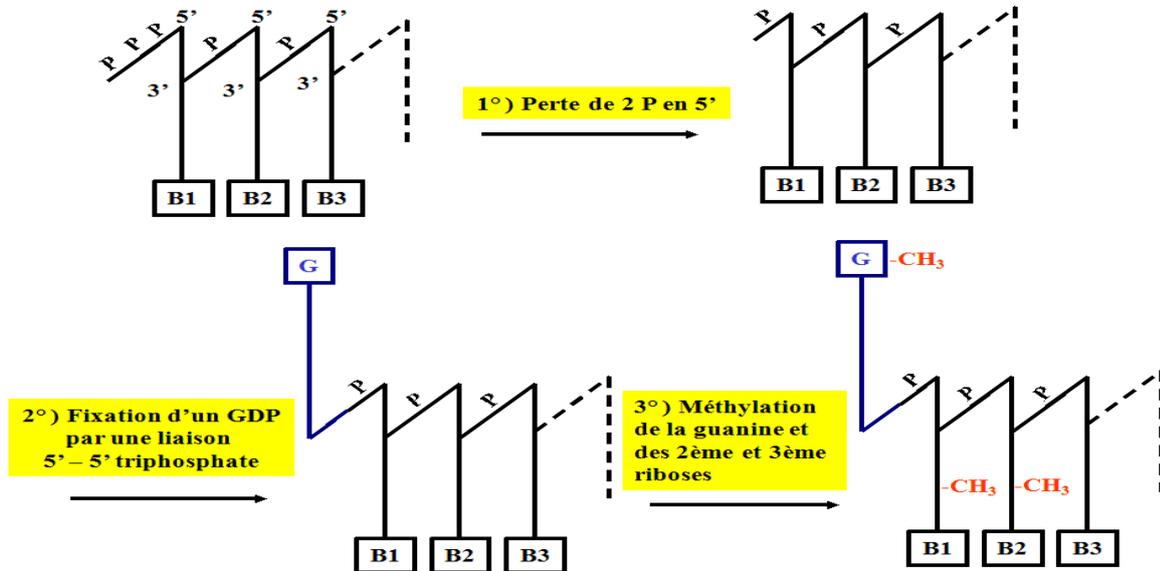


Figure 8 : Capping

- **La polyadénylation**

Elle consiste à rajouter une suite d'adénine au niveau de l'extrémité 3' des ARNm. Cette suite constituera la "queue poly A" caractéristique de tous les ARNm eucaryotes (figure 9).

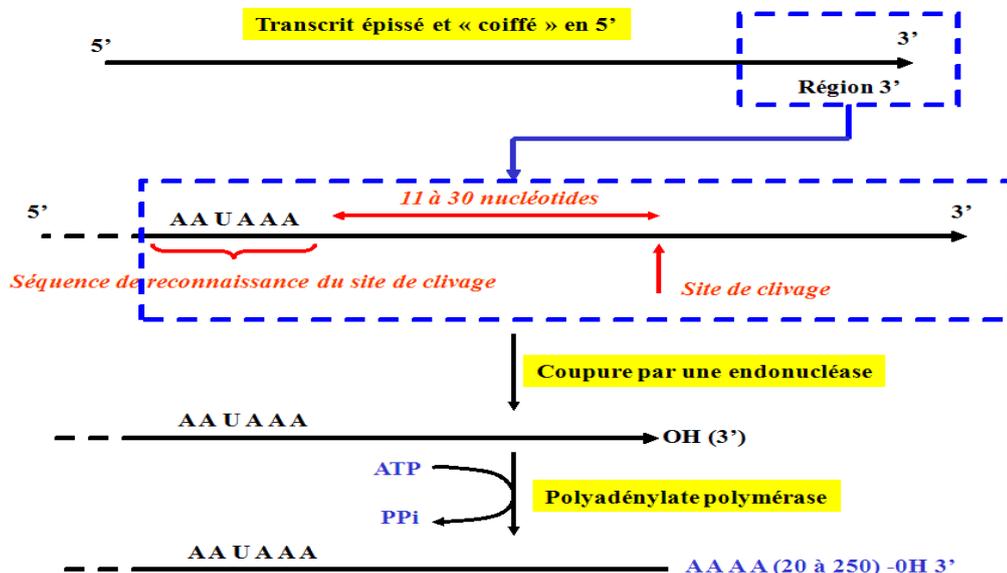


Figure 10 : Polyadénylation

• **Excision/ épissage**

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 messager. 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).

3-1 Mécanisme d'excision -épissage

C'est un mécanisme de précision, une erreur d'un seul nucléotide au moment d'excision change le cadre de lecture et aboutira à la formation d'une fausse protéine. Deux sites sont importants : la jonction exon-intron et le site de branchement.

a- La jonction exon-intron : tous les introns d'un transcrit primaire commencent par **GU** situé à l'extrémité 5' de l'intron et appelé **site donneur d'épissage**, et ils se terminent par **AG** (site 3') appelé site **accepteur d'épissage**. Le site de branchement (A) n'est pas loin de l'extrémité 3' d'intron environ -30 nucléotides se trouve une adénine appelée **adénine de branchement**. Des sn RNA, reconnaissent les extrémités 5' et 3' des introns et participent activement à une réaction de transestérification qui échange les liaisons phosphate de façon à laisser l'intron sous forme de lasso alors que les exons sont reliés entre eux.

b-Schéma du mécanisme excision-épissage : On aura deux clivages :

- Clivage à l'extrémité 5' d'intron entre la fin de l'exon situé en amont et début de l'intron, l'attaque de cette liaison ester est due à l'OH en 2' de l'adénine de branchement. L'extrémité 5' de l'intron GMP vient se soudée par une liaison covalente avec l'Adénine de branchement formé ainsi un lasso.
- Formation de deuxième clivage en 3' d'intron entre la fin d'intron et début d'exon situé en aval, il se produit simultanément une soudure des deux exons (entre 3'OH en de l'exon amont et 5'p de l'exon aval) et libération de lasso qui sera dégradé par des nucléases cellulaires.

c-Rôle des sn RNA : L'épissage nécessite l'intervention d'un complexe catalytique particulier faisant intervenir de petits ARN nucléaires ou les sn RNA (petites molécules d'environ 100 à 300 nucléotides situées dans le noyau, riche en uracile) qui s'associent à des

protéines. Ces complexes sn RNA-protéines forment des sn RNP (small nuclear ribonucleo particle) ou "snurps". Ils s'associent à l'ARN à modifier pour former un complexe de maturation qu'on appelle spliceosome. Il existe plusieurs types différents entre eux par leurs structure on distingue : U1, U2, U4, U5, U6.

d-Le spliceosome : c'est un assemblage moléculaire complexe qui se place au niveau de l'intron à éliminer, il contient plusieurs types de sn RNA. Certain sn RNA sont impliqués dans la reconnaissance des 3 principaux sites (par complémentarité) sur un petit nombre de nucléotides, ce sont les U1 qui reconnaît la jonction 5' à cliver (GU), U2 reconnaît le site de branchement (A), U5 reconnaît la jonction 3' (AG). D'autres sn RNA sont impliqués dans les réactions enzymatiques d'excision-épissage comme le U4 et le U6 (figure 10)

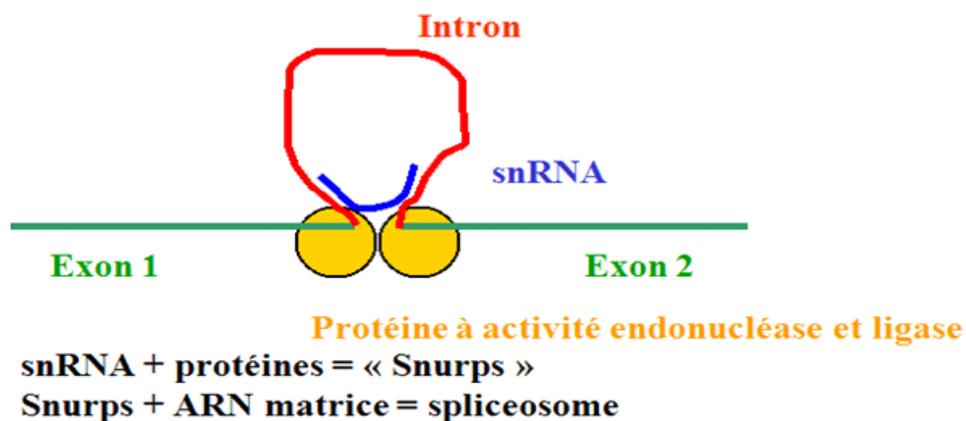


Figure 10 : Le spliceosome

LA TRADUCTION

La traduction est un événement très conservé chez tous les organismes, et très coûteuse en énergie. Elle nécessite une matrice constituée d'une molécule d'ARNm pour donner un produit final qui est une protéine ou polypeptide. Les principaux éléments impliqués dans la traduction sont:

- **ARNm:** Cette molécule est constituée d'une série ordonnée d'unités de trois nucléotides appelées codons, elle fournit l'information qui doit être interprétée par la machinerie de la traduction
- **ARNt:** Ils fournissent l'interface entre les acides aminés ajoutés au polypeptide en croissance et les codons dans l'ARNm.
- **Aminoacyl-ARNt synthétase:** Cette enzyme couple les acides aminés avec les ARNt spécifiques qui reconnaissent le codon approprié.
- **Ribosome:** Coordonne la reconnaissance de l'ARNm par chaque ARNt et catalyse la formation de la liaison peptidique entre la chaîne polypeptidique en croissance et l'acide aminé chargé sur l'ARNt sélectionné.

- **Mécanisme de la traduction**

La traduction se déroule en trois étapes : Initiation, élongation et terminaison. Ces trois étapes nécessitent la présence de **facteurs protéiques** qui assistent le mRNA, les tRNA et le ribosome au cours du processus de traduction. Chez les procaryotes, les facteurs sont abrégés en **IF** pour les facteurs d'initiation ou **EF** pour les facteurs d'élongation, alors que chez les eucaryotes, ils sont appelés **eIF** et **eEF** (Figure 1).

Pour que l'initiation et l'élongation de la chaîne polypeptidique aient lieu, il faut aussi de l'énergie fournie par le guanosine triphosphate (**GTP**).

Il existe plusieurs différences entre le mécanisme de traduction chez les procaryotes et les eucaryotes et la majorité de ces différences apparaissent dans la phase de l'initiation.

Procaryote	Eucaryote	Fonction
Facteurs d'initiation IF1, IF3	- eIF3, eIF AC, eIF6 - eIF4B, eIF4F	Fixation aux sous-unités ribosomales Fixation à l'ARNm.
IF2	- eIF2, eIF2B - eIF5	Délivrance de l'ARNt initiateur. Déplacement d'autres facteurs.
Facteurs d'élongation EF- Tu	eEF1 α	Délivrance de l'aminoacyle- ARNt au ribosome.
EF- Ts	eEF1 $\beta\gamma$	Recyclage de EF-Tu ou eEF1 α
EF- G	eEF2	Translocation.
Facteurs de terminaison RF1		Libération de
RF2	eRF	la chaîne
RF3		polypeptidique.

Figure 1 : facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de traduction chez les eucaryotes et les procaryotes

- **Mécanisme de traduction chez les procaryotes**

2-1 Initiation

Dans les mRNA procaryotes, il existe une séquence conservée de 8 à 13 nucléotides en amont du premier codon à traduire ou codon de l'initiation. Il s'agit de la séquence de **Shine-Dalgarno** ou **ribosome binding sequence**. C'est une séquence riche en purine correspondant au consensus: **5' AGGAGGU 3'**. Cette séquence appelée également site fixant le ribosome intervient dans le positionnement correct du ribosome sur le RNA m : le brin 16 S du rRNA (petite sous unité) interagit et reconnaît la séquence Shine-Dalgarno du mRNA. (Figure 1).

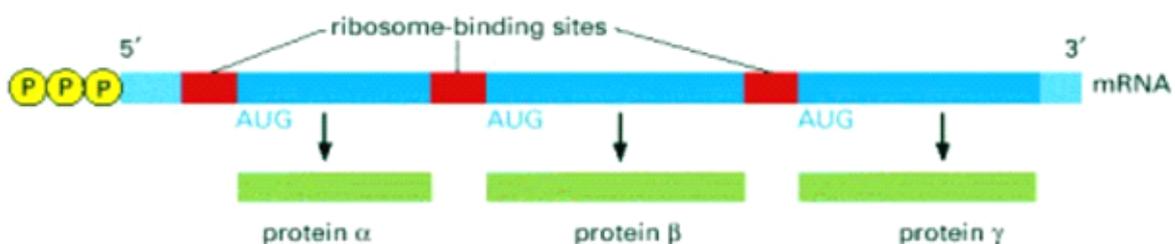


Figure 1 : Séquence de Shine-Dalgarno

Le premier acide aminé incorporé dans une chaîne polypeptidique est la méthionine aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Dans les deux types d'organismes, le codon d'initiation (AUG) est reconnu par un **tRNA initiateur** spécial. Celui-ci diffère du tRNA qui s'apparie avec les codons AUG dans le reste de la région codante du mRNA pour

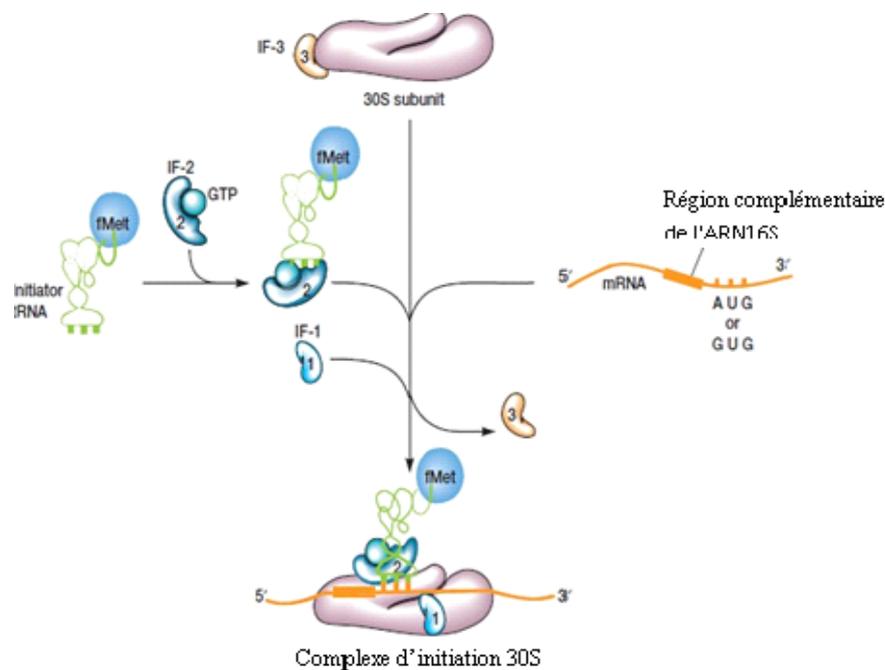
incorporer les **méthionines internes** du polypeptide. Les deux types de tRNA sont chargés avec la méthionine par la même enzyme : la méthionyle tRNA synthétase

Chez-les-procaryotes, la méthionyle tRNA initiateur est modifié par une enzyme appelée **transformylase** pour obtenir le **N-formyle-méthionyle-tRNA (tRNA^{fMet})**. Le groupement **N-formyle** ressemble à une liaison peptidique et permet au tRNA^{fMet} de pénétrer dans le site P du ribosome alors que tous les autres tRNA ne peuvent accéder qu'au site A du ribosome.

Les facteurs IF1 et IF3 se lient à la petite sous unité du ribosome et empêchent la fixation de la grosse sous unité. L'IF2 et la GTP se lient ensuite à la petite sous unité. Il permettra par la suite au tRNA^{fMet} (tRNA initiateur) de se lier à la petite sous unité du ribosome.

