

2022-2023

V. 2023.2

Biologie Moléculaire des Génomes

Organisation, Maintien et Expression

L3

Cours	Enseignant
Réplication & topologie (4h)	C Vélot
Stabilité / dynamique des génomes (2h)	D Gautheret
Régulations transcriptionnelles (3h)	"
Régulation par l'épissage (2h)	"
Traduction et NMD (3h)	"
Régulation par les ARN (2h)	"

La traduction et quelques exemples de régulation traductionnelle

Crédit support de cours: Pr. Jean-Pierre Rousset

Rappels L2



AAAAAA



AAAAAA



AAAAAA



AAAAAA



AAAAAA









AAAAAA



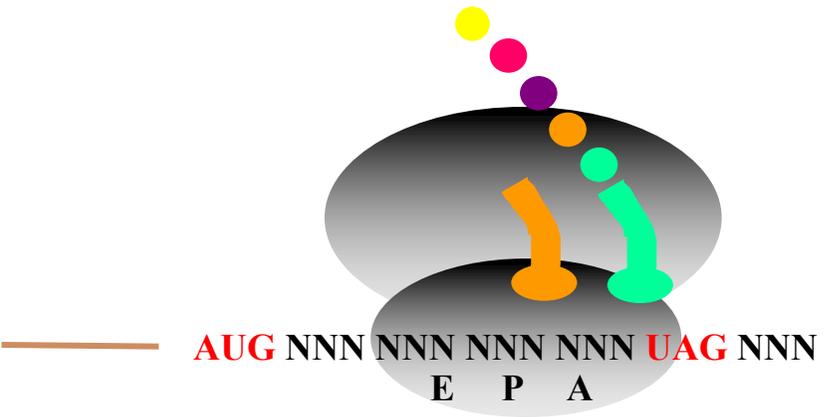


— AUG NNN NNN NNN NNN UAG NNN
E P A

— AAAAAA



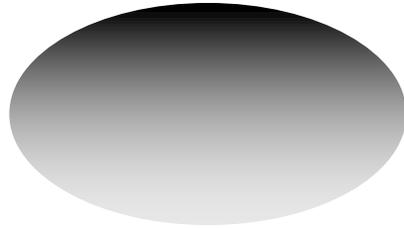
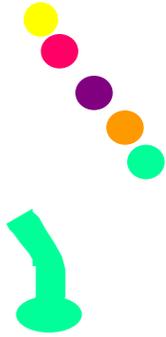
— AAAAAA



AAAAAA

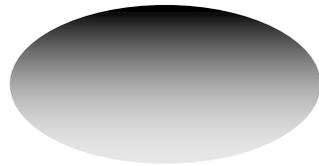






— **AUG** NNN NNN NNN NNN **UAG** NNN

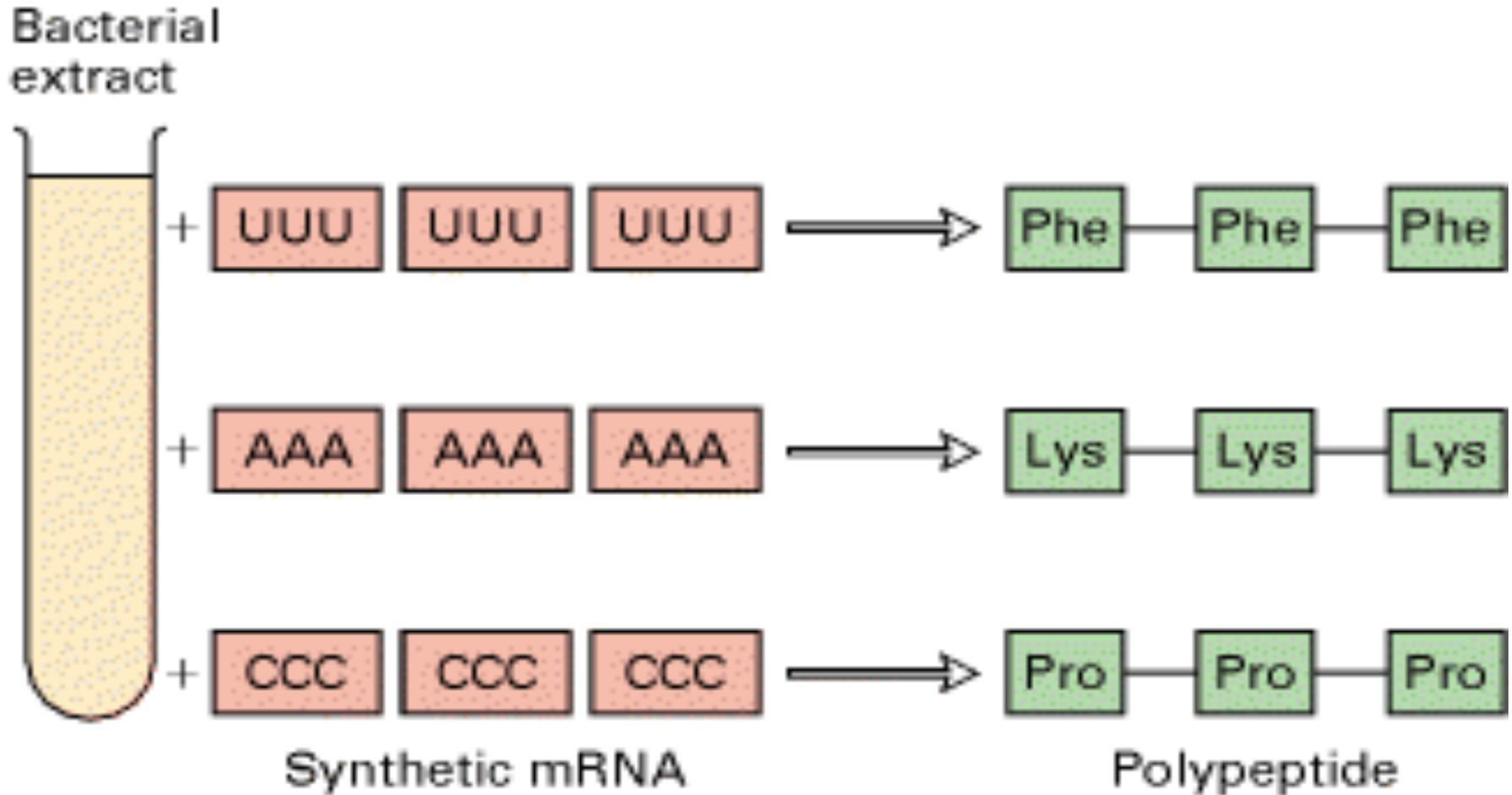
— AAAAAA



Un peu de poésie



Décryptage du code génétique (terminé en 1966)



Le code génétique universel

GCA	AGA						GGA			UUA			CCA	AGC				GUA		
GCC	AGG						GGC			UUG			CCC	AGU	ACA			GUC	UAA	
GCG	CGA	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUA	CUA	AAA		CCG	UCA	ACC			GUG	UAG	
GCU	CGC	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUC	CUC	AAG	AUG	CCU	UCG	ACG	UGG	UAC	GUU	UGA	
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

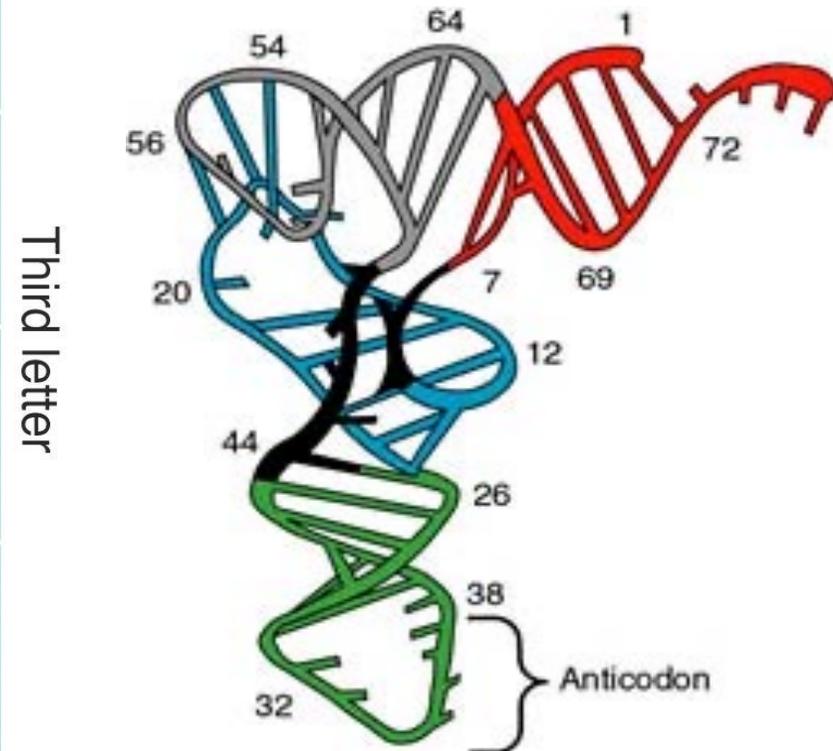
Avantages de la dégénérescence du code: stabilité génétique

- 1) Pour certains acides aminés : plusieurs tRNA.
- 2) Certains tRNAs peuvent reconnaître différents codons (wobble)

Second letter

		Second letter					
		U	C	A	G		
U	UUU	Phe	UCU } UCC } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U C A G	
	UUC						
	UUA	Leu		UAA Stop	UGA Stop		
	UUG						UAG Stop
C	CUU	Leu	CCU } CCC } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U C A G	
	CUC						
	CUA			CAA } Gln			CGA } Arg
	CUG						
A	AUU	Ile	ACU } ACC } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U C A G	
	AUC						
	AUA			AAA } Lys	AGA } Arg		
	AUG Met						AAG } Lys
G	GUU	Val	GCU } GCC } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U C A G	
	GUC						
	GUA			GAA } Glu			GGA } Gly
	GUG						

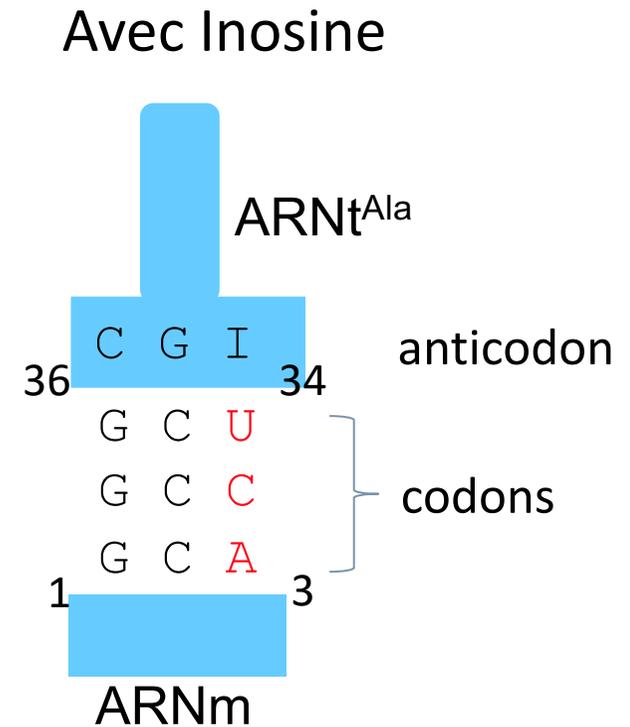
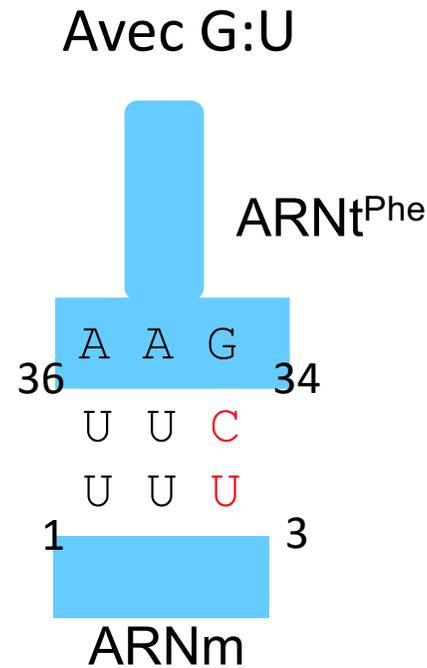
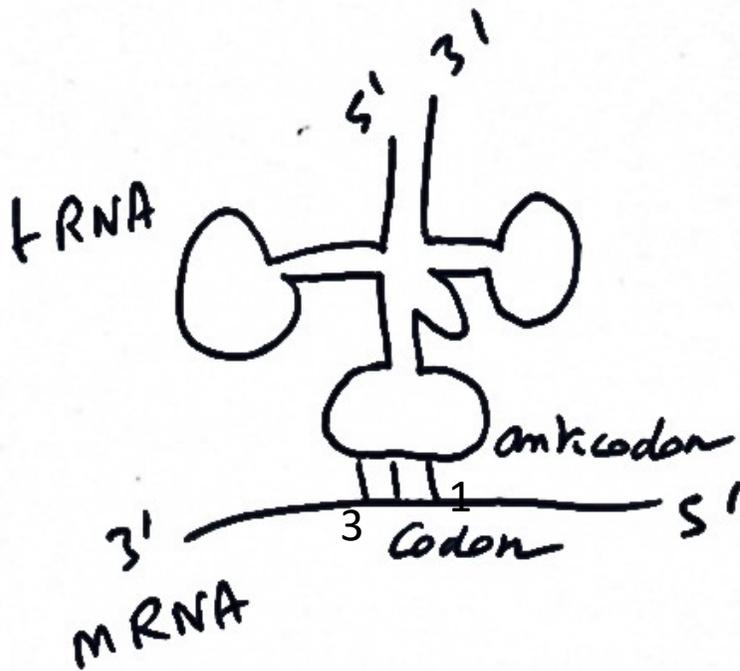
ARN de transfert (ARNt)



- **Origine**
- **Orienté**
- **Dégénéré**
- **Non chevauchant**
- **« Universel »**

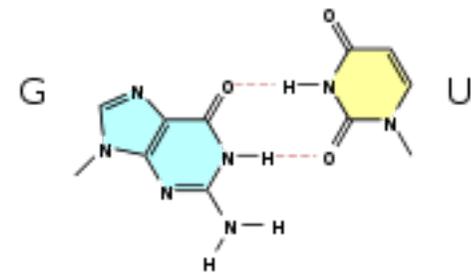
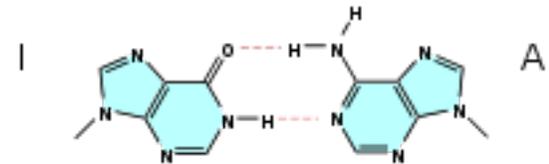
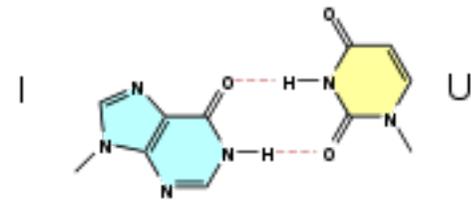
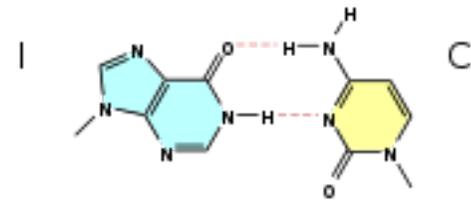
Adaptateur entre le monde des acides nucléiques et celui des protéines

Reconnaissance codon-anticodon et Wobble



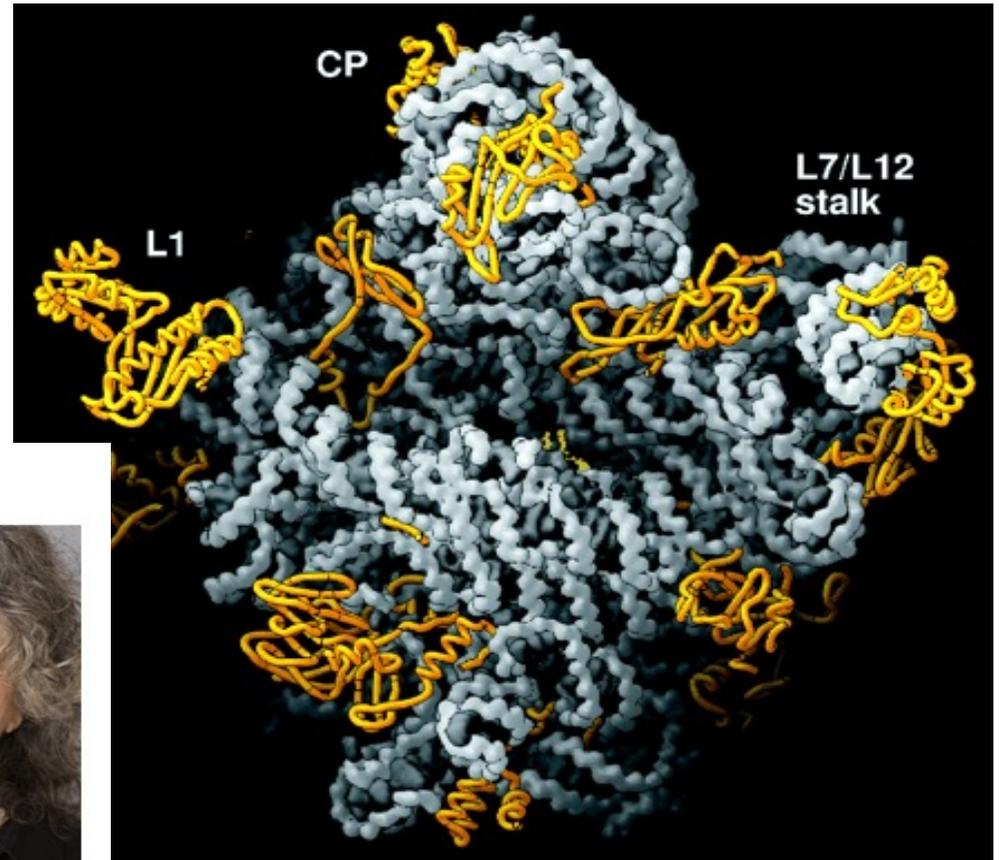
Attention: sens des brins
inversés entre les 2 figures

Les paires « wobble »



Fin des rappels

Les ribosomes



"for studies of the structure and function of the ribosome"



Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology

Venkatraman Ramakrishnan

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

MRC Laboratory of Molecular Biology
Cambridge, United Kingdom



Credits: Michael Marsland/Yale University

Thomas A. Steitz

🕒 1/3 of the prize

USA

Yale University
New Haven, CT, USA;
Howard Hughes Medical Institute



Credits: Micheline Pelletier/Corbis

Ada E. Yonath

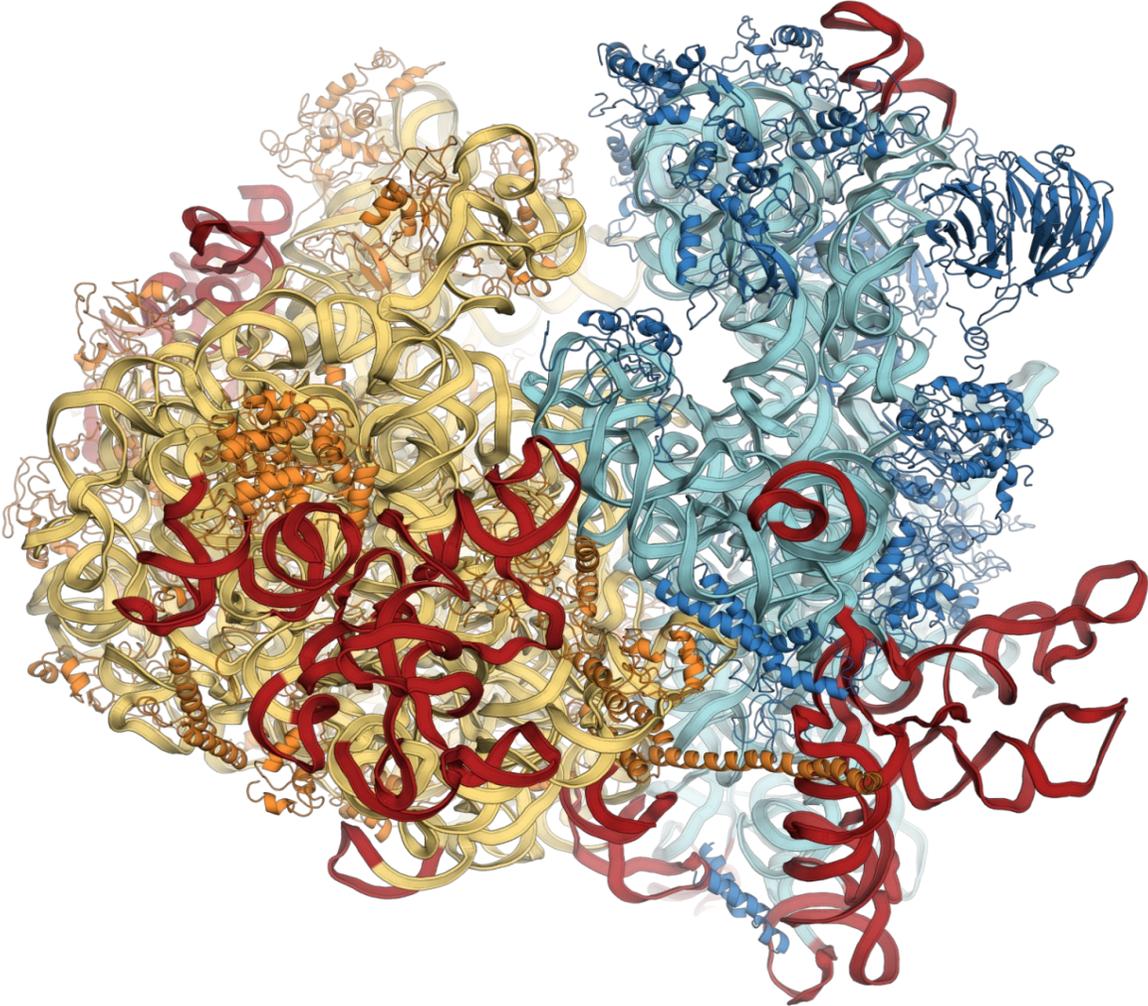
🕒 1/3 of the prize

Israel

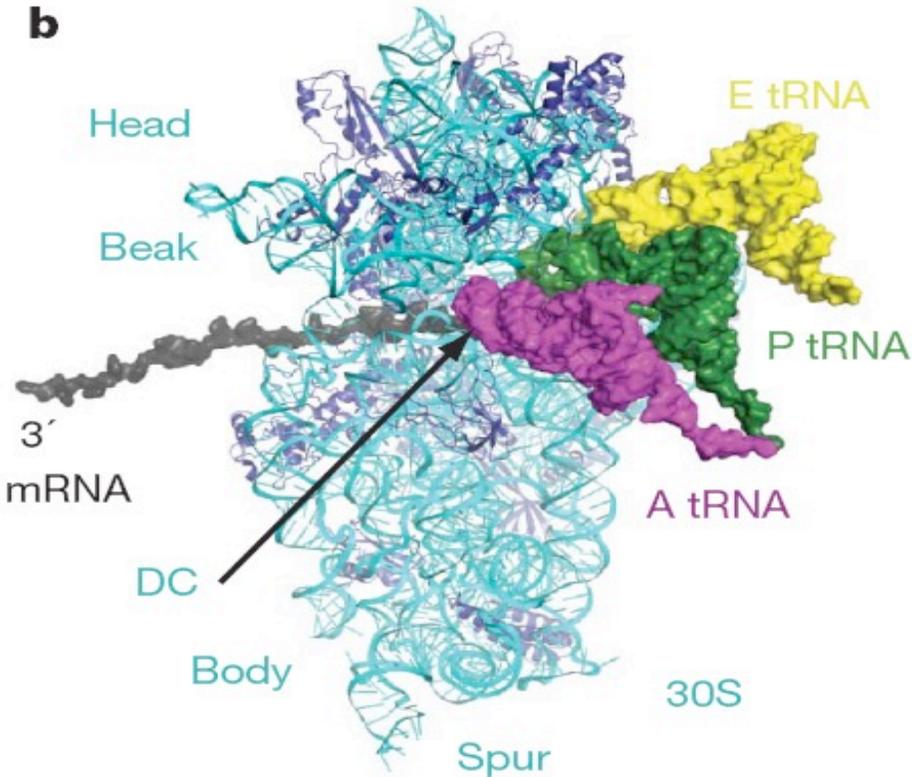
Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel

Ban, Nissen, Hansen, Moore, Steitz Science. 2000 (LSU)

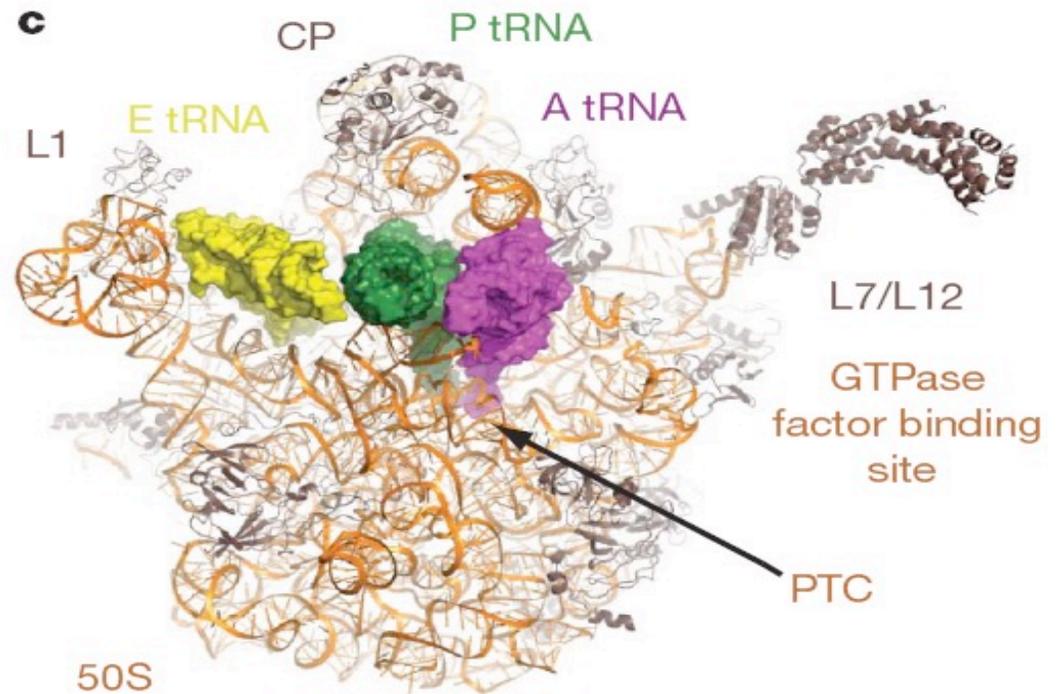
Les ribosomes



Petite et grande sous-unités en 3D

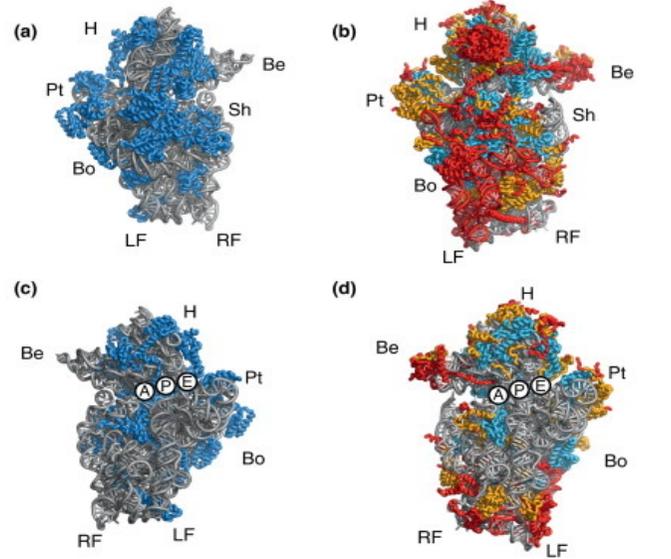
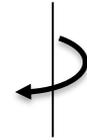


SSU: Small Subunit
Decoding Center (DC)



LSU: Large Subunit
Peptidyl-transferase Center (PTC)

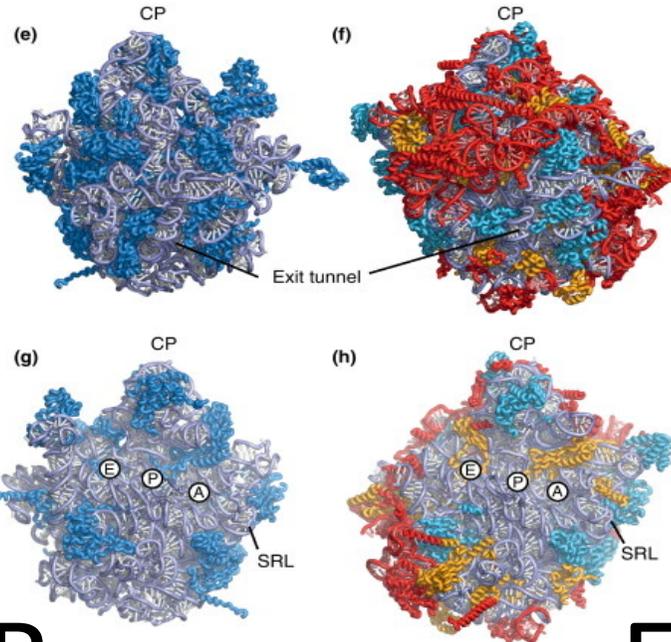
Différences bactérie/ eucaryote



Solvent
exposed
side

SSU
(30S ou
40S)

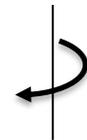
Subunit
interface



Solvent
exposed
side

LSU
(50S ou
60S)

Subunit
interface



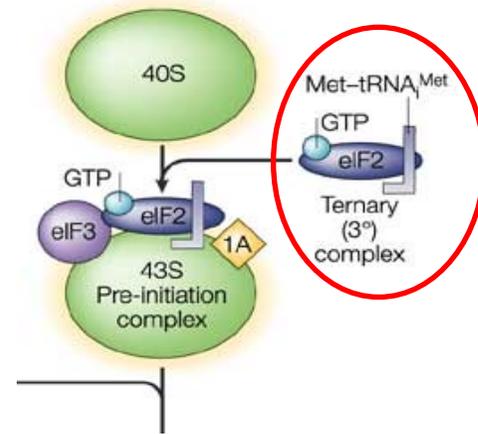
B ————— **Bacteria**

————— **Eukarya** **E**

Rouge : spécifique euk.

Démarrage traduction eucaryote

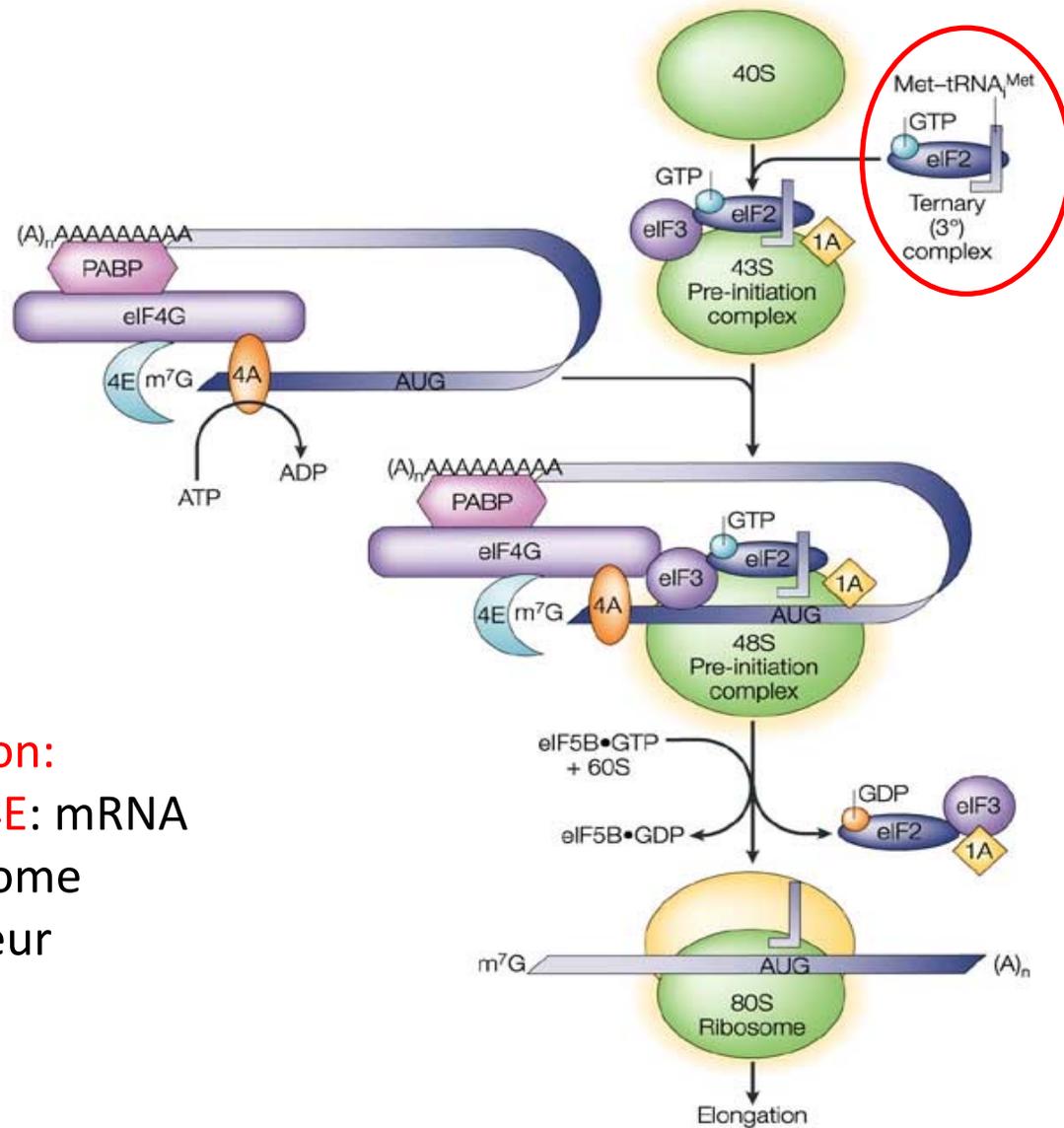
Démarrage de la traduction eucaryote



$TC = GTP + tRNA_i + eIF2$

Liaison d'un complexe ternaire (TC) à la sous unité 40S

Le TC permet de charger le 1^{er} tRNA (met) sur la petite sous-unité du ribosome

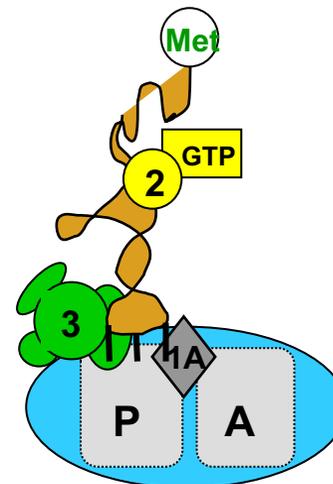
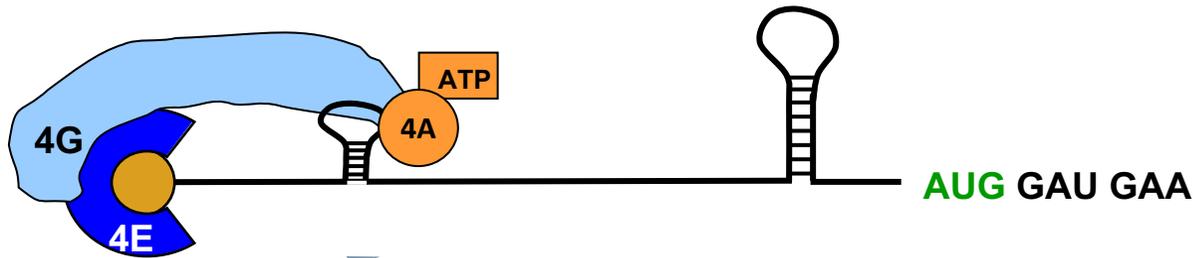


TC (complexe ternaire)
= GTP+tRNA_i+eiF2

Facteurs d'initiation:
eIF4G, eIF4A, eIF4E: mRNA
eIF1A, eIF3: ribosome
eIF2: tRNA initiateur

(1GTP consommé pour l'assemblage 40S+60S)

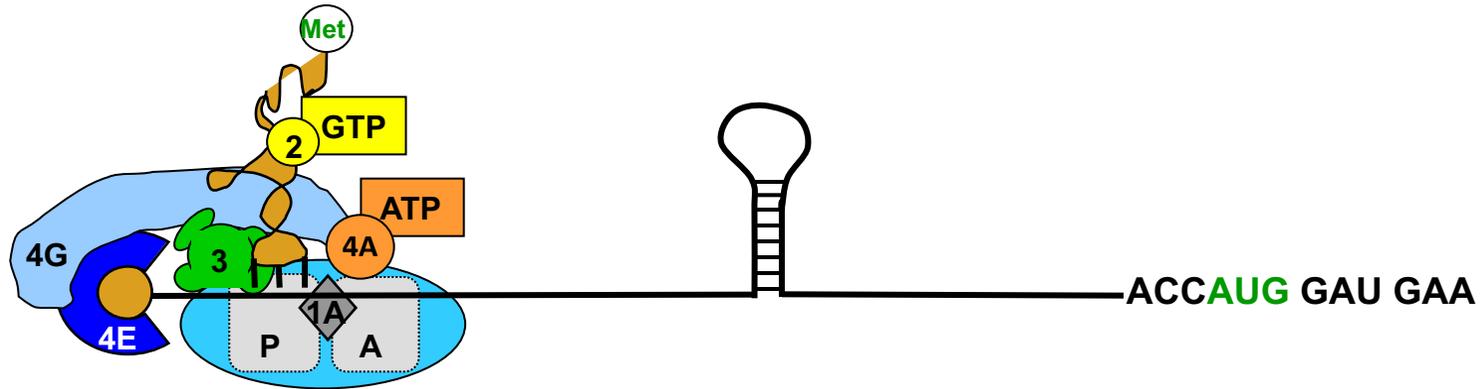
Rôles des eIF-4



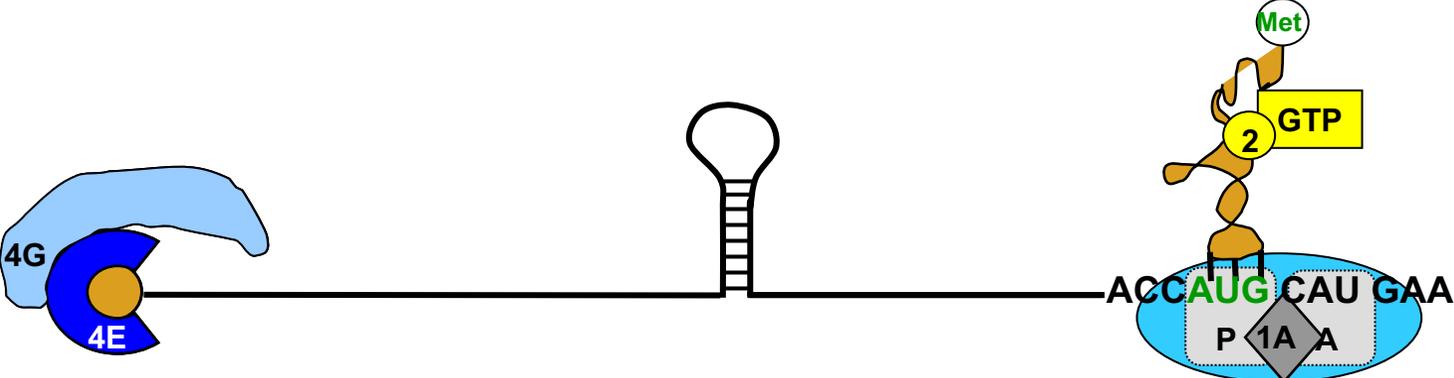
Complexe de pré-initiation

- eIF-4E reconnaît la coiffe m7Gppp
- eIF-4G protéine plateforme, interagit avec de nombreux facteurs : eIF-4E, eIF-4A, eIF3
- eIF4A hélicase ATP-dépendante

