

Transcription

BIOL201

Daniel Gautheret

daniel.gautheret@u-psud.fr

- Chapitre 1: Transcription et RNA polymérase
- Chapitre 2: Initiation, élongation et terminaison
- Chapitre 3: Régulation: l'exemple procaryote
- Chapitre 4: Maturation de l'ARN chez les eucaryotes

Chapitre 1

Transcription et RNA polymérase

L'intuition de la transcription

Chez les eucaryotes:

ADN dans le noyau



Machinerie de synthèse dans
le cytoplasme

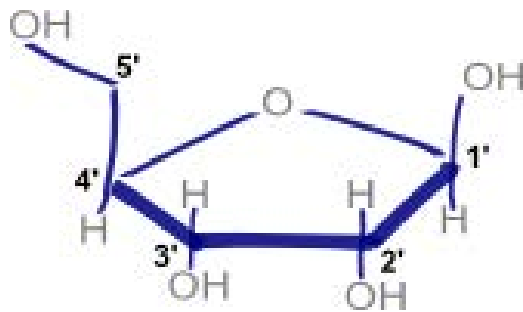
Hypothèse d'un l'intermédiaire ARN

Étapes-clé de la découverte de l'ARN messenger

- 1957: concept d'un « adaptateur ARN » (Crick)
- 1956-57: Découverte progressive d'une nouvelle fraction d'ARN, polymorphe
- 1959-60: découverte d'une « ARN polymérase » capable de synthétiser de l'ARN à partir d'ADN.
- 1961. Mise au point des techniques d'hybridation ADN-ARN sur filtre de nitrocellulose. -> l'ARN est complémentaire d'un seul brin d'ADN
- 1961. Démonstration de l'existence d'un ARN messenger (Jacob & Monod)
- 1961. Purification d'ARN polymérase bactérienne et synthèse *in vitro* d'ARN à partir de matrice ADN

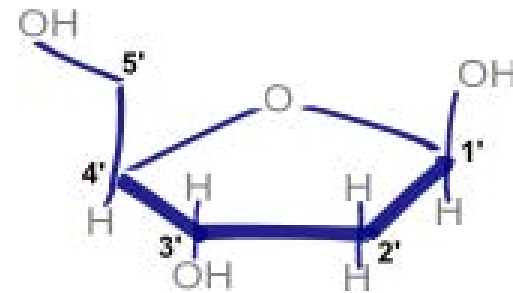
Rappel: différences ADN/ARN

ARN



ribose

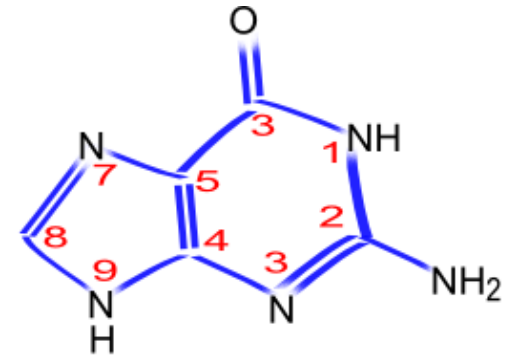
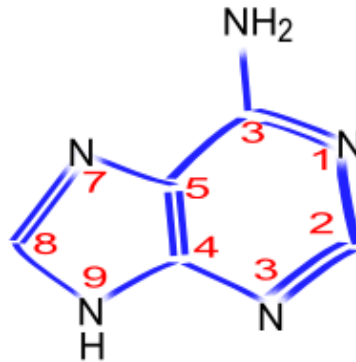
ADN



désoxyribose

Bases de l'ADN et de l'ARN

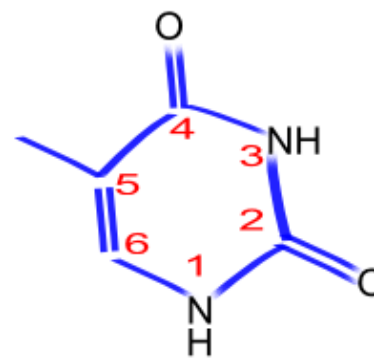
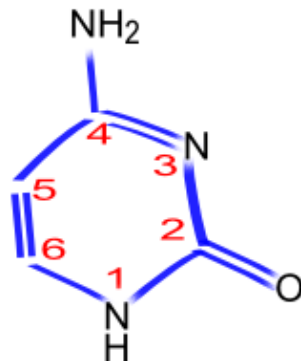
Base puriques



ADN: T

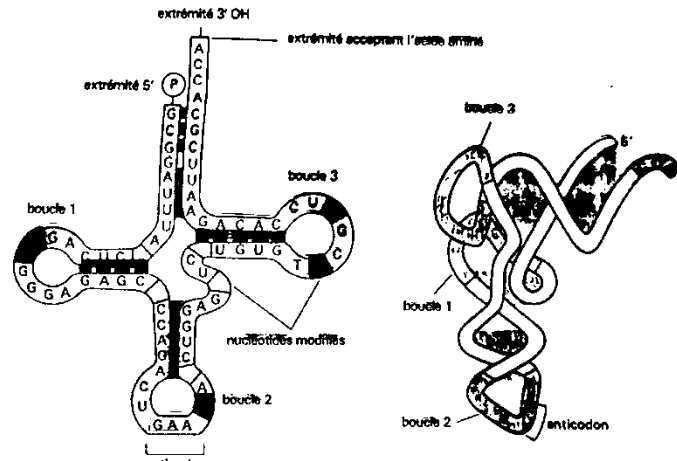
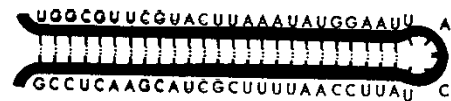
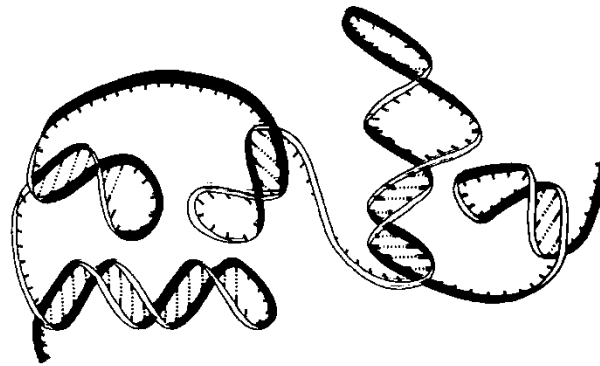
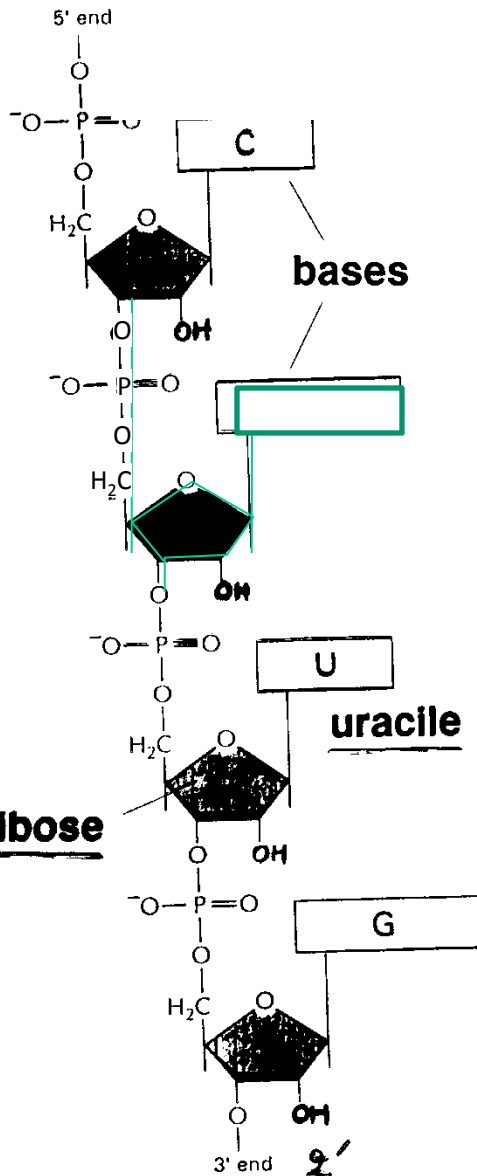
ARN: U

Base pyrimidiques

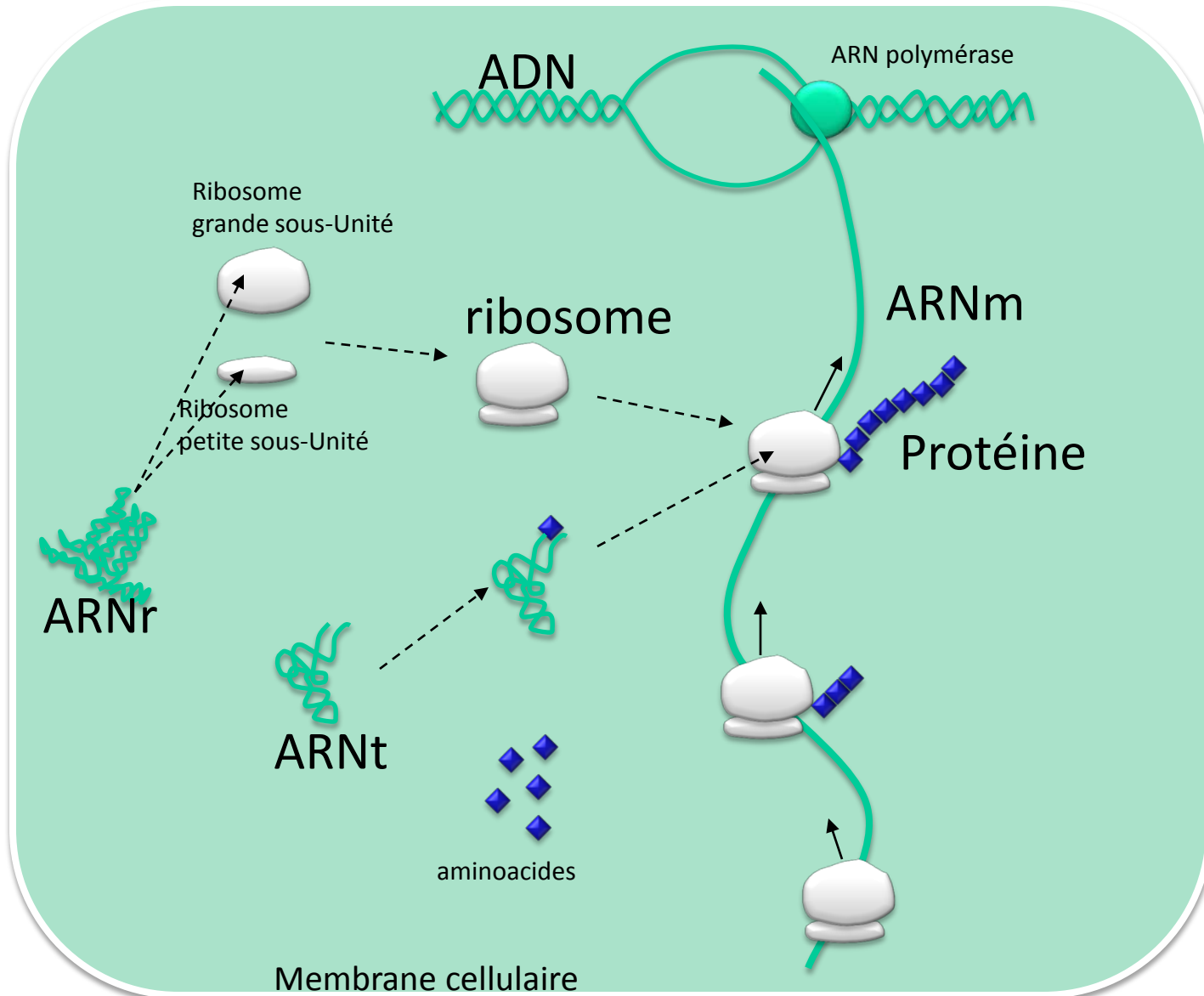


Structure des ARN

- Molécule ordonnée linéaire
- Orientée 5'P->3'OH
- Grand nombre de structures secondaires possibles



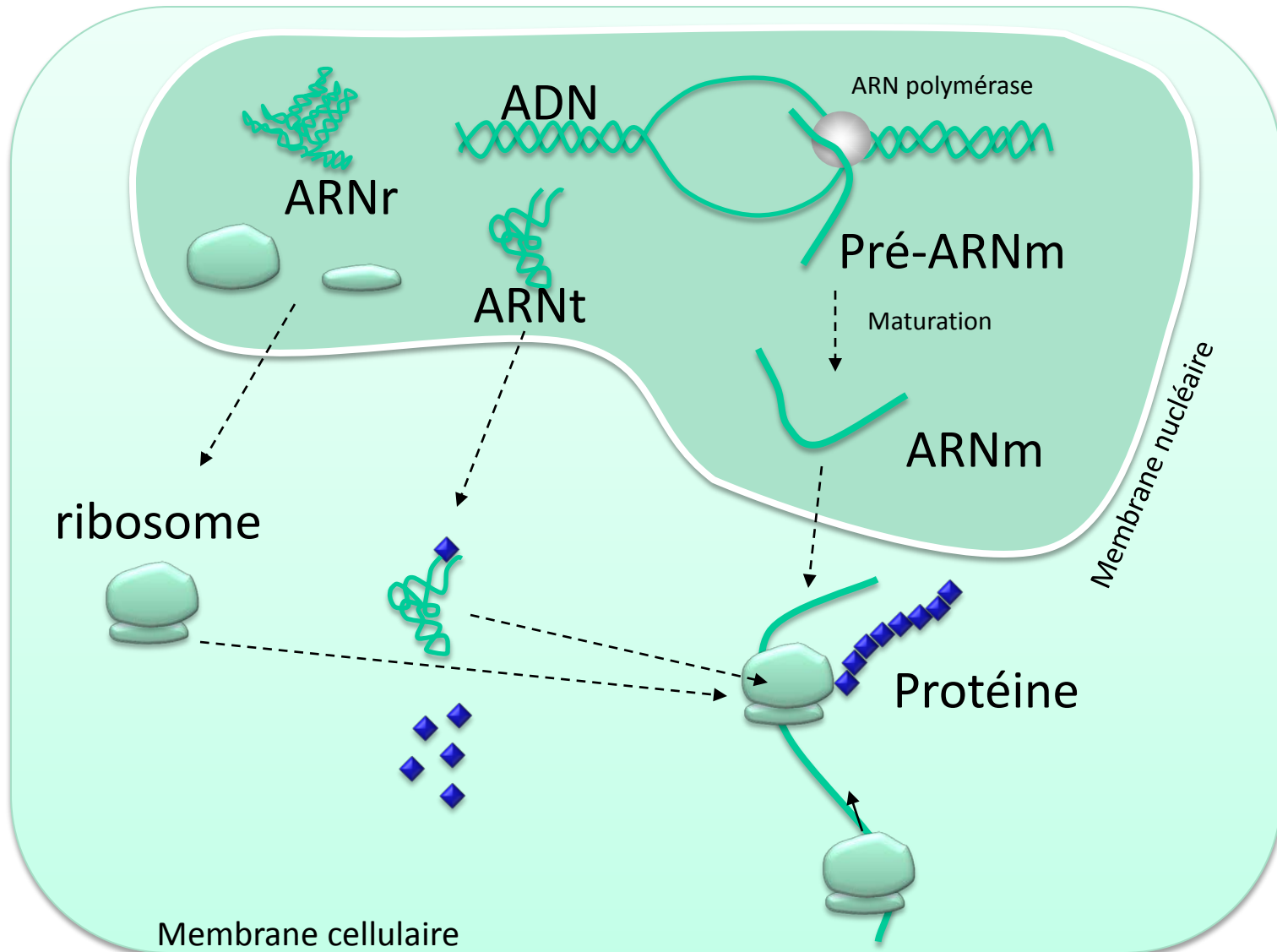
Décodage du gène dans la cellule bactérienne



Les principaux ARN dans une bactérie

- ARN ribosomiques (ARNr)
 - Grande sous-unité 23S (3000nt) et 5S (120nt)
 - Petite sous-unité 16S (1500nt)
 - Composition en bases: 25%A 21%U 32%G 22%C
- ARN de transfert (ARNt)
 - 4S (70nt)
- ARN messenger (ARNm)
 - Instable (demi-vie courte)
 - Grande variété de molécules
 - Entre 300 et 5000 nt
 - Taux de synthèse élevé

Décodage du gène dans la cellule eucaryote



Distribution des ARN dans une cellule eucaryote

Cytoplasme

- ARN ribosomiques (ARNr)
 - Grande sous-unité 28S et 5,8S
 - Petite sous-unité 18S
- ARN de transfert (ARNt)
 - 4S
- ARN messenger (ARNm)
 - Plus stables qu'ARNm bactériens
 - Grande variété de molécules
 - Entre 300 et 5000 nt

Noyau

- Distribution différente du cytoplasme
- ARN « géants » (10000 à 100000nt)
- Turn-over rapide

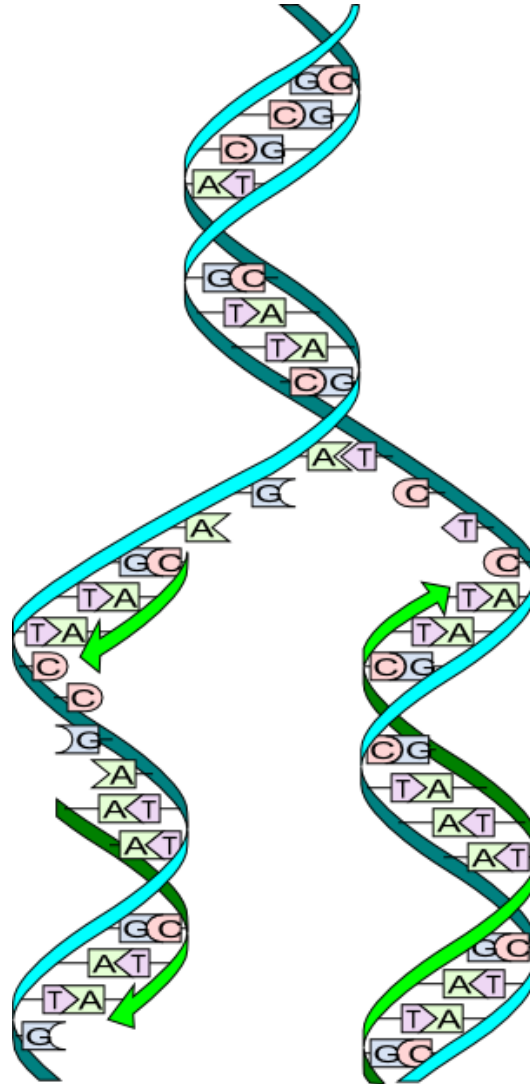
Idée d'ARN précurseurs présents dans le noyau

ARN présents dans une cellule typique de mammifère (fibroblaste de souris en culture)

	ARN cellulaire total (%) à l'équilibre	ARN Synthèse totale (%)
Précurseurs nucléaires d'ARNr	4	39
↓		
ARNr cytoplasmique	71	-
Pré-ARNm	7	58
↓		
ARNm cytoplasmique	3 !	-
Petits ARN stables (surtout ARNt)	15	3

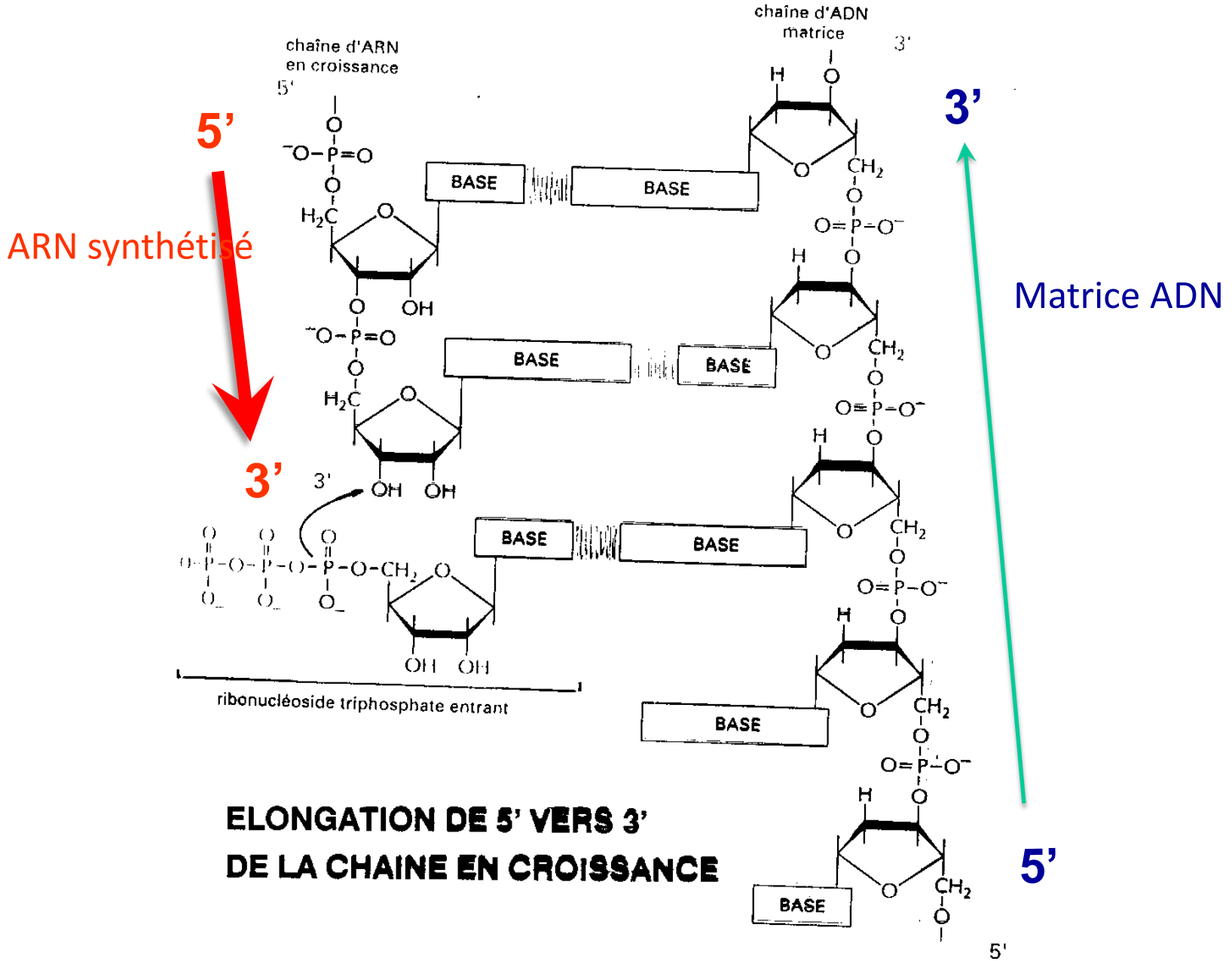
Toute la variété des ARNm est comprise dans ces 3% !

Comparaison transcription/réplication: copie des 2 brins d'ADN au cours de la réplication

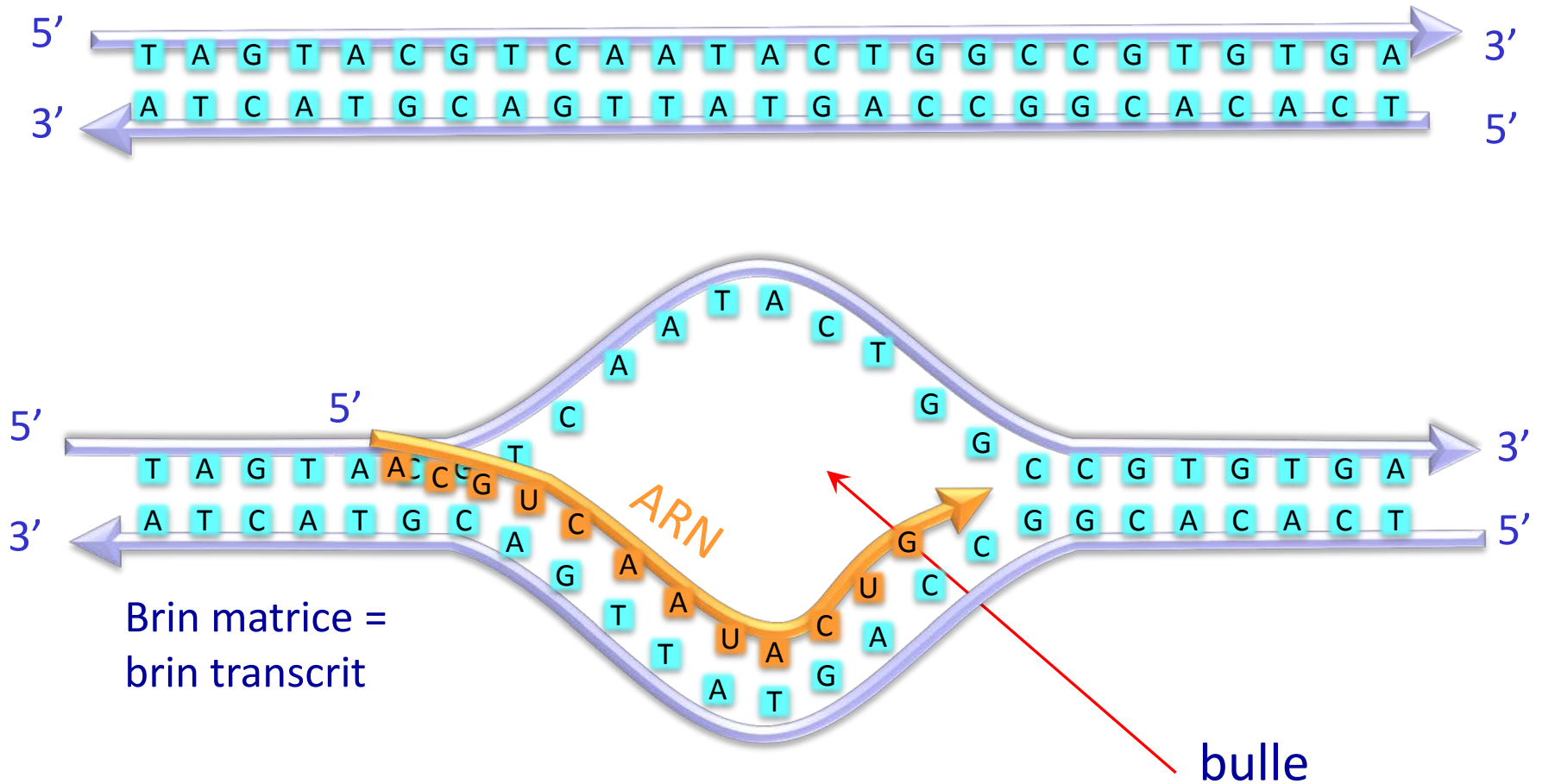


From Wikipedia: DNA replication

Comme pour la réplication: polymérase synthétise de 5' vers 3'

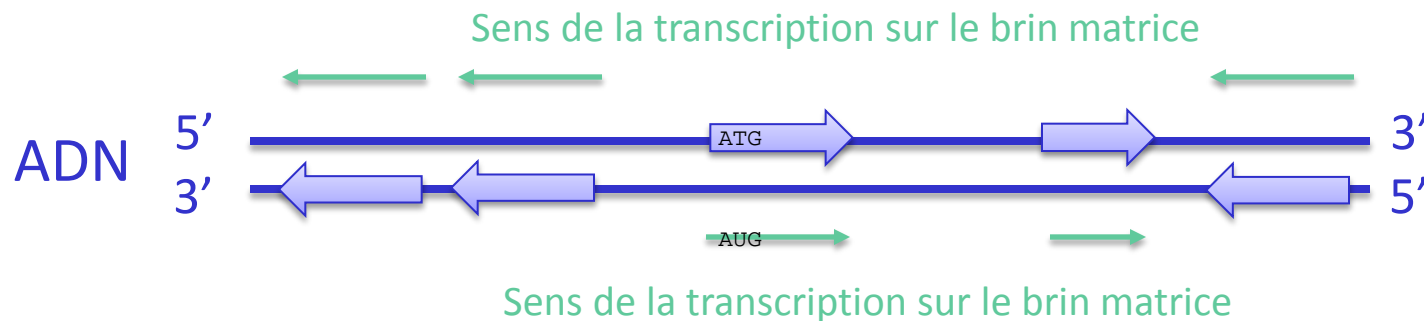


Copie d'un seul brin d'ADN par l'ARN polymérase

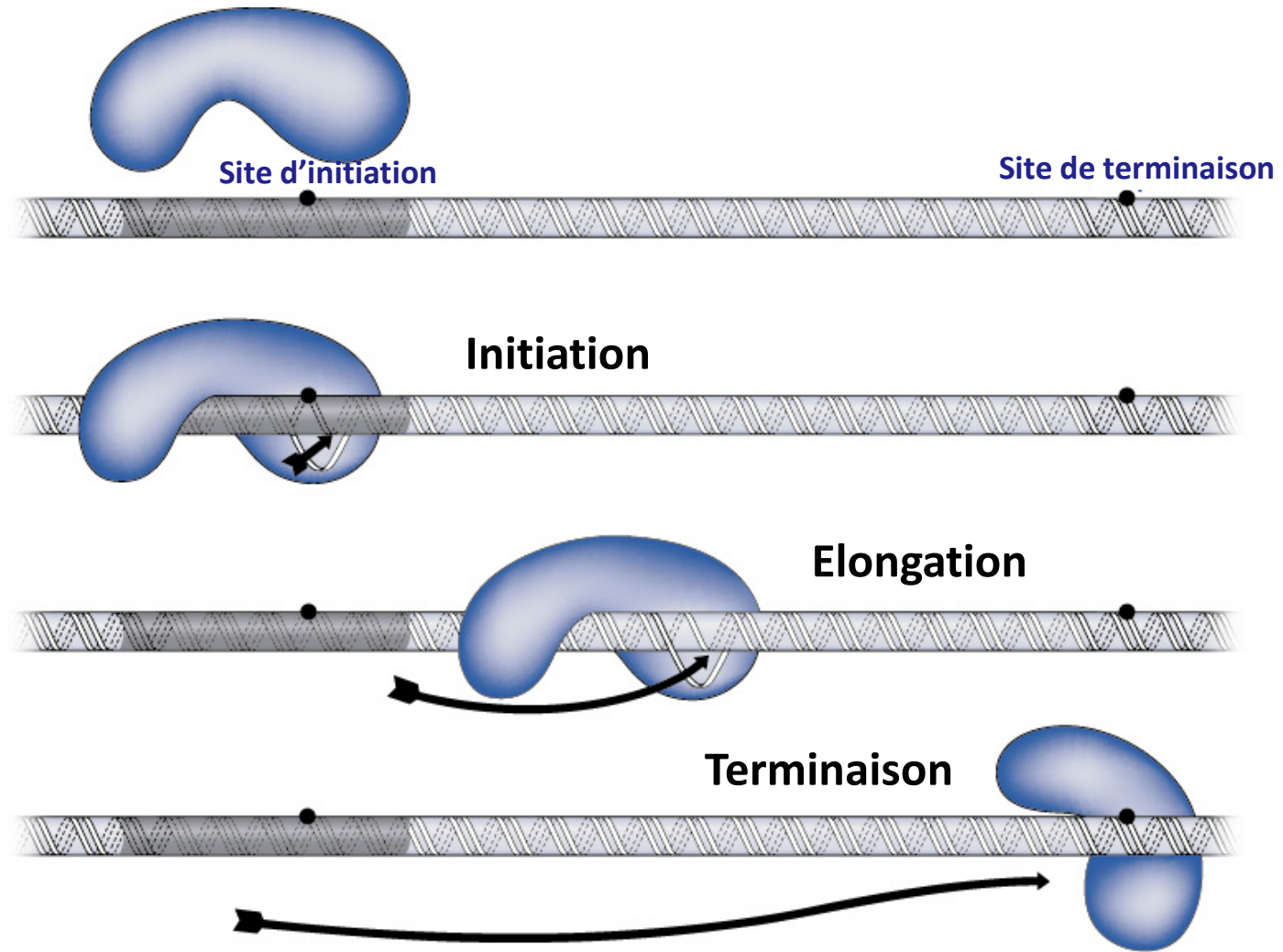


Les gènes peuvent résider sur un brin ou l'autre de l'ADN

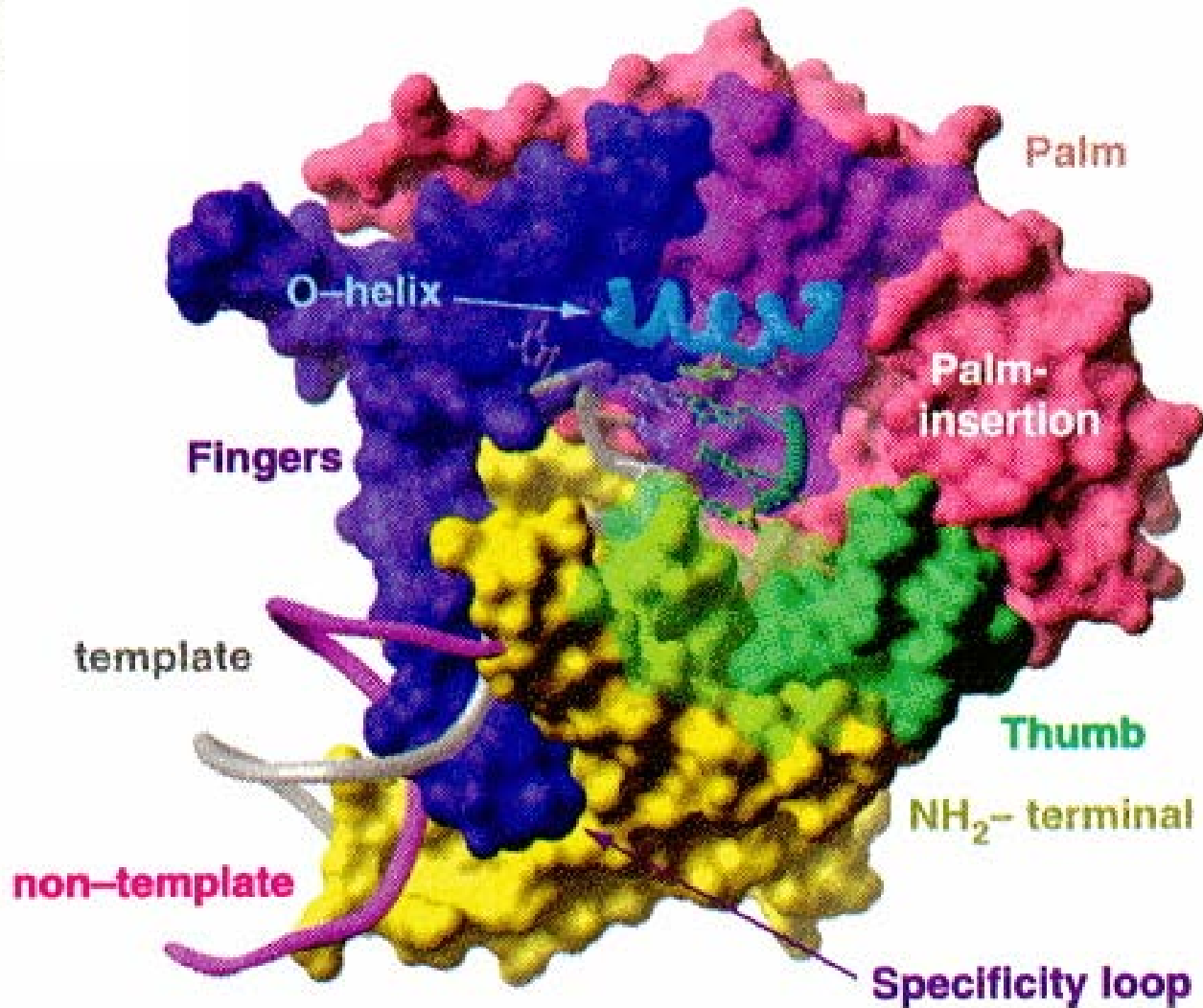
- Exemple de transcription dans une région génomique: il y a des gènes sur les deux brins.



