

Institut Villebon-Georges Charpak

Licence 1 Sciences et Technologies

Socle Biologie

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Partie 2



Alexis Faure

alexis.faure@universite-paris-saclay.fr

Martine Thomas

martine.thomas@universite-paris-saclay.fr

Sommaire

Objectifs de l'UE Socle Biologie	3
Organisation nucléaire	4
La réplication	6
La transcription	14
Code Génétique, traduction et biochimie des protéines	29
I. Le décryptage du code génétique	30
II. Le mécanisme moléculaire de la traduction	34
III. La synthèse des protéines à l'échelle de la cellule	45
IV. Notions élémentaires de biochimie des protéines	48
Travaux Pratiques	56
Planches techniques	59

L1 - UE socle Biologie -

L'Unité d'Enseignement « Socle Fondamental en Biologie » fait partie du bloc « Sciences Fondamentales et Appliquées » du semestre 1 de la licence Sciences et Technologies. Cette UE permet d'acquérir des savoirs et des savoir-faire fondamentaux en Biologie Cellulaire et Moléculaire.

A l'issue du cours, l'étudiant sera capable de :

Connaître les grandes théories fondatrices de la biologie et les hypothèses sur l'origine de la vie (cours introductif)

- Enoncer et dater les théories fondatrices de la biologie contemporaine
- Expliquer simplement chacune de ces théories
- Expliquer les différentes hypothèses concernant l'émergence de la vie sur terre

Expliquer les mécanismes de la réplication, de la transcription et de la traduction (poly2)

- Citer les principales molécules impliquées dans ces différents mécanismes
- Connaître et représenter le déroulement spatio-temporel de ces différents mécanismes
- Connaître les techniques expérimentales permettant d'étudier ces mécanismes (but, principe, limites)

Décrire l'organisation de la cellule eucaryote et les fonctions associées aux différentes structures cellulaires (Poly 1)

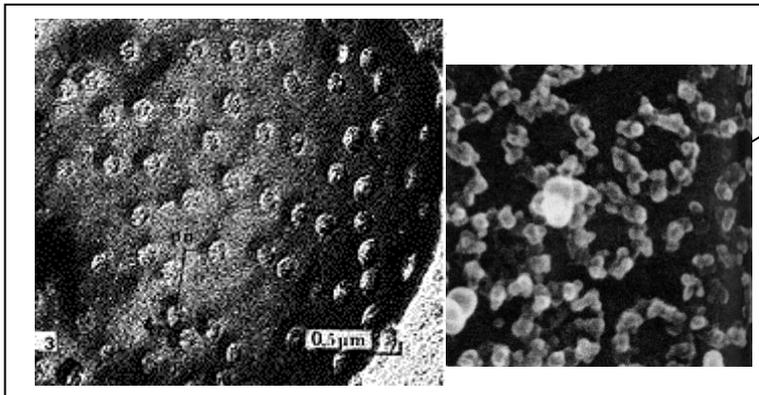
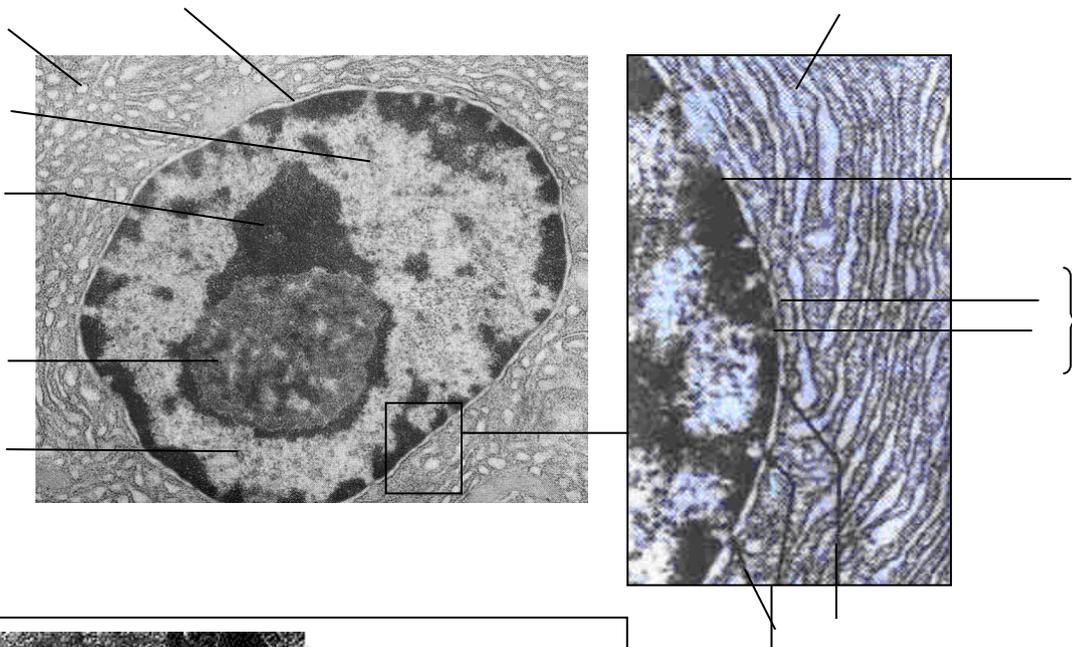
- Distinguer les grands types d'organisation cellulaire
- Reconnaître les différents compartiments cellulaires, les structures subcellulaires des cellules eucaryotes sur des clichés de microscopie ou des schémas
- Etablir les relations connues entre compartiments, structures subcellulaires et fonctions biologiques
- Analyser et interpréter les résultats expérimentaux obtenus à l'aide des techniques élémentaires de biologie cellulaire et moléculaire, formuler à partir de ces données des conclusions ou des hypothèses

Décrire les principaux mécanismes de la régulation de la succession des phases du cycle cellulaire, intégrer des explications biochimiques (partie Andrea Cottignies-Calamarte)

- Expliquer, en donnant des exemples empruntés à l'étude du cycle cellulaire, comment des modifications chimiques des protéines peuvent conduire à des modifications de fonction de ces dernières
- Décrire et interpréter des expériences ayant permis de mettre en évidence la présence de facteurs de régulation présents à certaines phases du cycle cellulaire
- Décrire les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans le passage d'une phase à l'autre du cycle cellulaire, dans la surveillance du cycle
- Donner des exemples de mécanismes impliqués dans la régulation de la dynamique du cytosquelette au cours du cycle cellulaire
- Donner des exemples de mécanismes impliqués dans la régulation de la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire

Organisation nucléaire

Q1. Légendez les photos ci-dessous avec les termes suivants: espace périnucléaire, euchromatine, membrane nucléaire interne, hétérochromatine, réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire, pore nucléaire, membrane nucléaire externe, nucléoplasme, cytoplasme, nucléole



Q2. Par quelles techniques ont été obtenues ces images ?

Q3. Quels sont les composants de la chromatine ?

Q4. Légendez les photos et schémas ci-dessous avec les termes suivants : hétérochromatine, euchromatine, octamère d'histones, fibres de chromatine, protéines non histones, nucléosome, histone H1, ADN.

l'organisation de la

Q5. Quelle est l'unité de base de chromatine ?

11 nm

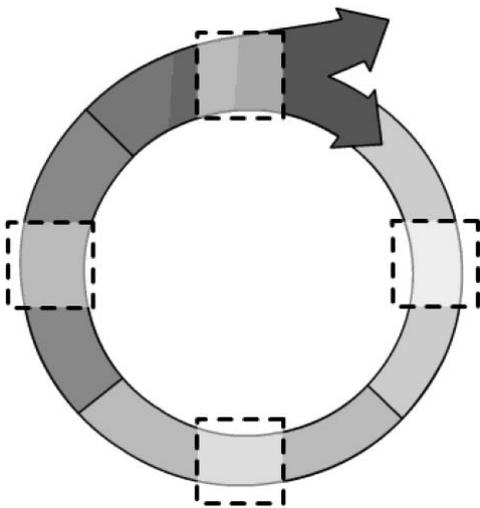
La Réplication

1- La chromatine pendant la phase S du cycle cellulaire

a- Rappels : Qu'est-ce que la phase S ?

Légendez le cycle cellulaire ci-dessous, en plaçant les noms des phases :

Quelles sont les principales fonctions cellulaires associées à ces phases ? :



b- L'ADN de cellules d'œufs de *Drosophila melanogaster* en phase S est isolé puis observé au microscope (photo « ADN de cellules en phase S »). En parallèle, de l'ADN contrôle est isolé à partir de cellules de même type au cours d'autres phases du cycle (photo « ADN contrôle »).



ADN de cellules en phase S

0,8µm



ADN contrôle

Q1. Quel type de microscope a-t-on utilisé pour obtenir ces images ? Quelle information vous permet de vérifier ce point ? Justifier votre réponse.

Q2. Commenter ces images

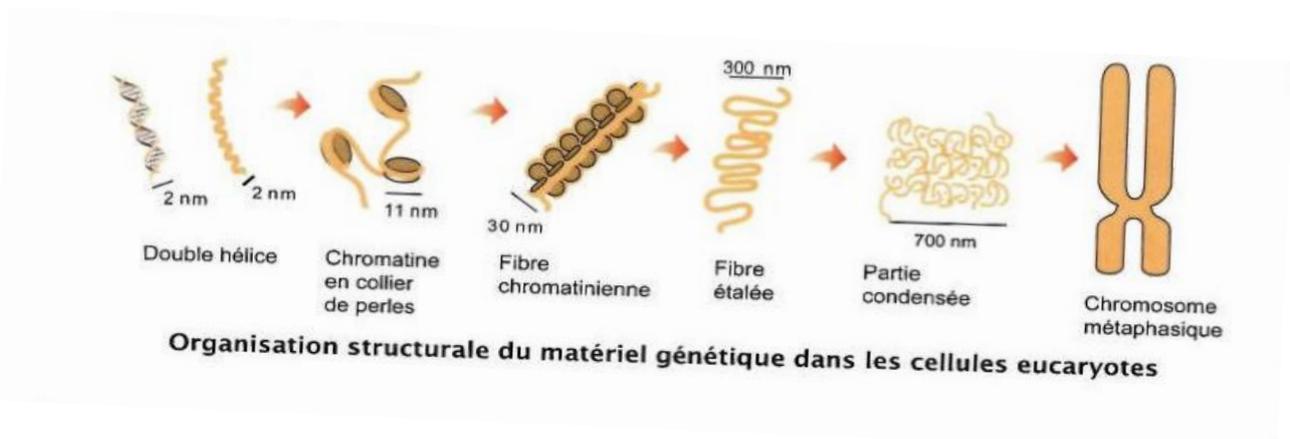
2- La structure de l'ADN

Visionner la vidéo de 12'30 à 30'30

<https://www.youtube.com/watch?v=4Bkfvoqu1oc>

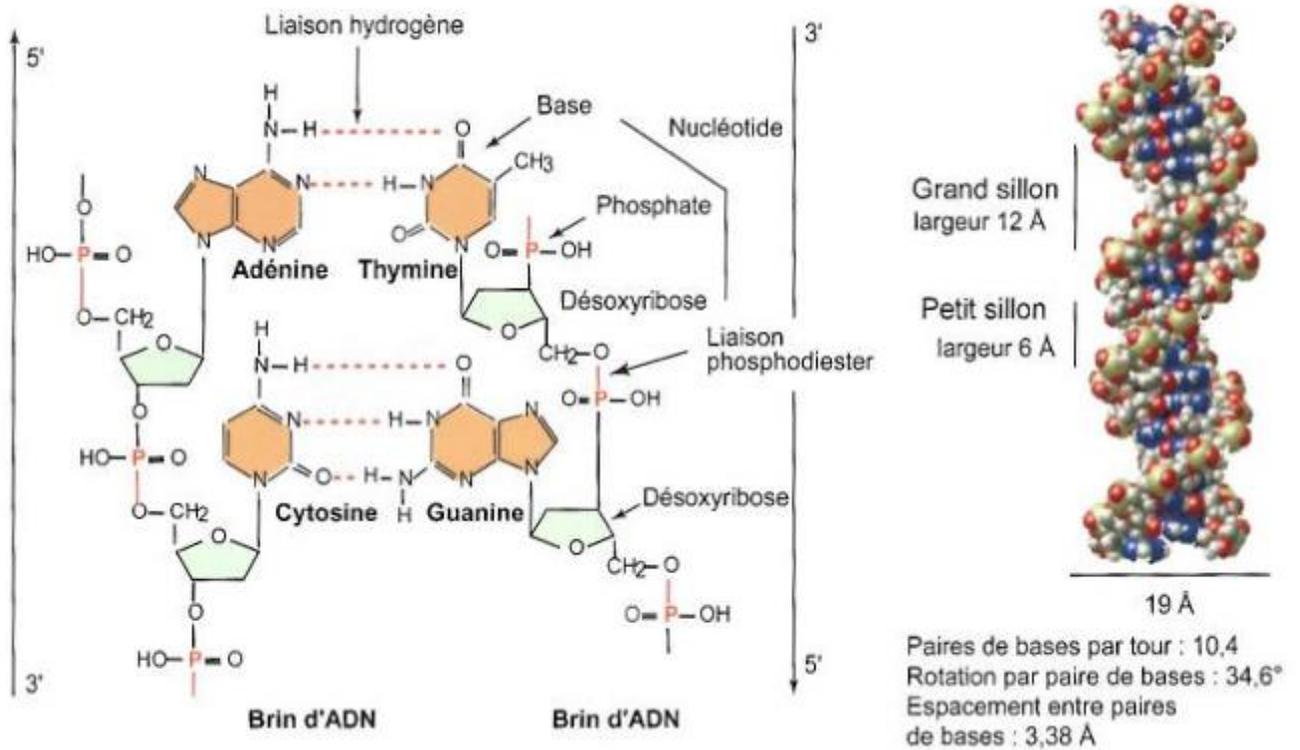
Rappel :

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est fortement replié au cours du cycle cellulaire par interaction avec des protéines structurales histones.



L'ADN est une macromolécule constituée par l'enroulement de 2 chaînes formées de l'assemblage de 4 nucléotides monophosphates, reliés par une liaison phosphodiester. Chaque nucléotide contient un groupement phosphate, un sucre de type désoxyribose et une base parmi

4 bases différentes : adénine, guanine, cytosine et thymine. Les 2 premières sont des bases puriques et les 2 dernières des bases pyrimidiques.
 L'enchainement des nucléotides conduit à la formation d'une chaîne vectorisée, décrite de l'extrémité 5'phosphate vers l'extrémité 3'OH (sens informationnel de la molécule)
 Les 2 chaînes s'enroulent l'une autour de l'autre selon 2 directions opposées et sont dites anti- parallèles. Elles prennent la conformation d'une double hélice, et sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les bases complémentaires.



3- Les techniques de marquage de la molécule d'ADN

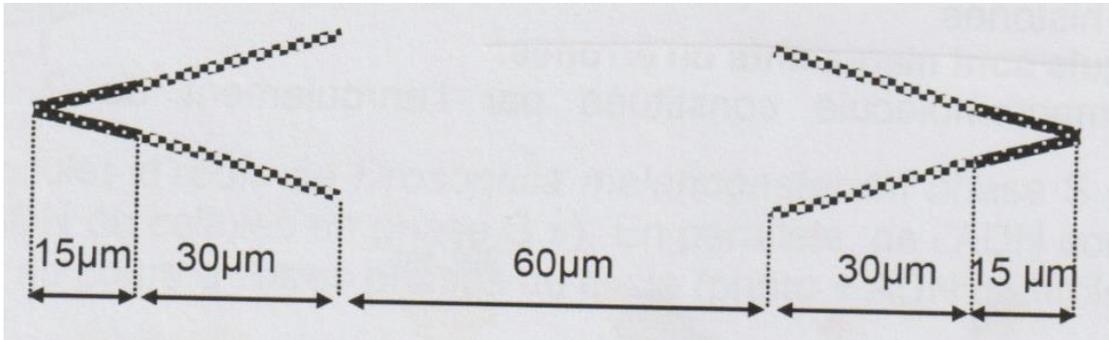
Voir les fiches techniques :

- Fiche Techn. n°3 : **Utilisation des radio-isotopes en Biologie**
- Fiche Techn. N°4 : **L'autoradiographie**
- Fiche Techn. N°5 : **Le Pulse-Chasse**

Quels types de précurseurs doit-on utiliser si on veut étudier l'ADN, l'ARN ?

4- Visualisation de la réplication au niveau de la fibre chromatinienne

Une culture de cellules animales est incubée pendant 30 min avec de la ^3H -thymidine à faible activité spécifique, puis pendant 15 min avec de la ^3H thymidine à forte activité spécifique. Les cellules sont immédiatement fixées, les noyaux sont purifiés, les molécules d'ADN sont extraites, déprotéinisées puis étalées sur des lames de microscope et traitées pour l'autoradiographie. Le résultat peut être schématisé de la façon suivante :



Q1. Quelle molécule la ^3H thymidine met-elle en évidence dans cette expérience ?

Q2. Quelle est la condition pour qu'elle soit incorporée ?

Q3. Quelle caractéristique de la réplication peut-on tirer de l'observation de cette image ?

Q4. Localiser sur ce schéma l'origine de réplication et les fourches de réplication

5- Mécanisme de la réplication

Pour une vue générale du mécanisme (en 3D et en anglais):

<https://www.youtube.com/watch?v=TNKWgcFPHqw>

Pour une présentation un peu plus classique mais en français (canadien)

<https://www.youtube.com/watch?v=5TJ685bT8-g>

Q1. Essayez de retrouver les grandes étapes du mécanisme de la réplication.

Q2. Avez-vous compris le mécanisme ? Alors, que se passe-t-il au niveau d'un œil de réplication ?

a) Schématiser les 2 brins des molécules en cours de réplication en indiquant leur polarité

b) Légender ce schéma (brin tardif, brin précoce, fragments d'Okazaki, amorce ARN).

c) Indiquer par une flèche le sens de progression de la fourche de réplication

d) Positionner l'ADN polymérase

e) Indiquer les régions radioactives



Q3. Quelle est la vitesse de déplacement de la fourche de réplication (en μm et en pb / min, sachant que la distance entre 2 paires de bases est de 0,34 nm) ?

Q4. Quelle est la longueur d'ADN répliqué par le fonctionnement d'une fourche de réplication pendant la phase S (durée 5 h pour ces cellules) *rappel vitesse d'une fourche soit 1 μm / min*

Q5. Sachant que dans ces cellules, la longueur moyenne de l'ADN contenu dans un chromosome est de 4,2 cm, **combien d'origines de réplication sont, en moyenne, présentes sur un chromosome de ces cellules ?**

Q6. Après addition de cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique) à la culture cellulaire, on remarque un arrêt de la réplication au bout de quelques heures. **Comment expliquez-vous ce phénomène ?**

Q7. En observant l'autoradiographie de l'ensemble de la lame, on peut observer le résultat suivant pour une molécule d'ADN :



Localiser la ou les origines de réplication. En partant de ou des origines indiquer le sens de déplacement des fourches de réplication.

Q8. A partir de l'autoradiographie peut-on dire si la réplication est synchrone à partir des différentes origines de réplication ?

6- Et si la molécule d'ADN était circulaire ?

Essayez de transposer le mécanisme général de la réplication vu précédemment dans la situation où la molécule d'ADN serait circulaire et ne porterait qu'une seule origine de réplication.

Schématisez

- un stade où la réplication vient de débiter
- un stade où la moitié de la molécule est déjà répliquée

La Transcription

En guise d'introduction, nous vous proposons de visionner cette vidéo générale des mécanismes de transcription et traduction :

From DNA to protein 3D : <https://www.youtube.com/watch?v=gG7uCskUOrA>

Dans les années 1950, on savait que l'ADN était situé dans le _____ des cellules eucaryotes, qu'il spécifiait la séquence des acides aminés des protéines, mais que les protéines étaient synthétisées dans le _____ de ces cellules. Une des questions importantes pour les biologistes de l'époque était de comprendre comment l'information génétique pouvait passer de l'ADN aux protéines. On suspectait alors la présence d'un intermédiaire véhiculant l'information entre l'ADN et les protéines.

Les exercices 1-4 vous permettront de comprendre comment les chercheurs ont mis en évidence le rôle de l'ARN comme intermédiaire dans le transfert de l'information génétique entre l'ADN et les protéines.



Les exercices 5 et 6 vous permettront de comprendre comment l'ADN est transcrit en ARN et comment l'ARN (l'ARNm) est modifié pendant et après la transcription.

Un code couleur vous indique la difficulté des exercices proposés.

- En vert les exercices simples.
- En orange les exercices de difficulté moyenne.
- En rouge les exercices qui demandent un peu plus de réflexion.

N.B. Quelle que soit la difficulté, tous ces exercices sont de niveau L1. Ces indications sont destinées à vous permettre une meilleure auto-évaluation.

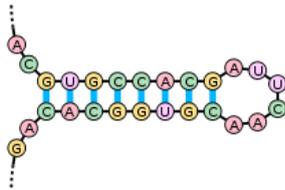
Ces exercices sont complétés par des sections encadrées qui correspondent à des notions théoriques (notions de cours). Il s'agit dans toutes ces sections de notions de niveau L1. Les paragraphes *en italiques* correspondent à des notions complémentaires ; tout le reste correspond à des informations que nous considérons comme incontournables, notions que vous devrez donc parfaitement connaître à l'issue de cet enseignement.