Grâce à l'IF3, la petite sous unité s'attache alors à un mRNA via la séquence Shine-Dalgarno. Le tRNA^{fMet} peut maintenant se fixer au complexe par l'appariement de son anticodon avec le codon d'initiation du mRNA. L'IF3 se détache du complexe ; celui-ci est alors désigné sous le terme **complexe d'initiation S30** (Figure 2- A).

La grande sous unité peut maintenant se fixer. Elle déplace l'IF1 et l'IF2. La GTP est hydrolysé en GPD. Le complexe formé à la fin de la phase d'initiation est appelé **complexe d'initiation S70** (Figure 2- B).



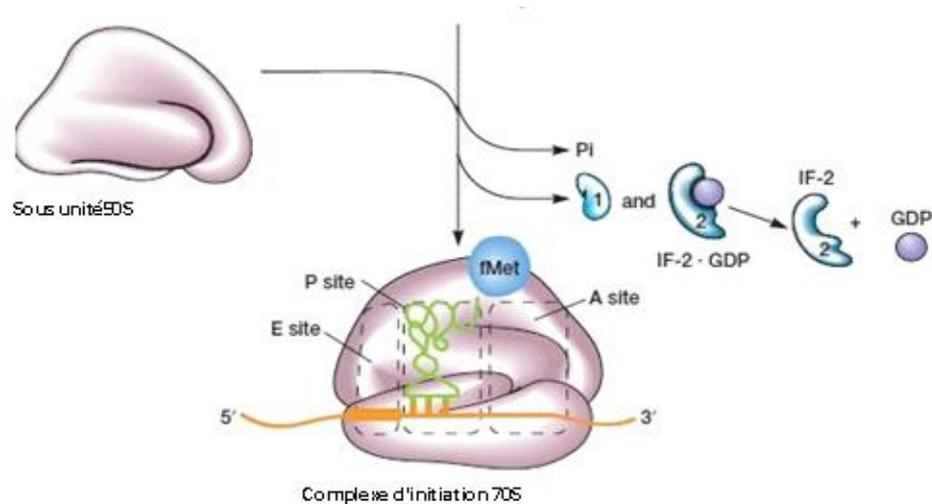


Figure 2 : Initiation de la traduction chez les procaryotes et formation du complexe d'initiation A- 30S et B- 70S

- **Elongation:** Le cycle d'élongation est divisé en trois étapes :

- **Reconnaissance du codon sis au site A du ribosome**

Au premier stade de l'élongation, le codon du mRNA qui se trouve au **site A** du ribosome forme des liaisons hydrogène avec l'anticodon d'une molécule de tRNA entrante qui porte l'acide aminé approprié (aminoacyle tRNA).

Le facteur « **EF-tu** » est requis pour délivrer l'aminoacyle tRNA au site A du ribosome. L'énergie consommée au cours de cette étape provient de la GTP. Le complexe **EF-tu-GDP** est régénéré avec l'aide des « **EF-ts** ». Mais à part le tRNA initiateur, tous les types d'aminoacyle tRNA peuvent former ce complexe avec l'EF-tu.

- **Formation de la liaison peptidique**

Une enzyme qui fait partie intégrante de la grande sous unité du ribosome, « **la peptidyle transférase** », catalyse la formation d'une liaison peptidique entre :

Le polypeptide qui dépasse du site P et l'acide aminé nouvellement arrivé au site A.

Il s'agit d'une **transpeptidation** ; elle a lieu sans la contribution de plus d'énergie autre que celle contenue dans la liaison ester (aa~tRNA).

A ce stade, le polypeptide se sépare du tRNA auquel il était lié. Il est transféré sur l'acide aminé porté par le nouveau tRNA qui se trouve au site A (Figure 3).

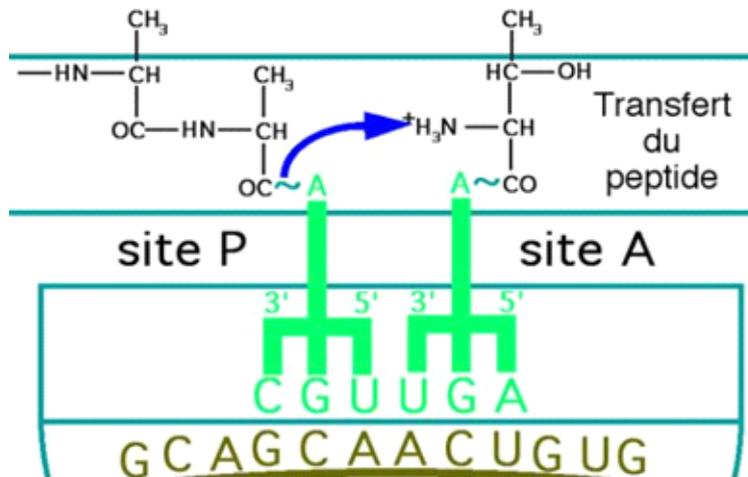


Figure 3 : Formation de la liaison peptidique

- **Translocation**

Un complexe constitué d'« **EF-G** » (**translocase**) et de GTP se lie au ribosome. L'hydrolyse du GTP en GDP est accompagnée de la dissociation et éjection du tRNA localisé au site P du ribosome et le déplacement du tRNA du site A vers le site P du ribosome (tRNA porteur du polypeptide en formation). Au cours de ce déplacement, les liaisons hydrogènes se maintiennent entre l'anticodon du tRNA et le codon du mRNA, ce qui permet aux deux molécules de se déplacer ensemble (Figure 4).

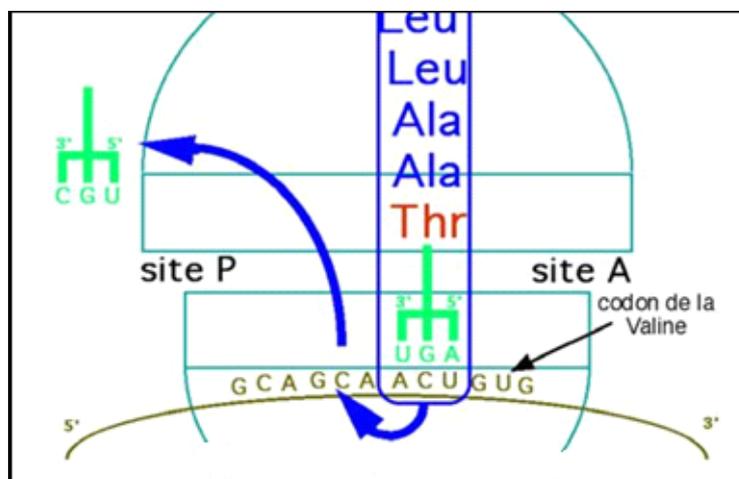


Figure 4 : Translocation des codons

A la suite de ce mouvement, le prochain codon à traduire se retrouve au site A du ribosome. Chaque cycle d'élongation ne dure environ que 60 ms et se répète pour chaque addition d'un nouvel acide aminé jusqu'à la terminaison de la synthèse du polypeptide.

Le GDP et l'EF-G sont libérés à la fin de chaque cycle puis régénérés pour être réutilisés.

- **Terminaison**

La terminaison se fait grâce à 3 facteurs de terminaison : RF1, RF2 et RF3 (RF : Release Factor ou facteur de libération). On a soit :

- L'assemblage **RF1-RF3** dont la structure 3D est proche de celle d'un tRNA. RF1 permet de reconnaître les codons stop UAA et UAG.
- L'assemblage RF2-RF3 dont la structure 3D est proche de celle d'un tRNA. RF2 permet de reconnaître UAA et UGA.

En fait, Il n'existe normalement pas de tRNA qui reconnaît les codons d'arrêt de la traduction. Les facteurs de terminaison poussent la peptidyle transférase à transférer le polypeptide vers une molécule d'eau au lieu de le transférer vers un aminoacyl tRNA. Ainsi, le nouveau peptide est libéré. La dissociation du ribosome requiert ensuite l'intervention de la translocase (EF-G) et du facteur de libération du ribosome. Le dernier tRNA non chargé (au site P), le mRNA et les deux sous unités du ribosome sont libérés.

