

Plan du cours de Biologie Moléculaire

I. Initiation aux techniques usuelles de biologie moléculaire

II. Le Dogme Central

Introduction

II.1 La réplication

II.2 La transcription

II.3 La traduction

II.4 Régulation génétique chez les bactéries

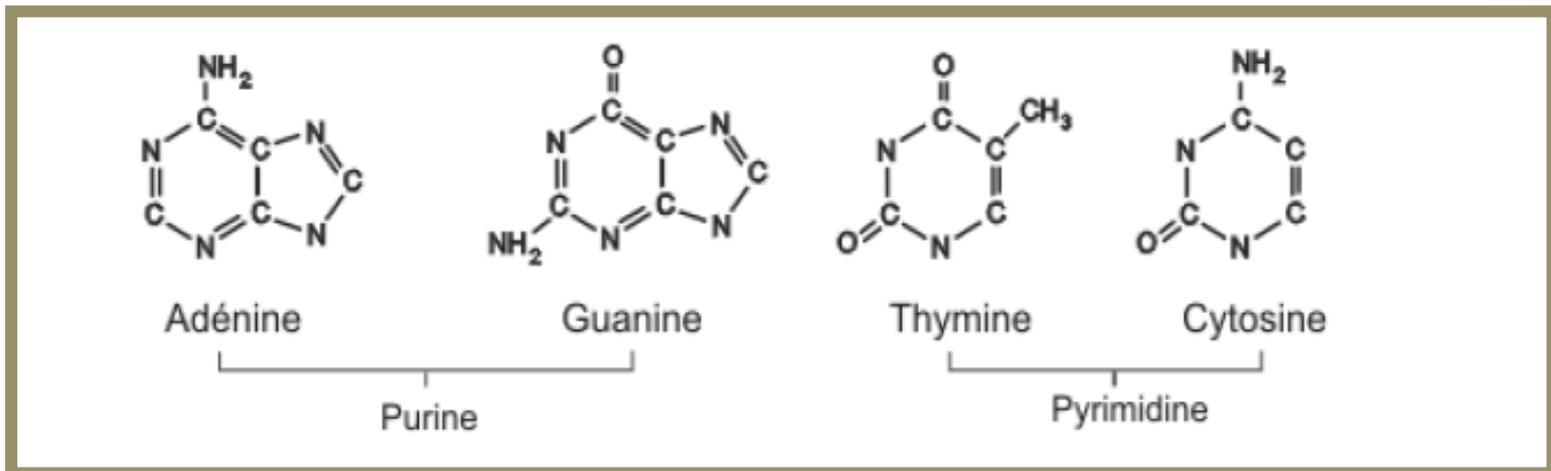
INTRODUCTION

Support de l'information génétique et Macromolécules

Génome: ensemble de gènes

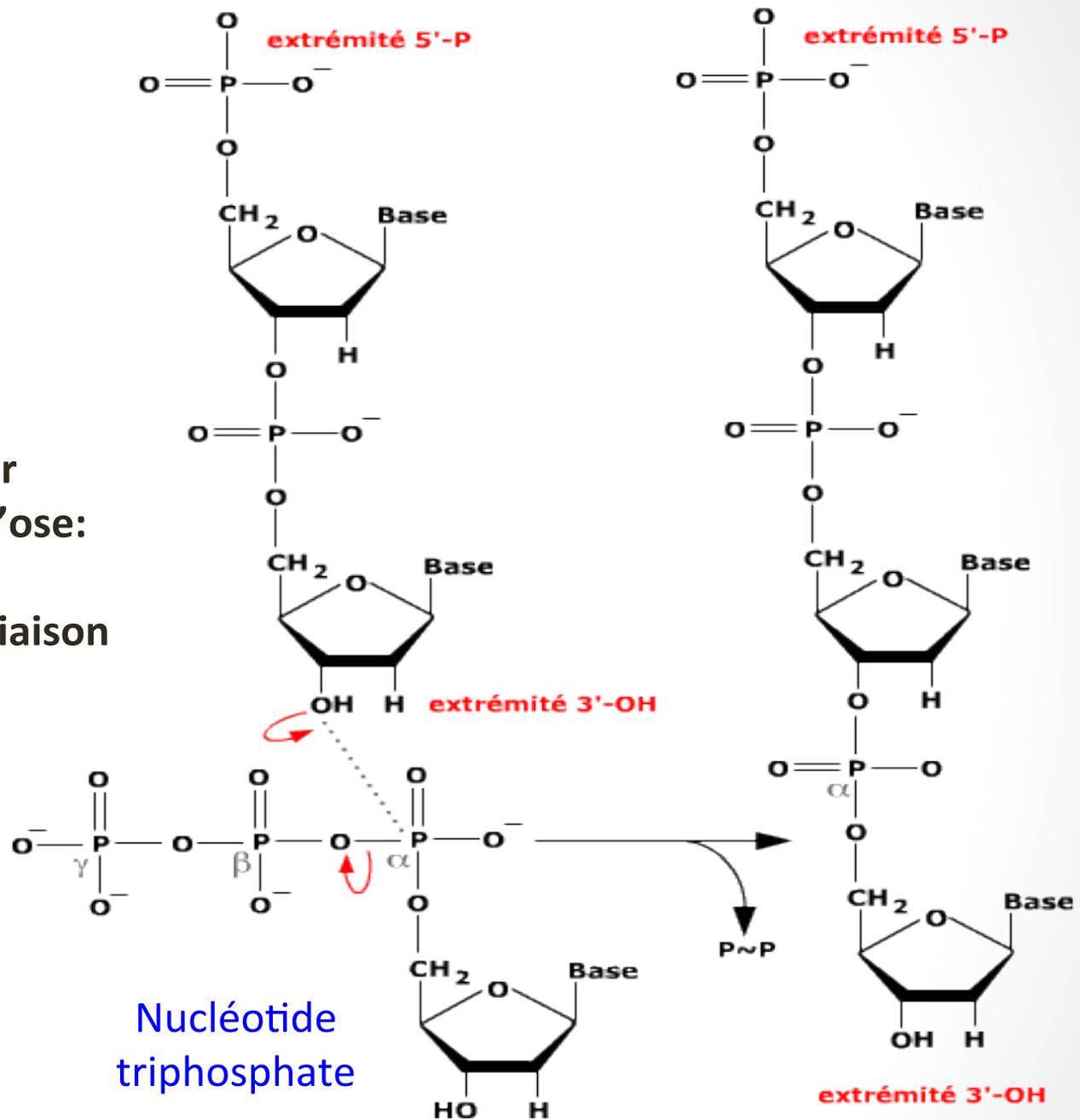
Gène: unité fonctionnelle de l'information génétique.

Composition: acides désoxyribonucléiques (ADN), séquences composés de bases puriques (Adénine, Guanine) et pyrimidiques (Thymine, Cytosine), d'oses et d'un groupement phosphate



Elongation se fait par l'extrémité 3'OH de l'ose:

- Formation de la liaison phosphodiester
- Elimination d'un pyrophosphate



Comment le matériel génétique se transmet de façon exacte d'une génération à une autre ?

Le dogme central

Réplication

Transcription

Traduction

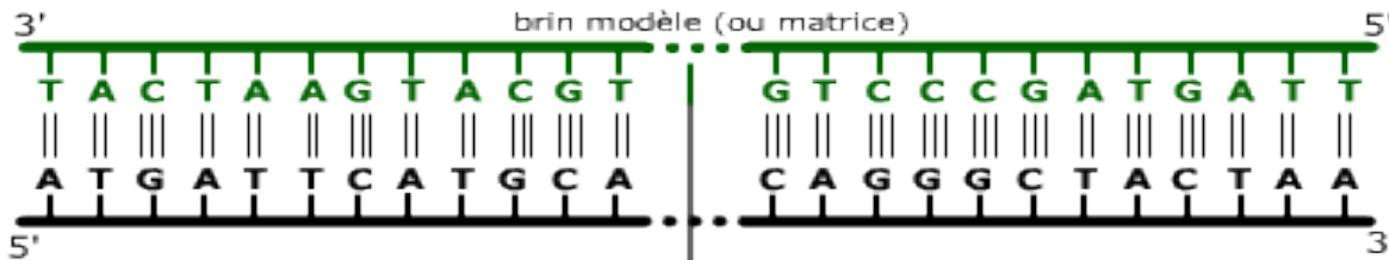


Matrice ADN
ADN polymérase III
Protéines de
réplication
dNTP
ATP
Mg²⁺

Matrice ADN (brin sens)
ARN polymérase
Facteurs de transcription
NTP
Mg²⁺

Matrice ARNm
Ribosomes
Facteurs de traduction
Acides aminés
ARNt
Synthases
ATP, GTP, Mg²⁺

Flux de l'information génétique unidirectionnel



**ADN
double
brin**

Transcription

(complémentarité des bases)

ARN messenger

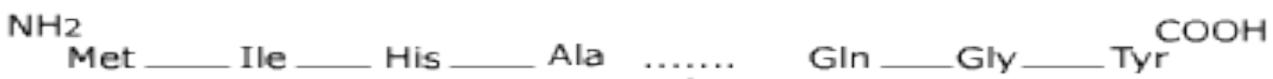


ARNm

Traduction

(code génétique)

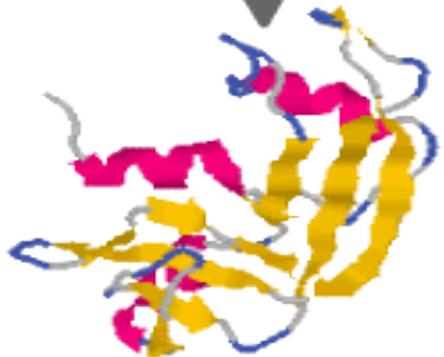
Protéine



**20 aa
possibles**

Repliement

(code physico-chimique)



**Synthèse des 3 types de
macromolécules
informationnelles**

Plan du cours de Biologie Moléculaire

I. Initiation aux techniques usuelles de biologie moléculaire

II. Le Dogme Central

Introduction

II.1 La réplication

II.2 La transcription

II.3 La traduction

II.4 Régulation génétique chez les bactéries

II.1 Réplication

A- Généralités

B- Réplication continue et réplication discontinue

C- Réplication chez les procaryotes

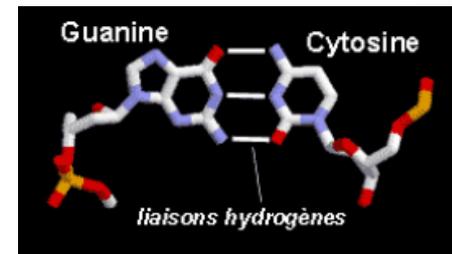
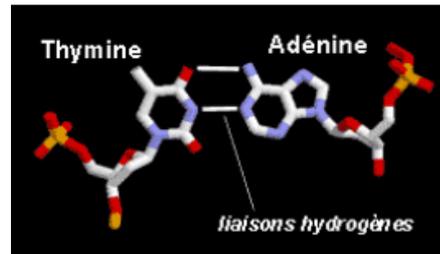
D- Fidélité de la réplication : PROOFREADING

E- Réplication et la division cellulaire

F- Réplication chez les Eucaryotes

A- Généralités

- Synthèse de plusieurs molécules d'ADN à partir d'une molécule parentale initiale afin de transmettre à la descendance une information génétique conforme.
- Respect des règles d'appariement:



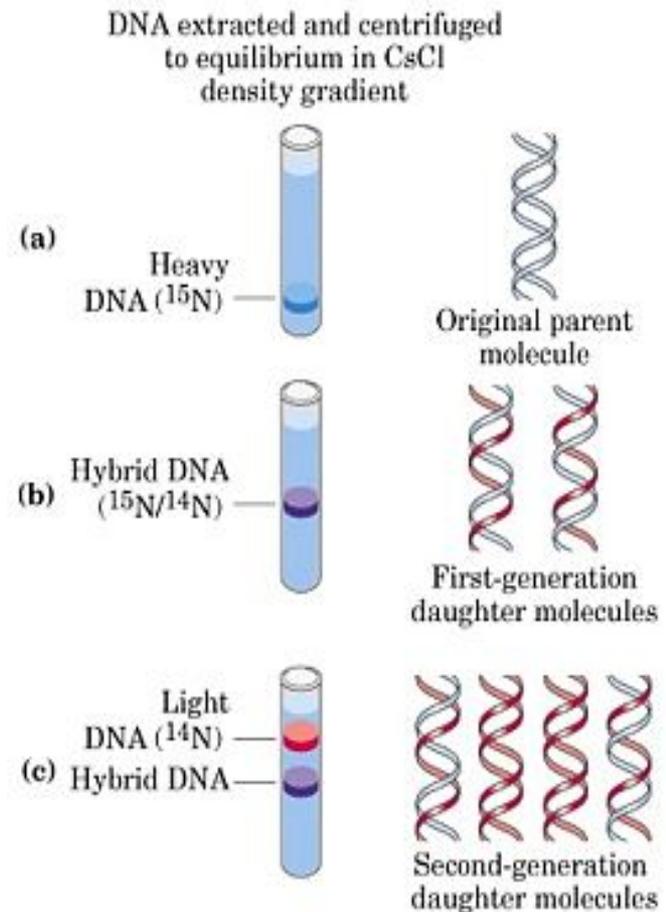
- Réplication est semi-conservative (l'original est conservée)
>>>> mécanisme très précis.

Première répllication

les molécules "lourdes" distribuées de façon égale entre les deux molécules filles

Deuxième répllication

l'apparition de molécules de deux poids différents



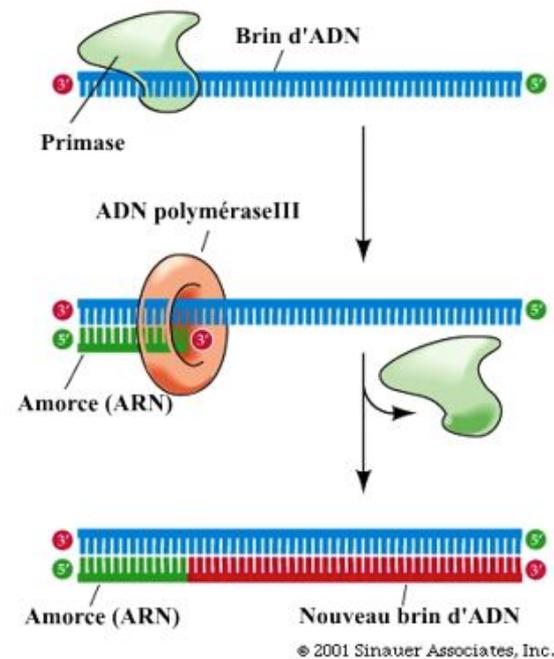
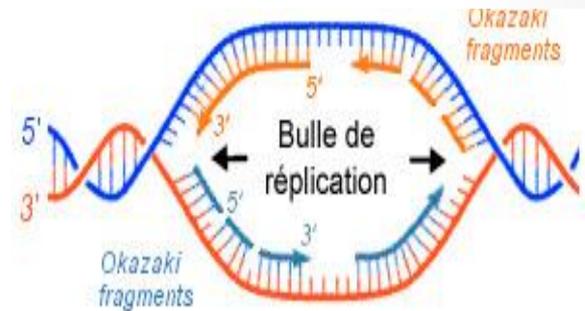
Expérience de Meselson-Stahl
avec *E. Coli*

Répllication semi-conservative

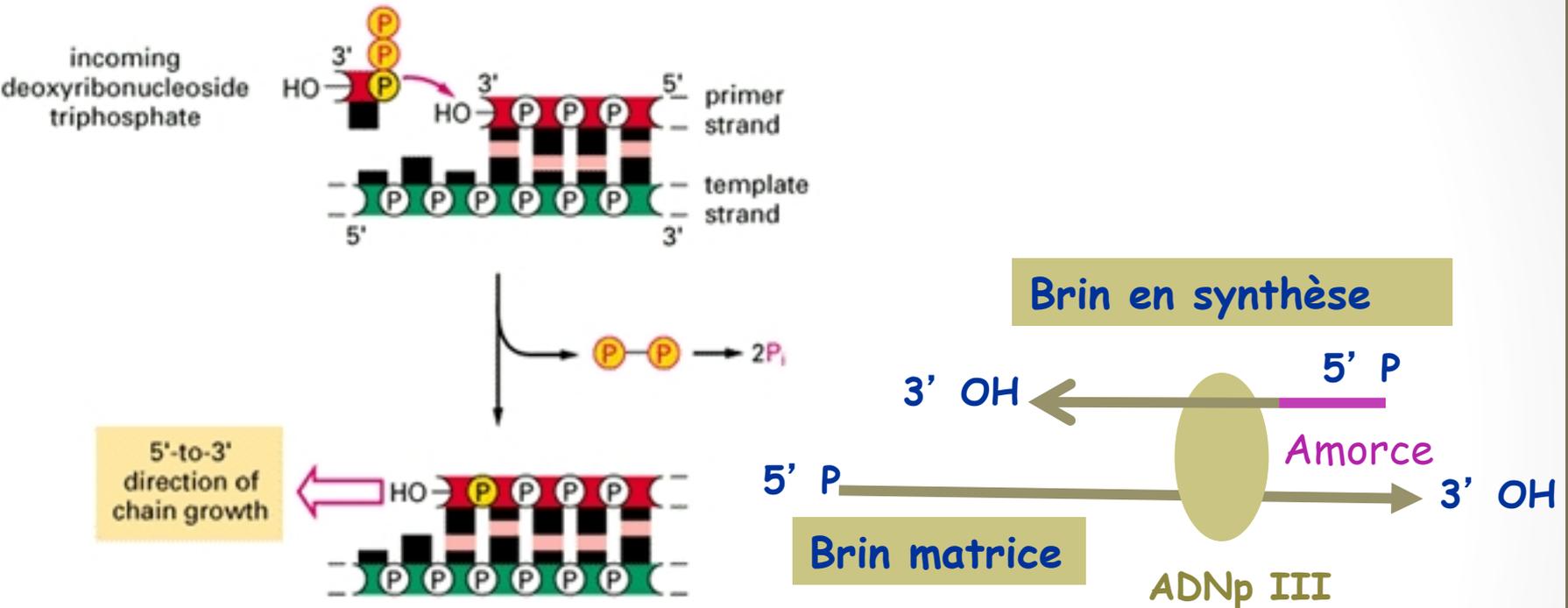
la molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complétée par une chaîne nouvellement synthétisée.

Mécanisme de la réplication

- La réplication commence aux origines de réplication (ORI) puis s'étend sous la forme de bulles de réplication.
- L'antiparallélisme des deux brins impose une réplication semi-discontinue.
- Plusieurs enzymes sont nécessaires pour la réplication (hélicase, primase, ADNp...)



L'ADN polymérase établit au fur et à mesure les liaisons covalentes entre nucléotides dans le sens 5' vers 3'.



Réaction asymétrique
uniquement dans le sens 5'P--->3'OH

Asymétrie est liée à l'activité de l'ADN polymérase:

- nécessité d'avoir une **amorce (fragment ARN)**
- dernier résidus de l'amorce doit être apparié et avoir un groupement 3' OH libre
- Présence de nucléotides et du magnésium Mg^{2+} dans le milieu

ADNpIII utilise comme amorce un **petit ARN** de 500 nucléotides synthétisé par une **primase**.

* *In vivo*, l'amorce est dégradée plus tard et remplacée par l'ADN grâce à l'enzyme appelée **ADNpI**.

Vitesse de réplication de l'ADN

- Réplication est une réaction rapide:

- **Bactéries: 1000 pb/sec/fourche,**

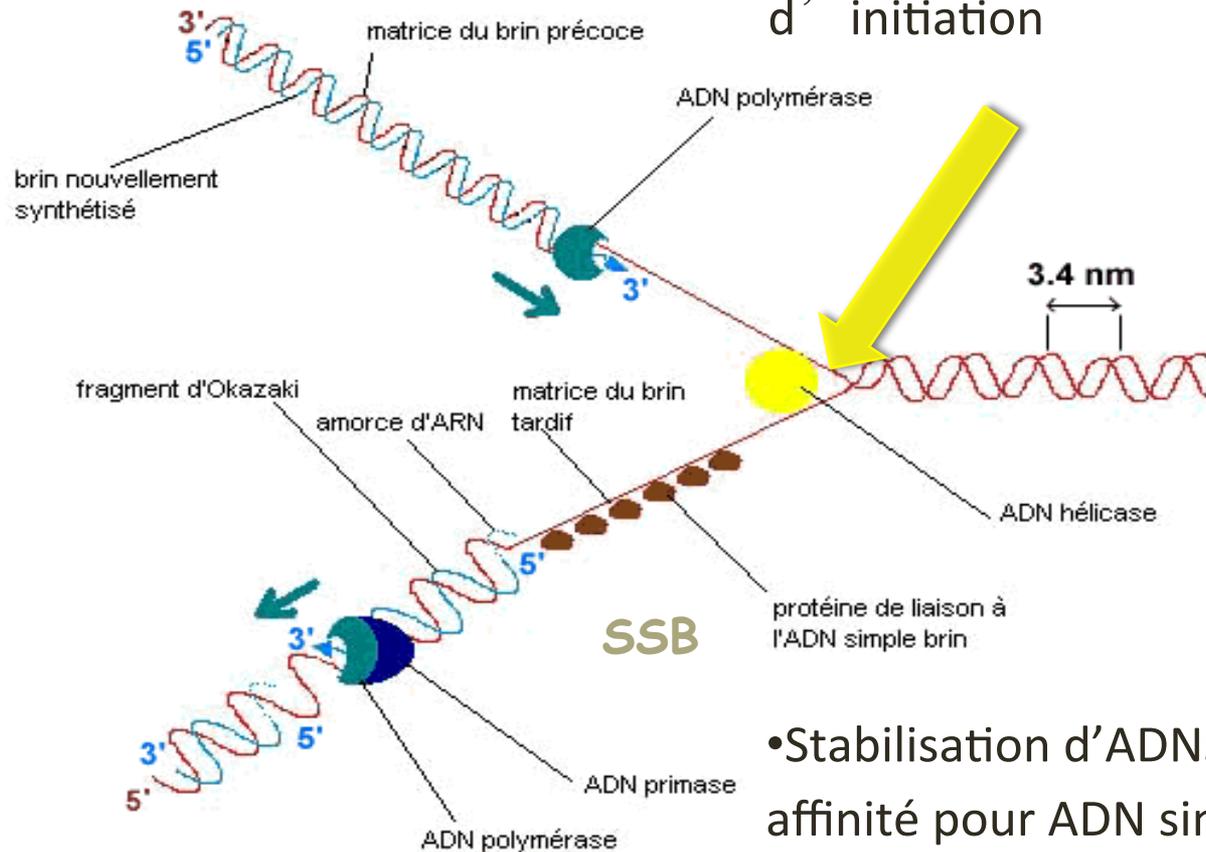
Chromosome *E. Coli* fait $4,4 \cdot 10^6$ pb et réplique en 42 min
d'où nécessité de 2 fourches

