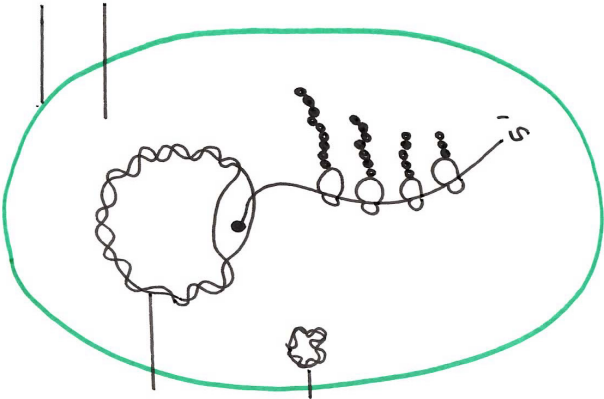
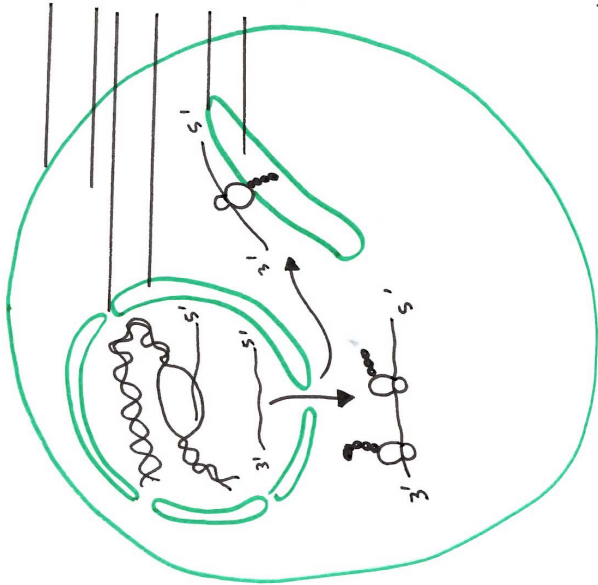


Bactérie (1µm)



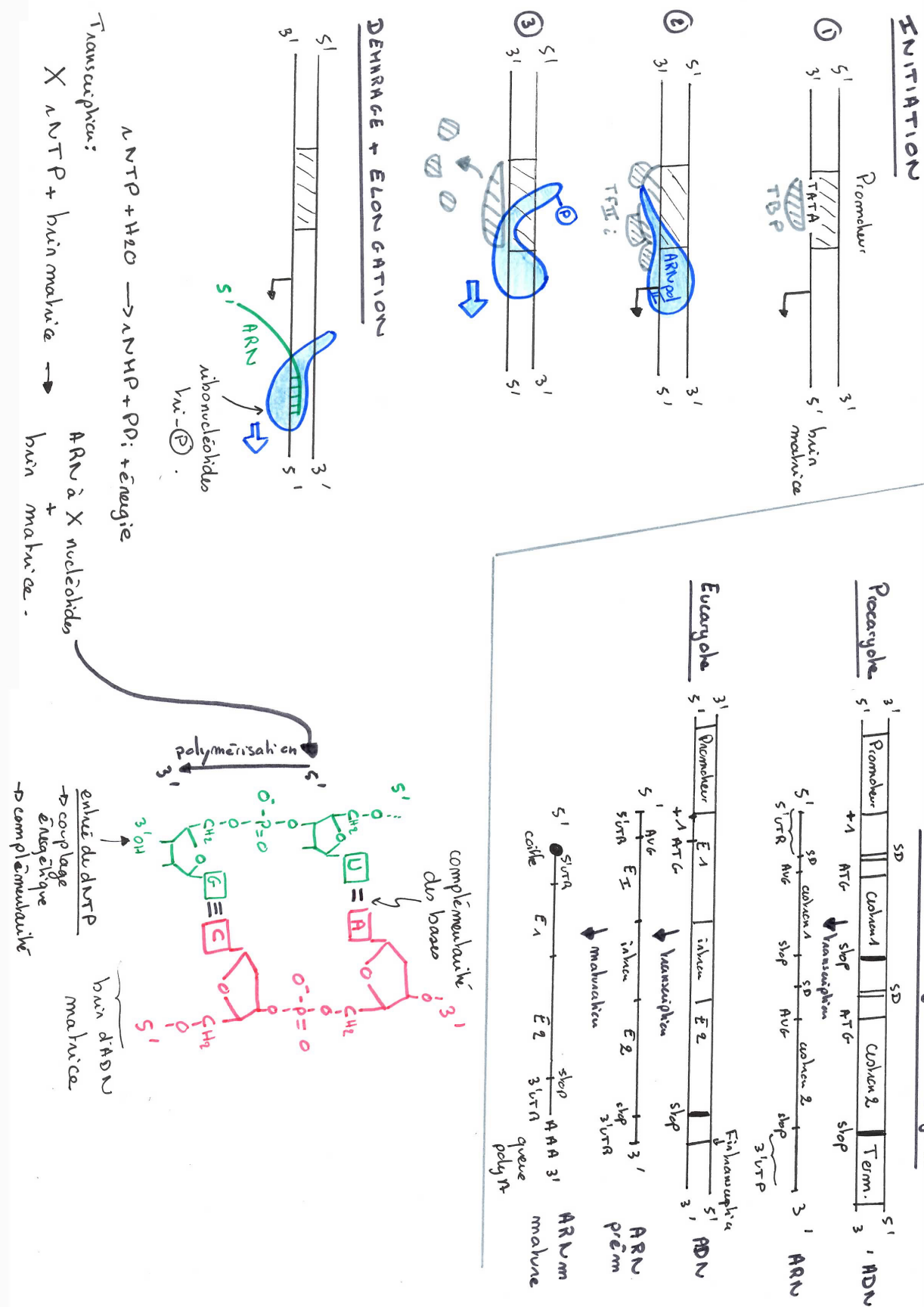
Cellule animale (10µm)



Comparaison de l'expression génétique
chez les Pro- et les Eucaryote

- xxx ADN linéaire
- o ADN circulaire
- ~ ARNm
- o ribosome
- chaîne polypeptidique

Figure 1 : mécanismes généraux de la transcription



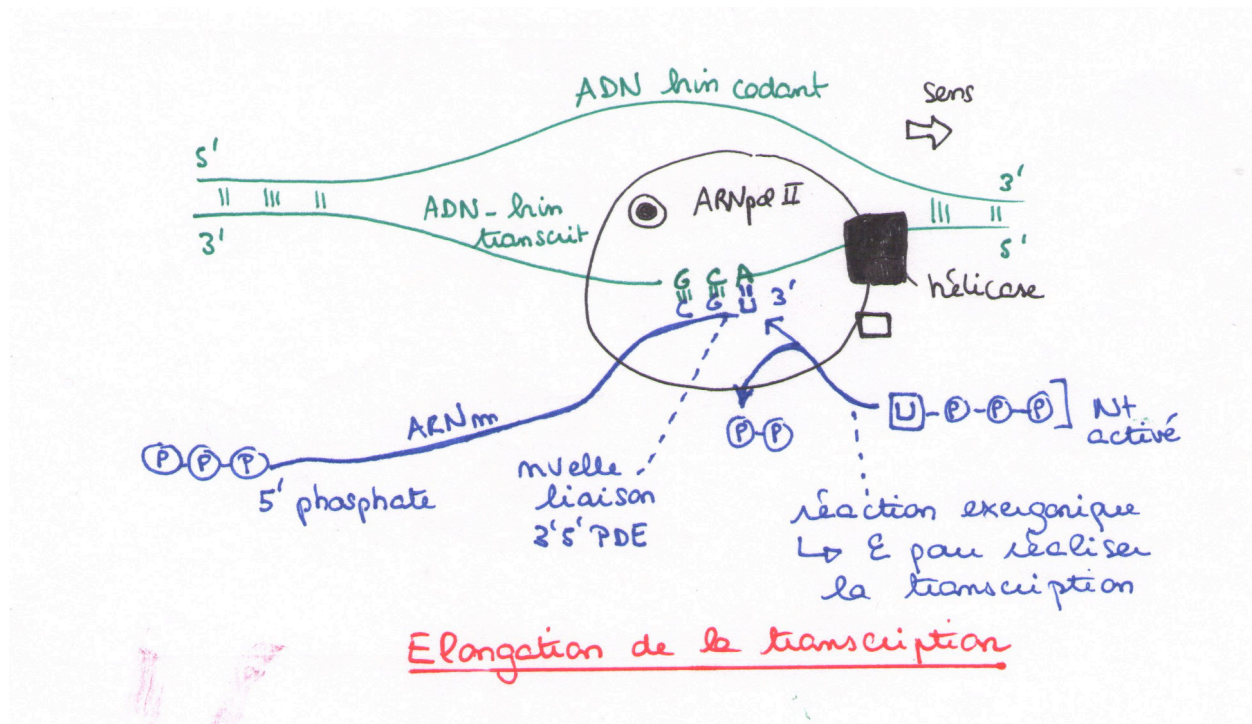
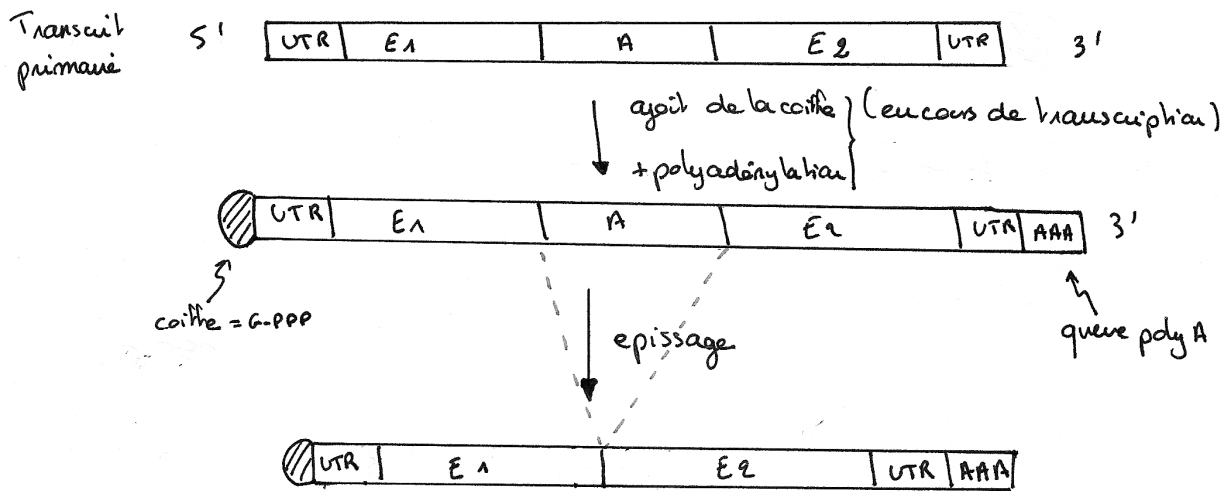


