

Génétique moléculaire

La génétique moléculaire a pour but d'élucider la structure et la fonction du gène. Elle se propose d'étudier le support de l'information génétique : l'acide désoxyribonucléique (ADN) et trois phénomènes fondamentaux : le processus de réplication de l'ADN, la transcription de l'ADN en acide ribonucléique et la traduction de l'ARN en protéines sous forme d'une chaîne polypeptidique.

I- Support de l'information génétique

Le rôle de l'ADN a été établi à partir d'expériences effectuées sur des micro-organismes qui présentent de nombreux avantages tels que la facilité de leur manipulation, la rapidité de leur multiplication et la relation directe entre le gène et son effet. Parmi les expériences portant sur les micro-organismes et plus particulièrement les bactéries : « la transformation bactérienne de Griffith (1928) » (figure 1).

Expérience de Griffith (1928)

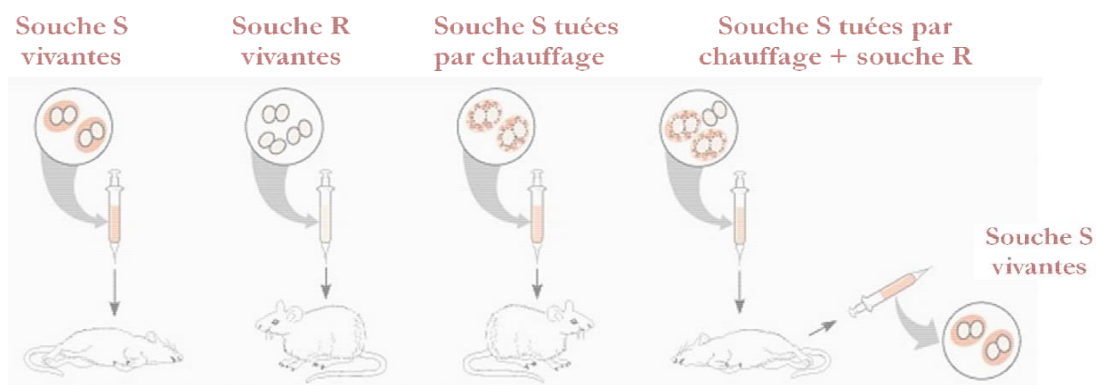


Figure 1 : La transformation bactérienne de Griffith

En 1928, Frederick Griffith démontre que l'inoculation sous cutanée à la souris d'un mélange de pneumocoques capsulés (virulents) tués par la chaleur et de pneumocoques non virulents vivants, entraîne une septicémie mortelle à pneumocoques capsulés vivants. Il y a donc eu transformation des pneumocoques (R) en pneumocoques capsulés (S). Griffith émet une hypothèse qu'il existe chez pneumocoques capsulés (S), une substance transférée aux pneumocoques non virulents (R) qui vont acquérir de nouvelles potentialités héréditaires et deviennent capables de synthétiser la capsule, leur conférant alors un pouvoir pathogène. En 1944, Avery MacLeod et McCarty démontrent que le « principe transformant » est l'ADN bactérien.

II- Structure des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des polymères de motifs élémentaires appelés nucléotides. Un nucléotide est formé de l'estérification d'un nucléoside par l'acide phosphorique.

Nucléotide = nucléoside + acide phosphorique

On donne le nom de nucléoside à un hétéroside résultant de la combinaison d'un ose : le ribose pour les acides ribonucléiques et le désoxyribose pour les acides désoxyribonucléiques ; et d'une base purique ou pyrimidique (Figure 2).

Nucléoside = ose + base purique ou pyrimidique

La base est reliée à l'ose par une liaison N-Osidique et l'acide phosphorique estérifie la fonction alcool du carbone 5 de l'ose.

Il existe 4 principaux types de ribonucléotides et de désoxyribonucléotides différents les uns des autres par la nature de la base azotée (figure 3). Ces nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester 3', 5' établies entre une fonction acide du reste phosphorique et la fonction alcool en 3' de l'ose du nucléotide voisin.