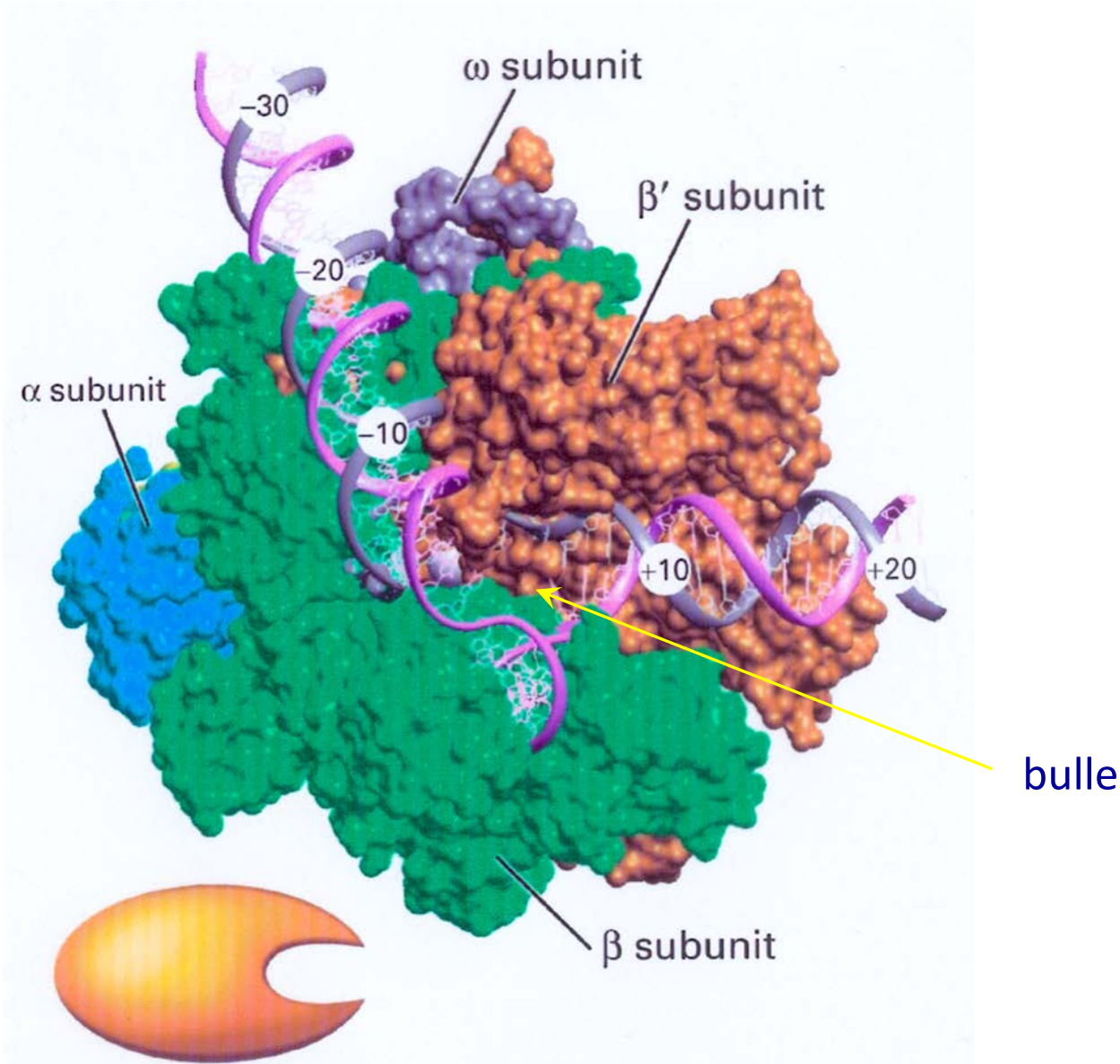
Les étapes de la transcription



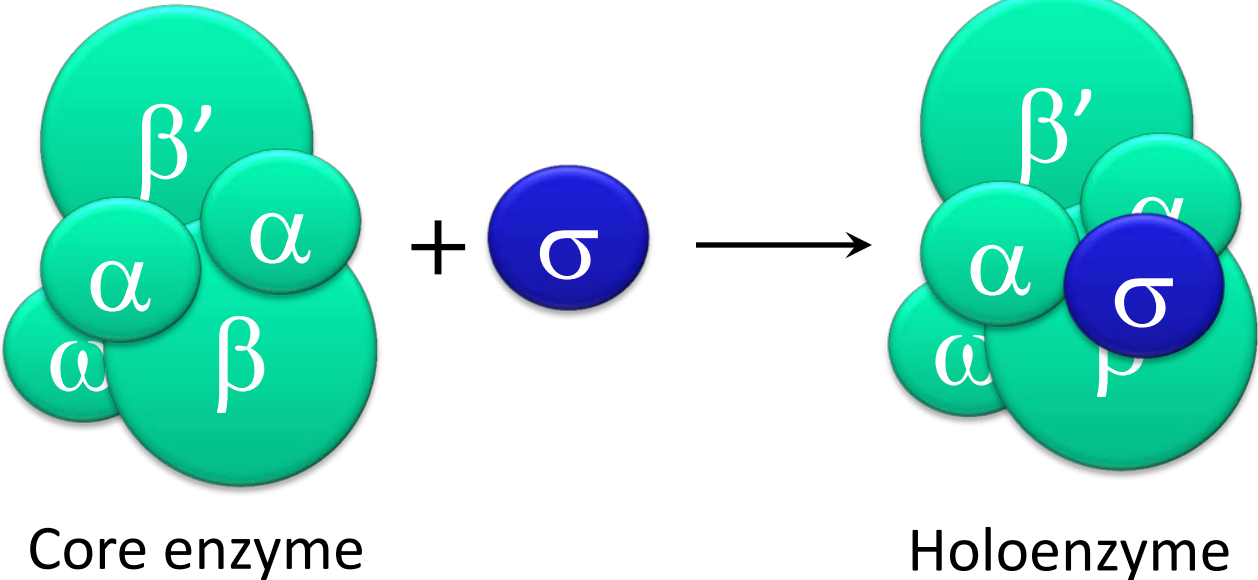
Structure de l'ARN polymerase de T7



Structure de l'ARN polymerase bactérienne

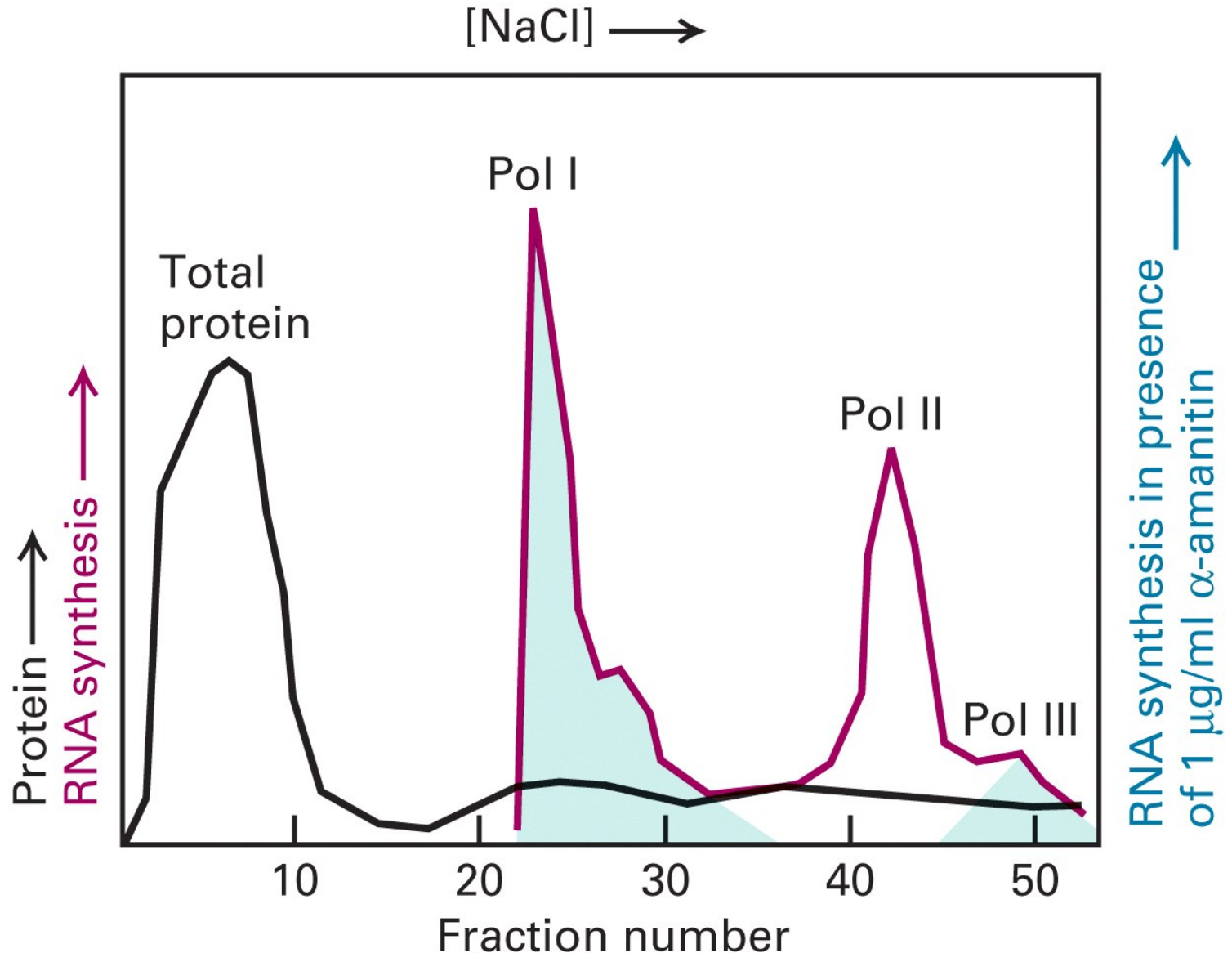


Structure de l'ARN polymérase d'E. coli



	7000 molécules/cellule		
Coeur (Core)	alpha	rpoA	36500
	beta	rpoB	151000 site catalytique
	beta'	rpoC	155000 liaison
Complet (Holo)	omega	rpoZ	11000 assemblage du core
	sigma	rpoD	70000 interaction avec promoteur

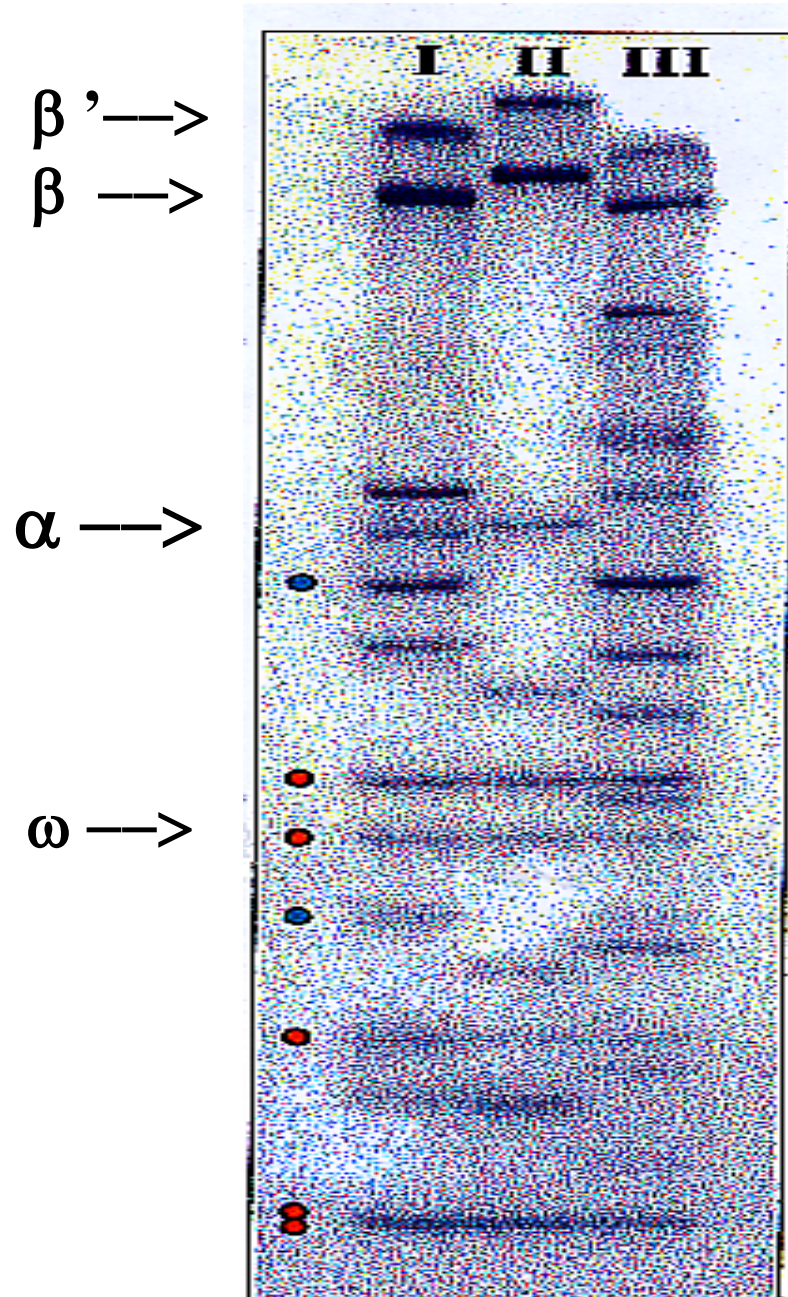
Les 3 ARN polymérase eucaryotes

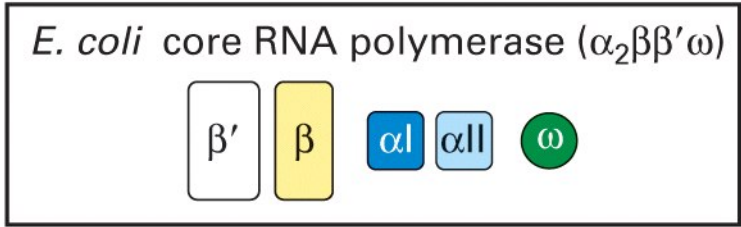


Activités des 3 ARN polymérases eucaryotes

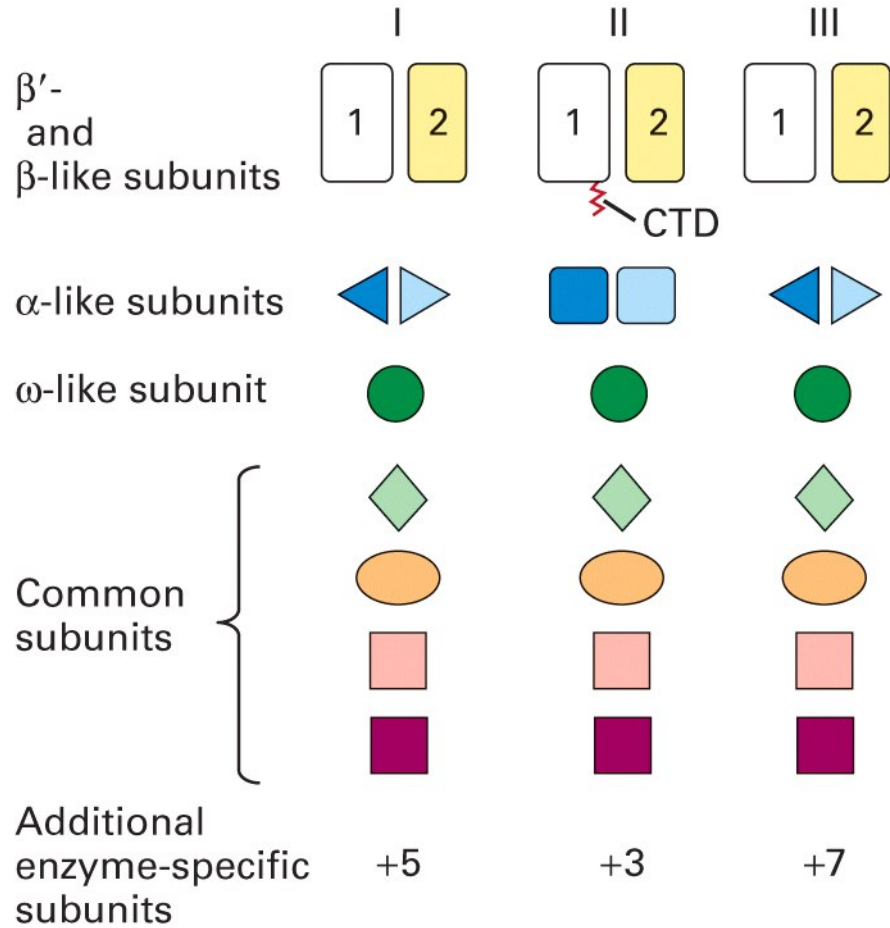
- Pol I: la plus active. Synthétise les ARNr sauf 5S. Dans le nucléole.
- Pol II. Synthétise les précurseurs d'ARNm. Dans le noyau.
- Pol III. Activité faible. Synthétise les ARNt et autres petits ARN nucléaires (snRNA), et ARNr 5S. Dans le noyau

Les 3 ARN polymérase de *Saccharomyces cerevisiae*





Eukaryotic RNA polymerases





The Nobel Prize in Chemistry 2006

"for his studies of the molecular basis of eukaryotic transcription"



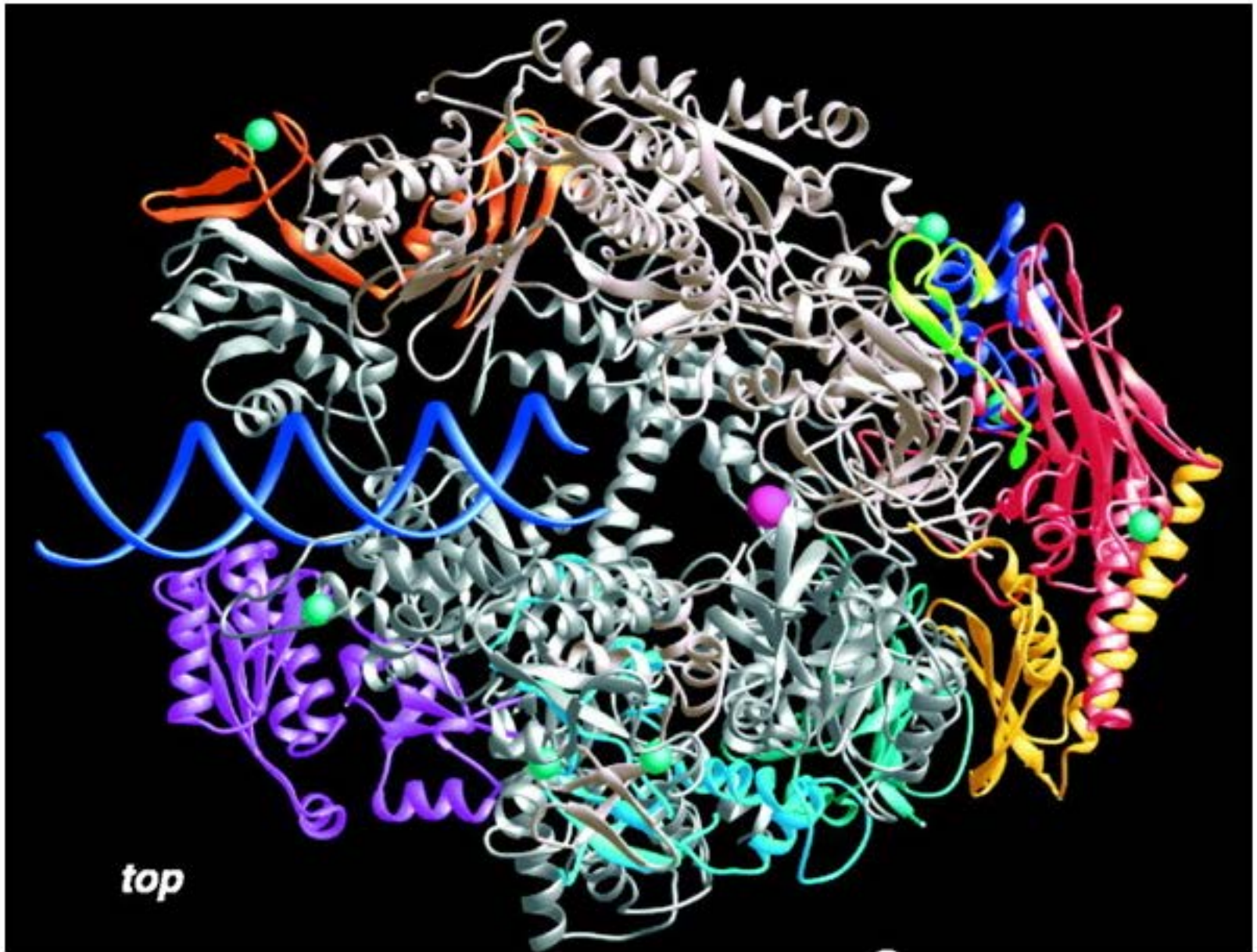
Photo: L. Cicero/Stanford University

Roger D. Kornberg

USA

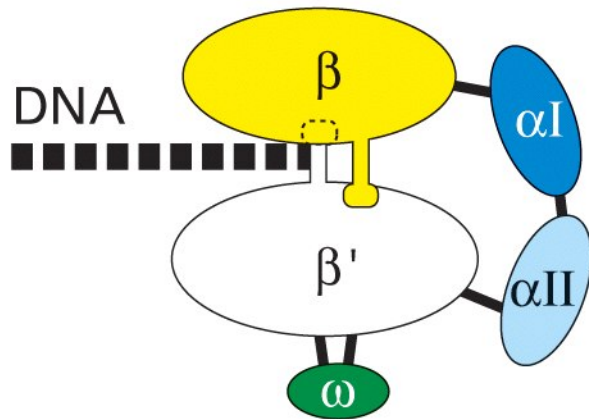
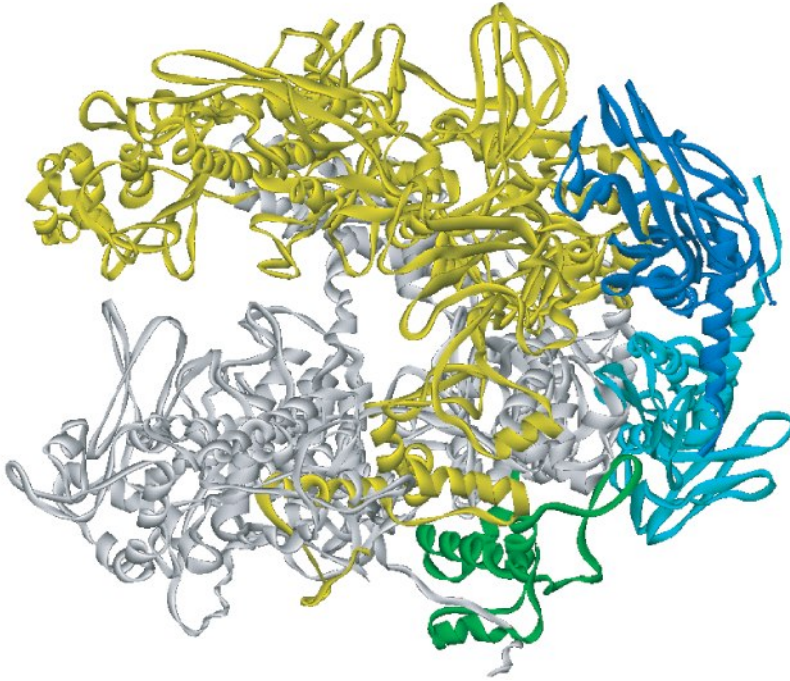
Stanford University
Stanford, CA, USA

Pour la structure de la RNA
polymérase II de levure en cours
de transcription

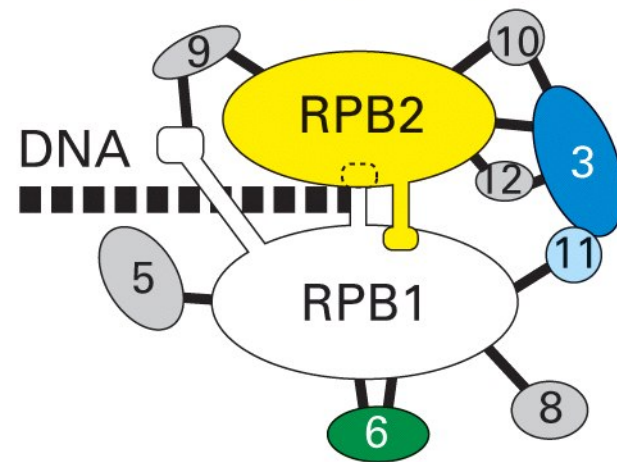
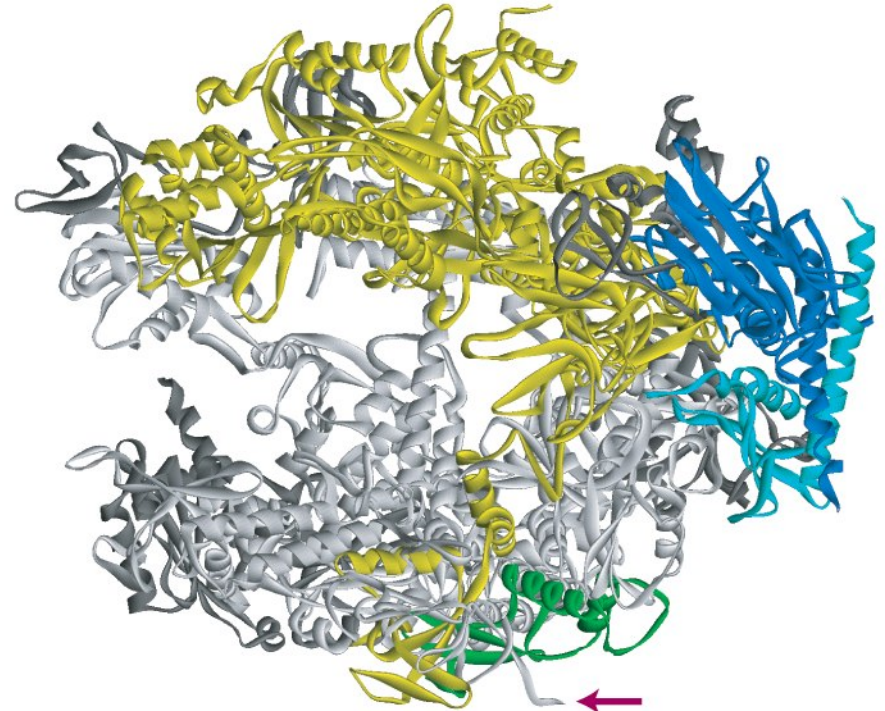


RNA POLYMERASE II de *Saccharomyces cerevisiae*

(a) Bacterial RNA polymerase

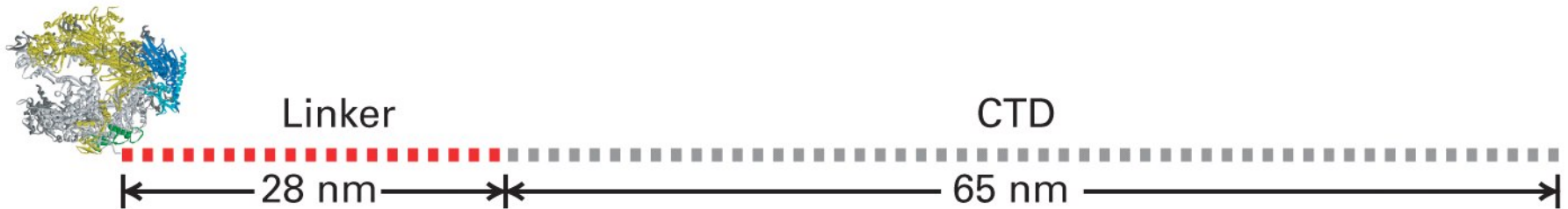


(b) Yeast RNA polymerase II



Structure de l'ARN polymérase II : Longueur considérable du domaine C-terminal (queue CTD)

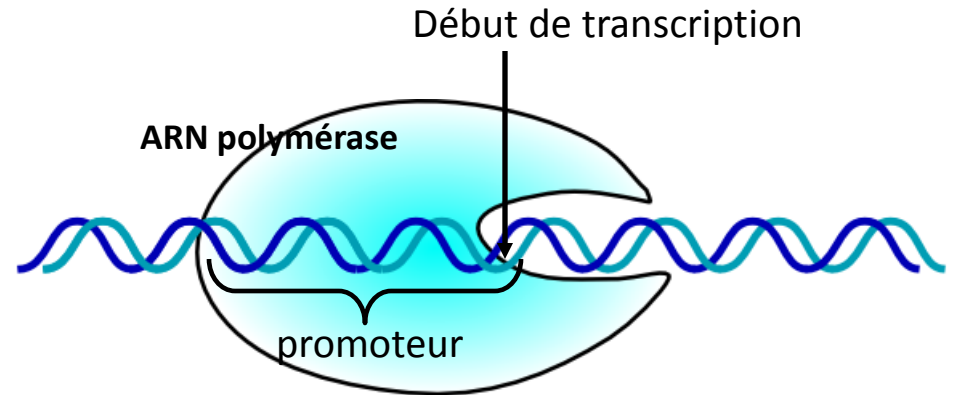
RNA polymerase II



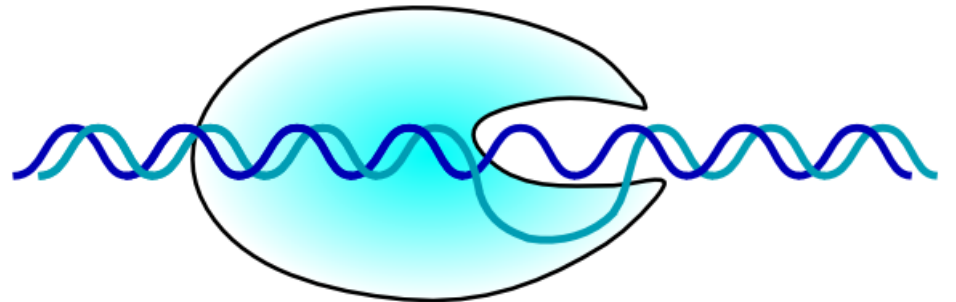
CTD: répétition d'une cinquantaine de séquences
"Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser"

Initiation

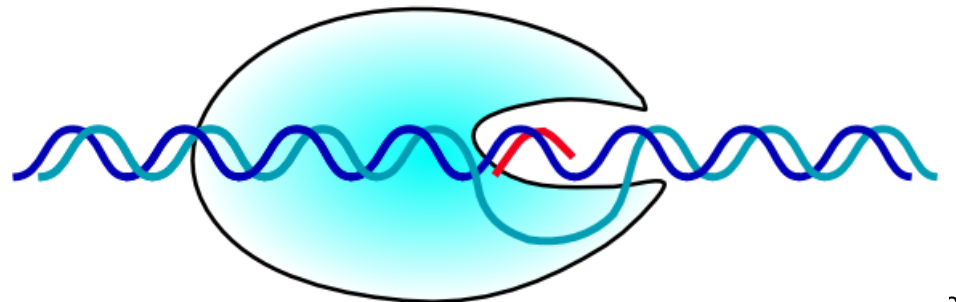
- La polymérase se fixe au promoteur sur l'ADN duplex



- La polymérase dénature le duplex. Formation de la bulle de transcription

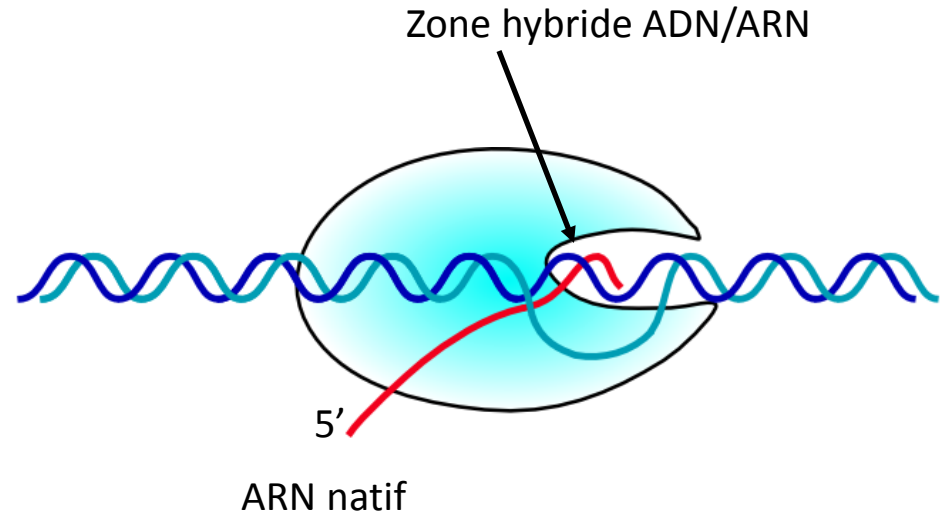


- La polymérase catalyse la liaison phosphodiester des deux premiers rNTP



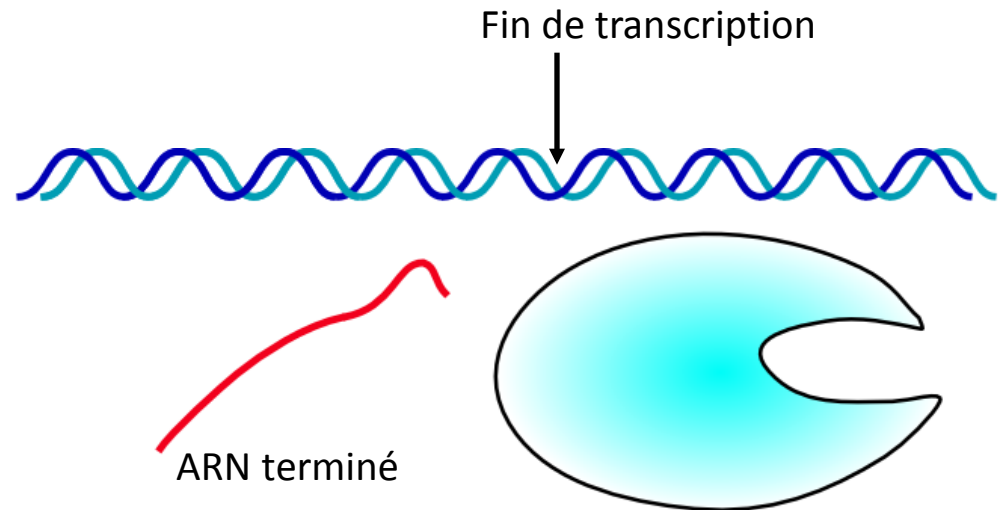
Elongation

- La polymérase avance 3'>5' sur le brin matrice en dénaturant le duplex et en ajoutant des rNTP à l'ARN



Terminaison

- Au site d'arrêt de transcription, la polymérase relargue l'ARN terminé et se dissocie de l'ADN

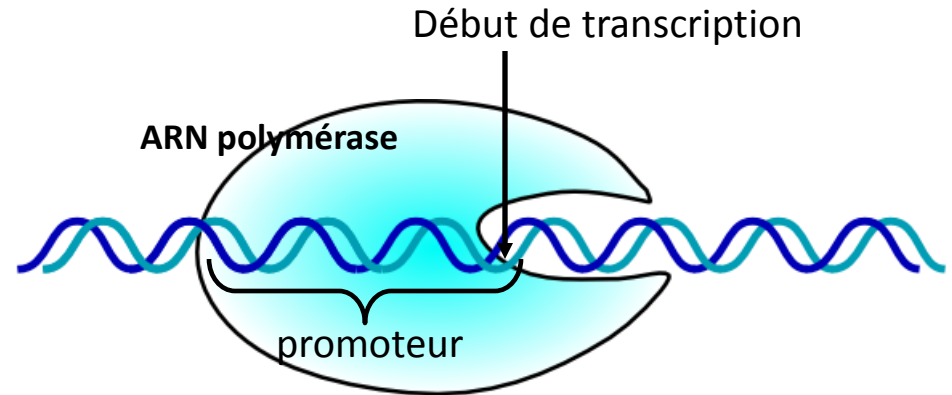


Chapitre 2:

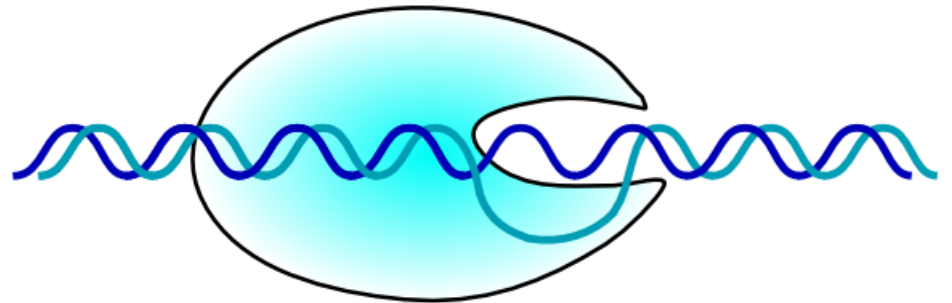
Initiation, Elongation et
Terminaison de la transcription

Initiation

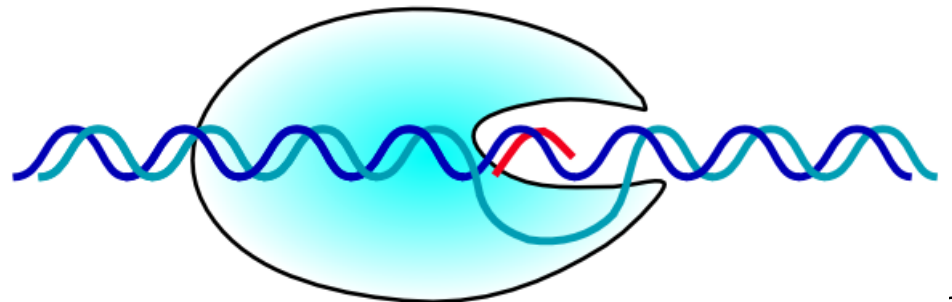
- La polymérase se fixe au promoteur sur l'ADN duplex



- La polymérase dénature le duplex. Formation de la bulle de transcription

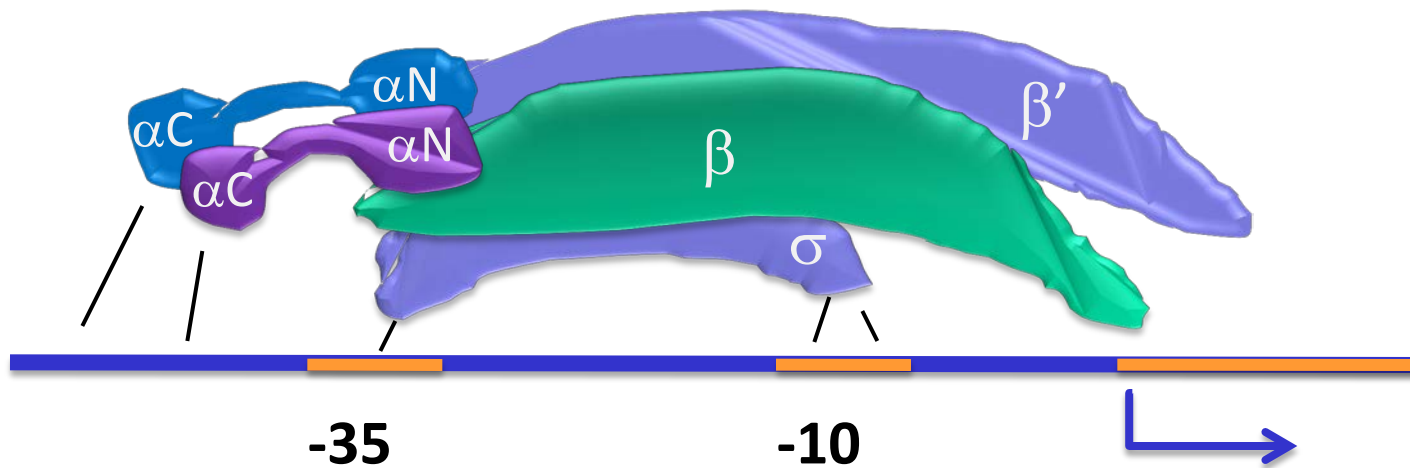
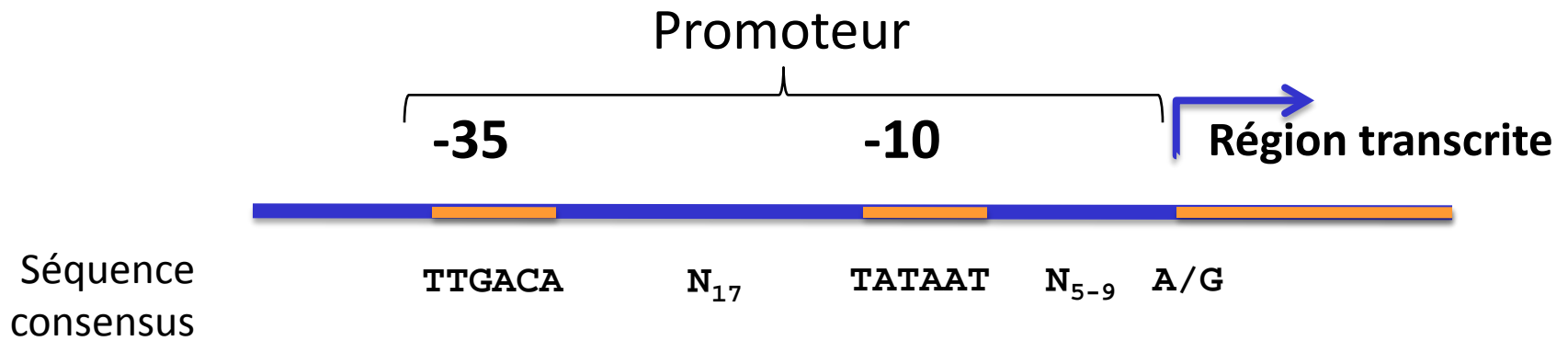