Figure 2 : maturation d'un ARNm eucryote



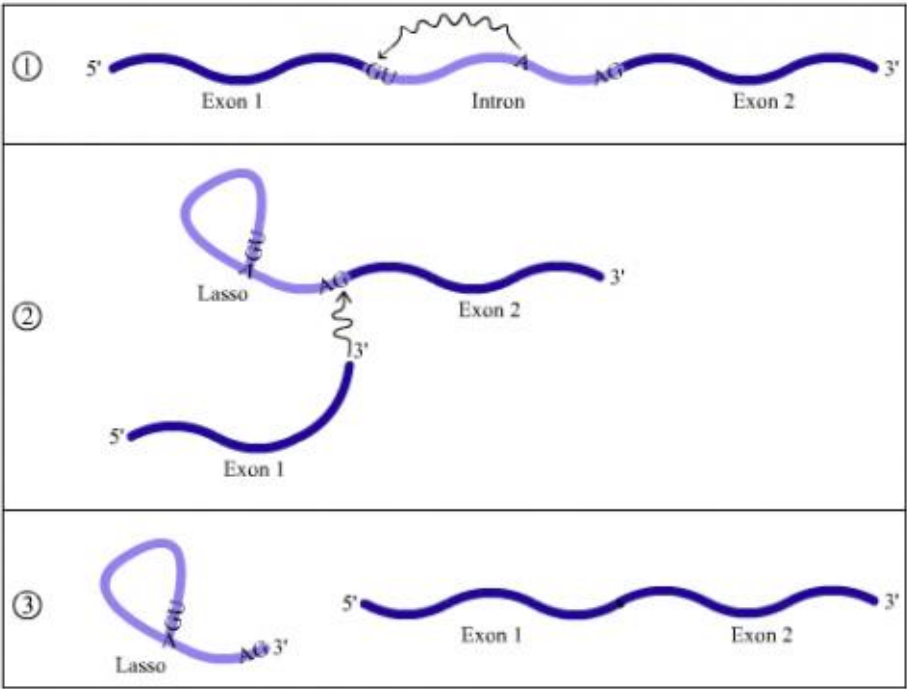
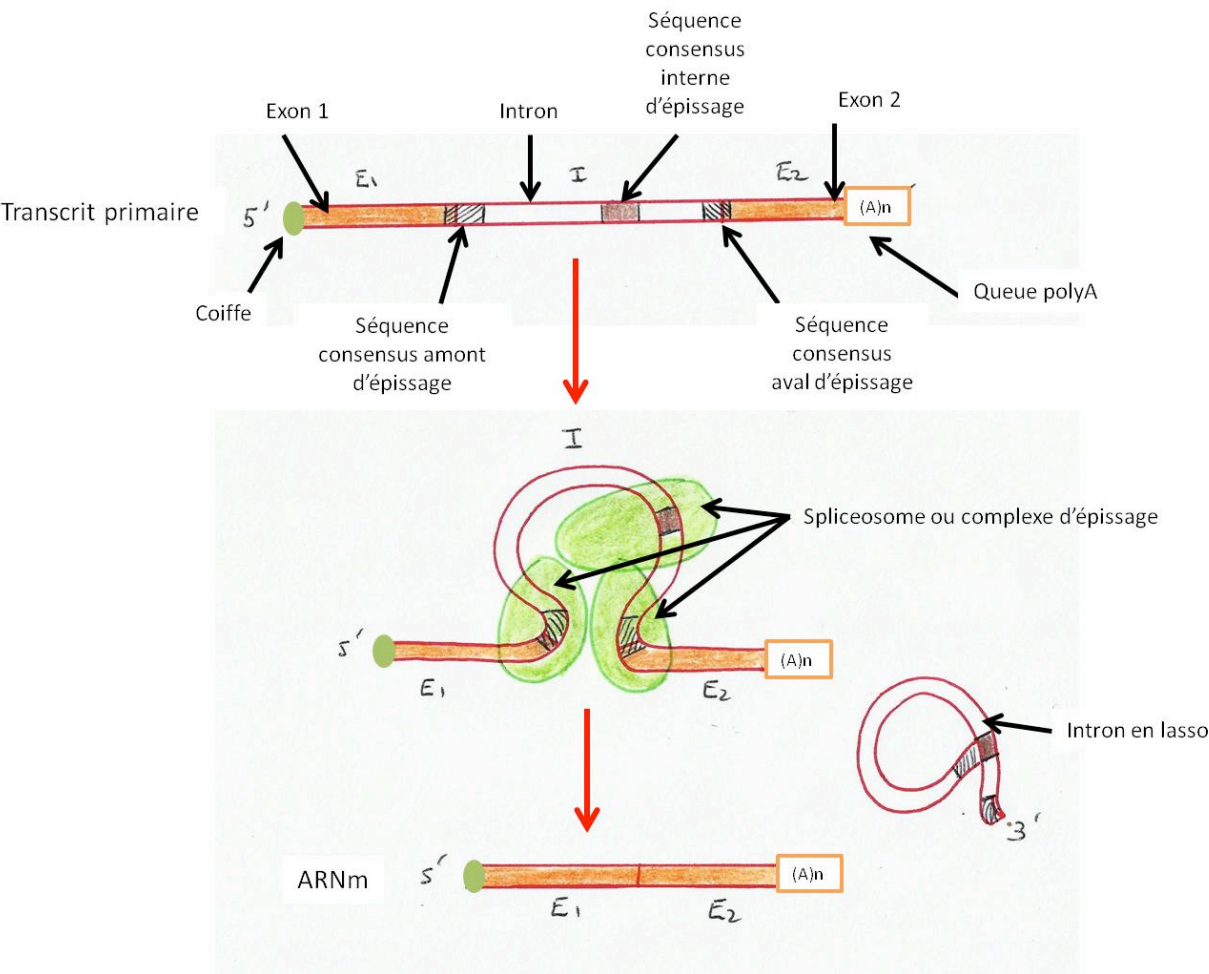


Figure 3 : addition d'une coiffe
(in Bisaillon, Médecine/Sciences 2001)

Elle se forme dès le début de la transcription, dès que 25 nucléotides ont été polymérisés : Cette "coiffe" est une guanosine triphosphate méthylée qui se fixe au premier nucléotide de l'ARNm. Ce nucléotide tri-P (car le premier !) est déphosphorylé puis création d'une liaison inusuelle 5'P – 5' P avec la guanosine monoP méthylée.

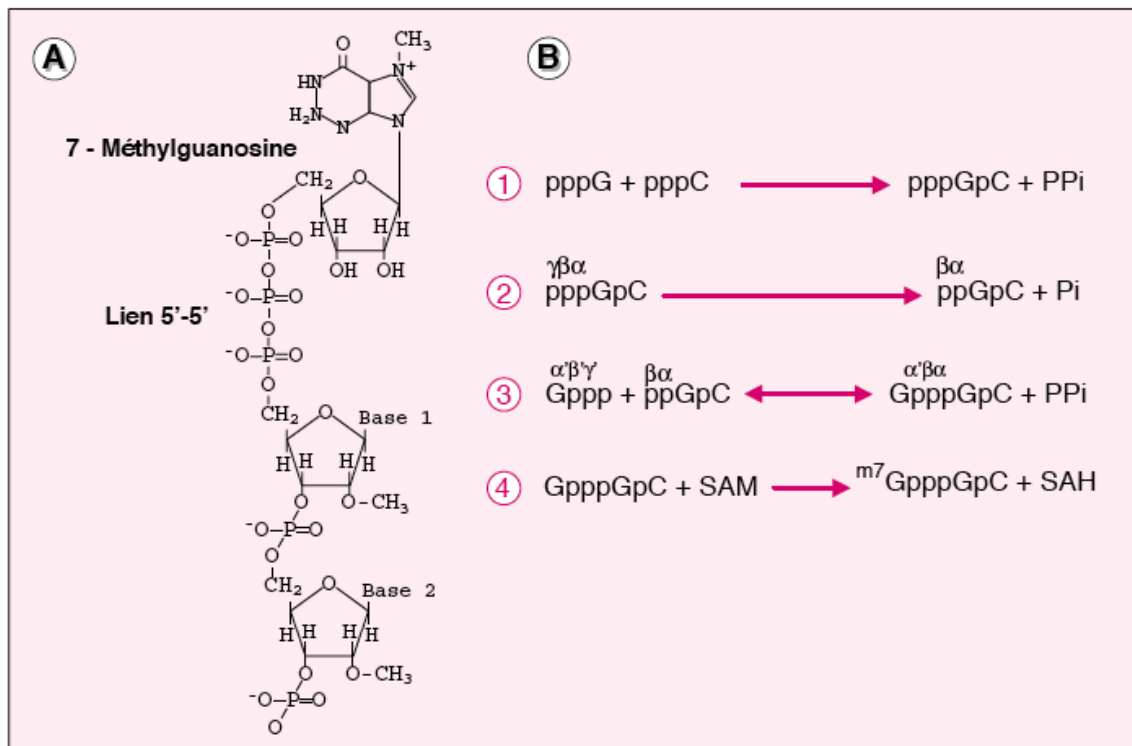
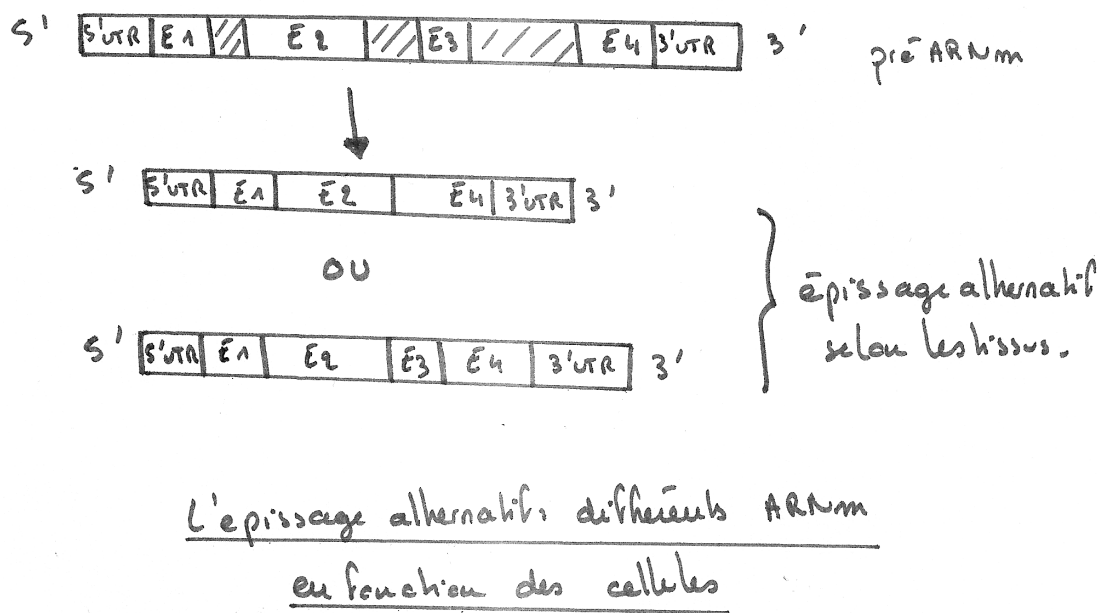