- **Cellules humaines: 100 pb/sec,**

Le génome humain fait $3 \cdot 10^9$ pb , réplique en 8 heures, il
faut au moins 1000 fourches de réplication

B- Réplication continue et discontinue

Brin précoce
synthèse continue



Brin tardif
synthèse discontinue

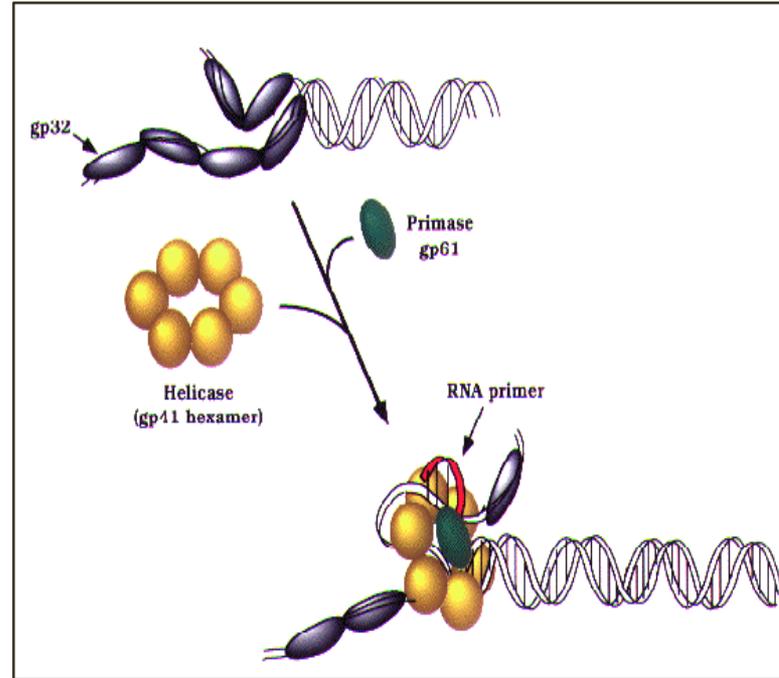
- Déroulement de la double hélice par une **Hélicase** qui se fixe sur la protéine d'initiation

3 étapes:

- initiation,
- élongation
- terminaison

- Stabilisation d'ADNs par des protéines à affinité pour ADN simple brin (**SSB: *Single Strand Binding protein***) empêchant le réappariement

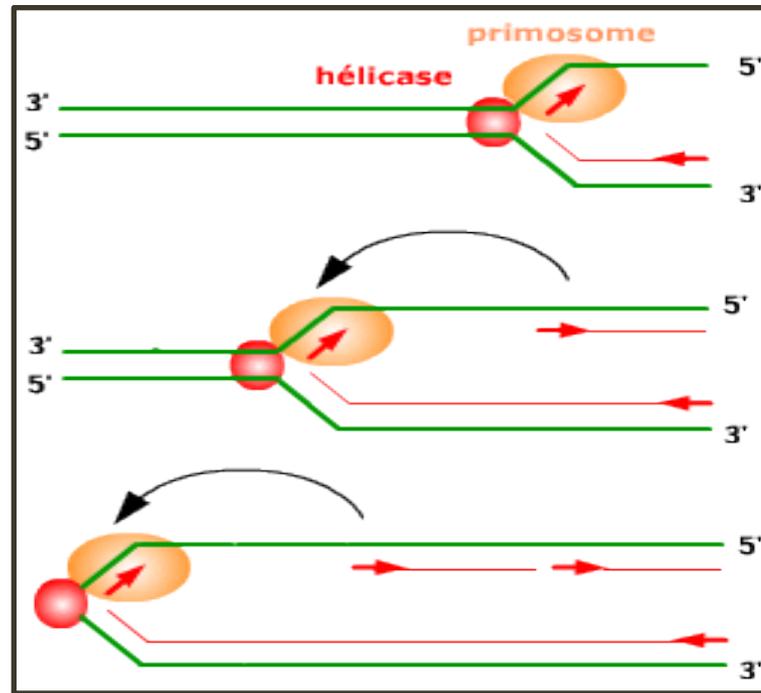
Assemblage d'un primosome



Réplisome contient:

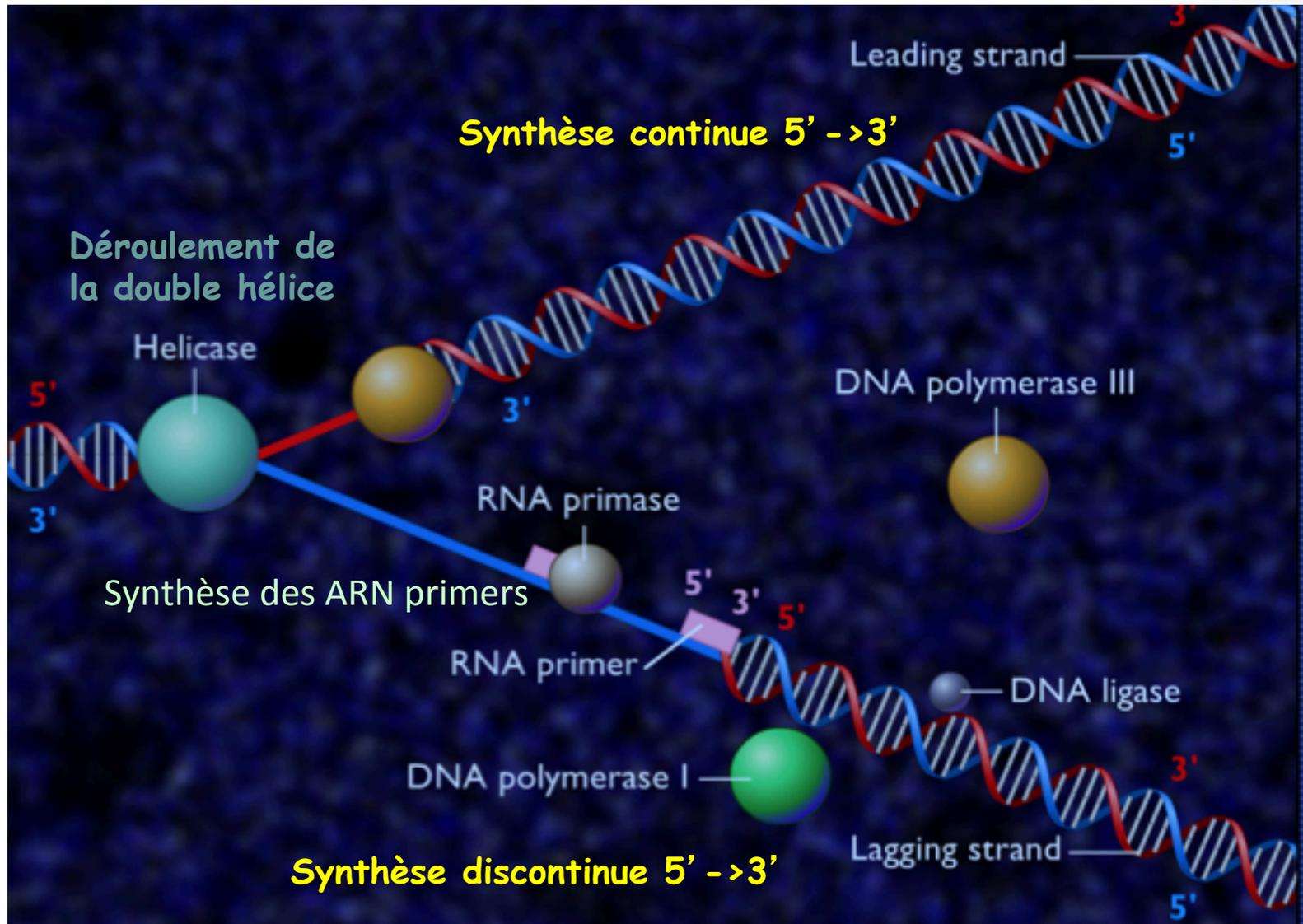
- **Primosome = hélicase + primase** déroulent et amorcent l'ADN par synthèse d'amorce ARN
- **ADN gyrase** supprime les super-enroulements

Déplacement du primosome



Déplacement du primosome se fait par une succession de glissements et de pauses sur le brin servant de modèle à la synthèse discontinue, dans le sens 5'->3' en suivant la progression de l'hélicase.