- La polymérase catalyse la liaison phosphodiester des deux premiers rNTP



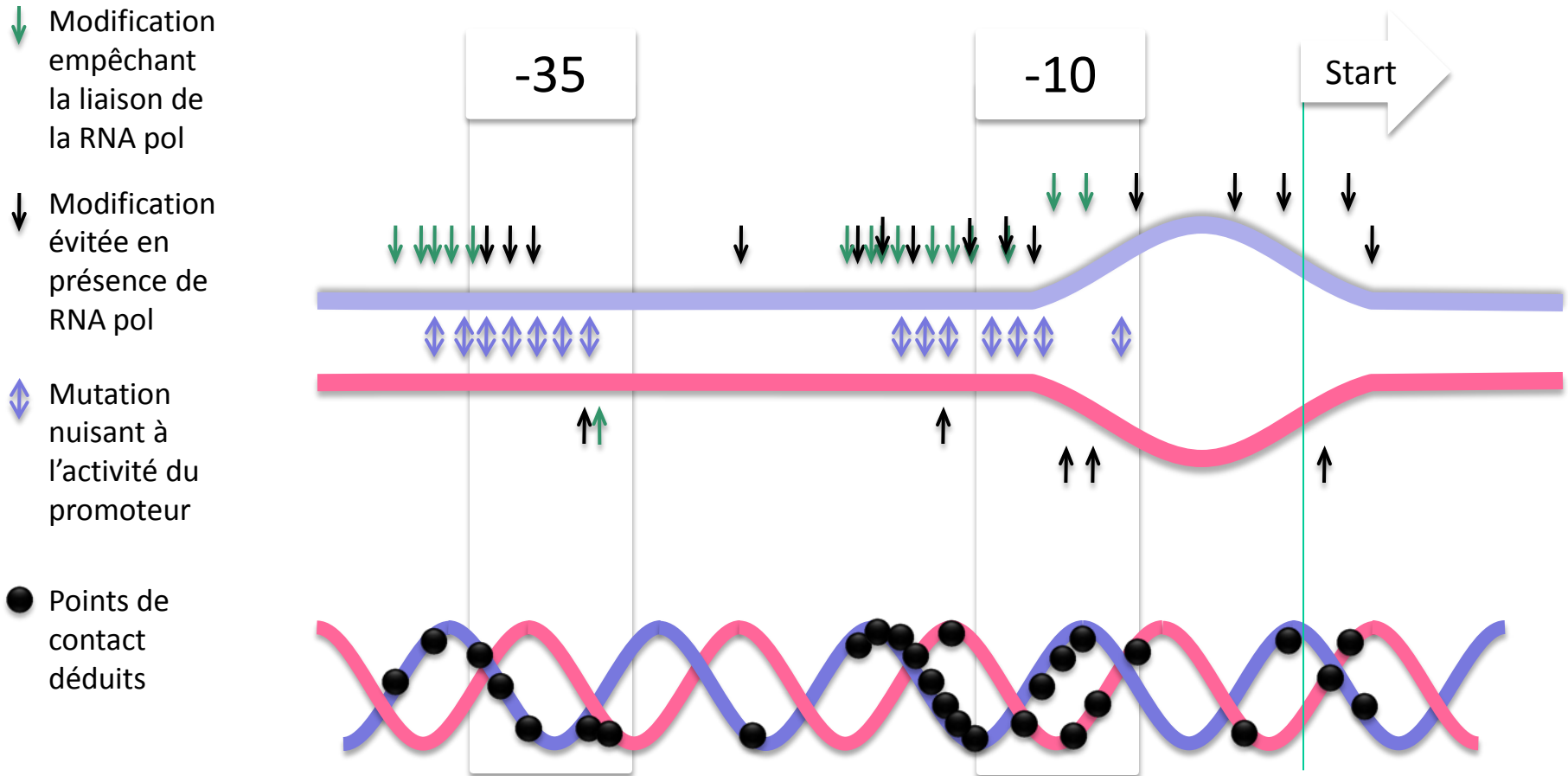
Initiation chez les bactéries

Structure d'un promoteur bactérien



Reconnaissance du promoteur par le facteur sigma

Caractérisation de la région promotrice (Modification des bases, Mutations des paires de bases)



La plupart des points de contacts se trouvent sur la même face de l'ADN

Reconnaissance d'un promoteur par l'ARN polymérase:

Affinités relatives du core enzyme et de l'holoenzyme pour l'ADN

	<i>core</i>	<i>holoenzyme</i> (<i>core</i> + <i>sigma</i>)
<i>ADN quelconque</i>	1	10^{-4}
<i>ADN promoteur</i>	1	10^3

Initiation	Holoenzyme	Fixation au promoteur
Elongation	Core	Abandon promoteur
terminaison	Core+fact term	Décrochage de l'ADN
	Core + sigma	Recyclage

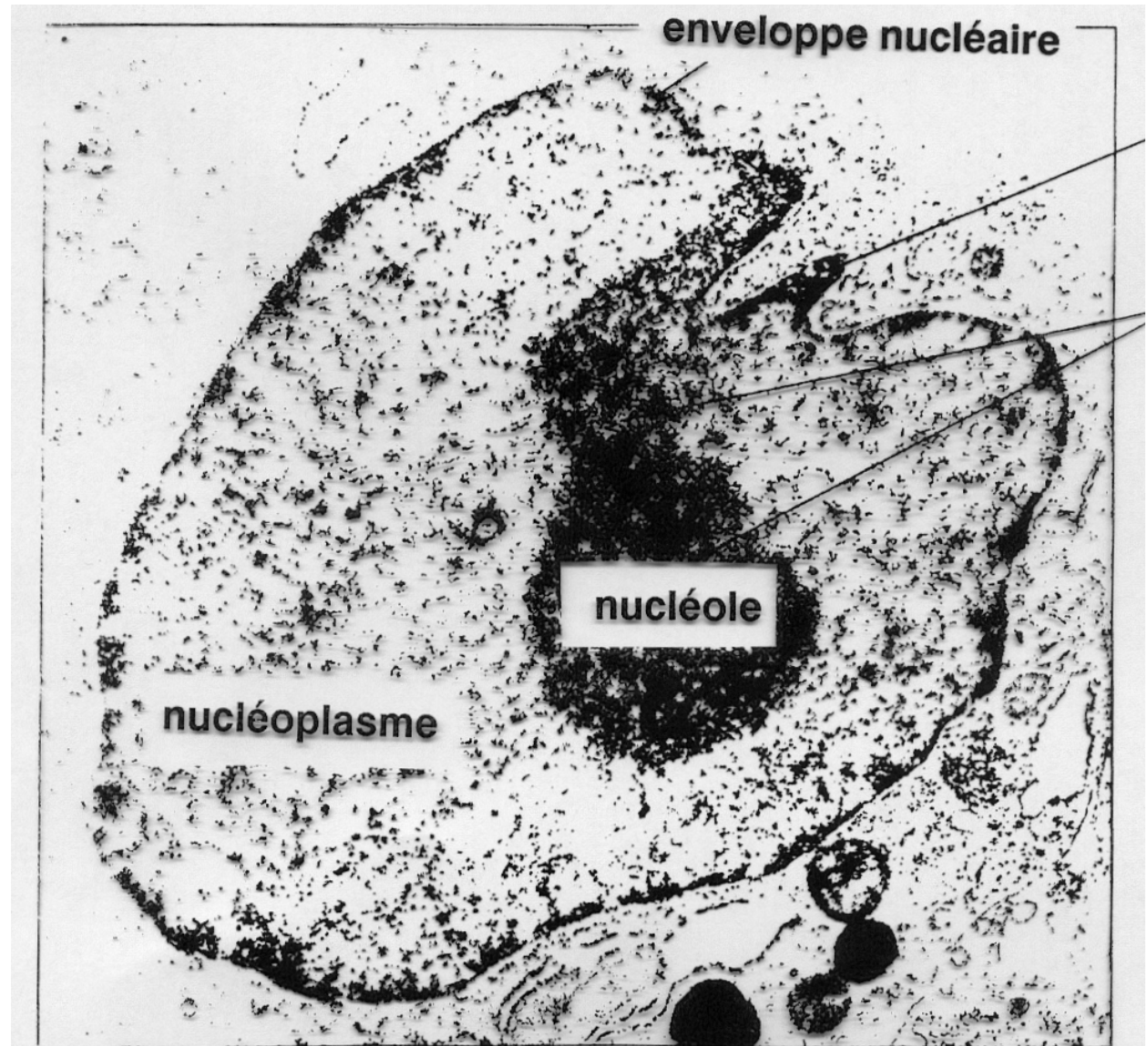
Exemples de facteurs sigma chez *E. coli*

Gène	Facteur	Rôle	Promoteur -35 espaceur -10
rpoD	σ 70	Général	TTGACA 15-18pb TATAAT
rpoH	σ 32	Choc thermique	CCCTTGAA 13-15pb CCCGATNT
rpoE	σ E	Choc thermique	
rpoN	σ 54	Carence en azote	CTGGNA 6pb TTGCA
fliA	σ F	flagelles	CTAAA 15pb GCCGATAA

Initiation chez les eucaryotes

RNA Pol-I

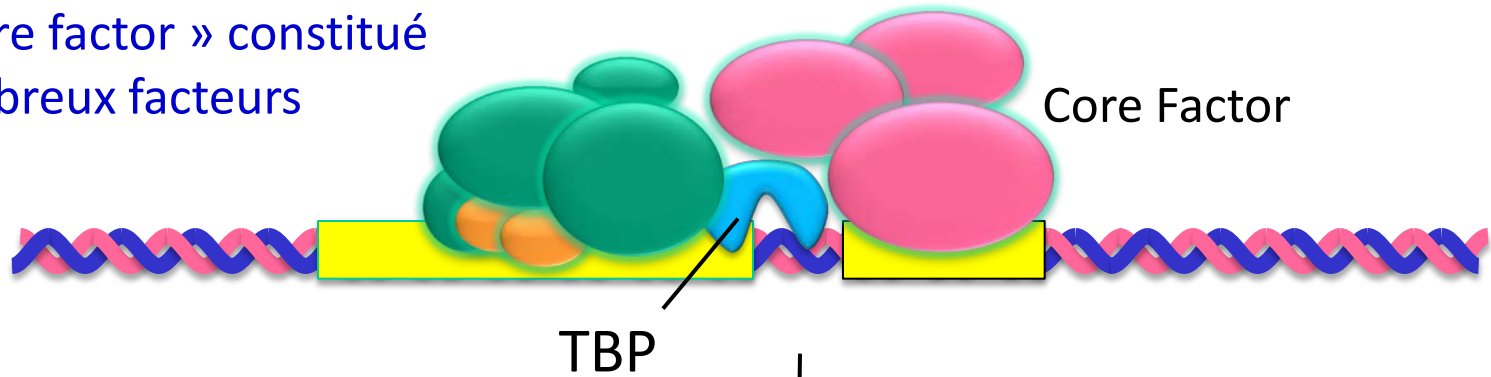
La synthèse du
précurseur des ARN
ribosomiaux
a lieu dans le
nucléole



Initiation de la transcription par la RNA pol I (synthèse des ARN ribosomiques)

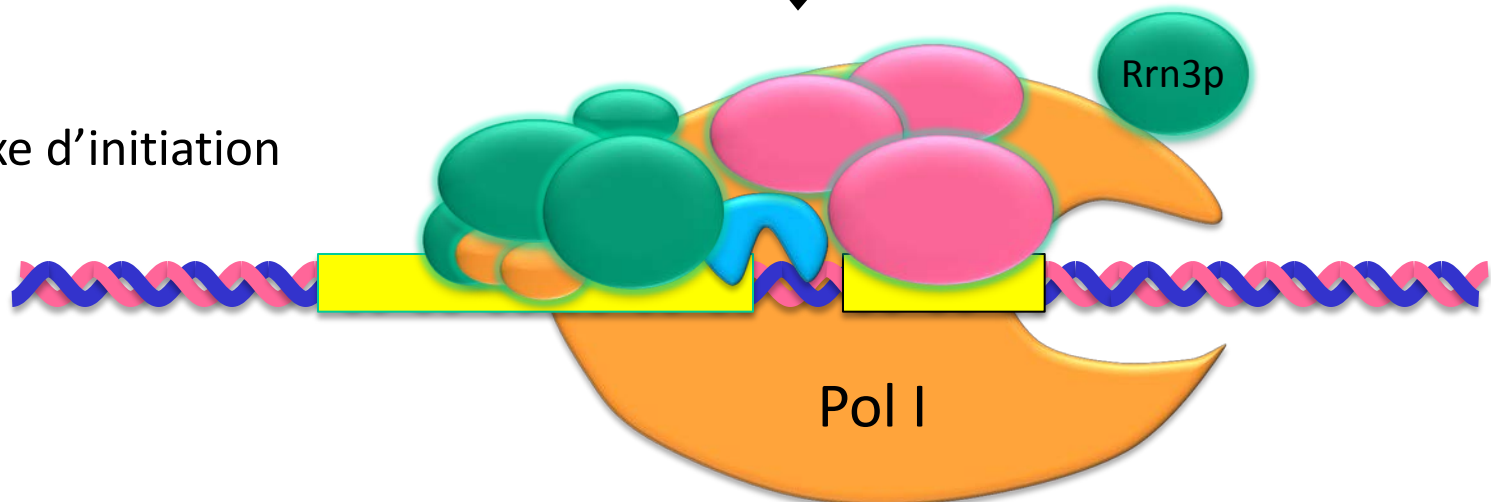
Les ARN pol. eucaryotes ne se fixent jamais seules: facteurs de transcription

Un « core factor » constitué
de nombreux facteurs



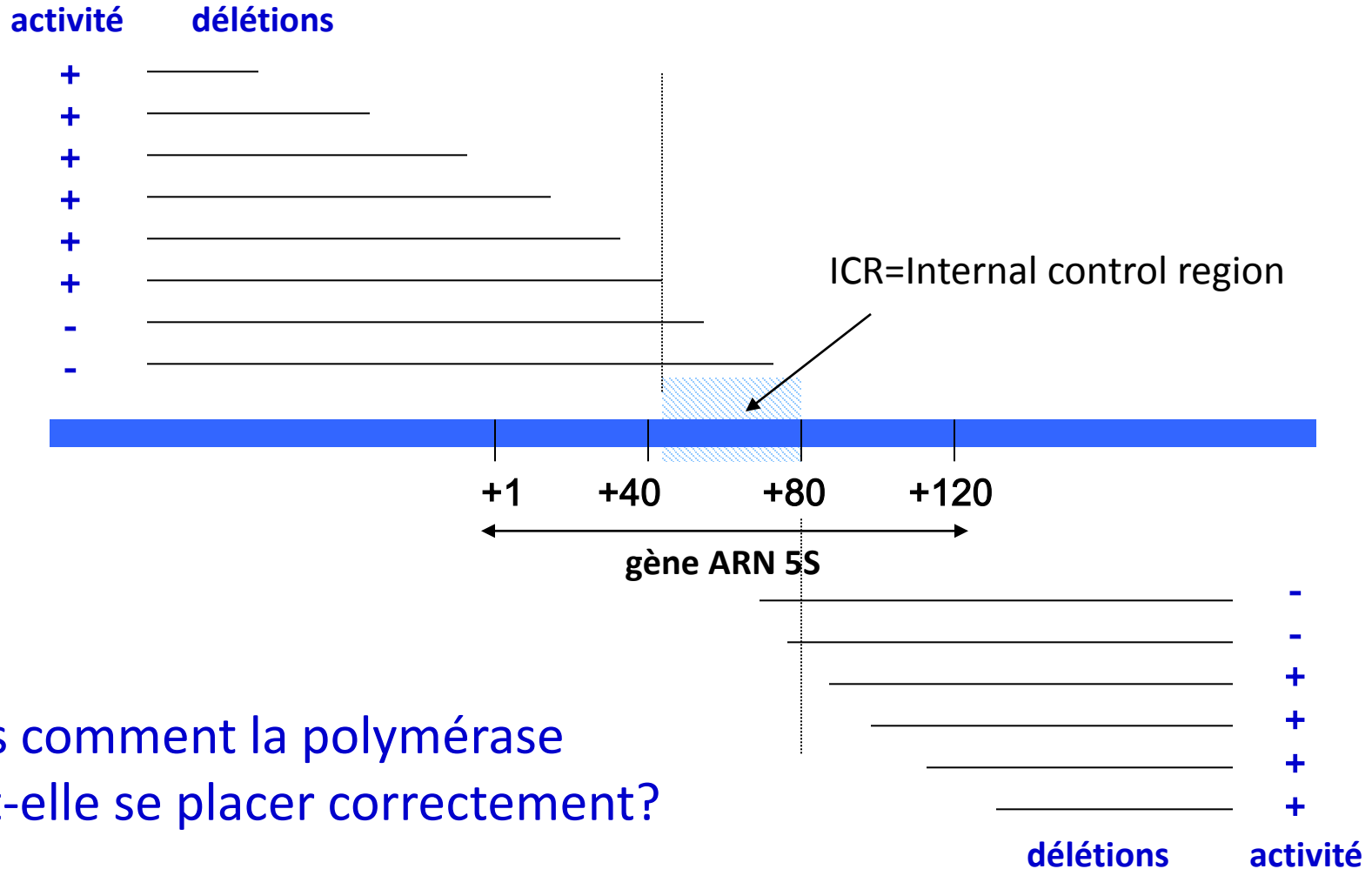
+ pol I et Rrn3p

Complexe d'initiation



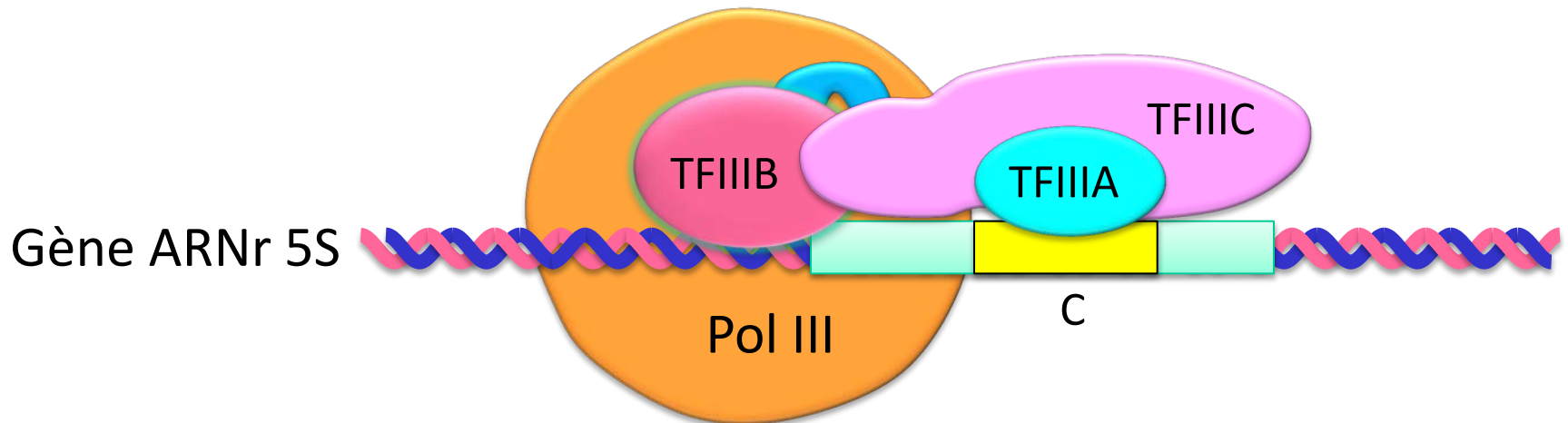
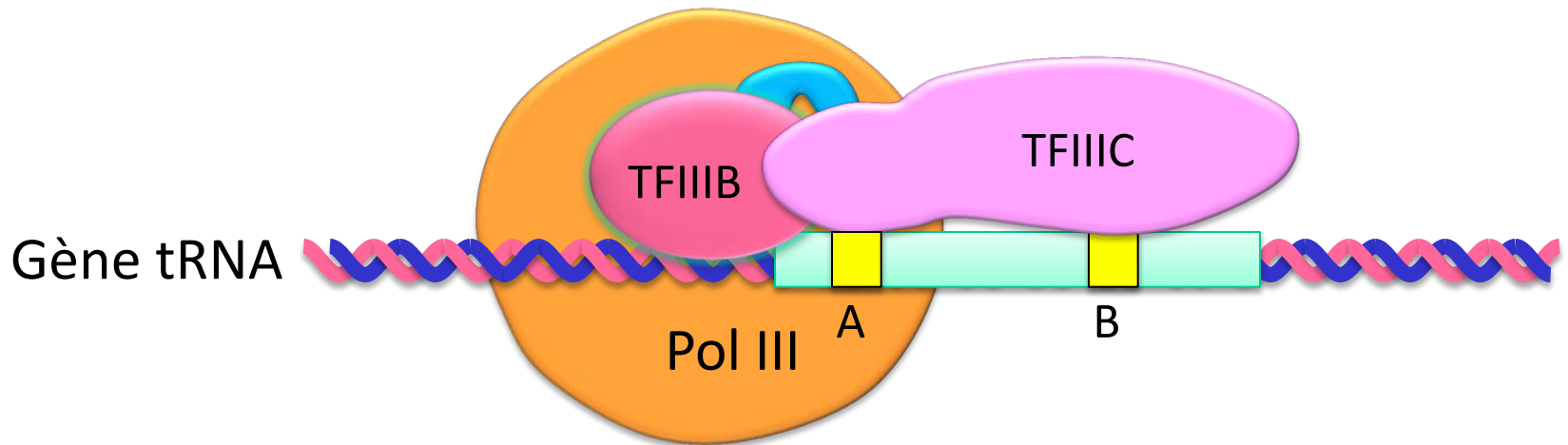
ARN pol III: le gène 5S n'est pas contrôlé par un promoteur en amont

Mise en évidence d'une région interne de contrôle de la transcription



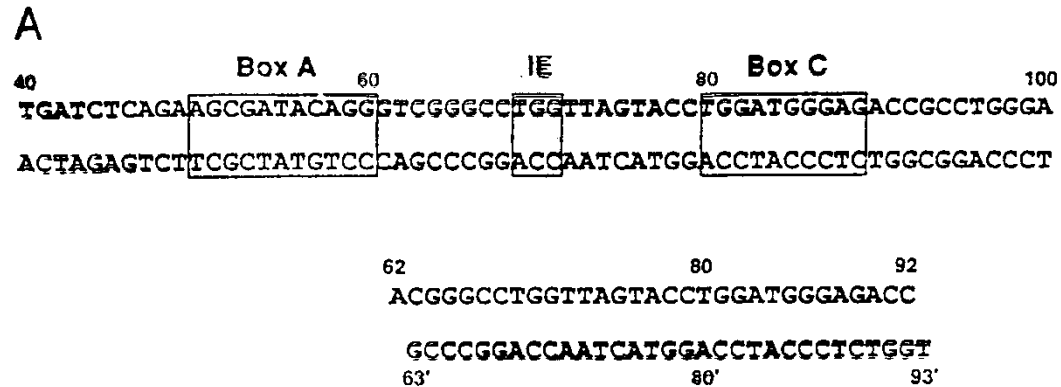
Mais comment la polymérase
Peut-elle se placer correctement?

Explication: le complexe d'initiation de la transcription de la pol-III

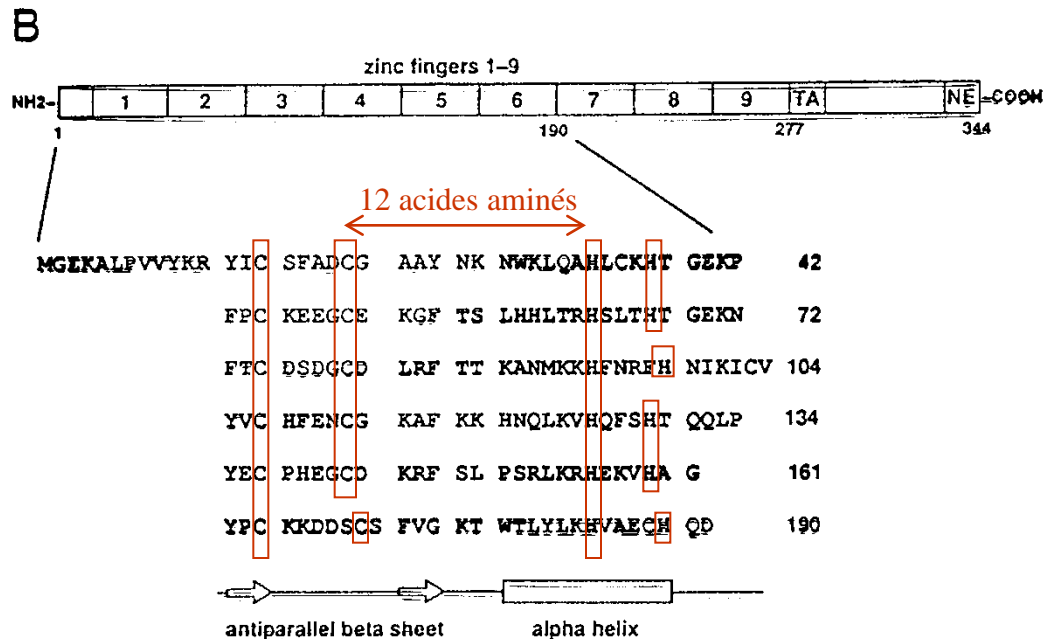


Séquence de la région ICR du gène codant pour l'ARN5S de *Xenopus laevis* et structure du facteur de transcription TFIIIA qui se fixe sur la région ICR

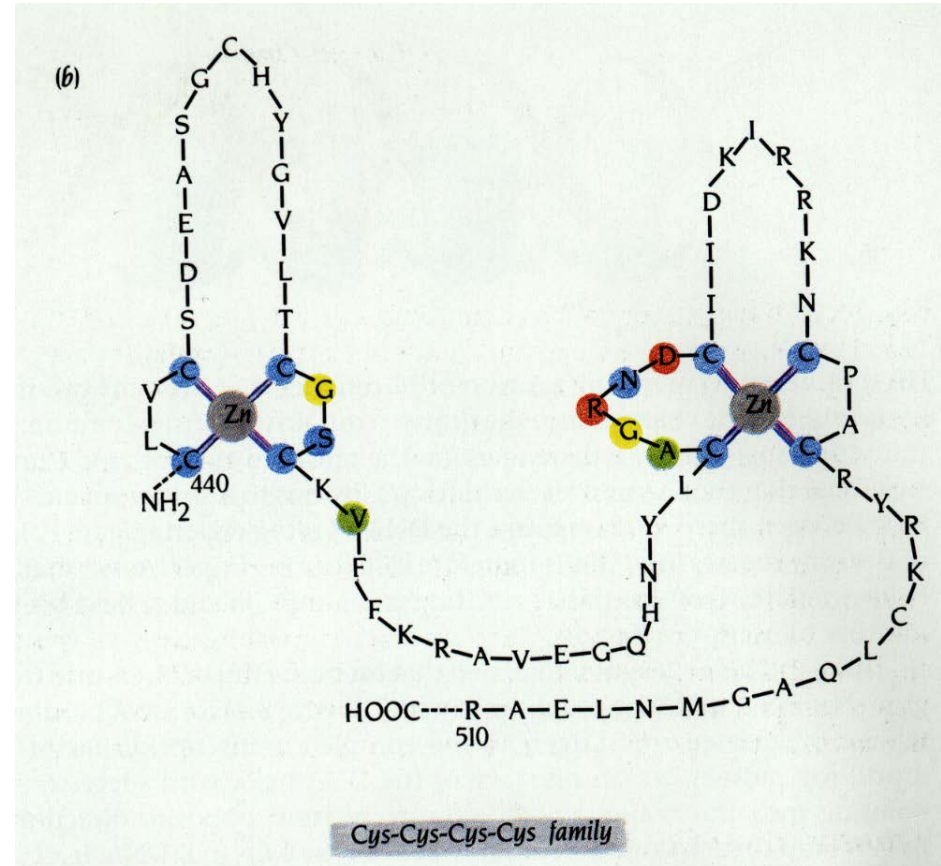
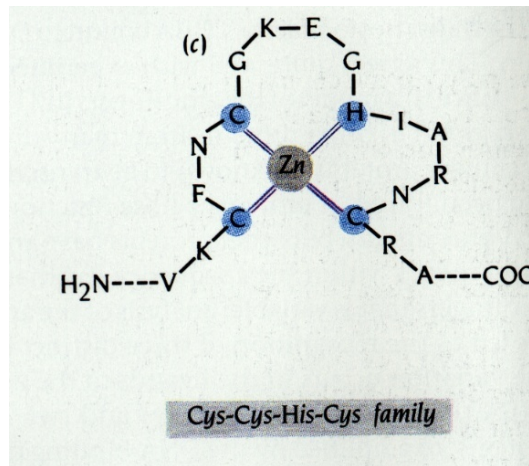
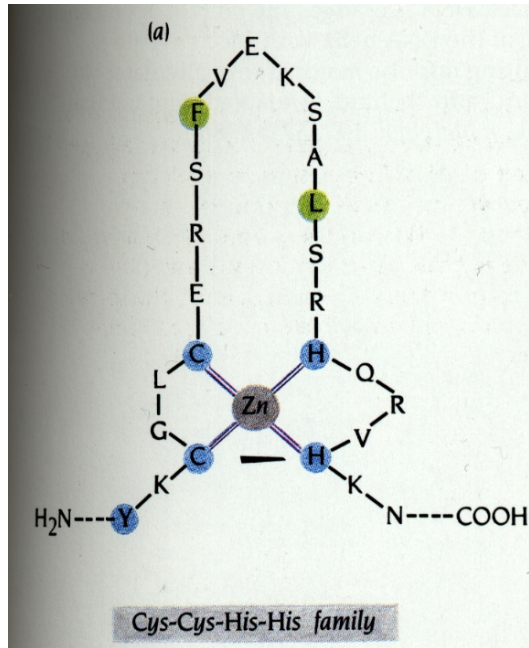
Région ICR



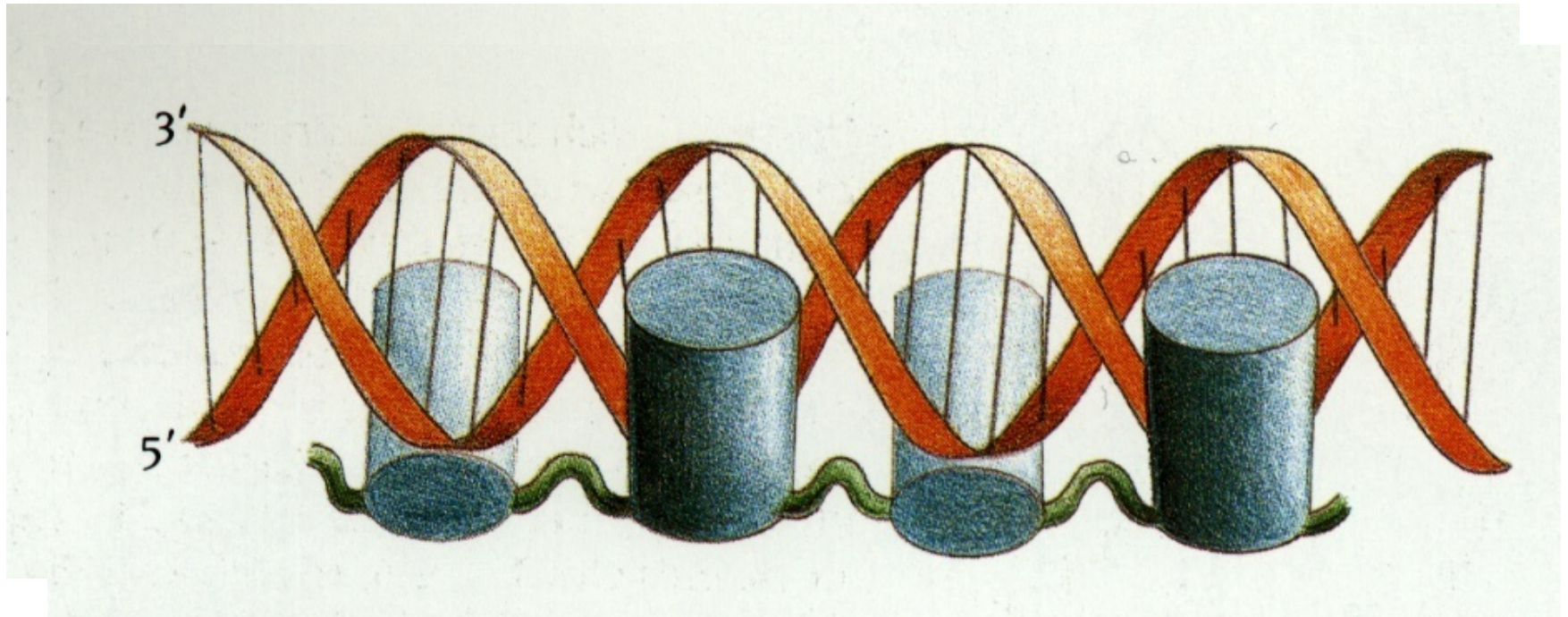
TFIIIA



Trois familles de doigts de zinc

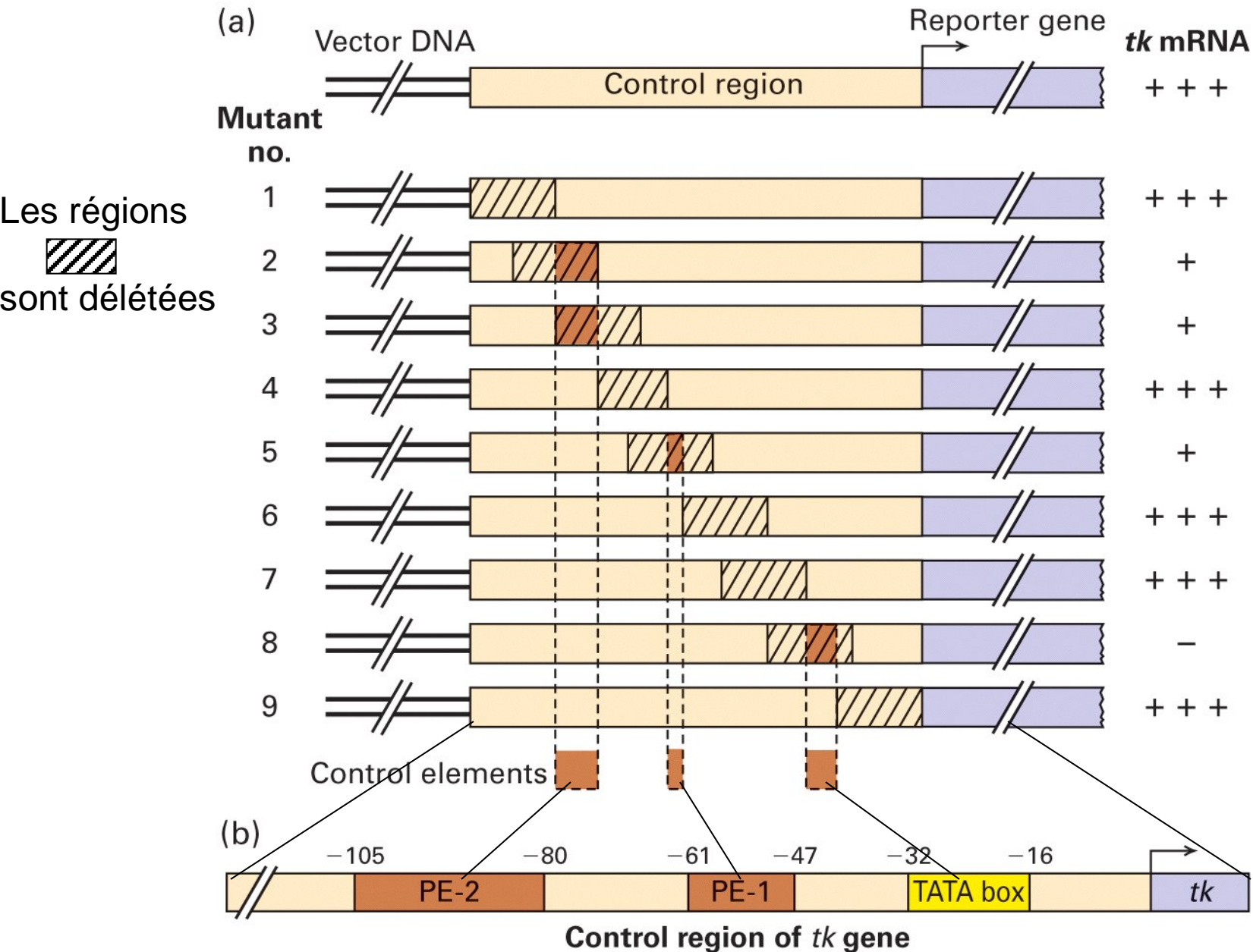


Représentation schématique de l'interaction de l'ADN avec les doigts de Zinc en tandem contenus dans le facteur TFIIIA