Moment de cours N°1 : Structure et types d'ARN

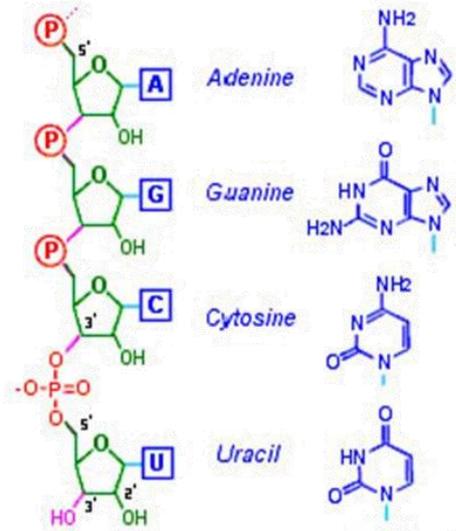
L'ARN est un polymère constitué d'un enchaînement de nucléotides. Chaque nucléotide contient un groupe phosphate, un sucre à 5 carbones (le ribose) et une base azotée. Les nucléotides sont liés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester. On trouve quatre bases azotées dans l'ARN : l'adénine, la guanine, la cytosine et l'uracile. L'ARN est un acide nucléique (acide ribonucléique) différent de l'ADN: il contient du ribose (le 2'OH rend la molécule moins stable), pas de thymine mais de l'uridine, il est simple brin (sauf exceptions).

On distingue aujourd'hui différents types d'ARN (tous synthétisés dans le noyau) :

- ARNm (ARN messager – cytoplasme)
- ARNt (ARN de transfert impliqué dans la traduction - cytoplasme)
- ARNr (ARN ribosomal, constituant des ribosomes - cytoplasme)
- mi ARN (micro ARN, contrôle de l'expression des ARNm –cytoplasme)
- de petits ARN, en particulier les snRNA (noyau)

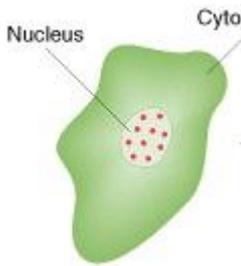


L'ARN peut former des structures secondaires (résultant d'appariements internes), en particulier la tige-boucle présentée ci-dessus.



Exercice 1 : Où l'ARN est-il synthétisé ? Expérience de marquage à l'uridine ^3H (ou uridine tritiée)

Lorsque des cellules vivantes sont incubées pendant un temps bref (3-10 minutes) en présence d'uridine tritiée, lavées, fixées, puis soumises à une analyse par autoradiographie, l'observation en microscopie optique montre le type d'image présenté ci-dessous.

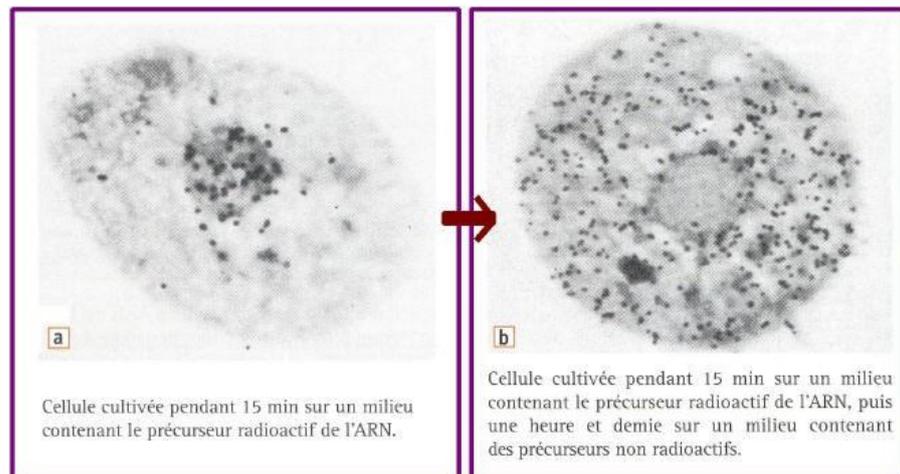


Résultat obtenu après marquage à l'uridine tritiée et histo-autoradiographie de cellules eucaryotes. Les points rouges figurent la position des grains d'argent réduits sur la préparation.

Q. Comment interpréter ce résultat expérimental?

Exercice 2 : Que devient l'ARN nouvellement synthétisé ? Expériences de « pulse-chase » en présence d'uridine tritiée

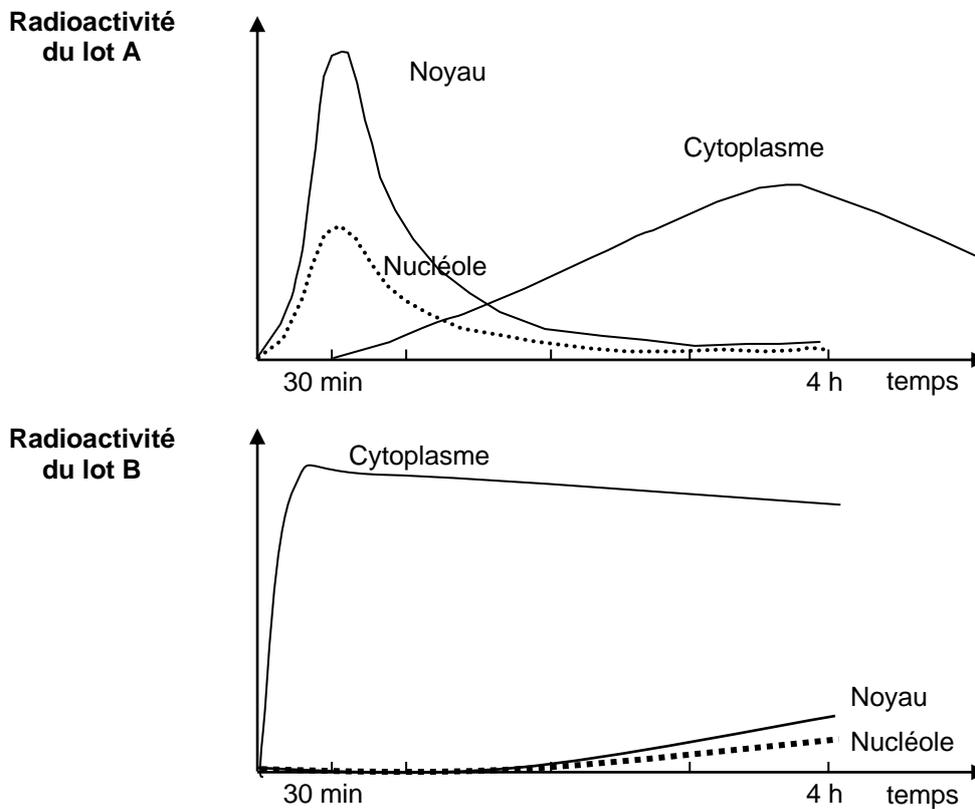
Des expériences de « pulse-chase » (planche technique n°5) avec de l'uridine tritiée permettent de déterminer le lieu de synthèse et de suivre le devenir des ARN dans les cellules eucaryotes. Ces expériences sont généralement menées en réalisant un pulse court de 2 à 3 minutes (incubation avec de l'uridine radiomarquée) et, après lavage, des temps de chasse compris entre 15 minutes et 1 heure en présence d'uridine non marquée. Les résultats classiquement obtenus sont représentés sur la figure ci-dessous.



Q. Comment interprétez-vous ces résultats? Est-ce compatible avec le rôle d'intermédiaire de l'ARN dans le transfert de l'information génétique ?

Exercice 3 : Quelle est la cinétique des différents événements ? Une expérience de marquage *in vivo*

De la cytosine tritiée a été injectée aux rats d'un lot appelé A et de la leucine tritiée aux rats d'un lot B. Après avoir sacrifié les animaux à des intervalles de temps variés, le foie a été prélevé, des coupes ont été préparées à partir du tissu hépatique, soumises à l'action de la DNase puis une autoradiographie a été effectuée. Les grains d'argent ont été comptés dans les compartiments suivants : noyau (nucléole exclu), nucléole, cytoplasme. Les résultats obtenus pour les 2 lots sont résumés par les courbes ci-dessous :



Q1. Quelle est la nature probable des macromolécules radioactives ?

Q2. En analysant les courbes ci-dessus, que peut-on déduire sur les lieux de formation et les voies de migration de ces macromolécules ?

Q3. Quelle structure permet la communication noyau/cytoplasme?

De quoi est-elle formée ?

Quels types de molécules sont ainsi exportées / importées du noyau ?

Q4. Quels sont les rôles, fonctions des structures suivantes :

Pore nucléaire :

Lamina :

Nucléole :

Moment de cours N°2: les ARN polymérases

Transcription = synthèse d'ARN à partir d'une matrice ADN

Trois moments peuvent être distingués: initiation, élongation, terminaison

Trois ARN-polymérases eucaryotes ont été mises en évidence. Elles diffèrent par leur localisation dans le noyau, par la nature des ARN formés et par leur sensibilité à des inhibiteurs tels que l' α -amanitine.

- ARN-polymérase I dans le nucléole pour les ARNr 45s (précurseur des ARN 5,8S ; 18S et 28S), est insensible à l' α -amanitine
- ARN-polymérase II dans le nucléoplasme pour les ARNm, est sensible à l' α -amanitine
- ARN-polymérase III dans le nucléoplasme pour les ARNt, ARNr 5S et pour les petits ARN, elle est également sensible à l' α -amanitine mais à hautes doses.

L' **α -amanitine** (tirée de l'amanite phalloïde) se fixe sur certaines sous-unités de l'ARN-polymérase et inhibe l'élongation de la transcription.

L'**actinomycine D** inhibe la transcription eucaryote et procaryote en s'intercalant entre certaines bases de l'ADN pendant l'élongation.



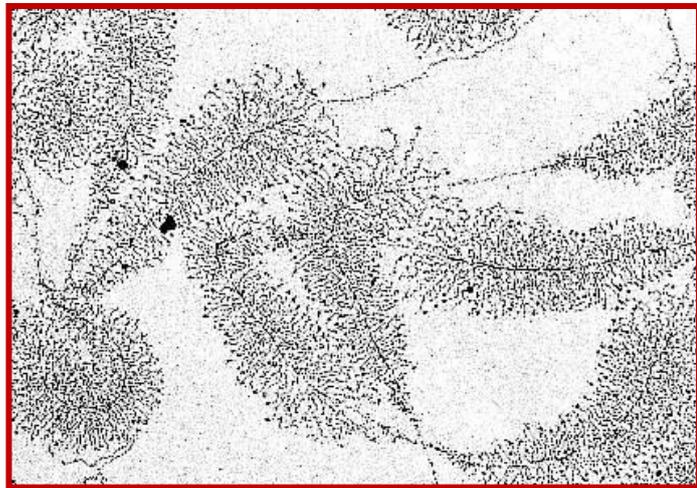
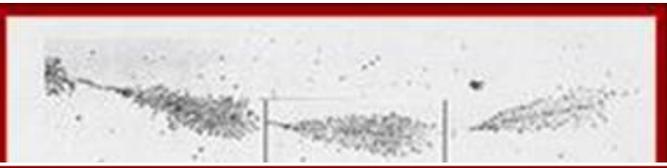
Pour en savoir plus sur l'initiation de la transcription :

<https://www.youtube.com/watch?v=fOl7IrNuOnk>

Exercice 4 : Peut-on visualiser un gène en cours de transcription ? Expériences d'observation de l'ARNr (ARN ribosomique) en microscopie électronique

Les noyaux d'ovocytes d'amphibiens contiennent de nombreux nucléoles. Ce modèle a été utilisé dans les années 60 pour étudier la transcription chez les eucaryotes. Des expériences de marquage à l'uridine tritiée suivies d'observation en microscopie montrent que les nucléoles sont le siège de synthèses d'ARNr.

Des expériences de microscopie électronique à fort grossissement et avec une préparation particulière des ovocytes ont été réalisées dans l'objectif de visualiser des gènes en cours de transcription. Les images obtenues montrent des structures en forme de sapins de Noël (ou d'arêtes de poissons ou arbre de Miller) assez caractéristiques, dont les branches sont absentes suite à un traitement à la RNase. Par ailleurs, un traitement à la DNase dissocie les structures en sapins de Noël dont il ne reste que les « branches ».



Q. Comment interprétez-vous les images obtenues ?

Faire un schéma en positionnant :

- ARN (noter les extrémités 5' et 3')
- ADN (noter les extrémités 5' et 3')
- ARN polymérase
- le sens de transcription

Exercice 5 : Quel est le brin transcrit ? Transcription *in vitro* plus séquençage

Les méthodes de séquençage des ADN et des ARN ont permis de déterminer quel brin d'ADN est transcrit. Voici l'exemple classique de la séquence du gène de la bêta-galactosidase d'*E. coli* et de celle de son ARNm.



Séquence d'ARNm (surlignée en rose) synthétisée à partir d'une matrice d'ADN double brin correspondant au gène codant pour la bêta-galactosidase d'*E. coli*. Les séquences des deux brins d'ADN sont surlignées en vert.

Q. Que montre cette figure présentant l'alignement des séquences d'ADN et d'ARNm ?

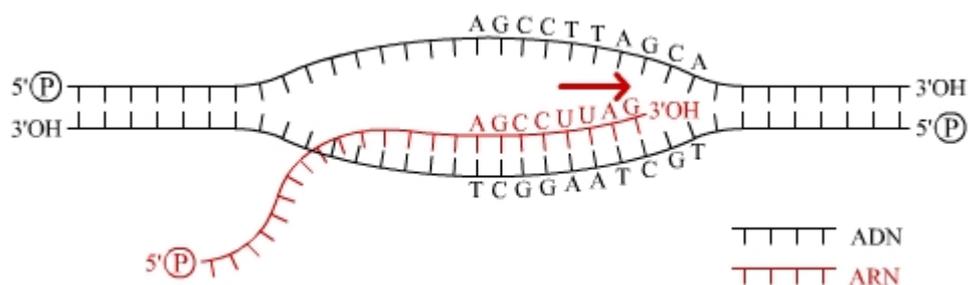
Complément :

L'ARN polymérase parcourt le brin matrice ou antisens (template strand) -qui est complémentaire du brin sens- de 3' vers l'extrémité 5'. Ce brin matrice est placé en bas de la figure ci-dessus.

Elle synthétise un brin d'ARN dont la séquence est complémentaire au brin matrice/antisens (en haut de la figure), en commençant par l'extrémité 5' de l'ARN (elle allonge l'extrémité 3'OH).

Le brin d'ARN néosynthétisé est donc identique au brin sens/codant d'ADN, aux uraciles et riboses près.

N.B. Il suffit de lire la séquence d'ADN du brin sens/codant, de 5' vers 3', pour en déduire la séquence du transcrit de 5' vers 3'.



Moment de cours N° 3: Le promoteur et des facteurs de transcription assurent l'initiation et la régulation de la transcription de l'ADN

Question : Comment la transcription par l'ARN pol II est-elle initiée et régulée?

Pour visualiser cette étape :

<https://www.youtube.com/watch?v=fOI7lrNuOnk>

<https://www.dnalc.org/resources/3d/13-transcription-advanced.html>

Contrairement à la réplication qui concerne la totalité du génome à chaque phase S, le programme de transcription est limité et variable : seules de petites portions du génome sont transcrites à un moment donné de la vie de la cellule et ces portions varient en fonction du type cellulaire, du développement, de l'environnement, *etc.* On comprend ainsi qu'il existe des mécanismes de régulation de la transcription, à commencer par ceux qui se mettent en place au moment de l'initiation de la transcription par l'ARN-polymérase II dans la région du promoteur. Nous aborderons ici le mécanisme de l'initiation de la transcription et sa régulation par les facteurs et co-facteurs de transcription.

a) Promoteur minimal et autres régions régulatrices de la transcription

Si on lit la séquence d'ADN sur le brin codant de 5' vers 3', alors les régions d'ADN situées dans la région 5' d'une région transcrite correspondent au **promoteur**.

Le promoteur est une région d'ADN qui détermine le site d'initiation de la transcription par les ARN polymérases et permet la régulation de la fréquence avec laquelle les ARN polymérases vont venir initier la transcription.

La région du promoteur comporte des séquences consensus. On trouve généralement :

- La TATA box (= boîte de Hogness) entre -30 et -25, elle est présente dans environ 80% des promoteurs.
- L'INR box à partir du +1 et présente dans environ 60% des promoteurs.
- La GC box optionnelle
- La CAAT box optionnelle

La TATA box et l'INR box forment le promoteur minimal au niveau duquel se fixe l'ARN-polymérase II via les facteurs généraux de transcription.

Les promoteurs eucaryotes ont une structure modulaire. On peut trouver des séquences activatrices jusqu'à quelques centaines de bases en amont du site d'initiation ; parmi elles, la GC box et la CAAT box sont relativement fréquentes.

Ces séquences activatrices sont en fait très variables et sont présentes en nombre variable suivant le promoteur. Ces boîtes constituent les sites de fixation des facteurs de transcription et permettent la modulation de l'activité du promoteur.

En dehors du promoteur minimal, des séquences spécifiques de l'ADN, appelées « **enhancers** » lorsqu'ils recrutent des facteurs de transcription activateurs (facteurs trans-régulateurs), ou « **silencers** » lorsqu'ils recrutent des facteurs de transcription inhibiteurs de la transcription peuvent être situés à des milliers de nucléotides du promoteur minimal et agissent au niveau de ce dernier par le jeu de courbures de l'ADN.

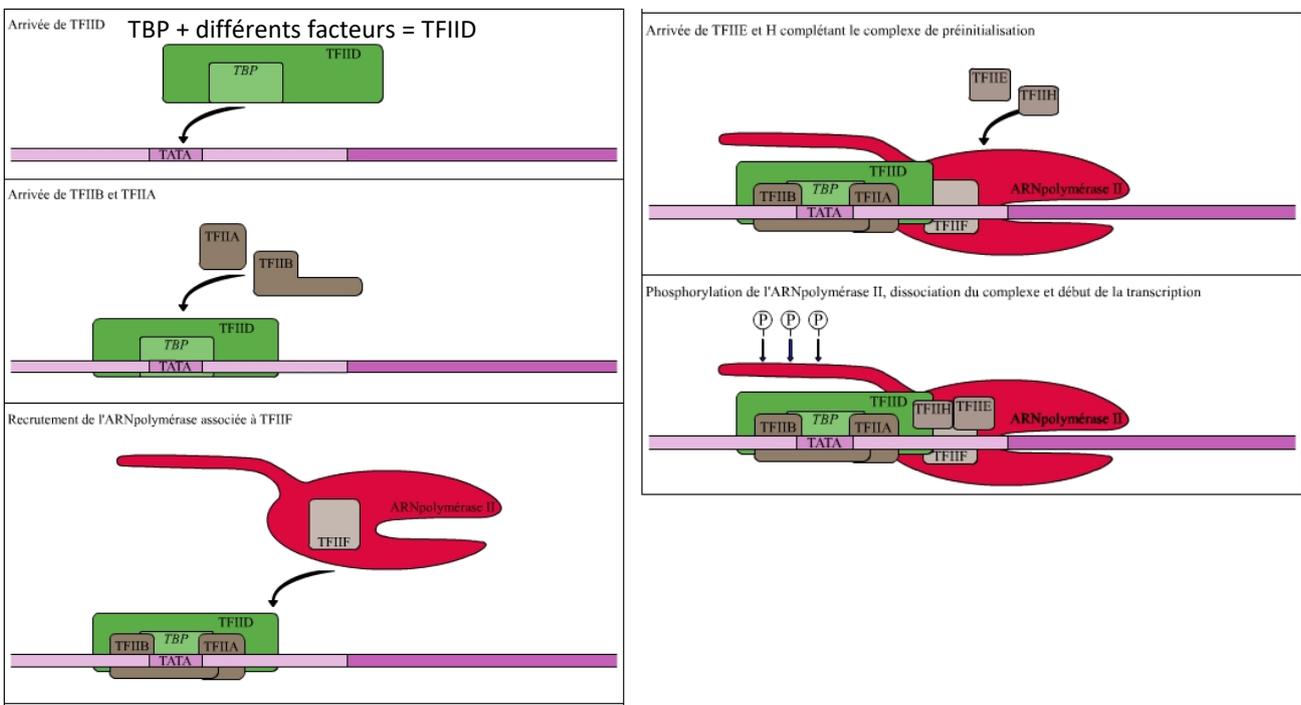
Le terminateur au niveau de l'ARN est constitué de la séquence AAUAAA suivie par un site de clivage environ 20 nucléotides en aval, puis d'une séquence DSE (DownStream Element) qui est une séquence riche en G/U.

b) Les facteurs généraux de la transcription et l'ARN pol II forment un complexe

L'ARNpol II des eucaryotes ne reconnaît pas seule le promoteur. Elle effectue cette fonction en s'associant à de nombreux co-facteurs protéiques qui se recrutent les uns les autres et qui forment avec elle et le promoteur un **complexe de pré-initiation de la transcription**. Ces facteurs protéiques sont notés TFIIA, TFIIIB, etc... pour « Transcription Factor for RNA polymerase II ». Ils correspondent aux **facteurs généraux de la transcription** car ils s'assemblent sur tous les promoteurs utilisés par l'ARNpol II (voir la figure ci-dessous). La liaison du complexe de transcription au promoteur proximal provoque l'ouverture et le déroulement des deux brins de son ADN, tout en spécifiant le brin qui va être transcrit et le **site d'initiation de la transcription** par l'ARN-polymérase (noté « +1 »).

- TFII D (=TBP + d'autres protéines) interagit avec l'ADN du promoteur et plus spécifiquement à la TATA box lorsqu'elle existe. Il permet une courbure de l'ADN.
- *TFII A interagit avec l'ADN en amont de la TATA box.*
- *TFII B interagit avec l'ADN en aval de la TATA box au niveau du site d'initiation qu'il détermine.*
- *TFII F agit lors de l'élongation.*
- *TFII H possède plusieurs activités dont une activité hélicase et une activité kinase qui sert à phosphoryler l'ARN-polymérase II au niveau de son domaine C-terminal (CTD, pour carboxy-terminal domain). Cette phosphorylation entraîne une modification de la structure 3D de l'ARN polymérase provoquant la dissociation du complexe d'initiation et le début de la transcription: la polymérase parcourt alors l'ADN matriciel. Une déphosphorylation est nécessaire pour permettre une nouvelle pré-initiation.*

Lorsque la transcription est initiée, l'ARN pol II parcourt l'ADN matrice et synthétise un ARN : la régulation de la transcription se joue essentiellement au moment de l'initiation.