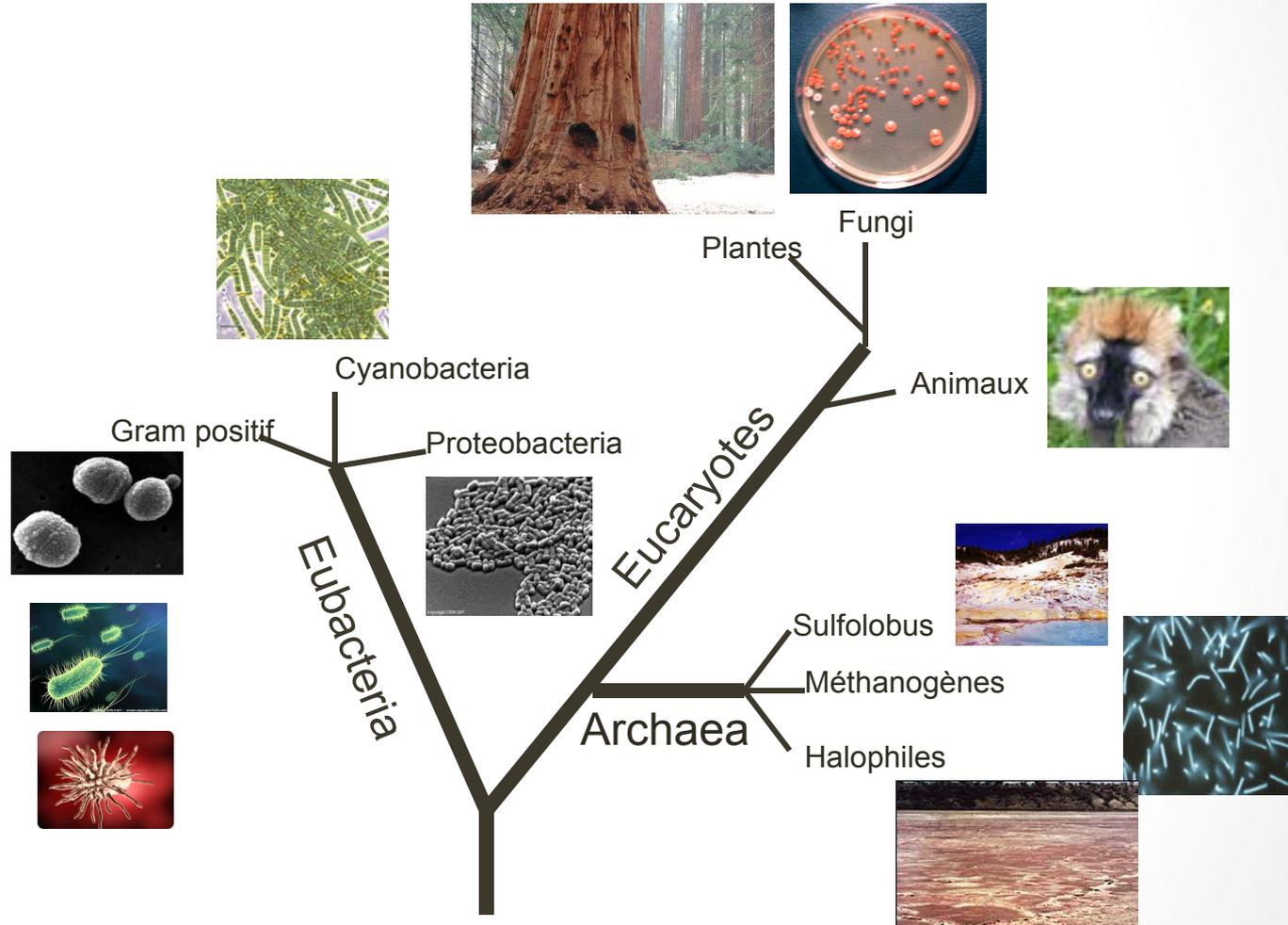
www.youtube.com/watch?v=e4VbuNe0QRQ



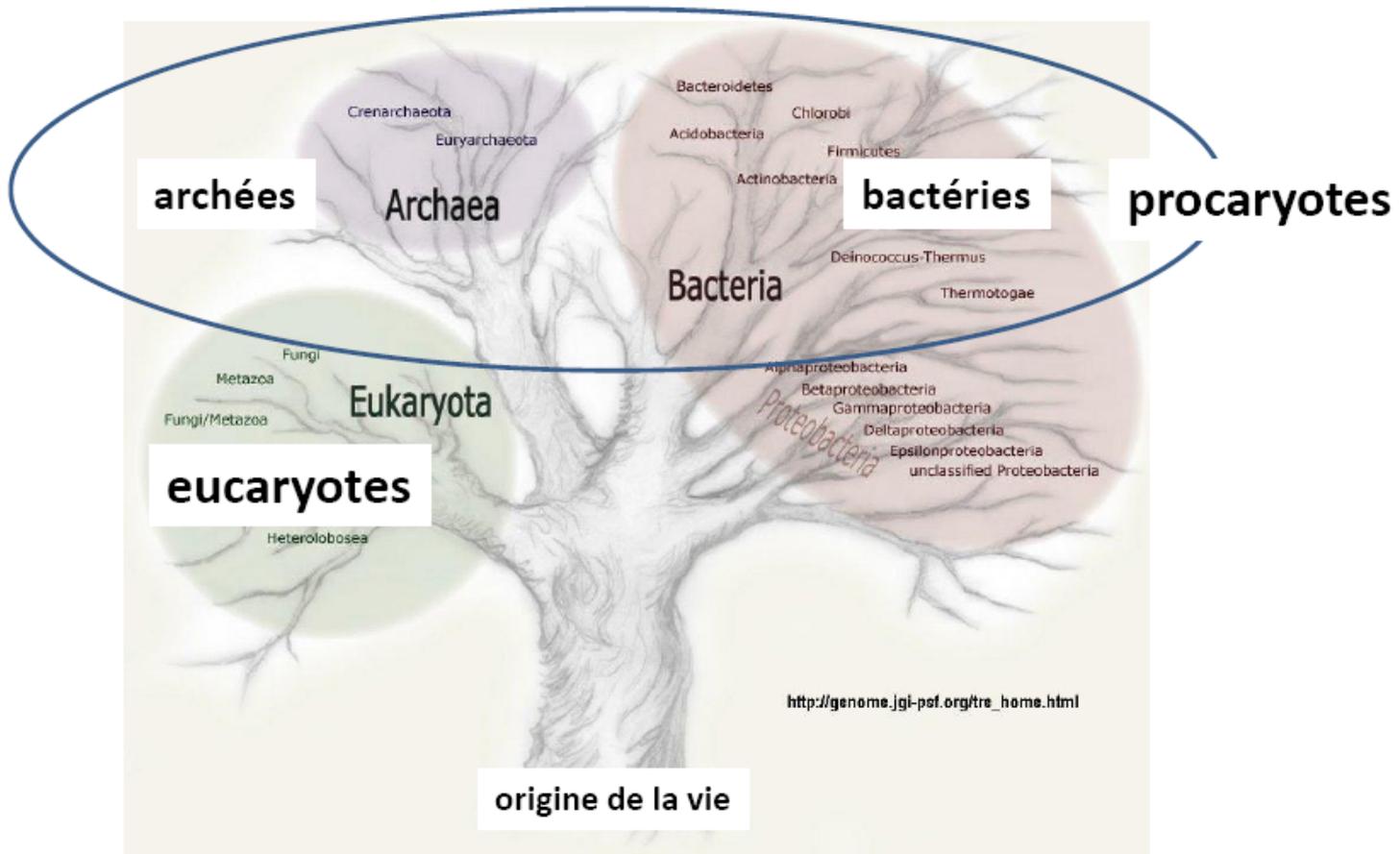
www.youtube.com/watch?v=oebogqrX5F4

C- Réplication chez les procaryotes:

Rappel des domaines du vivant



Trois domaines du vivant avec 2 grands groupes



Procaryotes ou Bactéries

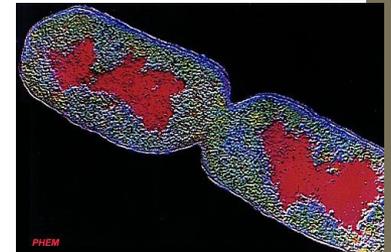
Deux grands groupes, les eubactéries et les archaebactéries avec des fonctionnements différents au niveau moléculaire mais une organisation similaire

➤ Structure

- ❖ Petite taille généralement (avec des exceptions)
- ❖ Leur structure est très simple, le plus souvent sans cytosquelette ni réseau de membrane interne
- ❖ Présence d'une **paroi** complexe
- ❖ Dans le cytoplasme, il y a présence des ribosomes et d'une masse "plus claire", le **nucléoïde** qui contient l'ADN sous forme d'un ou quelques chromosomes (svt circulaire)

➤ Division binaire:

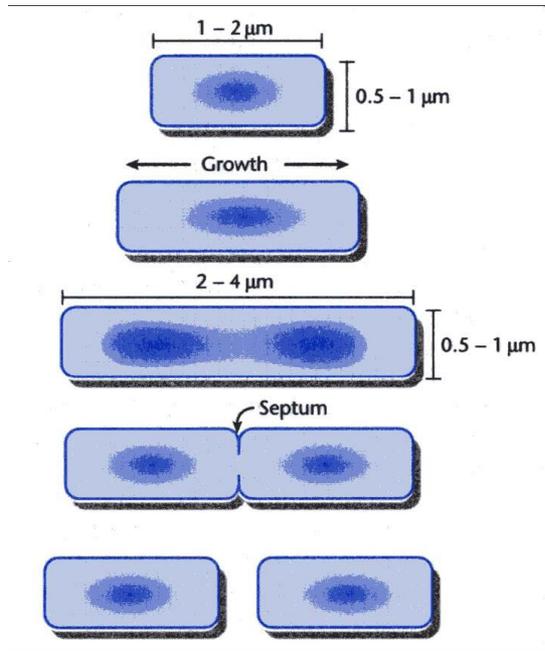
- Par **scissiparité** (fission binaire): 1 cellule donne par division 2 cellules filles génétiquement identiques (notion de clone)
- Pas d'individualisation de chromosomes visibles en cytologie à aucun moment de leur cycle de vie
- Multiplication **exponentielle**



➤ Temps de Génération : 20 min (*E.coli*) dans des conditions optimales à quelques heures

➤ Taux de croissance : 2 divisions / h au moins

0 min



20-30 min

cellule mère

18 heures
de croissance



10^9 bactéries/ ml

2 cellules filles identiques

➤ Echange génétique se fait par transferts horizontaux (transformation, conjugaison, transduction...)

C- Réplication chez les procaryotes

1- Initiation de la réplication:

- Se fait au niveau de l'origine de la réplication **Ori C** ou **Ori V**
- Ori = Séquences de 300 pb environ formées de séquences répétitives, reconnues spécifiquement par des protéines d'initiation (DnaA)
- Zones **flanquées de séquences riches en AT**, disposition propice à la détorsion de l'hélice bicaténaire
- Ouverture de la double hélice et formation de deux **fourches de réplication**
- Réplication bidirectionnelle à partir d'une origine de réplication

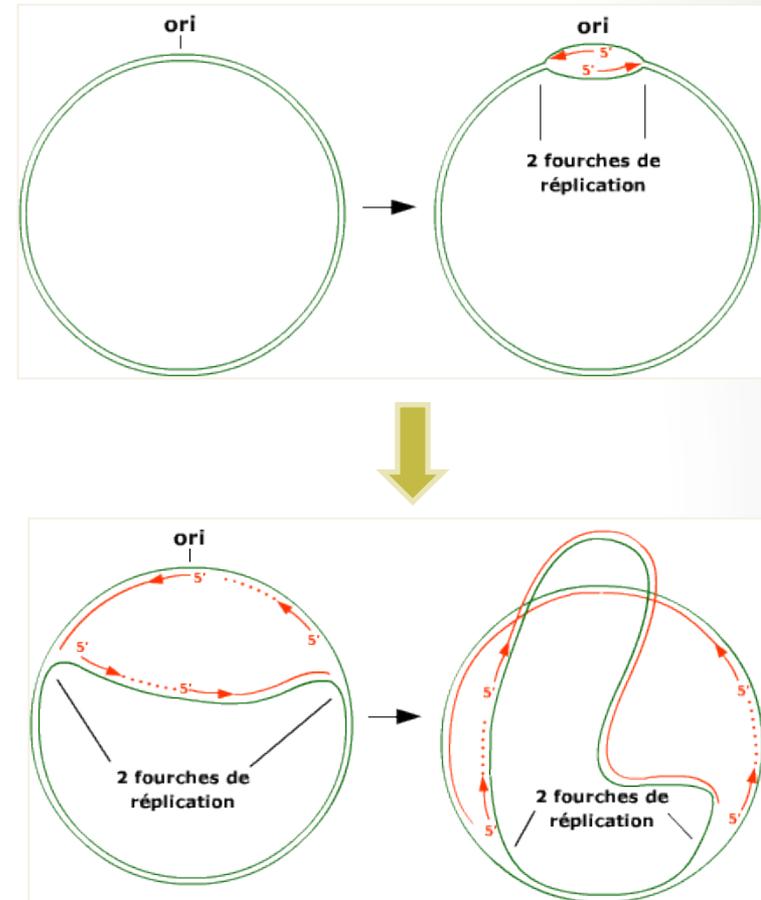
Réplication de l'ADN circulaire: Formation de structure thêta

***Pré-initiation** : Dénaturation de l'ADN au niveau de l'OriC et emplacement d'enzymes

***Initiation**: Mise en place des amorces

>>> 2 fourches de réplication progressent dans 2 directions opposées accompagnées de détorsion de la double hélice.

***Elongation** : Au niveau de chaque fourche, la synthèse d'ADN est semi-conservative et semi-discontinue



Le mécanisme de 2 fourches de réplication dans 2 directions opposées entraîne la formation des structures caractéristiques thêta visibles au microscope électronique.