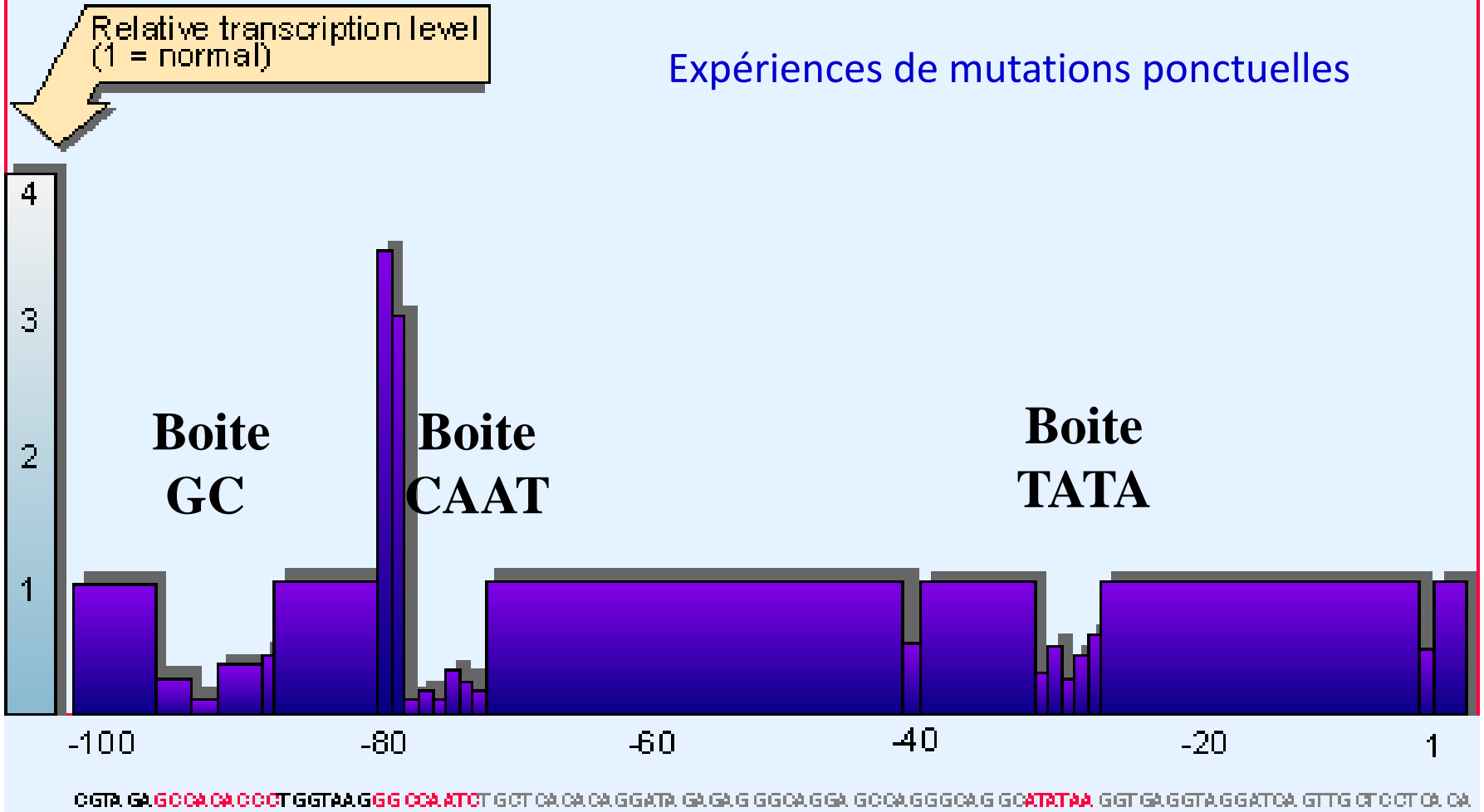
La RNA pol. II

Détermination de la région promoteur d'un gène dépendant de l'ARN polymérase II

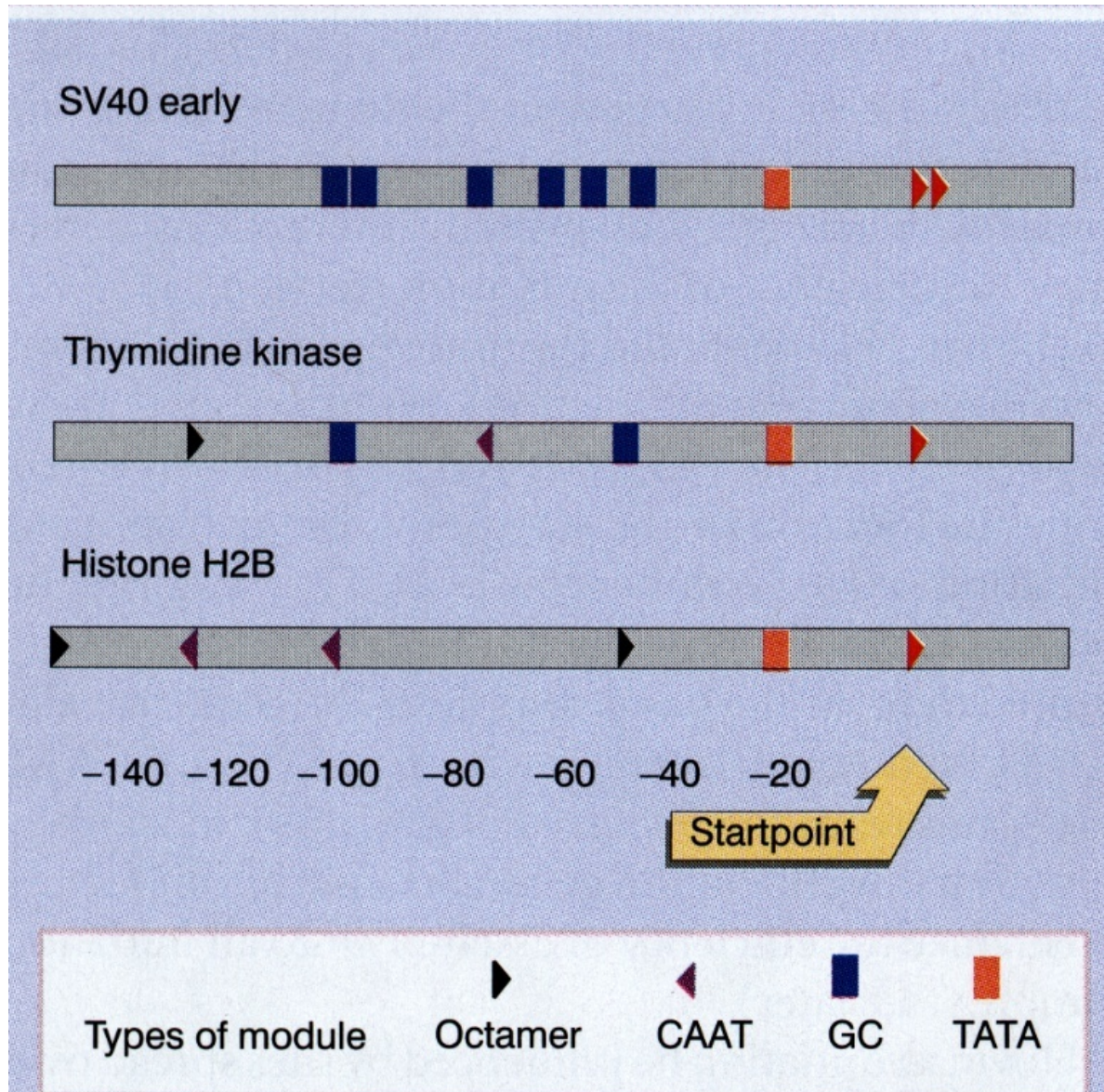


Identification de 3 Régions nécessaires à l'initiation de la transcription, en amont du gène codant pour la β -Globine

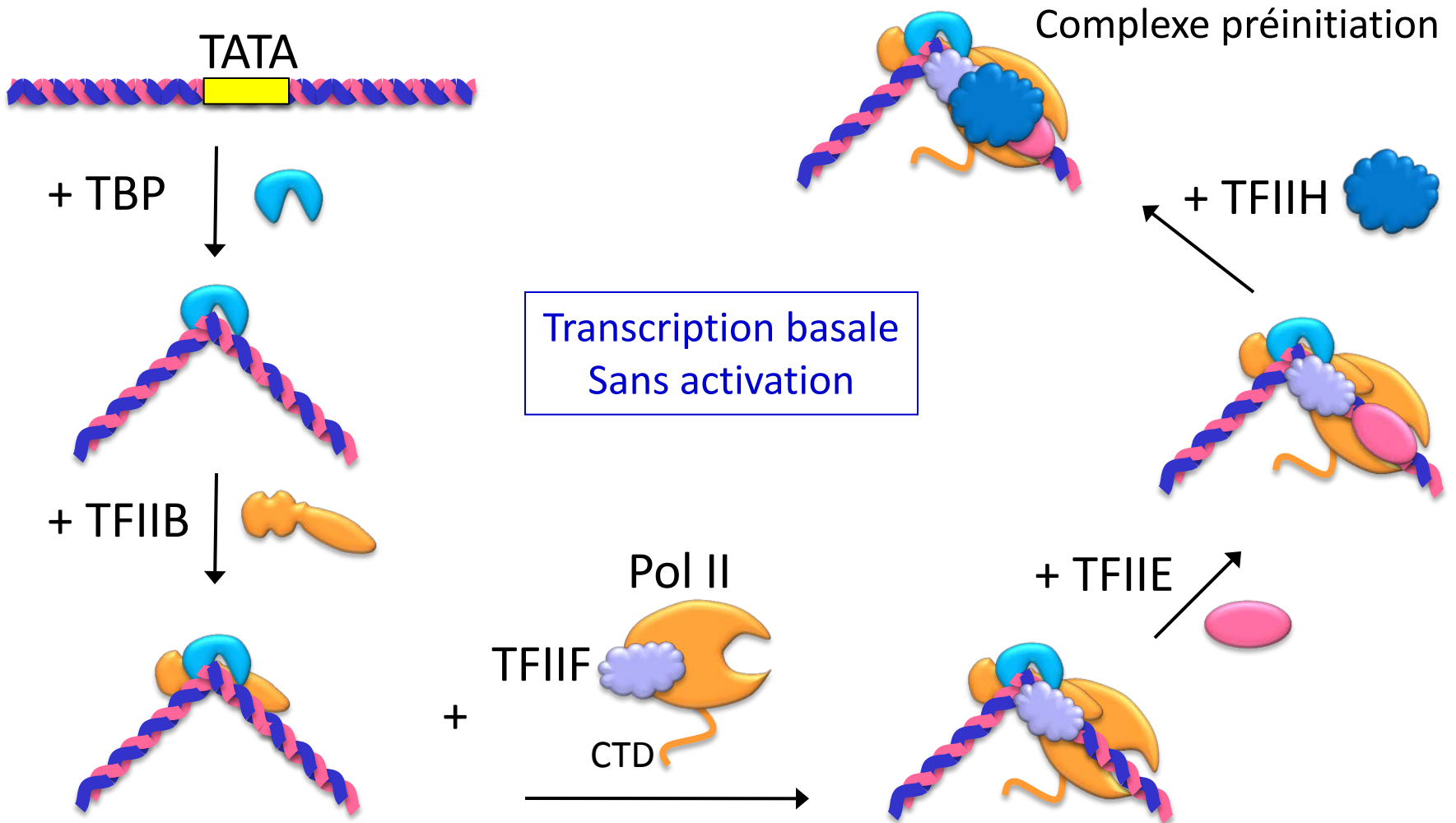
Expériences de mutations ponctuelles



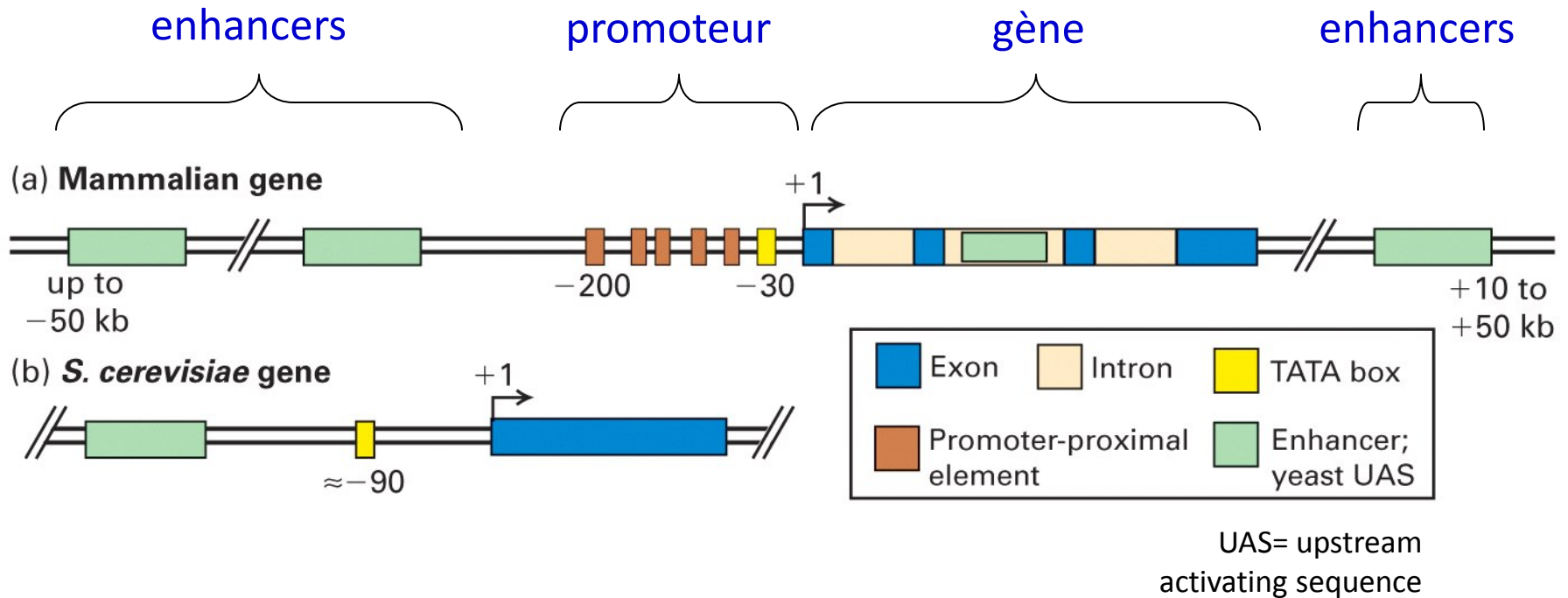
Les promoteurs utilisés par la pol-II sont des combinaisons variées de courtes séquences consensus



Formation du complexe de démarrage pol-II

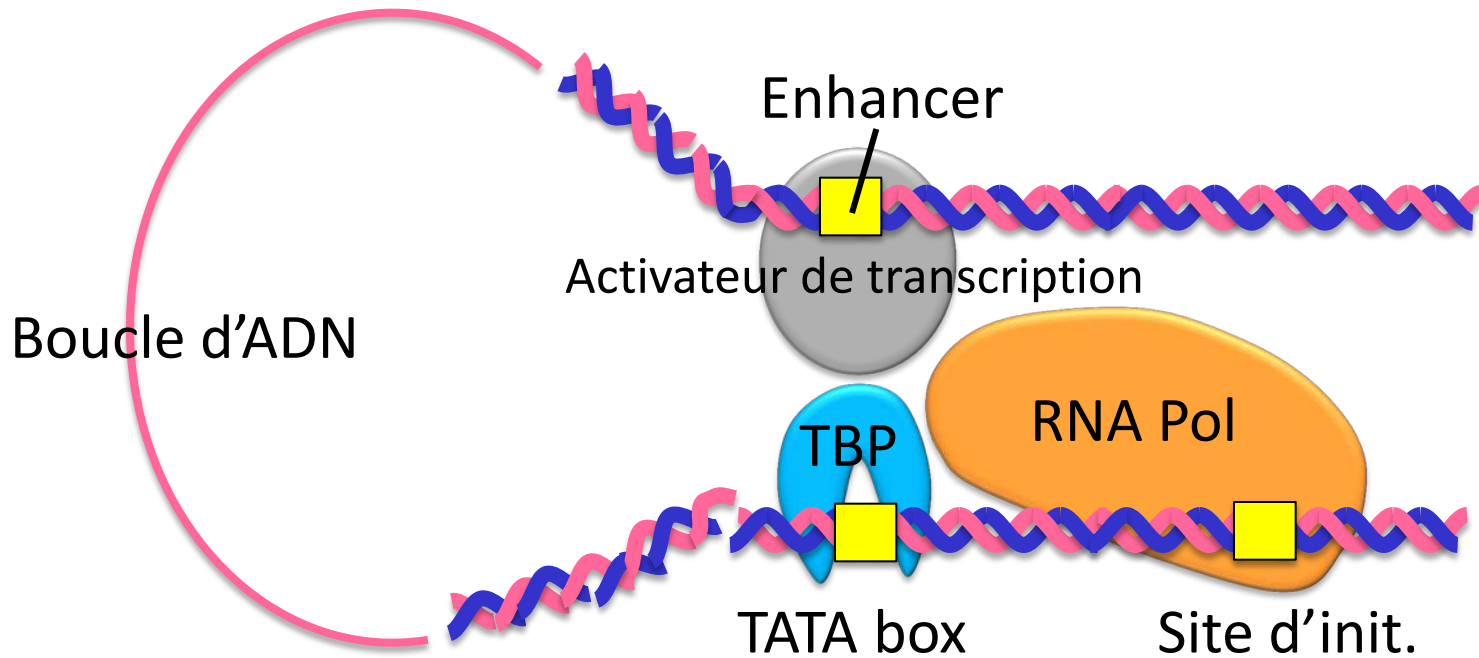


Éléments de contrôle du promoteur pol-II : les éléments distants

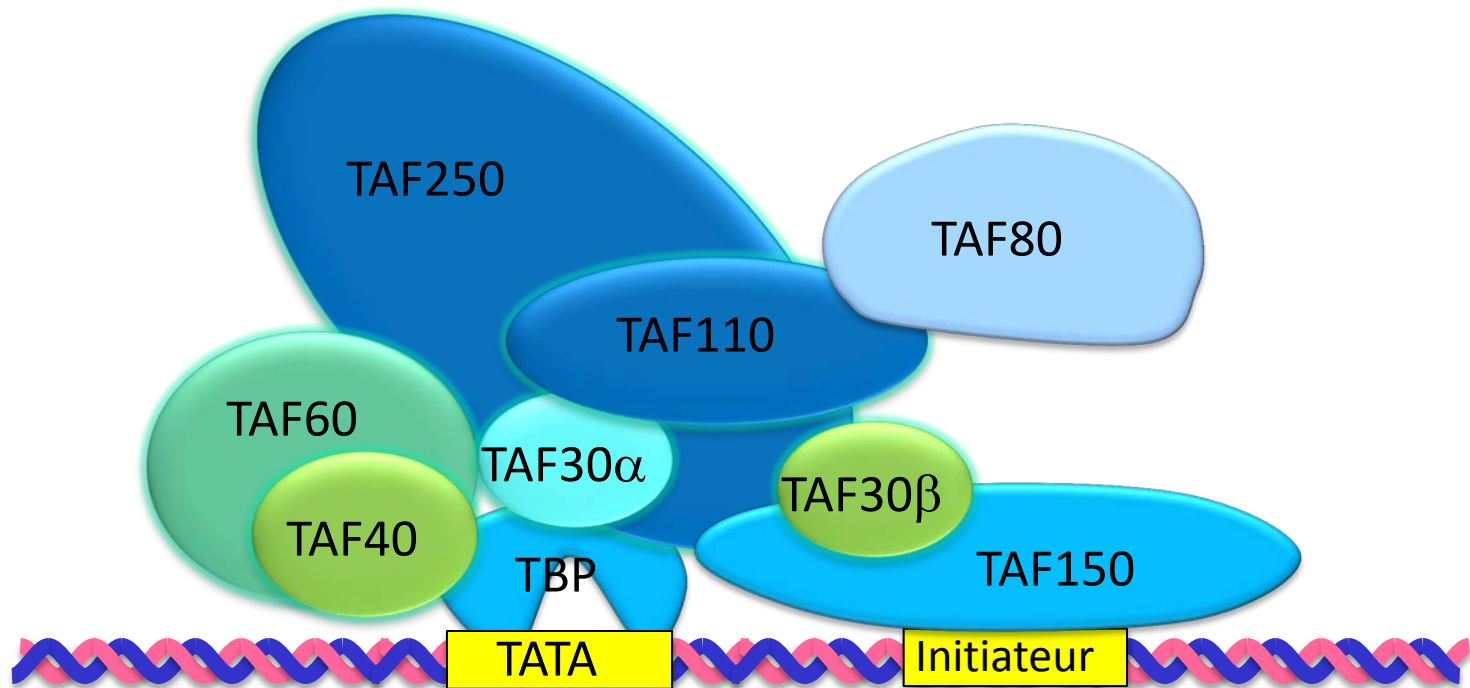


Comment fonctionne un enhancer?

Modèle simplifié d'activation de la transcription



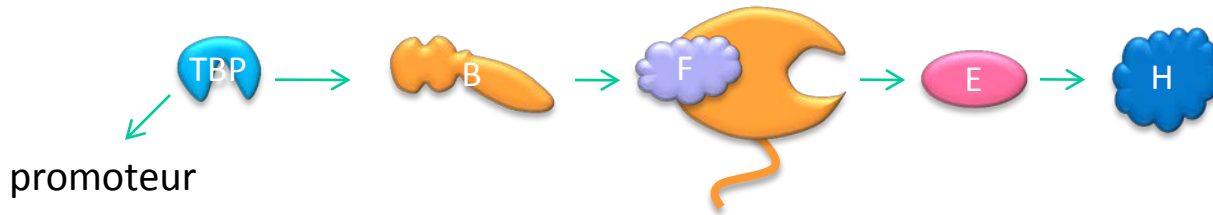
TBP peut s'associer à des facteurs (les TAF) et former le complexe TFII-D: Activation de la transcription



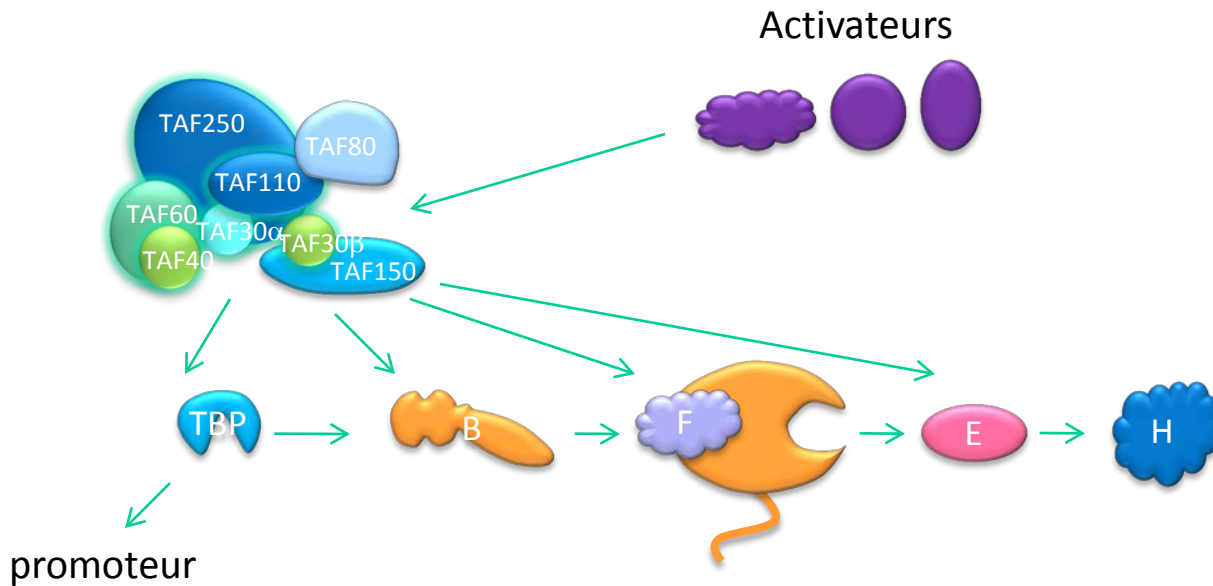
TAF: TBP-Associated Factors : ouvrent la chromatine, acetylent histones etc.

Niveau basal / Niveau activé

→ interactions

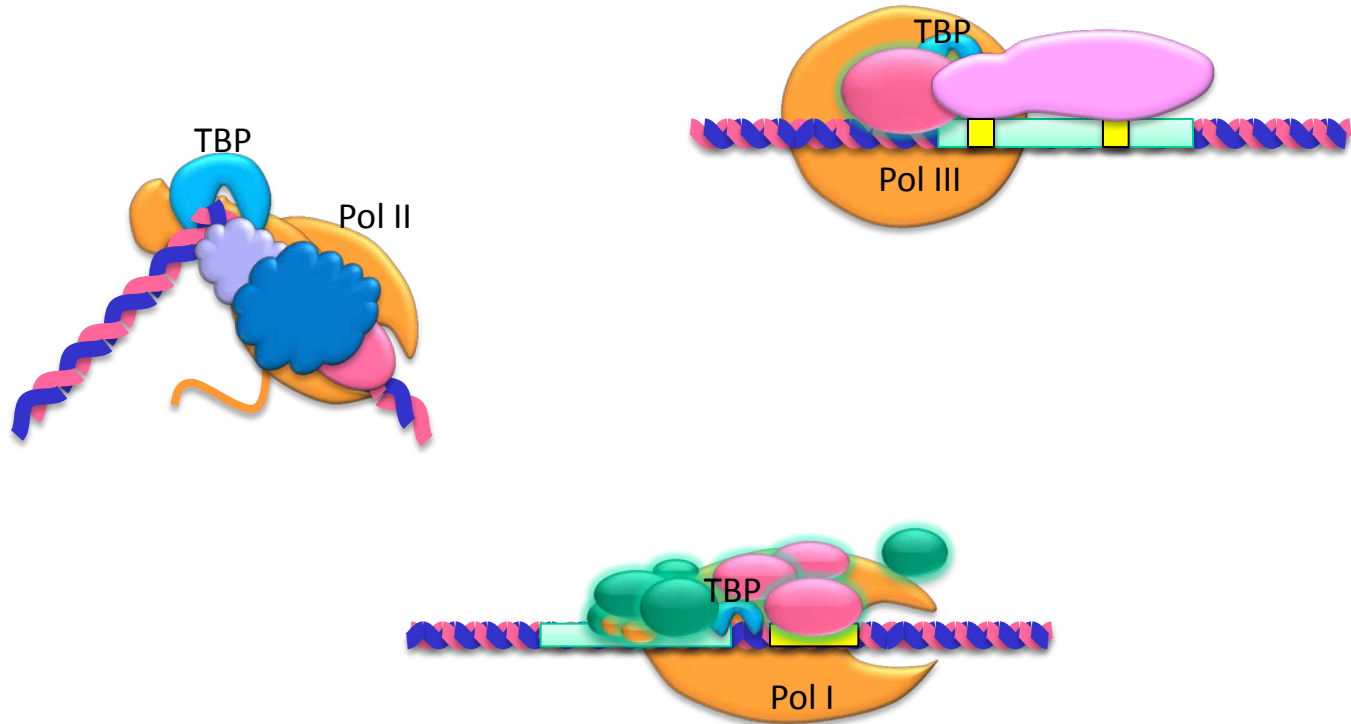


**Transcription
basale**

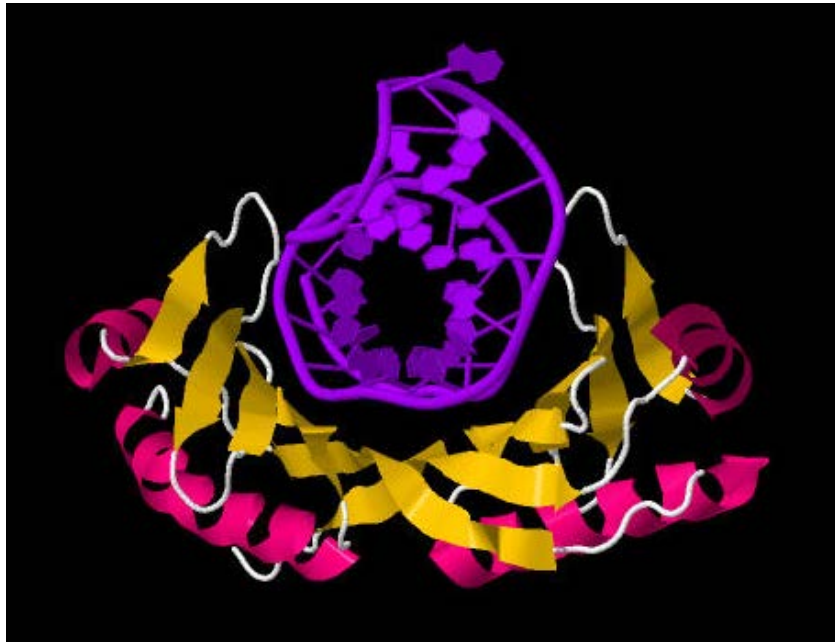


**Transcription
activée**

TBP est nécessaire à l'initiation de la transcription par chacune des 3 polymérases eucaryotes



Structure de la TBP de levure en complexe avec une boite TATA



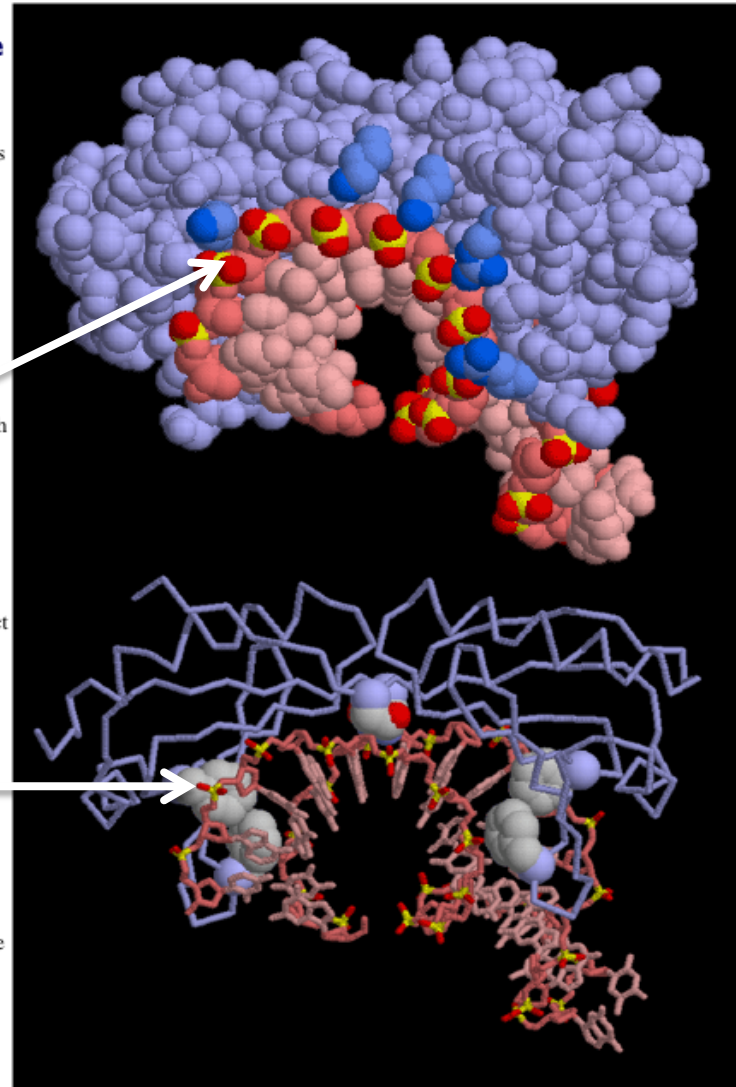
Structure en « selle de cheval »



Fixation dans sillon mineur

Exploring the Structure

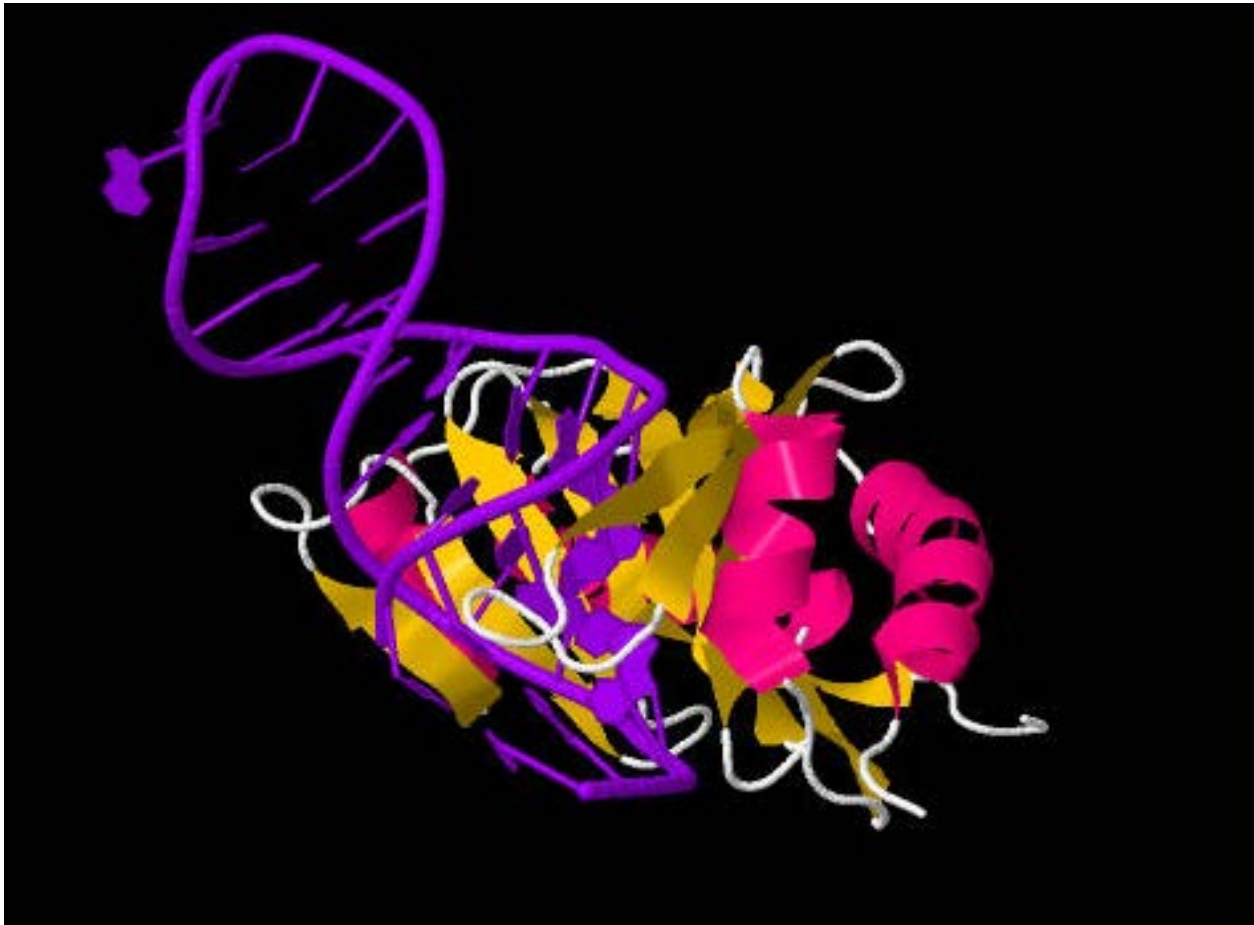
TATA-binding protein uses two types of interactions to recognize and hold the TATA sequence, as seen in this structure from PDB entry [1ytb](#). First, as shown at the top, it has a string of lysine and arginine amino acids (colored dark blue) that interact with the phosphate groups of the DNA (colored bright yellow and red). This glues the protein to the DNA. Second, the protein uses specially-placed amino acids to interact with DNA bases. As shown in the lower picture, four phenylalanine amino acids jam into the DNA minor groove and form the kinks that bend the DNA. There are also two symmetrical asparagine amino acids that form hydrogen bonds at the very center. The combination of the unusual flexibility of TATA DNA sequences and these specific hydrogen bonds allows TATA-binding protein to recognize the proper sequence.



Un mélange
d'interactions:

- non-spécifiques
(coller à l'ADN sur les
groupements P)
- spécifiques
(reconnaître la
séquence TATA)

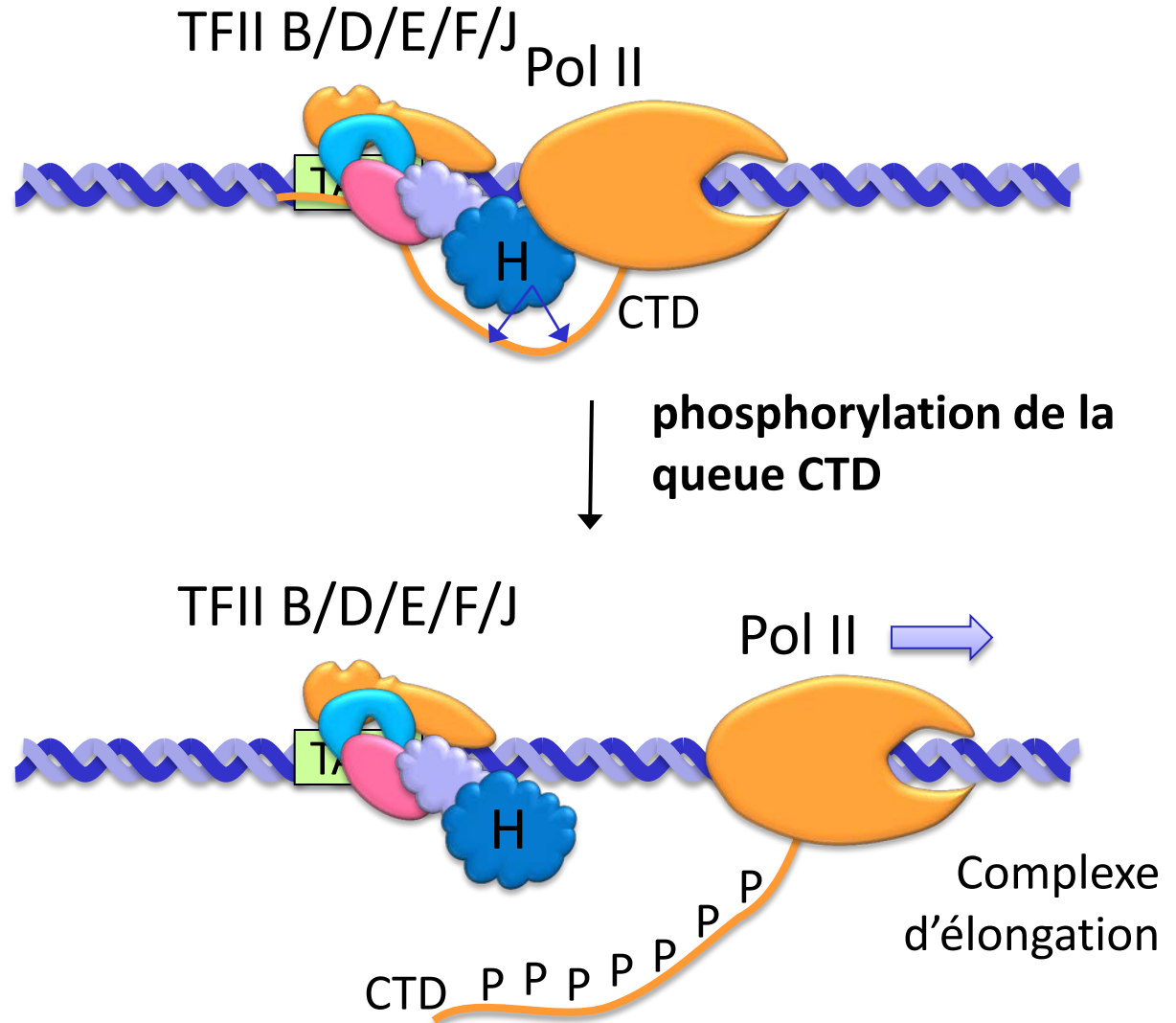
Torsion de la double hélice d'ADN



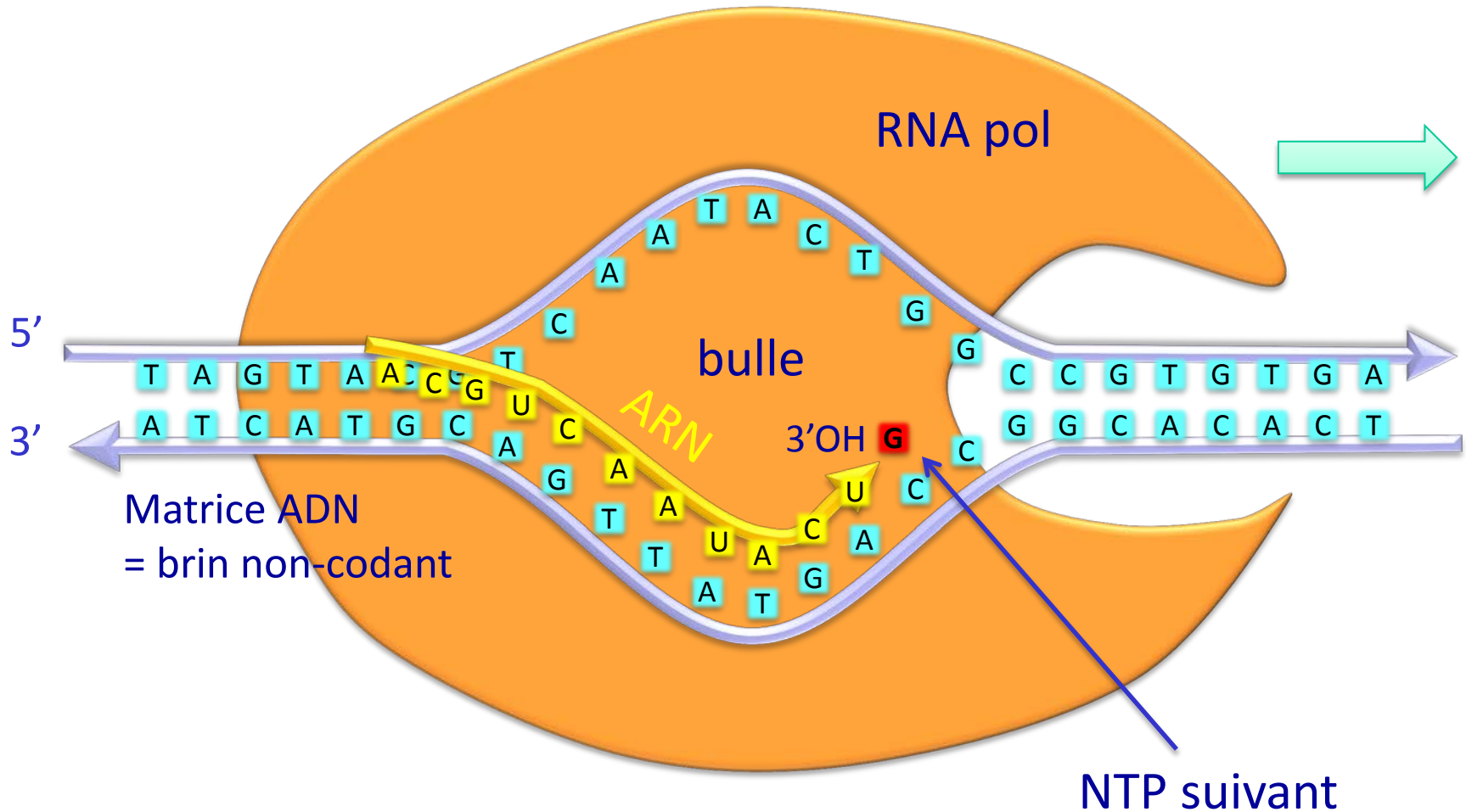
Elongation de la transcription: nécessité de quitter la région du promoteur