Outre leur rôle en tant que constituants majeurs des acides nucléiques, les nucléotides font partie de la structure des coenzymes aux rôles métaboliques essentiels.

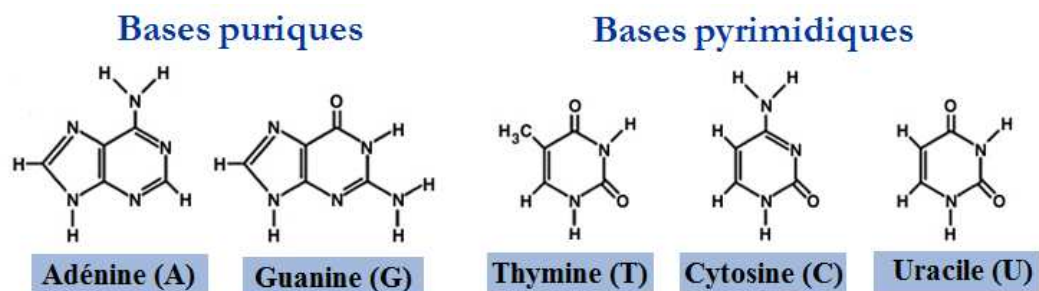


Figure 2 : Structure de bases azotées

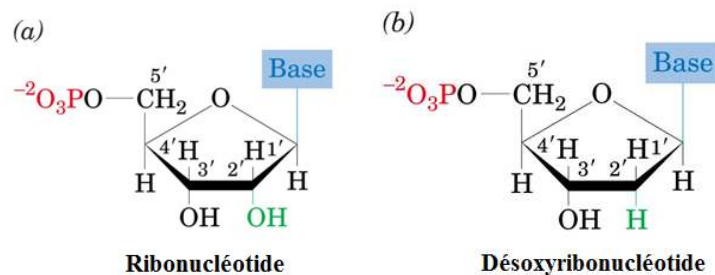


Figure 3 : Structure des ribonucléotides (a) et des désoxyribonucléotides (b)

II.1- Acide désoxyribonucléique (ADN) :

L'ADN est localisé dans une zone du cytoplasme appelée équivalent nucléaire chez les procaryotes, le noyau chez les eucaryotes cellulaire, et certains organites cellulaires tels que les mitochondries et les plastides.

L'ADN est le support de l'information génétique. Il a été montré :

- Qu'il existe d'importantes variations dans la composition des ADN de différentes espèces.
- Que la quantité d'ADN par cellule est constante.
- Qu'au sein d'une même espèce, la composition nucléotidique d'ADN des différents tissus et organes est invariable.
- Chargaff en 1950, a démontré une régularité dans la composition en bases de l'ADN. Le nombre de résidus d'adénine est identique à celui de thymine ($A = T$) et le nombre de résidus de cytosine est identique à celui de la guanine ($C = G$). La somme des purines set toujours égale à celle des pyrimidines ($A + G = C + T$).
- Le rapport $\frac{A + T}{C + G}$ est caractéristique de l'espèce.

II.1.1- structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

Les acides désoxyribonucléiques sont des polymères formés de 4 principaux désoxyribonucléotides : l'acide désoxyadénylique (dAMP), l'acide désoxyguanylique (dGMP), l'acide désoxycytidylique (dCMP) et l'acide désoxythymidylique (dTMP). Ces 4 types de nucléotides sont unis l'un à l'autre pour donner naissance à de longues chaînes de plusieurs milliers ou dizaines de milliers d'unités.

Les travaux de Watson, Crick et Wilkins en 1953 ont permis de mettre en évidence que la structure de l'ADN a une conformation hélicoïdale bicaténaire. La molécule d'ADN résulte de l'association de deux chaînes polynucléotidiques très longues, enroulées en une double hélice régulière autour d'un même axe (Figure 4). Les bases sont orientées vers l'axe et appariées selon leur complémentarité (A-T, C-G). Les deux chaînes complémentaires et antiparallèles sont réunies par des liaisons hydrogènes établies entre les bases appariées. L'adénine est reliée à la thymine par 2 liaisons hydrogènes et la cytosine est reliée à la guanine par 3 liaisons hydrogènes.