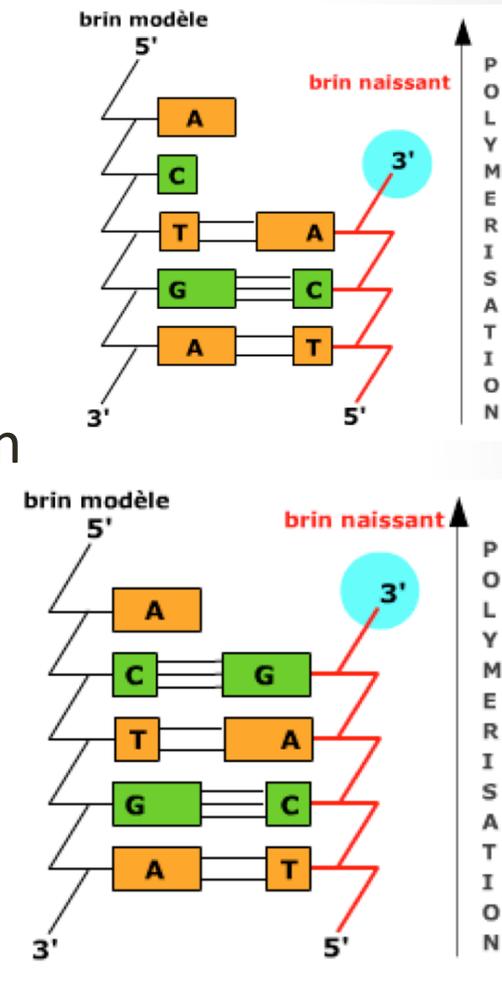
2- Élongation de la réplication:

Les polymérases ont 2 rôles:

1- Incorporation des bases en respectant les règles de complémentarité par **l'ADN pol III**

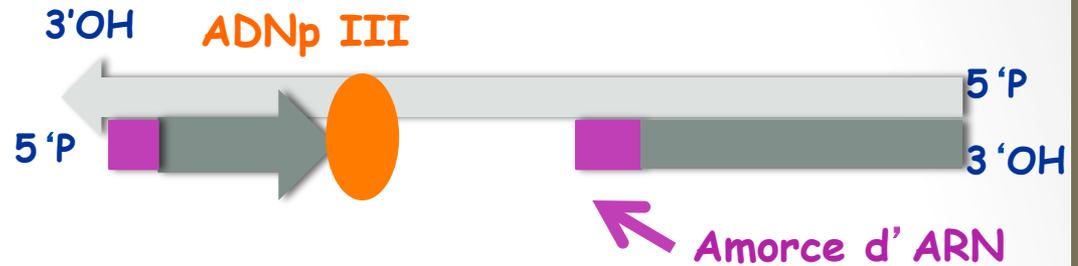
>>>> synthèse en continue d'un nouveau brin précoce.

2- Dégradation des amorces ARN grâce à l'activité de **l'ADN pol I** (exonucléase 5 → 3') et resynthèse de la partie manquante (activité polyméase 5' → 3').



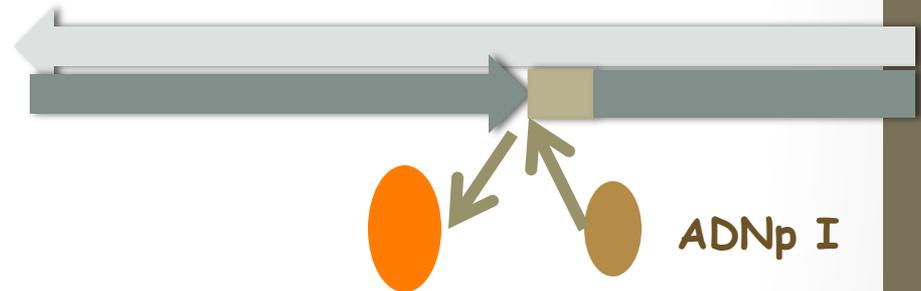
Assemblage de deux fragments sur le brin retardé

Après la synthèse de l'amorce, la primase est remplacée par ADNp III

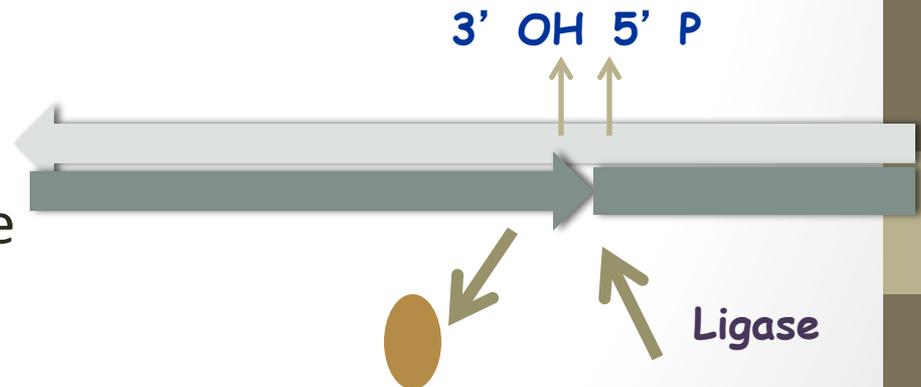


- Synthèse jusqu'à atteindre un ADN précédemment synthétisé

L'ADN pol I continue la synthèse de l'ADN et enlève l'amorce ARN



L'ADN ligase remplace la pol I après que l'amorce a été enlevée et soude les deux fragments ensemble



Comparaison des différentes polymérases

Fonction	Type I	Type III
Polymérase 5' → 3'	+	+
Exonucléase 3' → 5'	+	+
Exonucléase 5' → 3'	+	-
Matrice amorce:		
Double brin	-	-
Simple brin + amorce	+	+
Activités		
Vitesse (Kpb/min)	0,67	100
Nombre (molécules/cellule)	400	10 à 20

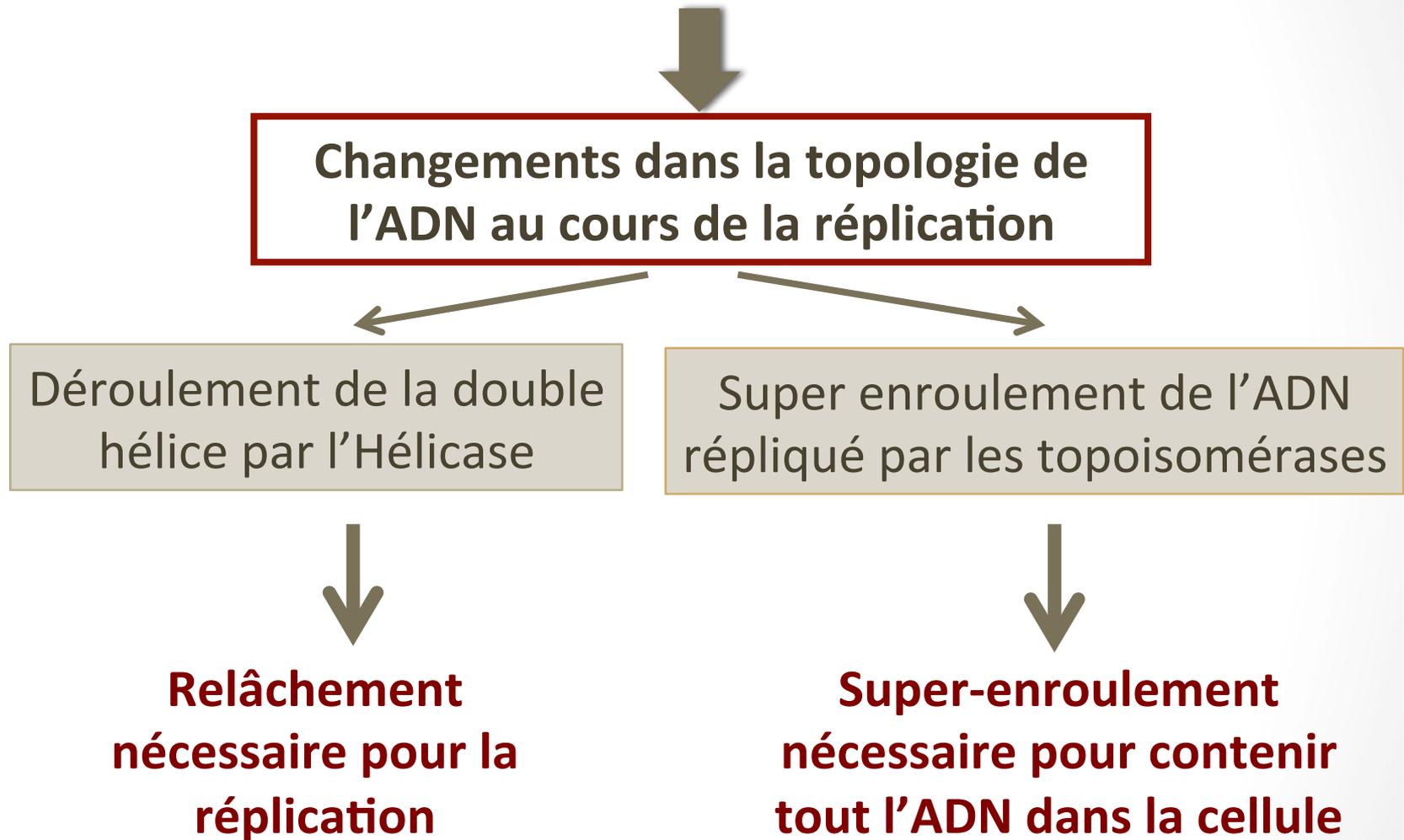
ADN pol III rapides,
peu nombreuses et
moins versatiles au
niveau de
l'exonucléase



Réplication et
mécanisme
d'autocorrection

L'ADN pol I étant très présente mais lente et pouvant facilement exonucléer, elle assurerait donc un rôle de réparateur de l'ADN.

L'information génétique doit être accessible à la réplication.
La structure de l'ADN restera dynamique dans la cellule.