Formation séquentielle du complexe de pré-initiation

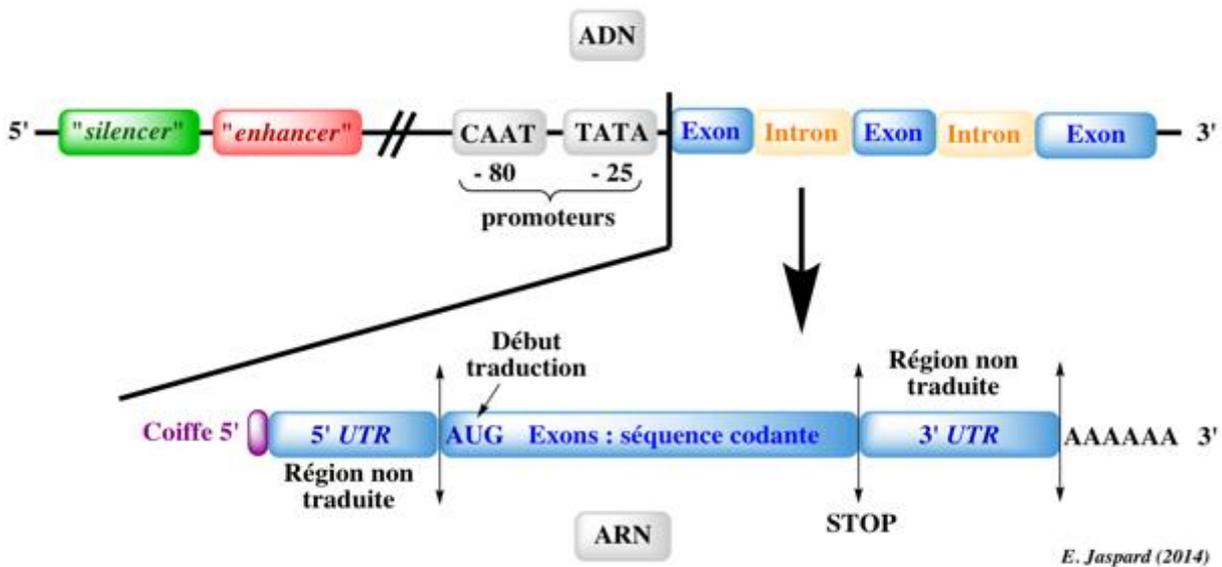
c) les facteurs de transcription trans-régulateurs de la transcription se fixent sur des séquences d'ADN cis-régulatrices

De courtes séquences de nucléotides des promoteurs, des enhancers et des silencers (éléments cis-régulateurs) sont reconnues par une classe de protéines (facteurs trans-régulateurs) dont la structure permet une liaison avec l'ADN. Ces facteurs trans-régulateurs (activateurs ou inhibiteurs de la transcription) jouent sur l'initiation de la transcription au niveau du promoteur.

A côté des éléments cis essentiels et présents dans la plupart des promoteurs, il existe beaucoup de ces éléments cis régulateurs qui permettent la fixation de facteurs trans-régulateurs de la transcription.

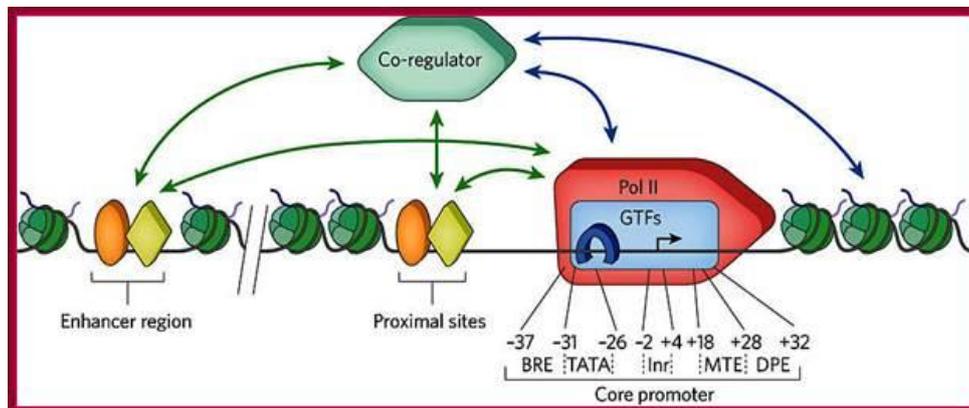
La fixation des facteurs protéiques trans-régulateurs sur les éléments d'ADN cis-régulateurs peut dépendre:

- de signaux qui parviennent à la cellule (certains facteurs de transcription sont activés par des hormones comme l'insuline ou des seconds messagers comme l'AMP cyclique).
- du type cellulaire (certains facteurs de transcription ne sont présents que dans certains types cellulaires et permettent une transcription différente d'un même gène dans différents tissus).



Question : comment les facteurs de transcription peuvent-ils activer ou réprimer la transcription des gènes ?

Réponse :



Moment de cours N° 4: la maturation des transcrits de l'ARN pol II

Question: que deviennent les pré-ARNm?

Maturation des transcrits primaires

Les pré-ARNm désignent les produits bruts de la transcription de l'ARN-polymérase II (les produits de la transcription des autres ARN-polymérases sont aussi soumis à des modifications post-transcriptionnelles et sont appelés pré-ARNr, pré-ARNt...).

La maturation des pré-ARNm a lieu dans le noyau de la cellule. Seuls des ARNm matures passent dans le cytosol.

a) Addition co-transcriptionnelle de la coiffe en 5' (ou capping)

Elle a lieu au début la transcription (durant l'élongation) avant que la chaîne ne compte plus de 30 nucléotides. Elle consiste en l'ajout d'un nucléotide à guanine sur l'extrémité 5' de l'ARN (établissement d'une liaison 5'-5' tri-phosphate) suivi de sa méthylation sur l'azote 7 de la base (ainsi que de la méthylation en 2' du ribose des un ou deux premiers nucléotides du transcrit primaire). L'extrémité 5' de l'ARNm est ainsi porteuse d'un m7G.

Cette modification :

- limite la réactivité de l'extrémité 5' et sa reconnaissance par les exonucléases (protection contre la dégradation).
- est nécessaire à l'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme
- est nécessaire à la liaison de l'ARNm avec la petite sous-unité du ribosome lors de l'étape d'initiation de la traduction.

La coiffe est ajoutée grâce à un complexe protéique appelé « Cap-Binding-Complex » (possédant une activité triphosphatase, une activité guanylyl-transférase et une activité méthyl-transférase).

b) Poly-adénylation en 3' par la poly-A polymérase

La poly-adénylation correspond à l'ajout de 200-250 adénines à l'extrémité 3' du transcrit primaire par la poly-A-polymérase (sans matrice ADN).

Lorsque l'ARN polIII transcrit une séquence signal très conservée AAUAAA (AATAAA sur le brin d'ADN sens), cette séquence de l'ARN est reconnue par le complexe CPSF (cleavage/polyadenylation specificity factor).

Une séquence DSE (DownStream Element) riche en U ou en GU située à quelques dizaines de nucléotides en aval est reconnue spécifiquement par un complexe protéique appelé CstF (Cleavage Stimulation Factor). Ces deux complexes et d'autres composants, comme l'ARN polymérase II et la poly(A) polymérase, forment alors un gros complexe de clivage qui va couper le transcrit avant que la poly-A-polymérase ajoute une queue poly A à l'extrémité 3' OH ainsi générée. Cette queue poly(A) confère de la stabilité au futur ARNm et se perd au fur et à mesure qu'il est traduit.

Enfin, l'ARN PolIII se sépare du pré-ARNm.

Excision des introns et épissage des exons (ou splicing)

Pour une vue générale du mécanisme d'épissage :

https://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw_pQ

Un transcrit primaire eucaryote se compose d'exons (des régions qui seront traduites pendant la traduction), entrecoupés d'introns (régions non-codantes). En plus de la fixation de la coiffe et la polyadénylation, le transcrit primaire est soumis à l'excision des introns et l'épissage des exons; les introns sont éliminés. L'excision-épissage commence pendant la transcription et s'achève en périphérie du noyau.

Au niveau de l'ARN, le mécanisme implique (voir figure A ci-dessous):

- un **site donneur d'épissage** (dinucléotide GU) à l'extrémité 5' de l'intron
- une Adénine qui constituera le **site de branchement** au milieu de l'intron
- un **site accepteur d'épissage** (dinucléotide CAG) à l'extrémité 3' de l'intron

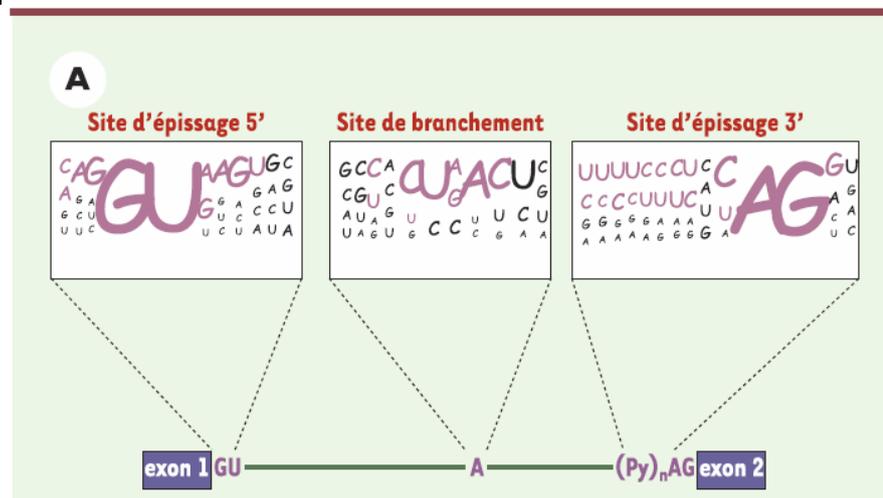


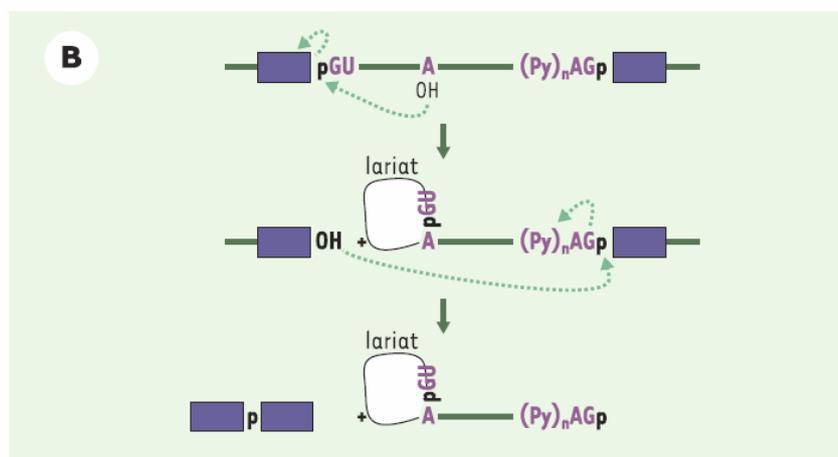
Figure A: séquences d'ARN

impliquées dans

l'excision/épissage. Les rectangles représentent les exons, et les traits pleins les introns. (Py)_n : étendue de pyrimidines avant le site accepteur (ou site d'épissage 3') généralement constitué du dinucléotide AG. Le site donneur (ou site d'épissage 5') est généralement constitué du dinucléotide GU.

Figure B : mécanisme de l'épissage d'un

transcrit primaire. L'épissage du transcrit primaire se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de trans-estérification. Lors de la première étape, le groupement 2' hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque un phosphate du site donneur. Cette réaction engendre une extrémité 3' OH libre de l'exon 1 et la formation d'une structure en lasso interne à l'intron (« lariat »). Lors de la deuxième étape, le 3' OH de l'exon 1 attaque un phosphate du site accepteur à la jonction intron-exon 2, permettant ainsi l'épissage (la jonction) des deux exons et la libération du lasso (intron) qui sera dégradé par des ribonucléases.

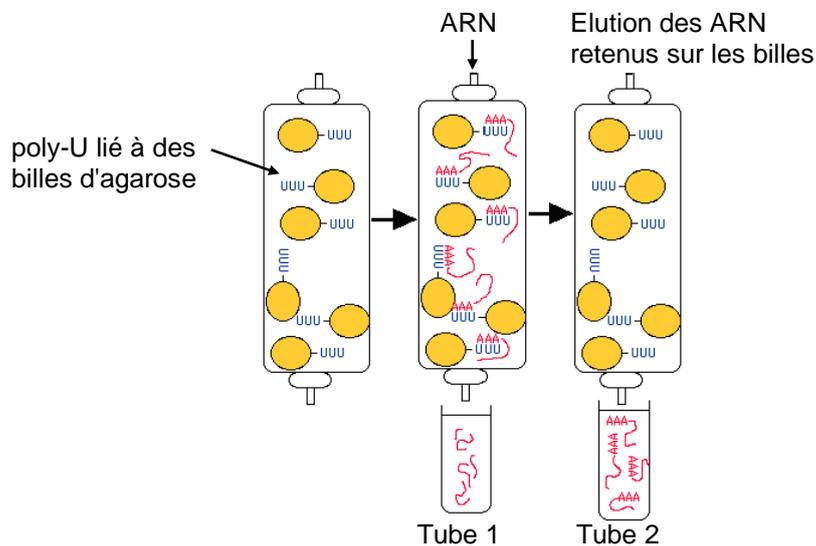


L'épissage est rendu possible par la formation d'un complexe catalytique nommé **spliceosome**. Le spliceosome complet est constitué de cinq ribonucléoprotéines (ARN + protéines) nucléaires différentes appelées **snRNP** (« small nuclear ribonucleoprotein »). Chacune d'elles est constituée d'un petit ARN nucléaire associé à plusieurs protéines. La formation du spliceosome est séquentielle et passe par l'incorporation des snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 ainsi que de nombreuses protéines accessoires. Il s'agit d'un mécanisme complexe en plusieurs étapes qui n'est pas présenté ici.

Exercice 6 : la transcription des gènes varie-t-elle selon le type cellulaire, le stade de développement, les conditions environnementales... ? Une expérience d'hybridation moléculaire avec de l'ARN radiomarqué

De l'uridine tritiée a été injectée à des poulets. Au bout de 4 h, les animaux ont été sacrifiés et les ARN ont été isolés à partir des hématies ou des muscles.

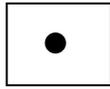
Ces 2 préparations d'ARN ont subi la purification suivante :



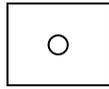
Q1. Quels types d'ARN récupère-t-on dans le tube 1 ?

Q2. Quels types d'ARN récupère-t-on dans le tube 2 ?

5 µl d'une solution d'ADN dénaturé (molécules correspondant à un fragment d'ADN purifié contenant le gène codant la globine) ont été déposés sur deux membranes. Ces membranes ont été hybridées avec des ARNs récupérés dans le tube 2 ; La membrane 1 a été hybridée avec des ARNs isolés d'hématies, la membrane 2 avec des ARNs isolés de muscle. Les résultats de l'autoradiographie sont schématisés ci-dessous :



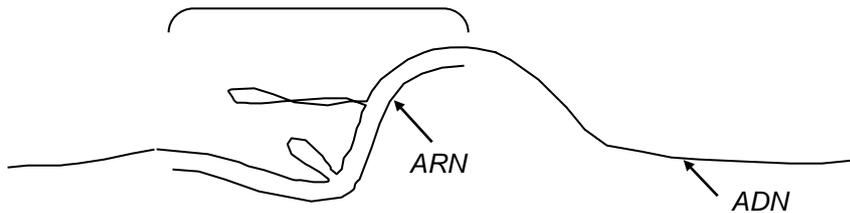
membrane 1



membrane 2

Q3. Pourquoi observe-t-on un signal autoradiographique avec les ARNs isolés d'hématies et pas avec les ARNs isolés de muscle ?

Dans un tube à essai, la molécule d'ADN du gène de globine de poulet est chauffée, ce qui sépare ses deux brins (dénaturation de l'ADN). On ajoute ensuite l'ARNm correspondant à ce même gène. L'ARN peut alors établir des liaisons faibles avec l'un des brins d'ADN du gène (le brin antisens) quand sa séquence de nucléotides lui est complémentaire : on dit que l'ADN et l'ARN s'hybrident. Les molécules hybrides ADN/ARN sont ensuite observées au microscopique électronique à transmission (MET). L'image obtenue est schématisée ci-dessous :



Q4. Identifier sur ce schéma, la molécule d'ADN et la molécule d'ARN. Pourquoi les deux molécules ne sont-elles pas totalement appariées ?

Q5. Schématiser la structure du fragment d'ADN délimité par le crochet.

Code génétique, traduction et biochimie des protéines



En 1958, le jeune biochimiste Marshall Nirenberg écrivait dans l'un de ses cahiers de laboratoire **“Could crack life’s code !”**. Dix ans plus tard, le prix Nobel de médecine, reçu avec Robert Holley et Har Gobind Khorana, venait récompenser sa contribution décisive dans le programme de décryptage du code génétique : Nirenberg avait brillamment réussi son audacieux pari.

Au-delà de la description de l’expérience ingénieuse de Nirenberg qui a initié une vaste entreprise de décryptage du code génétique, l’objectif des deux premières parties de cet enseignement est de vous permettre de comprendre comment l’information génétique transcrite sous la forme d’un ARNm intermédiaire (TD transcription) peut être traduite sous la forme d’une séquence d’acides aminés.

Autrement dit, **il s’agit ici de comprendre comment s’effectue le passage ARN->Protéine et en particulier quel est le code génétique* utilisé par les organismes vivants.**

La troisième partie de ce chapitre permettra de comprendre **dans quels compartiments cellulaires se déroulent la synthèse et la maturation des protéines**. Comment des protéines synthétisées dans le cytosol ou à la surface du réticulum endoplasmique peuvent-elles se retrouver dans un autre compartiment, voire à l’extérieur de la cellule ?

La dernière partie de ce chapitre aborde **des notions élémentaires de biochimie des protéines**, des bases essentielles pour comprendre le fonctionnement de la cellule à l’échelle moléculaire mais aussi pour comprendre les méthodes d’analyse utilisées par les biologistes, en particulier l’électrophorèse et le Western Blot.

** Le code génétique définit la correspondance entre la séquence nucléotidique des ARNm (et donc celle de l’ADN) et la séquence en acides aminés des protéines.*

Cet enseignement comportera donc 4 parties :

- I. Le décryptage du code génétique**
- II. Le mécanisme moléculaire de la traduction**
- III. La synthèse des protéines à l’échelle de la cellule**
- IV. Notions élémentaires de biochimie des protéines**

I. Le décryptage du code génétique

Au tournant des années 1960, de nombreux biologistes étaient convaincus que l'information génétique était contenue dans la molécule d'ADN et traduite en protéines. Au fil des expériences publiées dans la littérature scientifique, émergeait peu à peu l'hypothèse que cette information était d'abord transcrite sous la forme d'un intermédiaire ARN.

L'un des tous premiers partisans de cette hypothèse fut le prix Nobel Francis Crick qui, en septembre 1957, l'exposa de façon convaincante au cours d'une communication au congrès de la *Society for Experimental Biology* à Londres. Le « dogme central » (*DNA*->*RNA*->*Protein*) dont parla Crick ce jour-là se rapportait précisément à ce flux d'information passant de l'ADN, à l'ARN puis aux protéines.

Au cours de la conférence, Crick précisa:

" [T]he specificity of a piece of nucleic acid is expressed solely by the sequence of its bases, and [...] this sequence is a (simple) code for the amino acid sequence of a particular protein."

Pour Crick et ses collègues, la question qui devait être résolue était de savoir comment l'information constituée par les séquences nucléotidiques pouvait être traduite en séquences de 20 acides aminés différents, autrement dit comment 20 acides aminés pouvaient être spécifiés par 4 signes différents, ou encore comment passer d'un langage à 4 signes (ATCG ou AUCG) à un langage à 20 signes (20 acides aminés) ?

Un calcul simple indique qu'*a priori* 2 bases successives d'un acide nucléique ne peuvent pas spécifier un acide aminé car les doublets de bases ne représentent que 16 combinaisons différentes ($4^2=16$). Trois bases successives d'un acide nucléique représentent en revanche 64 combinaisons ($4^3 = 64$), ce qui est largement suffisant mais pose aussi un problème de redondance du code. Georges Gamow, un brillant physicien très intéressé par la Biologie avait déjà fait ce petit calcul au milieu des années 1950. Intéressé par la question du code, Gamow avait réuni dès 1954 un club de 20 scientifiques (autant que d'acides aminés), le « RNA Tie Club » dont le but était de réfléchir au code. Marshall Nirenberg ne faisait pas partie du club.

1) The Poly-U Experiment (1961)

En 1961, Marshall Nirenberg et Heinrich Matthaei présentèrent les résultats d'une expérience réalisée au NIH à Bethesda (USA) qui s'avéra décisive pour le décryptage du code génétique.

Sachant qu'il pouvait disposer d'un ARN ${}_{5'}\text{UUUUU}\dots\text{UUU}_{3'}$ (PolyU) synthétique, Nirenberg se demanda quelle séquence d'acides aminés pouvait résulter de la traduction d'un tel acide nucléique. Pour répondre à cette question il mit en œuvre une expérience très ingénieuse qui devait lui permettre de casser le premier mot du code génétique et initier un vaste programme de recherche de décodage.