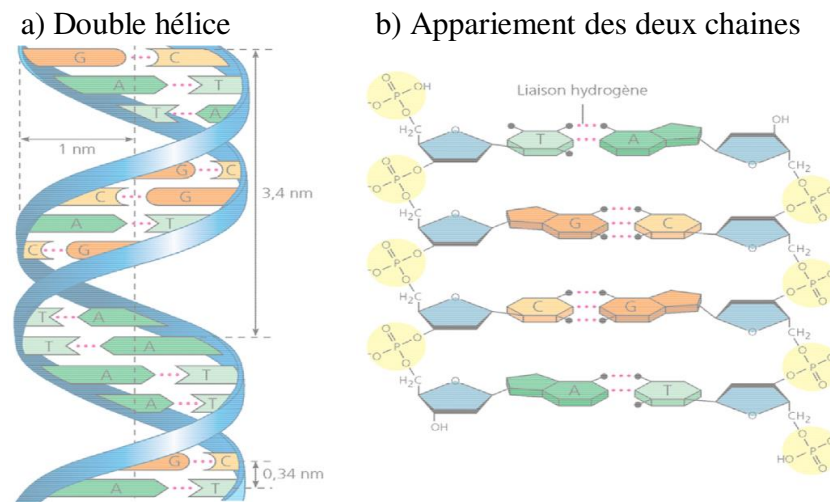


Figure 4 : Structure de l'acide désoxyribonucléique

II.1.2- Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN se fait selon un mode semi-conservatif mis en évidence grâce aux travaux de Messelson et Stahl (1958). Les deux brins d'ADN parentaux se séparent et s'autoreproduisent selon la loi de complémentarité des bases. Chacune des molécules filles comporte un brin parental et brin nouvellement synthétisé.

A) Réplication chez procaryotes

Pendant la réplication, les deux brins de la double hélice sont séparés grâce à des enzymes appelées : hélicases ou déroulases par rupture des liaisons hydrogène. Chacun des deux brins est stabilisé par des protéines SSB (*single strand bound*). Il y a formation d'une fourche de réplication et la croissance des brins néosynthétisés est continue sur un brin (brin direct complémentaire au brin parental 3'→5') et discontinue sur l'autre (brin indirect ou retardé complémentaire au brin parental 5'→3'). L'ADN polymérase III ne peut relier les nouveaux nucléotides que dans le sens 3'→5' dans le brin directe, en respectant les règles de complémentarité (Figure 5).

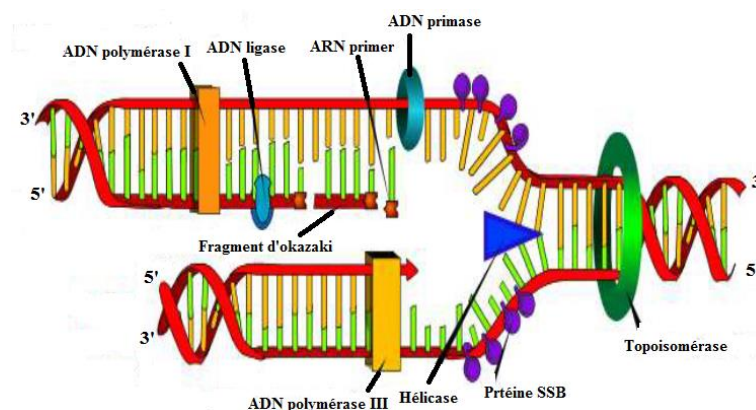


Figure 5 : Réplication de l'ADN chez les procaryotes

Sur le brin retardé, la primase fabrique des amorces d'ARN (primer) assez rapprochées à quelques centaines de nucléotides de distance sur le brin modèle au fur et à mesure que celui-ci est détaché du brin direct. L'ADN polymérase III synthétise un fragment d'Okazaki à partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre l'extrémité 5'-triphosphate de l'amorce précédente. Ensuite, l'ADN polymérase I remplace les ribonucléotides des amorces par des désoxyribonucléotides (les A, T, C et G de l'ADN) et une dernière enzyme, l'ADN ligase vient rattacher les uns aux autres tous ces fragments d'Okazaki.