- **Mécanisme de traduction chez les eucaryotes**

La majorité des différences de la traduction chez les eucaryotes par rapport aux procaryotes est apparue au cours de l'étape d'initiation

3-1 Initiation

L'initiation de la traduction nécessite au moins l'assemblage de 11 facteurs dont plusieurs d'entre eux contiennent plusieurs peptides. Elle peut se diviser en trois étapes majeures soit :

- . La liaison du tRNA initiateur « **tRNA-Met** » à la petite sous unité ribosomale.
- La liaison de cette sous unité à mRNA et la reconnaissance du codon d'initiation,
- .La réunion de la grosse sous unité ribosomale pour la formation d'un ribosome fonctionnel.

Chez les organismes eucaryotes, C'est la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction. La première étape de l'initiation de la traduction représente l'étape limitante. Elle consiste en la liaison du facteur « **eIF4E** » à la coiffe des mRNA. Cette coiffe empêche la dégradation des mRNA et favorise leur transport dans le cytoplasme. La **protéine d'échafaudage** ou **de soutien** « **eIF4G** » se lie à **eIF4E** grâce à sa partie N-terminale. Cet immense facteur permet à d'autres protéines de s'y lier et de former le complexe d'initiation de la traduction.

En effet, lorsque « **eIF4A** », qui sert d'**hélicase** pour défaire les structures secondaires du mRNA, est recruté par **eIF4G** le complexe « **eIF4F** » est alors formé.

Le facteur **eIF3** qui amène la sous unité ribosomale 40S près de la partie 5' des mRNA peut également se lier à **eIF4G**.

D'un autre côté, le facteur **eIF2** se lie au tRNA-Met lorsqu'il est lié à un GTP.

Les autres facteurs, **eIF5**, **eIF1** et **eIF1A**, font également parties du complexe d'initiation de la traduction, et leurs liaisons viennent former et stabiliser la sous unité 40 S.

Ce complexe avance sur le mRNA en hydrolysant de l'ATP à la recherche d'un premier codon AUG.

Le facteur **eIF1** assure la fidélité de la reconnaissance du codon d'initiation tandis que **eIF5** est nécessaire pour l'hydrolyse du GTP du facteur **eIF2**. Cette hydrolyse entraîne la dissociation de plusieurs facteurs de la sous unité 40S. Le tRNA-Met se retrouve ainsi sur le site P du ribosome. Le facteur « **eIF5B** » vient se lier et catalyse la formation du ribosome 80S par l'union des deux sous unités 40S et 60S en hydrolysant un GTP. Il est ensuite relâché et l'élongation peut débuter (Figure 5)

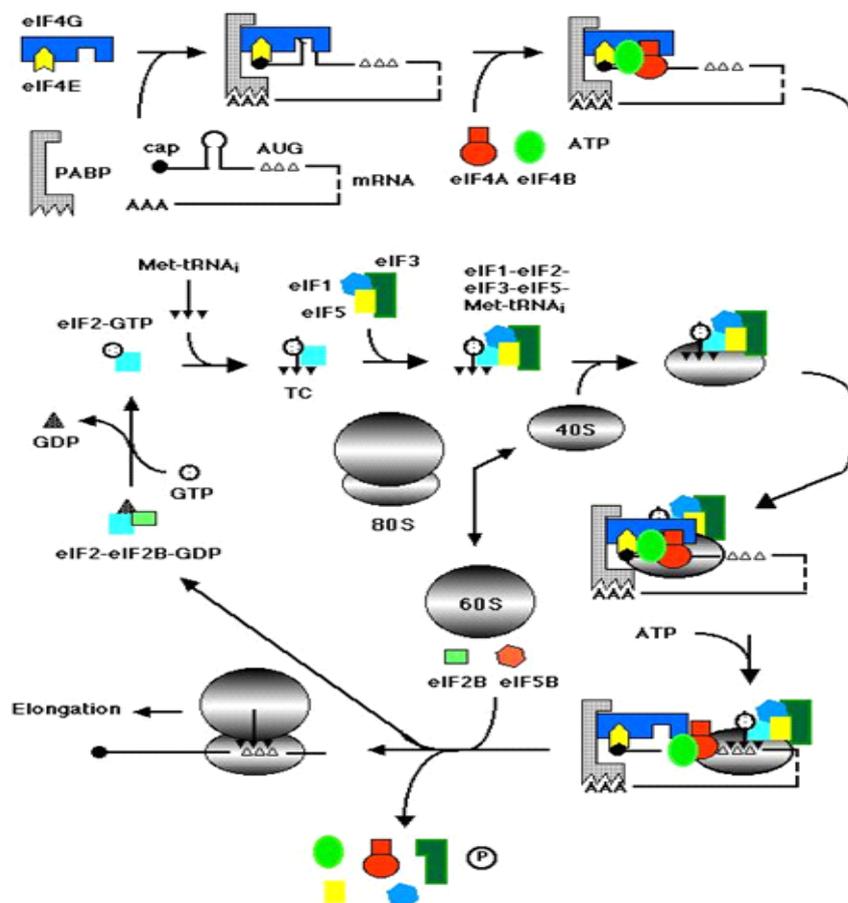


Figure 5 : Initiation de la traduction chez les eucaryotes

3-2 Elongation

Les ribosomes initiés ont leur **site A** vacant (vide). 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 le **site A**, en hydrolysant le **GTP** en **GDP**. Dès que le codon du messenger au site A est apparié 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 (figure 6)

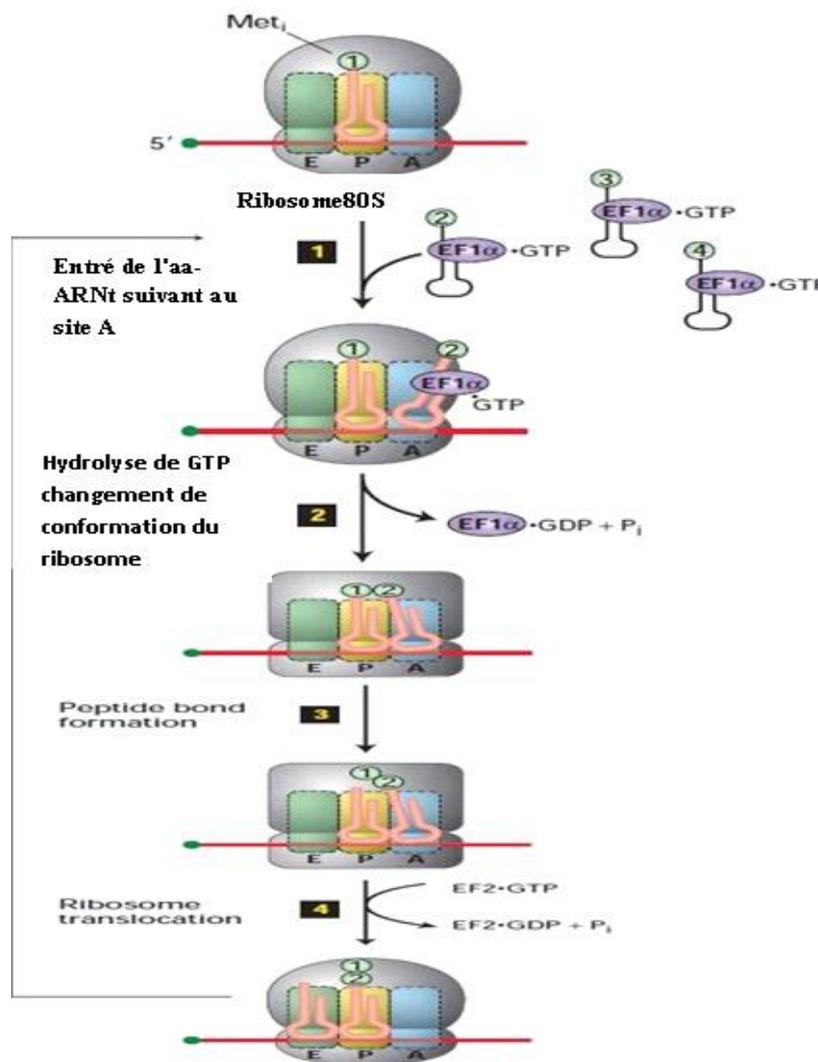


Figure 6 : Élongation de la traduction chez les eucaryotes (Lodish et *al.*, 2003)