Chez les bactéries :
relarguage du facteur
sigma

Chez les eucaryotes :
phosphorylation de la
queue CTD par TFIIH

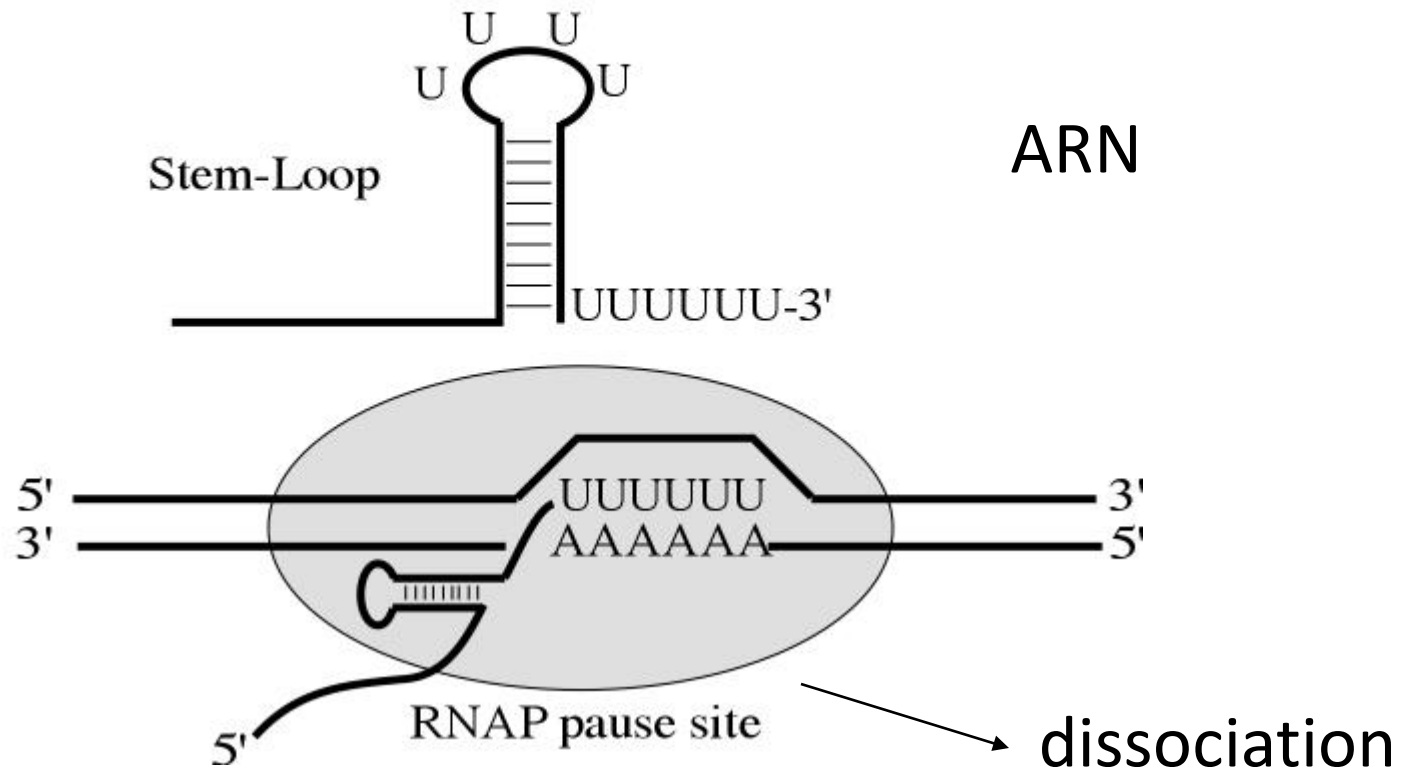


Elongation de la transcription



Procaryotes: la terminaison rho-indépendante

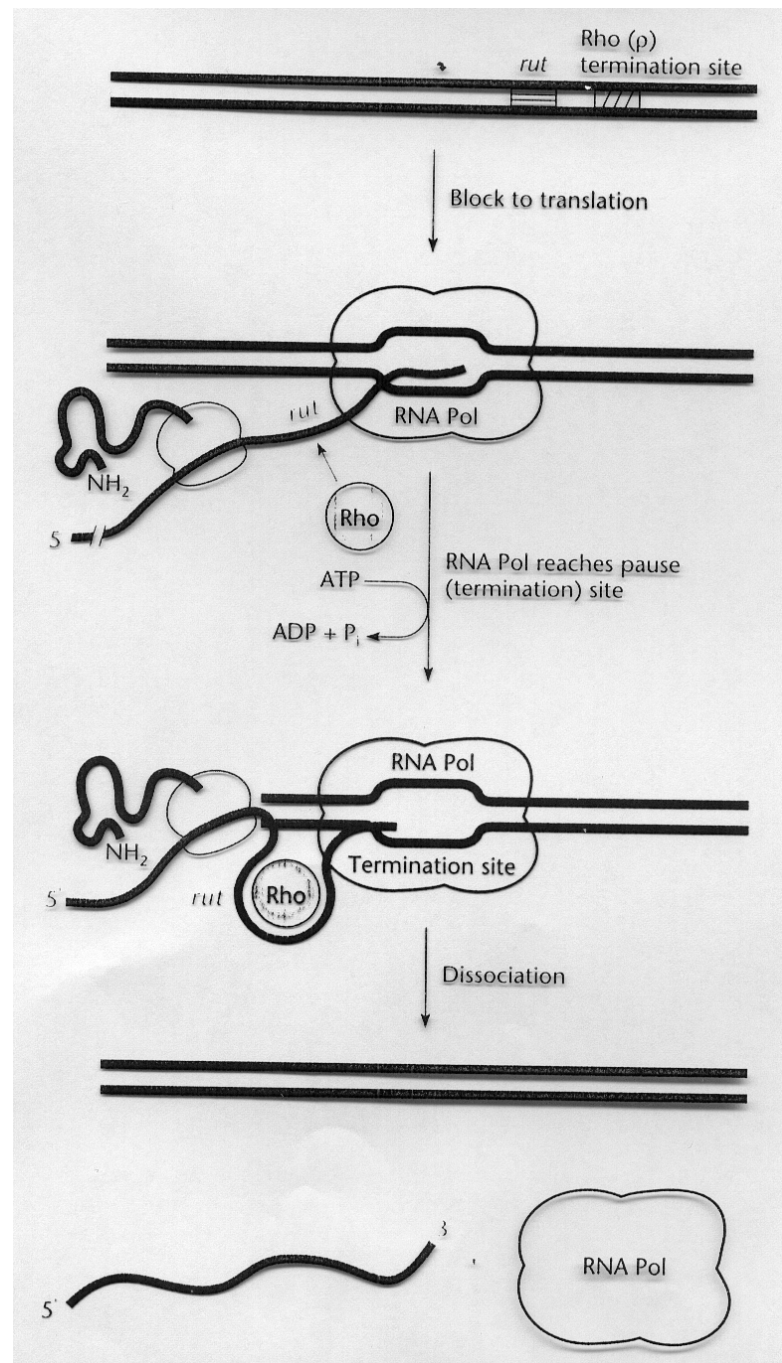
5'-GTACCGGGCCTTTTGGCCCGGTACTTTTTT-3' ADN
3'-CATGGCCCGGAAAACCGGGCCATGAAAAA-5'



Procaryotes: la terminaison rho-dépendante (modèle)

Blocage du ribosome sur codon Stop permet la fixation de la protéine Rho sur un site « Rho utilization site »

La fixation de Rho cause le décrochage de la polymérase



Terminaison chez les eucaryotes

- Arrêt causé par la polyadenylation (voir dernier cours).
- Après arrêt: maturation de l'ARN

Chapitre 3:

Régulation de la transcription: le modèle procaryote

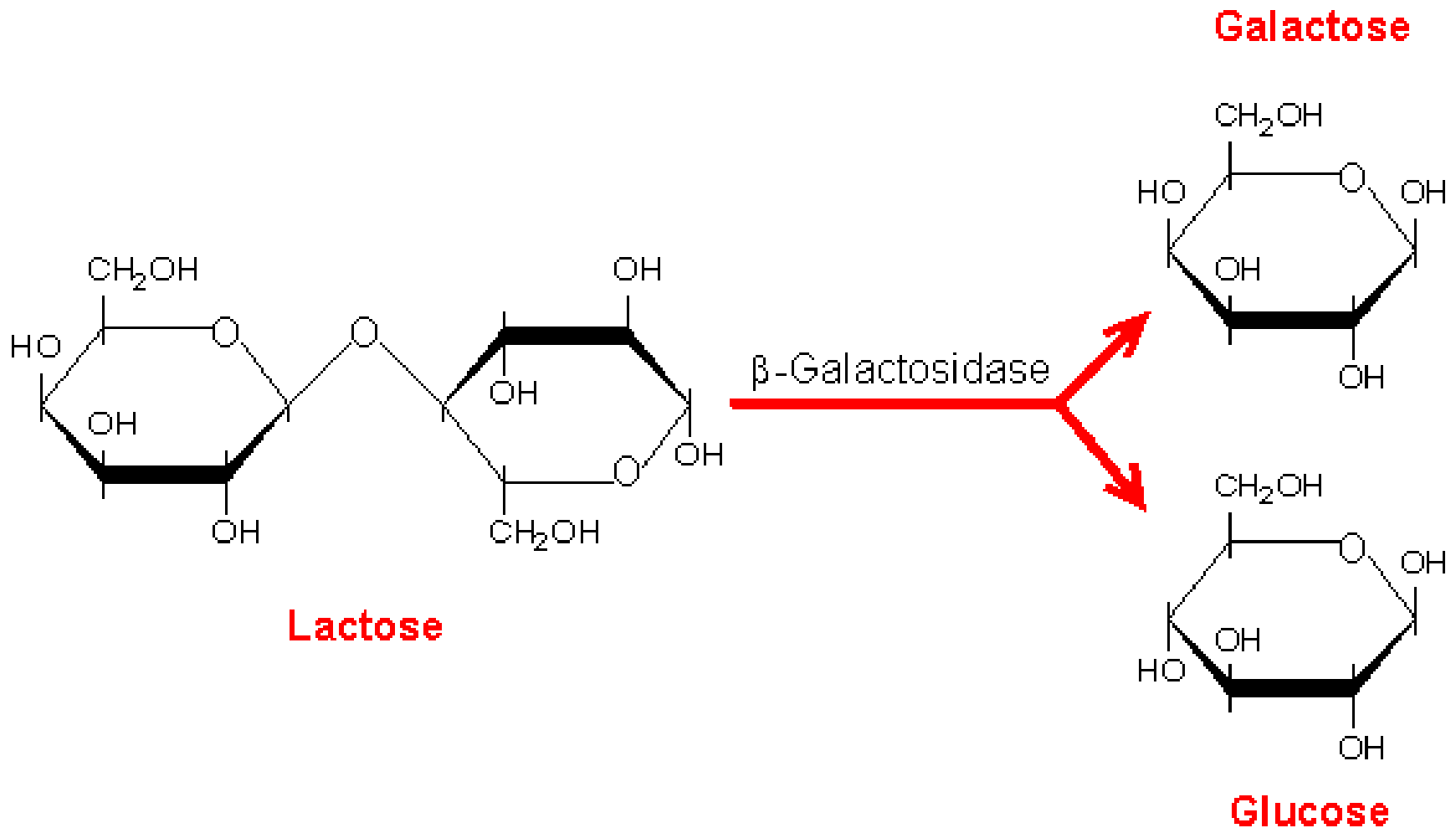
La régulation de l'expression

- Pourquoi l'expression des gènes doit-elle être régulée?
 - Division cellulaire
 - Différentiation
 - Réponses à l'environnement

Induction / Repression

- Induction/répression: réponses à l'apparition d'un substrat particulier
- Induction:
 - En absence de lactose: pas besoin d'enzyme de métabolisme du lactose
 - En présence de lactose: induction. L'enzyme est produite
- Répression
 - Une enzyme d'*E.coli* synthétise le tryptophane
 - En présence de Trp dans le milieu: pas besoin d'enzyme: répression

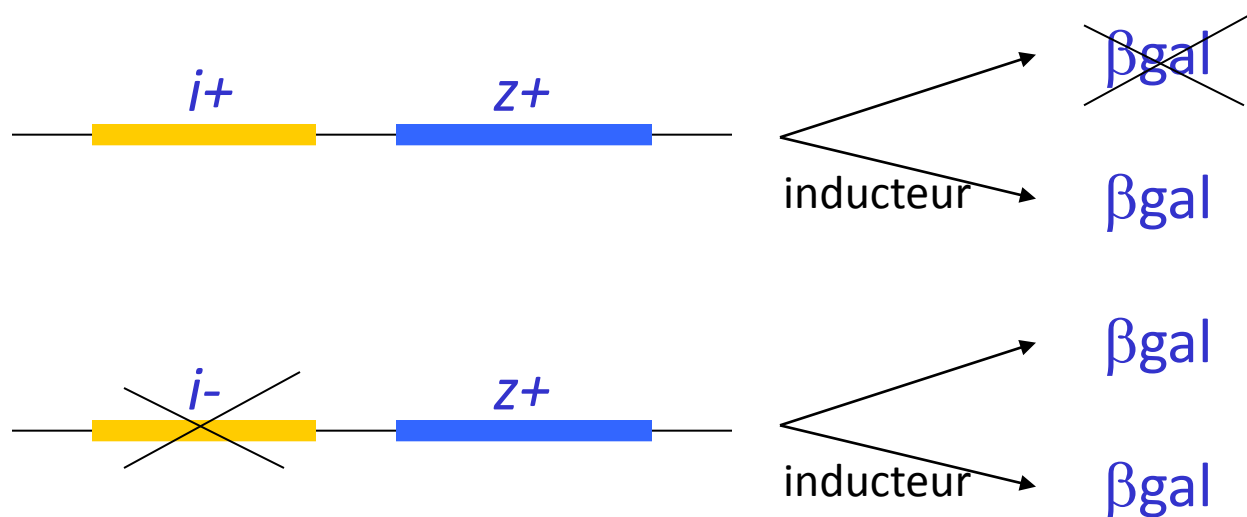
Métabolisme du lactose



Au départ: deux gènes connus

Années 50

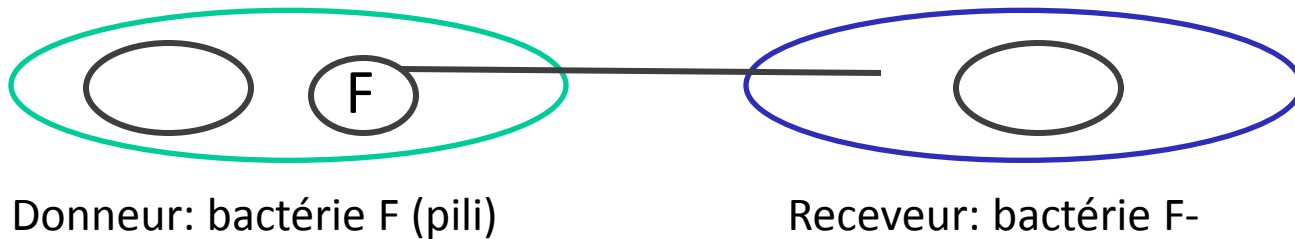
- Gène *z* (lac Z) : β gal
- Gène *i*:
 - Souche inductible: *i+*
 - Souche constitutive: *i-*



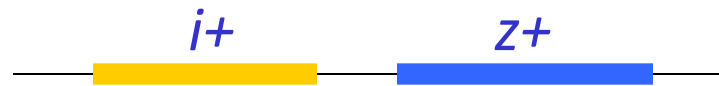
Inducteur=lactose ou analogue

L'expérience Pajama*

(*Pardee, Jacob, Monod, 1959)

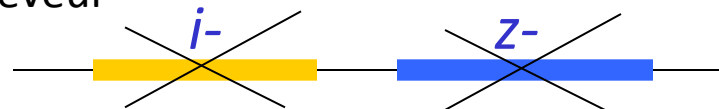


donneur



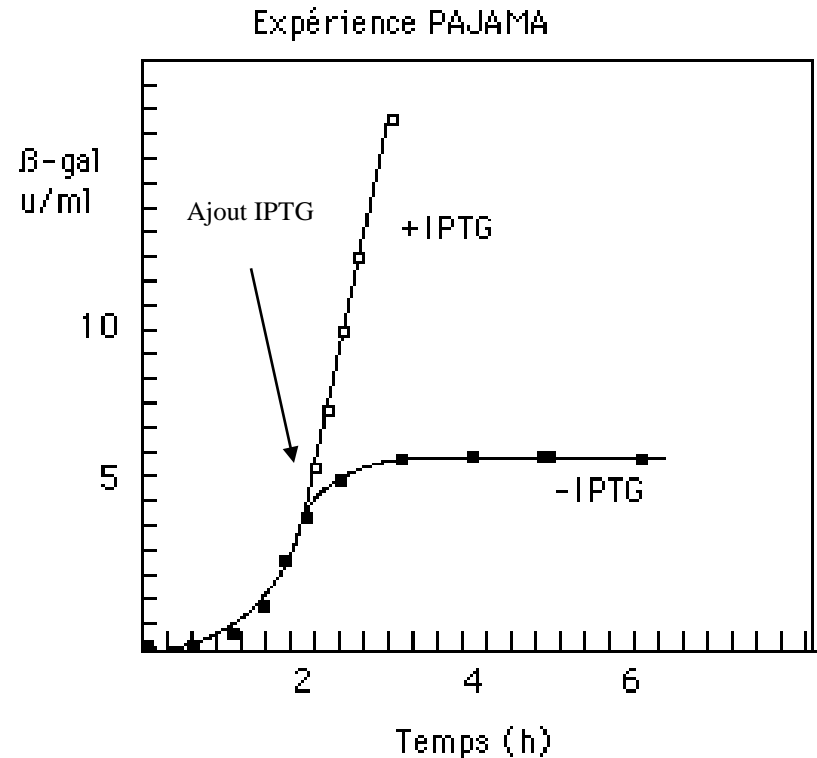
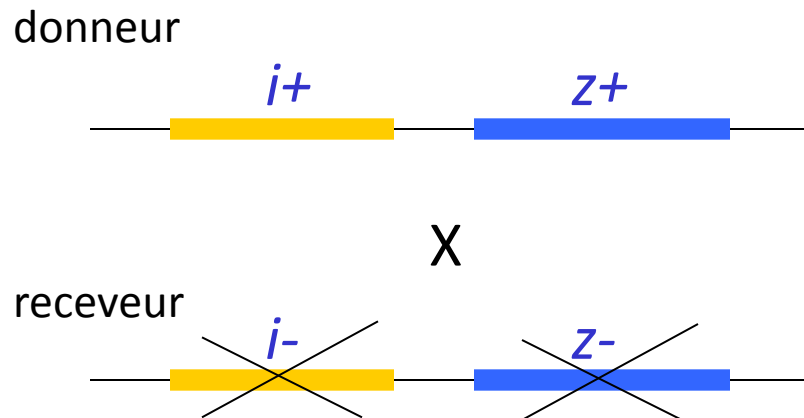
X

receveur



L'expérience Pajama

IPTG: inducteur analogue du lactose qui contrairement au lactose n'est pas reconnu par beta-gal. Donc reste dans la cellule.

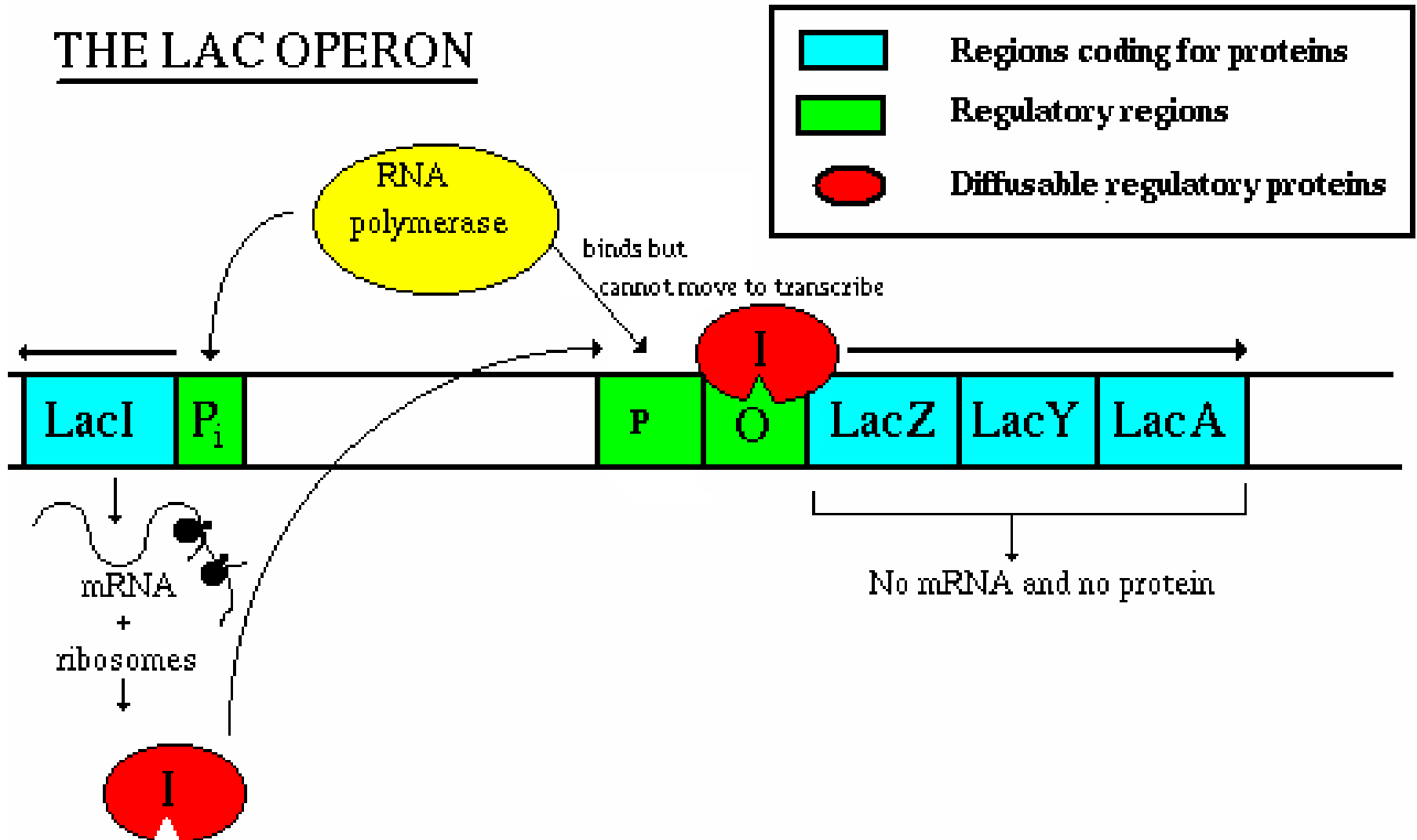


Interprétation:

- 1- introduction du gène $z+$ dans receveur $i-$ \rightarrow fabrication $Bgal$
- 2- introduction $i+$ \rightarrow bloque synthèse de βgal (i est un **répresseur**)
- 3- en présence d'inducteur, le répresseur ne fonctionne plus

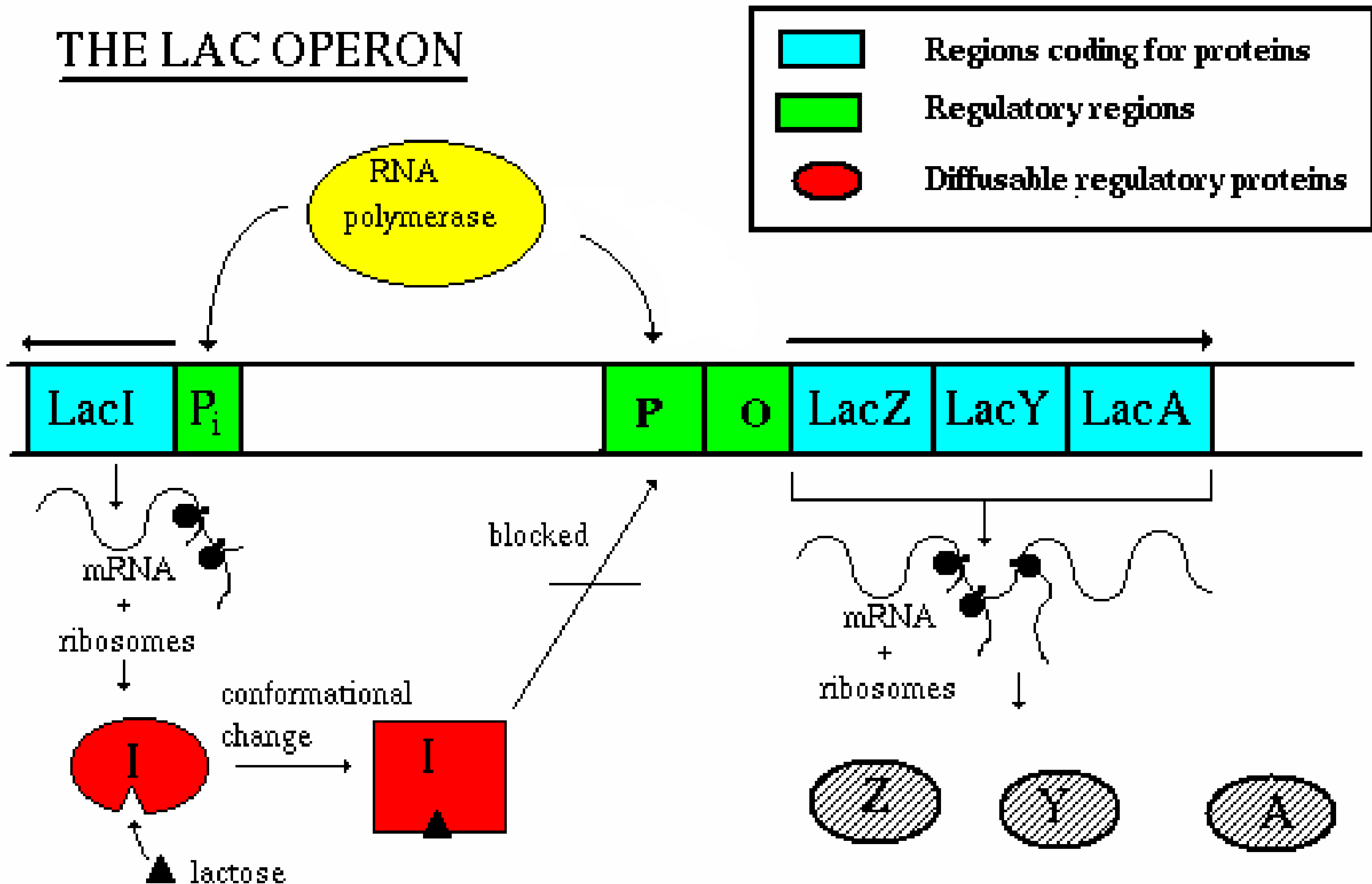
Fonctionnement de l'opéron (1)

THE LAC OPERON



Fonctionnement de l'opéron (2)

THE LAC OPERON



Les mutants qui ont permis d'établir le modèle d'opéron:

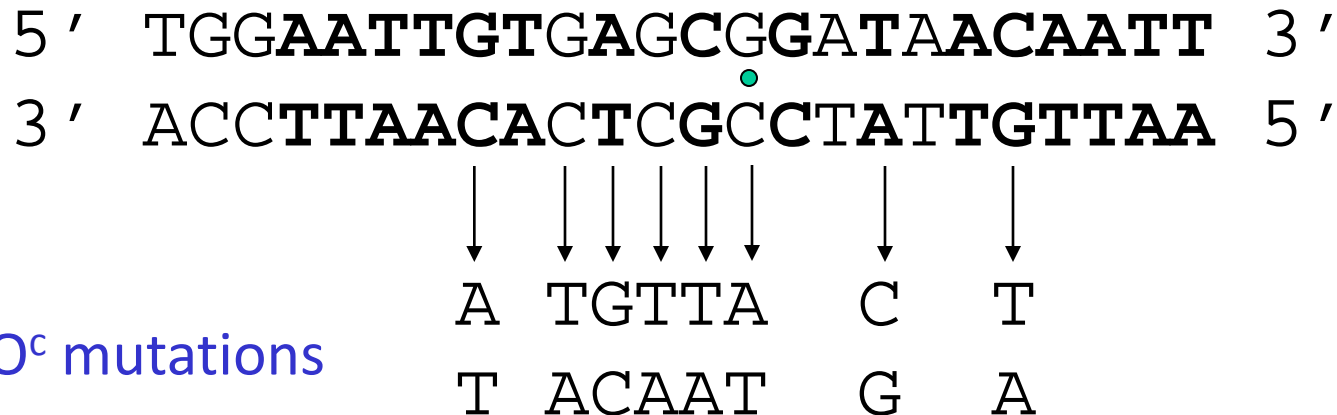
Genotype	Non-induit	induit	
I+,Z+	-	+	Sauvage
I-,Z+	+	+	Pas de répression
I-,Z+ / F I+,Z+	-	+	Restauration répression par action trans
I _s ,Z+	-	-	I _s : represseur insensible à l'induction
I _s ,Z+ / F I+,Z+	-	-	I _s agit encore en trans
O _c ,Z+	+	+	O _c : opérateur constitutif. Ne reconnaît pas I
O+,Z- / F O _c ,Z+	+	+	O+ ne répare pas O _c : action en cis
I _s ,O+,Z+ / F I+,O _c ,Z+	+	+	O _c dominant sur I _s

L'effet de l'inducteur sur le répresseur n'est pas absolu

	Répresseur	Répresseur +inducteur	
opérateur	2×10^{13}	2×10^{10}	Affinité
autre DNA	2×10^6	2×10^6	
Spécificité	10^7	10^4	Différence d'affinité

Symétrie de la séquence de l'opérateur de l'opéron lactose

Mutations rendant constitutive l'expression de l'opéron:

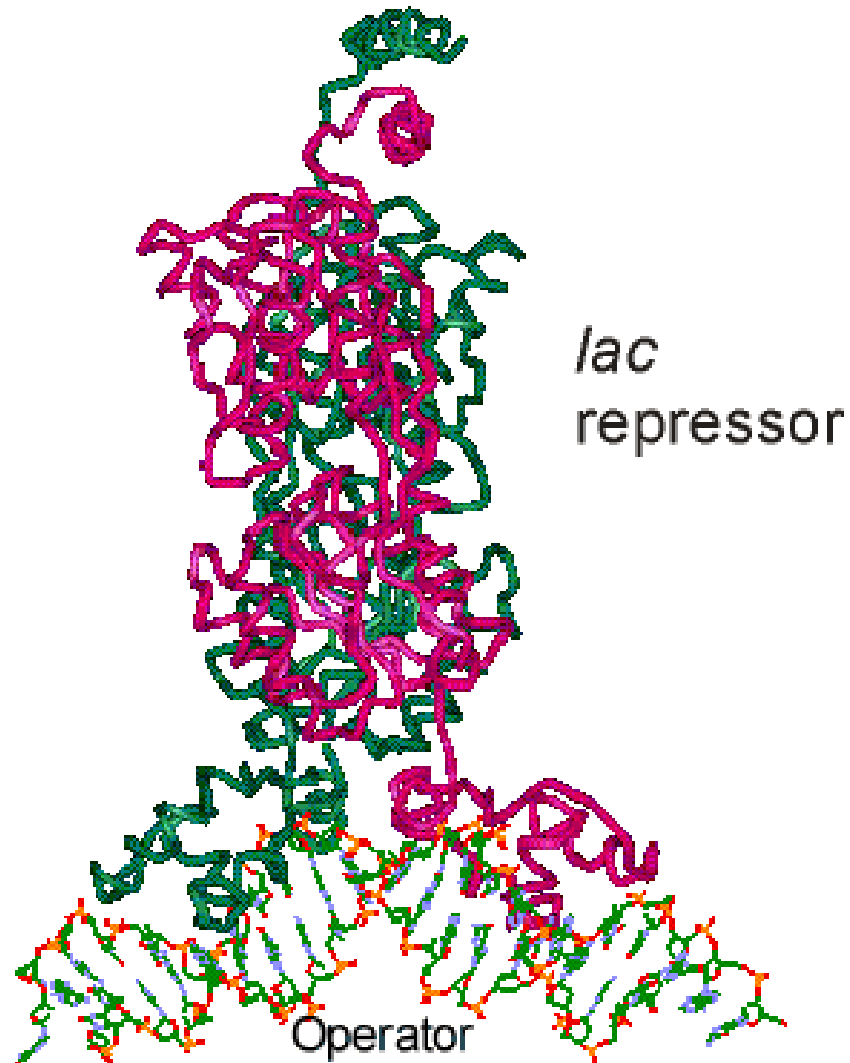


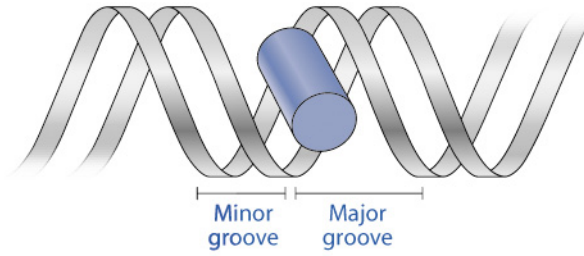
O^c mutations

Structure du complexe répresseur *lac* /opérateur

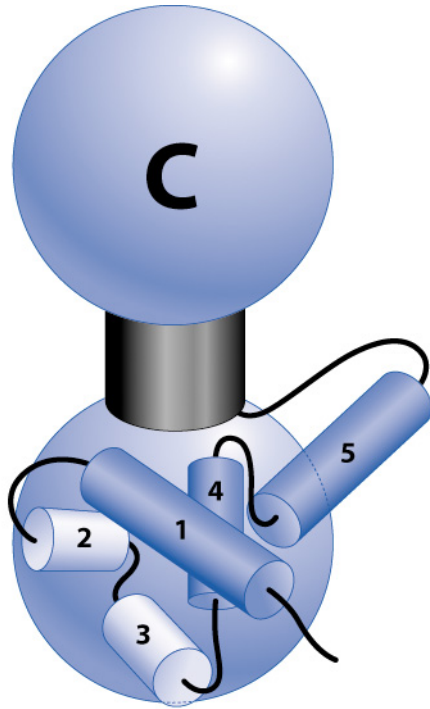
Le répresseur est un homodimère

Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente.

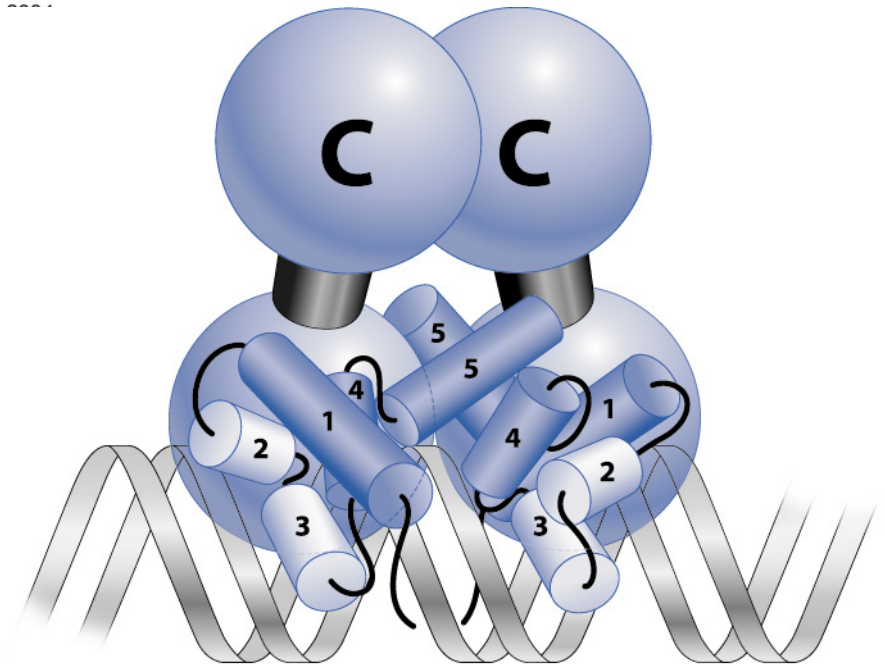




A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
 © Cold Spring Harbor Laboratory Press
 Chapter 2, Figure 4

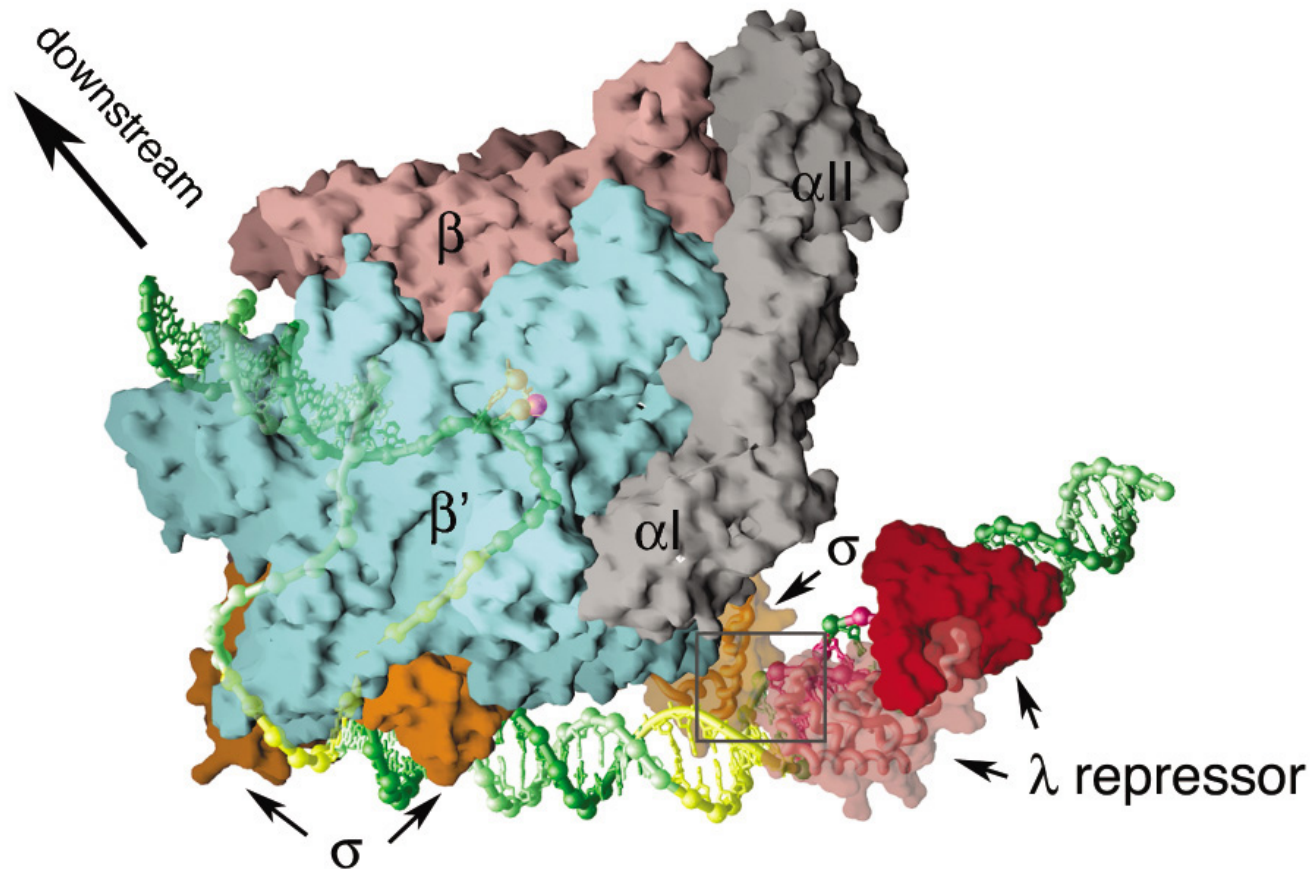


A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
 © Cold Spring Harbor Laboratory Press
 Chapter 2, Figure 5



A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
 © Cold Spring Harbor Laboratory Press
 Chapter 2, Figure 6

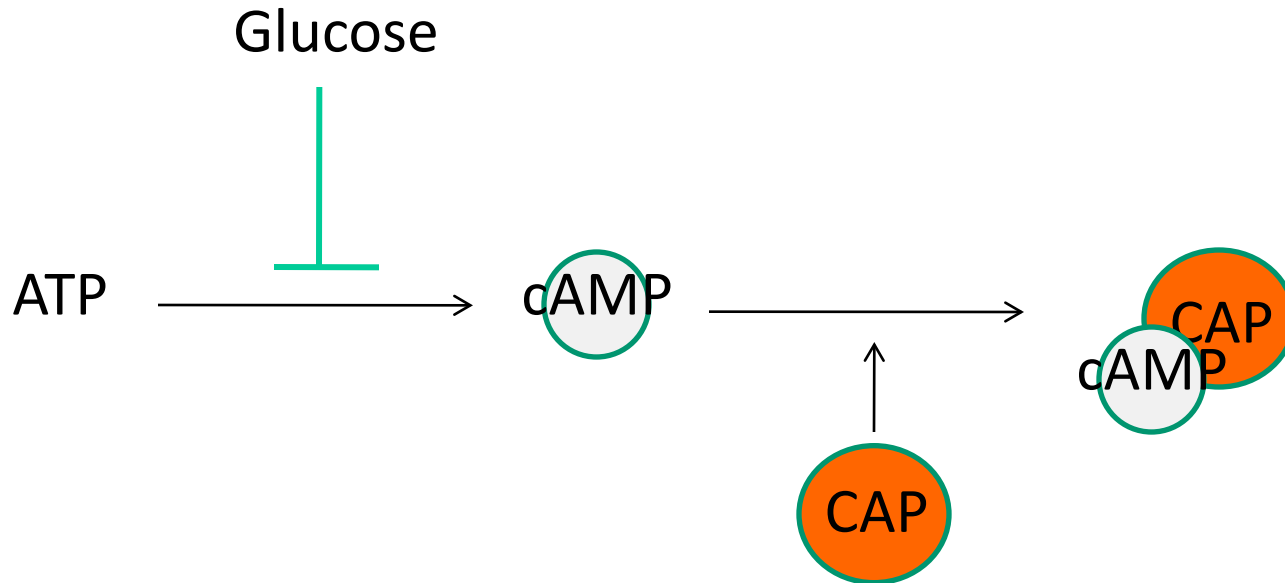
Encombrement de l'ARN polymérase bactérienne, de l'ADN et du répresseur du phage λ



A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
© Cold Spring Harbor Laboratory Press
Chapter 5, Figure 15a
Image prepared with BobScript, MolScript, and Raster3D.