L'expérience de Nirenberg

A un milieu constitué d'un extrait de *E. coli* (contenant tout ce qui est nécessaire à la traduction) réparti dans 20 tubes différents, Nirenberg ajoute à chaque fois du polyU et un seul type d'acide aminé radiomarqué.

Les tubes sont laissés à 37°C pendant 1 heure puis de l'acide trichloroacétique (TCA) est ajouté de façon à précipiter les polypeptides contenus dans les extraits.

Pour chaque tube, le précipité est passé sur un filtre qui permet de retenir les polypeptides et d'éliminer les acides aminés (marqués ou non) libres non incorporés.

La radioactivité du filtre est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

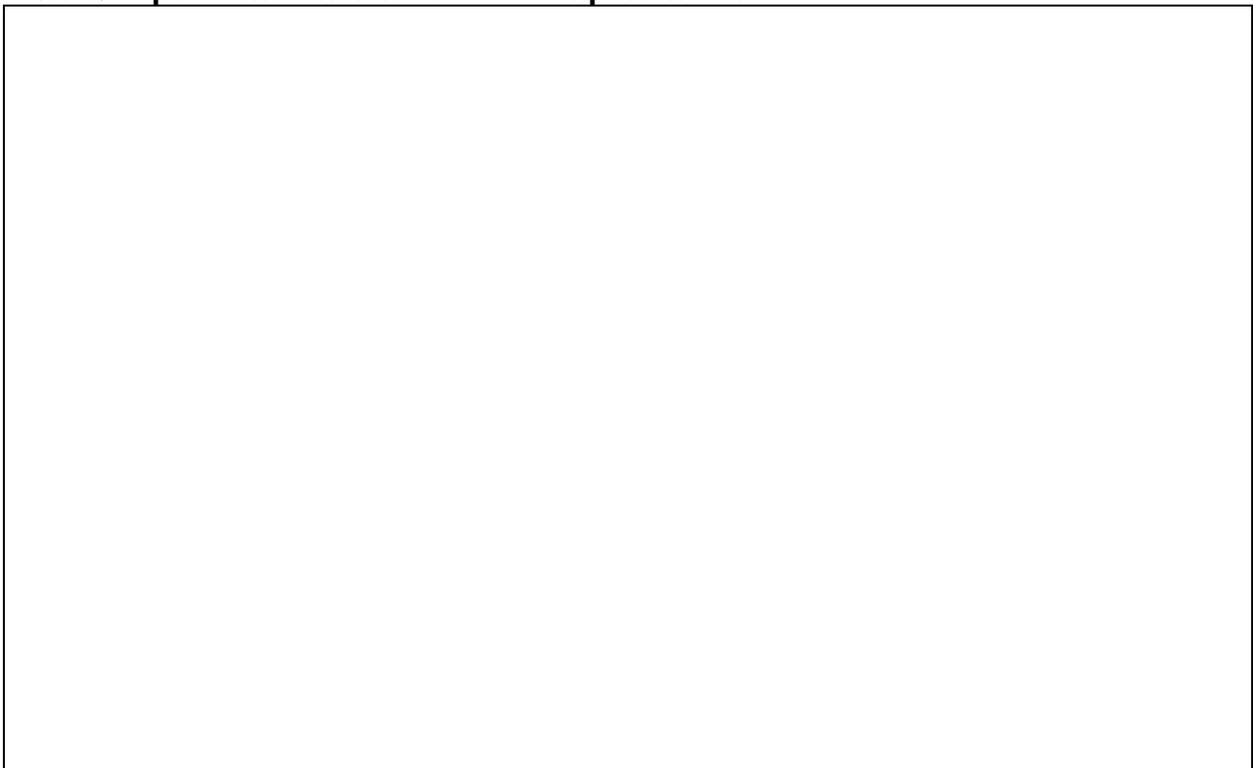
Les résultats montrent que seul le tube contenant l'extrait cellulaire, le polyU et de la phénylalanine radiomarquée permet de recueillir un précipité radioactif.

EXERCICE 1 : retrouver la correspondance séquence nucléotidique/séquence protéique, comprendre l'expérience de Nirenberg.

Q1. Dessiner les étapes de l'Expérience de Nirenberg (vous n'êtes pas obligés de dessiner les 20 expériences réalisées en parallèle).



Q2. Que peut-on conclure de cette expérience ?



Le même type d'expérience fut ensuite rapidement réalisé à partir d'autres acides nucléiques synthétiques, poly-C (-> proline) et poly-A (-> lysine). Har Gobind Khorana utilisa d'autres ARN synthétiques et montra que l'ARN UCUCUCU (UCU CUC UCU) produit deux acides aminés en alternance, la sérine et la leucine.

Enfin, une autre expérience de Nirenberg, réalisée avec Philip Leder en 1964, permit de craquer la fin du code (54 correspondances codon-acide aminé furent trouvées).

Les deux chercheurs :

- i) mirent au point une méthode de filtration pour séparer les complexes « ribosomes + ARNt-aa » (ARNt-aa = ARNt chargé en acide aminé) et
- ii) trouvèrent que l'ajout de trinuécléotides permettait la liaison spécifique d'ARNt-aa aux ribosomes.

Par exemple, le trinuécléotide AAA stimulait l'association entre l'ARNt-Lysine et les ribosomes. En récupérant le complexe ARNt-aa + ribosome formé par l'ajout d'un trinuécléotide donné, il était donc possible d'identifier l'acide aminé associé à l'ARNt et donc d'avoir la correspondance codon-acide aminé.

Le trinuécléotide AAA permettait de récupérer des complexes ARNt-aa + ribosome dont l'analyse montrait qu'il contenait la lysine (précédemment radiomarquée).

L'expérience apportait aussi une preuve supplémentaire que 3 bases successives codent un acide aminé.

2) Le code génétique

Les travaux de décryptage du code génétique, initiés par Nirenberg en 1961 et achevés en 1967, aboutirent aux résultats présentés dans le tableau de la figure 1. Ces travaux nous permettent de dégager un certain nombre de règles fondamentales. **6 règles à retenir :**

Tableau 1 : correspondance codon/acide aminé.

Ce tableau à triple entrée permet de retrouver l'acide aminé correspondant à un des 64 codons possibles. L'alphabet utilisé ici est celui de l'ARNm.

Le code génétique

Deuxième nucléotide

		Deuxième nucléotide									
		U		C		A		G			
Premier nucléotide	U	UUU	phényl-alanine	UCU	sérine	UAU	tyrosine	UGU	cystéine	Troisième nucléotide	
		UUC		UCC			UAC		UGC		
		UUA	leucine	UCA			UAA	STOP	UGA		STOP
		UUG		UCG			UAG				UGG
	C	CUU	leucine	CCU	proline	CAU	histidine	CGU	arginine		
		CUC		CCC			CAC			CGC	
		CUA		CCA			CAA	glutamine		CGA	
		CUG		CCG			CAG				CGG
	A	AUU	isoleucine	ACU	thréonine	AAU	asparagine	AGU	sérine		
		AUC		ACC			AAC		AGC		
		AUA		ACA			AAA	lysine	AGA	arginine	
		AUG	méthionine	ACG			AAG				
G	GUU	valine	GCU	alanine	GAU	acide aspartique	GGU	glycine			
	GUC		GCC			GAC			GGC		
	GUA		GCA			GAA	acide glutamique		GGA		
	GUG		GCG			GAG				GGG	

1. L'unité de codage est une **succession de 3 bases** nucléotidiques de l'ARNm (**codon**)
2. Le code est **universel** (rares exceptions)
3. Le code est **spécifique** : à un codon, un acide aminé (sauf codons stop/punctuation)
4. Le code est **dégénéré** : à un acide aminé, plusieurs codons (sauf tryptophane et méthionine, 1 seul codon)
5. **Le code est non-chevauchant** : les 3 nucléotides d'un codon ne participent qu'au code d'un seul acide aminé, la traduction des ARNm s'effectue par pas de 3 nucléotides à partir du 1^{er} codon. On parle du **cadre de lecture**.
6. Le code est **ponctué** : un codon INITIATION (**AUG=Méthionine**), trois codons STOP (**UAA, UAG, UGA**)

EXERCICE 2 : déterminer la séquence d'une protéine quand on connaît la séquence nucléotidique –ADN ou ARNm

L'hormone de croissance (GH : Growth Hormone) est l'une des deux hormones polypeptidiques majoritaires (l'autre hormone est la prolactine) synthétisées et sécrétées par le lobe antérieur de l'hypophyse.

Q1. Préciser sur la séquence ci-dessous correspondant à la séquence codante de l'ARNm codant la GH (brin sens), les extrémités qui codent pour les parties N et C terminales du polypeptide.

1 ATGGCTGCAGGCTCCCGGACG.....GTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG 654

Q2. Donnez la séquence des 4 premiers acides aminés

Q3. De combien d'acides aminés (a.a.) est composée la GH ?

Q4. Quelle masse moléculaire peut-on prédire pour la séquence protéique de la GH ? (MM a.a. : 110 Da)

II. Le mécanisme moléculaire de la traduction

Rappel important

Du point de vue chimique, les protéines sont **des polymères d'acides aminés** liés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. Le processus biologique qui permet l'obtention d'une protéine à partir d'acides aminés est appelé **traduction**.

La Figure 2 permet de comprendre qu'un peptide comporte, quelle que soit sa longueur, **une extrémité NH₃⁺, dite N-terminale, et une extrémité COO⁻, dite C-terminale**.

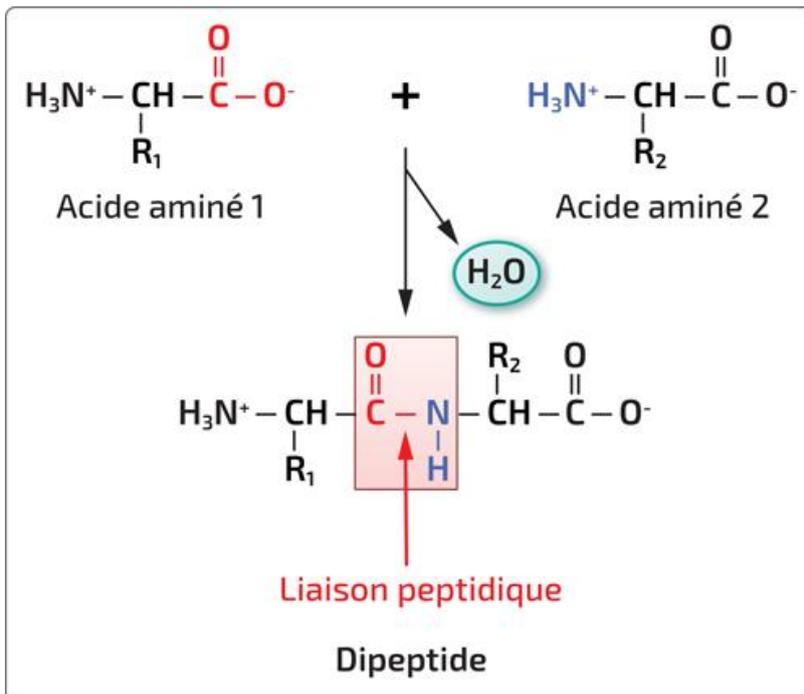


Figure 2 : Un peptide est un polymère d'acides aminés reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques.

La liaison chimique, covalente, qui résulte de la réaction de condensation entre le groupement acide carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre est appelée **liaison peptidique**.

La réaction entraîne la libération d'une molécule d'eau, comme indiqué sur la figure.

Les études du mécanisme de la traduction ont été réalisées pour la plupart *in vitro* à l'aide de systèmes de traduction acellulaires (du type de celui utilisé par Nirenberg). Ces expériences ont permis d'identifier précisément les éléments nécessaires à la traduction (nucléotides, ARNt chargés, sous-unités ribosomales, ARNm, GTP, facteurs protéiques) et de proposer le scénario présenté dans ce chapitre.

Les quatre acteurs principaux de la traduction sont: l'ARNm, les acides aminés, les ARNt chargés d'acides aminés, les sous unités ribosomales assemblées en ribosomes (petite sous-unité + grande sous-unité).

1) L'ARNm

L'ARNm synthétisé par les ARNpolIII et qui a subi un processus de maturation après sa synthèse dans le noyau des cellules eucaryotes passe dans le cytoplasme par les pores nucléaires (voir le cours sur la transcription). La Figure 3 rappelle les éléments de l'ARNm importants pour la traduction.

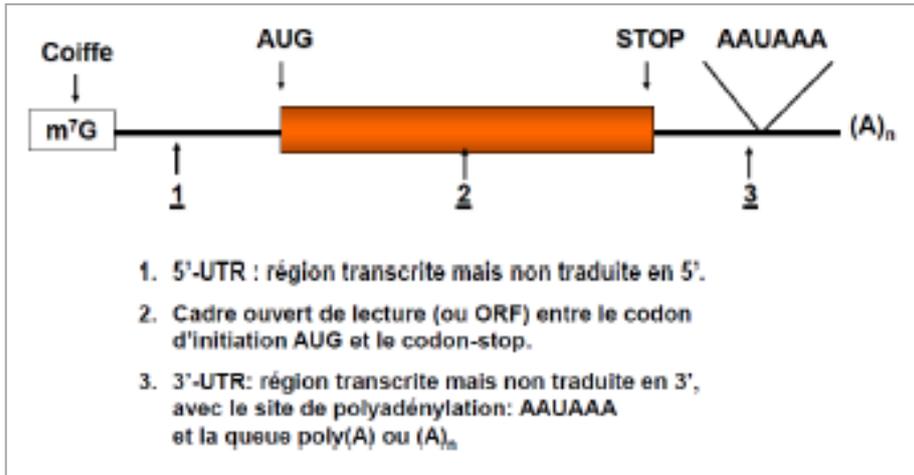


Figure 3 : Représentation schématique de l'ARNm mature. La figure présente les différents éléments importants pour la traduction. L'AUG est le codon d'initiation de la traduction, le STOP correspond à la position du premier codon stop de cet ARNm.

2) Les acides aminés

Les biochimistes ont montré qu'il existe 22 acides aminés biologiques dont 20 acides α -aminés naturels que l'on trouve fréquemment dans les protéines auxquels se rajoutent la sélénocystéine SECYS et, chez certaines archées méthanogènes, la pyrrolysine PYLYS). Il existe un 23^{ème} acide aminé présent exclusivement dans les bactéries et les organites : la Nformylméthionine

Un acide aminé est un acide organique porteur d'une fonction amine (NH₂). Les plus communs des acides aminés sont les acides α -aminés où le carbone porteur du groupement carboxyle porte aussi la fonction amine (carbone α).

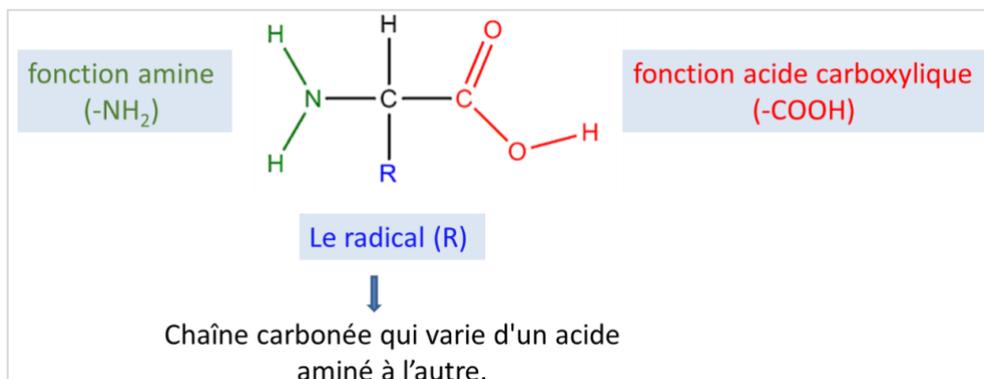


Figure 4 :
Structure d'un acide α aminé.

Les 20 acides aminés naturels ont tous un nom courant. Deux systèmes d'abréviation, à 3 lettres et à une lettre, permettent de les écrire rapidement.

Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I

Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Tableau 2 : Les 20 acides aminés. Le tableau indique le nom courant de chaque acide aminé ainsi que les abréviations correspondantes dans le système à 3 lettres et dans le système à une lettre.

On peut classer les acides aminés en fonction des caractéristiques chimiques de leur chaîne latérale. Certains :

- sont polaires, et donc hydrophiles,
- sont non-polaires et donc hydrophobes.
- sont chargés,
- sont non chargés.
- contiennent un cycle aromatique
- contiennent du soufre, etc.

Quelques informations utiles :

Les hydrophiles

- Polaires non chargés** : **Sérine + Thréonine (hydroxylés)**, Asparagine, Glutamine
- Polaires et chargés positivement à pH neutre** : Histidine, **Lysine et Arginine (basiques)**
- Polaires et chargés négativement à pH neutre** : **Acide aspartique et Acide glutamique (acides)**

Les hydrophobes

- Non polaires aromatiques** : Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane
- Non polaires soufrés** : **Cystéine**, Méthionine
- Non polaires aliphatiques** : Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline (cyclique), Glycine

Propriété-> très hydrophobes.

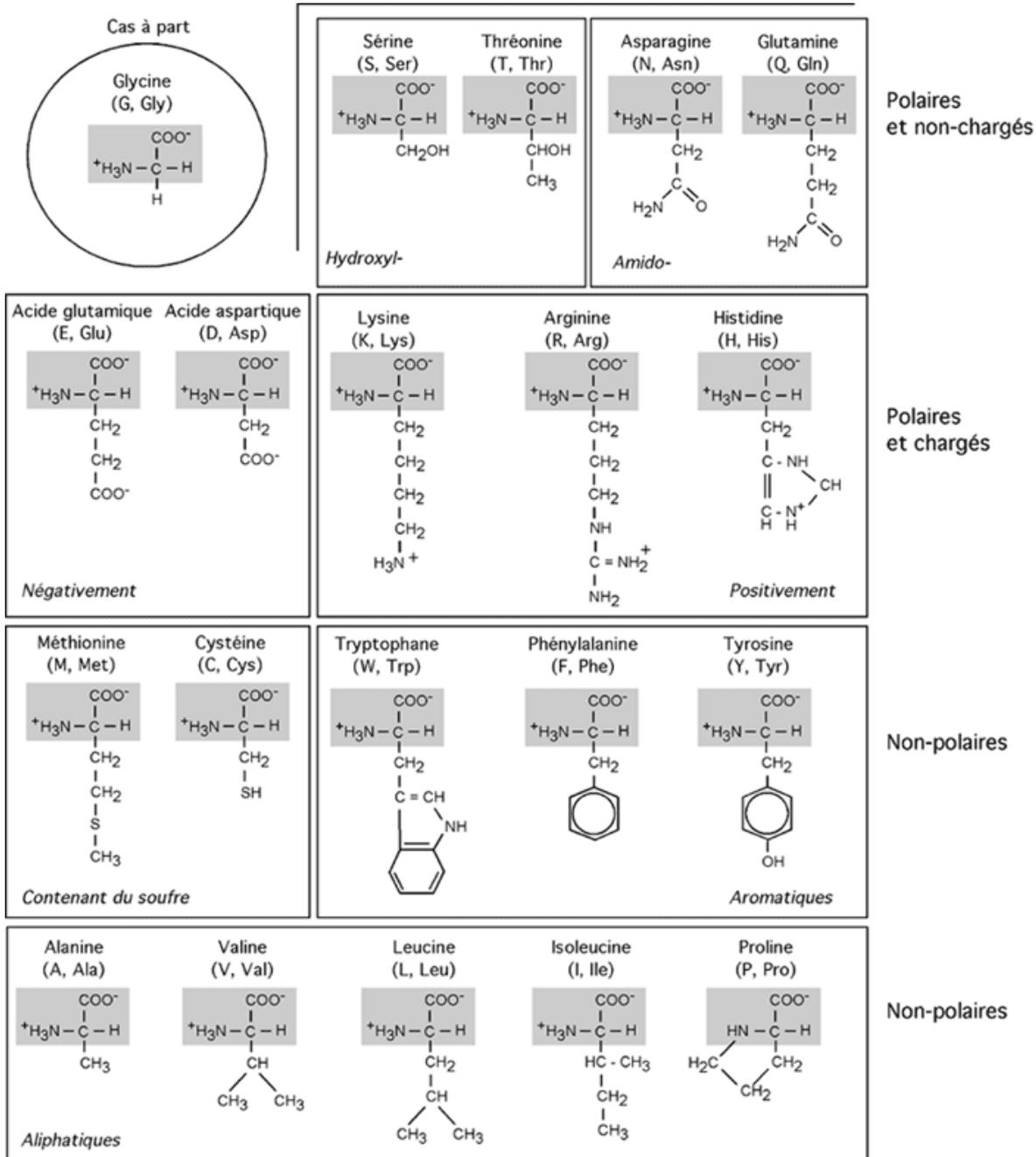


Figure 5 : Structure des 20 acides aminés naturels

Une règle informelle pour calculer approximativement la masse moléculaire d'une protéine (masse moléculaire=somme des masses atomiques des différents atomes constituant une molécule) est de compter 110 Daltons par acide aminé.

3) Les ARNt

A la fin des années 1950, un type d'ARN associé à des acides aminés appelé dans un premier temps *soluble RNA* puis *transfert RNA* (ARN de transfert) fut découvert. On montra que ces ARN jouaient le rôle d'intermédiaire entre les codons de l'ARNm et les acides aminés durant la traduction (Francis Crick avait déjà postulé l'existence d'une telle molécule d'ARN « adaptateur »).