3-3 Terminaison

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 (Figure 7)

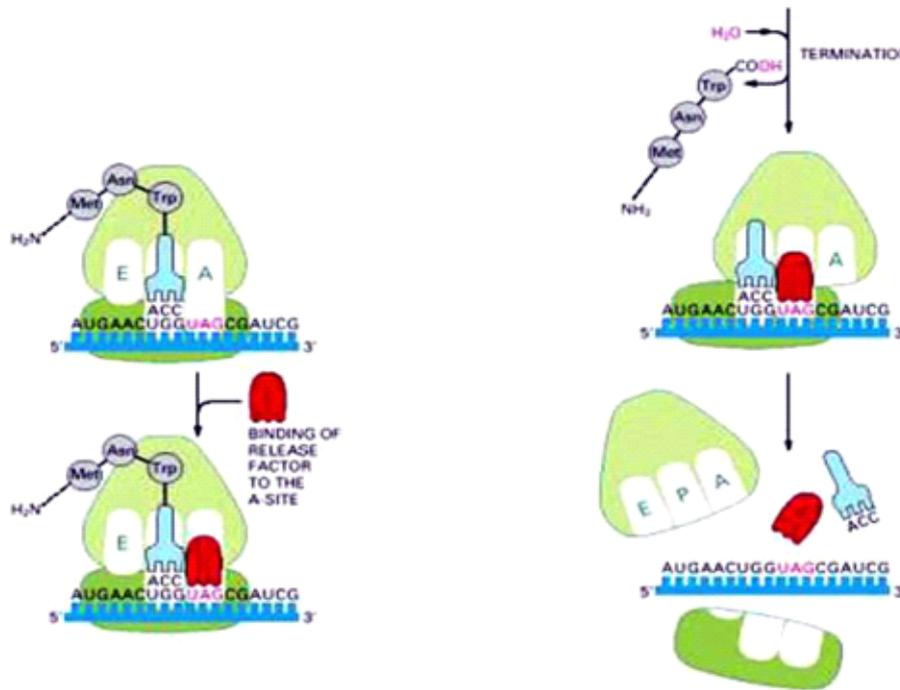


Figure 7 : Terminaison de la traduction

- **Bilan énergétique**

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 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
- Pour l'incorporation de ce tRNA chargé dans le site acide aminé du ribosome, le facteur eEF1B utilise un GTP (se transforme en GDP)
- Pour la translocation du peptidyle tRNA du site acide aminé au site peptidique, le facteur eEF2 utilise encore un GTP (se transforme en GDP).

Chaque acide aminé incorporé dans la protéine coûte à la cellule quatre liaisons riches en énergie (Figure 8)

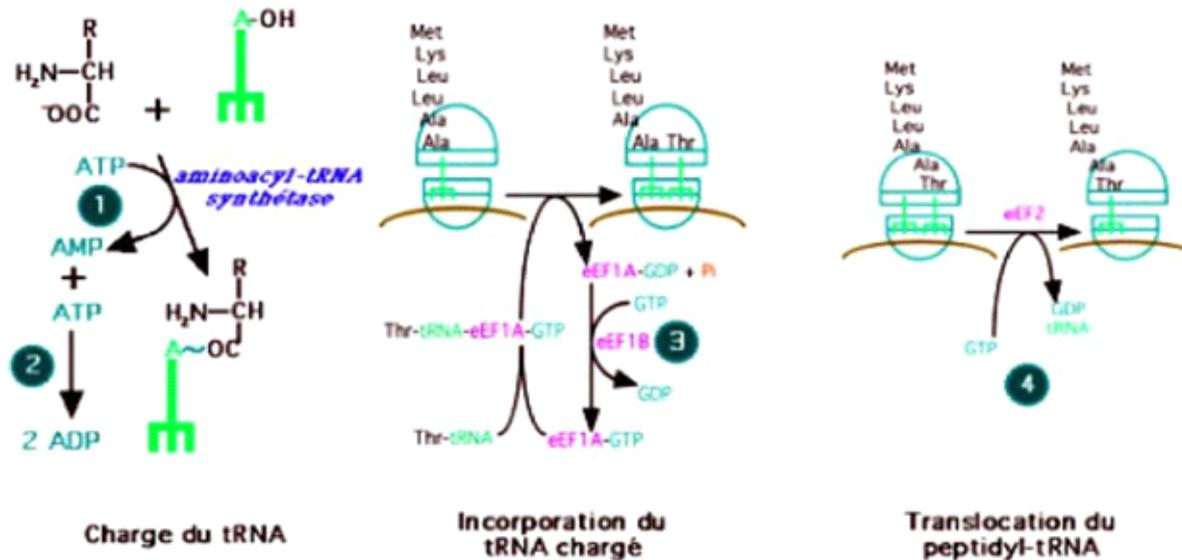


Figure 8 : Bilan énergétique pour l'incorporation d'un seul acide aminé

- **Modification post-traductionnelle**

Les principales modifications post-traductionnelles sont :

- Phosphorylation (Ser, Thr, ou Tyr: important dans la transduction de signaux à travers les membranes.
- L'élimination du formyl-méthionine ou méthionine par une enzyme spécifique (Metaminopeptidase : MAP) se fait chez plus de 50% des protéines des deux types de cellules. Le N-formyl de la première méthionine est enlevé chez E. coli par une deformylase.
- Clivage de chaîne polypeptidique (Ex. L'insuline)
- Glycosylation
- Addition des lipides
- Formation des ponts disulfures ou pont covalents (élastine, collagène).
- Acétylation (\approx 100 protéines cytoplasmique ont un N-terminal acétylé), la réaction est catalysée par N- α - acétyl transférase (exemple: acétylation des histones).
- Hydroxylation (hydroxylation des prolines et lysine)
- Biotinylation: Addition de la biotine [vit B8] (coenzyme de quelques enzymes de carboxylation [transfert de CO₂]).
- Élimination des séquences surnuméraires au niveau protéique, ce processus est appelé l'épissage protéique et le peptide éliminé est nommé intéine

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)

De nombreuses modifications chimiques se produisent après l'incorporation des acides aminés dans la structure primaire de la protéine : on les appelle « modifications post-traductionnelles ».