Rôle important de l'enroulement dans la régulation de la réplication

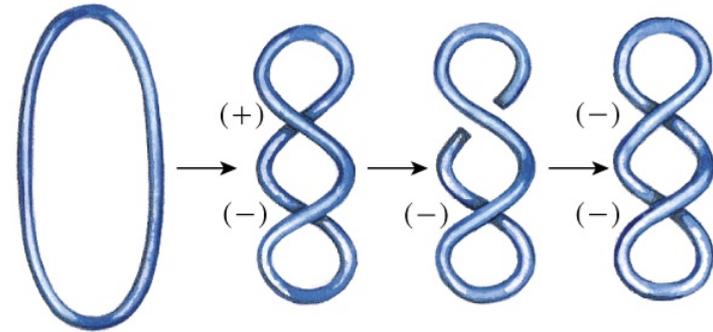
Régulation de l'état d'enroulement de l'ADN

Cas du génome circulaire

L'ADN gyrase: topoisomérase type II: Catalyse le croisement de brins

- Introduction de super-tours négatifs dans l'ADN,
- Coupure des 2 brins parentaux
- Séparation

>>>> Donc retour à l'état relâché d'ADN



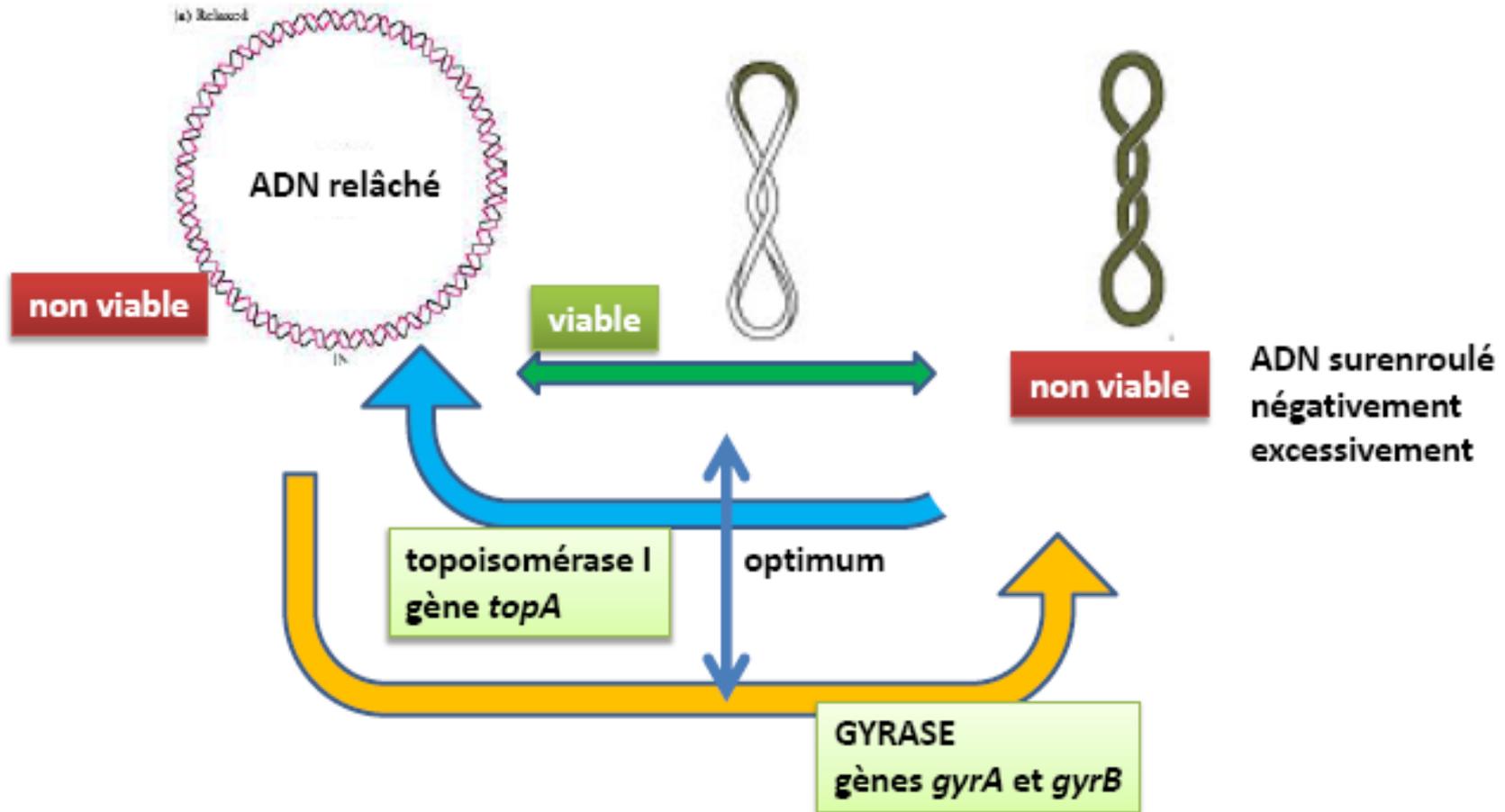
Mécanisme d'action de la gyrase sur un ADN circulaire

Gyrase est **spécifique** et **essentielle** à la réplication des bactéries

Topoisomérase de type I: régule l'état d'enroulement

>>> Nécessaire pour contenir tout l'ADN dans la cellule

Contrôle du taux de surenroulement de l'ADN

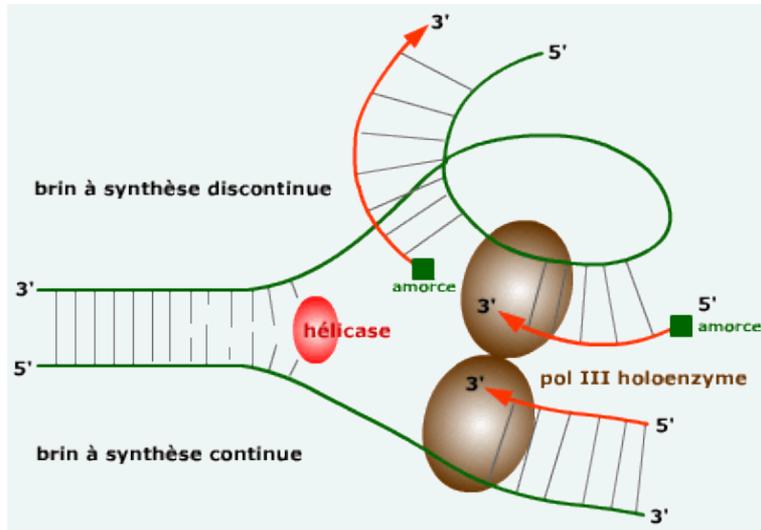


L'inhibition de l'activité des enzymes est létale pour les bactéries d' où l' effet d' un certain nombre d'antibiotiques, aminocoumarines, les quinolones et les fluoroquinolones.

Enzymes de la réplication chez les procaryotes

Enzyme	Fonction
ADN polymérase III (pol III)	Principales enzymes de polymérisation
ADN polymérase I (pol I)	Excise l' amorce ARN et remplit les trous
Hélicase (dnaB)	Déroule la double hélice à la fourche de réplication
Primase (dnaG)	Synthèse des amorces ARN
Protéines se liant à l' origine de réplication (dnaA)	Facilite la fusion pour ouvrir le complexe
Protéines se liant à l' ADN simple brin (Ssb): Déroulase	Empêche le réappariement des brins de l' hélice ouverte
ADN ligase (ligA, ligB)	Soude les coupures dans l' ADN
Gyrase	Réduit les torsades formées par la progression de la fourche et catalyse le superenroulement de l' ADN répliqué
Topoisomérase I	Régule l'état d'enroulement de l'ADN

Mécanisme de synthèse des deux brins d'ADN en même temps



- Formation d'une boucle par le brin à synthèse discontinue, sur un tour complet
- Tour de 180° du fragment d'Okazaki en cours de synthèse le plaçant dans la même orientation que le brin à synthèse continue

Synthèse d'ADN asymétrique et simultanée sur les deux brins



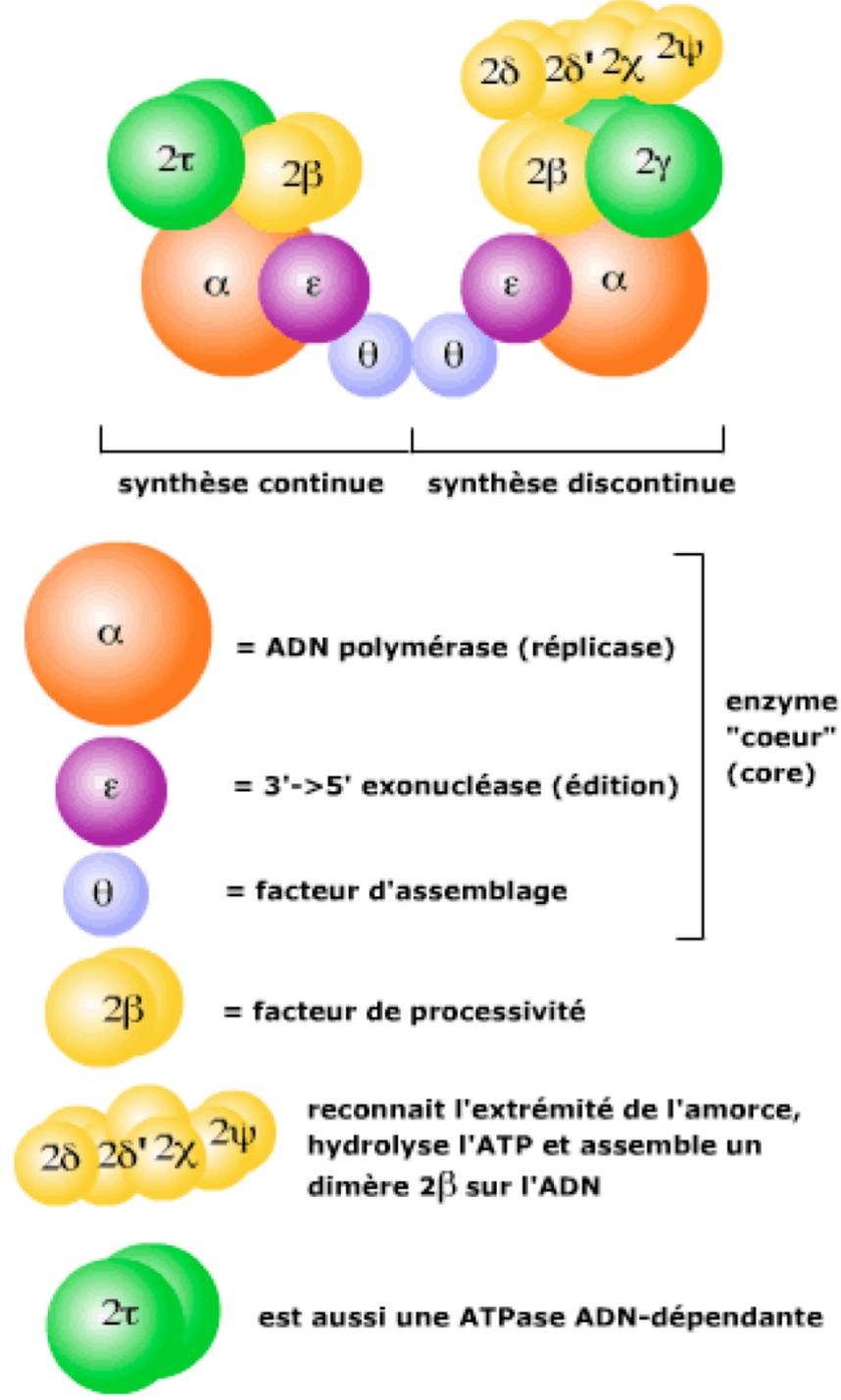
Complexe enzymatique (ADN polymérase III) avec deux sites catalytiques liés se déplaçant à la même vitesse dans une seule et même direction

ADN-polymérase III holoenzyme

Chez *E. coli*, la dissymétrie de fonctionnement de l'ADN-pol III (réplicase) correspond à une dissymétrie de composition en 2 complexes enzymatiques formés d'une dizaine de sous-unités différentes.



l'un assure la synthèse du brin continu et l'autre la synthèse du brin discontinu



3- Terminaison de la réplication:

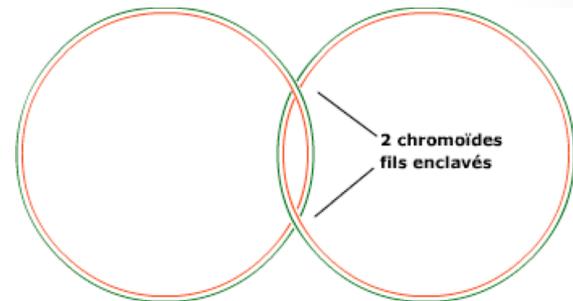
lors de la rencontre des deux fourches

Elle se fait au niveau d'une séquence TER située à l'opposé de l'origine de réplication reconnue par la protéine Tus qui met fin à la réplication

>>> Mécanisme fait intervenir d'autres protéines

Lorsque la réplication d'un chromosome circulaire est terminée, les 2 molécules obtenues sont reliées ensemble, comme les maillons d'une chaîne.