Il n'existe aucune affinité entre les ARNm et les acides aminés, la jonction entre chaque codon porté par l'ARNm et l'acide aminé qu'il spécifie se fait par l'intermédiaire de molécules adaptatrices : les ARN de transfert.

Les ARNt sont de petites molécules (70 à 95 nucléotides) qui ont deux fonctions essentielles :

- la possibilité, pour chacune d'entre elles de se lier à un acide aminé spécifique
- la possibilité de reconnaître un codon précis de l'ARNm grâce à une séquence appelée **anticodon**, un triplet de nucléotides complémentaire du codon.

La structure caractéristique des ARNt est présentée dans la Figure 6.

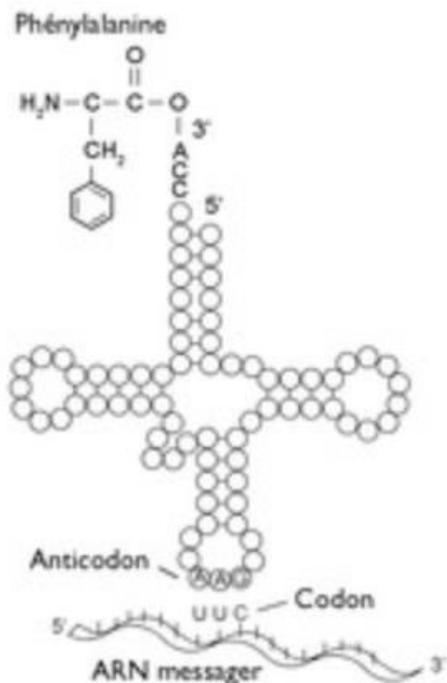


Figure 6 : représentation de la structure secondaire en "feuille de trèfle" d'un ARNt chargé.

La présence de palindromes dans la séquence des ARNt aboutit à une structure secondaire complexe comportant 3 tige-boucles.

L'une des boucles est porteuse de l'anticodon, une séquence de 3 nucléotides complémentaire et antiparallèle de la séquence d'un codon spécifiant un acide aminé.

L'extrémité 3' de l'ARNt (5'_p-ACC-3'_{OH}) est liée par une liaison covalente ester au groupement CO de l'acide aminé correspondant à l'anticodon (c'est-à-dire au codon auquel il peut s'apparier).

Les enzymes capables de catalyser le "chargement" spécifique des ARN de transfert, c'est-à-dire de relier le bon acide aminé à l'ARNt porteur du bon anticodon sont appelées aminoacyl-ARNt synthétases. Il existe autant d' aminoacyl-ARNt synthétases que d'acides aminés et chacune est capable de reconnaître les différents ARNt synonymes.

4) Les sous-unités ribosomales et les ribosomes (voir l'abrégé de *Biologie Cellulaire, poly1*)

Les ribosomes sont constitués d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines et sont structurés sous forme de deux sous-unités que ce soit chez les procaryotes ou chez les eucaryotes. Leur taille est définie en unité Svedberg.

Les ribosomes eucaryotes (80S) sont constitués d'une petite sous-unité 40S et d'une grande sous-unité 60S.

- La sous-unité 40S est constituée d'un ARNr **18S** et de 33 protéines.
- La sous-unité 60S est constituée des ARNr **28S**, **5,8S** et **5S** ainsi que de 49 protéines.

Les ribosomes procaryotes (70S) sont constitués d'une petite sous-unité 30S et d'une grande sous-unité 50S.

5) Initiation, élongation, terminaison : les trois étapes de la traduction

<https://youtu.be/Jfn4SFwMXlw>

La traduction se déroule dans le cytoplasme au sein des ribosomes, complexes ribonucléiques (ARN + protéines), qui servent de support à l'assemblage des acides aminés du polypeptide codé par l'ARNm.

Cette synthèse s'effectue en présence de différents types de facteurs protéiques et nécessite des ARNt chargés. L'hydrolyse des nucléosides triphosphates, ATP ou GTP en nucléosides diphosphates, ADP ou GDP, fournit l'énergie nécessaire aux différentes étapes de la traduction.

On distingue trois étapes au cours de la traduction : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

- **Initiation (cf figure 7)**

1) Les deux sous-unités du ribosome vont se mettre en place au moment de la phase d'initiation de la traduction. Dans le cytoplasme, l'association d'une protéine, le "facteur d'initiation" IF3, avec la petite sous-unité empêche l'assemblage spontané des ribosomes.

La petite sous-unité du ribosome reconnaît l'ARN messager (au niveau de sa partie 5') et s'y fixe.

2) La grande sous-unité vient compléter le ribosome. Elle présente deux sites de reconnaissance et de traitement des ARNt-aa, **les sites A et P** qui permettent de recevoir des ARNt avec un espacement correspondant à deux triplets successifs. Au départ, le site P (=Protéine naissante) ne peut être reconnu que par **un ARNt caractéristique de l'initiation (ARNti) systématiquement chargé en méthionine** (chez les eucaryotes) ou en formyl-méthionine (chez les procaryotes). Des facteurs protéiques d'initiation (IF), formant un complexe avec l'ARNti-méthionine (formyl methionine chez les bactéries) jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance du site P.

3) Lorsque cet assemblage est effectué, un second ARNt-aa vient occuper le site A (A=Acides aminés). La sélection de cet ARNt-aa repose sur l'appariement codon-anticodon.

4) L'acide aminé spécifié par le deuxième codon et porté par l'ARNt-aa du site A est en contact avec la méthionine d'initiation, une **liaison peptidique** s'établit entre les deux acides aminés. C'est une **aminoacyl peptidyltransférase** qui catalyse l'établissement de cette liaison. **L'extrémité N-terminale de la méthionine est libre, le groupe CO est engagé dans une liaison peptidique avec l'acide aminé N°2.**

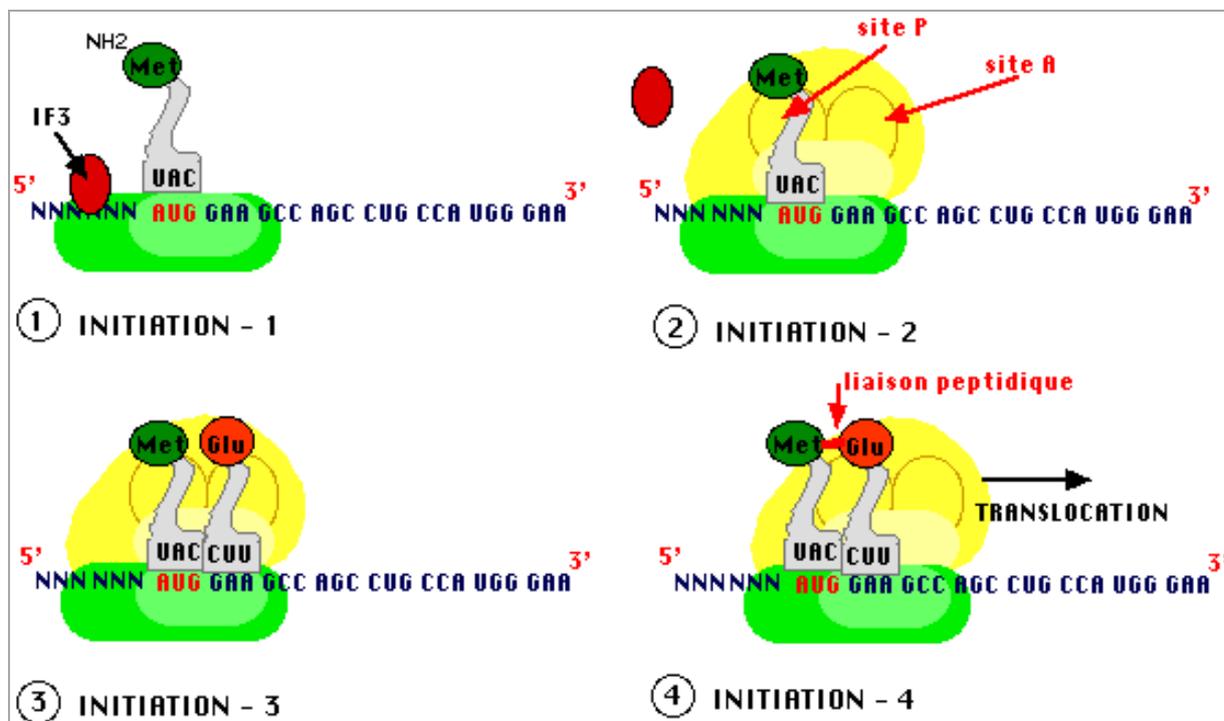


Figure 7 : les différentes étapes de l'initiation de la traduction :

Coût énergétique de l'initiation : 2 GTP + 1 ATP (+ 1ATP pour la synthèse de chaque ARNt-acide aminé)

- **Allongement ou élongation (cf figure ci-dessous)**

5) L'élongation nécessite la **translocation** du ribosome qui se décale exactement d'un triplet de nucléotides en éjectant l'ARNt déchargé qui occupait le site P. Il en résulte que : 1. le site P contient maintenant le second ARNt chargé d'un dipeptide ; 2. le site A est maintenant libre de recevoir un troisième ARNt chargé d'un troisième acide aminé (spécifié par le codon face au site A) ce qui entraîne une deuxième liaison peptidique. L'ARNt côté site P est éjecté. Ici encore, des facteurs protéiques, spécifiques de l'élongation (EF) forment des complexes avec les ARNt chargés pour assurer l'installation dans le site A.

6) Les translocations du ribosome se poursuivent avec adjonction séquentielle d'acides aminés à la chaîne peptidique en cours jusqu'à la terminaison.

Les images de microscopie électronique montrent que **de nouveaux ribosomes démarrent de nouvelles séquences d'initiation - élongation... avant que les précédents aient terminé.**

Coût énergétique de l'élongation : 2 GTP/acide aminé

- **Arrêt ou terminaison (cf figure 8)**

7) L'arrêt de la traduction est indiqué dans l'ARN messager par un des trois **codons stop** : UAG, UAA et UGA. Un facteur protéique de relargage ('Release Factor', RF) vient occuper le site A.

8) La translocation du ribosome s'arrête, la protéine est relâchée ainsi que le dernier ARNt déchargé ; les deux sous-unités du ribosome se séparent.

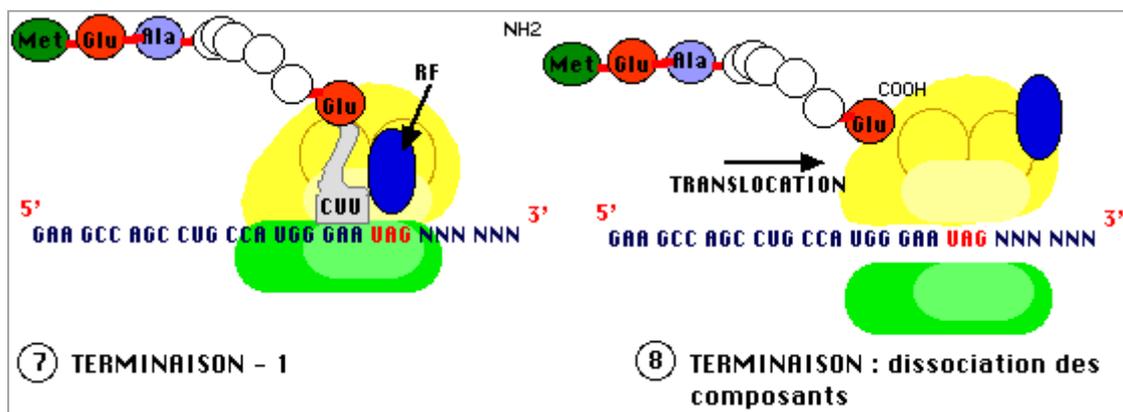


Figure 8 : Les différentes étapes de la terminaison de la traduction

Coût énergétique de la terminaison : 2 GTP

EXERCICE 4 : expliquer le mécanisme moléculaire de la traduction

Q1. Compléter directement sur le schéma ci-contre (Figure 9).

Les légendes doivent indiquer :

- les sous-unités ribosomales et le principal type d'ARN ribosomique (ARNr) dont elles sont constituées
- les sites de fixation peptidique (site P) et acide aminé (site A) du ribosome
- les molécules d'ARN messager (ARNm) et d'ARN de transfert (ARNt)
- les extrémités N-terminale et C-terminale de la chaîne peptidique en cours de synthèse

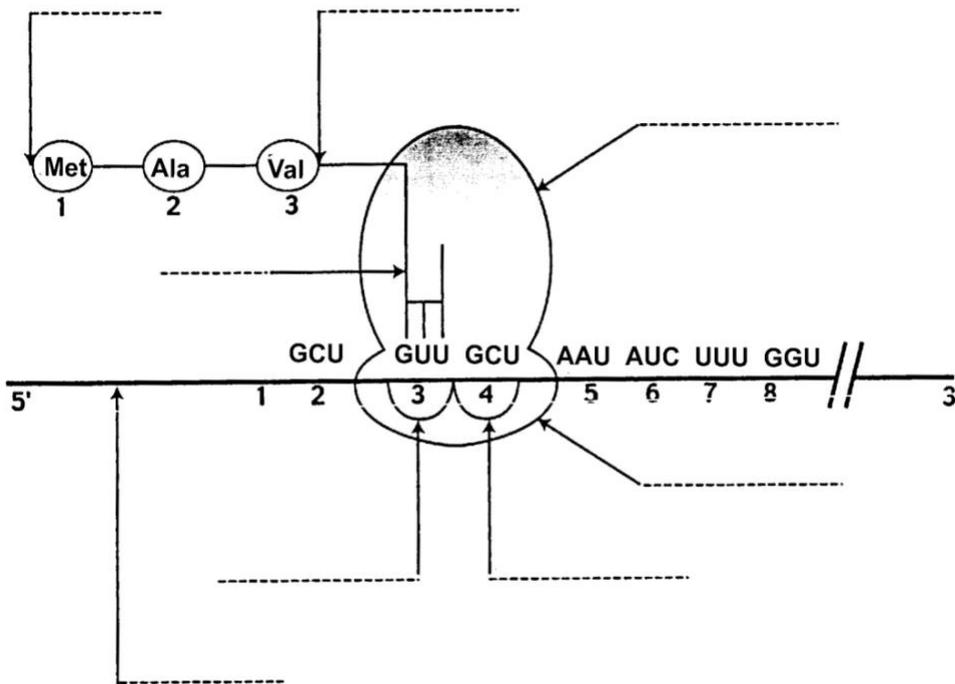


Figure 9 : Schéma du mécanisme moléculaire de la traduction

Q2. Ajouter directement sur le schéma ci-dessous (Figure 10)

- le résidu 7-méthylguanosine triphosphate (Gppp) à l'emplacement correct.
- la séquence nucléotidique du premier codon de l'ARN messager (codon 1).
- la séquence nucléotidique de l'extrémité 3' de l'ARN messager.

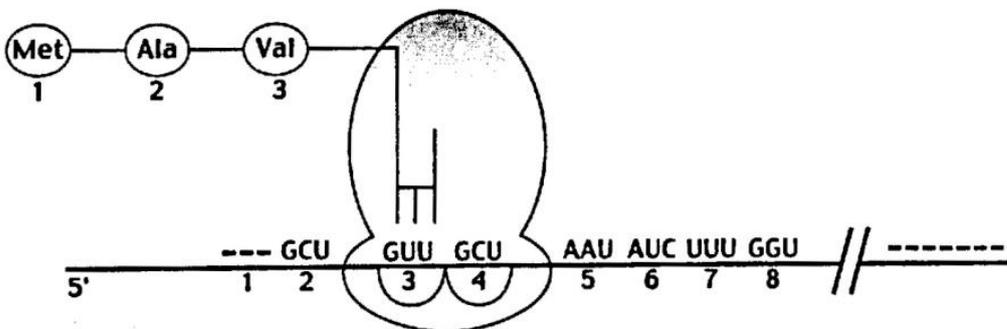


Figure 10 : Schéma du mécanisme moléculaire de la traduction

Q3. A partir des informations dont vous disposez sur la séquence d'ARN messager, déduire :

- la séquence des huit premiers acides aminés du peptide.

- la séquence du gène codant ces huit premiers acides aminés.

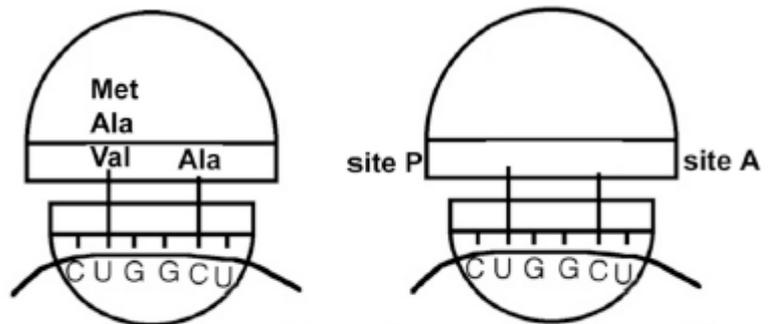
Au cours de l'élongation du début de la protéine, un ribosome se trouve successivement dans les deux états ci-dessous :

- A gauche avant la synthèse de la liaison peptidique, le site P porte un ARNt lié au peptide Met-Ala-Val. Le ribosome vient de recruter un ARNt chargé.

- A droite, après l'établissement de la liaison peptidique, les 2 ARNt sont encore fixés aux sites P et A.

Q4. Précisez (sur le schéma ci-contre, partie de droite) les éléments présents aux sites P et A à ce stade du processus.

NB la séquence est GUUGCU (à modifier)



Q5. A- Dans quel(s) compartiment(s) de la cellule a eu lieu la synthèse de l'ARNm ?

B- Et ensuite, que devient l'ARNm ?

Q6. Dans quel(s) compartiment(s) de la cellule a lieu la synthèse de cette chaîne peptidique?

Q7. A- Dans quel(s) compartiment(s) de la cellule a eu lieu la synthèse des sous-unités du ribosome ?

B- Et ensuite, que se passe-t-il ?

C- Quel est le devenir immédiat des sous-unités du ribosome quand la synthèse protéique est achevée ?

Le tableau suivant (tableau 3) illustre **trois mutations différentes** des codons 6 et 7 telles qu'elles apparaissent dans la séquence nucléotidique de l'ARN messager.

Position du codon	1	2	3	4	5	6	7	8
ARNm normal	-	GCU	GUU	GCU	AAU	AUC	UUU	GGU
ARNm avec mutation X	-	GCU	GUU	GCU	AAU	AU	U	GGU
ARNm avec mutation Y	-	GCU	GUU	GCU	AAU	AUC	UAG	GGU
ARNm avec mutation Z	-	GCU	GUU	GCU	AAU	AUC	UUC	GGU

Q8. Pour chacune des mutations X, Y et Z :

- de quel type est la mutation (non-sens, faux sens) ?

X :

Y :

Z :

- Quelles sont ses conséquences éventuelles sur le cadre de lecture ?

X :

Y :

Z :

- Quelles sont ses conséquences éventuelles sur le peptide synthétisé (Mutation nn sens, faux sens ou muette) ?

X :

Y :

Z :

III. La synthèse des protéines à l'échelle de la cellule

1) Lieux de synthèse des protéines dans les cellules eucaryotes

EXERCICE 5 : où sont synthétisées les protéines dans les cellules eucaryotes et que deviennent-elles dans la cellule ? Les travaux de Palade (1964) sur la synthèse et le cheminement intracellulaire des protéines de sécrétion.

Les expériences de Georges Palade (prix Nobel en 1974) permirent de suivre pour la première fois *in situ* le déplacement des protéines néosynthétisées à l'intérieur des cellules grâce à l'utilisation des techniques de « *pulse-chase* » et de microscopie électronique. Les observations de Palade furent réalisées sur des coupes de pancréas exocrine, un tissu spécialisé dans la synthèse et la sécrétion de protéines (zymogènes).

L'expérience de Caro et Palade (1964)

Des cochons d'Inde anesthésiés reçoivent par voie intraveineuse de la leucine- H^3 (leucine tritiée) pendant une durée relativement brève de 4 minutes (pulse).

Après des temps variables de chasse, les animaux sont sacrifiés, leur pancréas est rapidement prélevé et découpé en coupes ultrafines qui sont préparées par les techniques cytologiques (fixation, inclusion,...).

Ces coupes de pancréas sont soumises à une autoradiographie et analysées au microscope électronique.

Sur chaque autoradiographie, on détermine le pourcentage des grains d'argent au niveau de différents organites cellulaires visibles sur les coupes de la partie exocrine du pancréas (un tissu spécialisé dans la synthèse et la sécrétion de protéines).

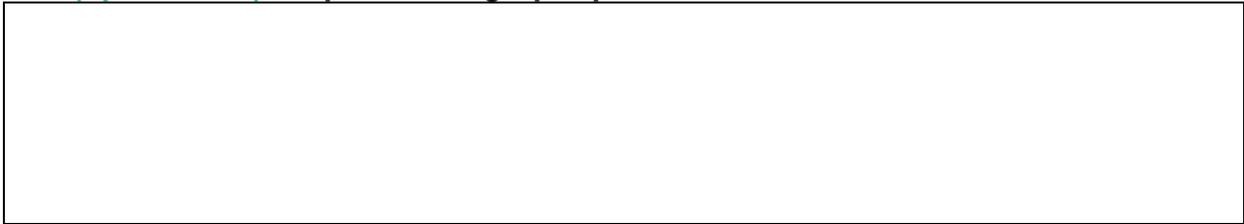
Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Distribution des grains d'argent au sein de différentes structures cellulaires à différents temps après injection de DL-Leucine-1,5- H^3

Temps après marquage		REG	Golgi	vésicules de sécrétion	Noyau	Mitochondries
en min		%	%	%	%	%
4	Classe	67	27	1	2	3
6		53	39	2	5	1
20		11	73	10	3	3
240		11	10	73	4	2

Q1. Qu'est-ce que la leucine ? Pour quelle raison Caro et Palade injectent-ils cette molécule rendue radioactive aux cochons d'Inde ?