Figure 1. **La structure-coiffe retrouvée à l'extrémité 5' des ARNm eucaryotes.**
A. Un résidu guanosine méthylé en position N7 est relié par un lien caractéristique 5'-5' au premier nucléotide de l'ARNm. Les groupements 2'-hydroxyle des nucléotides adjacents à la structure-coiffe peuvent également être méthylés. **B.** Activités enzymatiques impliquées dans la formation de la structure-coiffe. À la suite de la polymérisation des deux premiers nucléotides par l'ARN polymérase II (1), une ARN 5'-triphosphatase hydrolyse le phosphate γ situé à l'extrémité triphosphorylée des molécules d'ARNm (2); une ARN guanylyltransférase catalyse ensuite l'ajout d'un groupement GMP, conduisant à la formation d'une extrémité possédant un résidu guanosine lié par une liaison 5'-5' au premier nucléotide de l'ARNm (3); enfin, une ARN (guanine-7) méthyltransférase assure la méthylation du résidu guanosine en position N7 (4). SAM: S-adenosyl-L-méthionine; SAH: S-adenosyl-L-homocystéine; Pi: phosphate inorganique; Ppi: pyrophosphate.

Figure 4 : principe de l'épissage alternatif

Un épissage alternatif tissu dépendant conduisant à deux polypeptides aux fonctions différentes : épissage du gène CGRP (Calcitonin Gene Related Product) (ens-lyon)

Le gène est situé sur le chromosome 11. Il s'exprime dans les **cellules C de la thyroïde** où il code pour une hormone, la **calcitonine**, intervenant dans la régulation de la calcémie (hormone hypocalcémiante). Il s'exprime aussi dans de nombreux neurones du système nerveux central et périphérique où il code pour un neuromédiateur, le **CGRP**.

Calcitonine et CGRP ont des rôles physiologiques différents. C'est donc l'exemple d'un gène qui code pour deux protéines différentes suivant le type de cellules où il s'exprime.

Ce gène comprend 6 exons et 5 introns.

Dans les cellules de la thyroïde, l'ARN messenger résultant de l'expression du gène est constitué par l'union des exons 1 à 4. Le système d'épissage est tel que les exons 5 et 6 ne se retrouvent pas dans l'ARNm. Dans les neurones, l'ARNm résultant de l'expression du gène est formé par l'union des **exons 1, 2, 3, 5 et 6**. Il résulte donc d'un épissage qui a fait disparaître **l'exon 4**. On voit donc que le gène est épissé différemment dans les deux types cellulaires.

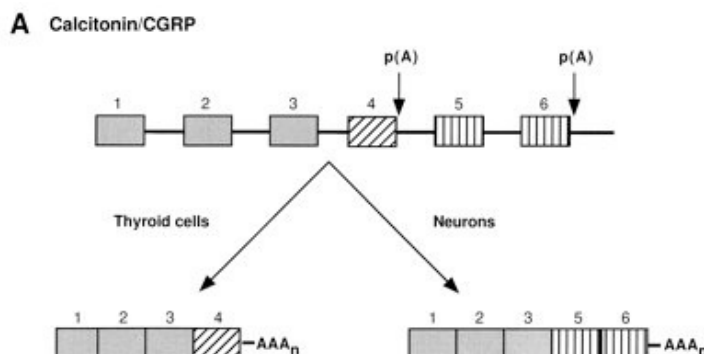
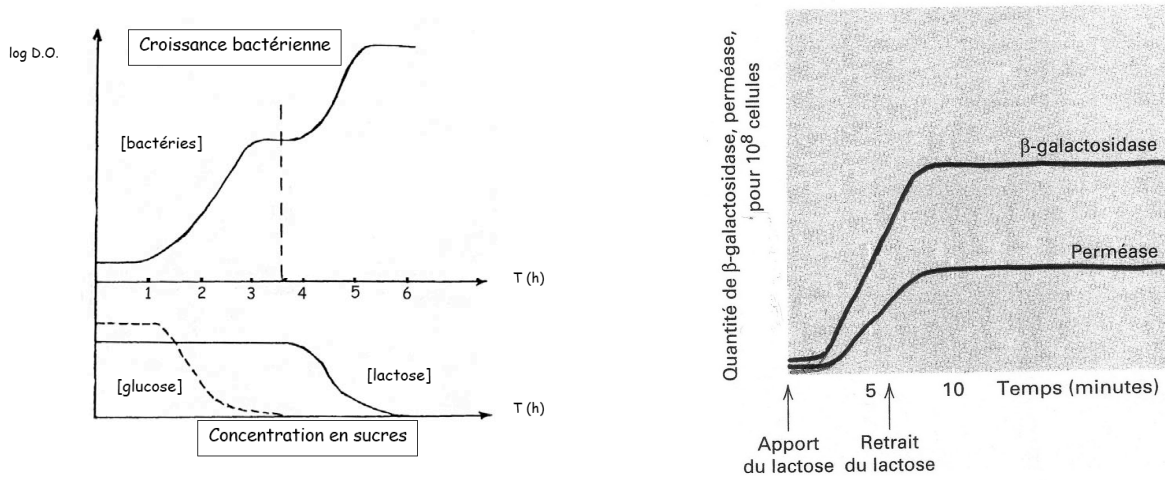


Figure 5 : étude de la croissance d'une population bactérienne sur différents substrats



**Figure 6 : notion d'ARNm polycistronique
Exemple de l'opéron lactose (simplifié)**

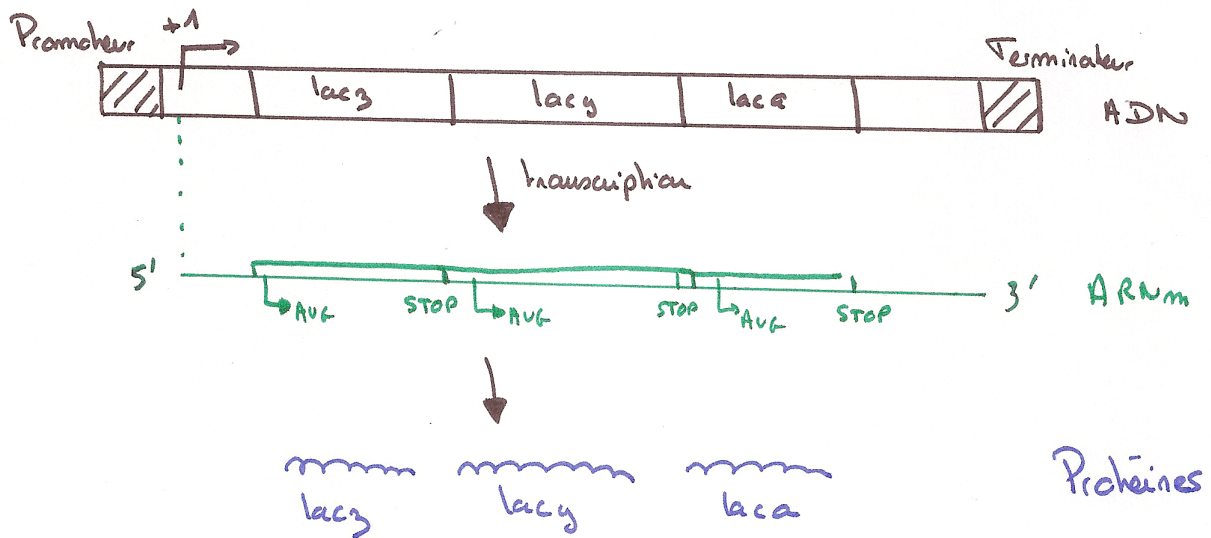
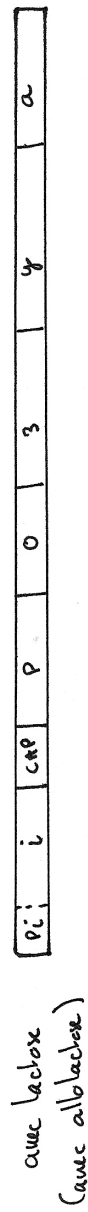
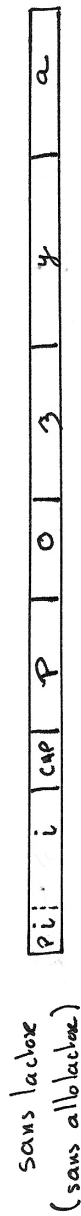


Figure 7 : Organisation fonctionnelle de l'opéron lactose (*E. coli*)



glucose seul

lactose seul

rien

glucose + lactose

BILAN

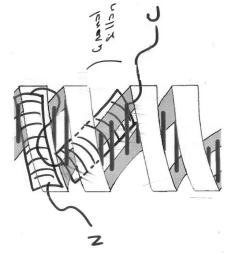
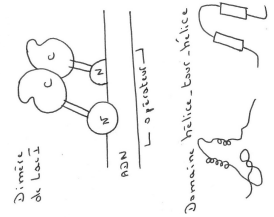


Figure 8 : fixation du dimère de CAP dans 2 grands sillons successifs de l'ADN.