La répression catabolique

Le glucose (un catabolite) réprime la synthèse de β gal

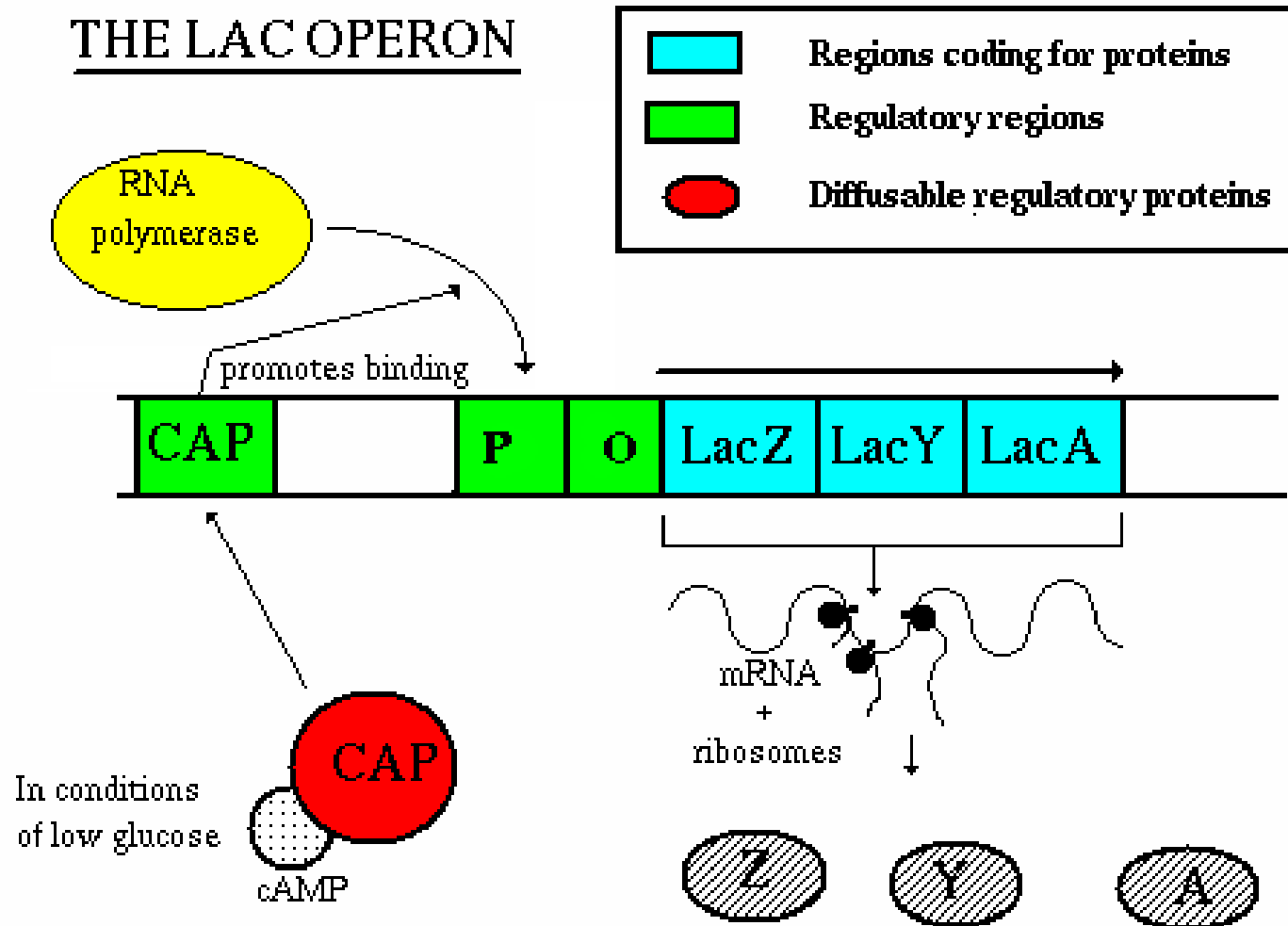


En absence de glucose: augmentation du taux d'AMPC qui forme un complexe avec la protéine CAP et l'active.

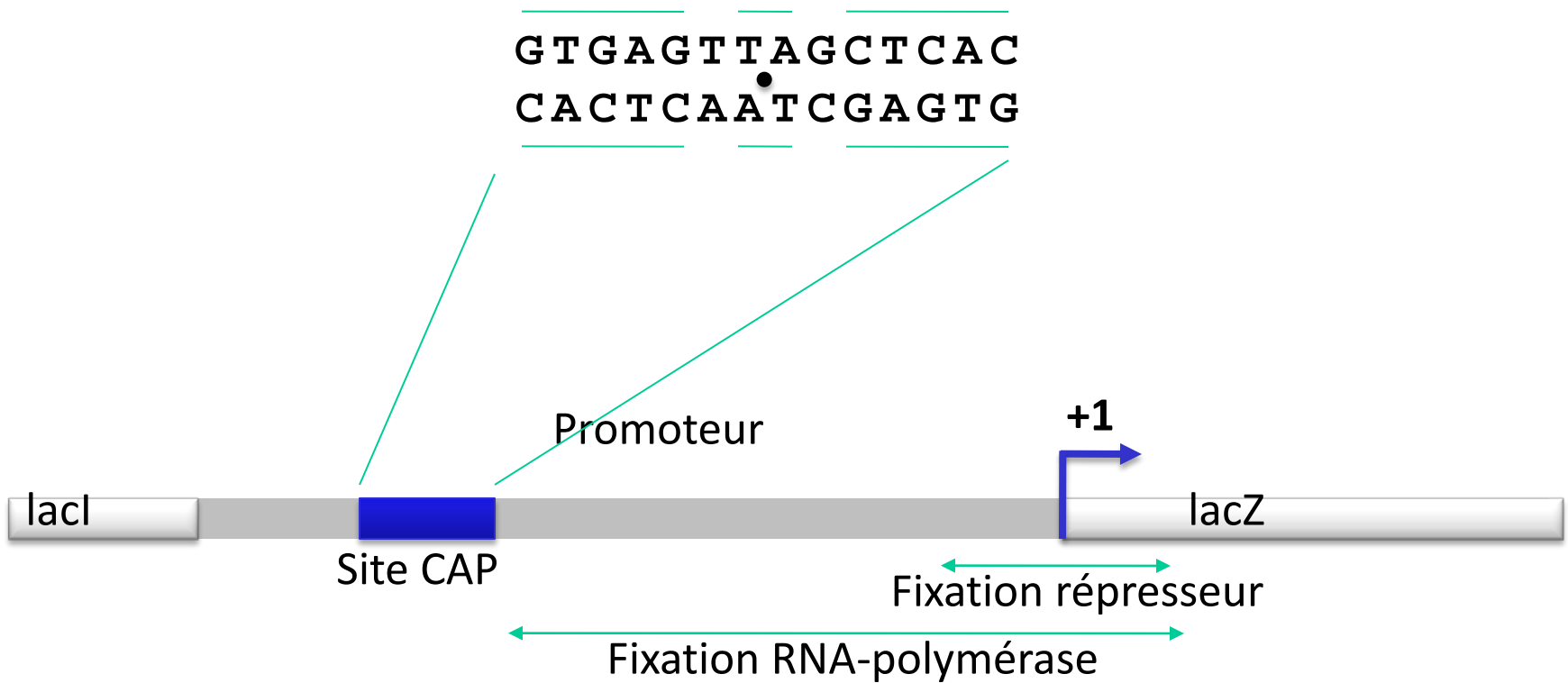
En présence de glucose: baisse du taux d'AMPC: empêche l'activation de CAP

une régulation positive

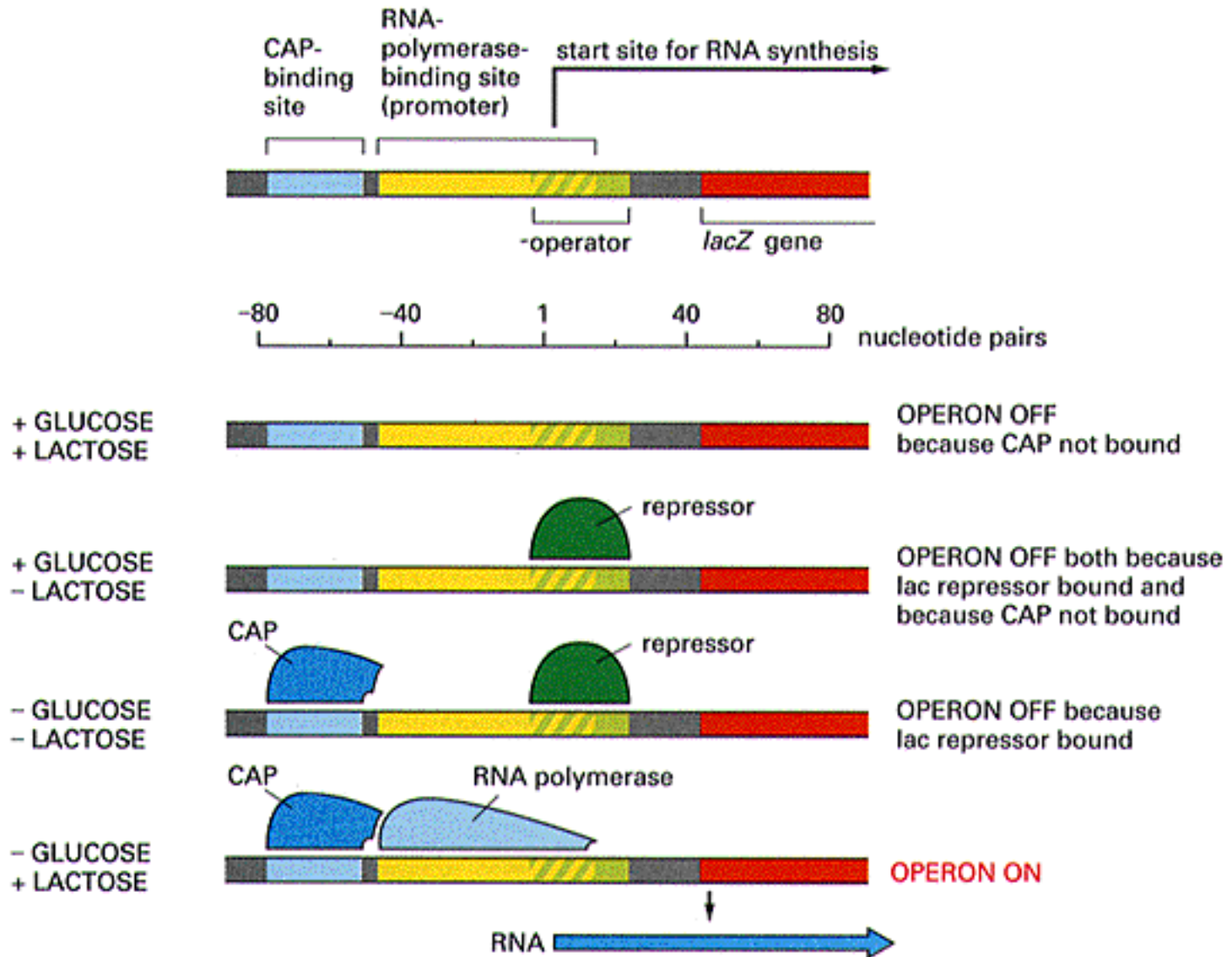
THE LAC OPERON



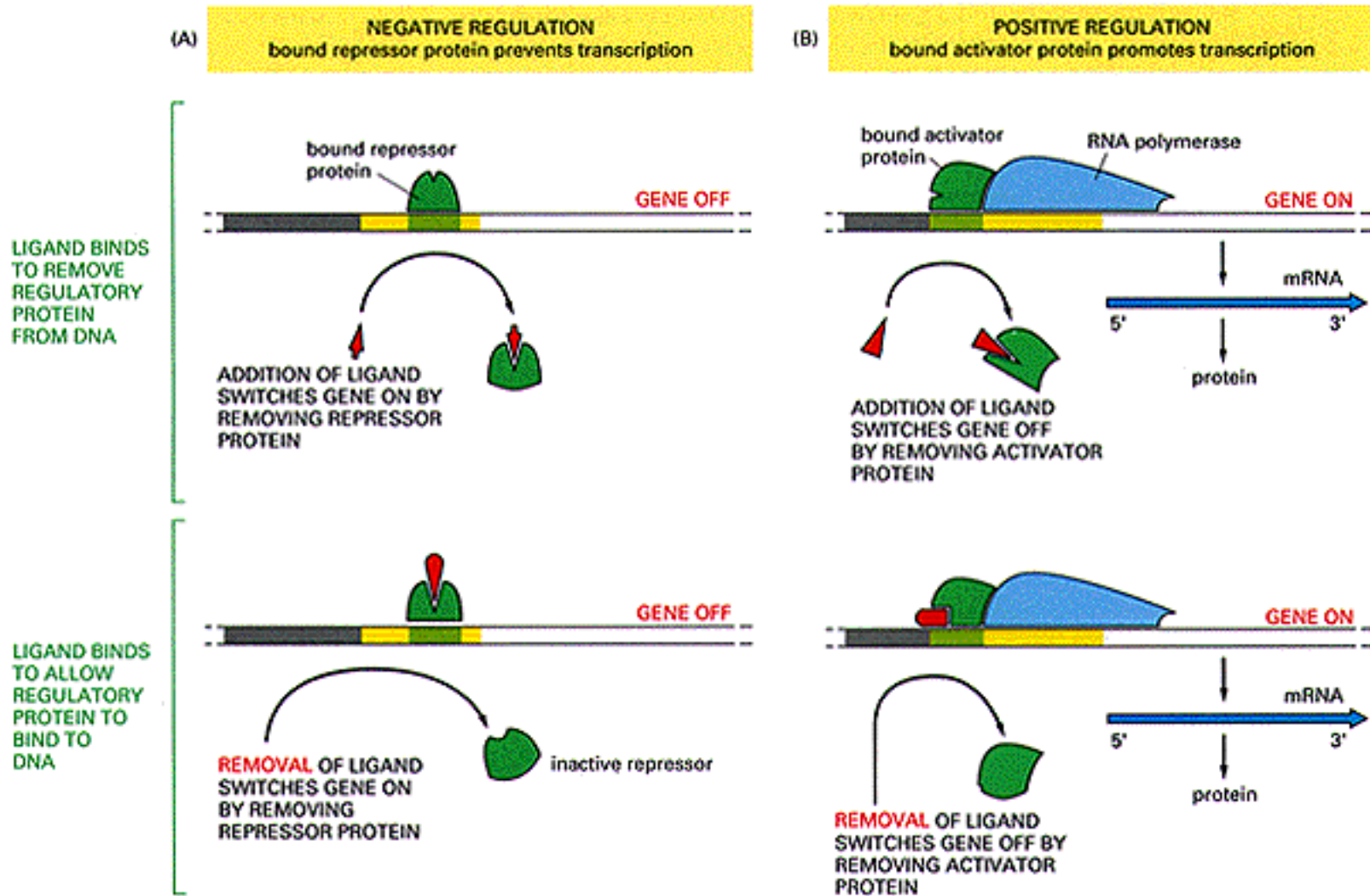
Site de fixation du complexe CAP-cAMP sur le promoteur



Conditions de régulation



Principes de régulation positive et négative



La régulation de la synthèse du tryptophane chez *coli*

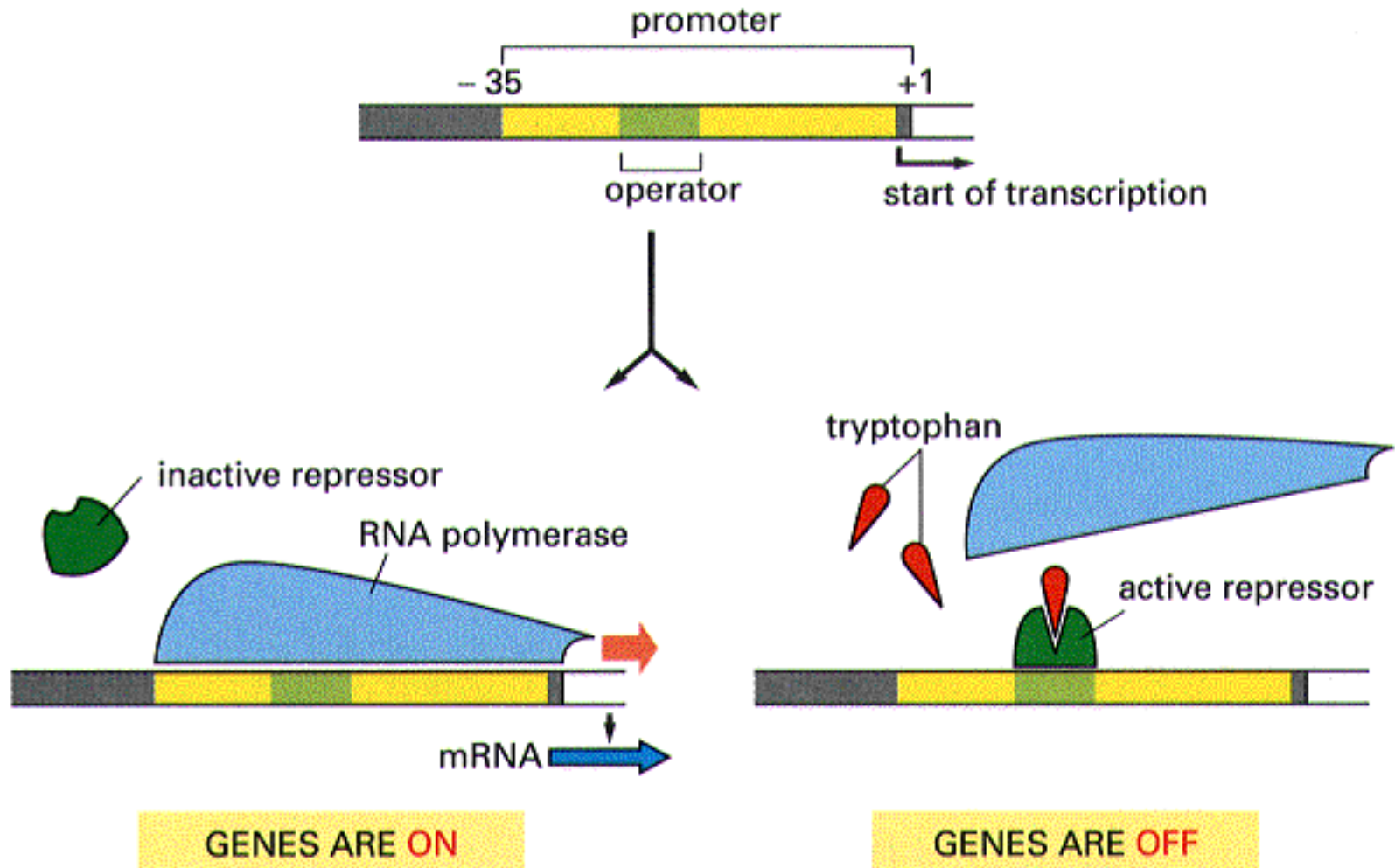
1. Contrôle au niveau de l'initiation de la transcription
2. Contrôle au niveau de la terminaison de la transcription

Trp: contrôle de l'initiation

- Un répresseur, *trpR* se fixe sur 3 opérateurs et contrôle la transcription :
 - De l'opéron *trpEDBCA* qui code pour les enzymes de la voie de bio synthèse du tryptophane à partir du chorismate
 - Du gène *aroH* qui code pour un enzyme impliqué dans la première étape de la voie de synthèse des acides aminés aromatiques
 - De son propre gène *trpR* (autocontrôle)

```
aroH GCCGAATGTACTAGAGAACTAGTGCATTAGGCTTATTTTTTTTGTATGATGCTAA  
Trp   AATCATCGAACTAGTTAACTAAGTACGCA  
trpR TGCTATCGTACTCTTTAGCGAGTACAACC
```

Contrôle au niveau de l'initiation de la transcription par le répresseur TrpR



***Trp*: contrôle de la terminaison**

- La transcription de l'opéron peut s'arrêter précocément après la synthèse d'une séquence leader qui précède les régions codant pour trpEDBCA: mécanisme d'atténuation

Le modèle d'atténuation

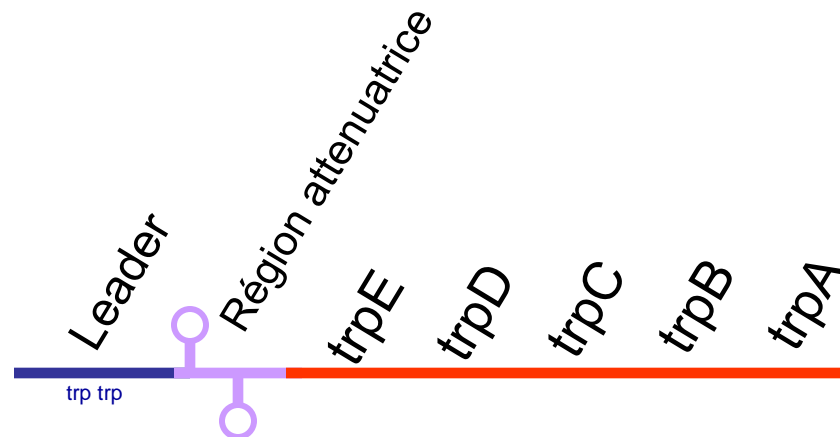
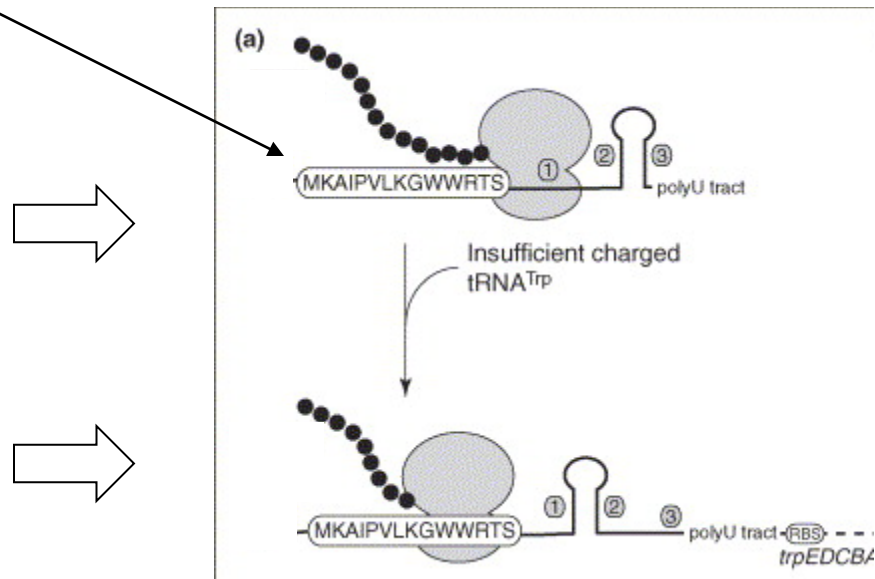
Peptide leader avec 2 codons trp

En présence de trp:

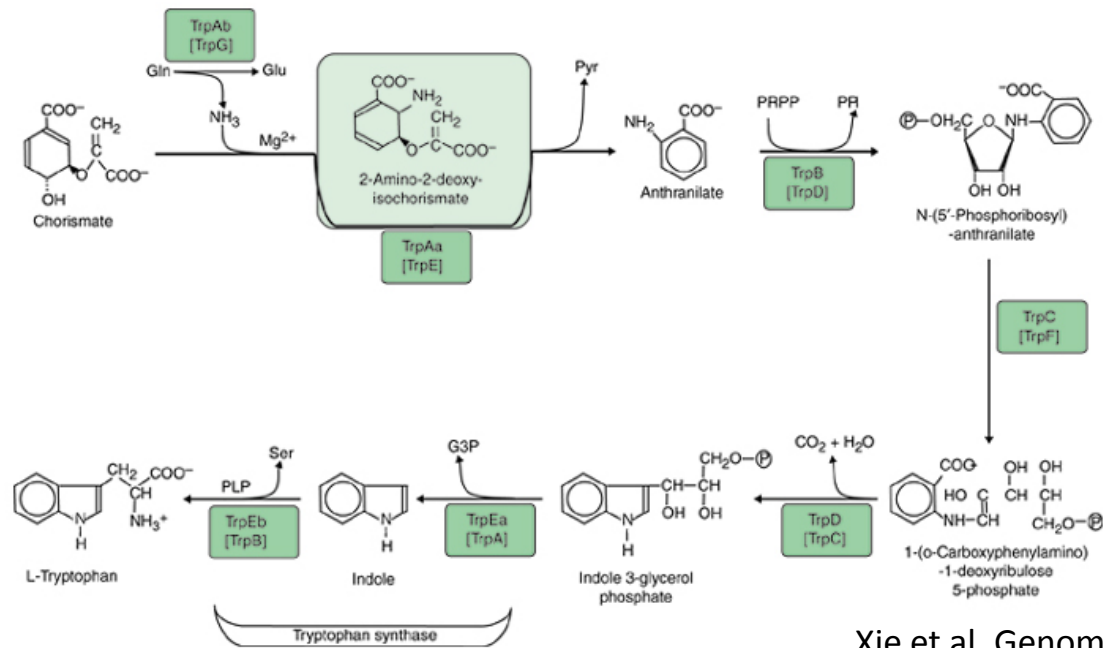
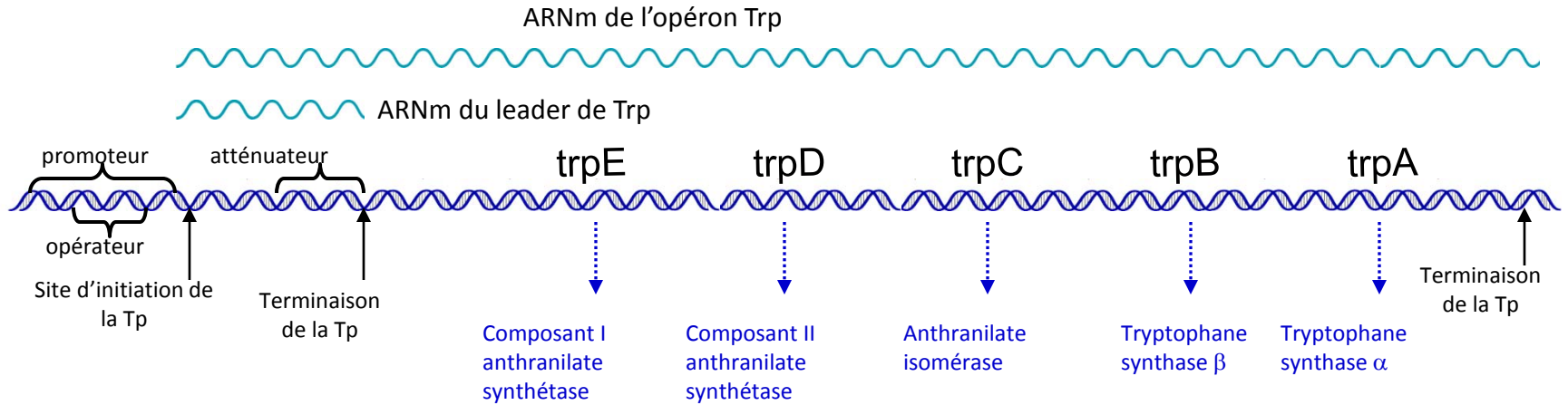
- Passage du ribosome
- Formation d'une structure terminatrice
- Blocage transcription

En absence de trp:

- Blocage du ribosome
- Formation d'une structure anti-terminatrice
- Poursuite de la transcription



Vue d'ensemble de l'opéron tryptophane d' *E. coli*



Et les eucaryotes?

Stratégies de régulation de la transcription chez les eucaryotes

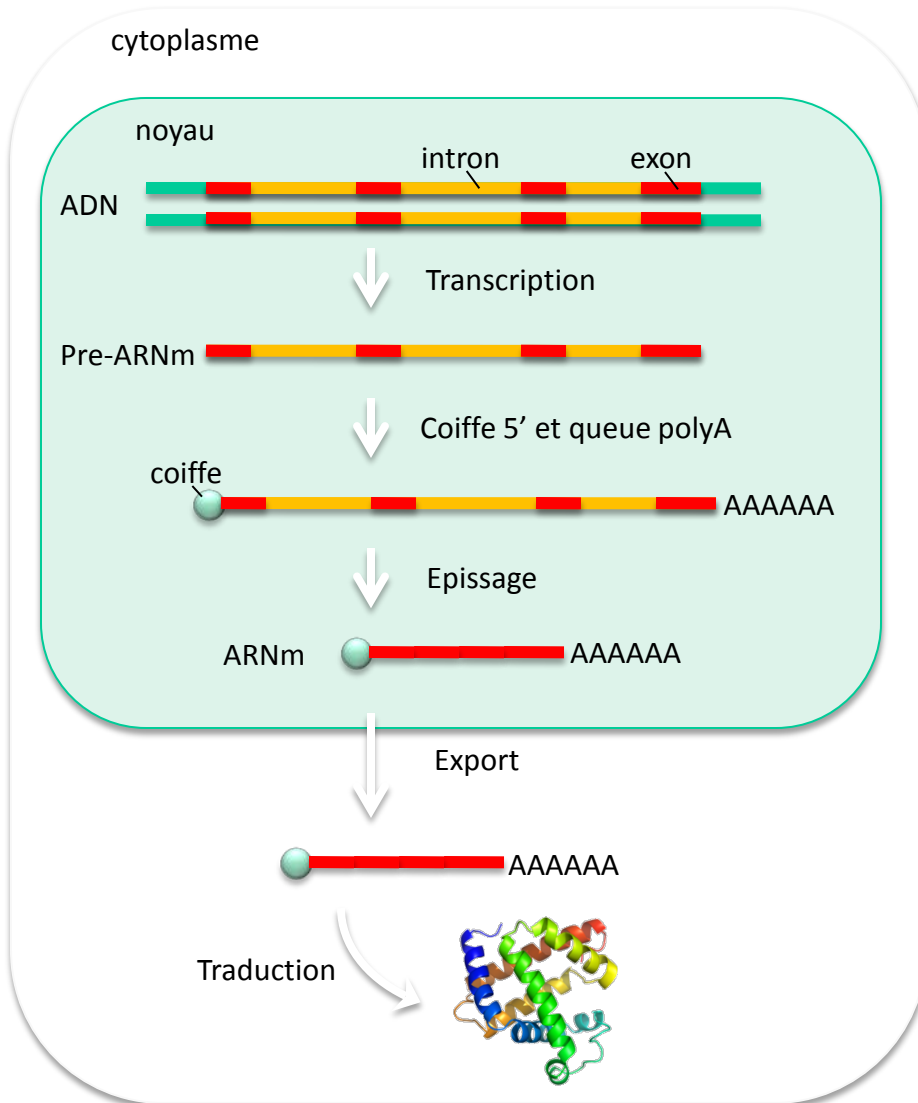
- Stratégies plus complexes que chez les procaryotes
 - Transport des protéines cytoplasme>noyau
 - Modification/activation des protéines
 - Glycosylation, acétylation, etc...
 - ADN non nu:
 - Chromatine ouverte / fermée
 - Maturation variable des ARNm
 - Un préARNm peut donner des ARNm différents

Chapitre 4:

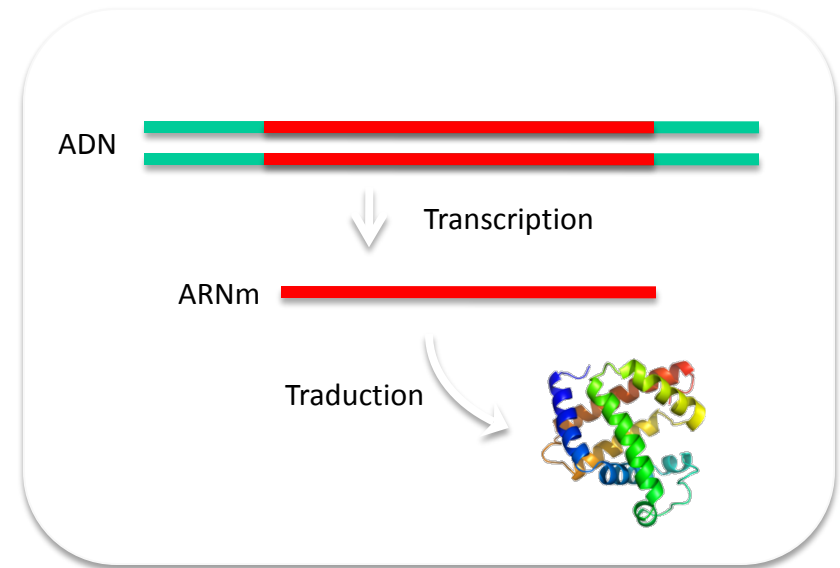
Maturation des ARN chez les eucaryotes

Expression des gènes : eucaryotes et procaryotes

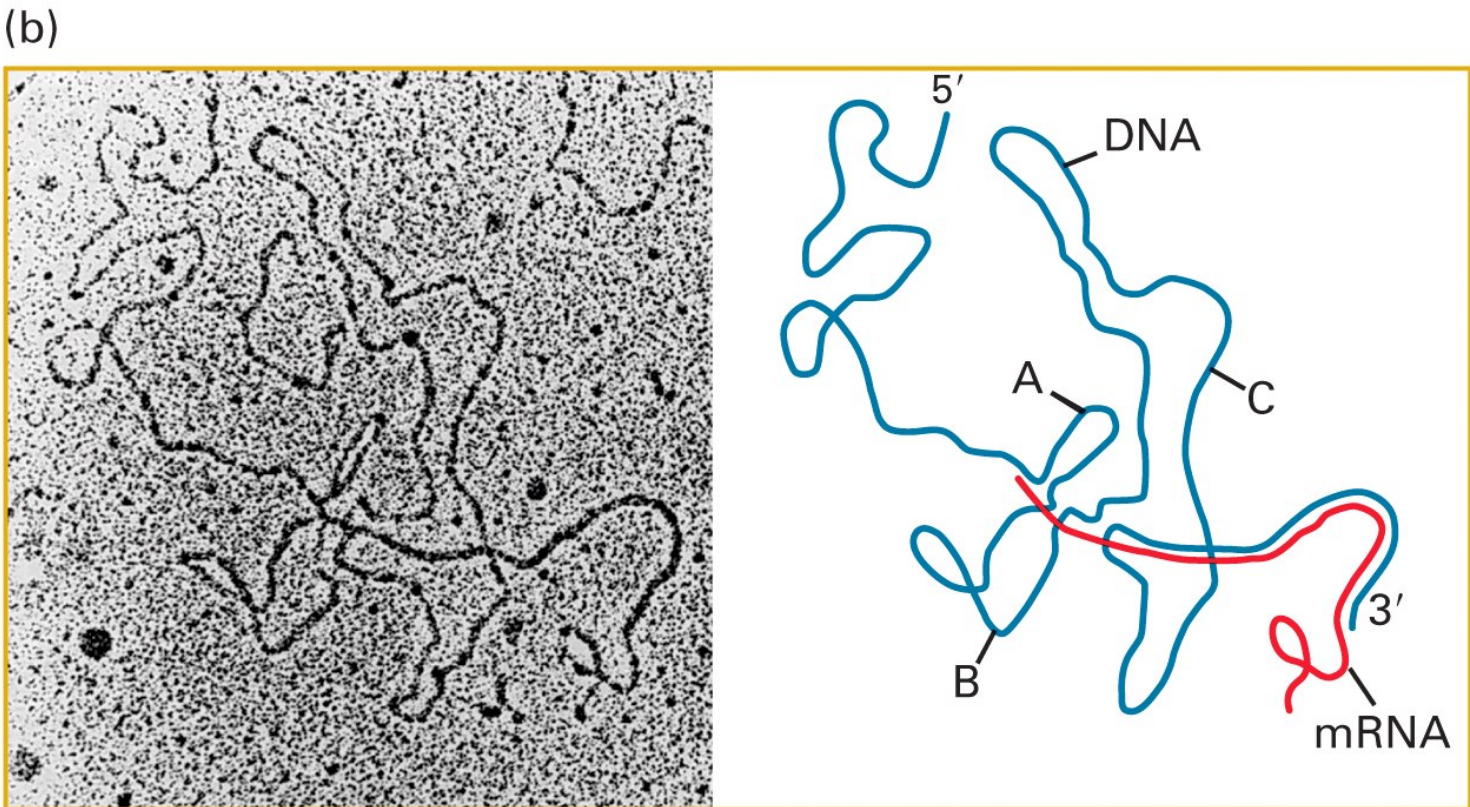
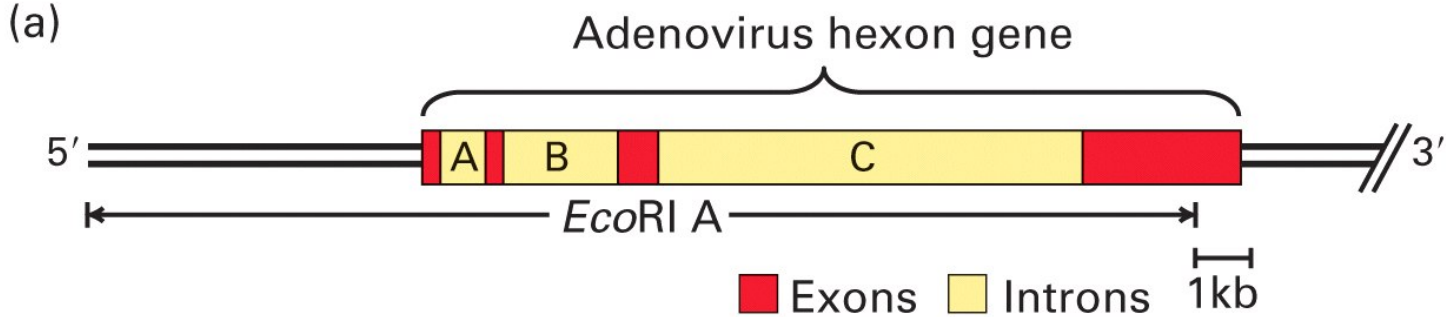
Eucaryotes