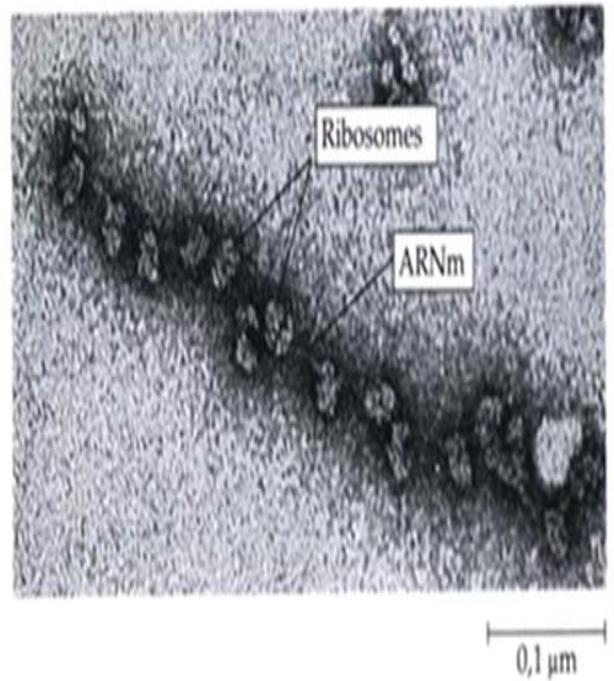
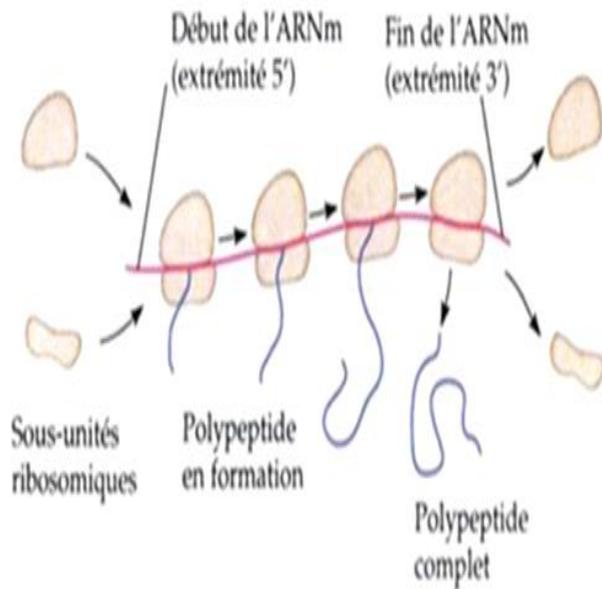
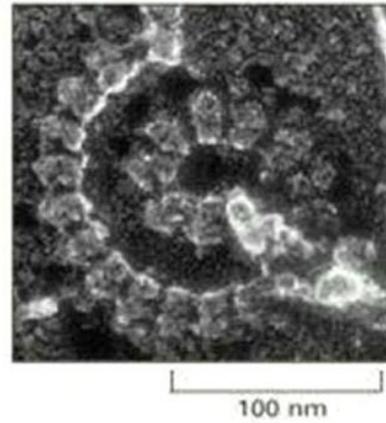
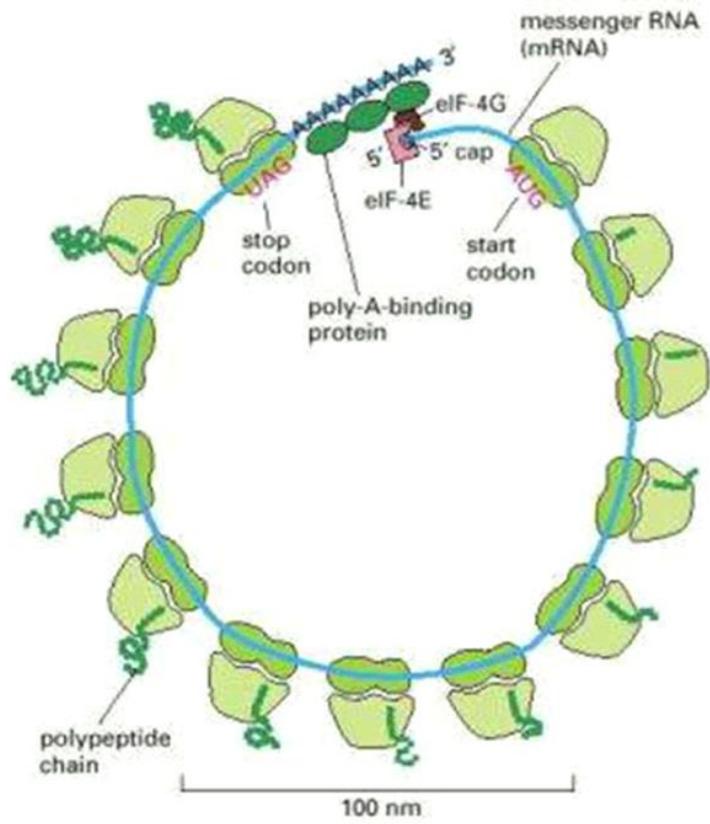
On distingue des modifications « co-traductionnelles » (se produisant alors que la traduction se poursuit et que le peptide naissant est encore attaché au ribosome qui l'a construit) des modifications « post-traductionnelles » proprement dites qui ont lieu dans la cellule, dans les organites ou hors 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

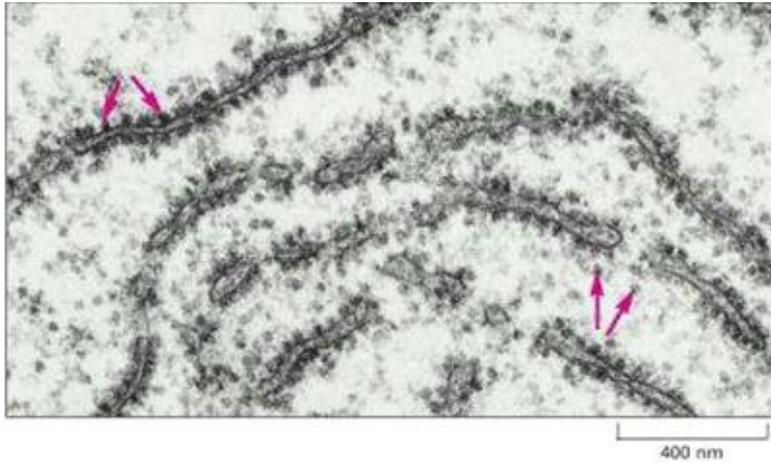
Polyribosome :

Le ribosome maintient les molécules de mRNA et de tRNA l'une près de l'autre à la façon d'un étau, pendant que l'une de ses nombreuses protéines, la « **peptidyle transférase** », catalyse de manière séquentielle et répétitive le transfert d'un acide aminé sur l'extrémité carboxyle de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse.

Lorsqu'un ribosome a commencé la traduction d'une molécule de mRNA et a traduit environ 72 à 81 nucléotides, un second ribosome peut s'assembler au site de fixation du ribosome et entamer un nouveau cycle de traduction du mRNA et ainsi de suite. Les multiples ribosomes se trouvant fixés sur le même mRNA forment une structure appelée « **polysome** » ou « **polyribosome** ».



Chez les eucaryotes, les polysomes peuvent être libres dans le cytoplasme ou, le plus souvent, liés à la membrane du « réticulum endoplasmique rugueux » (RER).



LE CODE GENETIQUE

Ce sont les bases azotées qui constituent la seule partie variable d'un mRNA. Par conséquent, ce sont les bases qui sont impliquées dans le code génétique. Mais il y a seulement 4 bases différentes (A, U, C et G) et il existe 20 acides aminés différents ! Comment 4 bases peuvent-elles donc coder 20 acides aminés ?

La correspondance n'est pas un nucléotide pour un acide aminé puisqu'il n'existe que 4 nucléotides différents pour 20 acides aminés différents ($4^1 = 4 \ll 20$).

Le code génétique repose donc sur une combinaison de nucléotides.

Une combinaison de 2 parmi 4 nucléotides possibles ne peut suffire ($4^2 = 16 \text{ doublets} < 20$).

Une combinaison de 3 parmi 4 nucléotides est plausible puisqu'elle offre $4^3 = 64 \text{ triplets}$ possibles. Ce système peut coder 64 acides aminés, ce qui est cette fois largement suffisant. Cette très belle hypothèse de départ s'est trouvée effectivement confirmée. Un code à 3 lettres, cela veut donc dire que 3 nucléotides (triplet ou « **codon** ») portés sur le mRNA seront traduits pour positionner un acide aminé. On dispose ainsi de 64 codons.

3 codons (UAA, UAG et UGA) sont des « codons non sens » qui ne peuvent pas être traduits en acides aminés. Ces codons sont en fait des signaux de fin de lecture. On les appelle « codons stop ». En fin de compte, il reste 61 codons pour 20 acides aminés. Mis à part la méthionine et le tryptophane, codés par un seul codon, les 18 autres acides aminés sont codés par plusieurs codons : de 2 à 6 (6 codons pour la leucine par exemple).

DECHIFFRAGE DU CODE GENETIQUE

Pour déchiffrer le code génétique, deux techniques très astucieuses ont été utilisées :

La première stratégie a consisté à fabriquer au laboratoire un mRNA très particulier : le « poly U », ne comportant que des nucléotides à uracile. Mis en contact dans système in vitro avec ribosomes, acides aminés et autres facteurs nécessaires à la traduction, le poly U a permis la synthèse d'une chaîne peptidique formée uniquement de phénylalanine. Cela signifiait donc que le codon UUU code la phénylalanine. On peut répéter cette expérience avec le poly A et trouver ainsi que le codon AAA code la lysine etc.