Q2 (optionnelle). Représentez graphiquement les résultats



Q3. Que pouvez-vous conclure de ces données sur le lieu de synthèse et le cheminement des protéines dans les cellules du pancréas des cochons d'Inde?



Les protéines du noyau, de la mitochondrie, des peroxisomes, des chloroplastes sont synthétisées dans le cytosol par des ribosomes libres. Ces protéines gagnent leur compartiment de destination grâce à des séquences d'adressage spécifiques (séquences de quelques acides aminés).

De nombreuses expériences de marquage radioactif à l'aide d'acides aminés marqués montrent que les protéines sécrétées, les protéines des lysosomes et de la membrane plasmique sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (REG) par des ribosomes liés à la surface de ce dernier. Au cours de la traduction, les polypeptides naissants passent à travers la membrane du réticulum pour se retrouver à l'intérieur (dans la « lumière ») de ce compartiment.

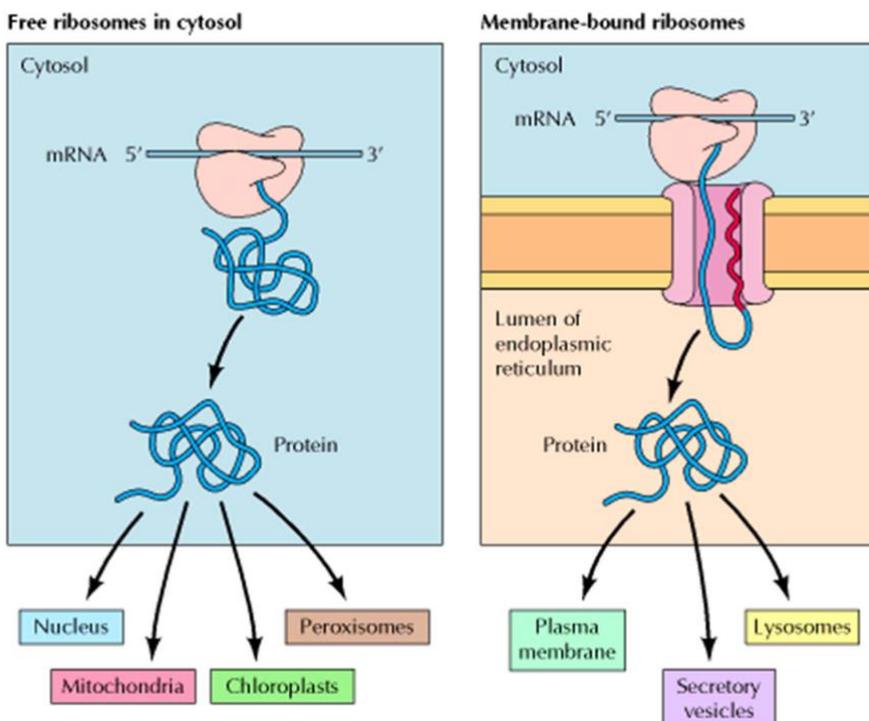


Figure 11 : ribosomes libres et ribosomes associés au REG. Les ribosomes libres (dans le cytosol) assurent la traduction des protéines nucléaires, mitochondriales, chloroplastiques, peroxisomales. Les ribosomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique granulaire (REG) assurent la synthèse des protéines sécrétées, lysosomales et membranaires (de la membrane plasmique, du réticulum, du Golgi, des lysosomes).

2) Le réticulum endoplasmique est le lieu de synthèse des protéines destinées à être sécrétées (voir chap 5 du poly 1 abrégé de Biologie Cellulaire)

La **Figure 12** présente le mécanisme par lequel la synthèse de certaines protéines est dirigée vers la membrane du REG.

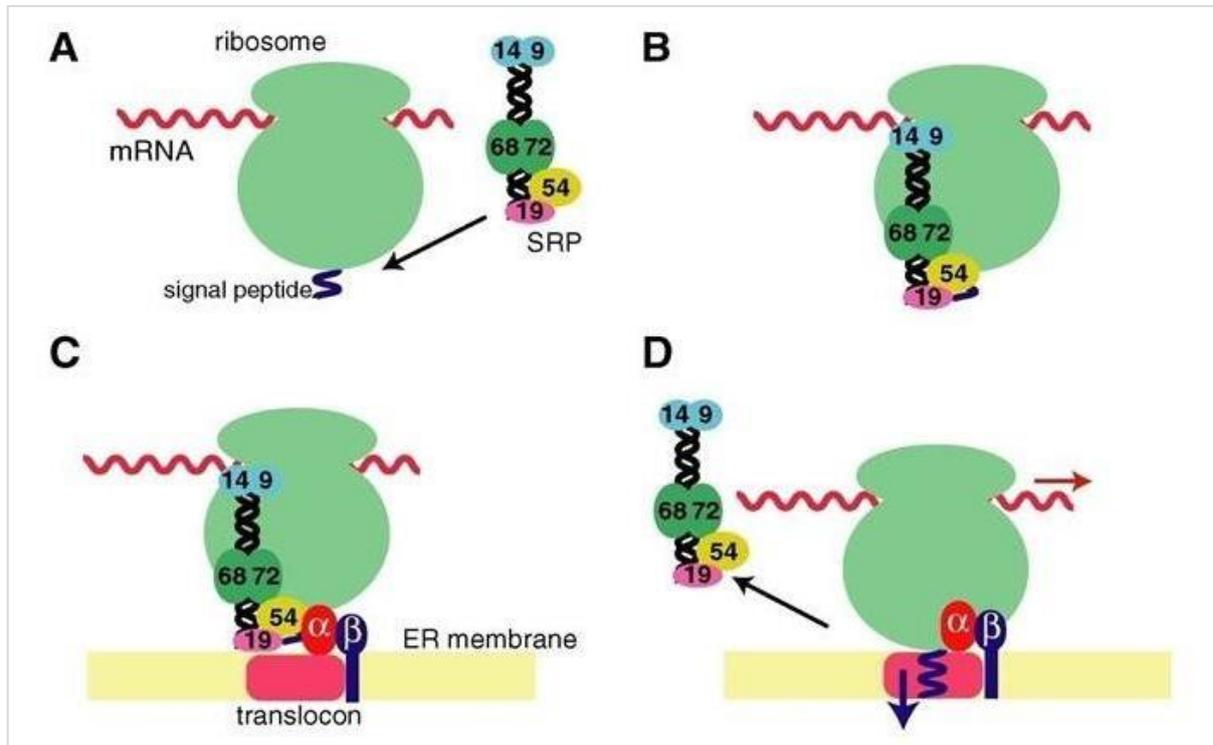


Figure 12 : le mécanisme d'action de la SRP.

L'ARNm en cours de traduction est représenté en rouge,

le ribosome en vert, la membrane du REG en jaune, le translocon en rose,

le polypeptide naissant est porteur d'une séquence signal en bleu.

La figure montre les différents composants de la SRP, ainsi que le récepteur dimérique de la SRP. Le mécanisme est décrit dans le texte ci-dessous.

La synthèse (traduction) des protéines mentionnées ci-dessus commence dans le cytosol jusqu'à ce qu'une **séquence signal** (un enchainement d'acides aminés hydrophobes) apparaisse sur le polypeptide en cours de synthèse par les ribosomes (A). Cette séquence signal est reconnue par une protéine cytosolique, appelé **PRS (ou SRP en anglais)**, qui d'une part bloque la traduction par le ribosome (B) et s'associe d'autre part à des protéines réceptrices (αβ) de la membrane du REG, amenant ainsi le ribosome au contact du REG (C).

Le **récepteur à la PRS** (αβ) est alors associé au GTP. Dans la membrane du REG, un complexe protéique d'amarrage et de translocation forme un pore dans la membrane du REG, appelé **translocon**. Le polypeptide dont la synthèse a été interrompue est amené au contact avec le complexe d'amarrage et de translocation par le récepteur associé au GTP (C).

L'hydrolyse du GTP déclenche la dissociation de la PRS de son récepteur et du ribosome, ce qui permet la reprise de la traduction (D). Le polypeptide en cours de synthèse passe dans le translocon au fur et à mesure qu'il est allongé par le ribosome. Les régions hydrophobes des protéines transmembranaires se reploient dans la membrane au moment de leur passage à travers le translocon. Les protéines destinées à être sécrétées se retrouvent dans la lumière du réticulum. La séquence signal est clivée par une enzyme (signal peptidase) au moment du passage du polypeptide dans le translocon. Elle est ensuite éliminée.

Les protéines sécrétées suivent la voie: Réticulum Endoplasmique->Appareil de Golgi->Vésicules de sécrétion

IV. Notions élémentaires de biochimie des protéines

Les protéines sont les molécules organiques des plus abondantes dans les cellules et constituent souvent plus de 50% du poids sec des êtres vivants. Elles sont les **molécules support de quasiment toutes les fonctions cellulaires** et peuvent se répartir en plusieurs catégories

- Les enzymes catalyseurs des réactions biochimiques
- Les protéines de défense (les anticorps)
- Les protéines de transport de molécules ou d'ions (la myoglobine et l'hémoglobine capables de fixer l'oxygène de façon réversible, les transporteurs membranaires, ...).
- Les protéines régulatrices qui participent à la régulation de processus cellulaires ou physiologiques (les hormones, les récepteurs et protéines associées, les protéines impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes...)
- Les protéines contractiles impliquées dans les mouvements cellulaires (la myosine)
- Les protéines de réserve qui servent de réserve en acides aminés (l'ovalbumine des œufs, les grains d'aleurones dans l'albumen des graines)
- Les protéines architecturales qui participent à la construction et au maintien des structures cellulaires et tissulaires (l'actine, la tubuline, la kératine, le collagène).

Trois caractéristiques importantes sont à prendre en compte pour comprendre comment une protéine peut exercer une fonction biochimique : la séquence des acides aminés, la conformation tridimensionnelle qu'elle adopte, les modifications chimiques -souvent réversibles- apportées à ses acides aminés.

1) Repliement des protéines : notions de structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire et de conformation

L'ordre de la séquence des acides aminés (=structure primaire) distingue une protéine d'une autre.

L'obtention d'une chaîne polypeptidique de séquence appropriée ne suffit pas à la réalisation de sa fonction biologique. Pour qu'elle soit « active », il faut en effet que la chaîne polypeptidique adopte une conformation spatiale, un « repliement » sur elle-même, une structure tridimensionnelle précise où chacun des milliers d'atomes de la protéine est positionné par rapport aux autres à une petite fraction d'angström près. Cette structure tridimensionnelle, unique parmi plusieurs conformations statistiquement possibles, est appelée **conformation « native »**.

La séquence en acides aminés (ou structure primaire) détermine largement la conformation d'une protéine dans un milieu donné. **Une modification de la séquence en acides aminés dans une protéine peut donc changer sa structure tridimensionnelle.**

La conformation native d'une protéine est souvent obtenue, dans les conditions physicochimiques de la cellule, à l'aide de protéines spécialisées qui aident les polypeptides nouvellement synthétisés à se replier correctement. Il s'agit de quelques enzymes (par exemple, enzymes impliqués dans la formation de ponts disulfures) et des **protéines chaperons**. Ces dernières sont capables de piéger les chaînes mal ou incomplètement repliées pour les empêcher de s'agréger et leur permettre de progresser vers la conformation native.

Les biochimistes distinguent trois niveaux de repliement des polypeptides à partir de la « structure primaire ».

La structure primaire

La structure primaire est la séquence des acides aminés sur la chaîne polypeptidique. Par convention, la structure primaire d'une protéine est écrite de gauche à droite en partant toujours de l'extrémité N-terminale. Les acides aminés sont numérotés de 1 à n, en partant de cette extrémité.

La structure secondaire

La structure secondaire correspond aux repliements locaux de la chaîne d'acides aminés d'un polypeptide en petites structures tridimensionnelles élémentaires : les hélices alpha et les feuillets bêta.

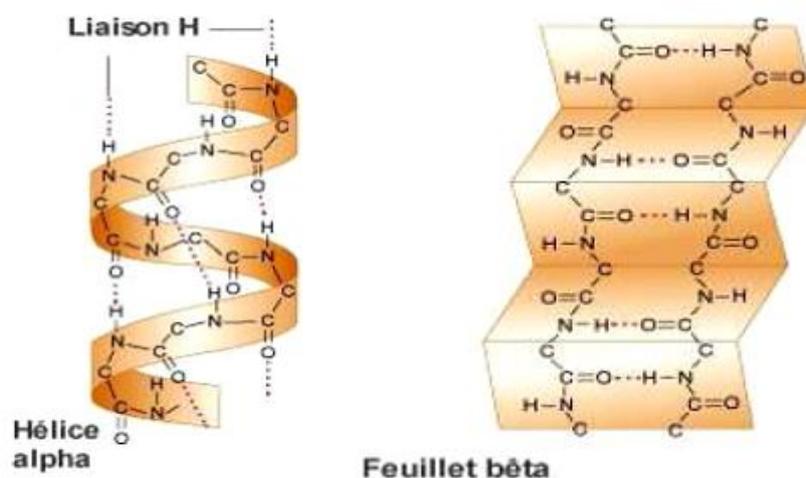


Figure 13 : hélice alpha et feuillet bêta, des structures élémentaires de la structure secondaire. Les représentations de l'hélice alpha (gauche) et du feuillet bêta montrent que ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique.

Toutes les chaînes polypeptidiques n'adoptent pas forcément une structure secondaire sur toute la longueur de la chaîne polypeptidique.

La structure tertiaire

La structure tertiaire est le repliement de la structure secondaire dans l'espace. Ce repliement est stabilisé par différents types d'interactions entre les atomes des acides aminés qui peuvent être éloignés dans la structure primaire mais rapprochés du fait de la formation des hélices alpha et des feuillets bêta. Ces interactions peuvent être des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques, des interactions hydrophobes, des interactions de Van der Waals, voire des liaisons covalentes (ponts S-S).

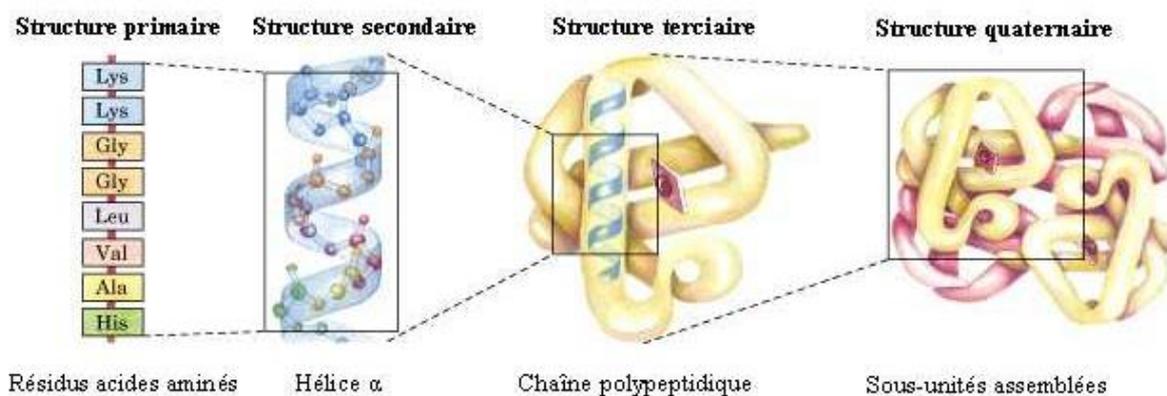
La conformation native d'une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique est une structure tertiaire.

La structure quaternaire

Beaucoup de protéines sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques indépendantes qui s'associent entre elles. Dans de telles protéines, chaque chaîne polypeptidique (qualifiée de sous-unité) adopte sa propre structure tertiaire de façon indépendante des autres sous-unités.

La structure quaternaire correspond à l'assemblage de 2 ou plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes (homo-multimère et hétéro-multimère).

Ces assemblages peuvent être assurés par des liaisons non covalentes, quelquefois par des ponts disulfures.



<p>La structure primaire est la séquence des acides aminés.</p>	<p>Les structures secondaires sont les motifs que forment les acides aminés. On reconnaît principalement les structures en hélice α et en feuillet β.</p>	<p>La structure tertiaire se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures secondaires, hélices et feuillets.</p>	<p>Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation : on parle de structure quaternaire.</p>
---	--	---	---

Figure 14 : les différents niveaux de repliement des polypeptides

Dénaturation des protéines

La dénaturation est l'altération de la conformation native d'une protéine, sans modification de la structure primaire, conduisant à une perte d'activité biologique.

Si les modifications structurales sont discrètes, la dénaturation **peut être réversible**. Si la protéine est incapable de reprendre la conformation native, la dénaturation est irréversible.

- **Agents dénaturants physiques** : les radiations UV, les ultrasons et la **température**. L'élévation de la température entraîne une agitation thermique (élève l'énergie de vibration et de rotation des liaisons entre atomes des molécules dissoutes) ce qui conduit à des mouvements intramoléculaires à l'origine de la rupture des interactions faibles qui stabilisent la conformation de la protéine. Dès 60°C, beaucoup de protéines sensibles à la chaleur sont dénaturées.
- **Agents dénaturants chimiques** : les variations du **pH**, les **détergents** anioniques et cationiques, les solvants organiques miscibles à l'eau (éthanol, acétone). Le détergent **Sodium Dodécyl Sulfate** (ou SDS) dont la "queue hydrocarbonée" établit des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales des résidus d'acides aminés apolaires) forme un complexe protéine-détergent ionisé en surface (le groupement sulfate du SDS est chargé négativement) dans lequel la chaîne polypeptidique est globalement déployée. Son action est réversible. L'urée est un autre agent dénaturant qui rompt les liaisons hydrogènes établies entre les acides aminés d'une protéine.

2) Modifications post-traductionnelles des protéines

La production de protéines par la cellule ne consiste pas seulement en une traduction de la séquence d'acide nucléique en séquence d'acides aminés et en un repliement correct du polypeptide produit. De nombreuses modifications chimiques ou biologiques peuvent avoir lieu après l'étape de polymérisation des acides aminés par le ribosome. Ces modifications sont, pour cette raison, dites post-traductionnelles.

Les modifications post-traductionnelles des protéines :

- permettent des modifications d'activité des protéines (inhibition, activation)
- sont la plupart du temps des réactions catalysées par des enzymes spécialisées et réversibles

Parmi les 200 modifications post-traductionnelles recensées par les biochimistes, 6 sont présentées ici : clivage de chaîne polypeptidique, acétylation, formation de ponts covalents, ancrage lipidique, glycosylation et phosphorylation.

a) Phosphorylation

La phosphorylation des protéines est l'ajout d'un phosphate sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine. Ce type de modification post-traductionnelle est réalisé par des enzymes appelées « **kinases** ». La phosphorylation est **réversible** : des enzymes appelées **phosphatases** sont capables de déphosphoryler les protéines.

De très nombreux travaux montrent que la phosphorylation est un phénomène important dans la transduction de signaux, dans la régulation de nombreuses enzymes du métabolisme. La phosphorylation change l'activité des protéines, en induisant des changements de conformation et/ou en permettant l'association avec d'autres protéines.

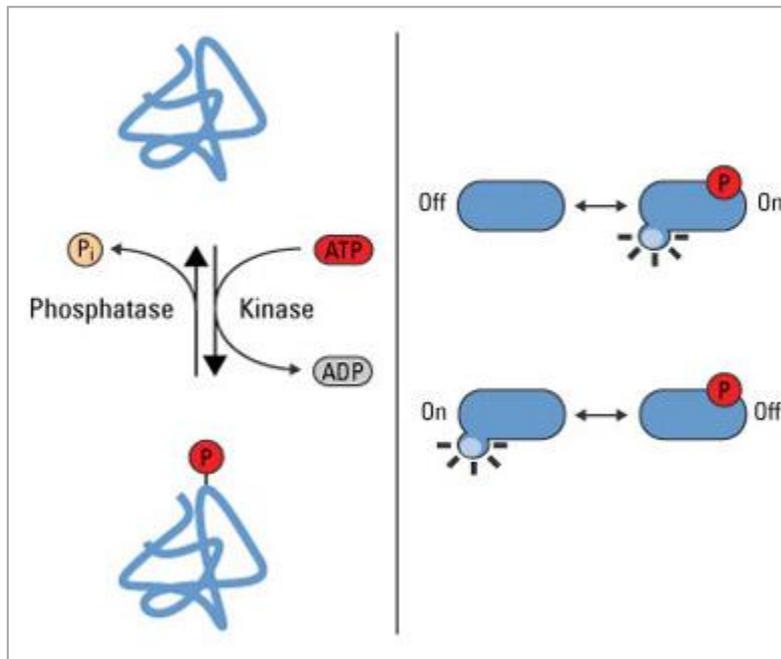


Figure 15 :
Phosphorylation et déphosphorylation des protéines.

Image de gauche : des kinases permettent la phosphorylation de sérine, de thréonine et de tyrosine de certaines protéines ; des phosphatases déphosphorylent les protéines en hydrolysant le groupe phosphate.

Image de droite : la phosphorylation provoque des changements de conformation qui activent (haut) ou bien inactivent (bas) la fonction des protéines.

Source : <https://www.thermofisher.com>

b) Formation de ponts covalents disulfures

Un pont disulfure (pont S-S) est une liaison covalente entre les 2 atomes de soufre de 2 **cystéines**. Toutes les cystéines d'une protéine ne forment pas un pont disulfure mais un grand nombre de protéines, en particulier les protéines de sécrétion, comportent des ponts disulfures (1/3 des protéines des eucaryotes).