>>> La séparation et la ligation se font par des **topoisomérases**



Différentes étapes de la réplication

- Déroulement de la double hélice par l'ADN hélicase
- Stabilisation sous forme simple brin par les protéines SSB
- Synthèse d'amorces ARN par la primase
- Hybridation des amorces sur l'ADN
- Synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase III
- Destruction des amorces ARN et réparation des lacunes par l'ADN polymérase I
- Ligation des fragments d'ADN synthétisés par la ligase

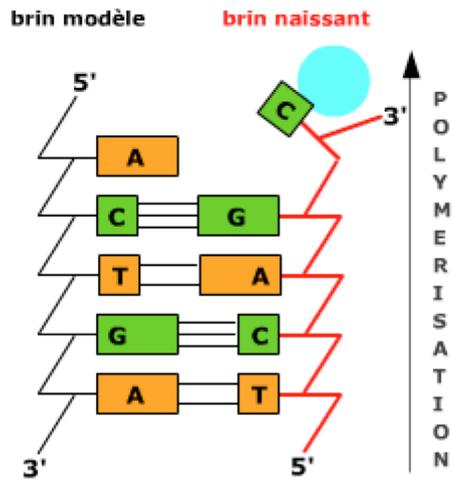
D- Fidélité de la réplication de l'ADN: Correction des erreurs d'élongation PROOFREADING

C'est la correction d'une absence de complémentarité entre les nucléotides de 2 brins d'ADN

Taux de mutation faible de 10^{-9} à 10^{-12} erreurs/paire de bases insérées grâce à:

- Règles d'appariement des bases sur le modèle du brin matriciel
- Activité correctrice des enzymes Pol I et III
 - ➔ Activité *exonucléasique* 3' → 5' (enlever un nucléotide mal apparié et remplacer par le bon nucléotide)
- Existence d'un **système multi enzymatique** comprenant une **endonucléase** associée à une **exonucléase bidirectionnelle (3'→5' et 5'→3')**, à une **ligase** et à une **ADN pol III**.

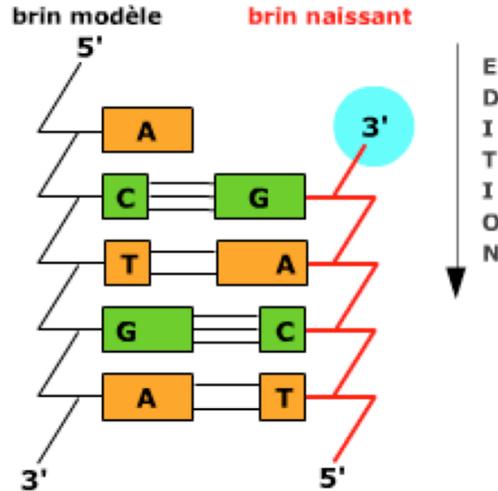
Correction d'épreuves (édition)



Mésappariement



Arrêt de l'élargissement



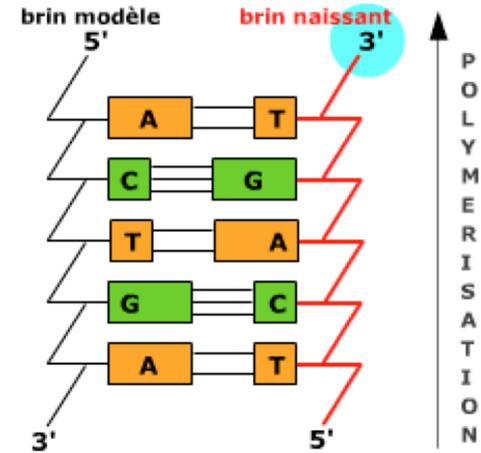
Elimination du mésappariement



La polymérase se réassocie au modèle-amorce corrigé



L'extrémité 3'-OH du brin naissant se positionne correctement dans le site catalytique de l'enzyme

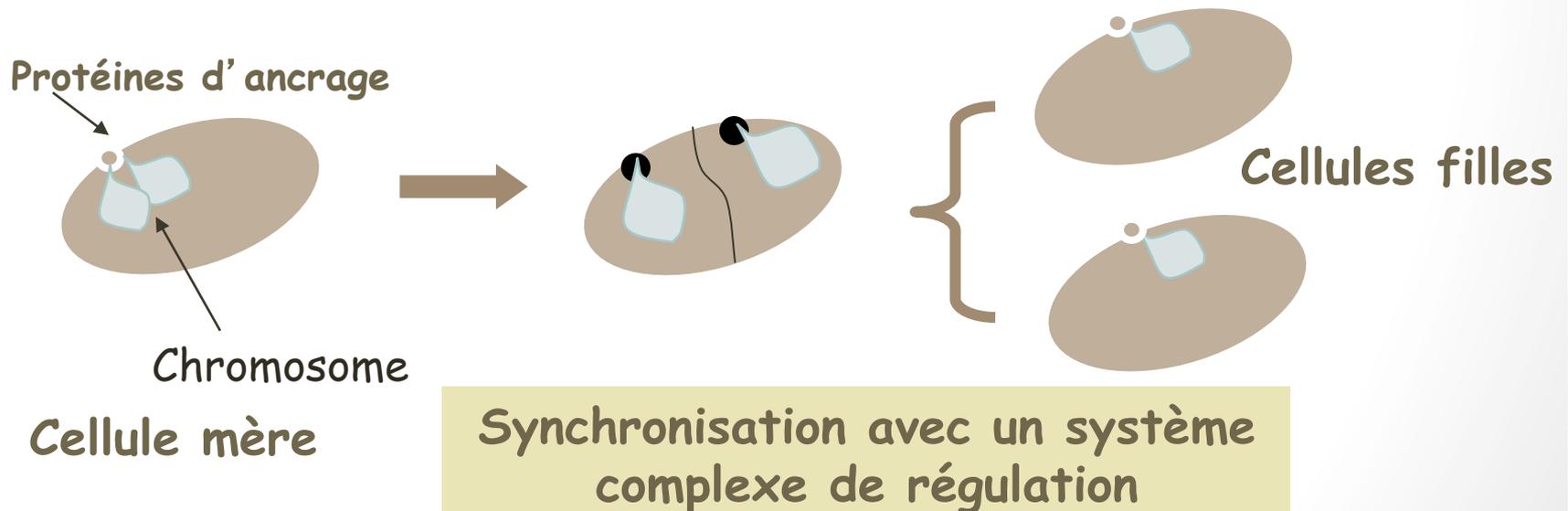


Reprise de l'élargissement

E- Réplication et division cellulaire

Modèle de partition des 2 molécules d'ADN entre les 2 cellules filles:

- ADN reste attachée à une protéine membranaire
- Les 2 ports d'attachement se séparent
- La membrane se divise en entraînant chacun une molécule d'ADN vers une cellule fille.



Expérimentalement, on peut provoquer la partition inégale chez les bactéries en utilisant des **mutants**.

Séparer la division cellulaire de la réplication :

- ◆ en empêchant la division cellulaire, on obtient des cellules avec plusieurs chromosomes (les minicells)
- ◆ en empêchant la réplication, on obtient des bactéries sans chromosome, des sacs à protéines (maxicells)

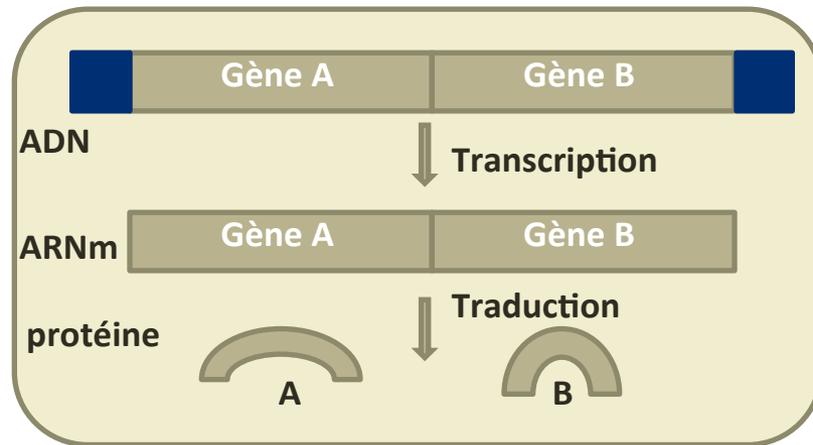
F- Réplication chez les eucaryotes:

Comparaison de la génétique des procaryotes et des eucaryotes

Différences sont dues :

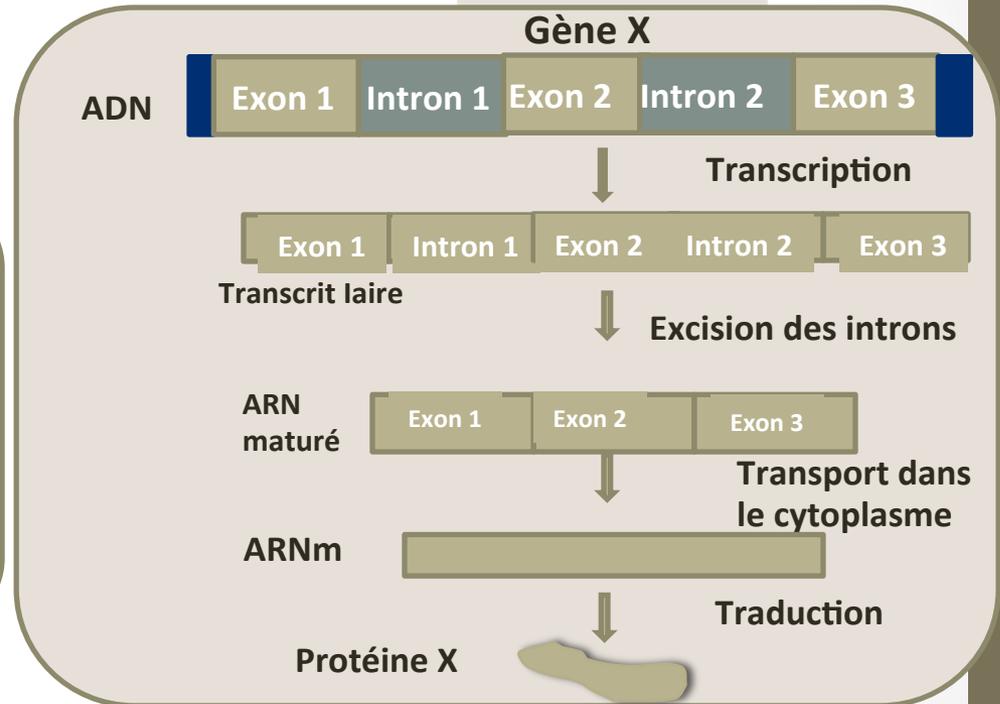
- la présence d'un noyau chez les eucaryotes
- ADN à organisation différente >>> (introns et exons)