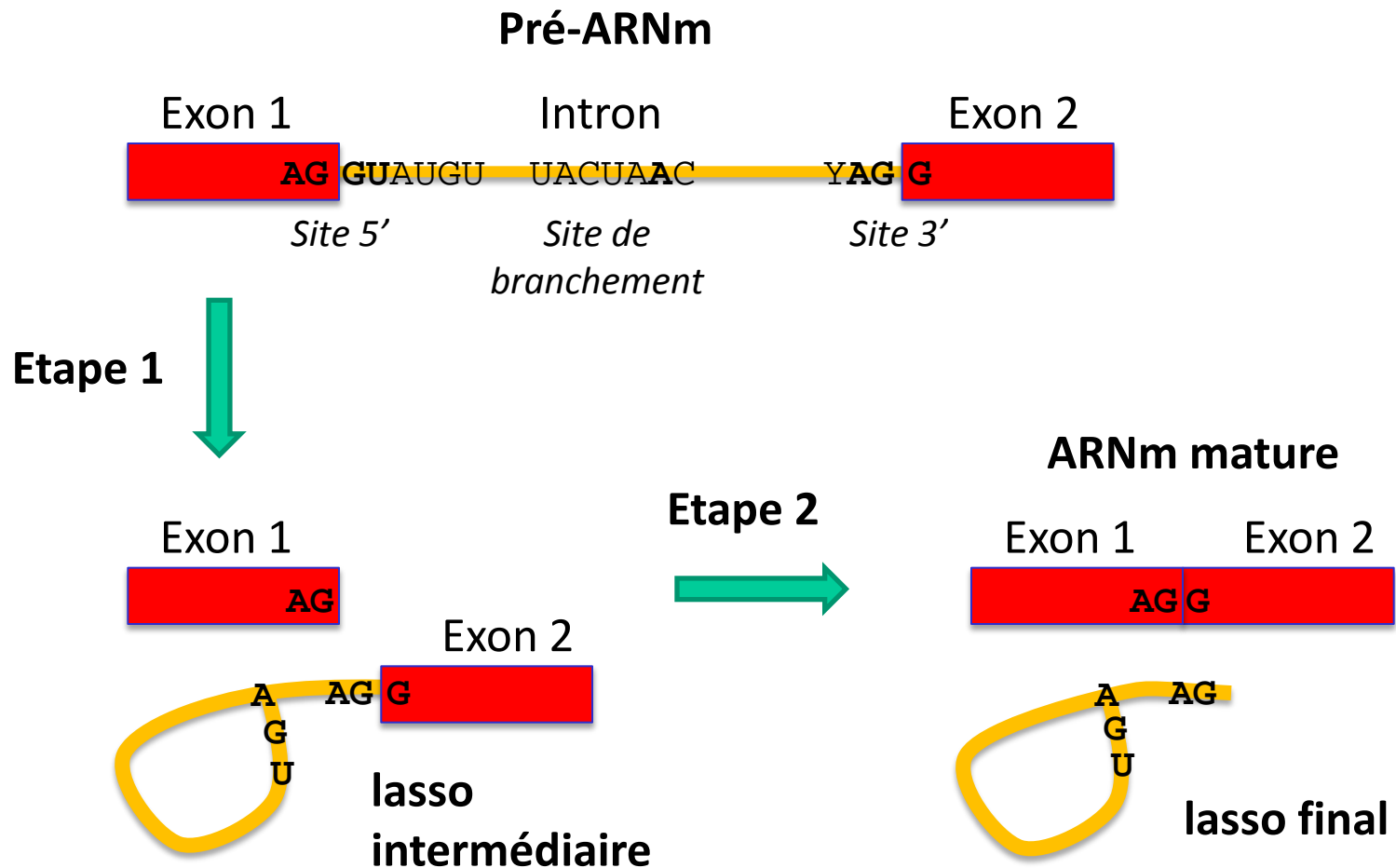
Procaryotes



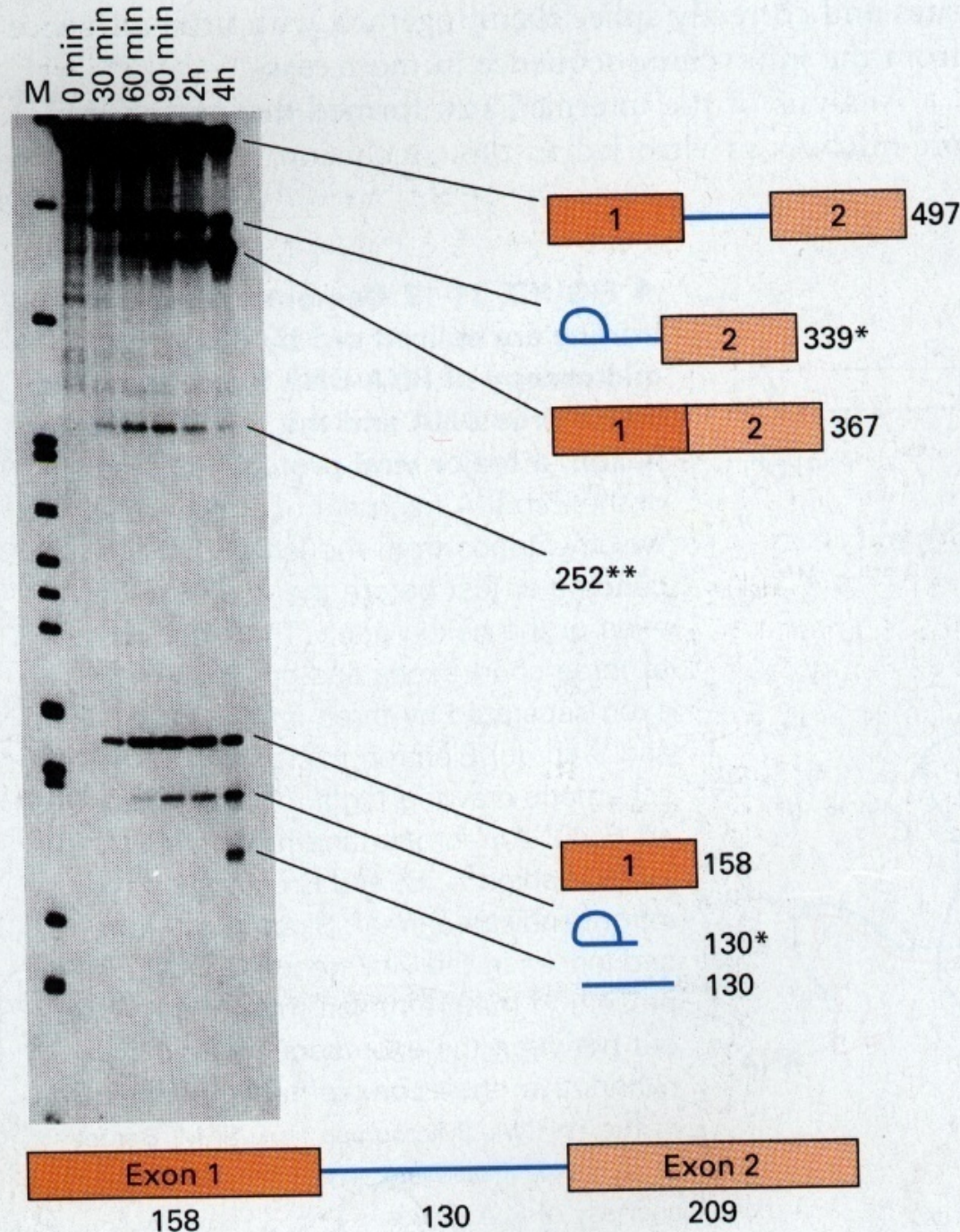
Boucles formées par hybridation d'un ARN messager eucaryote avec l'ADN génomique



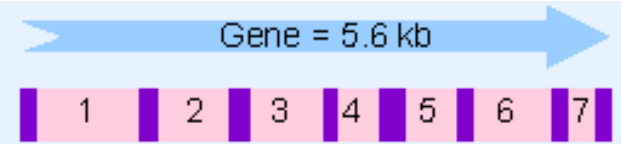
Les deux étapes de la réaction catalytique d'épissage



Epissage in vitro d'un ARN: Mise en évidence sur gel des produits intermédiaires

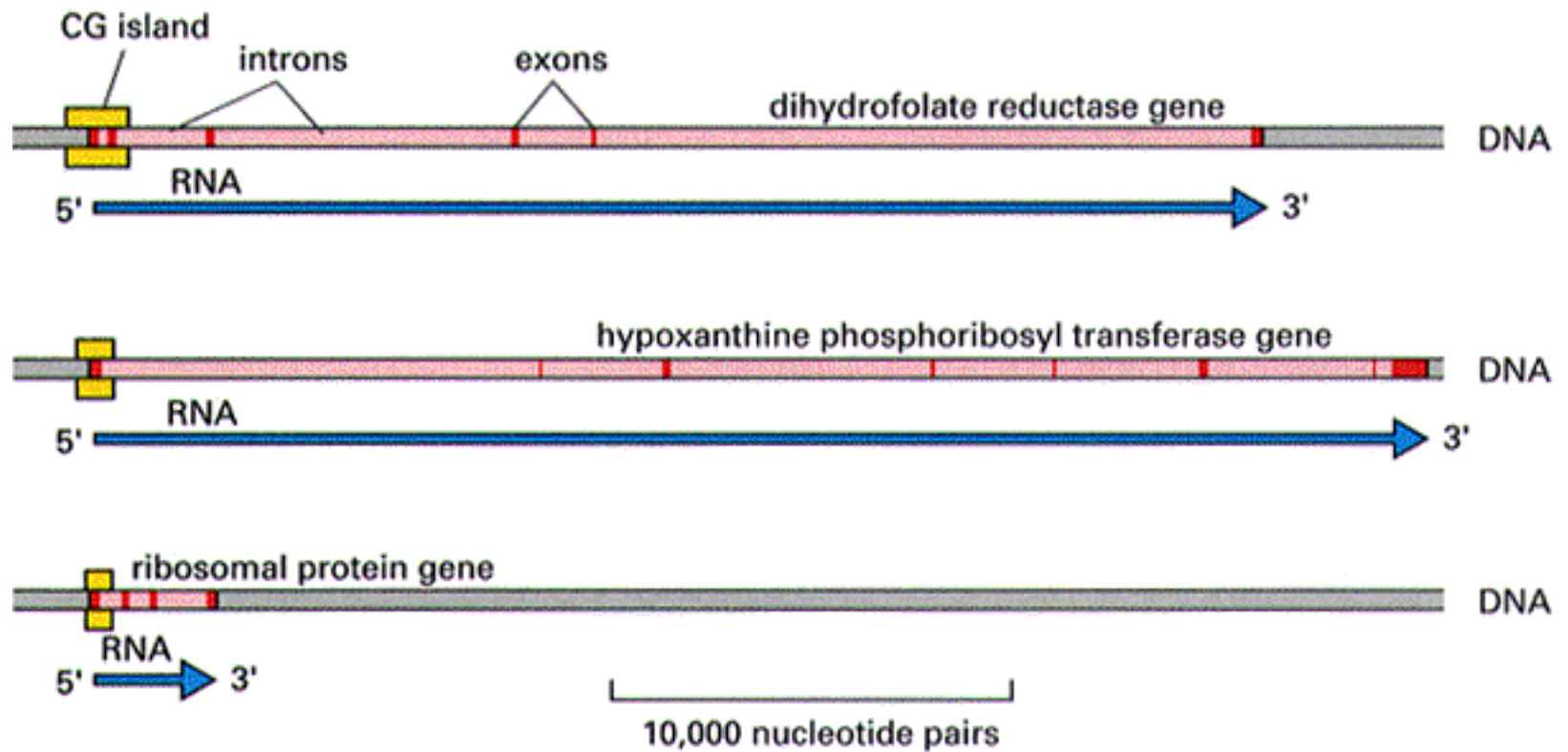


Produits intermédiaires obtenus au cours de la maturation des ARN

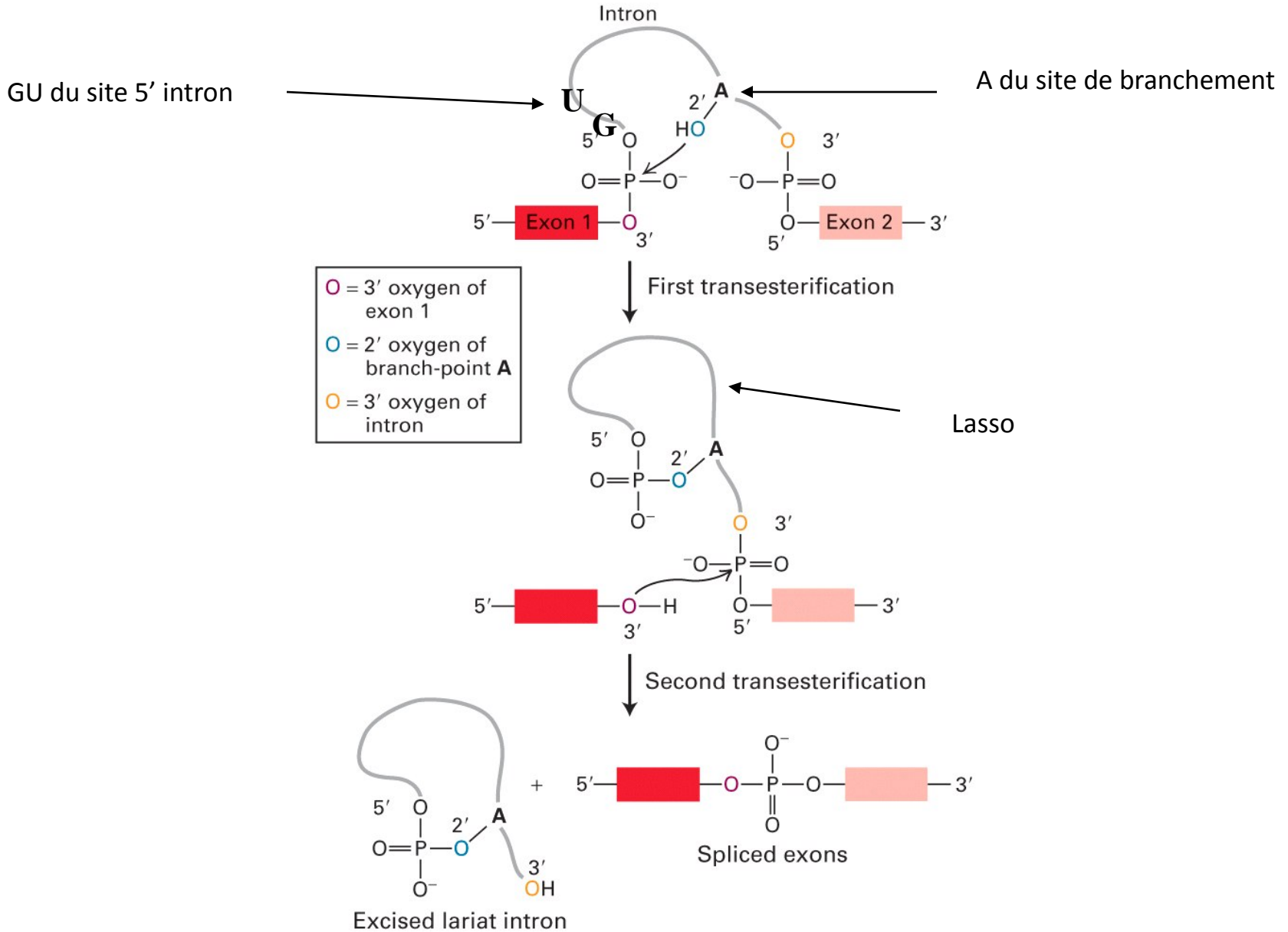


mRNA = 1.1 kb





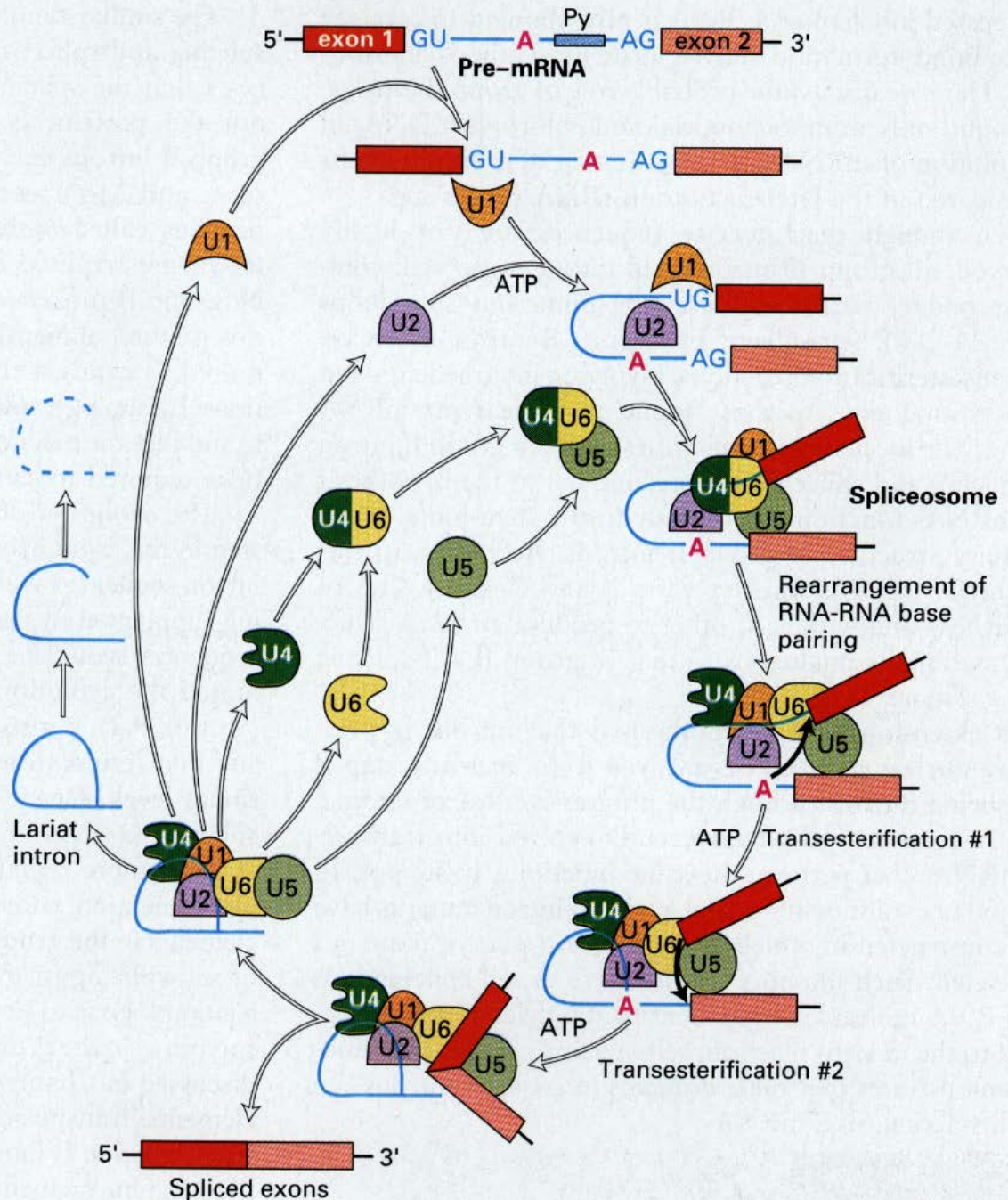
Les deux réactions de transestérification



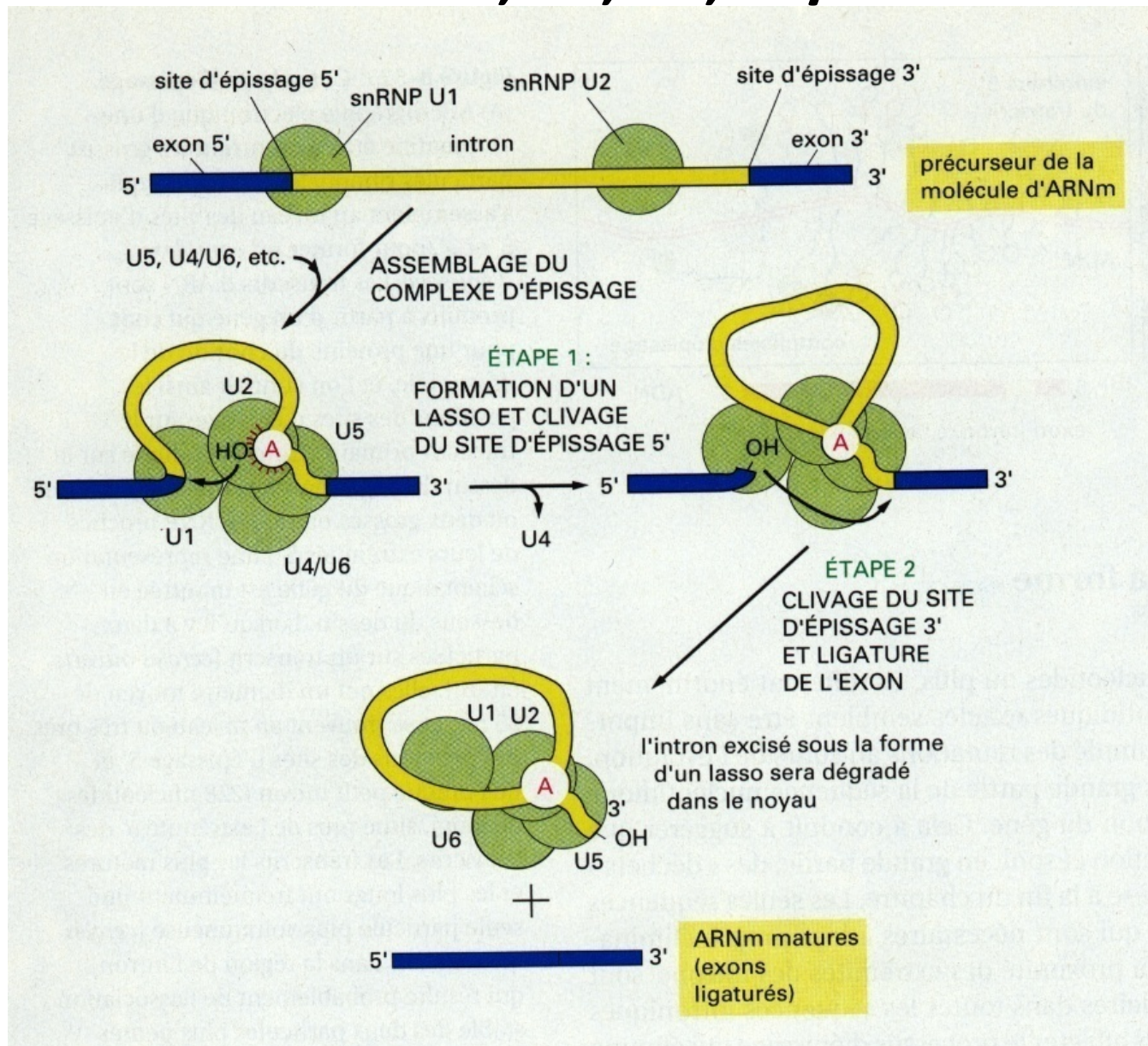
L'épissage est réalisé par un complexe ribonucléoprotéique: le spliceosome

U_x=snRNP
=snRNA+Protéines

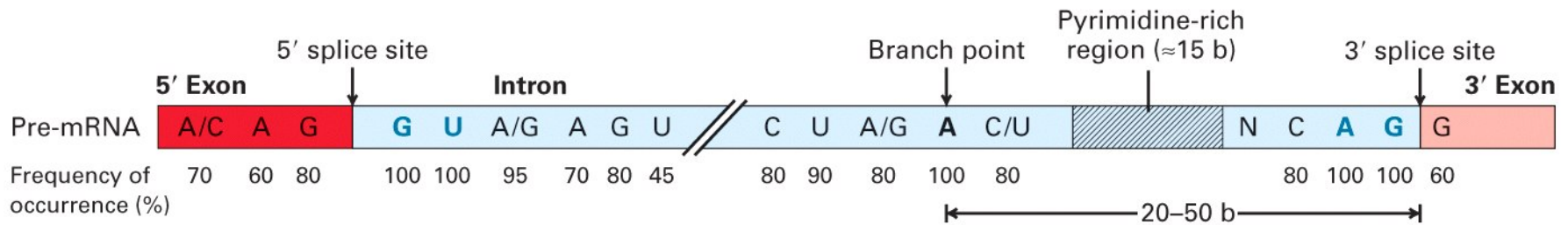
FORMATION ET RECYCLAGE DU SPliceOSOME



Catalyse et épissage par le complexe des snRNP U1,U2,U5,U4/U6

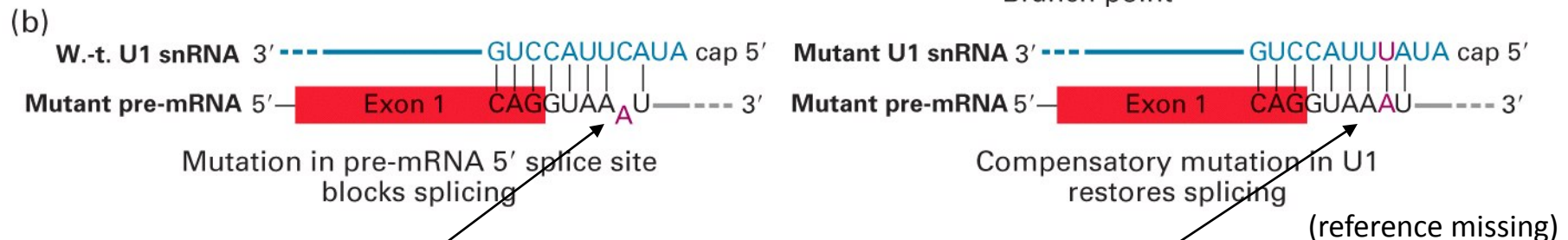
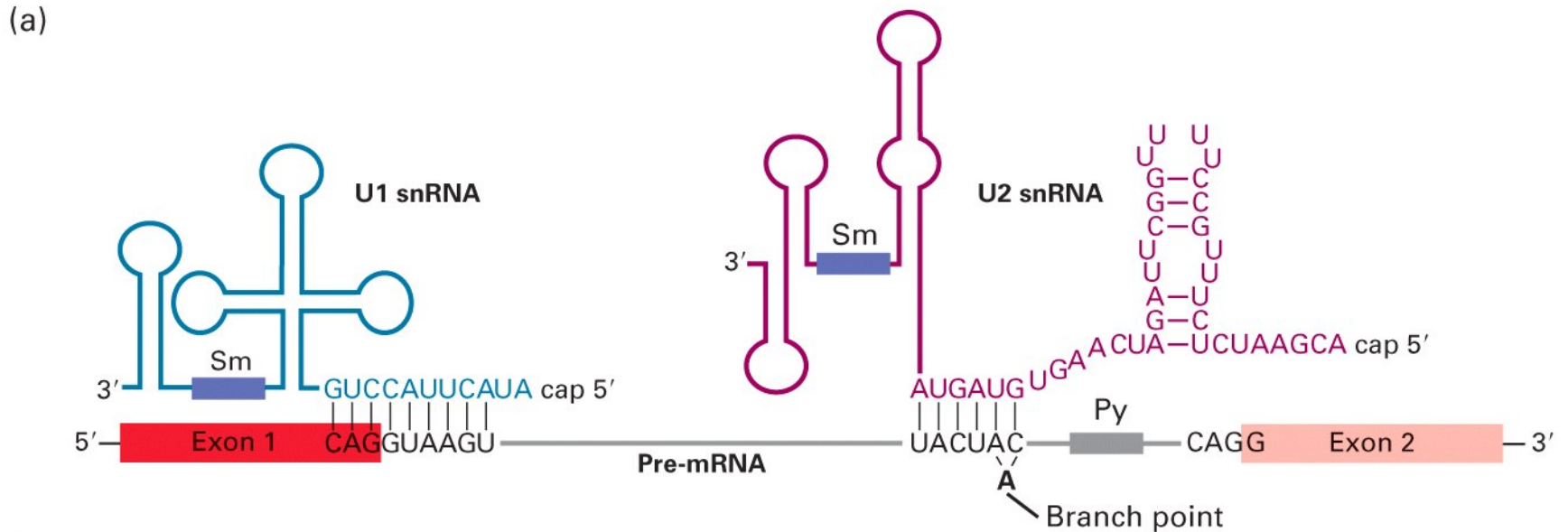


Retour sur les séquences consensus des introns à spliceosome



Pourquoi une telle conservation dans tous les gènes eucaryotes?

Les snRNA U1 et U2 interagissent avec les séquences consensus

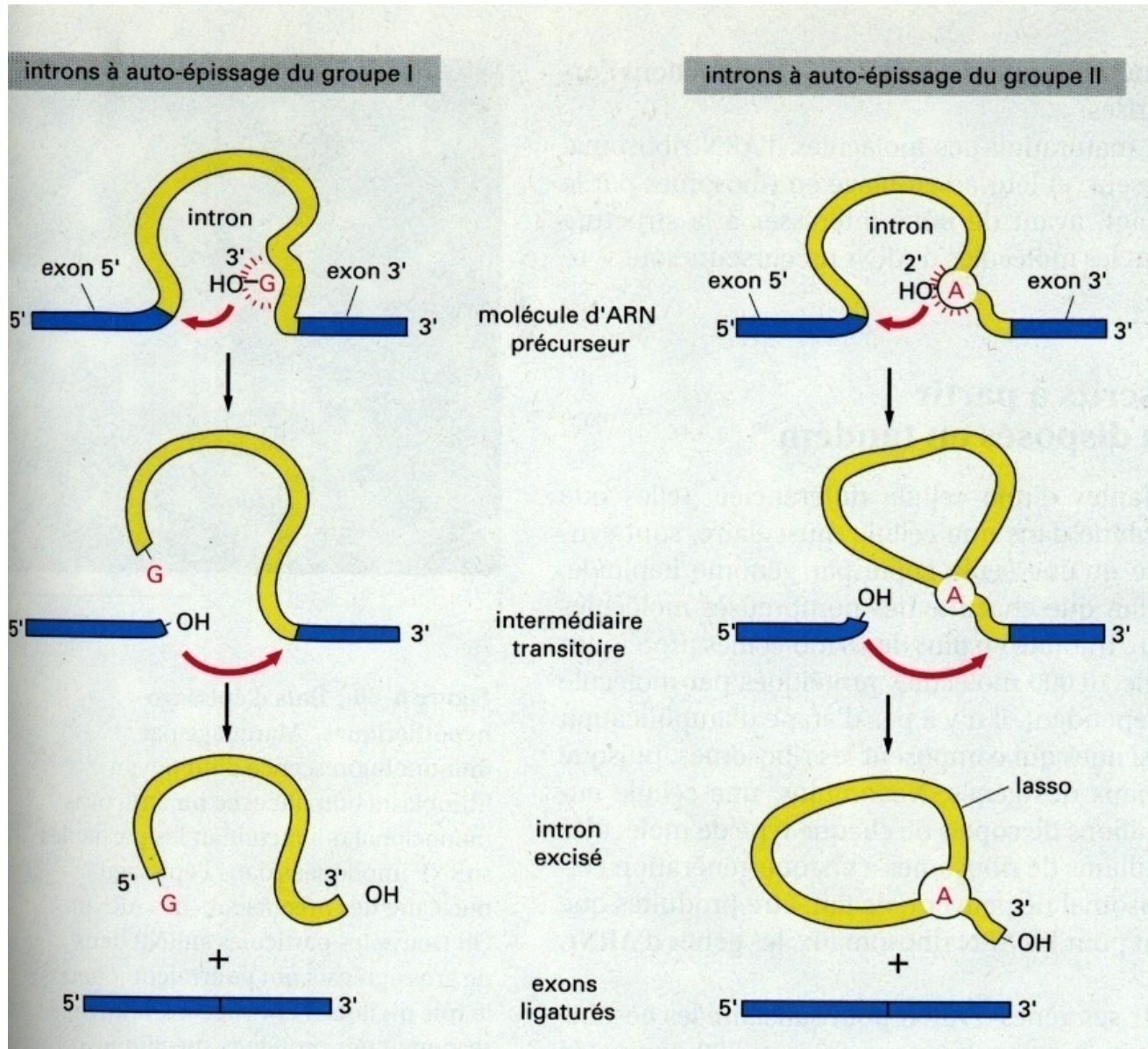


Mutation: blocage épissage

Mutation compensatoire:
restauration de l'épissage

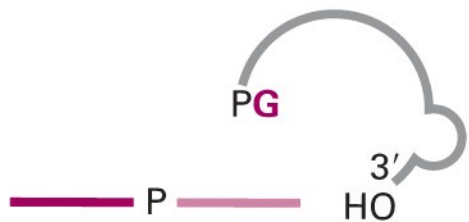
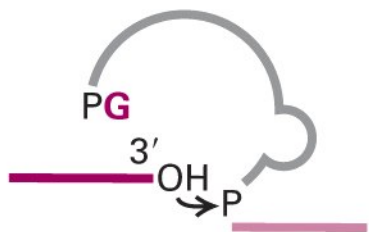
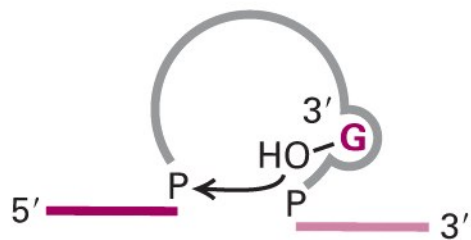
Autoépissage des introns de groupe I et de groupe II

(GMP
exterieur)

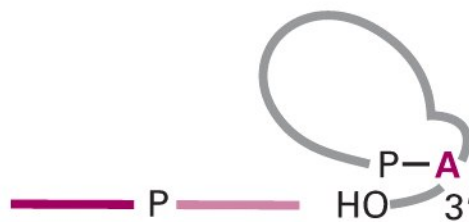
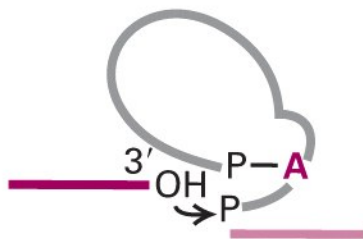
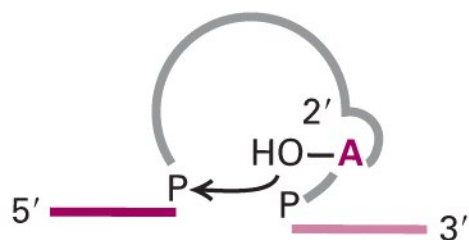


Self-splicing introns

Group I

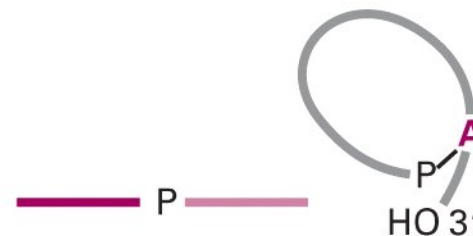
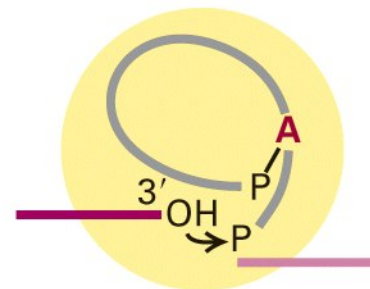
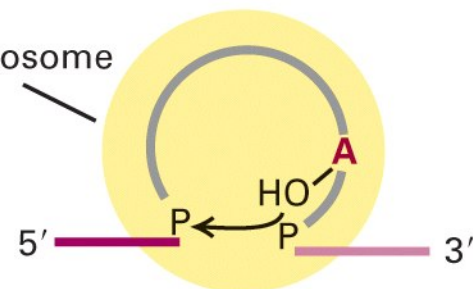