B) Réplication chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, la réplication a lieu pendant la phase S de la division cellulaire. Le mécanisme générale est presque le même que pour les procaryotes et fait intervenir un nombre d'ADN polymérase plus important :

- les deux brins de la double hélice sont séparés par une hélicase et chacun des deux brins est stabilisé par des protéines RPA (Réplication Protein A).
- Une ADN polymérase δ synthétise le brin direct de 3' vers 5'.
- L'ADN polymérase α , associée à la primase est responsable de la synthèse des amorces.
- Une ADN polymérase δ progresse de 5' vers 3' et permet la synthèse de façon discontinue du brin retardé sous forme de fragment d'Okazaki.
- Les amorces ARN sont détruites par les Rnase H et les lacunes formées sont comblées grâce aux polymérases β et α .
- Les différents fragments d'Okazaki sont liés les uns aux autres par une ADN ligase.
- Les autres DNA polymérases interviennent dans la synthèse du DNA mitochondrial ou dans les processus de réparation du DNA génomique.

II.2- Les acides ribonucléiques (ARN)

L'ARN est présent à la fois dans le noyau ou l'équivalent nucléaire et le cytoplasme des eucaryotes et des procaryotes. On trouve également l'ARN dans le cytoplasme intra-mitochondrial et intra-chloroplastique.

Il existe trois grandes classes d'ARN dans les cellules des micro-organismes, des végétaux et des animaux (figure 6). Ayant chacune une fonction bien déterminée dans la biosynthèse des protéines. Ces acides nucléiques diffèrent par leur poids moléculaire, leur taille et leur séquence en bases. Ils sont monocaténaires formés d'une seule chaîne polynucléotidique, contenant les 4 principaux nucléotides : l'acide adénylique (AMP), l'acide guanylique (GMP), l'acide cytidylique (CMP) et l'acide uridylique (UMP).

a) ARN messager (ARNm)

C'est un ARN de poids moléculaire très élevé à renouvellement rapide, dont la séquence des bases est complémentaire à celle de l'ADN qui lui a donné naissance (traduction). A chaque adénine de l'ADN correspond une uracile d'ARNm et à chaque cytosine correspond une guanine et vice versa (figure 5). Cette séquence polynucléotidique portant l'information contenue dans le génome pour la biosynthèse d'une protéine, migre vers le cytoplasme cellulaire.

Il y a autant de types d'ARNm que de chaînes peptidiques synthétisables dans une cellule donnée. L'ARNm se lie au ribosome (petite particules nucléoprotéique), pour former les polysomes qui sont les sites fondamentaux de biosynthèse des protéines.

b) ARN de transfert (ARNt)

L'ARNt est monocaténaire formé d'une seule chaîne polynucléotidique, repliée sur elle même en « feuille de trèfle » (figure 5). La fonction de l'ARNt est le transfert spécifique des acides aminés du hyaloplasme vers le, site ribosomal de la synthèse protéique.

Il existe autant d'ARNt que d'acides aminés, chacun étant caractérisé par une séquence nucléotidique spécifique dont l'information est contenue dans l'ARNm.

c) ARN ribosomal (ARNr)

L'ARNr représente environ 80 % de l'ARN cellulaire et 65 % du poids moléculaire des ribosomes. Les ribosomes sont des particules nucléoprotéiques présentes dans le cytoplasme cellulaire. Ils sont formés de deux sous-unités : la petite et la grande sous-unité (figure 5).