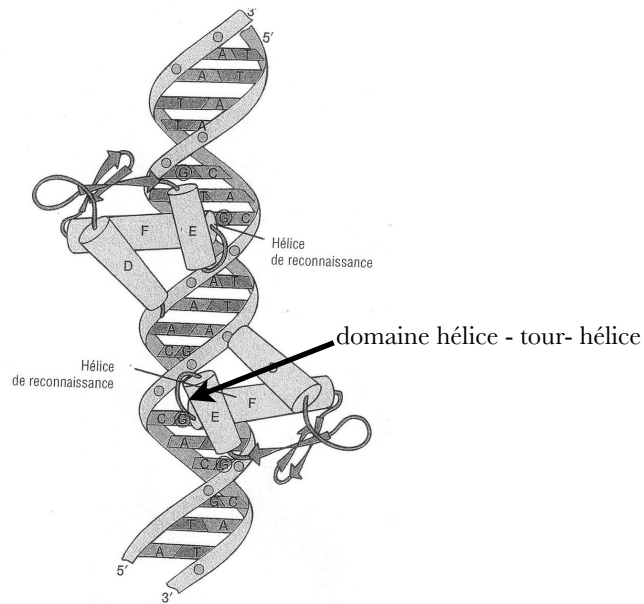
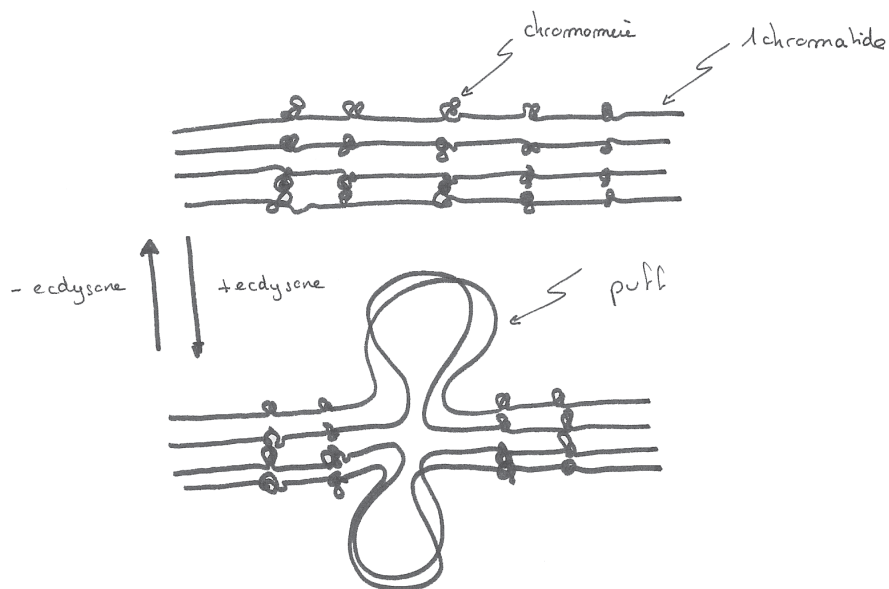


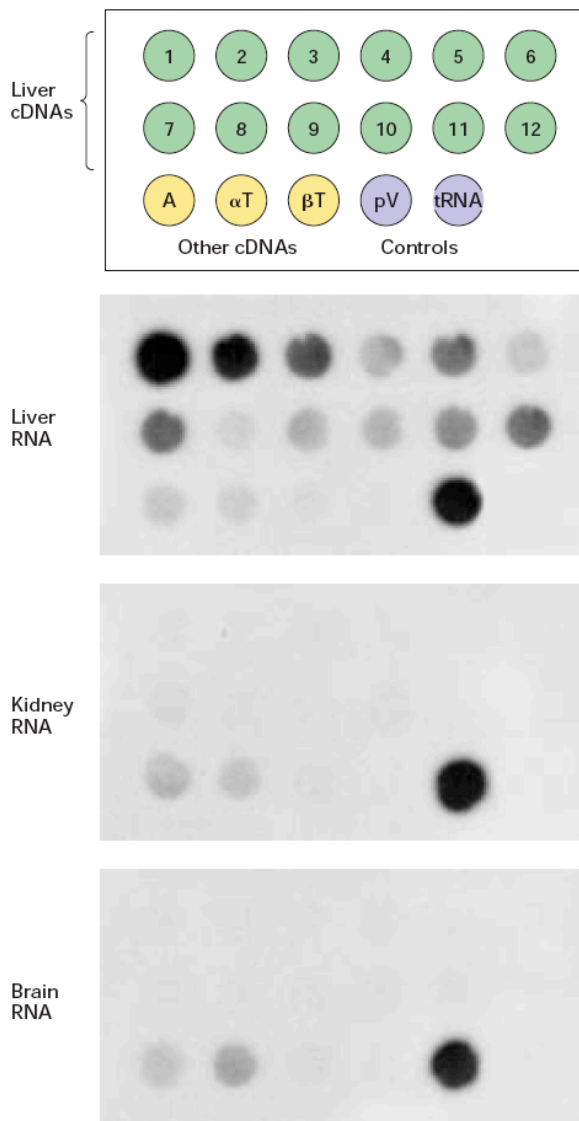
Figure 10 : effet de l'ecdysone sur un chromosome polytenique



Représentation schématique d'un chromosome

polyténique : en haut : organisation du chromosome
 en bas : formation d'un puff à un locus.

Figure 9 : mise en évidence d'une expression différentielle des gènes selon les tissus
(in Lodish et al., 5ème édition)



Measurement of RNA production in various tissues demonstrates that transcription of a given gene generally occurs only in the cell types in which it is expressed. Nuclei from mouse liver, kidney, and brain cells were exposed to ^{32}P -UTP. The three resulting labeled RNA samples were hybridized to separate nitrocellulose membranes; on each membrane was fixed an identical pattern of various cDNAs (*top*). The cDNAs labeled 1–12 (green) encode proteins synthesized actively in liver (e.g., albumin, transferrin) but not in most other tissues. The other cDNAs tested were actin (A) and α - and β -tubulin (αT , βT) (yellow), which are proteins found in almost all cell types. A gene encoding methionine tRNA and the plasmid vector DNA (pV) in which the cDNAs were cloned were included as controls (purple). After removal of unhybridized RNAs, the labeled RNAs complementary to the cDNAs were revealed by autoradiography. RNA from the liver sample hybridized extensively with the cDNAs. Little hybridization is seen for the kidney and brain samples, indicating that genes encoding proteins found in hepatocytes are transcribed in liver cells but not in the cells of the other tissues. [See E. Derman et al., 1981, *Cell* **23**:731, and D. J. Powell et al., 1984, *J. Mol. Biol.* **197**:21.]

Expliquer le principe de l'expérience :

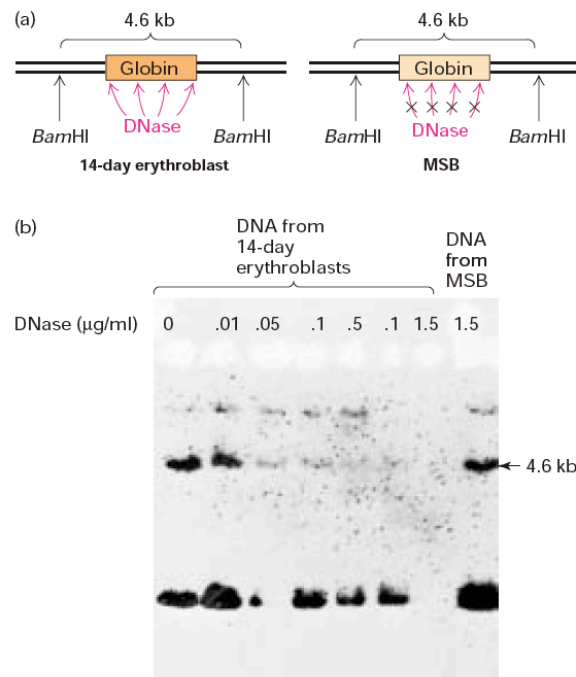
Que montrent les résultats?

Figure 11 : les gènes exprimés sont sensibles à la DNaseI

(in Lodish et al., 5ème édition)

Les expériences sont réalisées à partir de noyaux d'érythroblastes qui expriment le gène de la globine et de noyaux de cellules MSB non différenciées.

- les noyaux purifiés intacts, sont traités pendant un temps court par de **l'ADNase I** (enzyme qui hydrolyse l'ADN) à des concentrations croissantes.
- L'ADN est ensuite extrait des noyaux et soumis à l'action d'une endonucléase de restriction qui libère un fragment de taille connue (4,6kb) contenant le gène de la globine.
- L'ADN digéré est ensuite traité par Southern blot avec une sonde complémentaire du fragment du gène de la globine.



Nontranscribed genes

are less susceptible to DNase I digestion than active genes.

Chick embryo erythroblasts at 14 days actively synthesize globin, whereas cultured undifferentiated MSB cells do not. (a) Nuclei from each type of cell were isolated and exposed to increasing concentrations of DNase I. The nuclear DNA was then extracted and treated with the restriction enzyme *Bam*HI, which cleaves the DNA around the globin sequence and normally releases a 4.6-kb globin fragment. (b) The DNase I- and *Bam*HI-digested DNA was subjected to Southern blot analysis with a probe of labeled cloned adult globin DNA, which hybridizes to the 4.6-kb *Bam*HI fragment. If the globin gene is susceptible to the initial DNase digestion, it would be cleaved repeatedly and would not be expected to show this fragment. As seen in the Southern blot, the transcriptionally active DNA from the 14-day globin-synthesizing cells was sensitive to DNase I digestion, indicated by the absence of the 4.6-kb band at higher nuclease concentrations. In contrast, the inactive DNA from MSB cells was resistant to digestion. These results suggest that the inactive DNA is in a more condensed form of chromatin in which the globin gene is shielded from DNase digestion. [See J. Stalder et al., 1980, *Cell* **19**:973; photograph courtesy of H. Weintraub.]