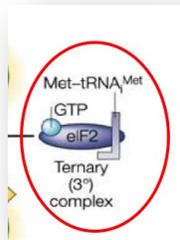
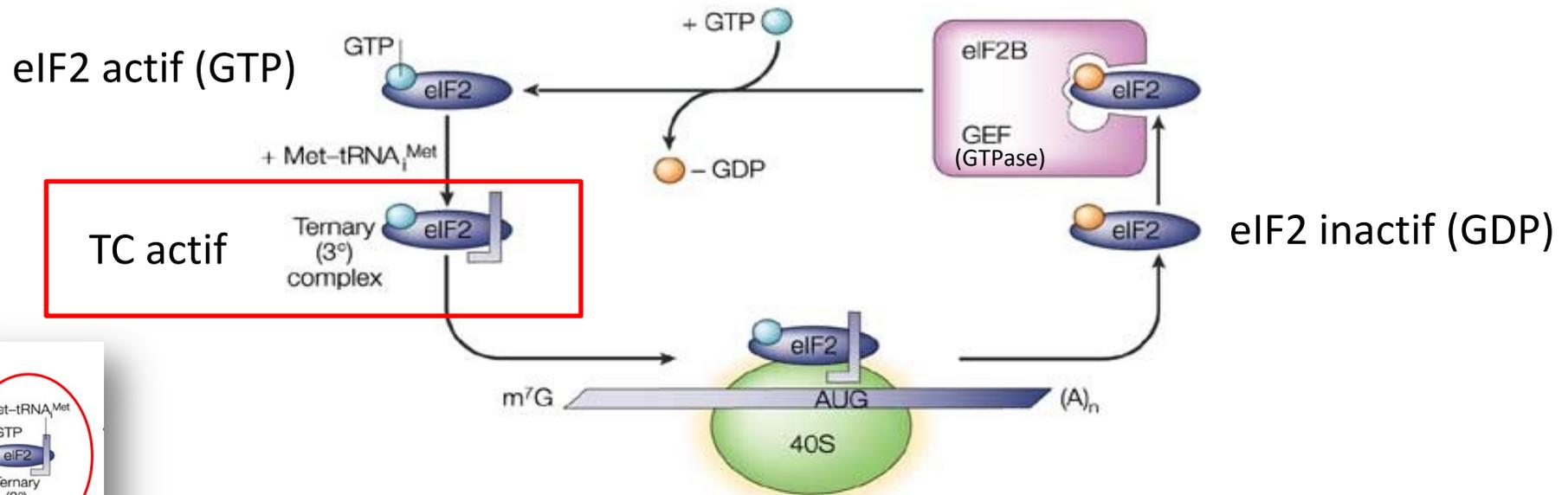
Démarrage eucaryote



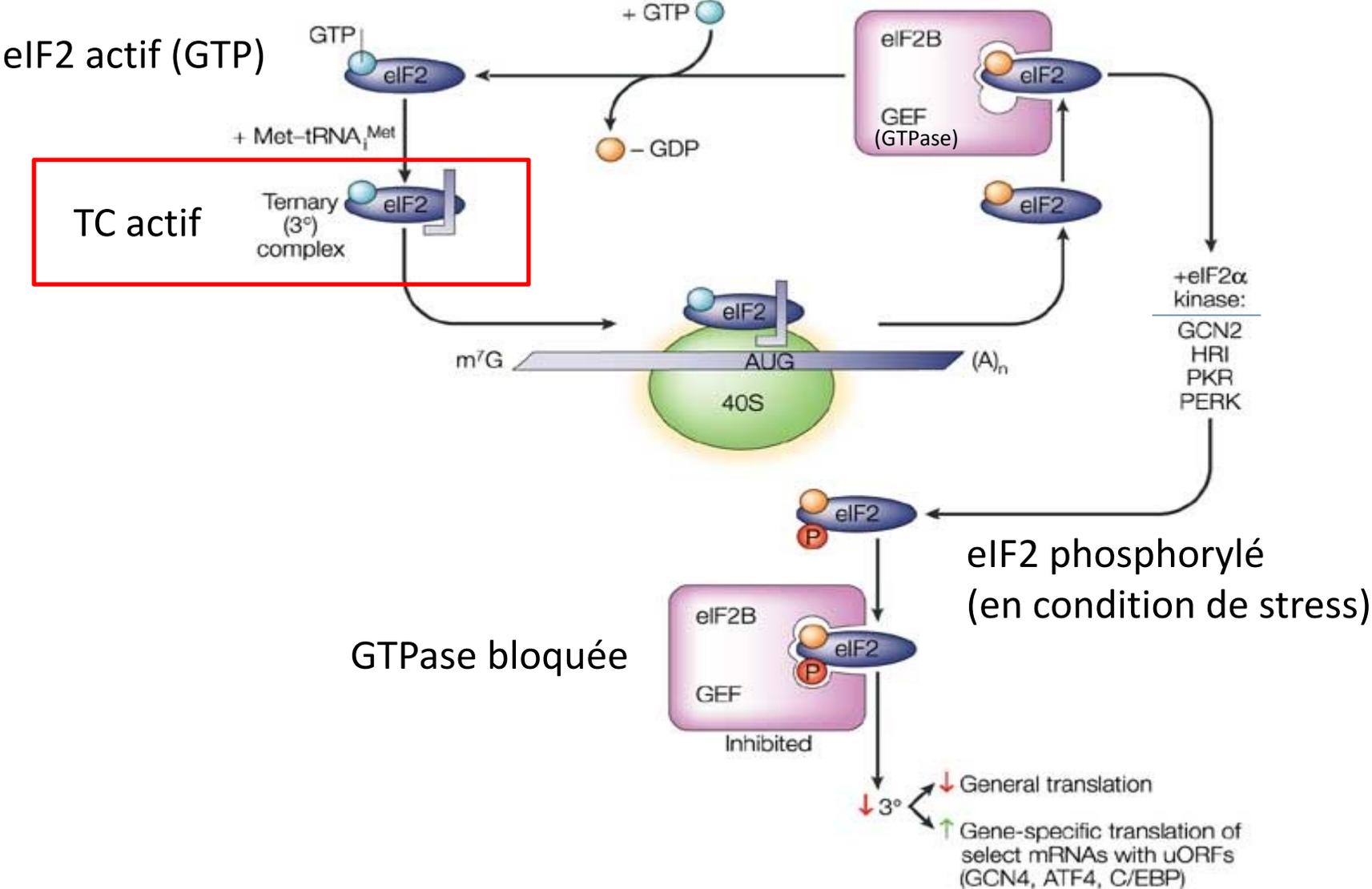
Démarrage eucaryote



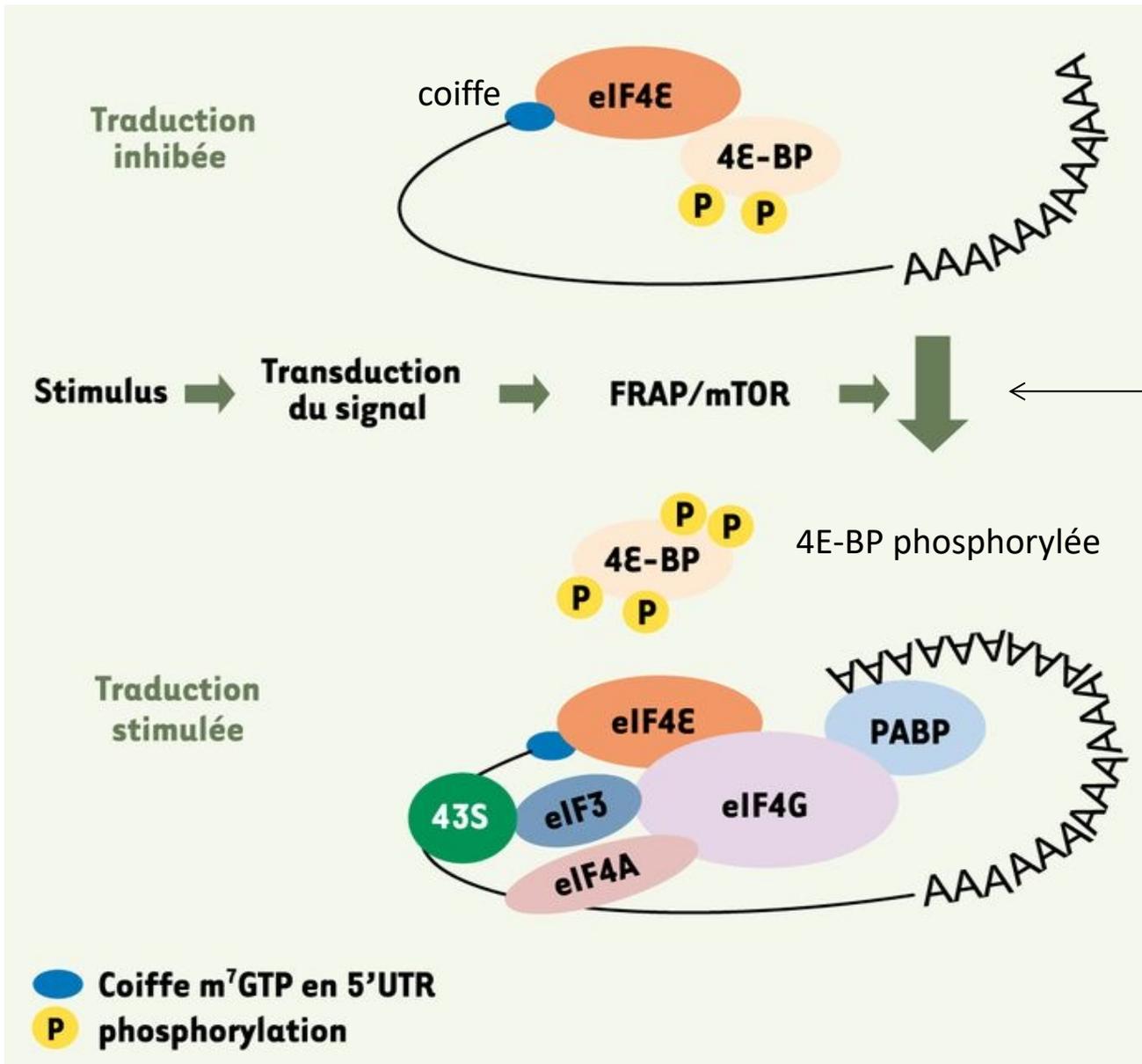
Régulation du démarrage N°1: via eIF2



Régulation du démarrage N°1: via eIF2



Régulation du démarrage N°2: via 4E-BP



(4E-BP = 4E Binding Protein)

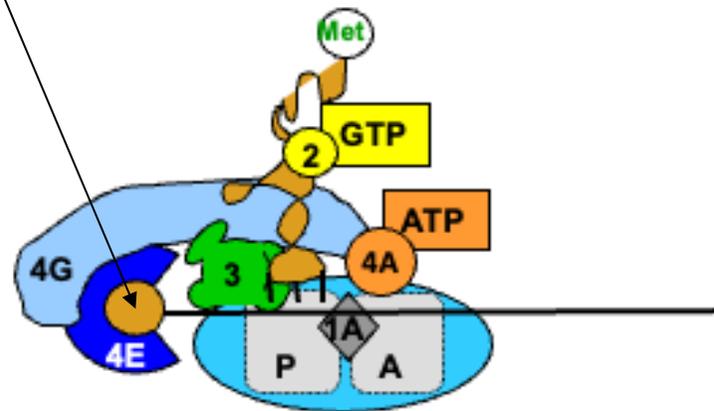
De nombreuses voies de signalisation (carence, infection, cycle) aboutissent à ce point

Voir TD P53!

Régulation du démarrage N°3:

Entrée interne du ribosome

Rappel: la coiffe est nécessaire au démarrage

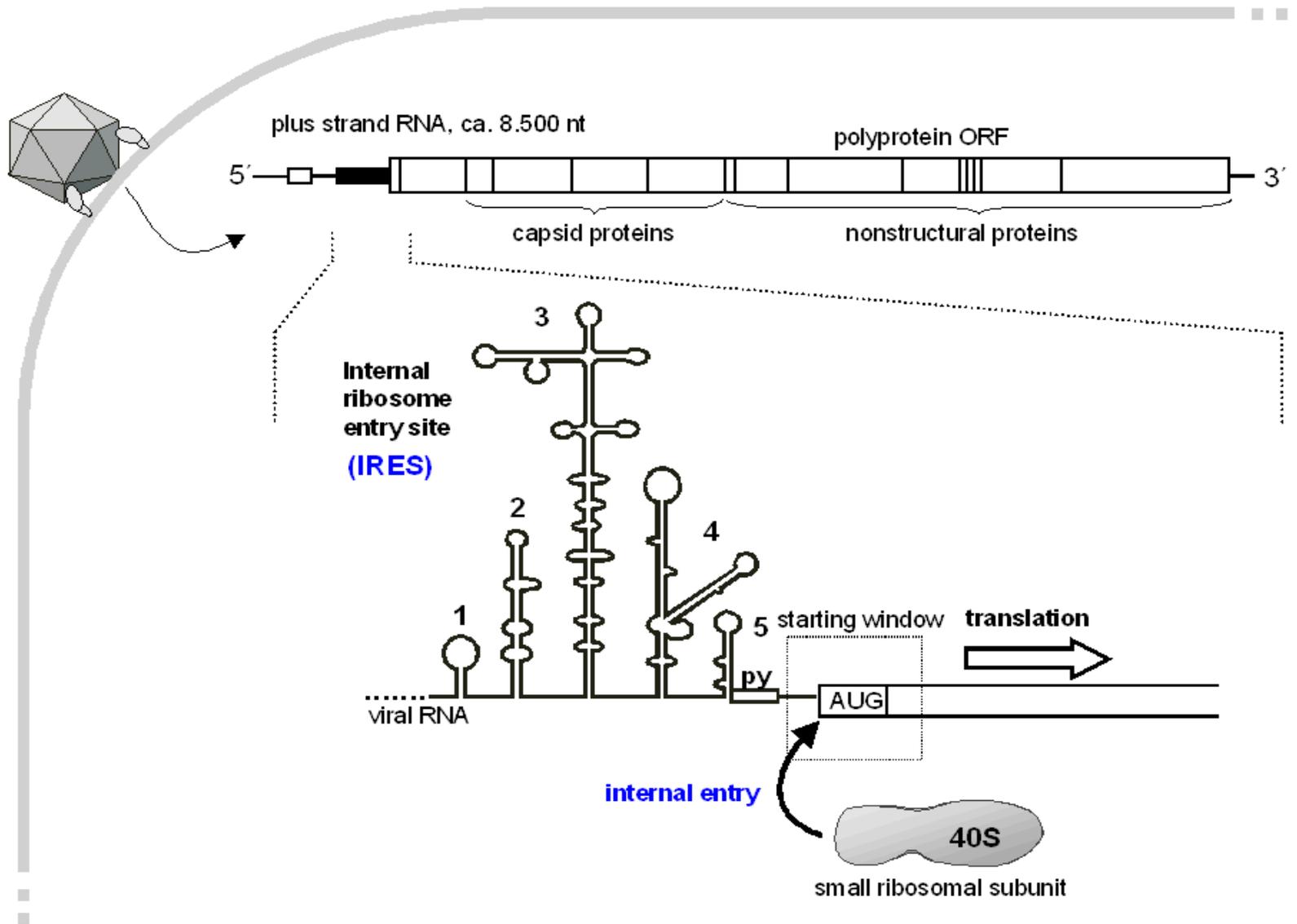


L'IRES de picornavirus (p. ex. polio)

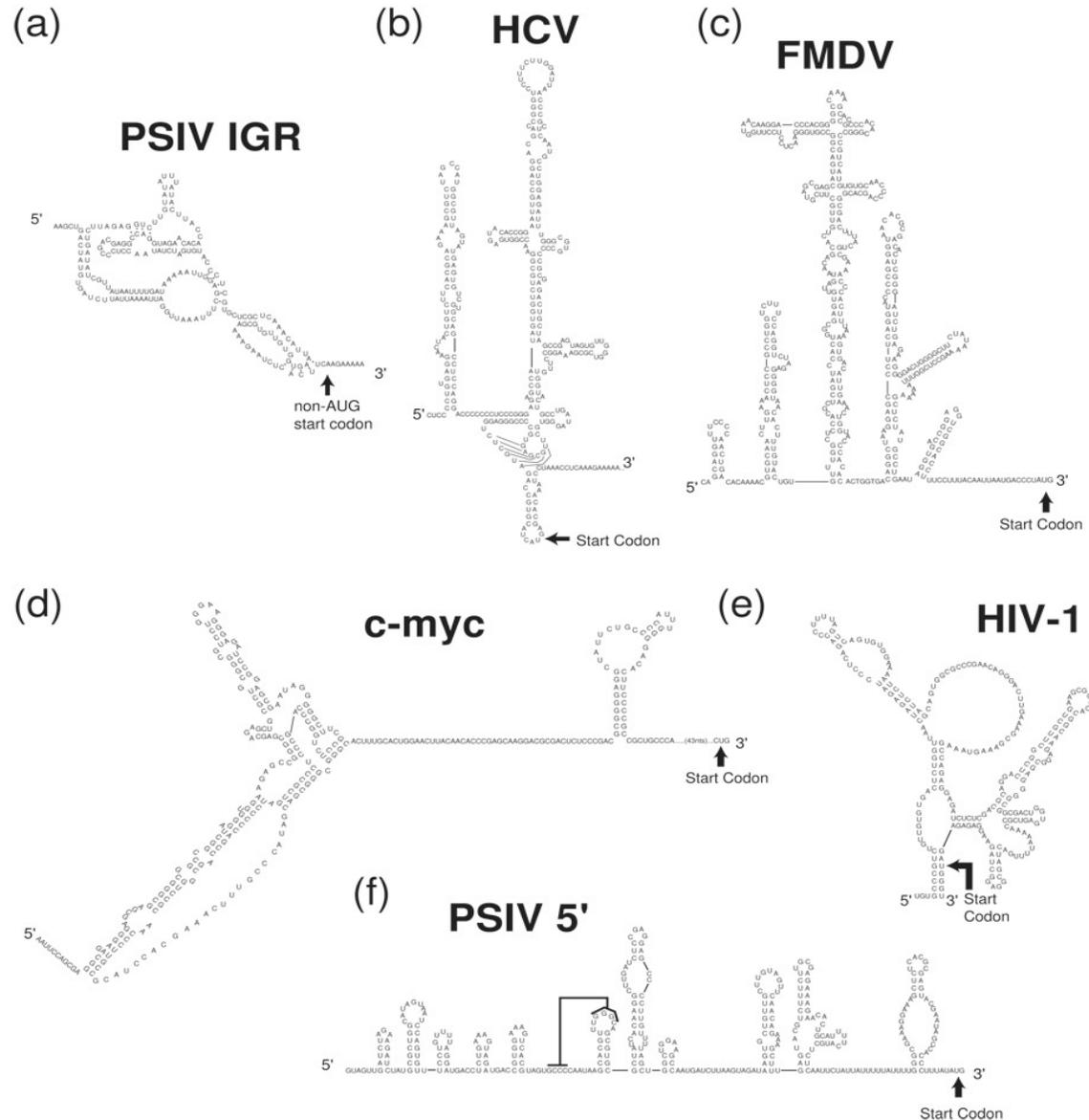
Virus à ARN
brin + sans
coiffe:
HIV
polio
Hepatitis

Ces virus
inhibent eIF4G!