L'ARNr va recevoir l'information de l'ARNm ainsi que les acides aminés véhiculés par les ARNt. L'ARNr va traduire l'information contenue dans l'ARNm pour synthétiser une protéine. Ce processus est appelé traduction.

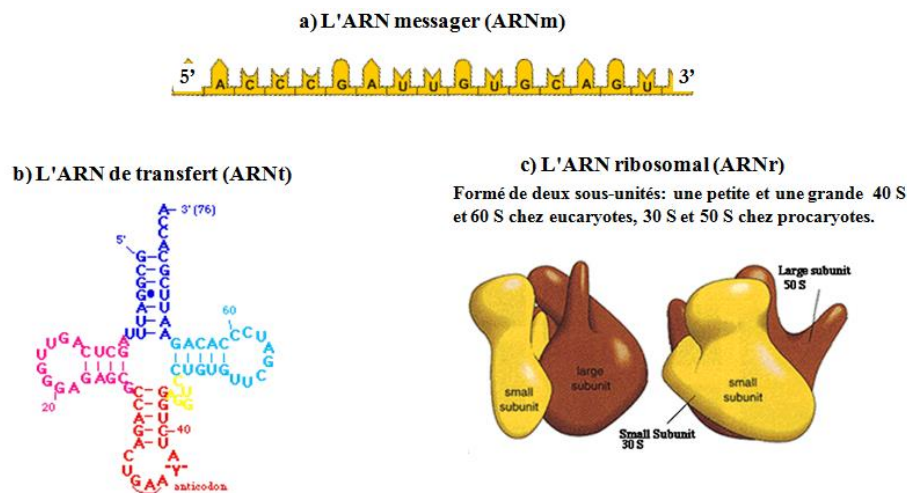


Figure 6 : Différentes classes d'acides ribonucléiques

III- Code génétique

L'une des fonctions de l'ADN consiste à diriger la synthèse des polypeptides qui sont des molécules constituées d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques et disposés selon une séquence appelée structure primaire.

L'ordre des acides aminés dans une chaîne polypeptidique est dicté par l'ordre des codons dans un gène. Un codon correspond à un triplet de bases adjacentes servant de code pour un acide aminé. Plusieurs codons peuvent servir de code pour le même acide aminé. Il existe 64 codons, 3 d'entre eux (UAA, UAG et UGA) sont qualifiés de codons non-sens et indiquent la terminaison de la synthèse du polypeptide. Le codon AUG déclenche la synthèse du polypeptide. Ce même codon sert de code pour la méthionine.

IV- Formation de la chaîne peptidique

La synthèse des polypeptides se fait en 2 étapes : la transcription des segments d'ADN sous forme d'ARNm et la traduction de l'ARNm en protéines au niveau des ribosomes.

Chez les eucaryotes la transcription a lieu dans le noyau, et la traduction dans le cytoplasme. Cependant, ces deux processus se déroulent simultanément dans le cytoplasme chez les procaryotes.

IV.1- Transcription

Au cours de la transcription, les deux chaînes de la double hélice de l'ADN se dissocient dans la zone du gène à transmettre. Un brin (3' - 5') joue le rôle de matrice pour la synthèse de l'ARNm sous l'action de l'ARN polymérase, en respectant la complémentarité des bases (figure 7). Dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile.

Il existe plusieurs types d'ARN polymérase :

- ARN-polymérase I qui synthétise les ARN ribosomiques (18 S, 28 S)
- ARN-polymérase II qui synthétise les ARN messagers
- ARN-polymérase III qui synthétise les petits ARN (ARNt, ARNr)