Résultats prédictibles :

Conclusion + hypothèses:

Figure 12a : Les histones peuvent subir des modification post-traductionnelles
(Annabelle Gérard et al., 2004)

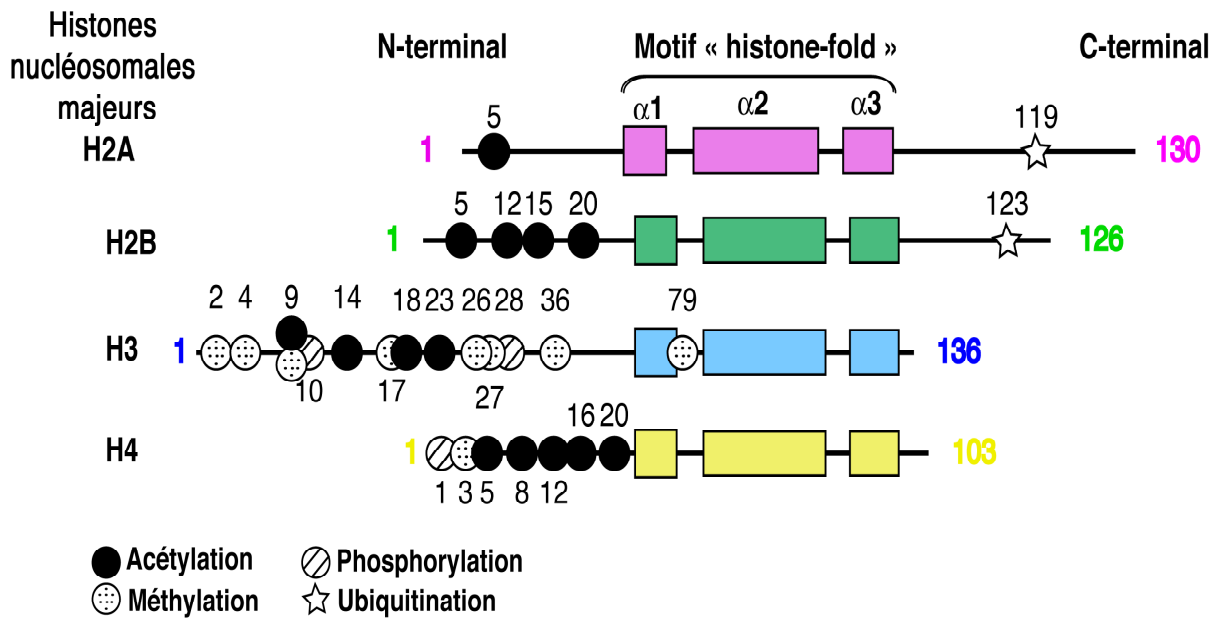


Figure 12b : les queues N-terminales des histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles

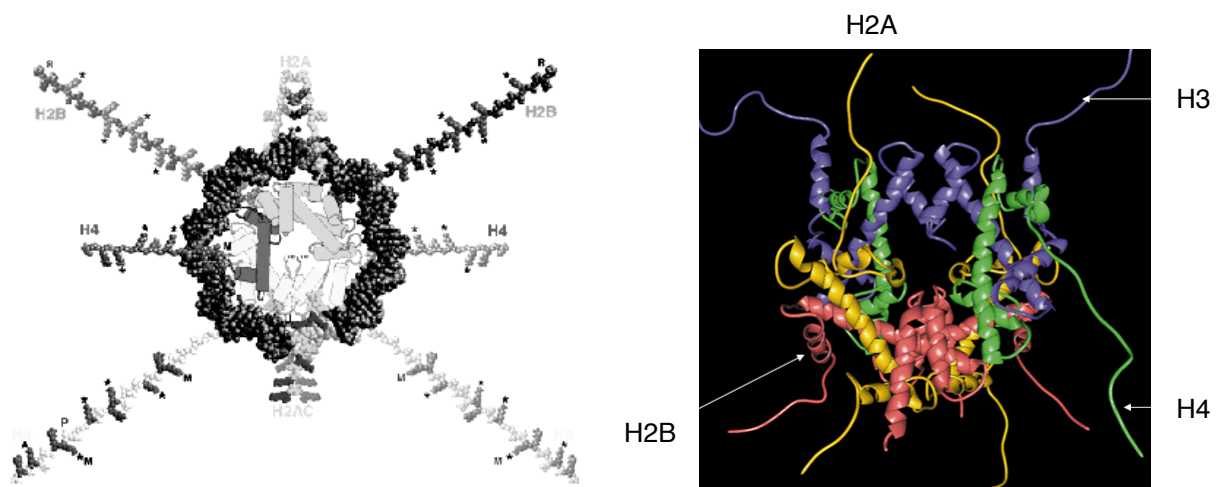


Figure 13 : contrôle de l'expression du gène flc et floraison
(in Medecine Sciences, 2005, 21)

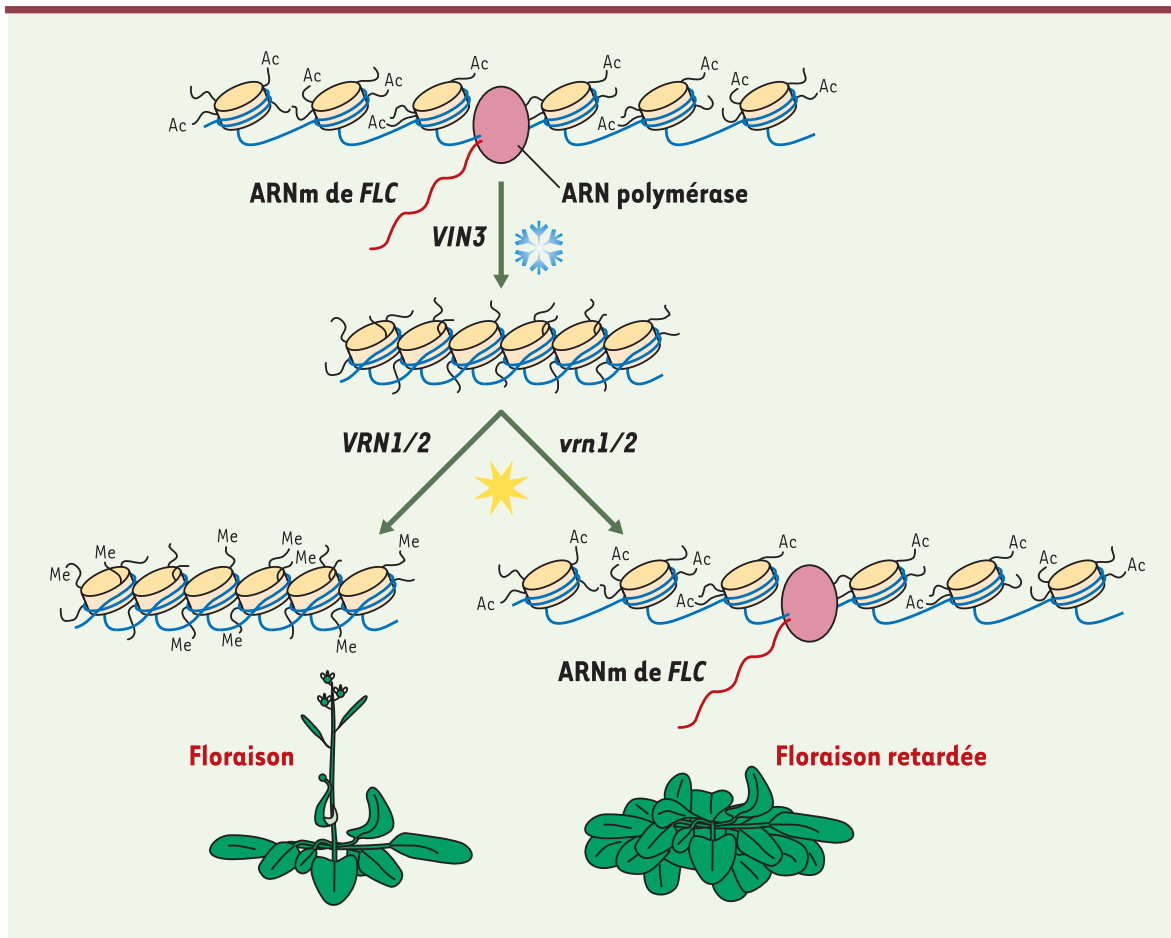


Figure 2. Modèle de répression du gène FLC par la vernalisation. En l'absence de vernalisation, le répresseur floral FLC (*FLOWERING LOCUS C*) est dans une configuration chromatinienne « ouverte » caractérisée par une hyperacétylation des histones H3 et H4 et une forte expression. Lors d'un traitement par le froid, l'expression du gène VIN3 (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) est induite et conduit à la désacétylation des histones H3 et H4 au locus FLC et à son inactivation. La répression transcriptionnelle de FLC, qui n'est que transitoire à ce stade, est maintenue par le complexe VRN1/2 (*VERNALISATION 1* et 2) impliqué dans l'ajout de groupements méthyles sur les lysines 9 et 27 de l'histone H3. C'est le maintien de cette inactivation qui permettra une floraison précoce lors de l'allongement des jours et de l'augmentation de la température. En contexte mutant *vrn1* ou *vrn2*, la répression de FLC n'est pas maintenue après vernalisation, ce qui conduit à un retard de la floraison.

Figure 14 : le code histone

L'expression d'un gène va dépendre en partie de la combinatoire des modifications post-traductionnelles des queues N-terminales de histones



Figure 15: expression des globines au cours du développement de l'homme

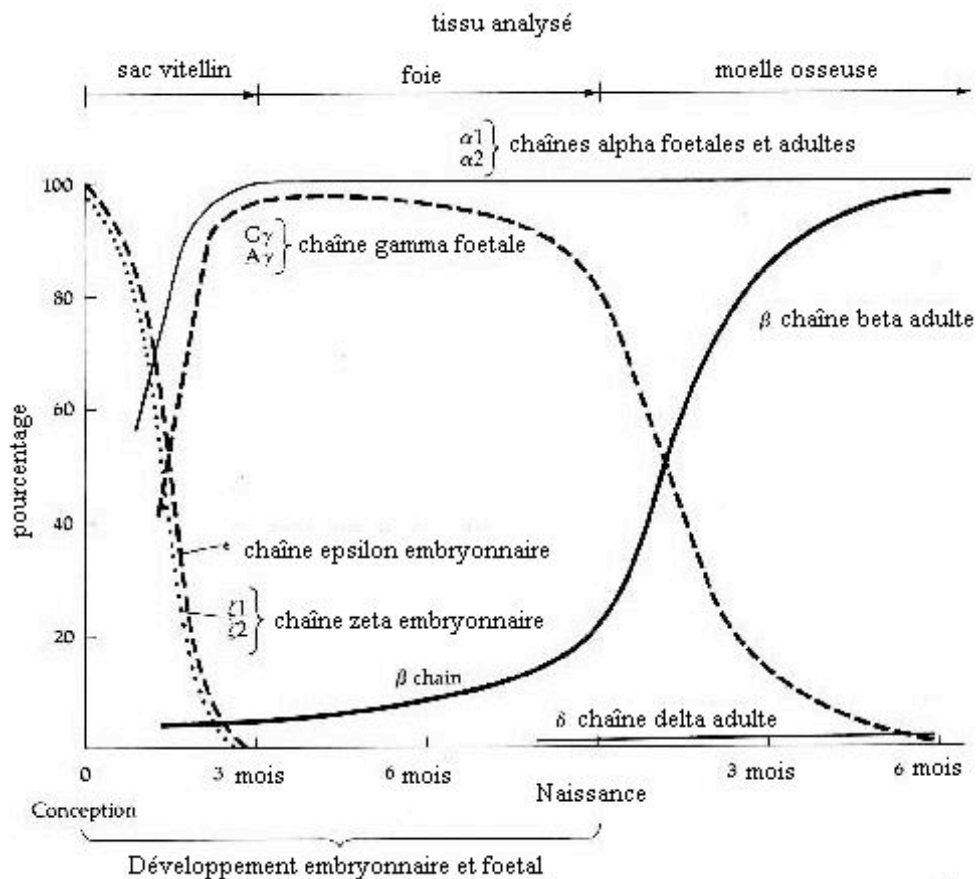


Figure 16 : la méthylation inhibe la transcription via 2 mécanismes

La méthylation des CpG entraîne la répression de la transcription via 2 mécanismes :