Des polynucléotides mixtes ayant 2 nucléotides différents répétés ont également été utilisés. Le poly AC par exemple (ACACACACACAC&) code ainsi (Thr-His-Thr-His)_n. Ce résultat ne permet cependant pas de savoir si Thr est codée ACA et His par CAC et vice versa. L'expérience a donc été répétée avec un poly AAC. Celui-ci donne 3 sortes de chaînes polypeptidiques selon que la lecture commence en AAC (poly Asn), en ACA (poly Thr) ou CAA (poly Gln). Le seul codon en commun avec l'expérience précédente est ACA et le seul acide aminé en commun dans les polypeptides obtenus est Thr. On en déduit donc que ACA code Thr (et CAC code His).

La deuxième stratégie utilise différents « aminoacyl tRNA » (aa~tRNA), des ribosomes et des trinucleotides synthétiques différents dans chaque expérience. Les trinucleotides peuvent s'attacher au ribosome et se fixer au aa~tRNA correspondant dans le mélange. L'ensemble est filtré sur une membrane de nitrocellulose. Les aa~tRNA libres passent à travers le filtre. Celui qui a été retenu sur le filtre correspond donc au trinucleotide utilisé dans l'expérience.

CARACTERISTIQUES DU CODE GENETIQUE :

1-UNIVERSALITE DU CODE GENETIQUE

Le code génétique est **presque** ou **quasi-universel**. Il fait partie du bagage d'organismes aussi différents que les virus, les bactéries, les végétaux et les animaux. La traduction du codon CCG par exemple donne la proline pour tous les organismes dont on a examiné le code génétique.

Dans les expériences en laboratoire, les gènes peuvent être transcrits et traduits après leur transplantation d'une espèce à une autre. Par exemple, un gène humain introduit dans les bactéries permet la programmation de ces dernières afin qu'elles synthétisent de l'insuline (protéine utilisée pour le traitement du diabète).

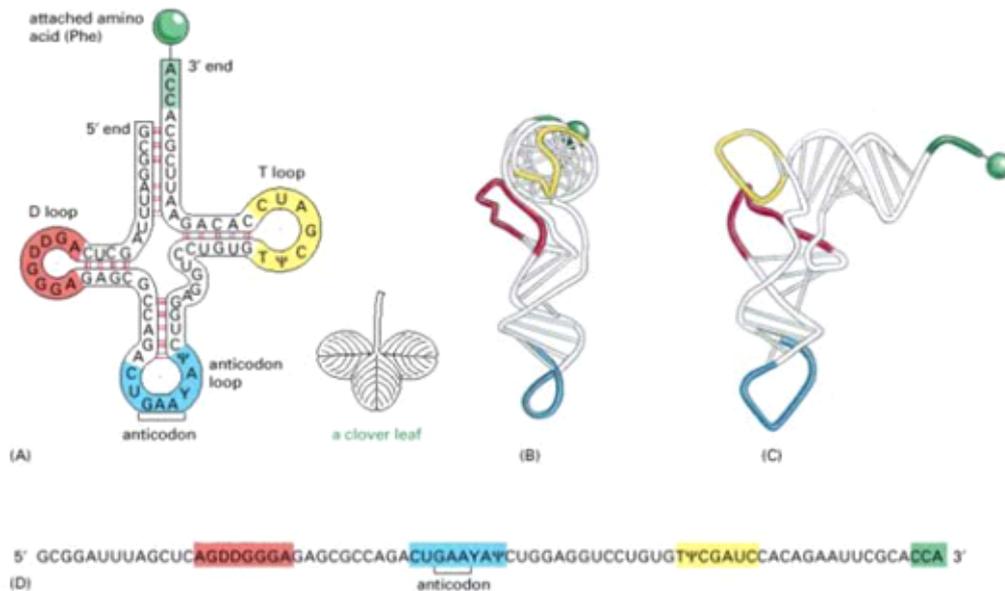
Cependant, il faut garder en esprit que l'universalité du code génétique comporte quelques exceptions. Depuis [1980], Sanger (2 fois Prix Nobel 1958 et 1980) et son équipe ont remis en question cette notion d'universalité du code génétique. Leurs résultats ont été obtenus avec du **DNA mitochondrial humain** : (AUA code Met au lieu de Ile, UGA code trp au lieu de stop et les codons AGA et AGG codent un stop au lieu d'arginine).

Depuis, d'autres différences portant sur d'autres codons provenant de mitochondrie de levure, typanosome...etc ont été mise en évidence.

On a même trouvé une exception ne se rapportant pas cette fois aux mitochondries. Le codon UAA du mRNA cytoplasmique de paramécie (protozoaire) code le Gln au lieu de stop.

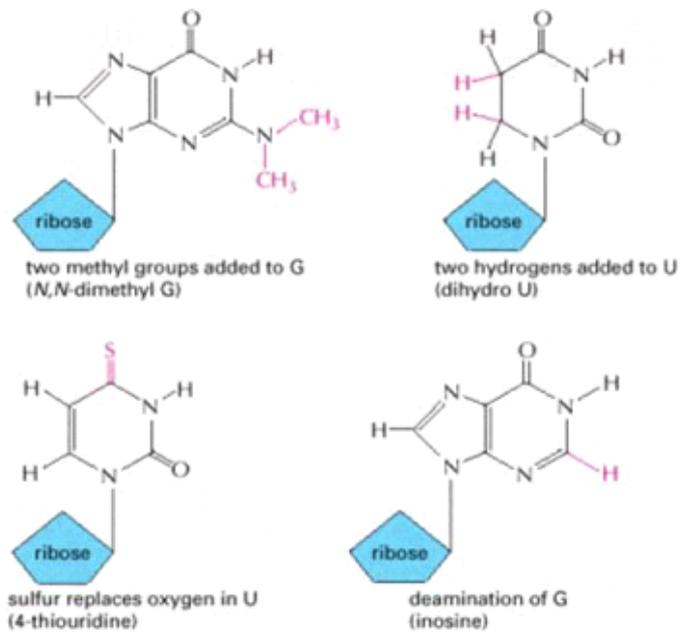
PROPRIETES DES tRNA ET NOTION DU WOBBLE

Les molécules de « **RNA de transfert** » (**tRNA**), comme toutes les autres sortes de RNA, résultent d'une transcription enzymatique à partir de matrice de DNA situées sur le génome procaryote ou eucaryote (nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique) : « **gènes tRNA** ». Chaque tRNA peut servir un grand nombre de fois. Il prélève l'acide aminé correspondant dans le cytoplasme, dépose sa cargaison au niveau du ribosome, puis quitte celui-ci afin d'aller chercher une autre cargaison. La structure du tRNA supporte bien la fonction de **navette** qu'il doit assurer pour un acide aminé spécifique.



RAPPELS : Une molécule de tRNA se compose d'un seul brin de RNA d'une longueur d'environ 80 nucléotides. Ce brin se replie sur lui-même pour former une molécule pourvue d'une structure secondaire en feuille de trèfle. La molécule de tRNA possède en effet une structure trilobée.

Cette structure est elle-même tordue et pliée et adopte une conformation tridimensionnelle très compacte vaguement semblable à un « L » inversé. La boucle qui dépasse à une extrémité du L comprend « l'anticodon ». L'extrémité 3' dépasse à l'autre extrémité du L et représente le « site de liaison de l'acide aminé ». Cette extrémité se termine toujours par les trois nucléotides CCA : on l'appelle également « extrémité CCA ».



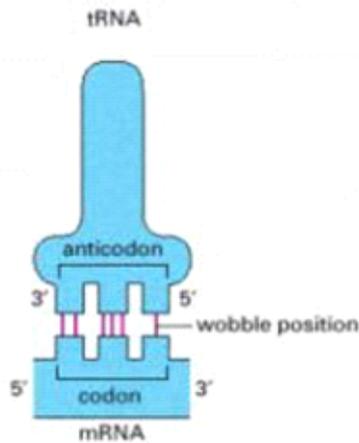
Les tRNA contiennent des **nucléotides atypiques**, inhabituels par la nature de leur base azotée. On trouve par exemple de la thymine, ainsi que d'autres bases azotées méthylées. En particulier, on trouve de « **l-hypoxanthine** » comme base azotée dont le nucléotide est « **IMP** ».