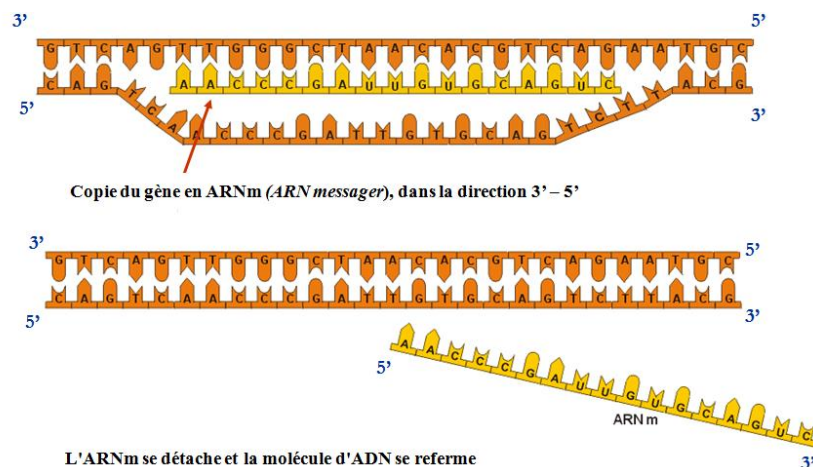


Figure 7 : Transcription de l'ADN en ARN messager

Chez les eucaryotes, les gènes sont constitués de séquences codantes (exons) et non codantes (introns). Une séquence de nucléotides codant pour une protéine est peut être interrompue par des séquences non codantes, les introns. Certaines sont des zones régulatrices de l'activité des gènes qui permettent d'activer la synthèse protéique ou au contraire de l'inhiber. Pendant la transcription de l'ADN, les introns sont aussi reproduits avec les séquences codantes. Les introns sont ensuite extraits de l'ARN précurseur par des enzymes spécifiques. Ce phénomène est connu sous le nom d'épissage qui conduit à l'ARNm (figure 8).

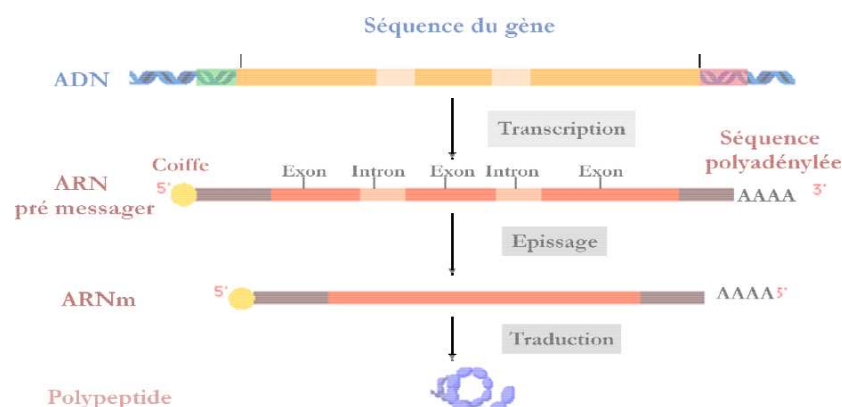


Figure 8 : Transcription chez les eucaryotes

IV.2- Traduction

La traduction est la synthèse des protéines à partir d'un ARN m, et comprend trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison (figure 9).

IV.2.1- Initiation

L'ARNm se fixe à la petite sous-unité de l'ARNr qui reconnaît le codon initiateur (AUG). Sa présence sur l'ARNm entraîne la réunion des deux sous-unités d'un ribosome et la mise en place, au site P du ribosome, de l'ARNt portant l'anticodon complémentaire au codon AUG.

Chez les procaryotes, la méthionine subit une formylation sur l'extrémité NH_2 (ajout d'un formyl) pour former la f-Met, c'est un phénomène pré-traductionnel. A la fin de la synthèse de la chaîne peptidique, la méthionine sera enlevée.

L'initiation est activée grâce à la présence de facteurs d'initiation (IF pour Initiation Factor).