- **Effet direct** : en inhibant la fixation de la machinerie de transcription
- **Effet indirect** : fixation de répresseurs qui reconnaissent spécifiquement les îlots CpG méthylés

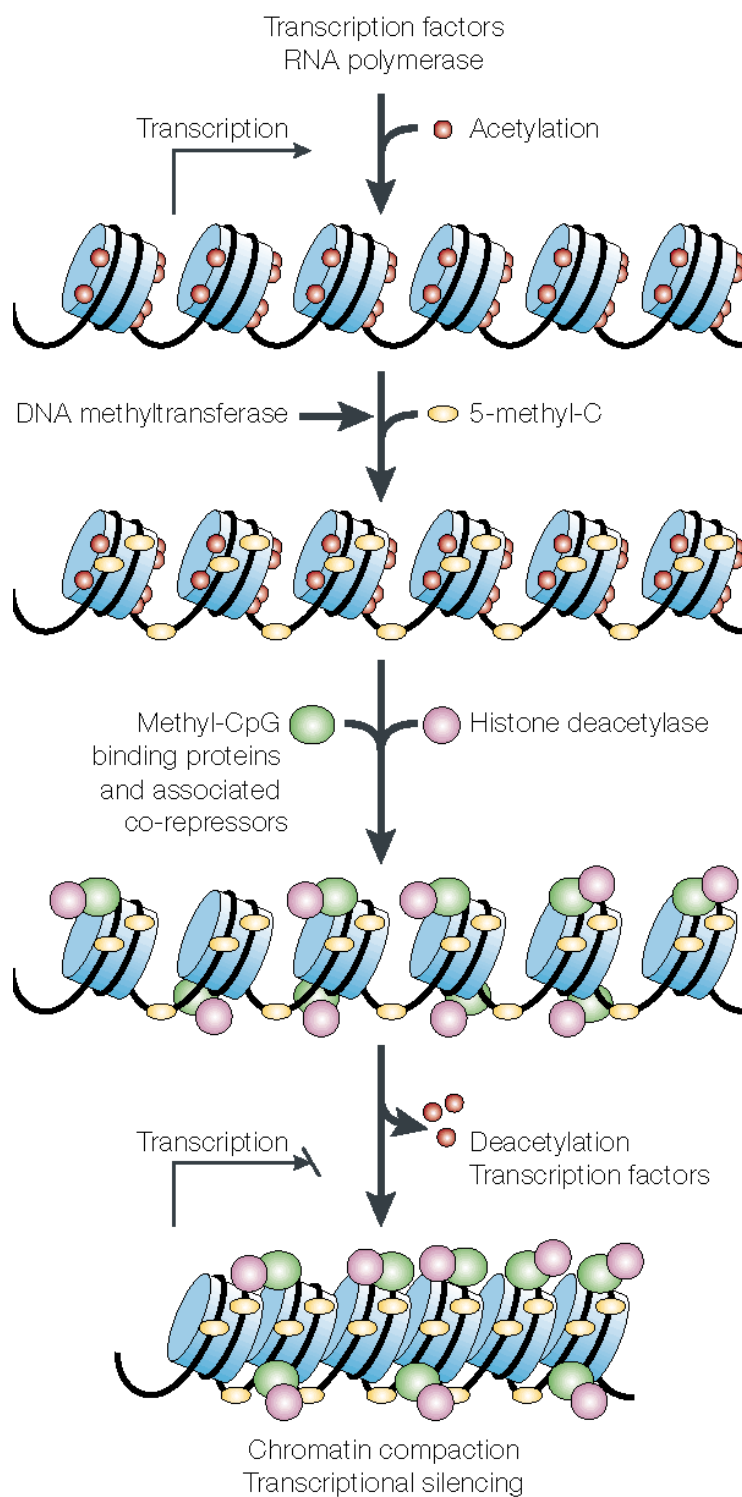


Figure 17 a : génétique / épigénétique

Génétique

Mutations

Changement de la séquence d'ADN
Non réversible

Epigénétique

Héritable

Stable

Changement dans l'expression des gènes
Potentiellement réversible

L'empreinte parentale

On suppose habituellement que les gènes que nous avons hérités de notre mère et de notre père sont équivalents. En fait les lois de Mendel (et le carré de Punnett utilisé pour les enseigner) reposent bien sur cette supposition : peu importe qu'un gène provienne d'un spermatozoïde ou d'un ovule. Et pourtant on connaît plus de trente gènes, chez les mammifères, pour lesquels *c'est important*. Dans ces cas, c'est soit le gène maternel, soit le gène paternel qui est fonctionnel. Cela signifie qu'un état pathologique grave et parfois mortel peut survenir lorsqu'une mutation provient d'un des parents, alors que, transmise par l'autre, elle aurait été inoffensive. Cela signifie également que les deux chromosomes parentaux sont indispensables au développement normal (nous en reparlerons au Chapitre 7).

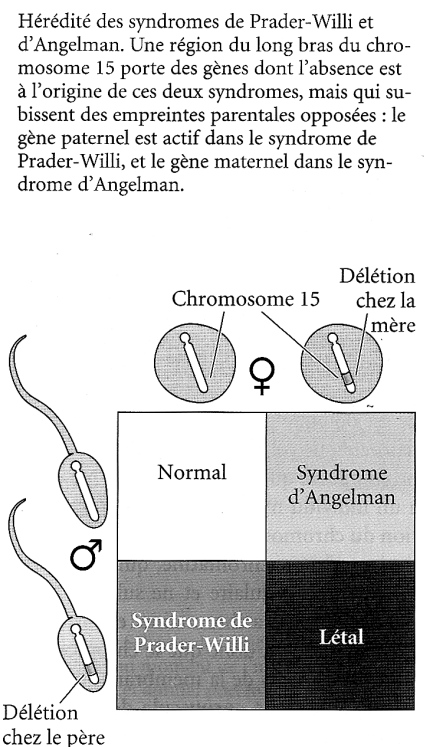
Par exemple, chez la souris, le gène *Igf-2* (qui encode le facteur de croissance apparenté à l'insuline II, insulin-like growth factor II, IGF II) est situé sur le chromosome 7, et n'est actif que si celui-ci a été hérité du père. Par contre, le gène du récepteur du même peptide, *Igf-2r*, n'est actif que si le chromosome 17, sur lequel il se trouve, provient de la mère (Barlow et al. 1991 ; DeChiara et al. 1991 ; Bartolomei et Tilghman 1997). Ce récepteur sert à capter et à dégrader l'excès d'IGF II. Si le gène *Igf-2r* provient du père, il y a formation d'un fœtus normal, mais s'il provient de la mère

le fœtus va peser 30% de plus que normalement et mourra vers la fin de la gestation⁶.

Chez l'être humain, la délétion d'un segment déterminé du long bras du chromosome 15 entraîne des anomalies différentes selon que celui-ci est de provenance paternelle ou maternelle (Figure 5.20). Dans le premier cas on a affaire au syndrome de Prader-Willi, qui comprend obésité, petite taille, retard mental modéré et hypogonadisme. Si, en revanche, le chromosome anormal est d'origine maternelle, l'enfant est atteint du syndrome d'Angelman : déficience mentale très grave, crises convulsives, mutisme, sourire et rire permanents (Knoll et al. 1989 ; Nocholls et al. 1998). (Note de Traducteur : c'est le « syndrome de la marionnette joyeuse »).

C'est la méthylation des cytosines de l'ADN qui fait qu'un gène est exprimé ou non (Arney et al. 2001). Dans les cellules germinales primordiales, précurseurs des gamètes, l'ADN n'est pratiquement pas

6. L'excès de poids est dû à l'excès d'IGF II. La mort a pour origine probable des anomalies de fonctionnement des lysosomes, car IGF-IIIR est également utilisé par les cellules pour orienter les enzymes lysosomiques vers leur destination finale. Chez l'homme, la méthylation aberrante de IGF2 est responsable du syndrome de Beckwith-Wiedemann.



méthylé (Monk et al. 1987 ; Driscoll et Migeon 1990). Une méthylation étendue apparaît au cours de la maturation, mais il arrive qu'elle affecte un gène différemment selon qu'il se trouve dans un oocyte ou un spermatozoïde. Cette méthylation différentielle peut s'observer directement dans les chromosomes des cellules embryonnaires (Sanford et al. 1987 ; Chaillet et al. 1991 ; Kafri et al. 1992). C'est la méthylation d'une partie de l'amplificateur du gène *Igf2* qui détermine si ce gène est oui ou non exprimé, or elle diffère dans l'œuf

et dans le spermatozoïde. Chez l'être humain, selon que le chromosome 15 est d'origine maternelle ou paternelle, les régions méthylées sont différentes ainsi que l'expression de certains gènes : c'est ce qui fait la différence entre les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman (Zesching et al. 1997 ; Ferguson-Smith et Surani 2001). On appelle **empreinte parentale** (« genomic imprinting ») le fait que l'origine maternelle ou paternelle d'un gène puisse être déterminée.