L'ensemble de ces bases atypiques n'est d'ailleurs pas incorporé tel quel au moment de la synthèse des tRNA. Ces bases sont formées par modification « **post transcriptionnelle** » d'une des 4 bases régulières (A, U, C ou G). Ainsi, IMP et TMP sont obtenus respectivement par désamination d'un AMP et méthylation d'un UMP.

Si chaque codon du code génétique correspond à un tRNA différent, on aurait trouvé 61 tRNA distincts pour assurer le mécanisme de la traduction dans les cellules. En fait, selon les cas, il n'en existe que 22 à 46 environ. Ce nombre suffit parce que les anticodons de certains tRNA peuvent reconnaître deux anticodons différents ou plus.

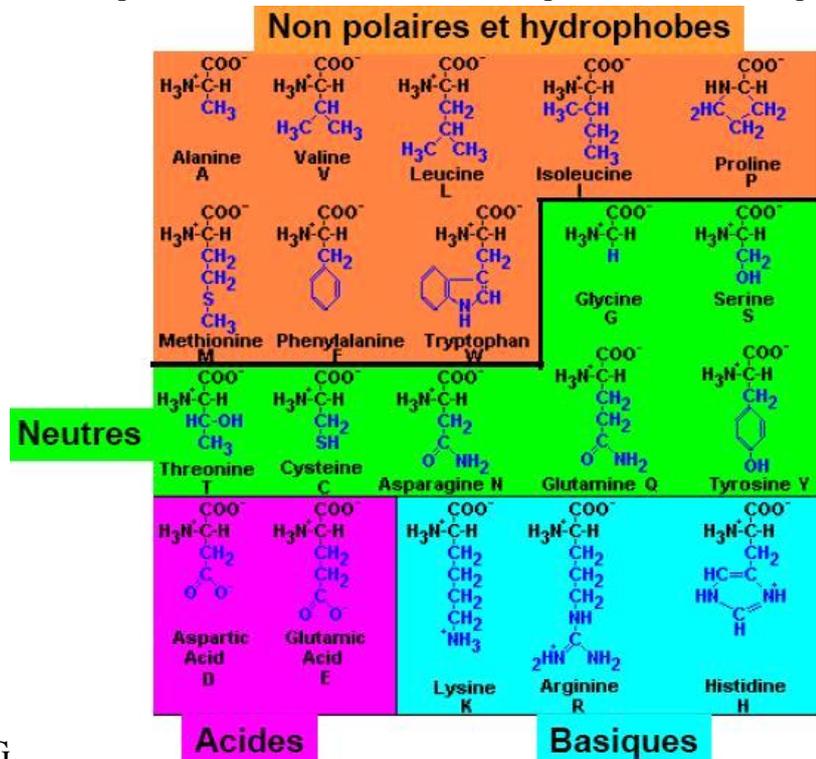
Cette souplesse est possible parce que les règles de l'appariement entre la troisième base d'un codon et la base correspondante de l'anticodon (**position d'oscillation de l'anticodon** : 1ère base de l'anticodon) ne sont pas très strictes (contrairement à ce que ce passe entre les bases du DNA et du mRNA).

Ce relâchement des règles d'appariement des bases est appelé « **wobble** » (mot en anglais qui signifie _avoir du jeu_ **oscillation** ou base **fluctuante** en français)



DANS LES MITOCHONDRIES DES MAMMIFERES: WOBBLE DE TYPE U/N

Ce type de wobble, décrit par Sanger et *al.* [1980], ne se rencontre que dans les mitochondries. Le nucléotide U en position wobble sur l'anticodon peut reconnaître laquelle



des quatre bases (A, U, C, G

Dans ce cas, lors de la synthèse des protéines effectuées dans les mitochondries, il suffit :

- D'un seul tRNA pour reconnaître les codons d'une boîte à 4, soit 8 tRNA (Leu, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Arg et Gly).
- D'un seul tRNA pour reconnaître les codons d'une boîte à 2 supérieure soit tRNA (Phe, Ile, Tyr, His, Asn, Cys et Ser).
- D'un seul tRNA pour reconnaître les codons d'une boîte à 2 inférieure, soit 6 tRNA (Leu, Met, Gln, Lys, Glu et Trp).

Remarque : un seul tRNA est requis pour Met qu'il s'agisse de la **Met initiale** ou de la **Met interne**). Ceci n'est pas le cas pour la synthèse des protéines au niveau du cytoplasme.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

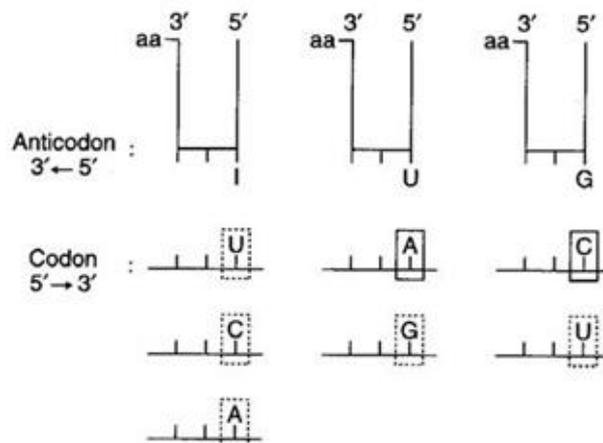
On dénombre donc **au total** seulement **22 tRNA** pour la synthèse des protéines dans les **mitochondries des mammifères**.

DANS LE CYTOPLASME : Wobble de type I/UC, U/G et G/U

Ce type de wobble, suggéré par Crick [1966], réduit à 32 le nombre de tRNA nécessaires pour la synthèse des protéines au niveau du compartiment cytoplasmique.

La première base d'un anticodon détermine si un même tRNA est susceptible de reconnaître 1, 2 ou 3 codons différents :

- Lorsque (I) est situé en position wobble sur l'anticodon, il peut s'apparier aussi bien à (U), à (C) qu'à (A) [appariements wobbles]
- Lorsque (U) occupe la position wobble sur l'anticodon, (U) peut s'apparier aussi bien à (A) [appariement classique] qu'à (G) [appariement wobble].
- Lorsque (G) occupe la position wobble sur l'anticodon, (G) peut s'apparier aussi bien à (C) [appariement classique] qu'à (U) [appariement wobble].



Vérifions selon ces règles le nombre de tRNA minimum pour reconnaître les 61 codons figurant sur le code génétique universel :

1) 1 tRNA pour chaque boîte à 2 supérieure : cas de Phe, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Ser, soit 7 tRNA;

2) 1 tRNA pour chaque boîte à 2 inférieure : cas de Leu, Gln, Lys, Glu et Arg, soit 5 tRNA;

3) 2 tRNA pour chaque boîte à 4.

Un premier tRNA aura I en position wobble et reconnaîtra les 3 codons supérieurs

Un deuxième tRNA avec C en position wobble sera nécessaire pour reconnaître le codon inférieur (liaison classique C-G) : cas de Leu, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Arg et Gly. Soit $2 \times 8 = 16$ tRNA

4) 1 tRNA pour chaque boîte à 3 supérieure : cas de Ile, soit 1 tRNA

5) 1 tRNA pour chaque boîte à 1 inférieure (liaison classique C-G) : cas de Met et Trp, soit 2 tRNA. En fait, il faut 2 (et non 1) tRNA pour reconnaître Met (l'un pour les Met à incorporer en cours de chaîne, l'autre pour la Met initiale qui démarre toute nouvelle chaîne peptidique). Ces 2 tRNA auront le même anticodon AUG mais différeront par ailleurs.

Soit donc un total de :

32 tRNA différents.

Remarque

D'autres types de wobble existent (chez la levure, les bactéries). En fonction du type de wobble qui régit les appariements entre anticodons et codons respectifs, nous retiendrons qu'il faut un minimum de 22 tRNA (mitochondrie de mammifères), de 32 tRNA (cytoplasme de mammifères), 46 tRNA chez certaines levures etc. Le nombre de tRNA nécessaire pour véhiculer les 20 acides aminés sera compris entre 22 et 61.