(Ebola:
virus à ARN
brin négatif.
Le mRNA est
produit avec
coiffe)



Galerie d'IRES...



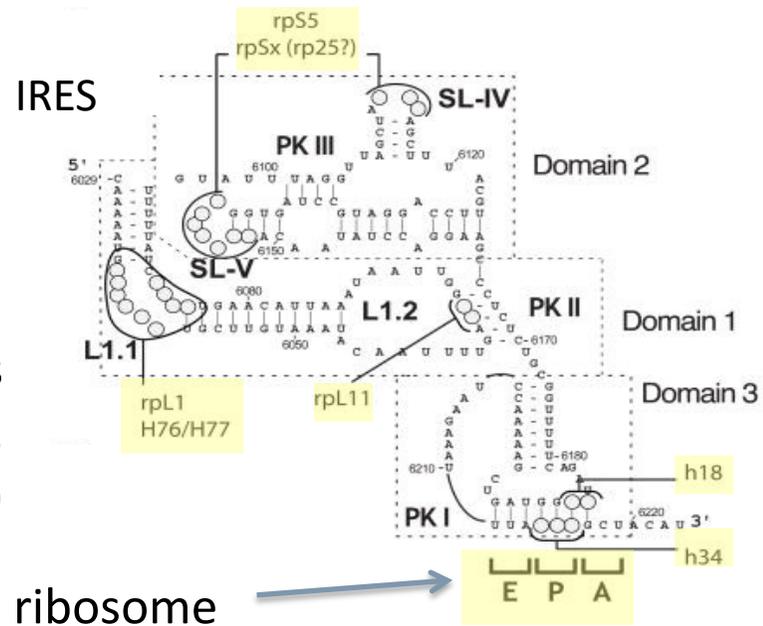
Pas de motif commun!

Existe aussi pour certains ARNm cellulaires

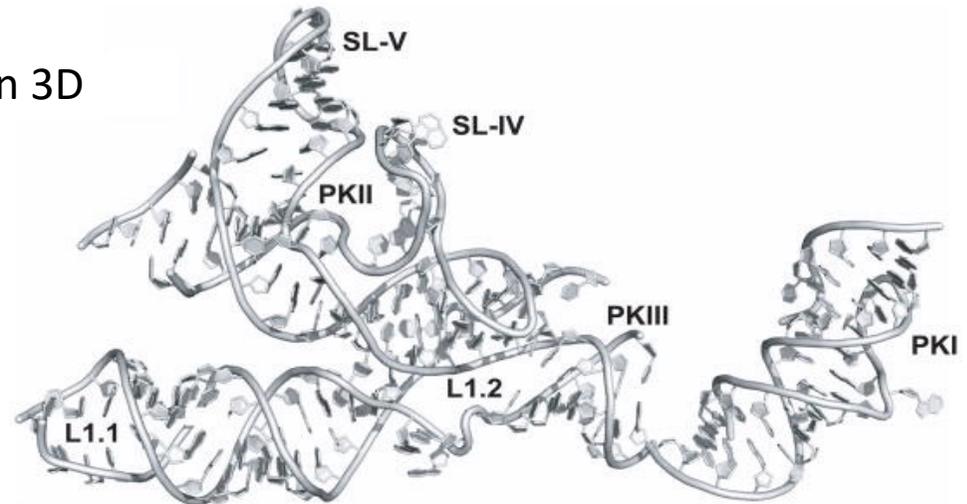
Reconnaissance de l'IRES par SSU ribosome

L'IRES est reconnu par différentes parties du ribosome (rpl1, rpl11, h18, h34)

Positions E/P/A du ribosome

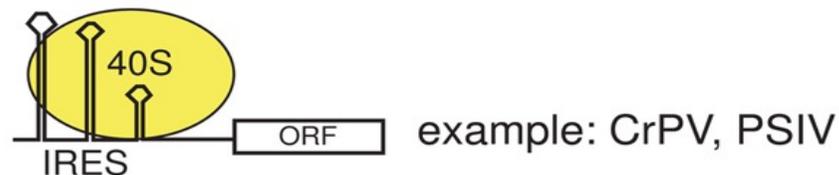
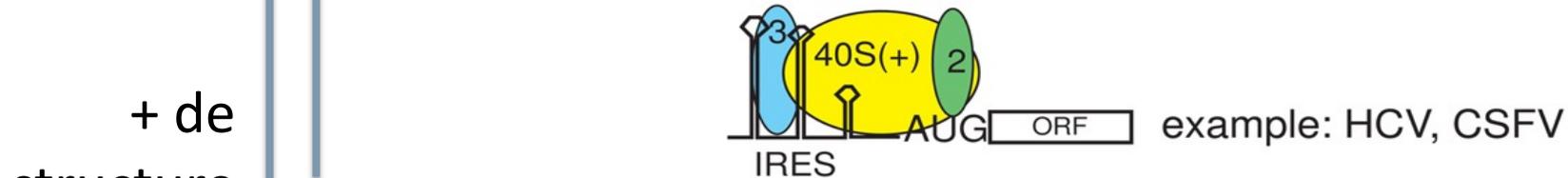
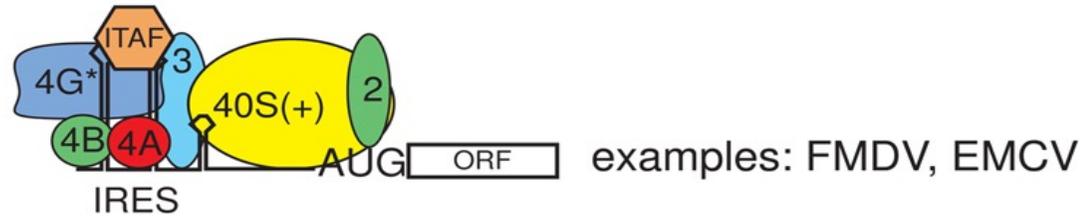
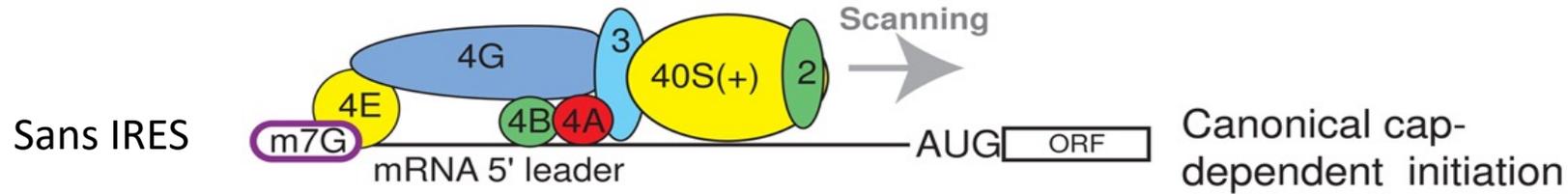


IRES en 3D



Attention: ici un type particulier d'IRES. Tous ne se fixent pas directement au ribosome

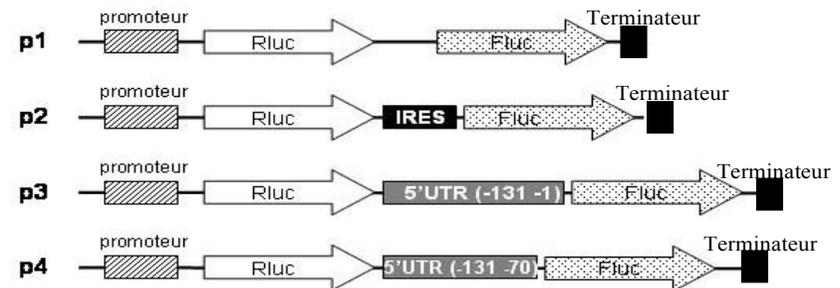
Equilibre entre structure ARN et facteurs externes



Utilisation des IRES virales en biologie moléculaire

Voir TD P53!

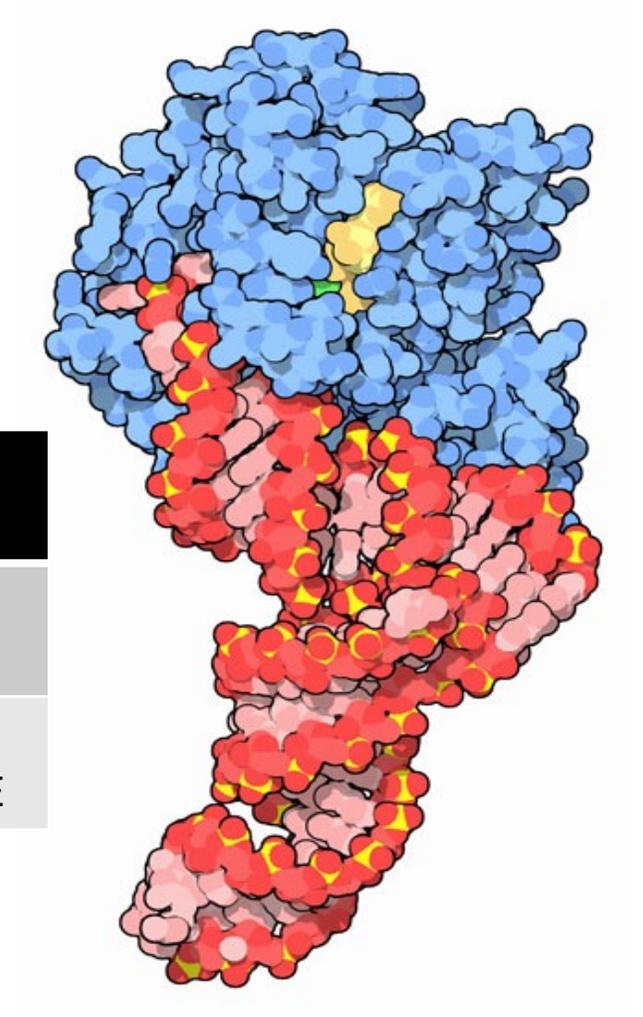
Utilisation d'IRES virale pour activer artificiellement la traduction d'un gène.



L'élongation

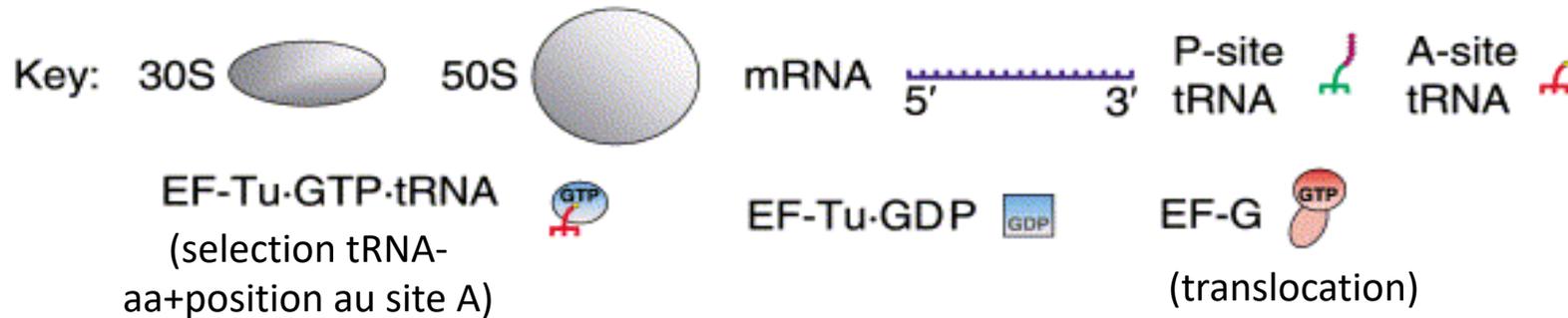
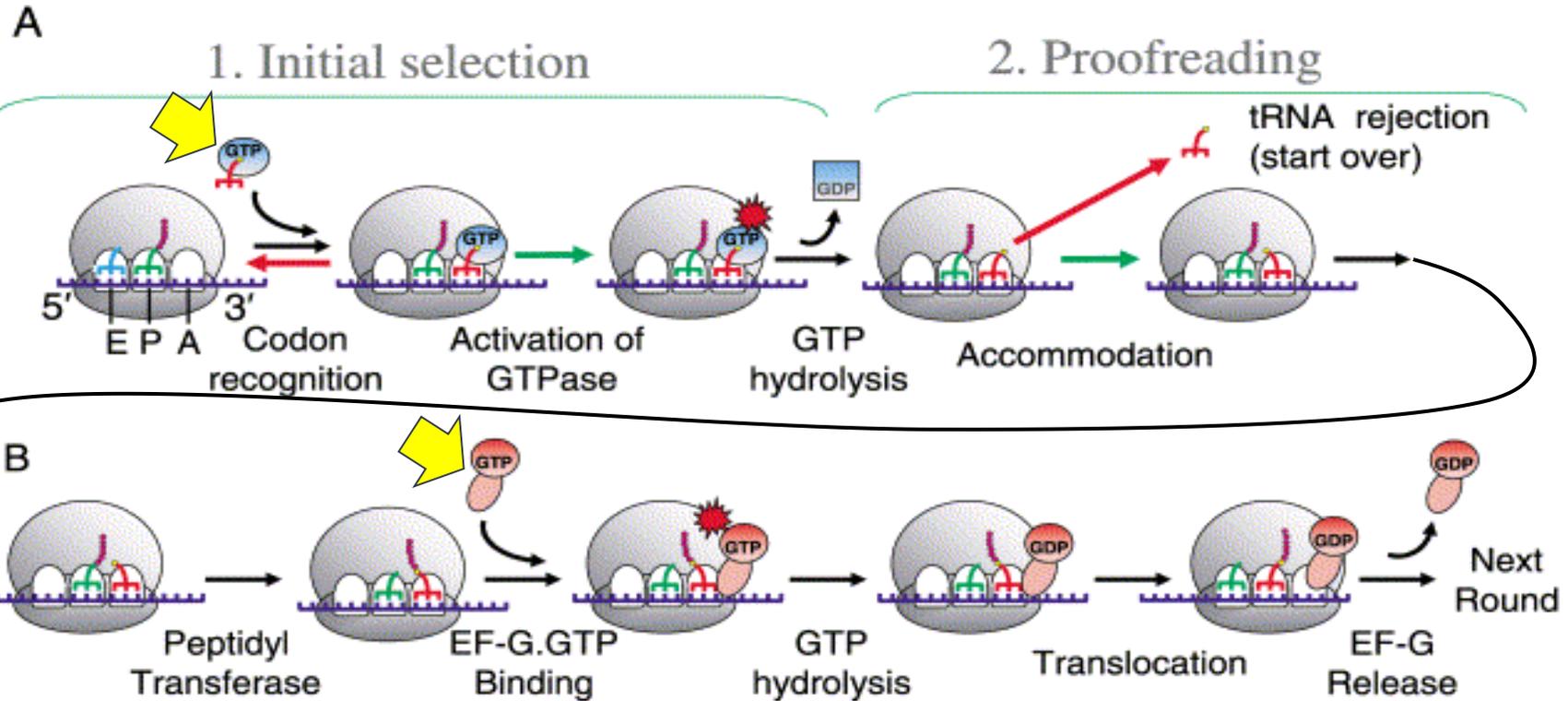
Elongation (rappel)

Facteur bacterien	Facteur eucaryote	Role
EF-Tu	eEF1	Permet l'entrée de l'aminoacyl-tRNA sur le site A
EF-G	eEF2	Catalyse la translocation des tRNA et du mRNA de A vers P et P vers E



Complexe EF-Tu / tRNA

Elongation bactérienne (rappel)



Consommation de 2 GTP (les 2 EF sont des GTPases)

Comment mesurer l'activité de traduction?