Group II

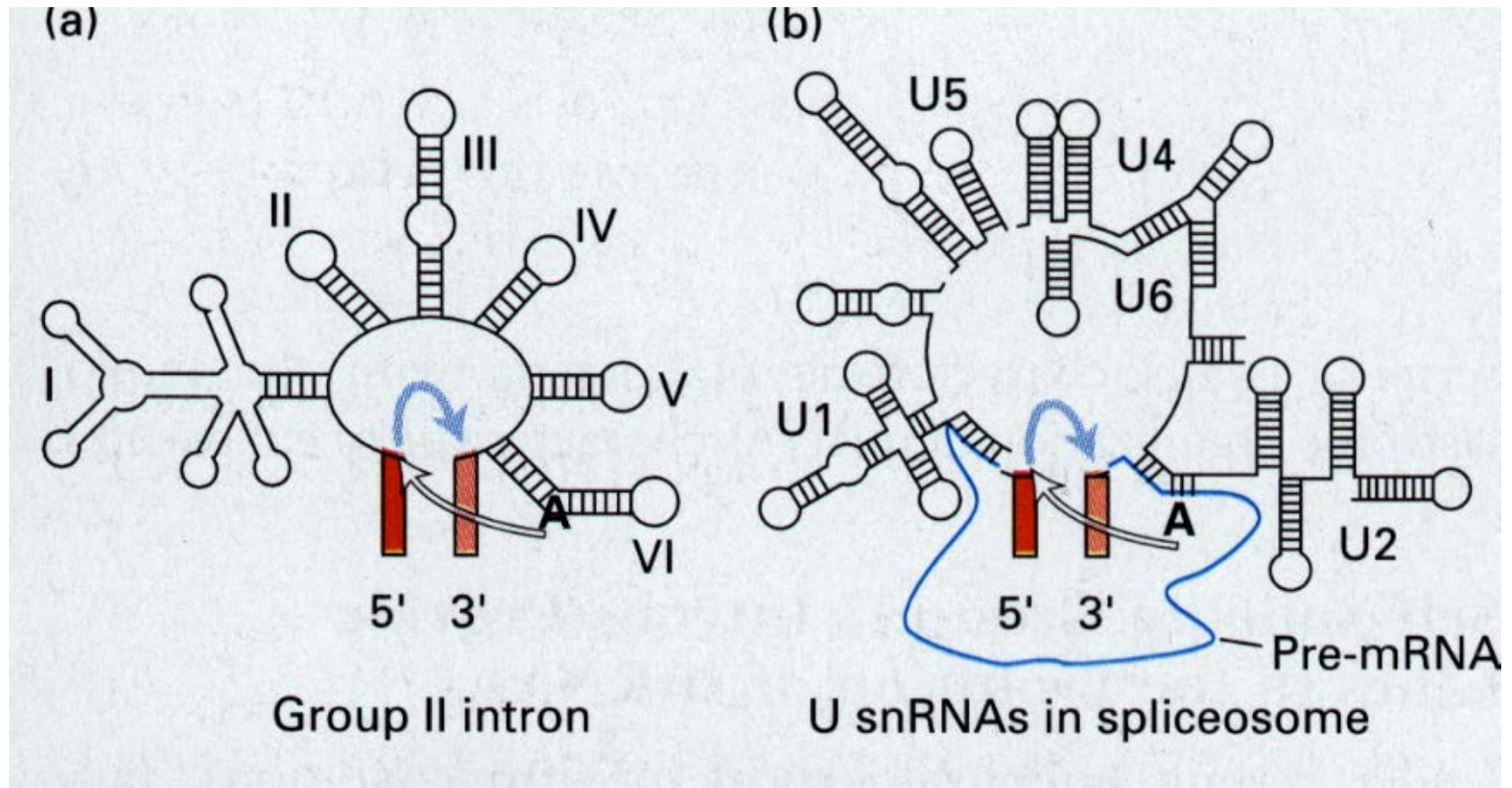


Spliceosome-catalyzed splicing of pre-mRNA

Spliceosome

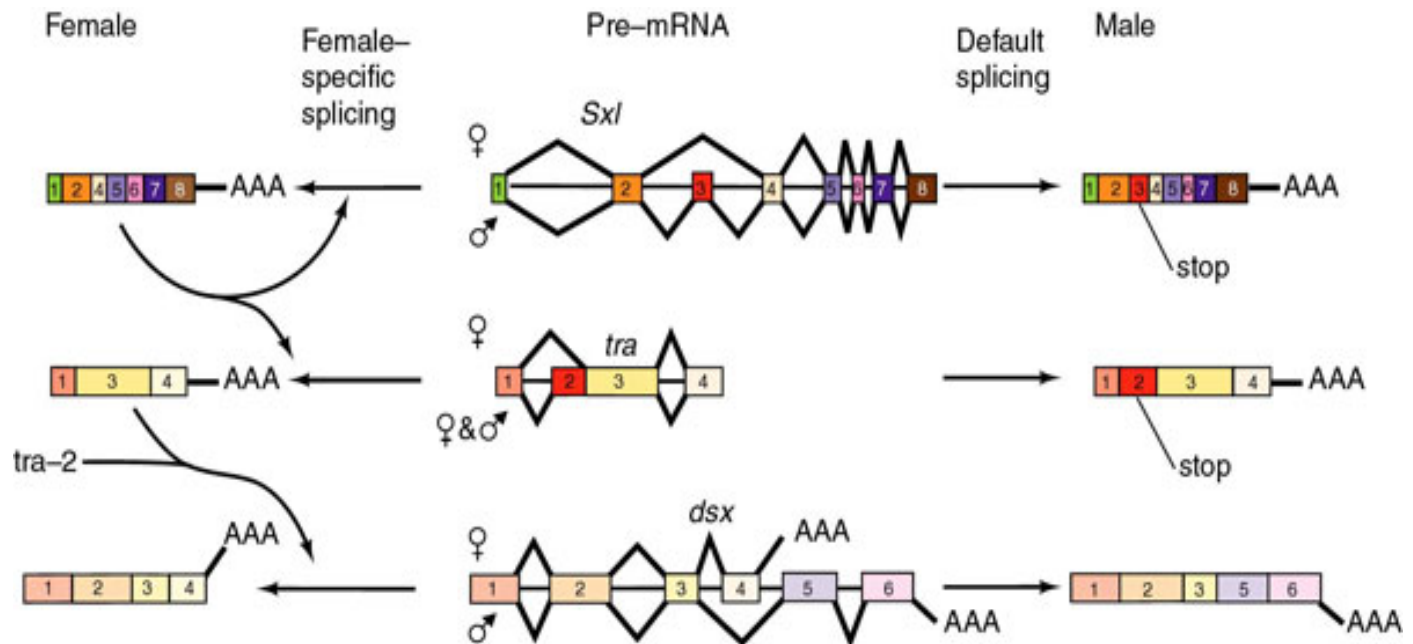


Comparaison entre la structure des introns de groupe II et les snRNA du spliceosome

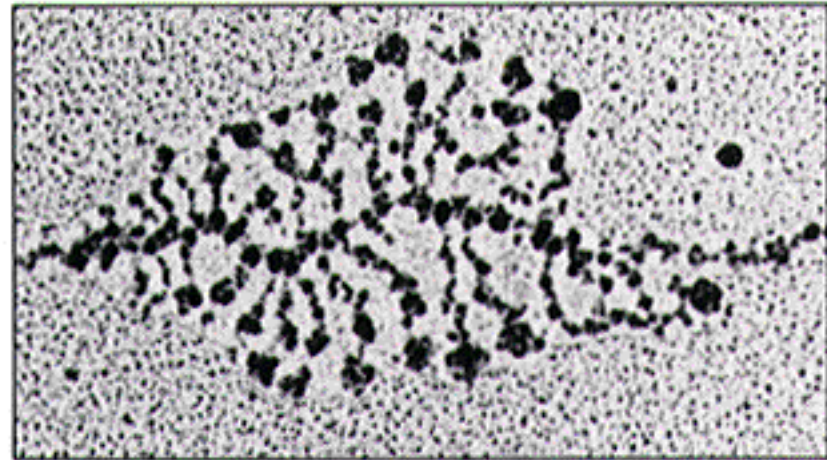


Epissage alternatif

3 gènes de détermination du sexe chez la drosophile, épissés différemment chez les males et les femelles:

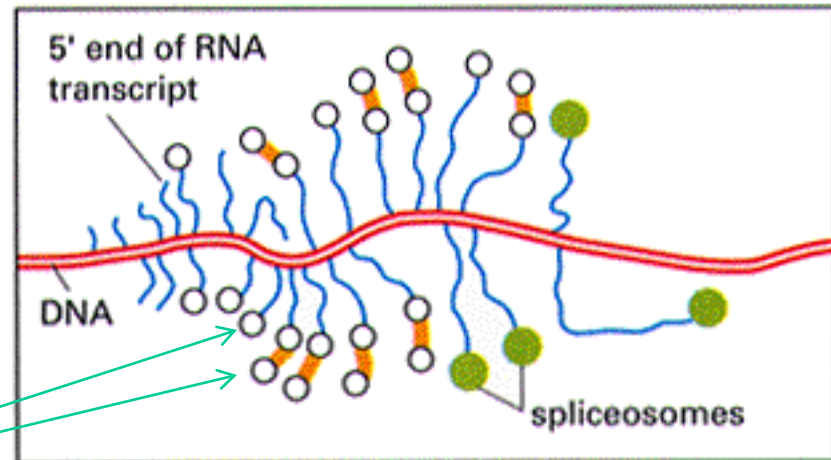


L'épissage est co-transcriptionnel



(A)

200 nm

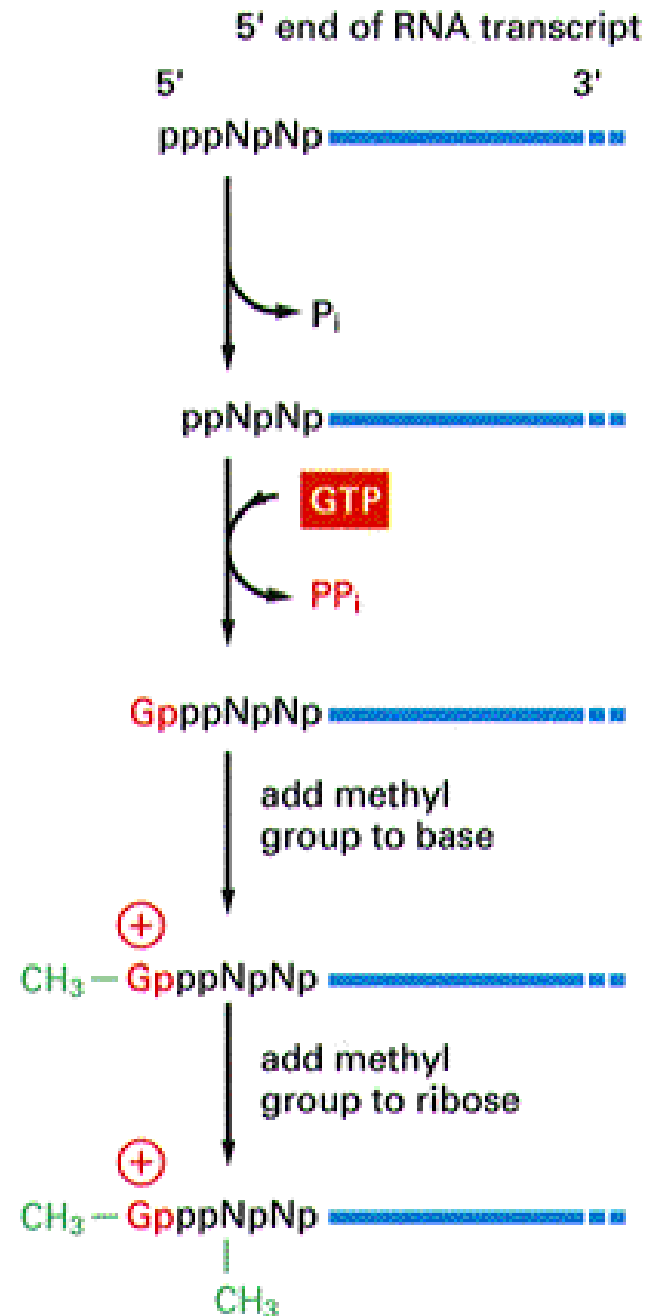


(B)

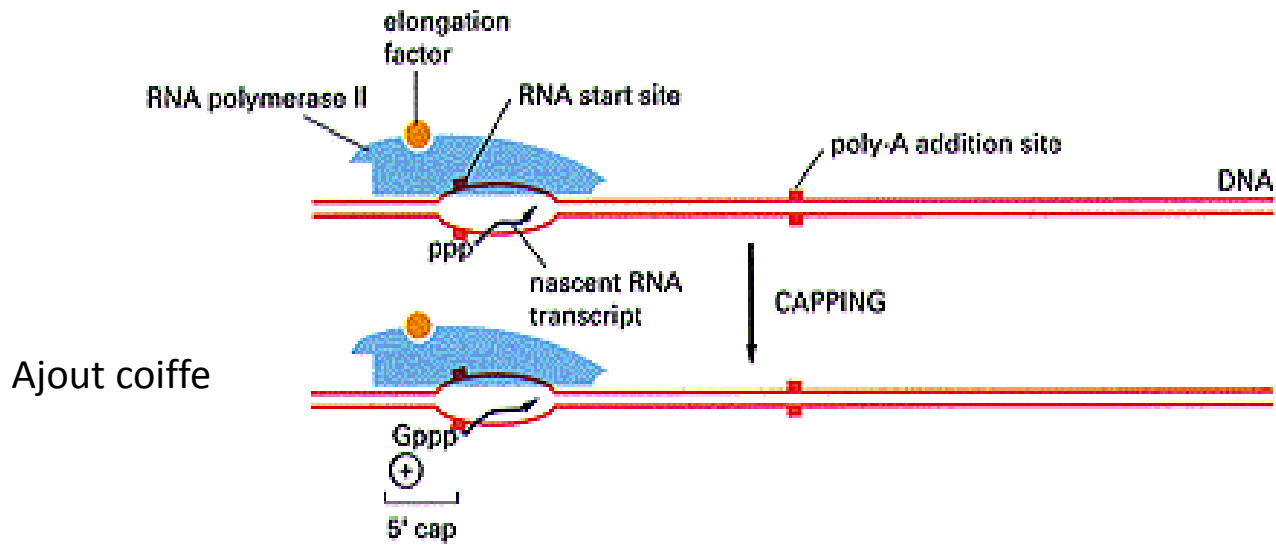
5' DNA
exon intron exon
3' DNA

Facteurs d'épissage

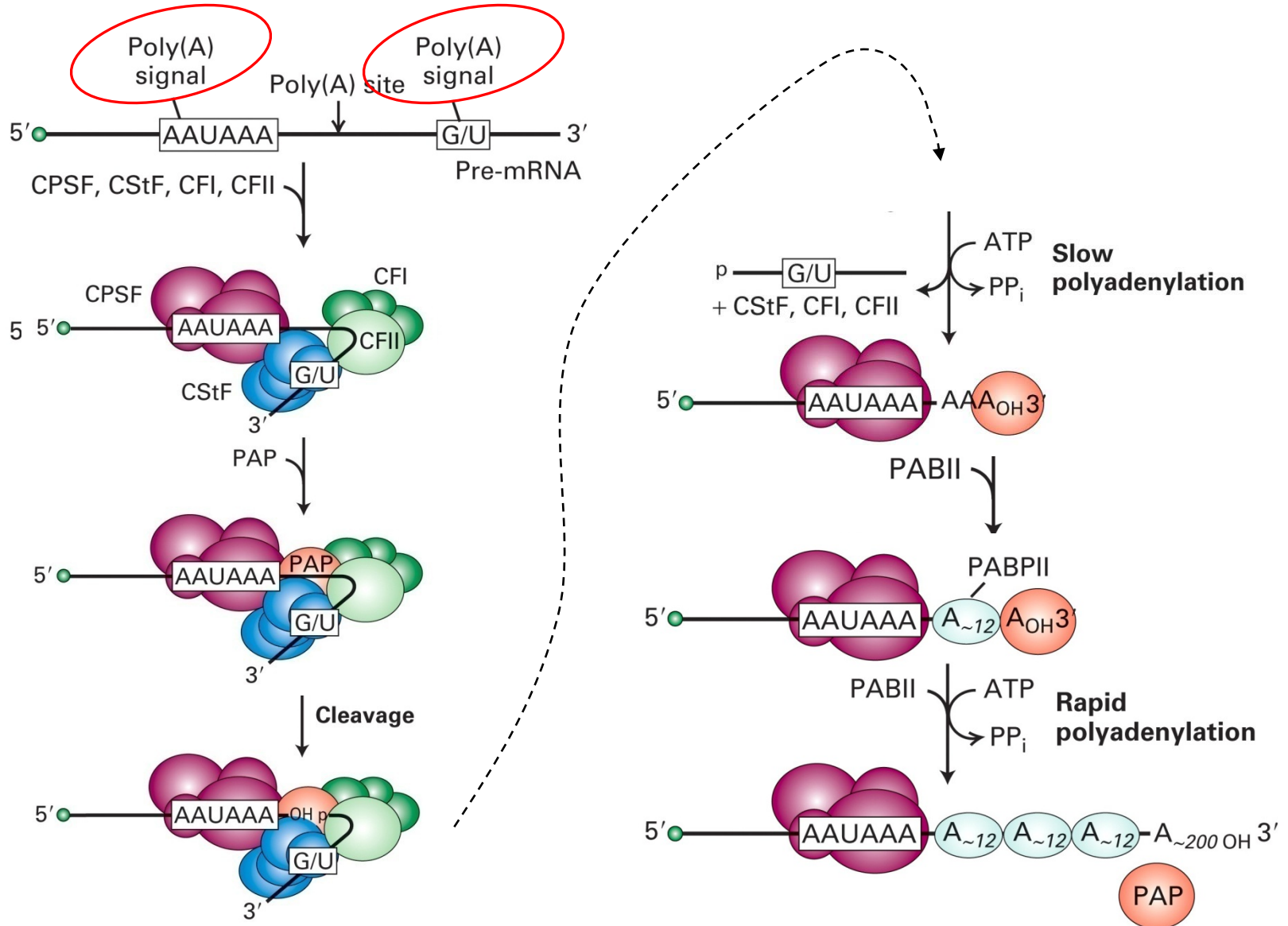
Coiffe de l'extrémité 5' du pré-ARNm



La Coiffe est mise en place dès le début de la transcription

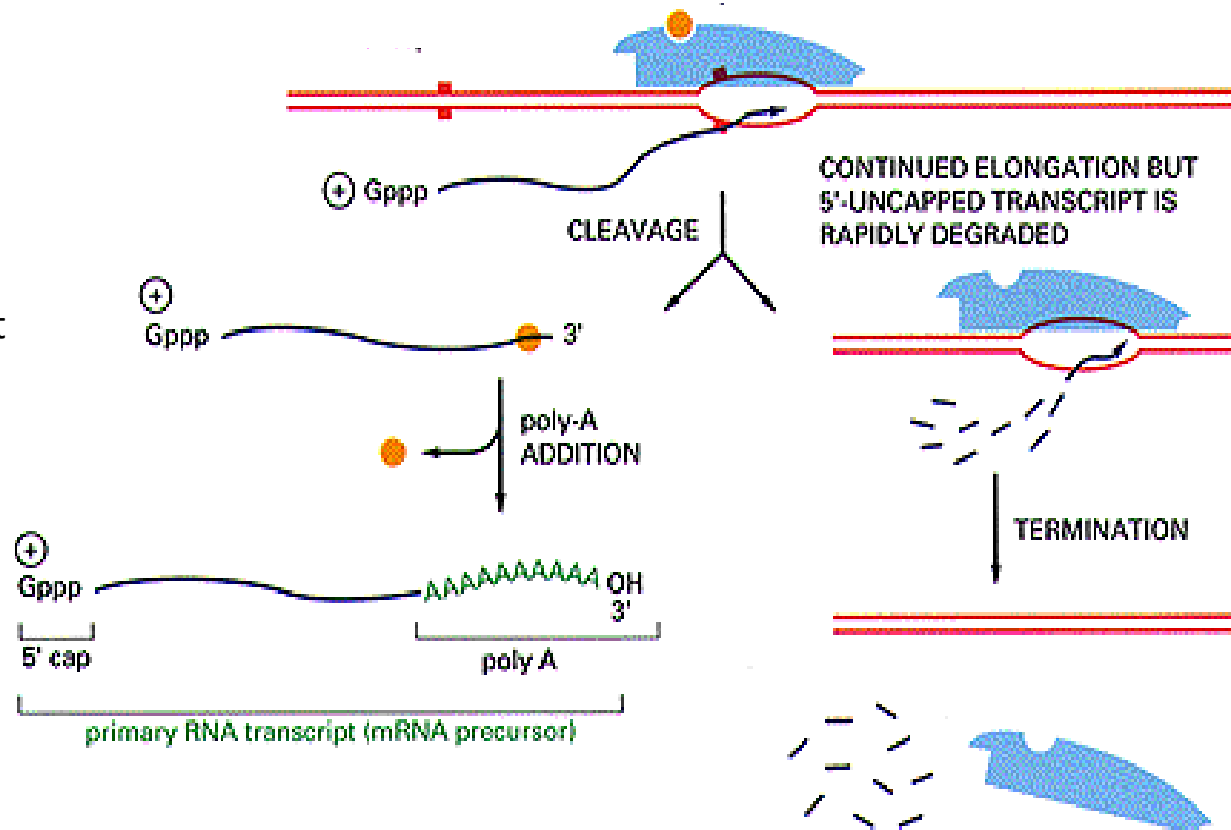


Mise en place de la queue poly-A en 3' du messenger

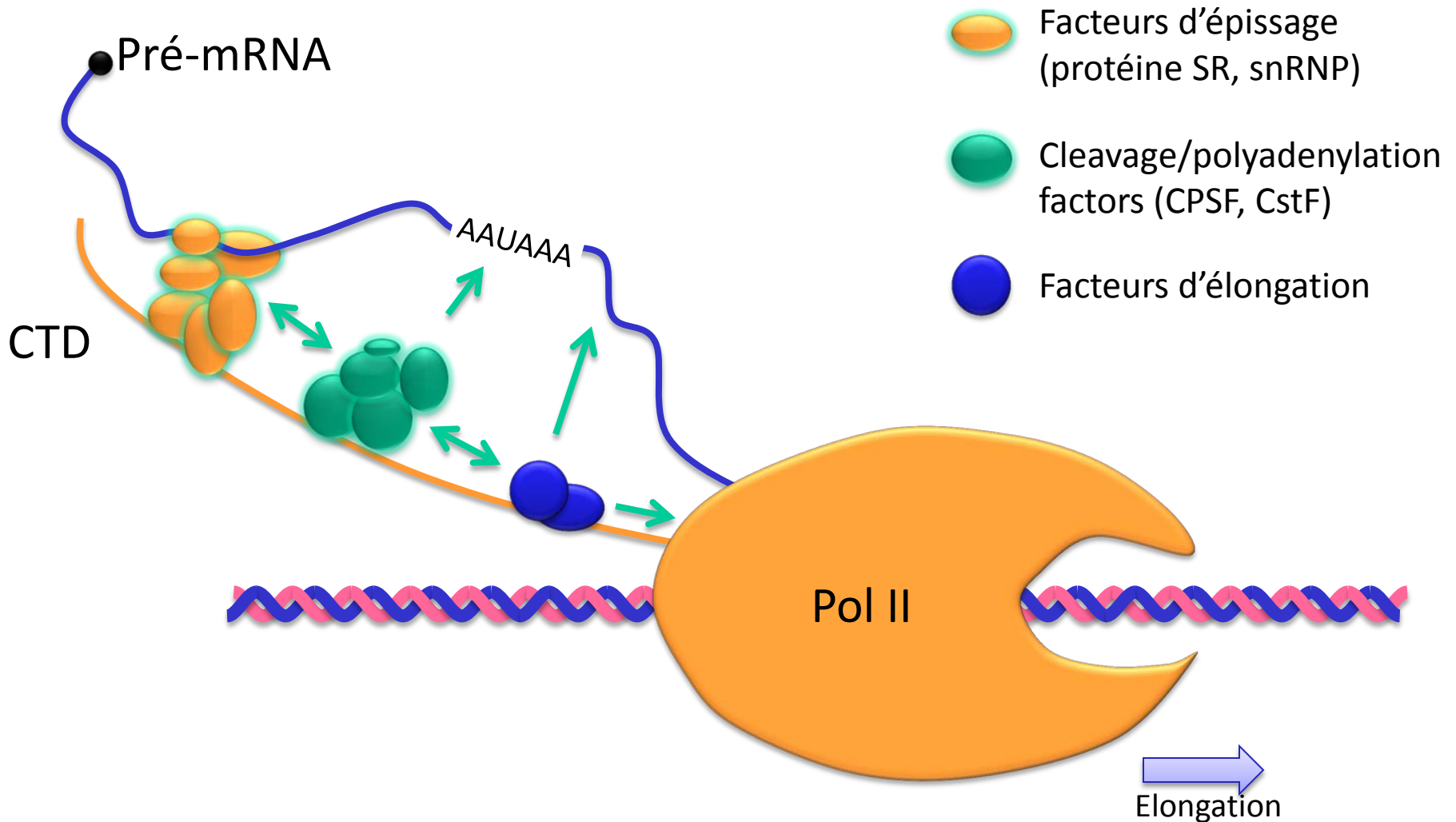


Polyadenylation et terminaison

Les transcrits sont
clivés et
polyadénylés.



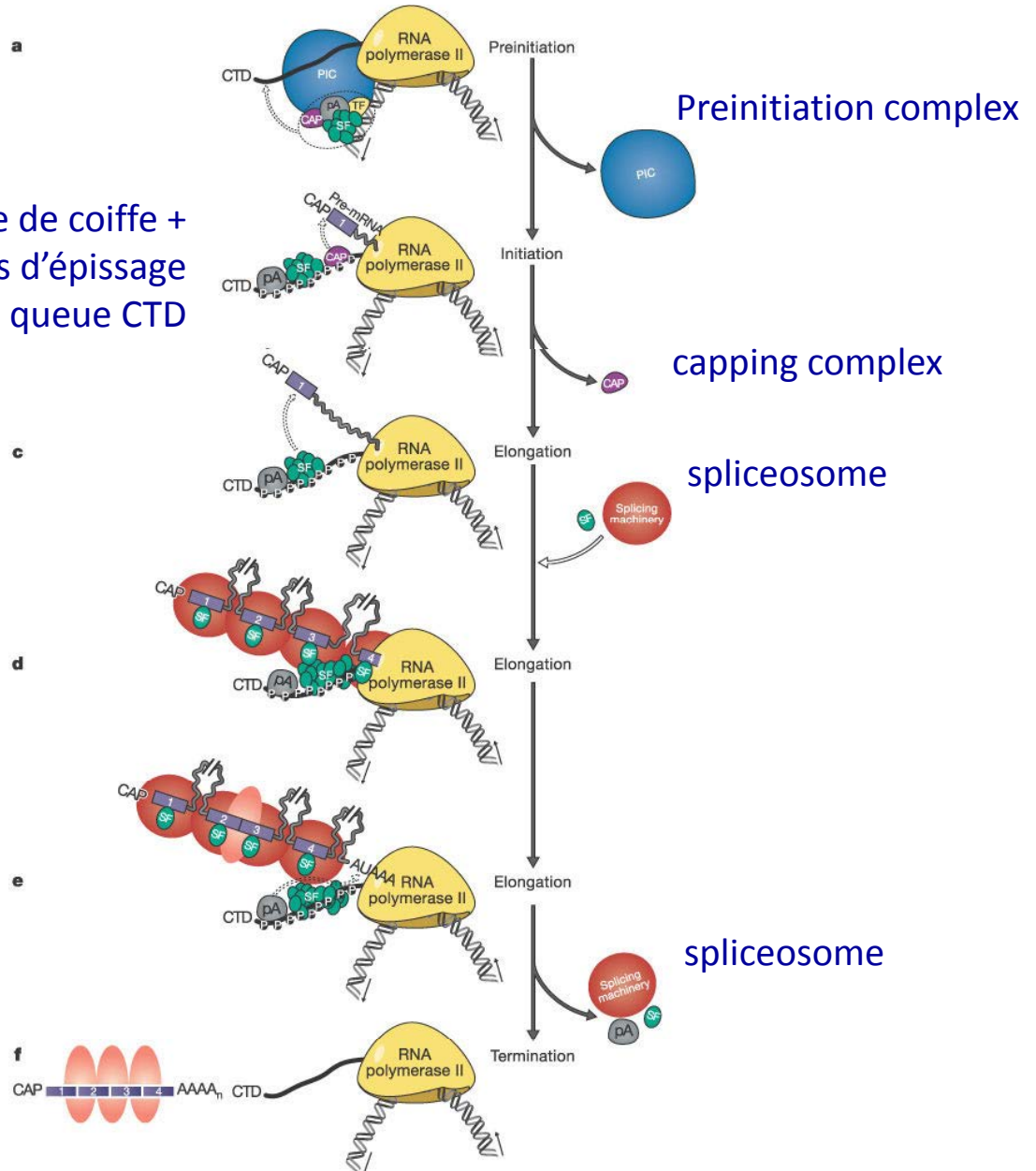
CTD et Terminaison



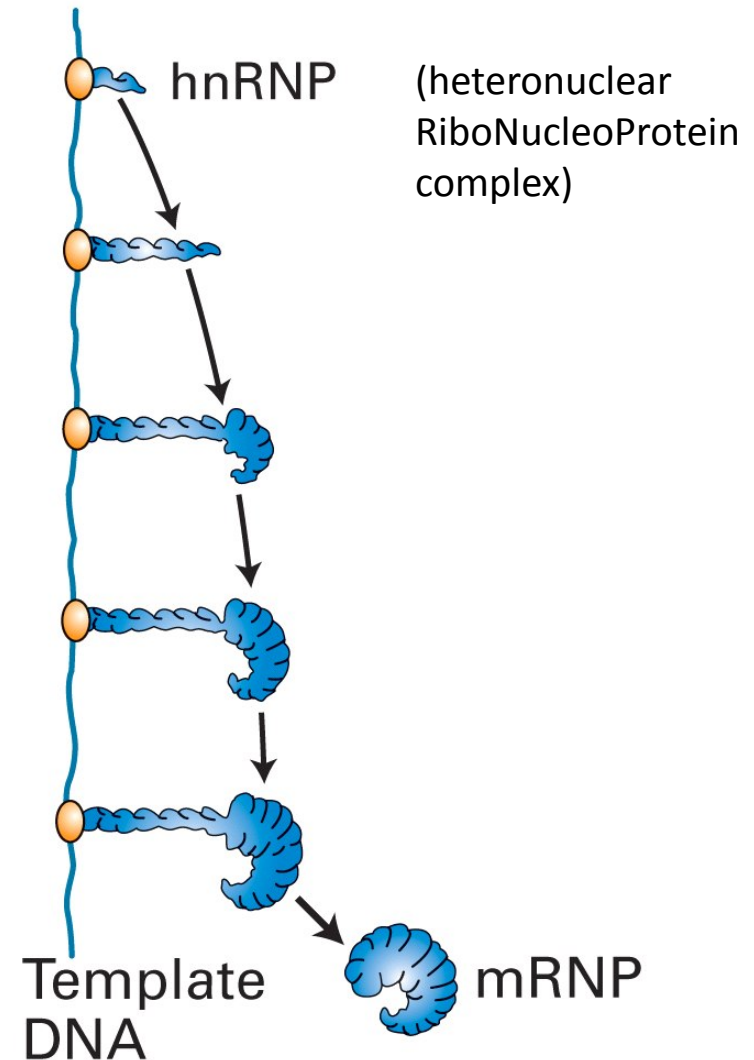
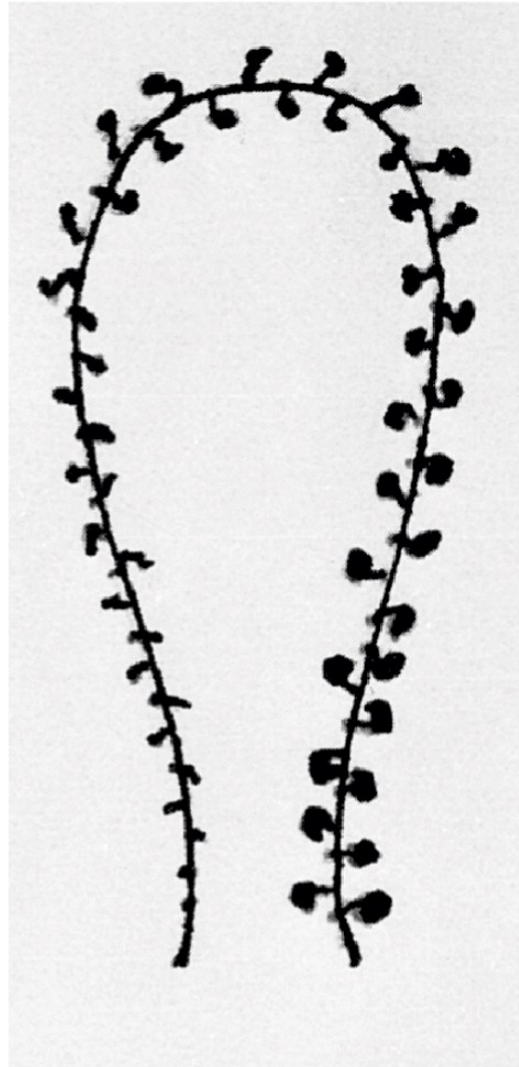
Etapes de transcription et maturation

Complexe de coiffe + facteurs d'épissage (SF) sur queue CTD

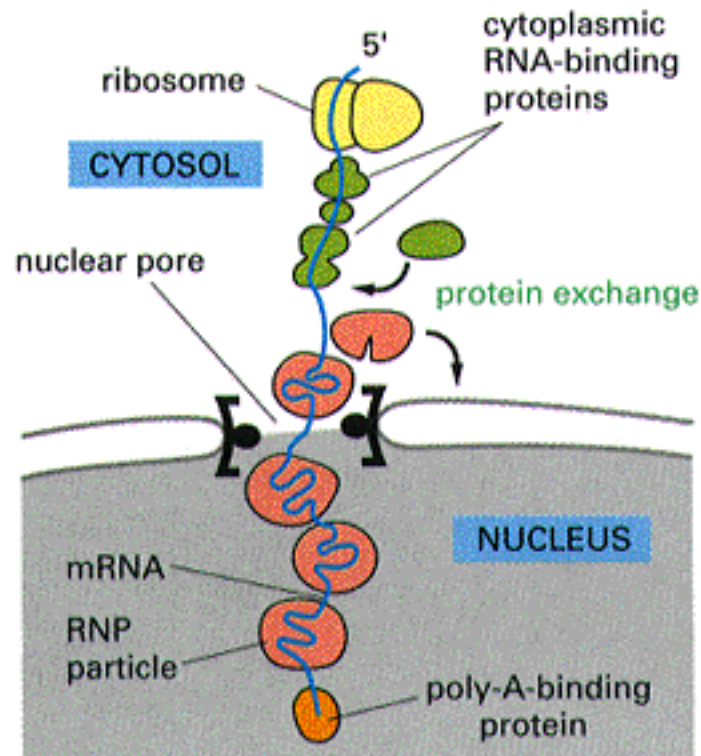
ARNm mature + protéines fixées



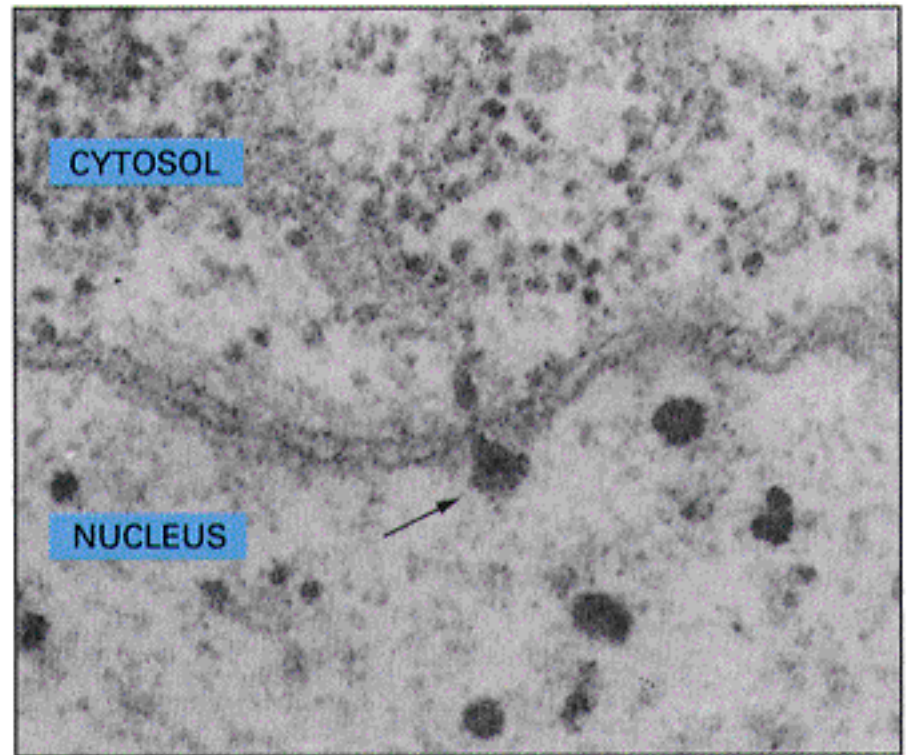
L'ARNm est en permanence recouvert de protéines



L'export nucléaire par les pores

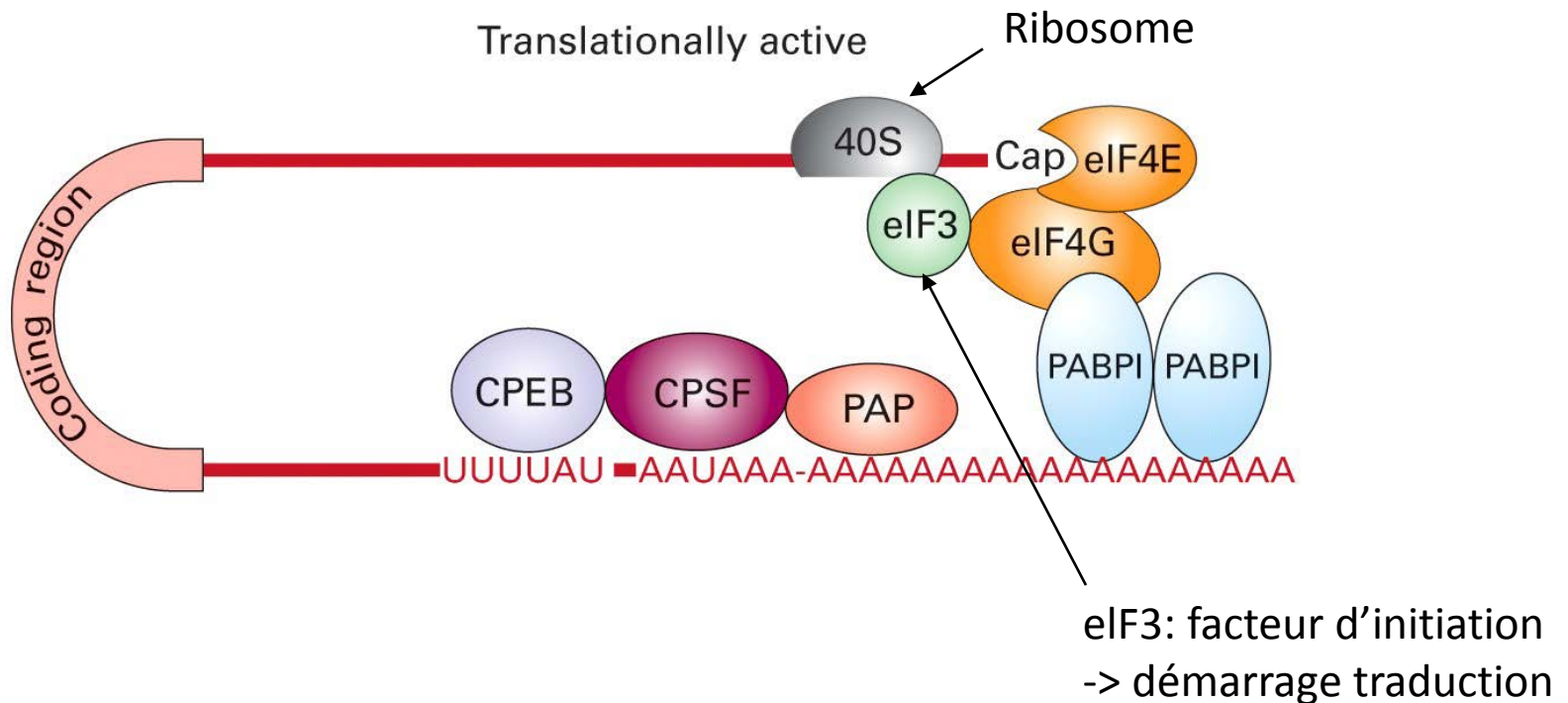


(A)



(B)

Importance de coiffe et queue poly-A pour le démarrage de la traduction



Maturation des ARN ribosomiques et assemblage des petites et grandes sous-unités du ribosome

Eucaryotes: ribosome =
5.8S+5S+28S+18S
+protéines