Un pont disulfure peut être établi entre 2 cystéines d'une même chaîne polypeptidique (on parle de pont intra-chaîne) ou entre 2 cystéines appartenant à 2 chaînes polypeptidiques identiques ou différentes (on parle de pont inter-chaînes).

Les ponts S-S appropriés contribuent de manière très significative à la stabilisation de la structure tridimensionnelle (conformation) native de la protéine.

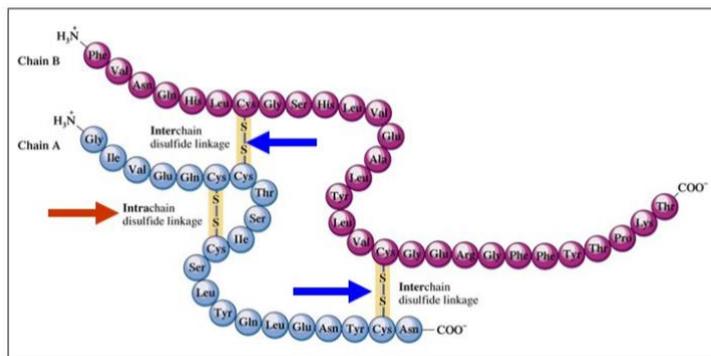


Figure 16 : ponts disulfures intra et inter-chaînes de l'insuline humaine. L'insuline est une hormone sécrétée par le pancréas. La structure quaternaire de cette protéine comporte deux chaînes, une chaîne A (21 aas) et une chaîne B (30aas), des ponts S-S inter-chaînes et un pont S-S intra-chaîne.

c) Acétylation par les N-acétyl transférases

L'acétylation est la liaison covalente d'un **groupe acétyl** (CO-CH₃-) sur le groupe α -amine de l'**extrémité N-terminale** des protéines **ou** sur le **groupe ϵ -amine des lysines**. L'acétyl est fourni par l'acétyl-coenzyme A.

Les réactions d'acétylation de protéines sont catalysées par des **N-acétyltransférases**. L'acétylation des lysines est une réaction **réversible** : elle peut être catalysée par des **déacétylases**. Des études récentes montrent qu'il s'agit d'une modification fréquente (plusieurs milliers de protéines sont concernées chez l'Homme) qui permet d'activer ou d'inhiber l'activité des protéines.

Remarque importante : l'acétylation des lysines **neutralise leur charge positive** (NH₃⁺). Lorsque les lysines des protéines histones sont acétylées celles-ci n'interagissent plus aussi fortement avec l'ADN (chargé négativement) : l'ADN est alors empaqueté de façon moins serrée, la chromatine est plus lâche.

d) Glycosylation en N et en O

Les **glycoprotéines** sont des protéines liées de façon covalente à des sucres. Cette fixation de sucres, appelée **glycosylation**, peut contribuer à la stabilité, l'adressage, la solubilité des protéines ou faciliter l'adoption d'une conformation. Elle est assurée par des enzymes spécifiques.

La majeure partie des glycoprotéines se trouve sur la face externe de la membrane plasmique, avec la partie glycosylée du côté du milieu extracellulaire ; il existe cependant aussi de nombreuses glycoprotéines intracellulaires qui sont O-glycosylés. Les chaînes

glucidiques des glycoprotéines sont dites liées en N ou en O selon leur site d'ancrage (voir Figure 17).

Pour les **chaînes glucidiques liées en O**, les sucres sont liés à l'oxygène du groupement hydroxyl (OH) de la **sérine**, la **thréonine**, ou de l'hydroxylysine (dans le collagène).

Les **chaînes glucidiques liées en N** sont liées par une liaison covalente à l'azote du groupement amide de l'**asparagine**. Le sucre directement fixé sur l'asparagine est le N-acetylglucosamine (GlcNAc). Les chaînes liées en N contiennent toutes une structure de base comprenant deux GlcNAc et trois mannoses ; sur cette structure d'autres glucides sont généralement présents.

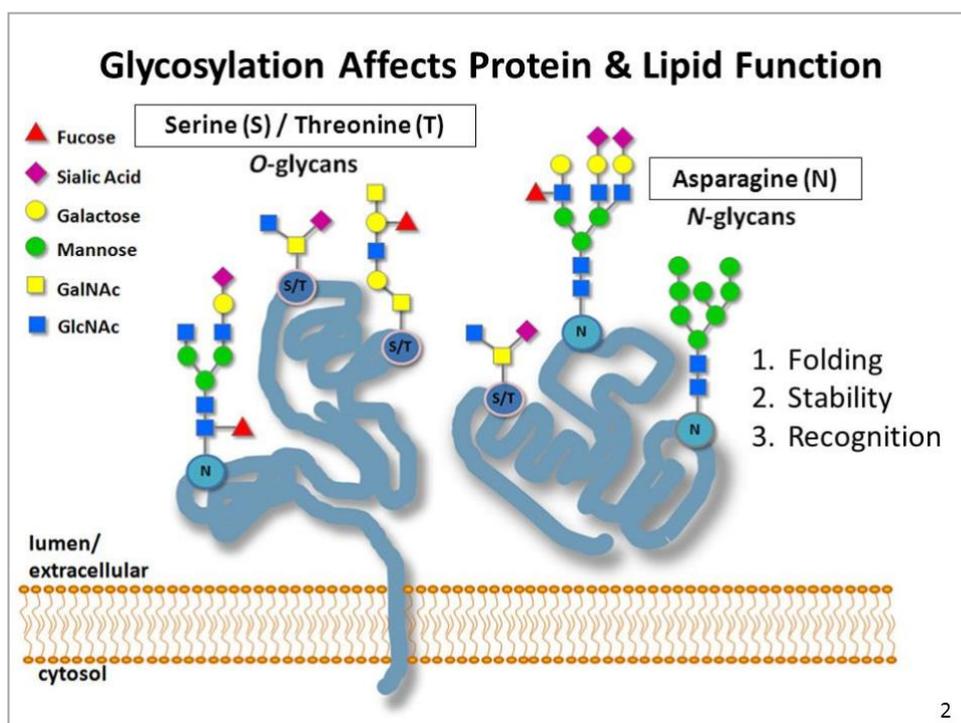


Figure 17 : O-glycosylation et N-glycosylation des protéines. Les sucres O-liés sont fixés de manière covalente à des sérines ou à des thréonines (voire l'hydroxylysine). Les sucres N-liés sont fixés de manière covalente à des asparagines. Ces sucres comportent un motif de base GlcNAc-GlcNAc-Mannose-Mannose-Mannose.

Source : <https://www.neb.com>

Les protéines qui présentent une séquence de **N-glycosylation** (une séquence de type X-Asn-Ser/Threo, dans laquelle X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline) au moment de leur passage dans le REG reçoivent, dans la lumière de ce dernier, un oligosaccharide (gros sucre) à 14 résidus sur l'asparagine de la séquence (**Figure 17**). Cette glycosylation est donc **cotraductionnelle** : elle s'effectue lorsque le polypeptide est en cours de synthèse et de translocation. Le sucre greffé sera ensuite légèrement modifié dans le RE (3 résidus glucose puis un mannose seront supprimés), puis ultérieurement dans l'appareil de Golgi.

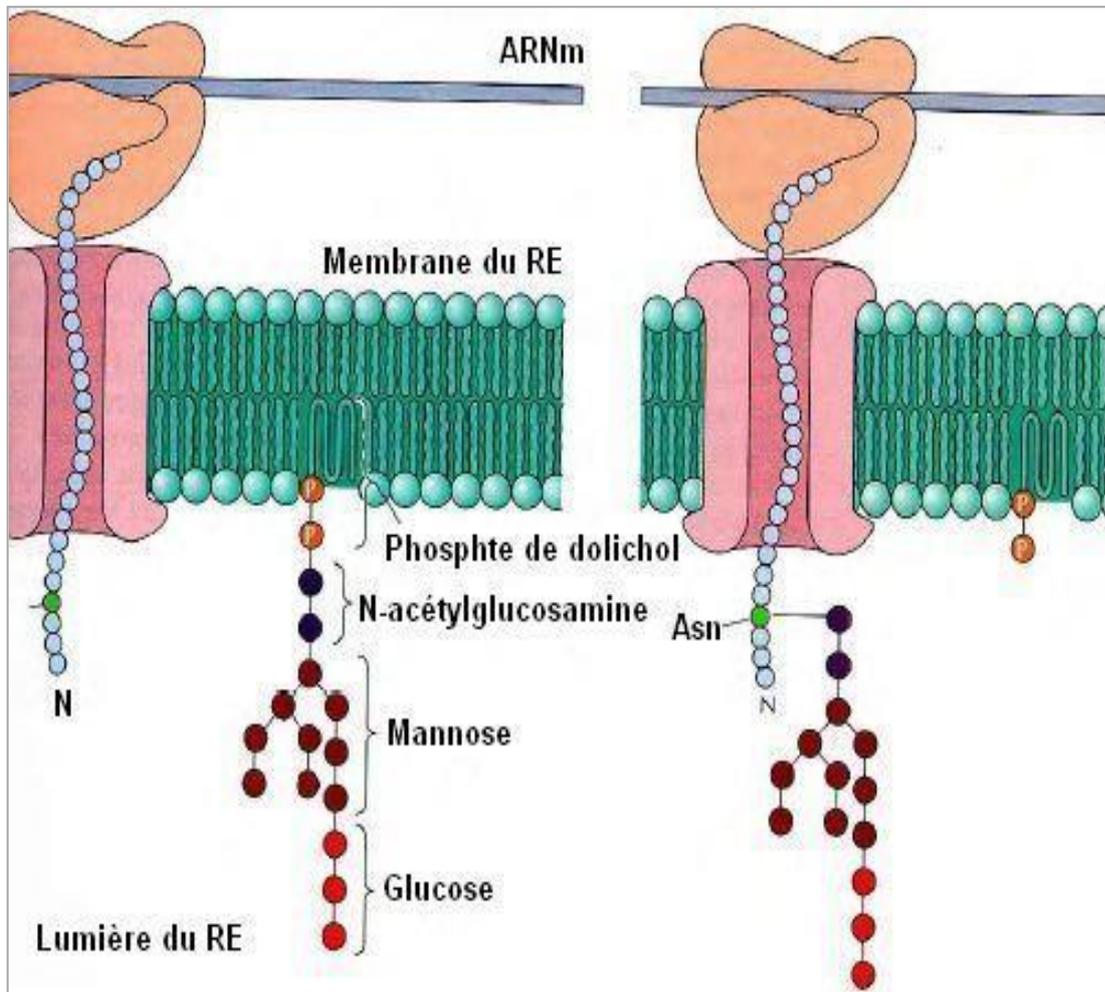


Figure 18 : Fixation du précurseur oligosaccharidique à 14 résidus (oses) sur une asparagine au moment du passage d'un polypeptide dans un translocon du REG. Le précurseur est élaboré par une série d'enzymes qui ajoutent les sucres un par un sur un gros lipide de la membrane du RE, le dolichol phosphate. La synthèse de l'oligosaccharide commence du côté du cytoplasme puis le dolichol effectue un retournement (flip flop) pour passer le sucre du côté de la lumière du RE où s'achève sa construction par d'autres enzymes. C'est une activité enzymatique du translocon (Oligosaccharyl transferase) qui catalyse le clivage de l'oligosaccharide et l'établissement d'une liaison covalente entre ce dernier et le groupement NH₂ de l'asparagine.

3) L'analyse des protéines : la technique de séparation SDS-PAGE et le western Blot

Les protéines d'un échantillon biologique peuvent être séparées les unes des autres par différentes techniques. L'électrophorèse, la SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en particulier, est la technique de séparation des protéines la plus simple et la plus utilisée par les biologistes.

- Séparation des protéines sur gel natif
- Séparation des protéines en SDS-PAGE

https://www.youtube.com/watch?v=E_4pjmDb2o

- Western Blot

Théorie

https://www.youtube.com/watch?v=ZJLRR_Inhcc

En labo

<https://www.youtube.com/watch?v=1h3PvWxMyd4>

Travaux Pratiques

TP1 : Microscopie (cf poly distribué pendant le TP)

TP2 : Extraction d'ADN nucléaire

Extraction d'ADN nucléaire à partir de foie de volaille

Les grandes étapes :

A partir d'un organe (ici le foie), procéder à un fractionnement cellulaire permettant d'obtenir une fraction cellulaire très enrichie en noyaux, suivi d'un fractionnement chimique permettant de purifier l'ADN nucléaire par rapport aux autres composants cellulaires tels que les protéines.

Extraction de noyaux :

1. Disposez très rapidement le foie sur une **boîte de Pétri** posée sur de la glace.
2. Découpez le foie en petits morceaux à l'aide d'un **scalpel**.
3. Transférez les morceaux de foie dans un **Potter** en présence de **10mL de Tampon d'extraction appelé MIA** (Tris/maléate pH7 ; CaCl₂ ; KCl ; Saccharose). Broyez jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
Après avoir retiré le piston, ajoutez **10mL de Tampon MIA** dans le Potter et homogénéisez à l'aide de la baguette en verre.
4. Filtrez l'homogénat (que l'on appellera H) sur une gaze disposée dans un entonnoir. Pressez soigneusement la gaze à la fin de la filtration pour éviter la perte de matériel biologique.
5. Transférez **le filtrat de H** dans un **tube de centrifugation en verre** de 30mL.
6. Prélevez une goutte du filtrat H pour observation au microscope (pour cela déposer cette goutte sur une lame de microscope et ajouter une goutte de vert de méthyle, puis recouvrir l'ensemble avec une lamelle).
7. **Centrifugez** à 1200g (environ 4000 r.p.m.) pendant 10 min.
8. Procédez à l'observation microscopique de la préparation H.
Qu'observez-vous ? Essayez de repérer des cellules entières, des noyaux, des mitochondries, des débris cellulaires...

9. Après centrifugation, vous obtenez un culot C et un surnageant S. Prélevez une goutte de S pour observation au microscope puis éliminez le surnageant (verser dans un bécher).

De même prélevez ensuite un échantillon de C (en grattant la surface du culot) pour observation (procéder ensuite de la même façon que pour S).

Les observations seront réalisées durant la centrifugation (étape 13).

Isolement de l'ADN nucléaire :

10. Remettez le culot C en suspension à l'aide d'une spatule ou baguette en verre dans **5mL de tampon de lyse (TRIS - EDTA - SDS)**. **Que se passe-t-il à cette étape ?**

11. Transvasez-le ensuite dans un **Erlenmeyer**, ajoutez **1,5mL de Perchlorate de sodium (NaClO₄)** et homogénéisez. **Que se passe-t-il à cette étape ?**

12. Sous la sorbonne, ajoutez ensuite **6,5mL** d'un mélange **Chloroforme / Alcool Isoamylique (24 : 1)**.

Fermez rapidement l'**Erlenmeyer** et homogénéisez pendant 5 min pour maintenir l'émulsion. **Que se passe-t-il à cette étape ?**

13. Sous la sorbonne, transférez ce mélange dans un **tube Corex** de 30mL, fermez avec un bouchon à vis et **centrifugez** à 9000 g (8000 r.p.m.) pendant 15min.

14. Durant la centrifugation, procédez à l'observation au microscope des échantillons C et S. **Qu'observez-vous ?**

15. A l'issue de la centrifugation, vérifiez que les phases aqueuse (phase supérieure) et organique (phase inférieure) soient bien séparées.

Recueillez délicatement la phase aqueuse à l'aide d'une **pipette plastique** (sans prélever ni la phase organique, ni la galette blanche de protéines dénaturées se situant à l'interphase) et transférez-la dans un **tube en verre de 15 mL**. Ajoutez lentement **l'éthanol absolu** froid (-20°C). **L'ADN va précipiter à l'interphase (il est devenu insoluble) et vous pourrez ainsi le récupérer en l'enroulant autour d'une pipette pasteur. Vous pourrez le conserver sous cette forme dans un tube rempli d'éthanol** (NB en laboratoire, après insolubilisation par l'éthanol, l'ADN est récupéré par centrifugation ; si l'ADN est propre, le culot est quasiment translucide).

Décrire l'aspect de l'ADN nucléaire obtenu

16. (étape facultative, si le temps le permet)

Transférez l'ADN obtenu dans un microtube Eppendorf puis centrifugez pendant 5 min à 8000 r.p.m. Éliminez le surnageant complètement à l'aide d'une pipette. Observez l'aspect du culot.

Laissez l'éthanol s'évaporer afin de sécher le culot d'ADN nucléaire

Planches techniques

Planche Technique 1 : Comment casser tissus et cellules ?

COMMENT CASSER LES CELLULES ET LES TISSUS

La première étape de purification de la plupart des protéines, consiste à détruire les tissus et les cellules de façon contrôlée.

En utilisant des procédés mécaniques doux, appelés **homogénéisation**, les membranes plasmiques des cellules peuvent être rompues et le contenu cellulaire libéré. Quatre procédés utilisés en routine sont montrés ici :

La soupe épaisse obtenue (appelée **homogénat** ou **extract**) contient les grosses et les petites molécules du cytosol, comme les enzymes, les ribosomes et les métabolites, ainsi que tous les organites entourés membranes.



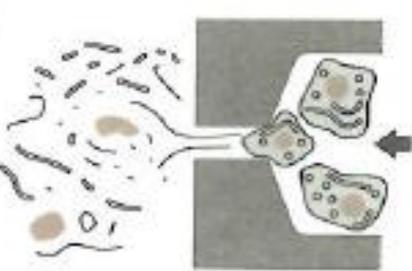
1 Casser les cellules par ultrasons



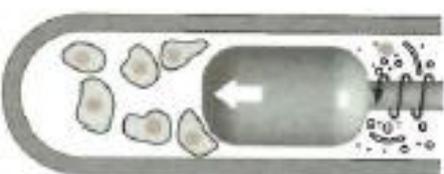
2 Utiliser un détergent doux qui fait des trous dans la membrane plasmique



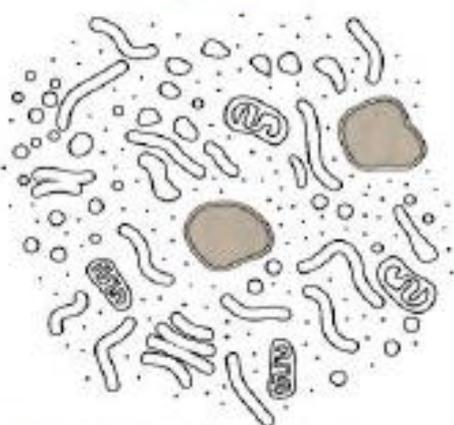
suspension cellulaire ou tissu



3 Forcer, à haute pression, les cellules à passer par un petit trou



4 Ecraser les cellules par la rotation d'un piston épousant exactement les parois d'un récipient de verre



Quand elle est faite avec soin, l'homogénéisation permet de garder intactes la plupart des organites entourés de membrane

Planche Technique 2 : la centrifugation

LA CENTRIFUGEUSE

chambre blindée matériel à sédimenter

rotor à bras mobiles

rotor à angle fixe

réfrigération moteur vide

force centrifuge

tube godet métallique

CENTRIFUGATION

De nombreux fractionnements cellulaires sont effectués dans un autre type de rotor : le rotor à bras mobiles.

HOMOGÉNAT CELLULAIRE avant centrifugation

CENTRIFUGATION

SURNAGEANT : composants plus petits et moins denses

CULOT : composants plus gros et plus denses

AVANT

APRÈS

La centrifugation est le procédé le plus répandu pour séparer l'homogénat en ses différentes parties ou fractions. L'homogénat est placé dans des tubes spéciaux et centrifugé à grande vitesse dans une centrifugeuse ou une ultracentrifugeuse. Les ultracentrifugeuses actuelles tournent à des vitesses pouvant atteindre 100 000 tours par minute et produisent des forces allant jusqu'à 600 000 fois la force de la gravité.

À de telles vitesses, la chambre de la centrifugeuse doit être réfrigérée et sous vide pour que les forces de friction ne chauffent pas l'homogénat. La centrifugeuse est entourée d'une chambre blindée, car un rotor mal équilibré pourrait exploser très violemment en raison de la libération explosive d'énergie. Un rotor à angle fixe peut contenir de plus gros volumes qu'un rotor à bras mobiles, mais le culot se forme moins uniformément.

CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

Des centrifugations répétées, à vitesses croissantes, permettent de séparer les homogénats en leurs différents constituants.

La centrifugation sépare les constituants cellulaires en fonction de leur taille et de leur poids. Les composants les plus gros et les plus denses sont soumis à la force centrifuge la plus grande et se déplacent le plus rapidement. Ils sédimentent en culot au fond du tube, tandis que les constituants plus petits restent en suspension au-dessus, dans ce qu'on appelle le surnageant.

homogénat cellulaire

CENTRIFUGATION À FAIBLE VITESSE

SURNAGEANT 1

CENTRIFUGATION À VITESSE MOYENNE

SURNAGEANT 2

CENTRIFUGATION À GRANDE VITESSE

SURNAGEANT 3

CENTRIFUGATION À TRÈS GRANDE VITESSE

CULOT 1 : cellules entières, noyaux, cytosquelette

CULOT 2 : mitochondries, lysosomes, peroxysomes

CULOT 3 : microsomes, autres petites vésicules

CULOT 4 : ribosomes, virus, grosses macromolécules

Planche Technique 3 : Utilisation des radioisotopes en Biologie

Les isotopes (même nombre d'électrons, donc mêmes propriétés chimiques ; masses différentes) radioactifs (instables, se désintègrent) le plus souvent utilisés comme "marqueurs" en Biologie sont le ^{32}P , le ^{14}C , le ^{35}S et le ^3H .

Leur utilisation se base sur le fait qu'un organisme ne fait pas la distinction entre des molécules marquées et non marquées.