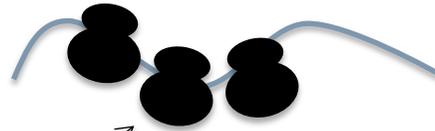
Les polysomes



ARN non traduit



Faiblement traduit

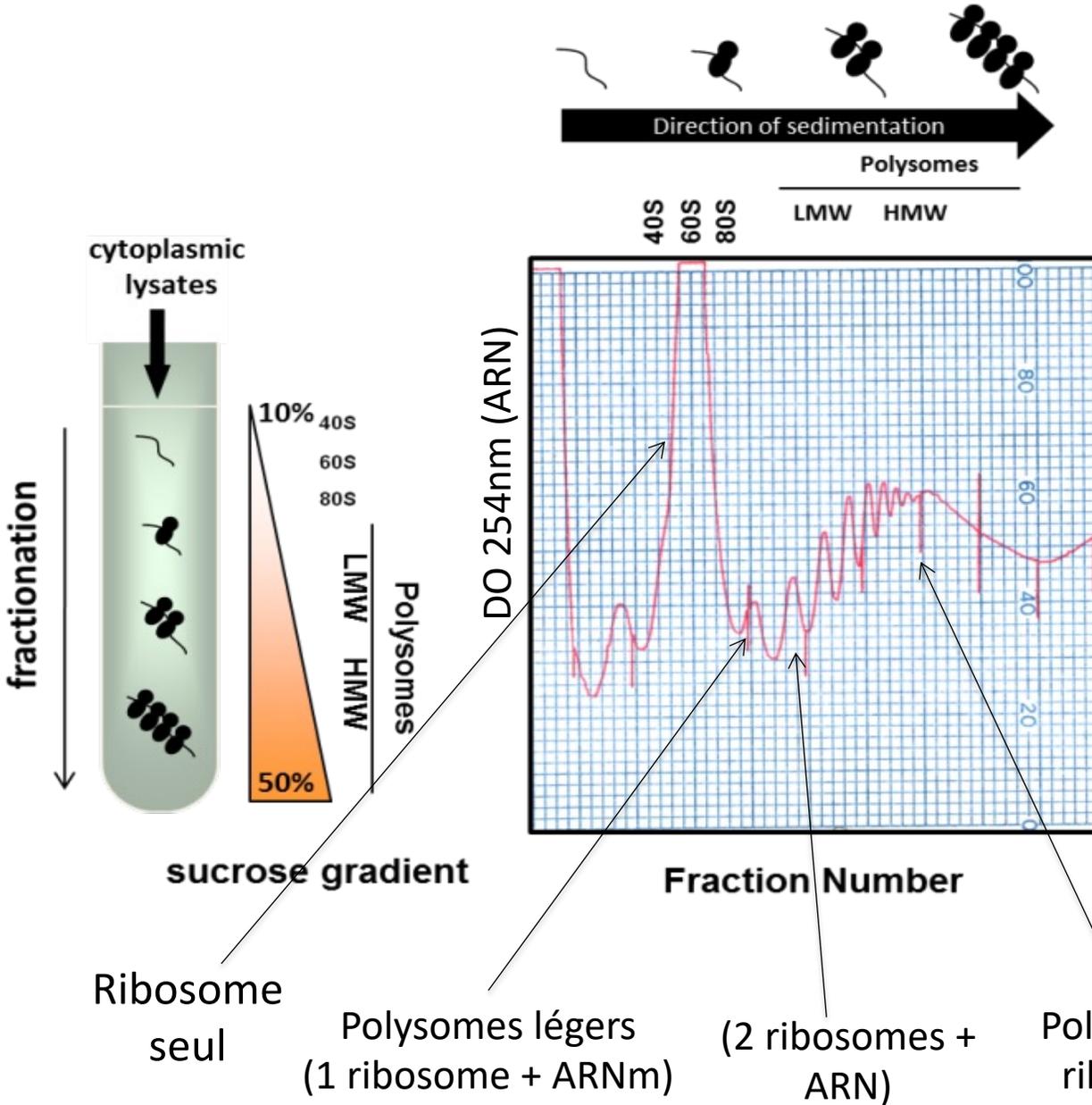


Fortement traduit

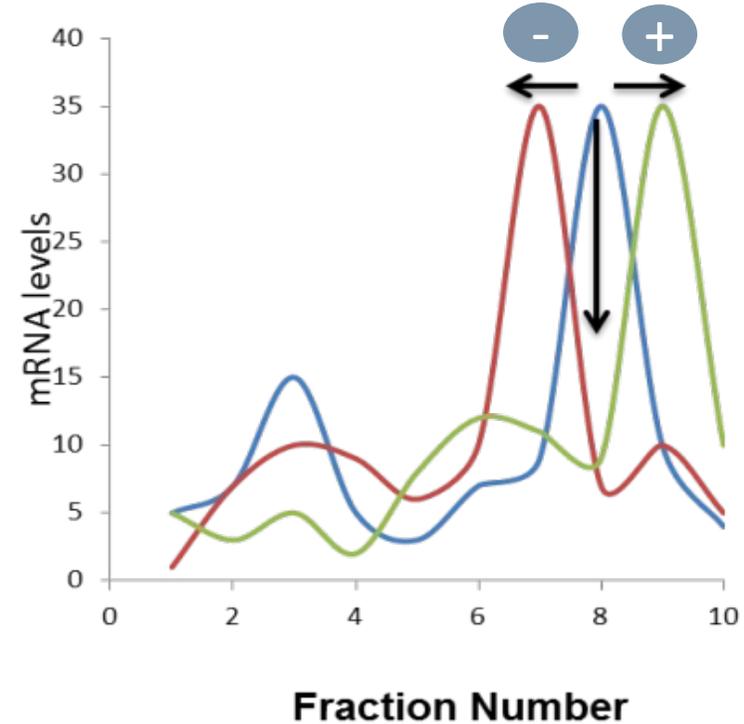
Poly-ribosome



Isolement des ribosomes en traduction: polysomes



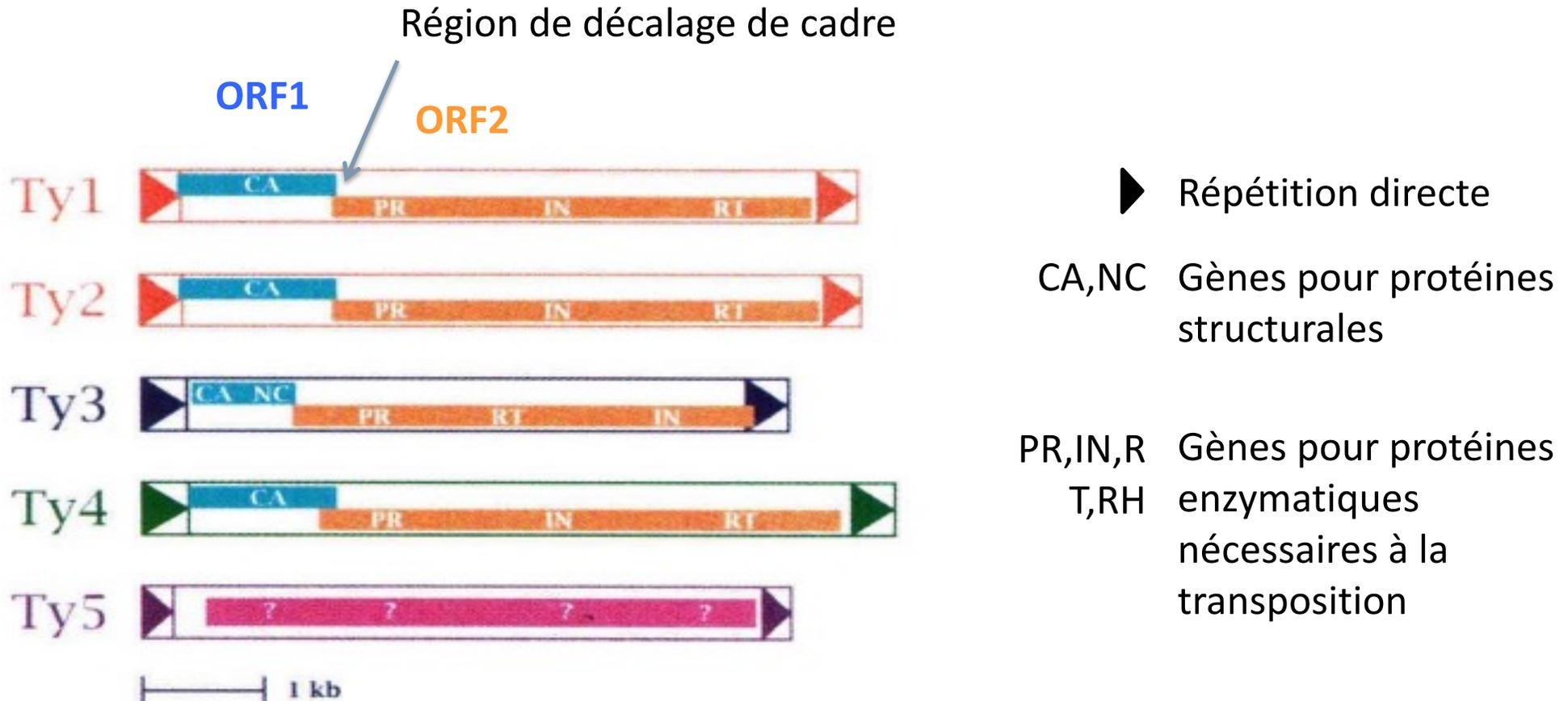
Quantité de mRNA dans les ≠ fractions dans 3 expériences



Régulation au niveau de l'élongation

Régulation au niveau de l'élongation

N°1: Décalage en +1



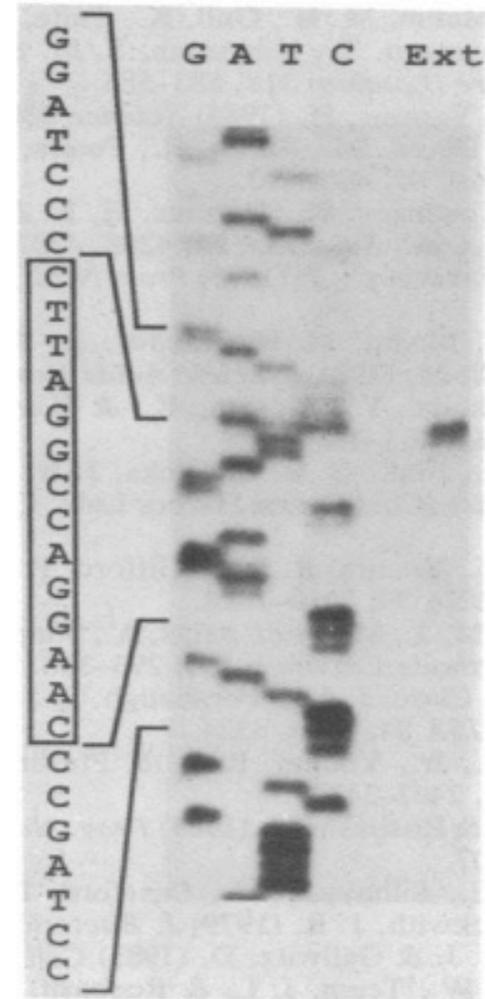
Les rétrotransposons Ty de levure

Le décalage peut-il être causé par une modification de l'ARNm (editing)?

On s'attendrait dans ce cas à trouver un mélange d'ARN de séquences variables à partir du site de décalage de cadre.

...Ce n'est pas le cas.

Gel de séquence Sanger de
cDNA de Ty



Recherche de gènes affectant l'efficacité de transposition

On réalise une banque de fragments génomiques sur des plasmides multicopies (= mutagénèse par surexpression)

Quels gènes peuvent abolir la transposition?

Table 1. Overexpression of $tRNA_{CCU}^{Arg}$ inhibits Ty1 transposition

Strain*	Plasmid	Transposition frequency [†]
YH107	Yep351, 2 μ -based, no insert	14.3% (18/126)
YH109	p49A, 4-kb genomic insert containing $tRNA_{CCU}^{Arg}$ in Yep351	0.8% (1/120)
YH113	pX114, 0.3-kb genomic insert containing $tRNA_{CCU}^{Arg}$ in Yep351	0.8% (1/119)
YH112	pX113, 4-kb genomic insert containing $tRNA_{CCU}^{Arg}$ disrupted by <i>neo</i> in Yep351	8.5% (9/106)
YH118	pRS315, centromeric, no insert	8.1% (20/247)
YH116	pX116, 0.3-kb genomic insert containing $tRNA_{CCU}^{Arg}$ in pRS315	4.3% (11/258)
YH117	pX117, 0.3-kb genomic insert containing $tRNA_{CCU}^{Arg}$ in pRS315	4.4% (11/250)

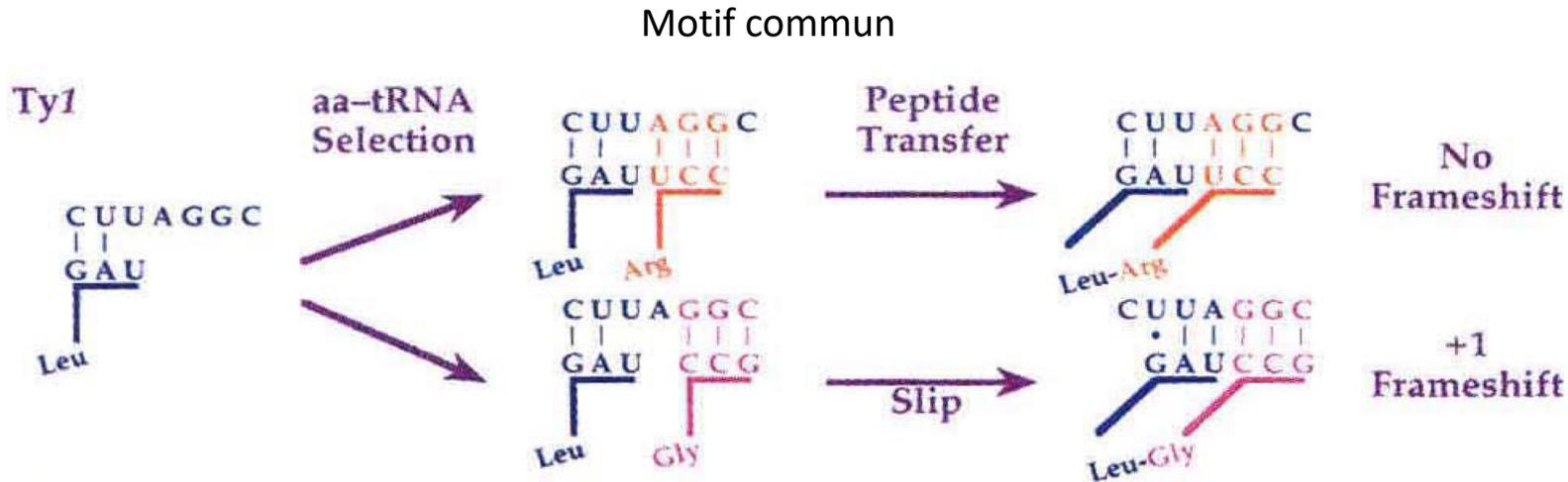
*All the strains listed here were derivatives of YH82 (*MATa ura3-52 trp1 Δ 63 leu2 Δ 1 his4-539 lys2-801*). They also contained the plasmid pX3 (pGTy1-H3-*TRP1*).

[†]Transposition frequency was defined as the fraction of the cells that became Trp⁺ after galactose induction and segregation of the pGTy1-H3-*TRP1* plasmid.

-> à chaque fois: un tRNA CCU

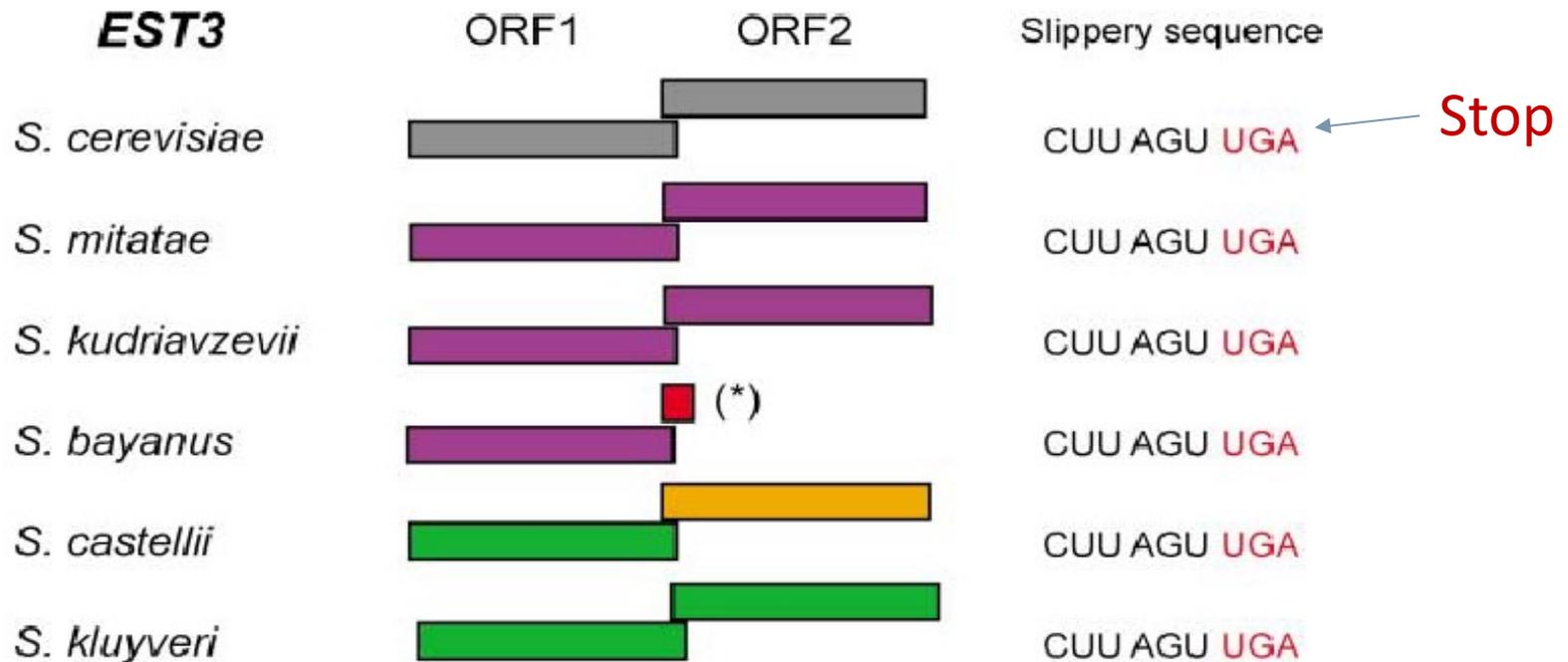
Le décalage de cadre en +1

Rappel motif:
CTTAGGC



- Le tRNA^{Arg}_{CCU} est naturellement peu abondant et inefficace
- Le ribosome préfère insérer un tRNA^{Gly}_{GCC} quitte à opérer un décalage de +1 du cadre
- En surexprimant le tRNA^{Arg}_{CCU} on favorise la lecture « normale »
- Décalage de cadre = « frameshift »
- On parle ici de décalage programmé

Autre exemple de décalage +1: le gène EST3

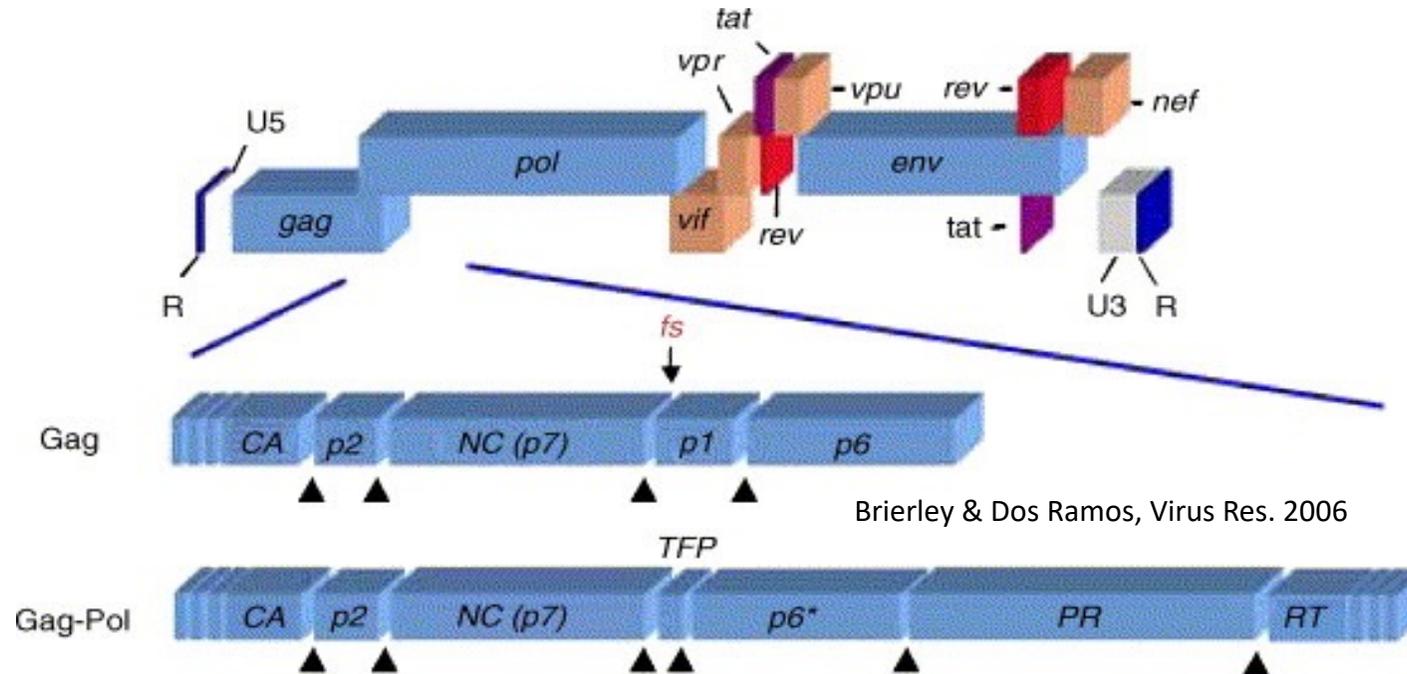


Namy et al. 2004

- Même principe que Ty: ici le codon AGU est lu par un tRNA rare et inefficace
- La zone où se passe le décalage est appelée ici séquence « glissante »