IV.2.2- Elongation

A la fin de l'initiation, l'ARNm se trouve associé à la petite sous-unité du ribosome. L'ARN de transfert initiateur chargé de la méthionine est en contact d'une part avec le codon initiateur de l'ARNm par l'intermédiaire de sa séquence anticodon et d'autre part avec la grande sous-unité au niveau du site P. L'autre site du ribosome, le site A, accueille le deuxième ARNt grâce à un facteur d'élongation EF-Tu. Ce dernier est activé en présence du GTP pour former un complexe activé EF-Tu-GTP qui se fixe à l'ARNt. L'hydrolyse du GTP du complexe en GDP favorise la liaison de l'ARNt au site A. Le complexe EF-Tu-GDP est libéré du ribosome grâce à un facteur d'élongation EF-Ts. Ensuite une peptidyl-transférase du ribosome induit la formation d'une liaison peptidique entre les deux acides aminés adjacents.

Le ribosome avance sur l'ARNm permettant ainsi la lecture des codons successifs de 5' vers 3' et donc l'élongation de la chaîne peptidique. Cette étape est catalysée par le facteur EF-G qui effectue la translocation des acides aminés du site A au site P. La lecture de l'ARNm par le ribosome se fait

IV.2.3- Terminaison

Le passage du ribosome au niveau d'un codon non-sens (UAA, UAG et UGA) provoque sa dissociation et l'arrêt de la traduction en présence d'un dernier cofacteur RF (RF pour Releasing Factor). La protéine synthétisée est libérée et la méthionine, est séparée du reste de la chaîne polypeptidique. La protéine se replie selon sa séquence et prend sa configuration spatiale.

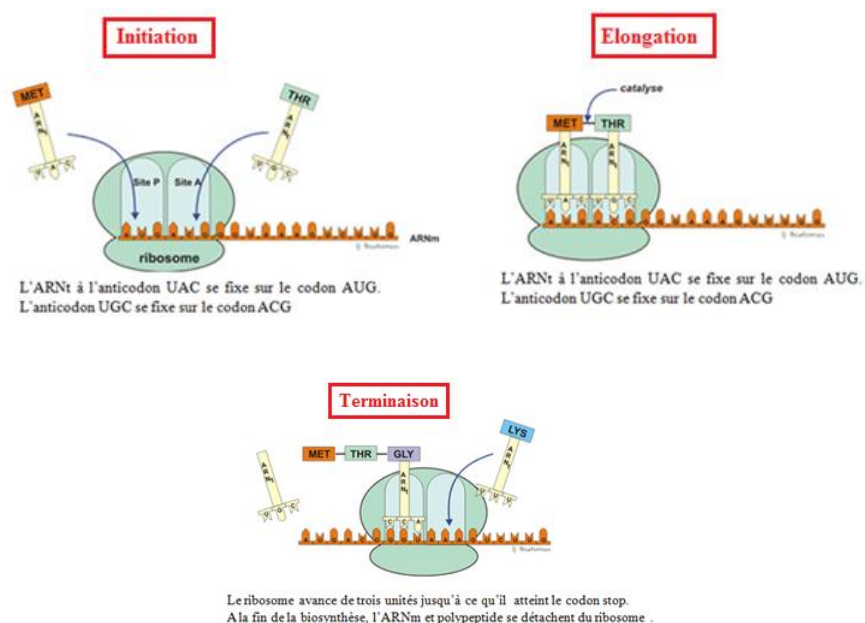


Figure 9 : différentes étapes de la traduction

V- Régulation de l'expression des gènes

V.1- Régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes

Les bactéries sont capables de s'adapter aux fréquentes modifications du milieu extérieur. La présence d'une substance donnée dans un milieu induit la synthèse bactérienne des enzymes impliquées dans le catabolisme de cette substance. Par contre, si cette substance est absente, ces

procaryotes synthétisent les enzymes pouvant l'anaboliser. Les bactéries régulent l'expression de leurs gènes de manière à ne reproduire que ce dont la cellule a besoin.