Procaryote



- ADN **circulaire** dans le cytoplasme
- Toutes les régions d'ADN sont codantes

Eucaryote

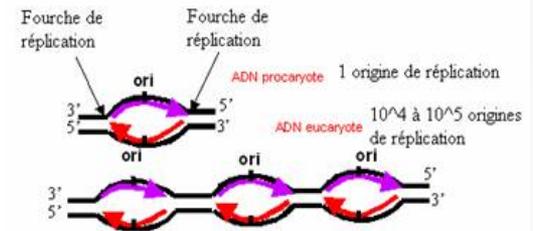


- ✓ ADN linéaire individualisé sous forme de chromosomes dans le noyau
- ✓ Séparation spatiale de la transcription et la traduction, ARNm passe dans le cytoplasme

F- Réplication chez les eucaryotes:

Même système que celui des procaryotes avec le brin avancé et le brin retardé >>> **Mais, quelques différences**

- ADN plus long
- Plusieurs **origines de réplication** activées de manière synchronisée et progressant à la même vitesse (50 nucléotides/s)



- Plusieurs polymérases agissant simultanément tout en ayant des fonctions différentes:

α : synthèse de l'amorce, élongation et réparation de l'ADN;

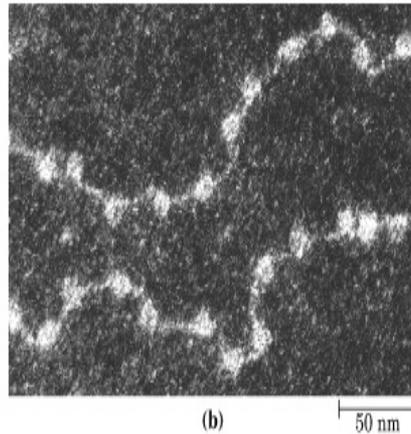
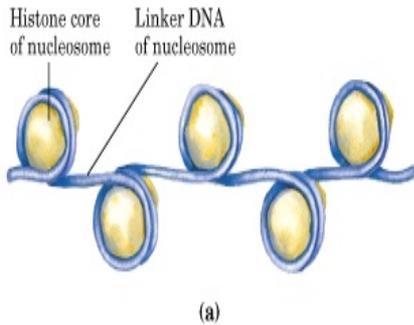
β : réparation de l'ADN,

γ : réplication de l'ADN mitochondriale ...

δ : Élongation des brins plus réparation de l'ADN

ϵ : Réparation et remplacement de l'ARN au niveau du brin retardé

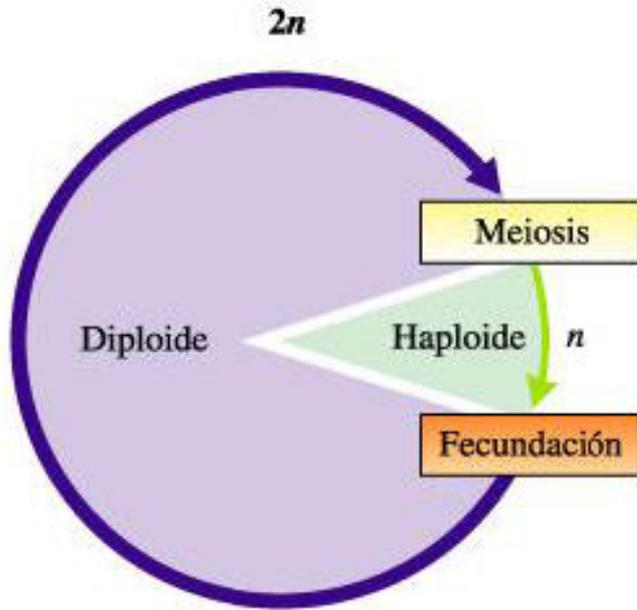
- L'ADN est intégré dans la chromatine associée aux histones. Donc, au moment de la réplication, il y a production d'histones et duplication de la masse d'histones aussi.



Structure complexe des chromosomes (chromatine et protéines histones)

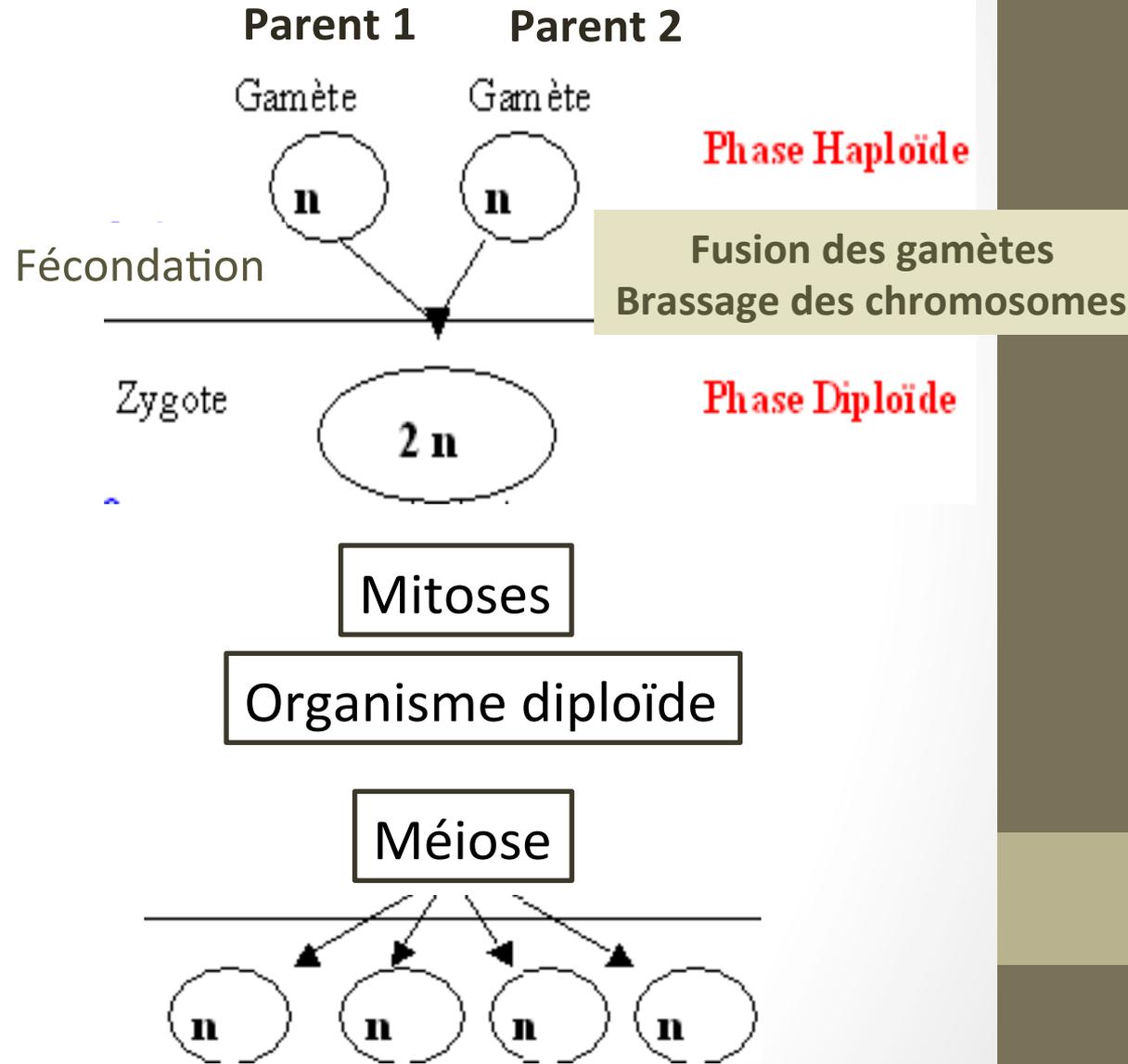
- Structures complexes discoïdes autour desquelles est entouré l'ADN : **nucléosomes** qui constituent une barrière ralentissant la polymérase (faible vitesse de progression de la fourche de réplication)

Division cellulaire chez les eucaryotes

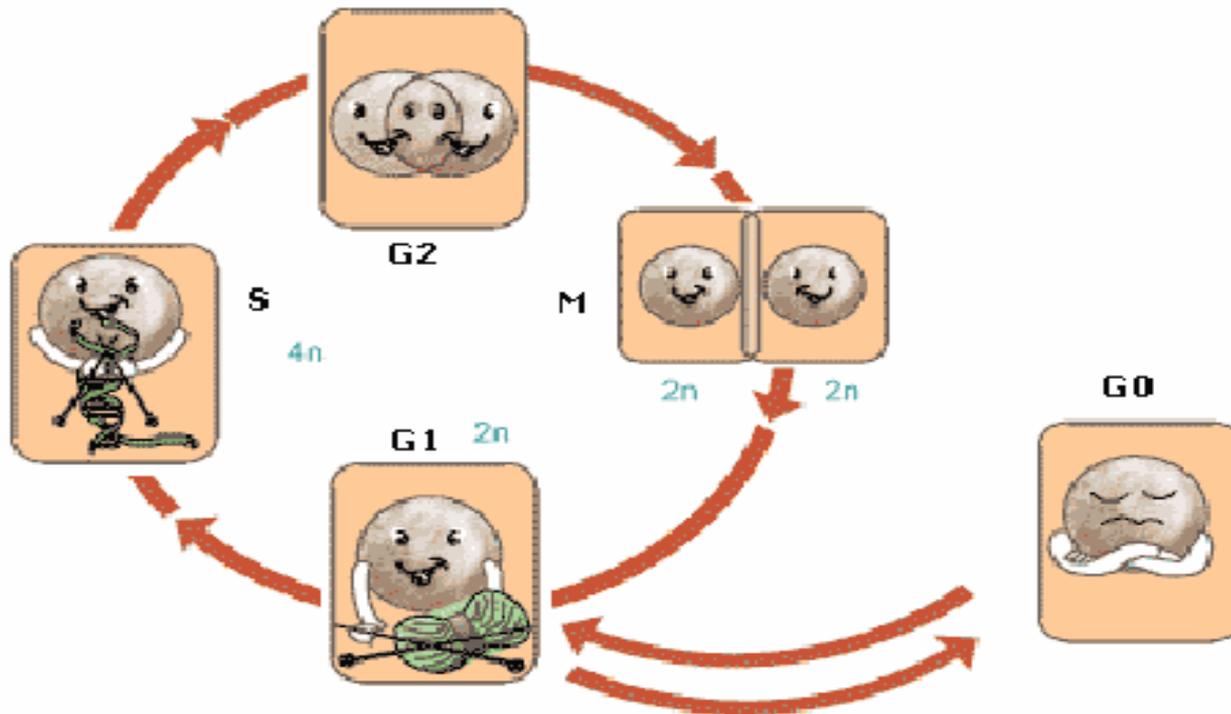


Cycle sexuel chez les eucaryotes

Recombinaison méiotique



Synthèse d'ADN uniquement pendant la phase S du cycle cellulaire



Période de multiplication

- G1** : phase de préparation à la synthèse de l'ADN
- S** : phase de synthèse de l'ADN
- G2** : phase de préparation à la mitose
- M** : mitose

Période de quiescence

- G0** : pas de processus de division cellulaire
Cellule au repos
exerçant ses fonctions