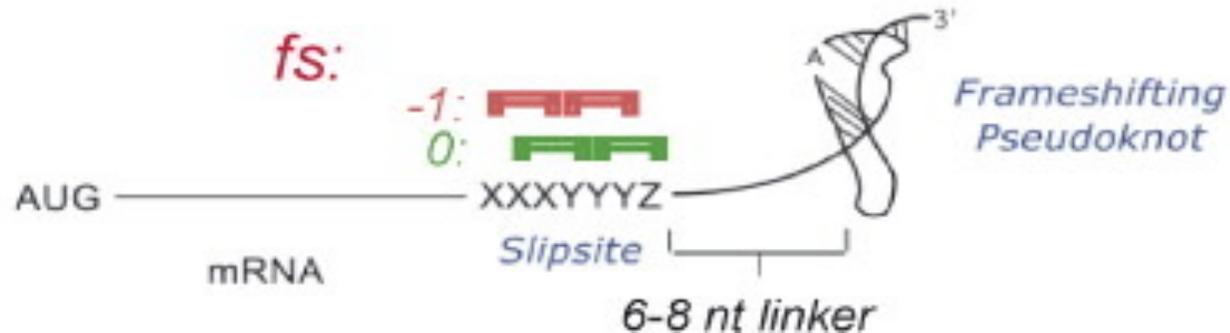
N°2: le décalage en -1 (cas de HIV-1)

Le génome de HIV-1 et zoom sur la région du décalage en -1:



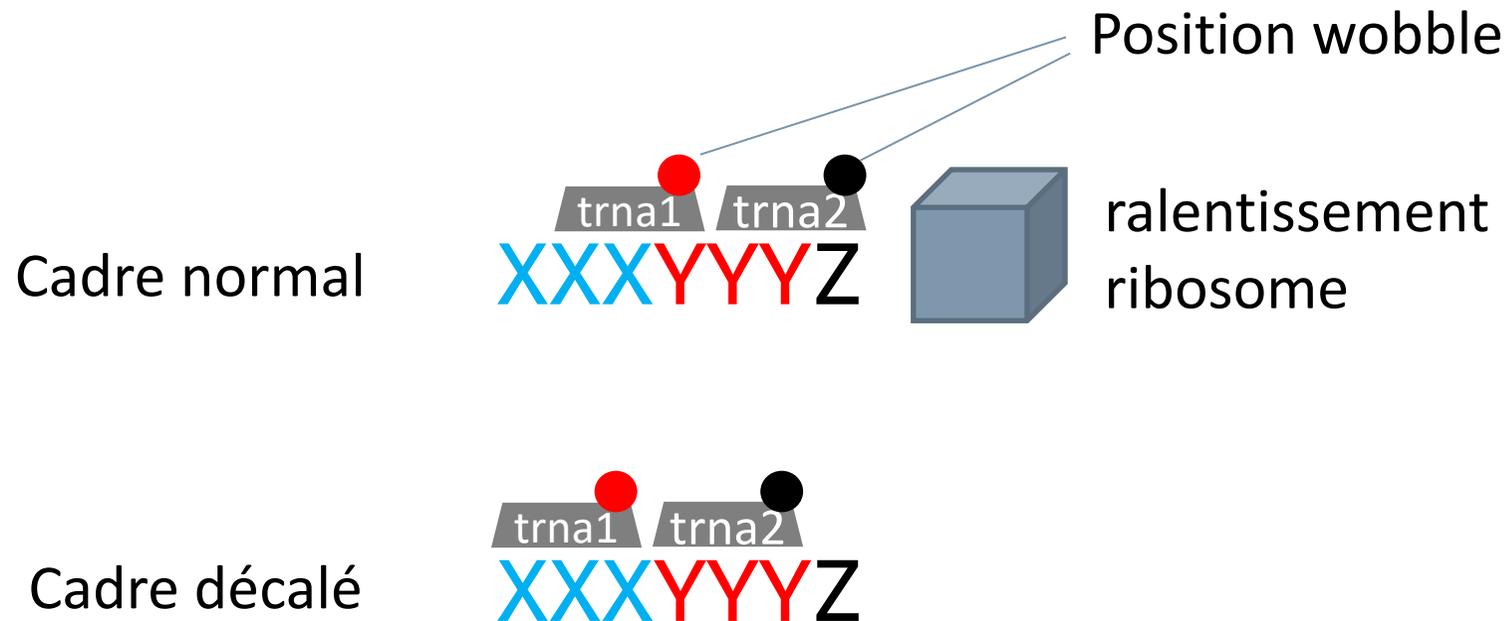
- Le décalage (fs) permet la production de la polyprotéine gag-pol.
- L'équilibre entre les deux formes Gag et Gag-Pol est essentiel à la survie du virus (cible pharmaceutique)
- La protéine PR (Protéase) réalise les coupures (▲) dans les polyprotéines

Elements nécessaires au décalage -1



- Pseudonoeud ou tige-boucle très stable: bloque le canal d'entrée du ribosome
- Séquence glissante XXXYYYZ: le passage en -1 ne crée qu'un changement dans la position wobble. Les mêmes tRNA peuvent rester en place

Détail du frameshift -1

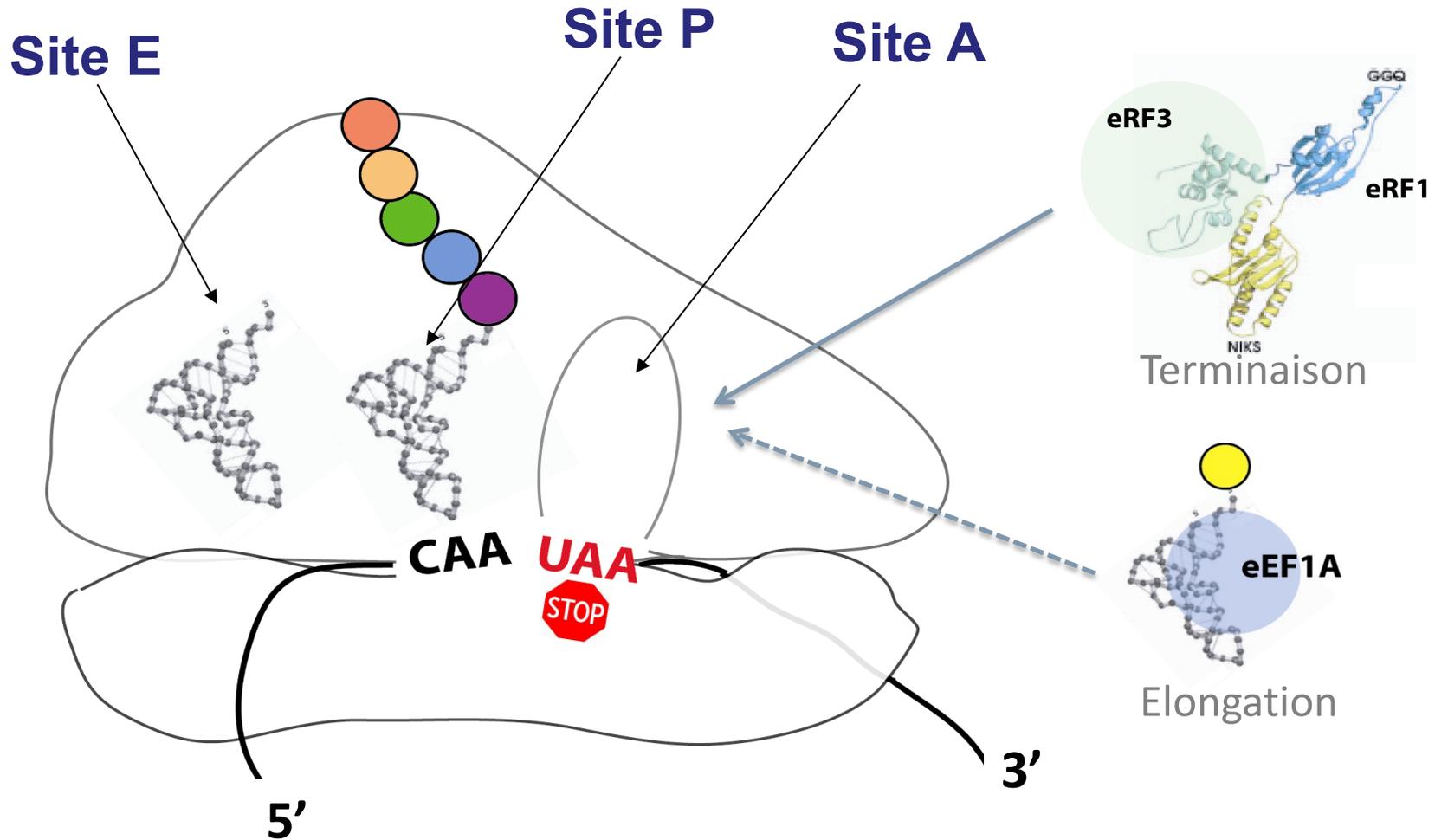


Régulation au niveau de la Terminaison:

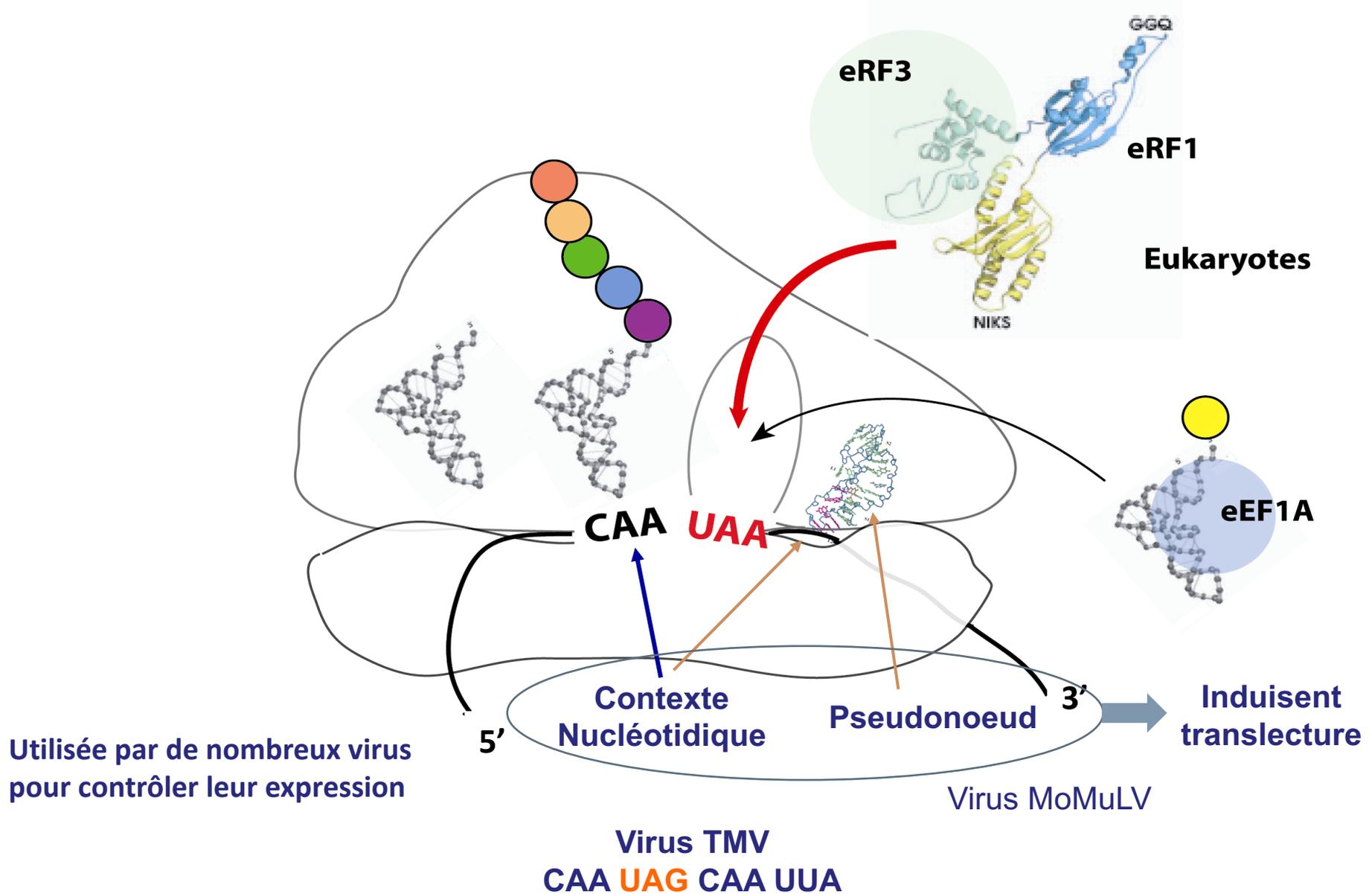
La translecture

Terminaison de la traduction

Eucaryotes



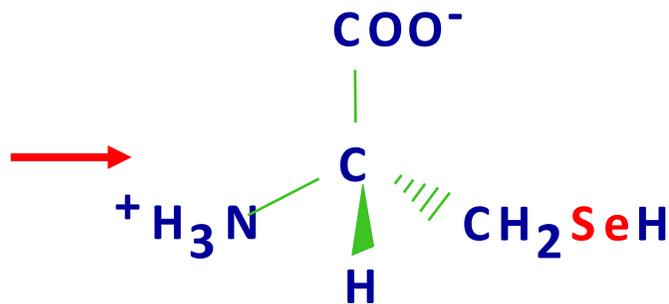
N°1: Translecture favorisée par éléments stimulateurs



N°2: Translecture au moyen de la sélénocystéine, le 21^{ème} acide aminé

Biologie du sélénium chez les mammifères

Se



sélénocystéine

Sélénoprotéines

- Protection contre les radicaux libres
- Développement
- Fertilité
- Vieillesse

Les gènes de sélénoprotéines

Formate dehydrogenases

AAC CAG GCC CGC GTC **TGA** CAC GGA CCA (E. coli)

TGC TGC GCT CGC GTC **TGA** CAC GGC CCT (E. coli)

Hydrogenases

CGC TCC TAC GAC CCG **TGA** CTG GGC TGT (D. Baculatus)

Glutathione peroxidases

AAT GTG GCC TCT CAA **TGA** GGC AAG ACG (PHGPx)

AAT GTC GCG TCT CTC **TGA** GGC ACC ACG (mouse GPx-1)

AAT GTG GCG TCC CTC **TGA** GGC ACC ACG (human GPx-1)

5' Deiodinase

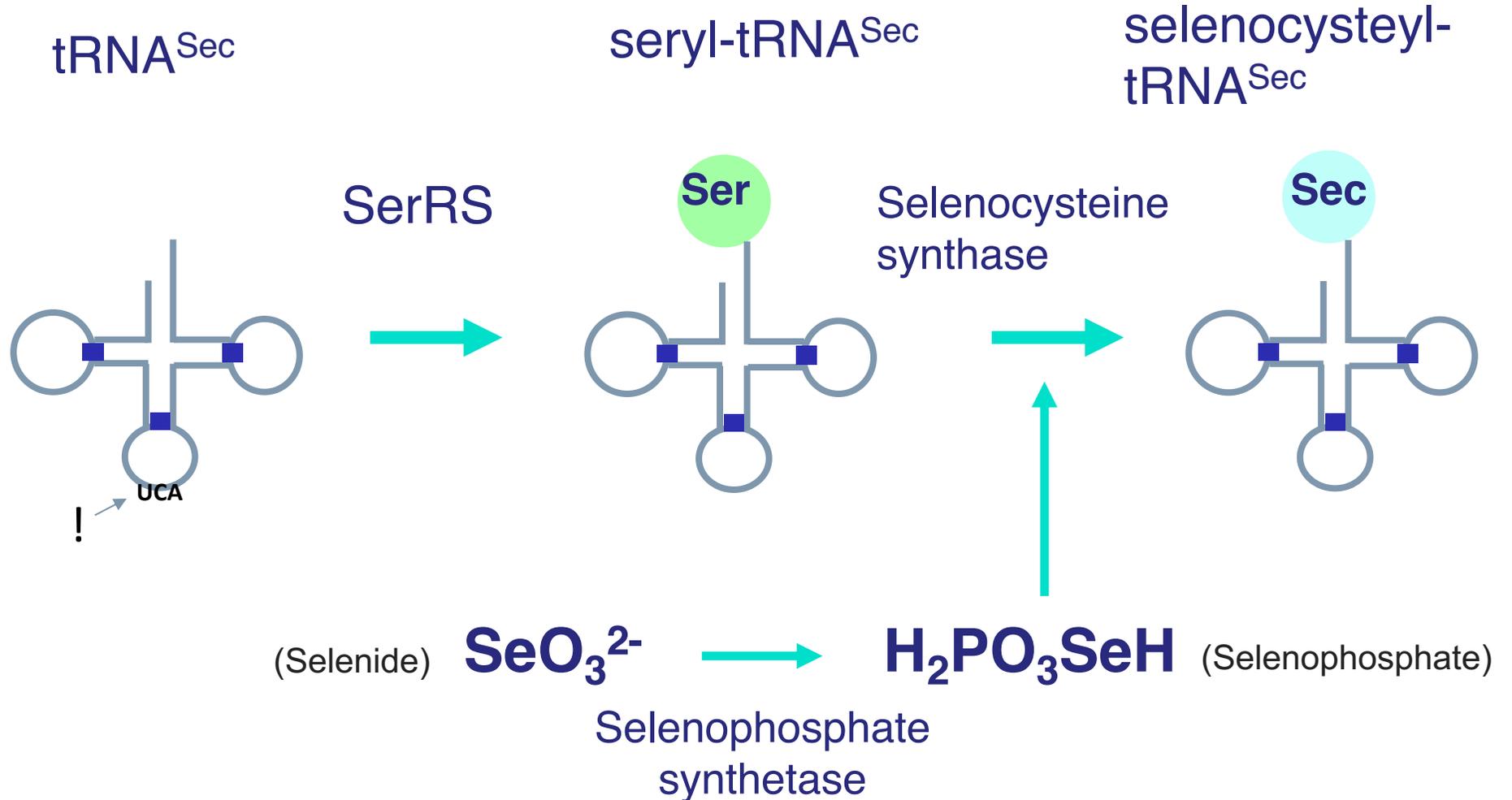
TTC GGC AGC TGC ACC **TGA** CCT TCA TTT (human)