Figure 17 b: inactivation de l'un des deux chromosome X chez les Mammifères femelles

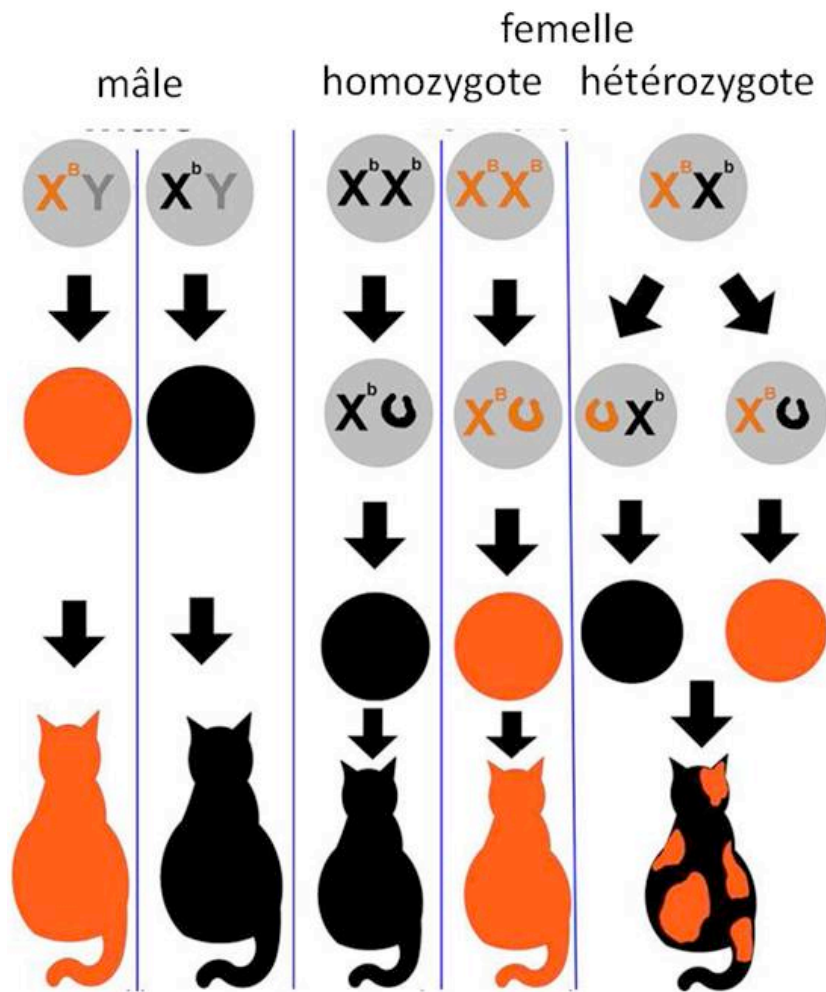


Figure 18 : rôles de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones

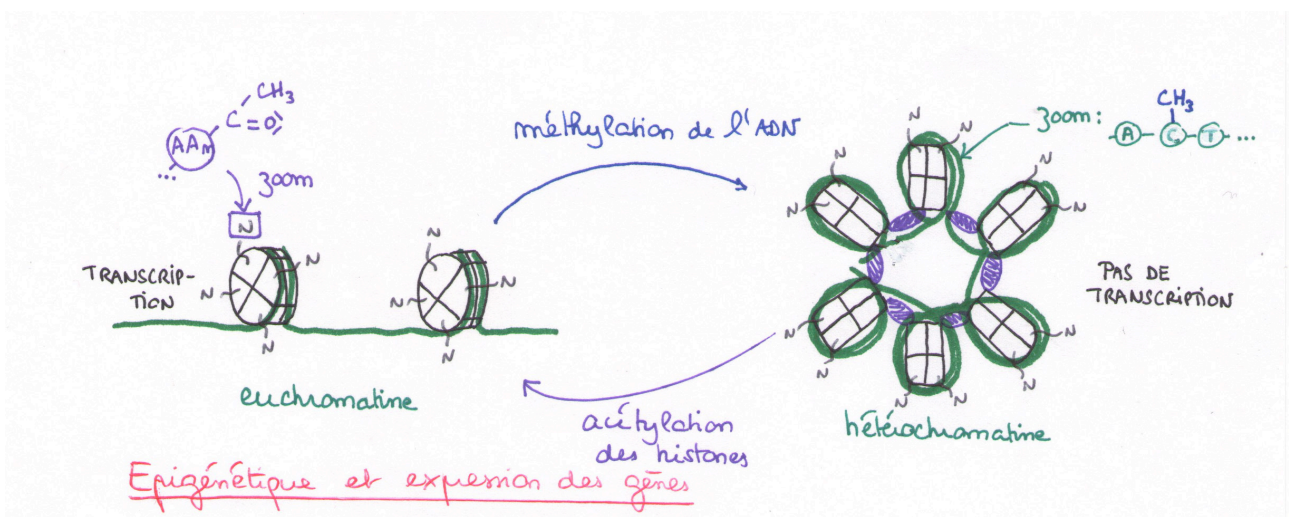
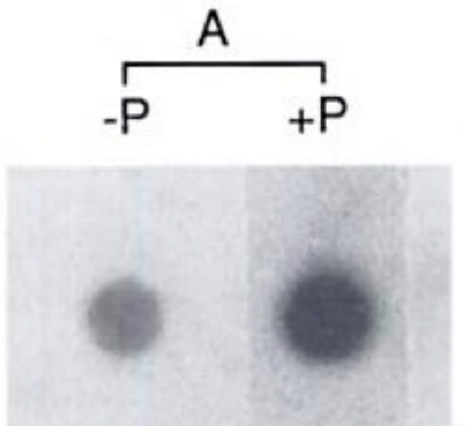


Figure 19 : mise en évidence d'un contrôle transcriptionnel

On étudie l'effet de la prolactine sur l'expression du gène de la β -caséine sur des cellules de glandes mammaires de souris en culture.

Les cellules ont cultivées avec ou sans prolactine. On quantifie l'ARNm de la B-caséine (technique de puce).



Conclusion + hypothèses:

Figure 20 : enhancer et silenseur sont des séquences régulatrices

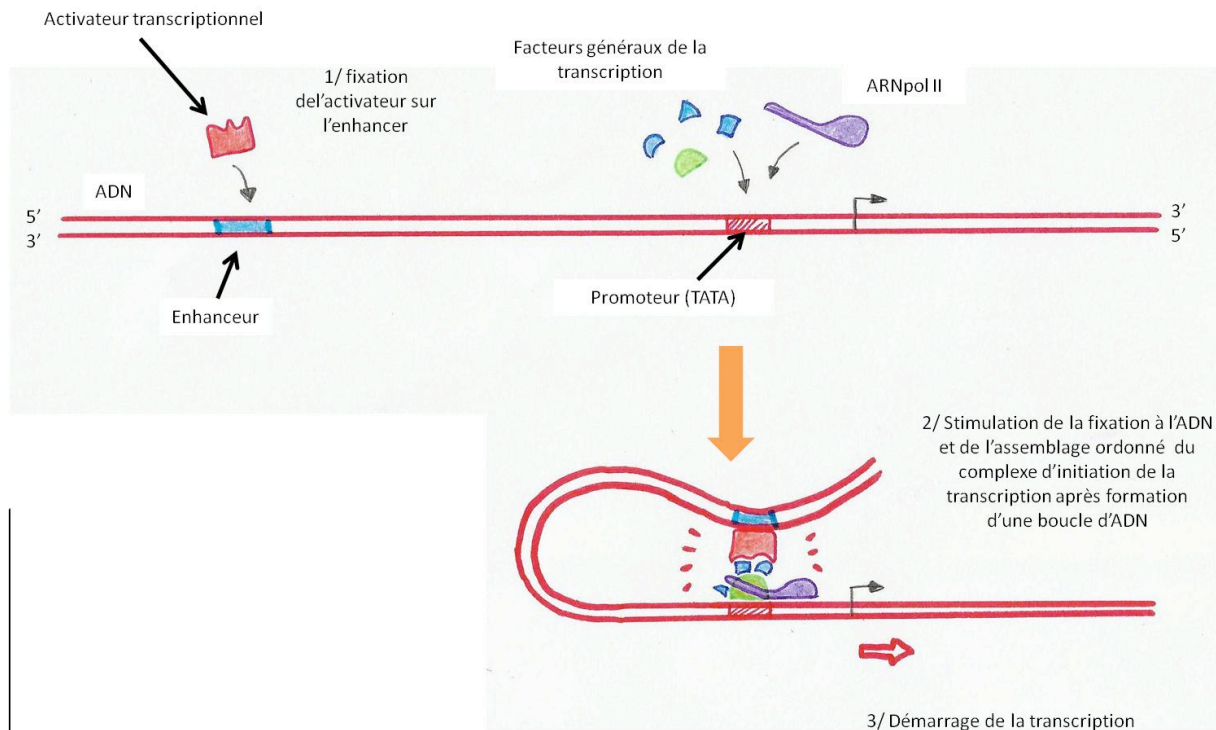


Figure 21 : bilan du contrôle de l'expression chez les Eucaryotes

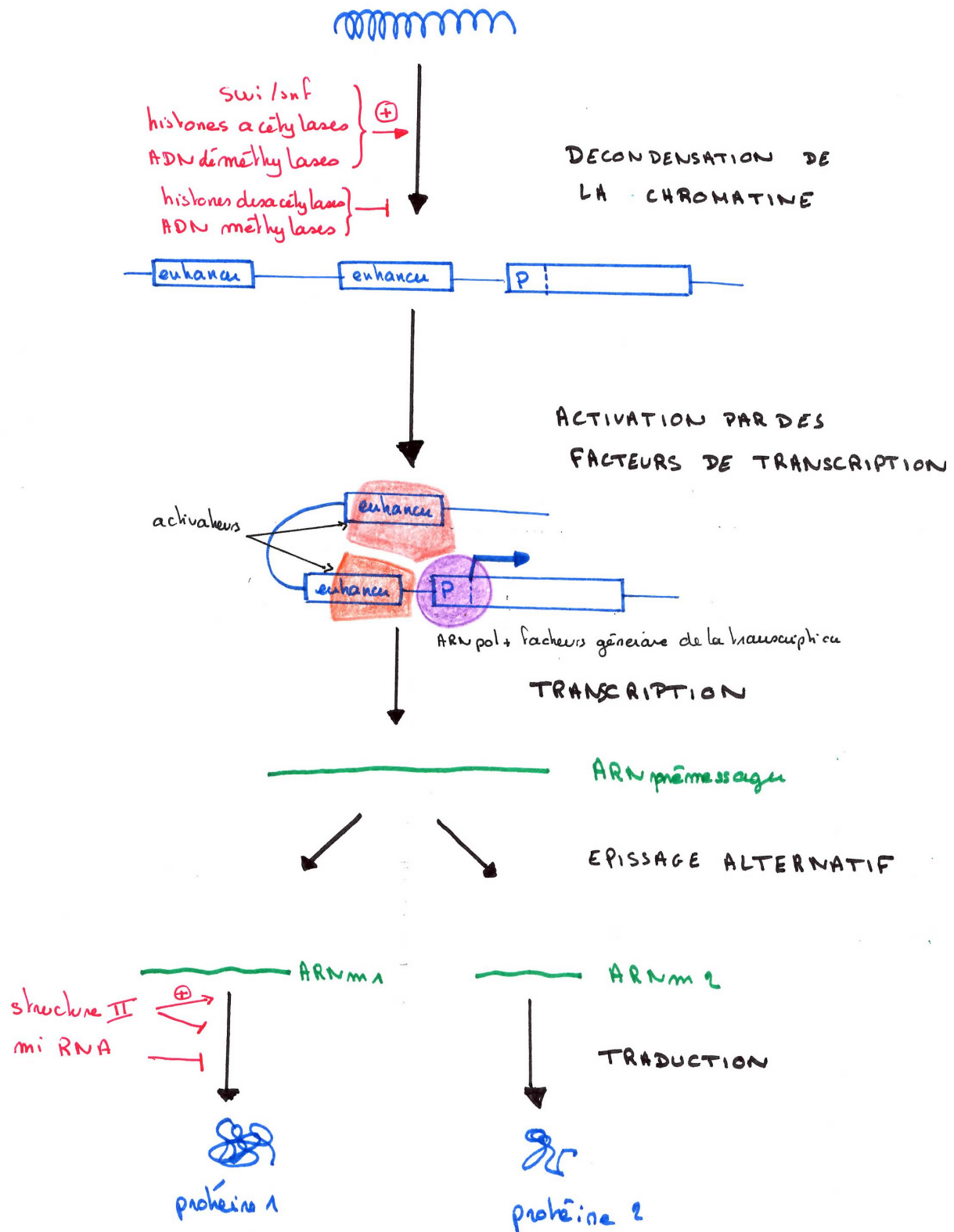
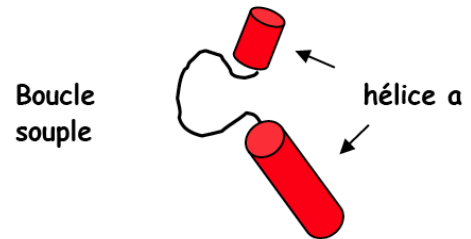


Figure 22 : structure des protéines qui se lient à l'ADN

Une protéine régulatrice reconnaît une séquence spécifique de l'ADN parce que sa **surface** est fortement **complémentaire de la surface de la double hélice** du gène → importance de l'interaction ADN-protéine, imptce de la structure III des protéines, des liaisons faibles etc...
Quels motifs permettent une fixation spécifique = une reconnaissance de séquence?

➤ **Motif hélice-tour-hélice:** deux hélices α reliées entre elles par une courte chaîne d'acide aminé. C'est un des motifs les plus simples et les plus communs : ce motif est également appelé **homéodomaine** (cas du répresseur du phage lambda)



➤ **Motif doigt de zinc:**

Une hélice α associée à 2 feuillet β par l'intermédiaire d'un atome de zinc. L'hélice α entre en contact avec l'ADN au niveau du grand sillon.

Les protéines activatrices de la transcription des ARN ribosomiques eucaryotes ont des motifs de ce type, les récepteurs aux hormones stéroïdes (oestrogènes par ex) aussi. Selon les facteurs, le nombre de doigts varie de 2 à plus de 60.

➤ **Motif glissière à leucine:**

Ce motif permet la dimérisation des facteurs, souvent nécessaire à l'activation de la transcription.

Mécanisme : ces facteurs possèdent des leucines tous les 7 résidus au niveau d'hélices α : les leucines sont des aa hydrophobes et leur présence tous les 7 aa permet la formation d'une hélice hydrophobe sur un de leur côté. Deux facteurs pourront ainsi s'associer au niveau de leur hélice par répulsion hydrophobe. Cette structure est appelée **fermeture éclair à leucine** ou **leucine zipper**.

2 hélice α s'imbrique pour former un Y à l'envers qui enserre l'ADN au niveau d'un grand sillon comme une sorte de pince à linge.

(in Gilbert, 5ème Edition, De Boeck)

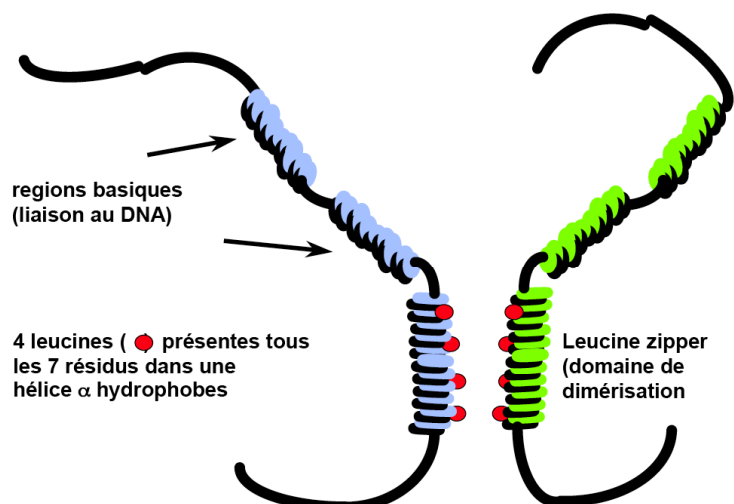


Figure 23 : Rôle des si et mi RNA
| Cell Research, 15(11-12):935-946, Nov-Dec 2005

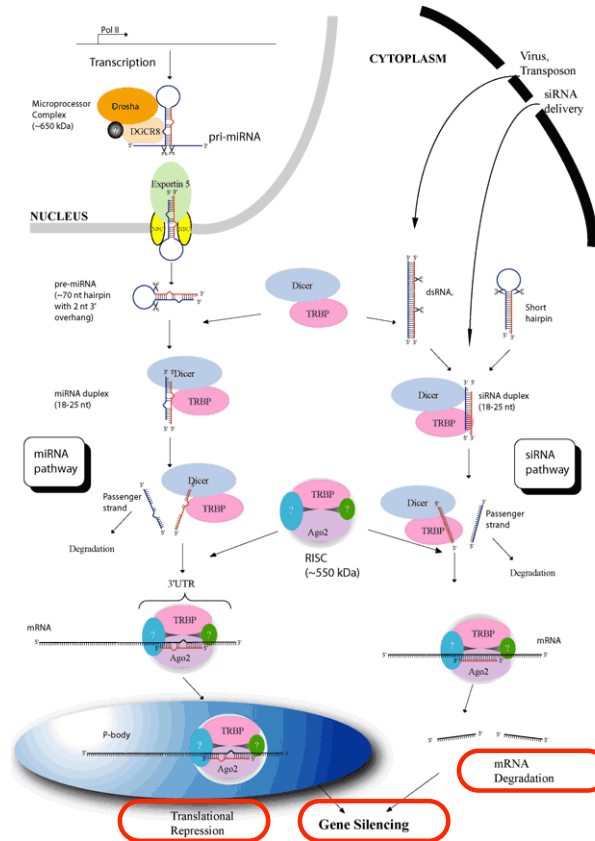
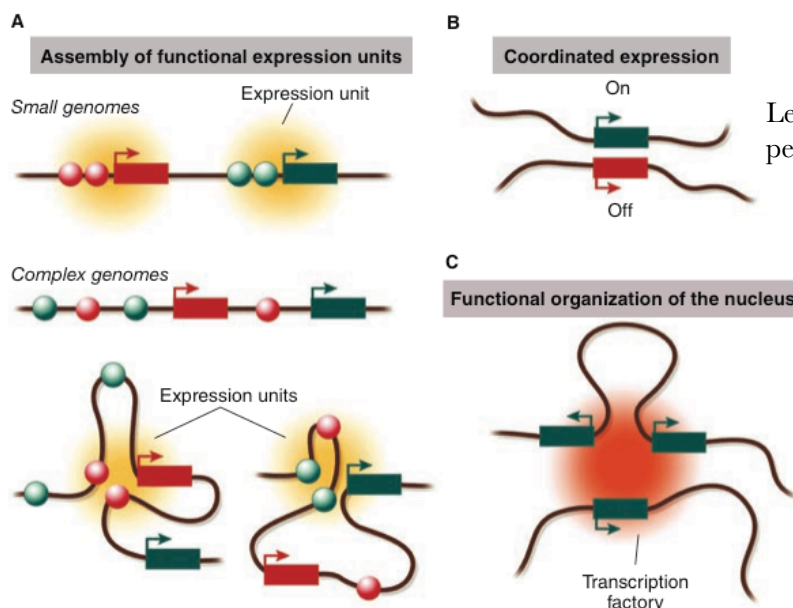


Figure 24 : contrôle de l'expression en 3D
(in Dekker, Science VOL 319, mars 2008)



Le déplacement de l'ADN dans le noyau peut permettre :

- de mettre en relation des séquences codantes avec des séquences régulatrices (A en bas))
- de regrouper dans une région riche en enzymes et facteurs de transcription différents gènes soumis à une même régulation (C)

Fig. 1. Spatial assemblies. (A) Linearly defined expression units in compact genomes and spatially assembled expression units in complex genomes. (B) Association between coordinately expressed genes. (C) Colocalization of genes at subnuclear structures, such as transcription factories. Circles, regulatory elements; rectangles, genes. Arrows indicate direction of transcription.

CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL

Facteurs de transcription

Méthylation de l'ADN

Accessibilité de la chromatine

CONTROLE POST-TRANSCRIPTIONNEL

Fact. de transcription "vrais"

Activateur $\oplus$ / Represseur $\ominus$



Fixation à un site silencieux par un motif

doigts de zinc
hélice-hélice
hélice-boucle-hélice

• sites CpG
• déméthylation $\oplus$ transcription (CNS mais pas CNS)

• Modifications post. traductionnelles

des histones

acétylation H3 $\oplus$
phosphorylation H3 $\oplus$
méthylation H3 $\ominus$

• Remodelage de la chromatine (SWI, SRF, ATP)

• Position du gène dans le noyau

• Fact. recrutant des complexes de remodelage de la chromatine

• maturation de l'ARNm $\rightarrow$ épissage alternatif

• stabilité de l'ARNm (structure II)

• expression traduction par ARN

• activation de la protéine.