La plupart des gènes des bactéries sont arrangés en des opérons qui codent pour des protéines intervenant dans les mêmes fonctions comme le métabolisme du lactose. Chez *Escherichia coli*, l'opéron lac regroupe 3 gènes (lacZ, lacY et lac A) qui code les enzymes catalysant le catabolisme du lactose. Ces enzymes sont la β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en ses sucres constituants (glucose et galactose), le lactose perméase qui transporte le lactose à l'intérieur de la cellule et transacétylase qui est aussi impliquée dans l'hydrolyse du lactose.

A côté de l'opéron, se trouve le promoteur, un site sur lequel l'ARN polymérase, une enzyme réalisant la synthèse de l'ARNm, se fixe pour amorcer la transcription. Entre ce promoteur et l'opéron, se trouve l'opérateur sur lequel peut se fixer une protéine spécifique le répresseur. Ce dernier est codé par le gène régulateur lacI.

Lorsque le répresseur est fixé à l'opérateur, il empêche la progression de l'ARN polymérase et bloque la transcription des gènes lac (figure 10). Les 3 enzymes ne sont pas alors synthétisées. Il s'agit d'une régulation par répression.

L'activation de l'opéron lac se produit par la fixation d'un β -galactoside sur le répresseur qui va l'inactiver et empêcher sa fixation sur le site opérateur. L'ARN polymérase peut se fixer sur la région promotrice et l'opéron lac est transcrit (figure 11).

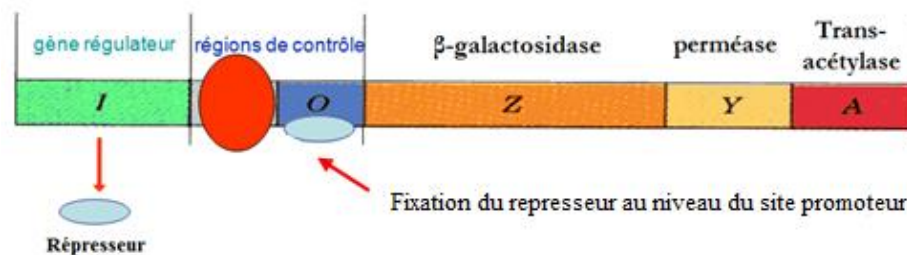


Figure 10 : Régulation de l'expression de l'opéron Lac par répression

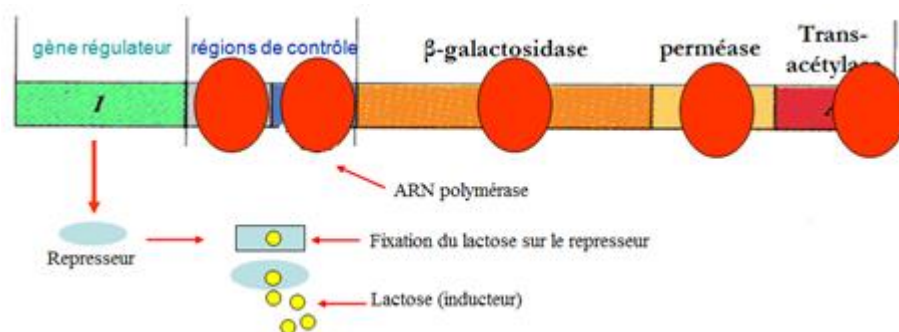


Figure 11 : Régulation de l'expression de l'opéron Lac par induction

V.2- Régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes

Les cellules des eucaryotes régulent l'expression de leurs gènes essentiellement en faisant varier le taux de transcription. La transcription est initiée par la formation d'un complexe d'initiation de la transcription (TIC), qui met en jeu la fixation de l'ARN polymérase II et des protéines (facteurs de transcription), à l'ADN du promoteur au niveau d'une séquence appelée TATA box.

On trouve également dans le génome des eucaryotes des séquences régulant l'activité des gènes promoteurs mais situés en amont ou en aval de ceux-ci. Ce sont les « Enhancers » ou activateurs qui stimulent l'activité des promoteurs par l'intermédiaire des facteurs de transcription. Il existe également des séquences d'ADN ayant des propriétés inverses inhibant la transcription, ce sont les « Silencers ».