STOP

↓
Sélénocystéine

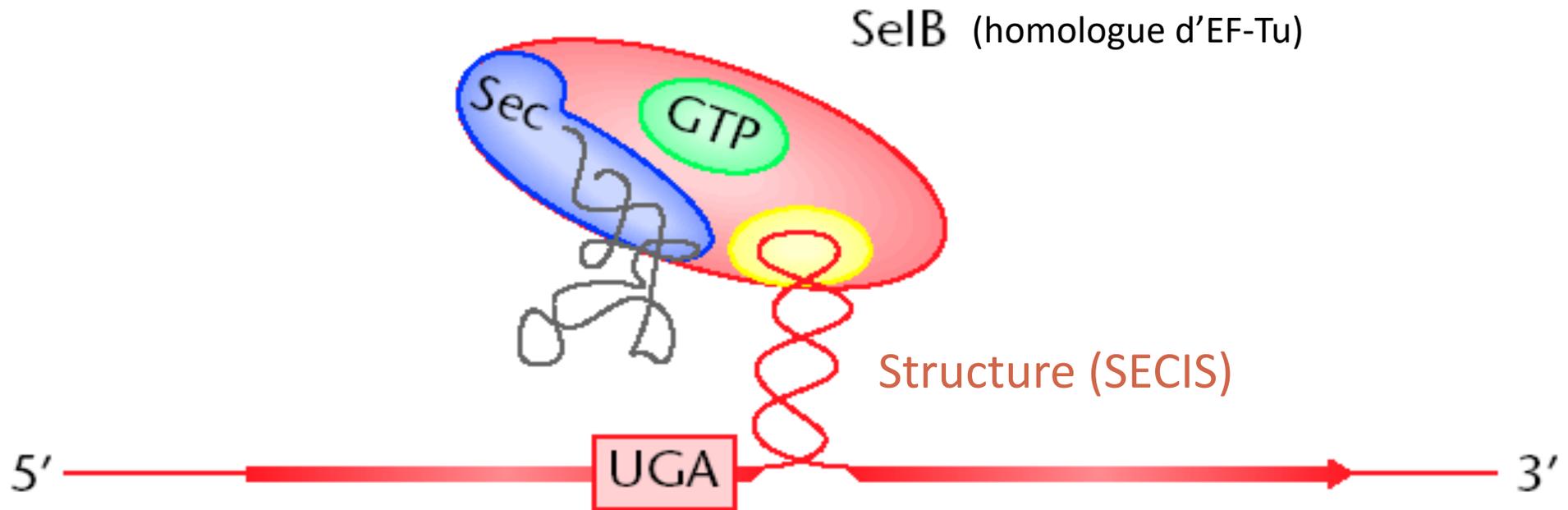
Reprogrammation du
codon Stop

Formation des tRNA^{Sec}

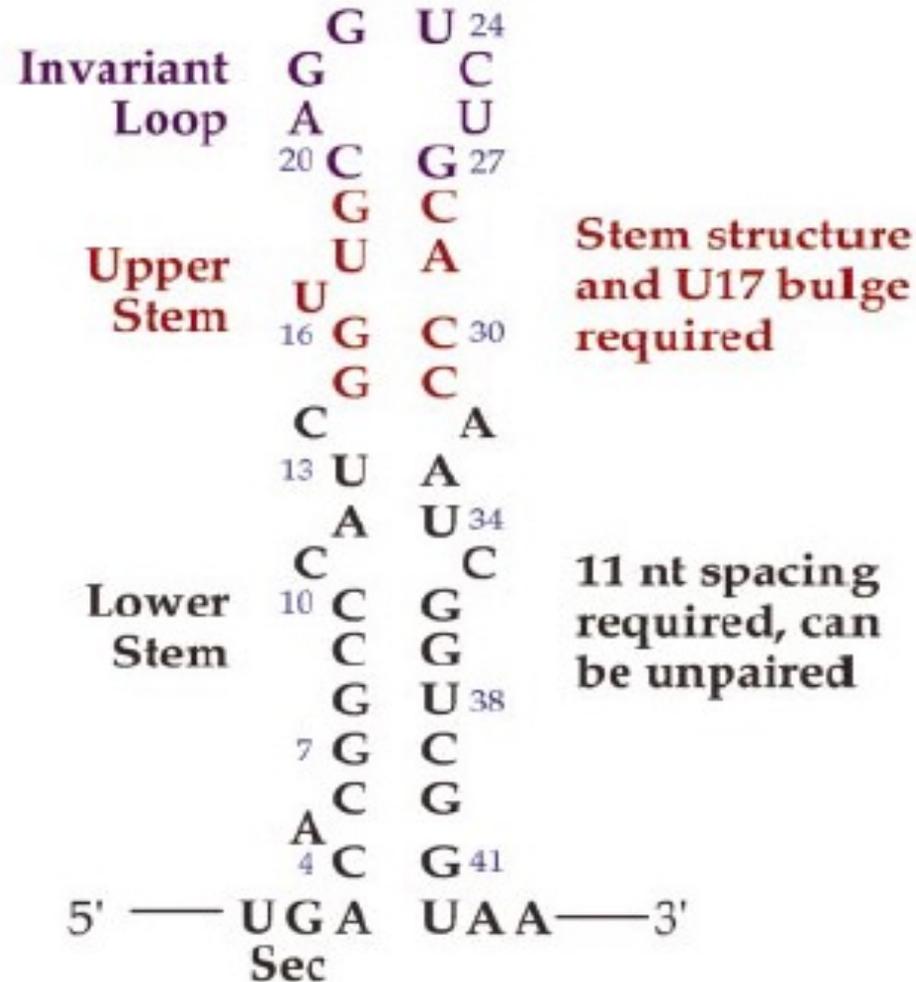


La reconnaissance du codon stop nécessite une structure dans le mRNA

Bactéries:

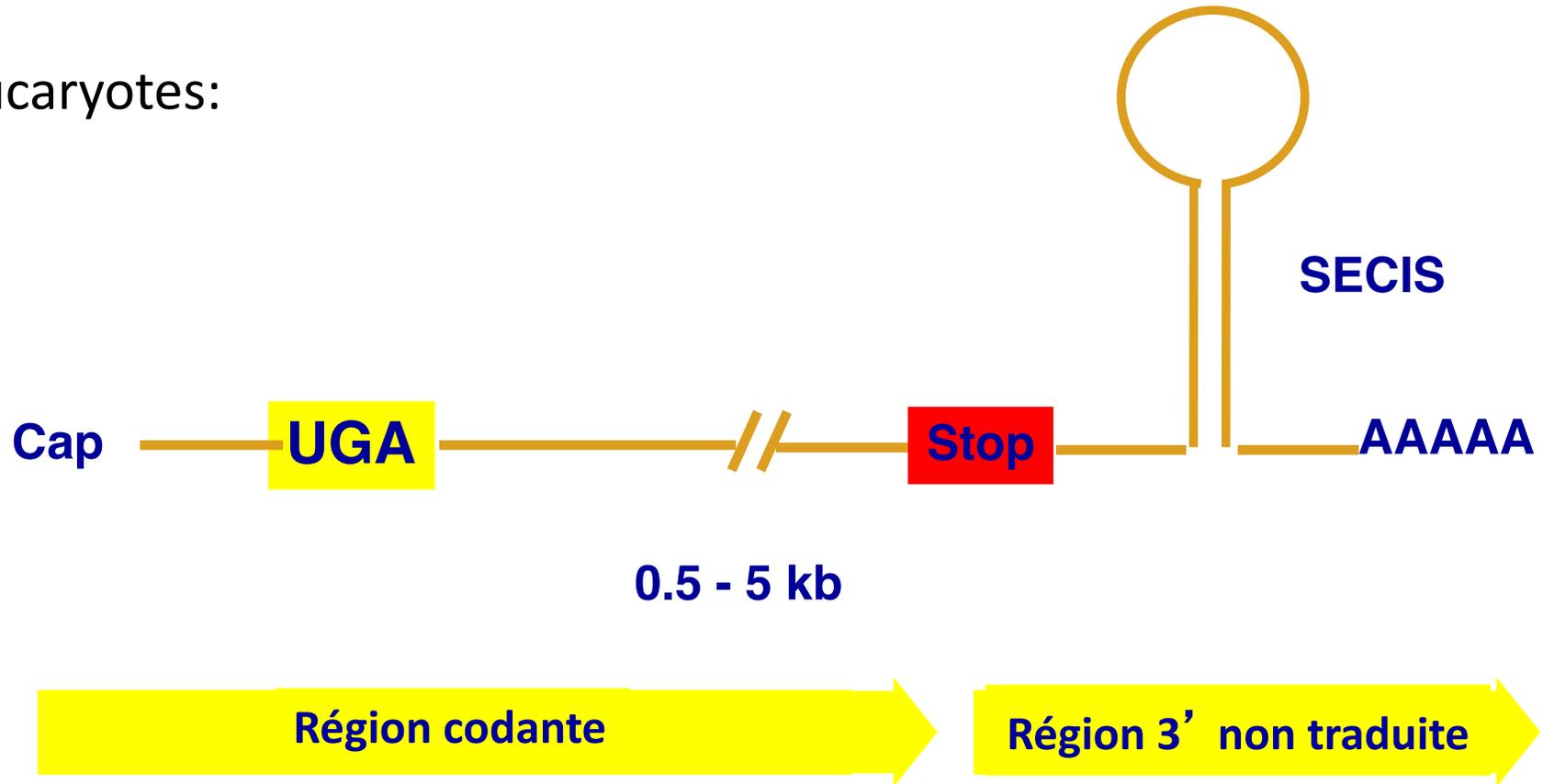


Structure d'ARN SECIS chez coli

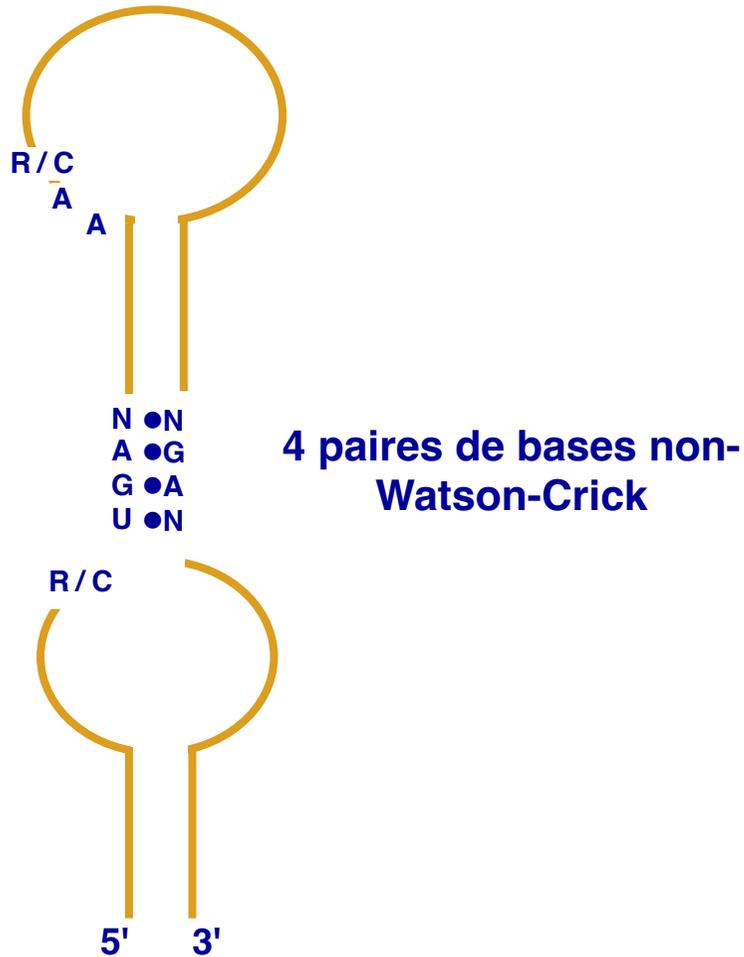


E. coli

Eucaryotes:

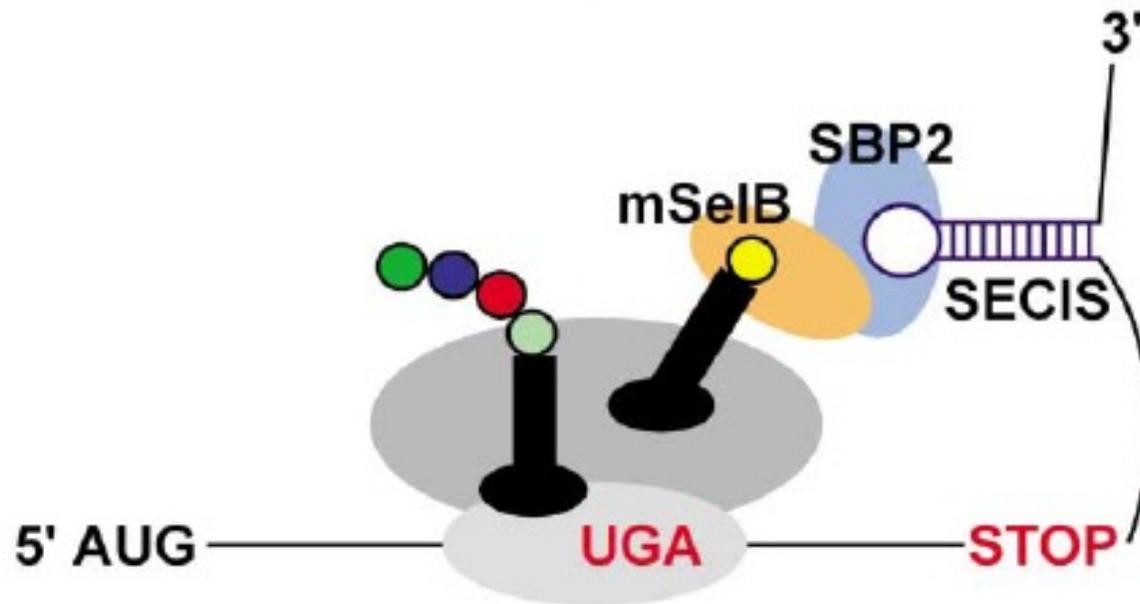


Structure d'ARN SECIS chez les eucaryotes



Eucaryotes

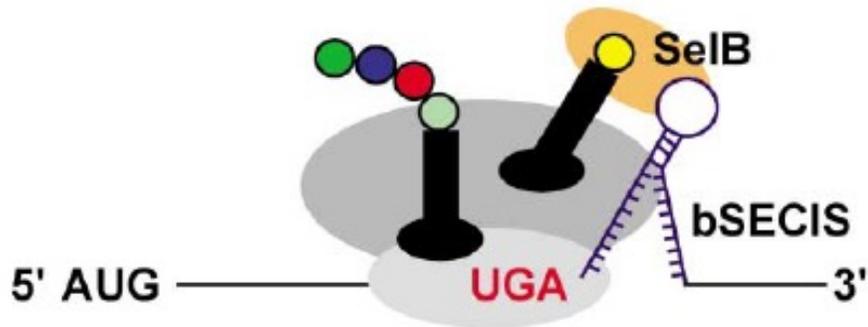
Mécanisme SECIS eucaryotes



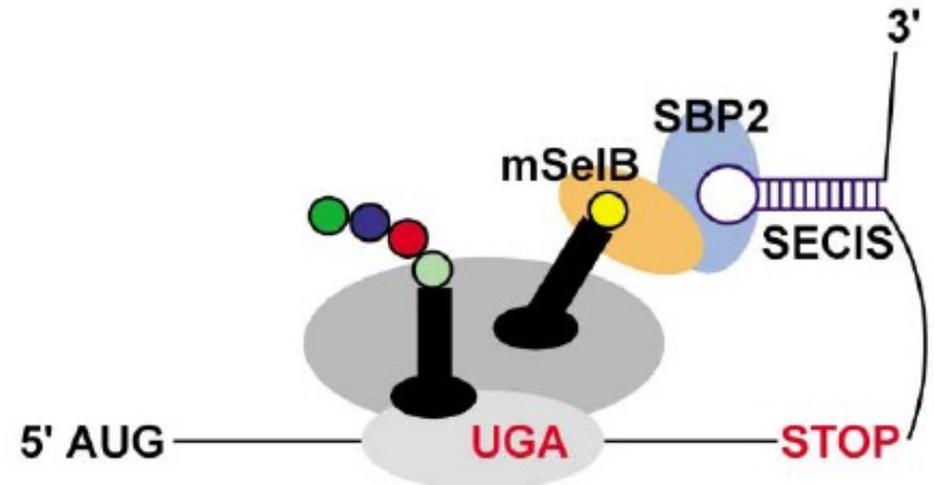
Comparaison procaryotes/eucaryotes

A

Bacteries



Eucaryotes



Nonsense-Mediated mRNA Decay

NMD

NMD : surveillance des ARNm

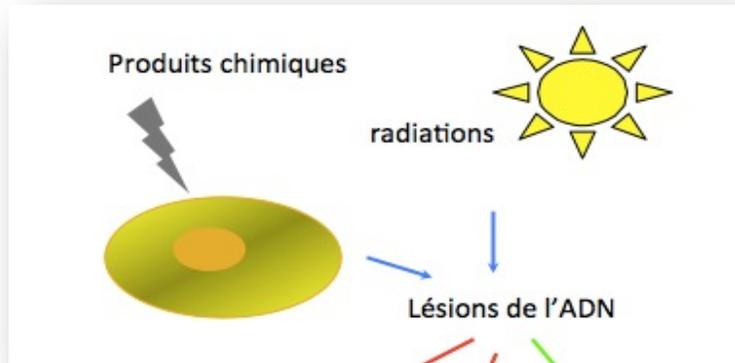
- Un des nombreux mécanismes post-transcriptionnels qui sont utilisés par les cellules eucaryotes pour contrôler la qualité des ARNm

Codon Terminal Prématuration (PTC)

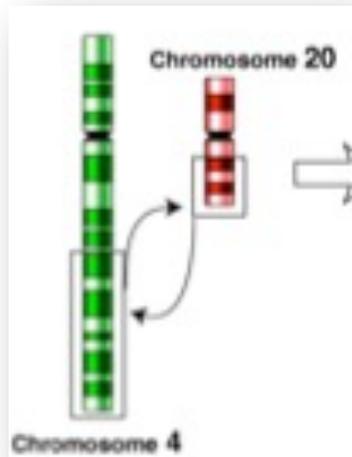
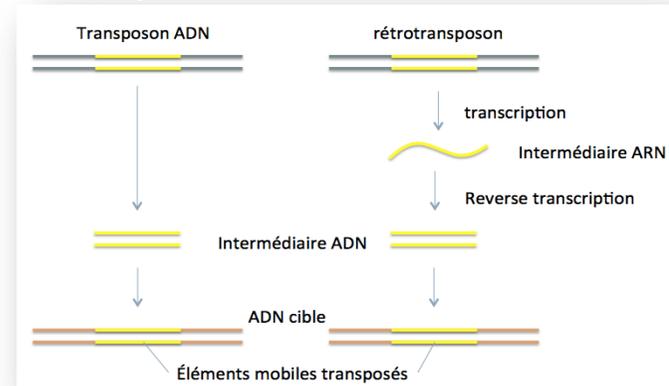
- Un codon Stop (UAA, UAG, UGA) localisé en amont du site de terminaison normal
- Provoque fin prématurée de traduction

Origine des PTC (vus dans cette UE)

Lésions>Mutations



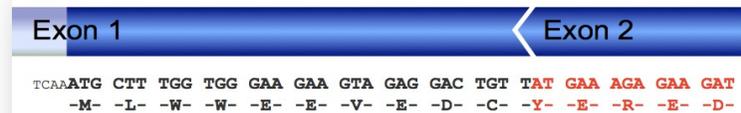
Transpositions



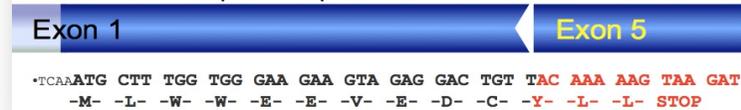
Réarrangements ADN

Défaut d'épissage

Normal:



Saut d'exon avec perte de phase:

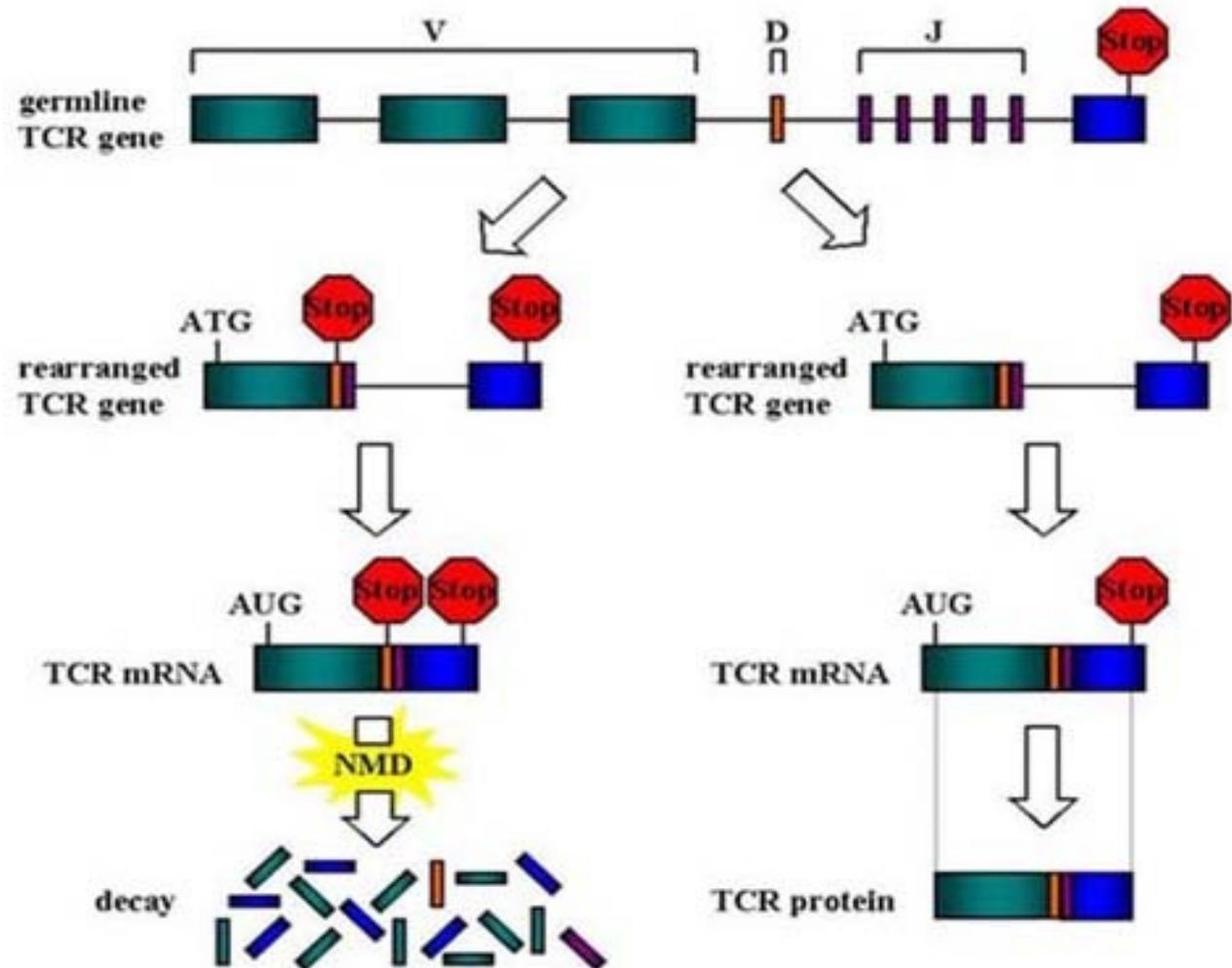


Aussi: certains réarrangements naturels de l'ADN

Exemple du locus TCR (T-cell Receptor)

Dans les lymphocytes T

Réarrangement
de l'ADN V+D+J



Fonction du NMD

- Le NMD dégrade les ARNm anormaux produits par des erreurs de transcription, d'épissage ou des mutations (souvent liées à des maladies).
- Le NMD évite la production de protéines tronquées nocives pour la cellule.
- Le NMD élimine aussi des substrats naturels comme certains ARNm alternativement épissés ou non.
- Le NMD régule ainsi l'expression normale des gènes

Mécanisme du NMD

Le NMD dépend de l'épissage

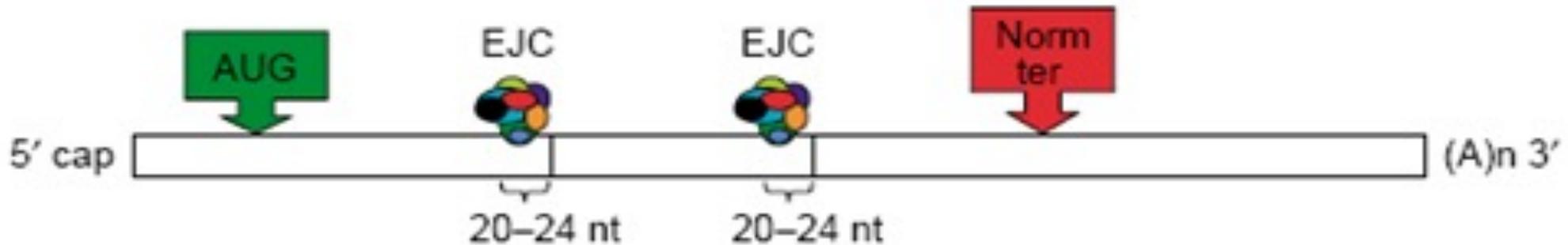
- Les mRNA des gènes sans introns ne sont pas soumis au NMD

Le NMD nécessite une traduction pour la reconnaissance du codon Stop

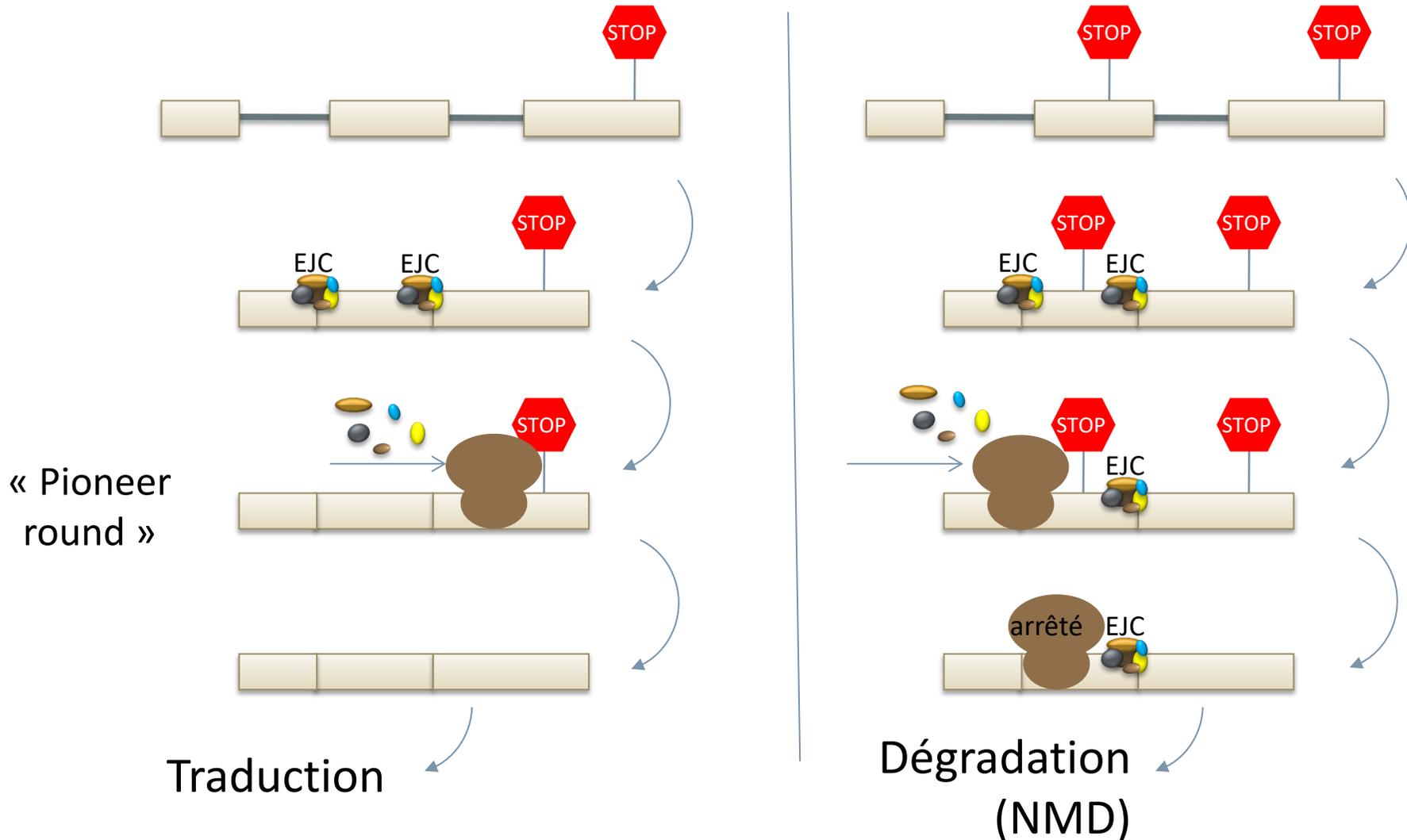
- Le NMD est inhibé par:
 - Les antibiotiques touchant les ribosomes en traduction (anisomycine, puromycine...)
 - L'infection par polio virus, qui inactive les facteurs d'initiation eIF4GI and eIF4GII.
 - Une structure secondaire dans le 5' UTR qui bloque le scanning par la sous unité 40S.
 - Les tRNA suppresseurs qui permettent l'incorporation d'aa aux PTC.

Le complexe de jonction d'exon (EJC)

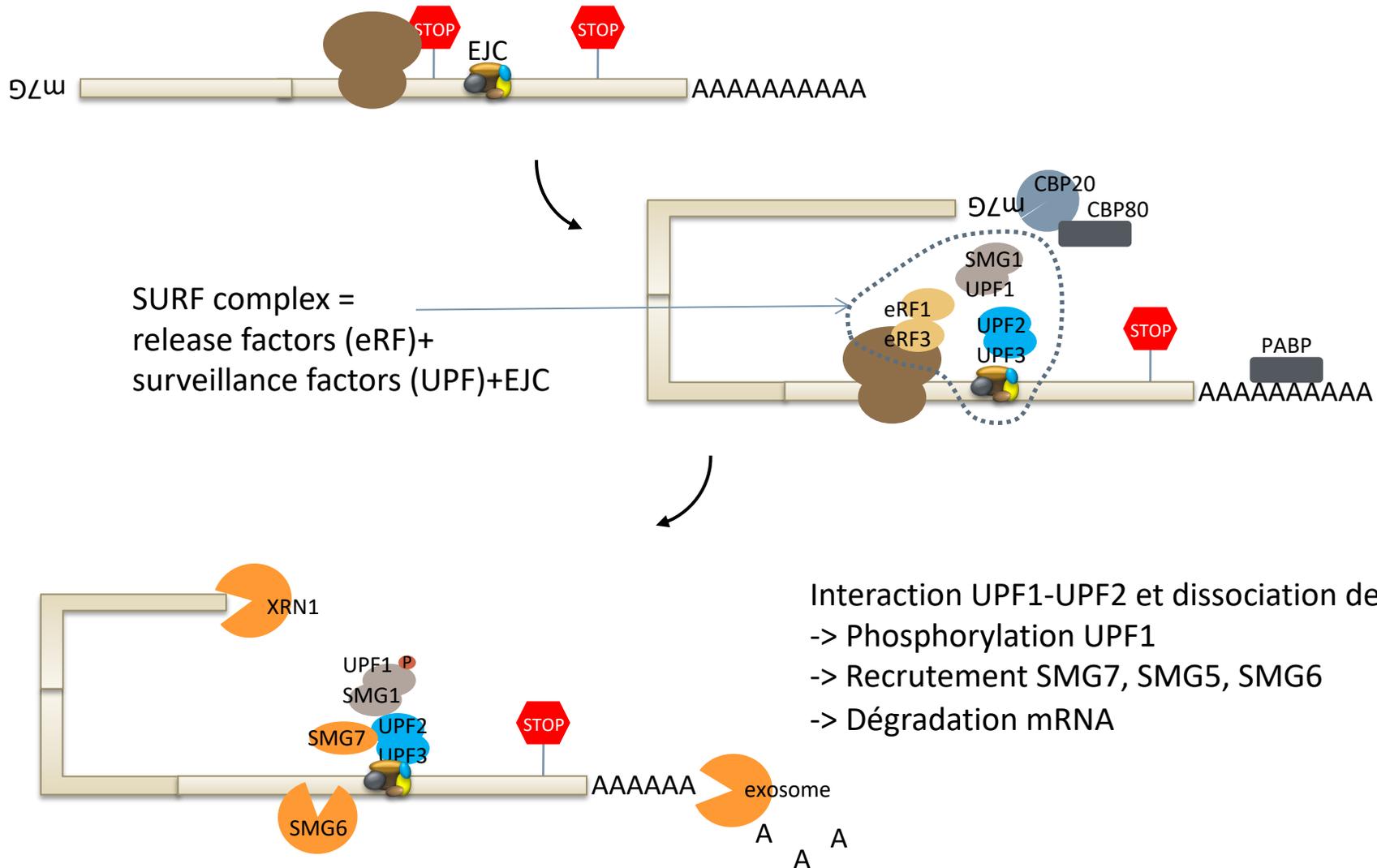
- Un complexe protéique déposé à la suite de l'épissage.
- Fixé à ~20–24 nucléotides en amont des jonctions exon–exon du mRNA nouvellement synthétisé.



Le concept du 1^{er} essai de traduction (pioneer round of translation)



Du ribosome bloqué à la dégradation



La dégradation des ARNm chez les mammifères

- Decapping
 - DCP1, DCP2
- Déadenylation
 - PARN (polyA-ribonuclease), CCR4
- 5'->3' exonucleases
 - XRN1, RAT1/XRN2
- 3'->5' exonucléases
 - Exosome (6 RNAses à domaine PH; 3 RNAses à domaine S1 et KH, un complexe RNASE D-like, une hélicase)

Environ 20% des ARNm alternatifs naturels sont sujets au NMD



Human

Statistics about the current GENCODE Release (version 41)

Protein-coding transcripts	88780
- full length protein-coding	63370
- partial length protein-coding	25410
Nonsense mediated decay transcripts	20933
Total mRNAs	109713

Le NMD est largement utilisé par les cellules de mammifères pour contrôler le niveau normal d'expression des mRNA

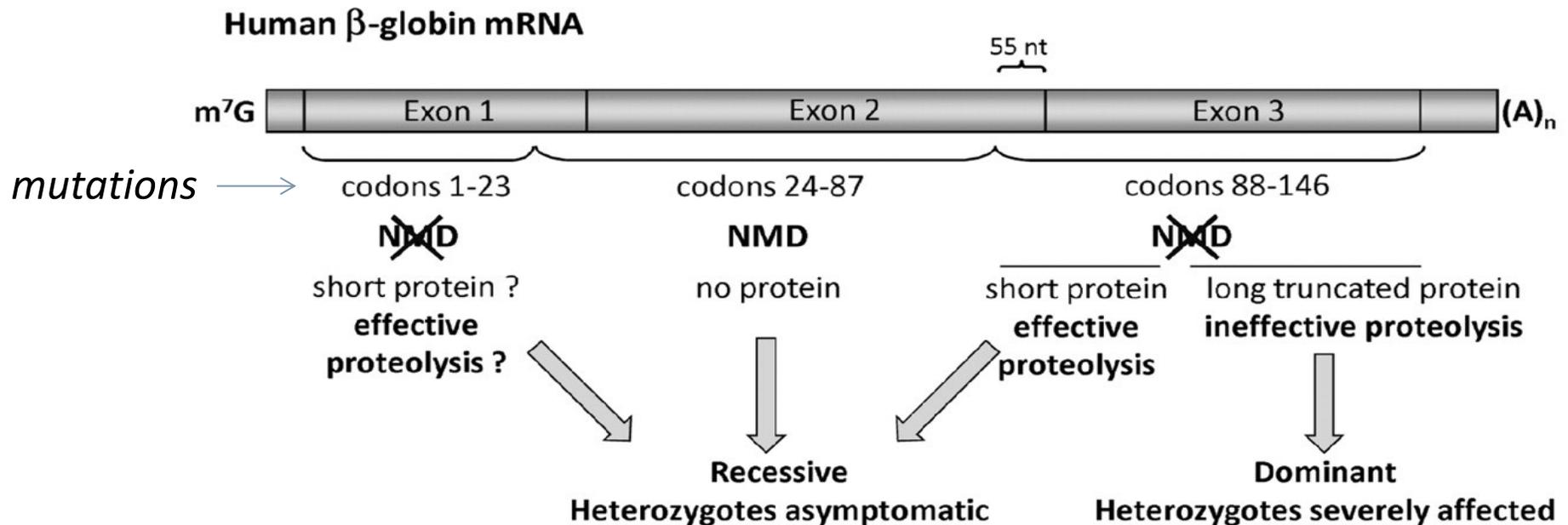
NMD et maladies humaines

Beta-thalassémie

- Anémie héréditaire causée par mutation dans le gène de β -globine
- Suivant l'endroit de la mutation: formes récessives ou dominantes

Le NMD contrôle le devenir des différentes formes du mRNA

Seuls les ARNm de taille intermédiaire sont soumis au NMD



Les protéines longues non-fonctionnelles saturent le système de protéolyse

Le syndrome de Marfan

- Maladie autosomale dominante des tissus conjonctifs: Dilatation de l'aorte, déplacement du cristallin, croissance anormale des os.
- Cause: mutations dans le gène Fibrilline 1 (FBN1) -> mauvais assemblage de la matrice extracellulaire.
- Les codons Stop associés à une forte réduction de l'abondance du mRNA provoquent un phénotype modéré.
- Les codons Stop associés à une abondance élevée de mRNA muté provoquent la forme grave du syndrome de Marfan.
- Le NMD est donc un puissant modulateur du syndrome de Marfan.