Ces isotopes sont utilisés intégrés à un précurseur de la molécule que l'on veut étudier. De ce fait, si on fournit à un organisme un précurseur radioactif, **il va l'utiliser pour ses synthèses cellulaires.**

Par exemple, dans une molécule de leucine (acide aminé), un atome d'hydrogène (^1H) est remplacé par un atome de tritium (^3H). On obtient alors un précurseur radioactif : la leucine tritiée. Si on fournit à une cellule cet acide aminé radioactif, la probabilité qu'il soit incorporé dans un polypeptide est la même que pour le même acide aminé non marqué présent dans le milieu. Ceci ne peut évidemment être réalisé que si la macromolécule est en cours de synthèse.

NB. Les radio-isotopes intégrés dans les macromolécules ne modifient en rien leurs propriétés chimiques.

On peut repérer les molécules ayant intégré un isotope radioactif par le **rayonnement** que cet isotope émet lors de ses désintégrations. Suivant la nature de l'expérience, on repère les composés radioactifs soit par autoradiographie (voir fiche 4), soit en mesurant la radioactivité avec précision à l'aide d'un compteur Geiger ou à scintillation (amplification du signal).

Macromolécules	Précurseurs	Précurseur de choix
ADN	Nucléotides	^3H -desoxythymidine (nucléoside*)
ARN	Nucléotides	^3H -uridine (nucléoside*)
Protéines	Acides Aminés	ex : ^3H - leucine, ^{35}S -methionine

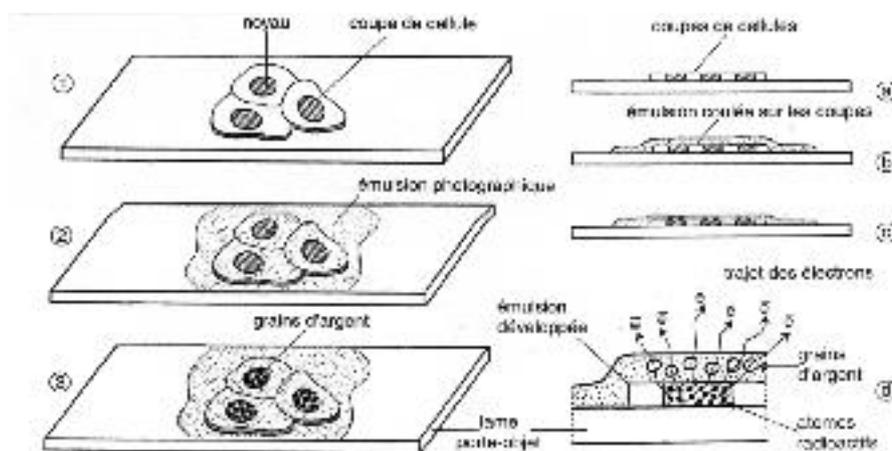
Planche Technique 4 : Autoradiographie

Les molécules radioactives sont visualisées par autoradiographie.

On utilise un film ou une émulsion photographique sensible aux radiations :

- utilisation d'un **film autoradiographique** pour les plaques de chromatographie, les gels d'électrophorèse ou les membranes ; le film est placé en contact étroit avec le matériel contenant les molécules radioactives

- pour les coupes histologiques, utilisation d'une **émulsion** déposée directement sur la coupe. Après un temps d'exposition variable, le développement de l'émulsion révèle, sous forme de petits grains d'argent, la répartition du matériel marqué.



Exemple : autoradiographie d'une coupe histologique (superposition des images cytologique et autoradiographique)

Planche Technique 5 : Expériences de pulse-chasse ou « pulse-chase »

Les **marqueurs radioactifs** permettent le suivi à la trace du devenir dans l'espace et le temps de chaque espèce moléculaire.

- **pulse** : on ajoute le composé marqué dans le milieu pendant une brève période. Si le composé entre dans la cellule, il va se mélanger aux composés préexistants non marqués ; il y a alors incorporation au hasard des molécules marquées et non marquées dans une macromolécule mais uniquement si cette macromolécule est en cours de synthèse.

L'autoradiographie permet de déterminer le **site de synthèse** de la macromolécule correspondante.

- **chasse** : on élimine le composé radioactif du milieu et on le remplace par un excès du même composé non radioactif. En raison de la forte dilution du traceur radioactif dans la cellule, les nouvelles synthèses n'incorporeront pratiquement plus que des précurseurs non radioactifs.

On suit ensuite à intervalles réguliers le devenir (déplacement éventuel) de la radioactivité introduite au moment du pulse.

De même que le baguage des oiseaux permet de déterminer leurs aires de répartition, leurs voies de migration et leur durée de vie dans les conditions naturelles, le marquage isotopique permet de détecter une molécule dans un mélange complexe, de la doser par les méthodes de comptage, et même de visualiser son devenir dans un organisme, un organe, une cellule, un organite...

Planche technique n°6

Electrophorèse d'acides nucléiques et protéines : Généralités

L'électrophorèse est une technique analytique permettant de séparer des molécules chargées électriquement dans un champ électrique.

L'électrophorèse monodimensionnelle, généralités

Les principales espèces moléculaires séparées par ces techniques sont
les acides aminés, les peptides et les protéines
les acides nucléiques : ADN et ARN

Réalisation pratique

- * La séparation se fait sur un support électriquement inerte : feuille de cellulose, gel d'agarose (mailles lâches) ou de polyacrylamide (mailles serrées).
- * Le support peut être horizontal ou vertical
- * Ce support est imbibé de solution saline conductrice et les deux extrémités sont plongées dans deux cuves distinctes reliées chacune à une électrode d'un générateur électrique.
- * Les molécules à séparer sont déposées à mi-distance des électrodes ou à l'extrémité du gel.
- * Lorsque l'on applique le courant électrique, ce dernier passe obligatoirement par le support et entraîne alors les molécules déposées selon leur charge.

Exemple schématique

Situation au départ
Vue en coupe

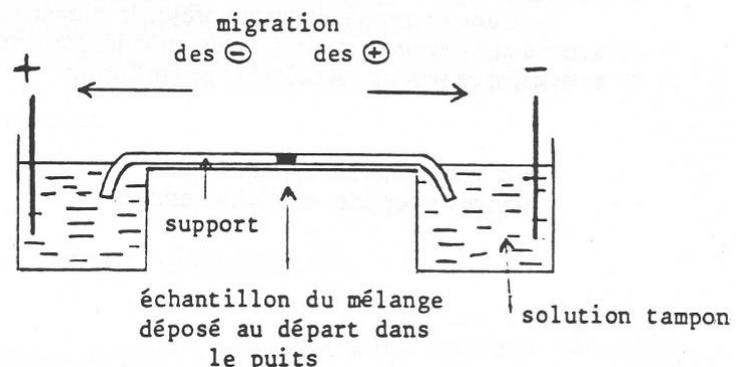
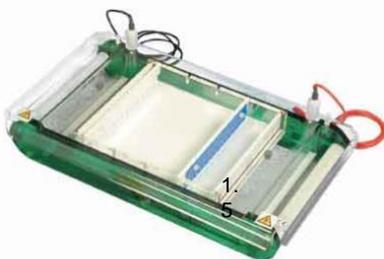


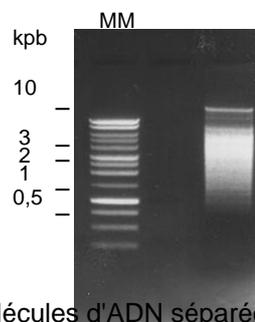
Planche technique 7

L'électrophorèse d'acides nucléiques

- les différents acides nucléiques (chaînes linéaires de nucléotides) ont naturellement le même rapport charge/masse : une charge - / nucléotide liée à la présence des PO_4^- .
 - Les molécules sont séparées selon leur taille : la charge propre de la molécule n'intervient pas dans le processus de séparation, ils ne peuvent donc être séparés qu'en fonction de leur masse moléculaire.
 - Le support doit être un tamis moléculaire, d'où l'utilisation de gel tridimensionnel (à mailles plus ou moins serrées) d'agarose (cas le plus fréquent) ou d'acrylamide (dans les cas nécessitant une séparation plus fine des molécules). Ce support peut être horizontal (agarose) ou vertical (agarose ou polyacrylamide). De manière générale, l'électrophorèse des acides nucléiques se fait en gel d'agarose (pores plus lâches que ceux de la polyacrylamide).
- * Le support est imbibé de solution saline conductrice et les deux extrémités sont plongées dans deux cuves distinctes reliées chacune à une électrode d'un générateur électrique.
- Le dépôt se fait à proximité de la cathode, les acides nucléiques migrent vers l'anode, leur vitesse de migration est inversement proportionnelle à leur taille (cf schéma général électrophorèse horizontale).
 - Selon la taille des molécules d'acides nucléiques à séparer, on peut jouer sur la porosité du gel en augmentant ou diminuant la concentration du composant principal du gel.
- * Après migration, les acides nucléiques sont révélés par une coloration au bromure d'éthidium (BET) (observation de la fluorescence sous UV).



Appareil d'électrophorèse pour gel horizontal



Molécules d'ADN séparées sur gel d'agarose horizontal et visualisées grâce au BET

MM : molécules étalons de masses moléculaires connues (1pb = 660 Da = 660 g/mole)

Planche technique 8

L'électrophorèse de protéines

I- séparation des molécules selon leur rapport charge / masse

*Lors de cette électrophorèse, les protéines ne subissent aucune modification de conformation, elles restent fonctionnelles, d'où le terme **d'électrophorèse en conditions natives (non dénaturantes)**.

*Le dépôt peut se faire au centre du support (généralement support à mailles lâches feuille de cellulose). Les molécules restent en surface du support.

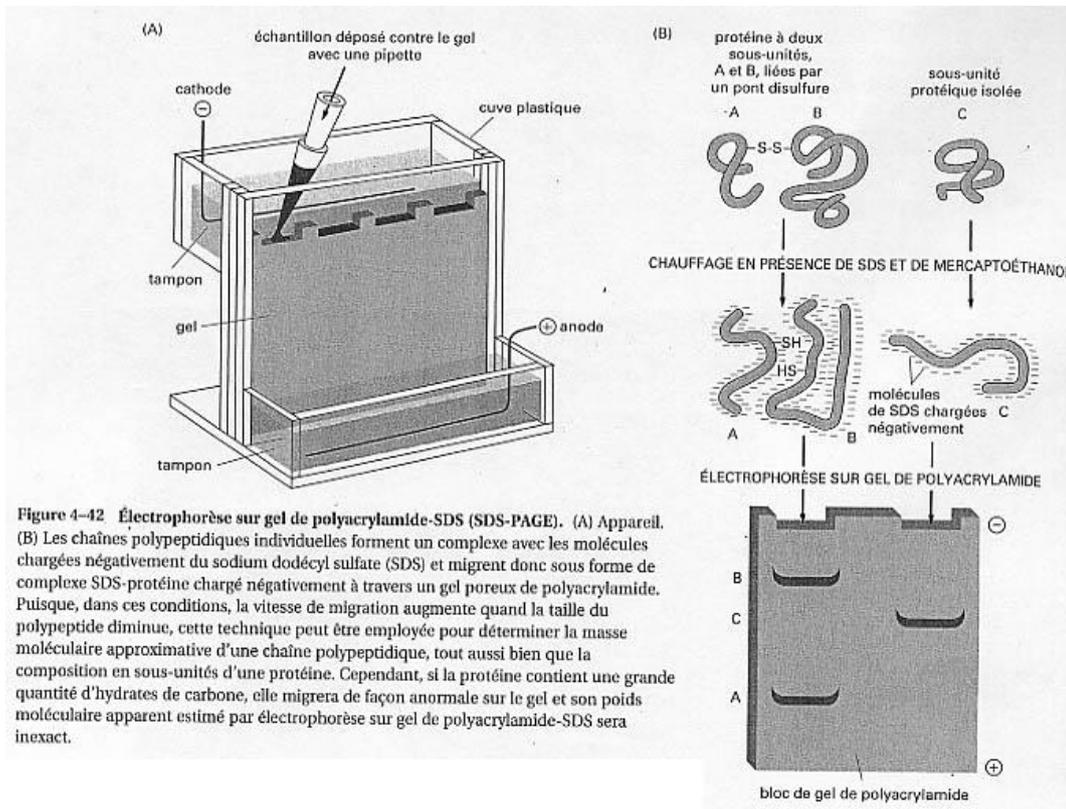
Les molécules ayant une charge globale négative se déplaceront vers l'anode.

Les molécules chargées globalement positivement se déplaceront vers la cathode.

*La vitesse de déplacement dépend à la fois de la charge globale et de la masse.

II- séparation des molécules selon leur masse globale

- La charge propre de la molécule n'intervient plus dans le processus de séparation, seules comptent les différences de taille.
- Cette fois, le support doit être un tamis moléculaire, d'où l'utilisation de gel d'agarose ou d'acrylamide (à mailles plus ou moins serrées) car les molécules vont migrer dans le support.
- Pour que la charge propre des protéines n'intervienne plus dans la migration, l'expérimentateur les recouvre d'un excès de charges négatives sous la forme de molécules de détergent, le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS va se lier aux régions hydrophobes des protéines, provoquant leur déroulement et donc leur dénaturation.
- Le déploiement total de la protéine est obtenu en présence d'agent réducteur (DTT, beta - mercapto-ethanol) qui casse les ponts di-sulfure.
- Les protéines se retrouvent dissociées en leurs sous unités, sous forme de chaînes d'acides aminés entièrement chargées négativement et ne sont plus fonctionnelles d'où le terme **d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE pour SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)**.
- Cette fois, le dépôt doit se faire à proximité de la cathode, les polypeptides migrent alors vers l'anode, la vitesse de migration est inversement proportionnelle à la taille de ces molécules. Plus la molécule est de petite taille, plus elle se déplace rapidement dans les mailles du gel.
- Selon la taille des protéines étudiées, on pourra modifier le profil de séparation en jouant sur la taille des mailles du gel en augmentant ou diminuant la concentration du composant principal du gel (ici l'acrylamide). Plus le gel est riche en acrylamide, plus les mailles sont serrées, moins les molécules de grandes tailles pourront se déplacer facilement.



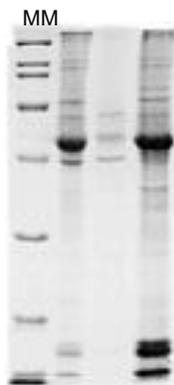
III- Visualisation des protéines et détermination des tailles

Les molécules étudiées n'absorbant pas dans le visible (non colorées), il est nécessaire de les révéler par une coloration spécifique :

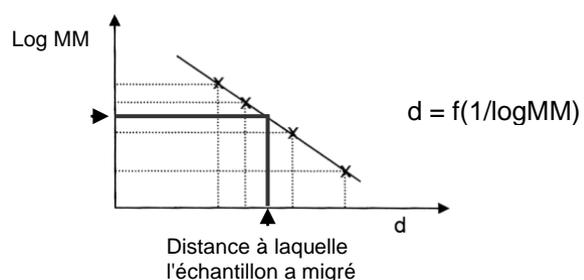
- soit au bleu de Coomassie
- soit aux sels d'argent (méthode plus sensible)

Afin de connaître la taille des molécules (protéines ou acides nucléiques), on étalonne les gels en faisant migrer parallèlement aux échantillons étudiés des molécules dont la masse moléculaire est connue.

Gel de polyacrylamide
protéines colorées au bleu de Coomassie



MM : molécules étalons de masses moléculaires connues



La distance de migration dans le gel est inversement proportionnelle au logarithme de la masse moléculaire.

Planche technique 9 : Mise en évidence d'une protéine spécifique par « Western Blot »

Lors de l'électrophorèse en gel d'acrylamide, les protéines séparées dans le gel sont enfermées dans un « labyrinthe » tridimensionnel qui les rend inaccessibles sur le plan moléculaire. Si on veut accéder aux molécules, il faut sortir les protéines du gel sans modifier leur distribution électrophorétique et les fixer sur une membrane. Cette étape est appelée « transfert ». Celui-ci se fait dans un champ électrique puisque les protéines sont déjà chargées négativement.

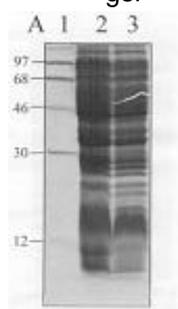
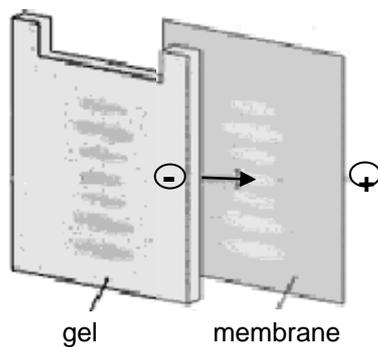
Une fois sur la membrane, la protéine recherchée peut être localisée par immunodétection (à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt) en utilisant comme traceur une enzyme dont on révèle la présence par son activité biologique.

Cette technique est appelée **WESTERN BLOT**

1. Electrophorèse

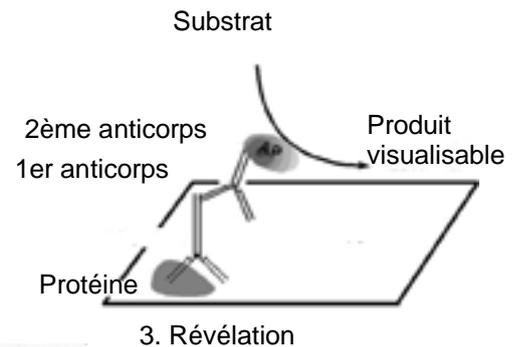


2. Electro-transfert



Coloration du gel

2 et 3 : Protéines totales de cellules
1 : molécules étalon de masse moléculaire connue (en kDa ; 1 Da = 1 g/mole)



3. Révélation



Révélation après western blot
anticorps dirigé spécifiquement contre une protéine

Détection d'une protéine après électrophorèse sur gel : "Western blot"

Planche Technique TP1 : Ordres de grandeur (TP1)

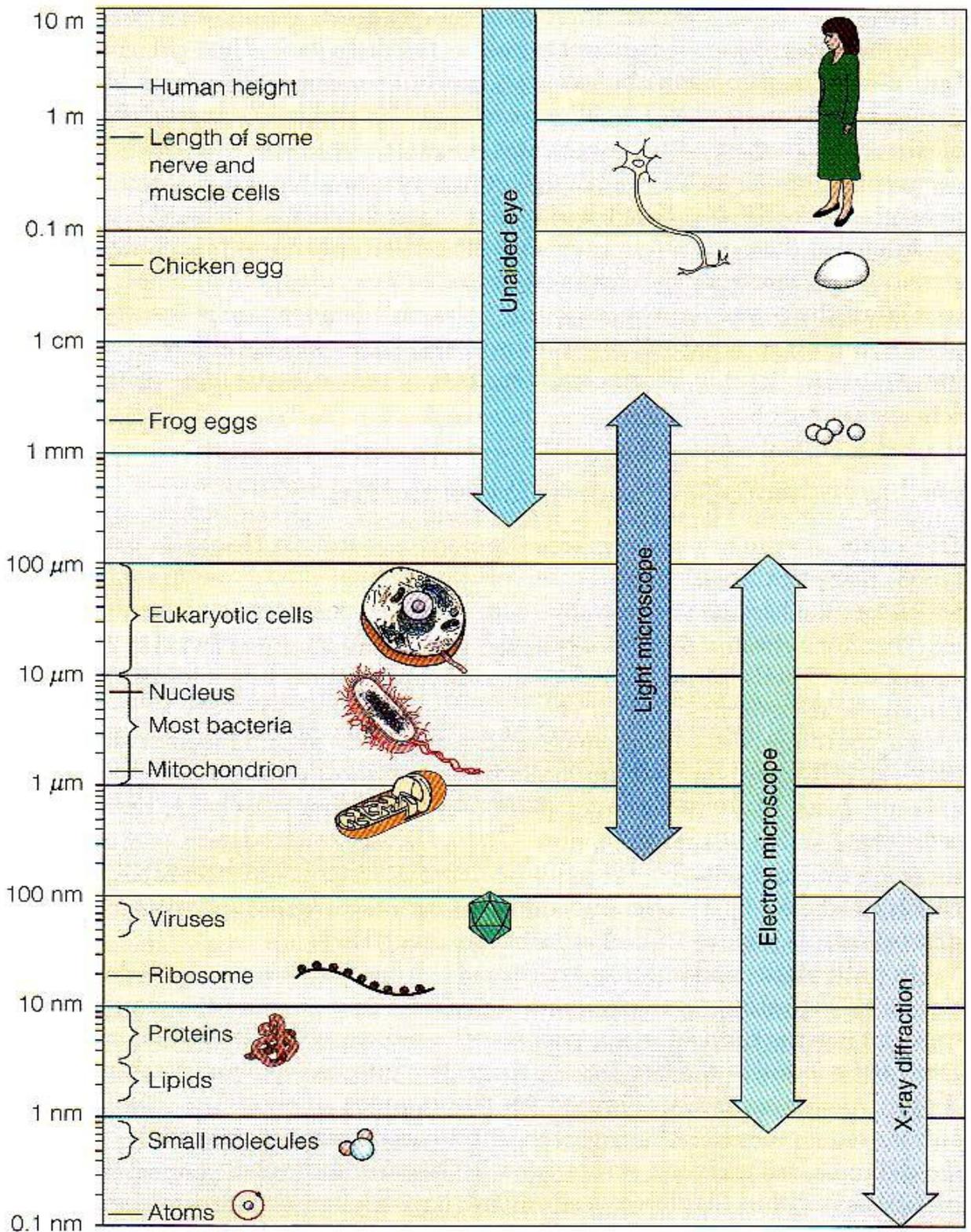
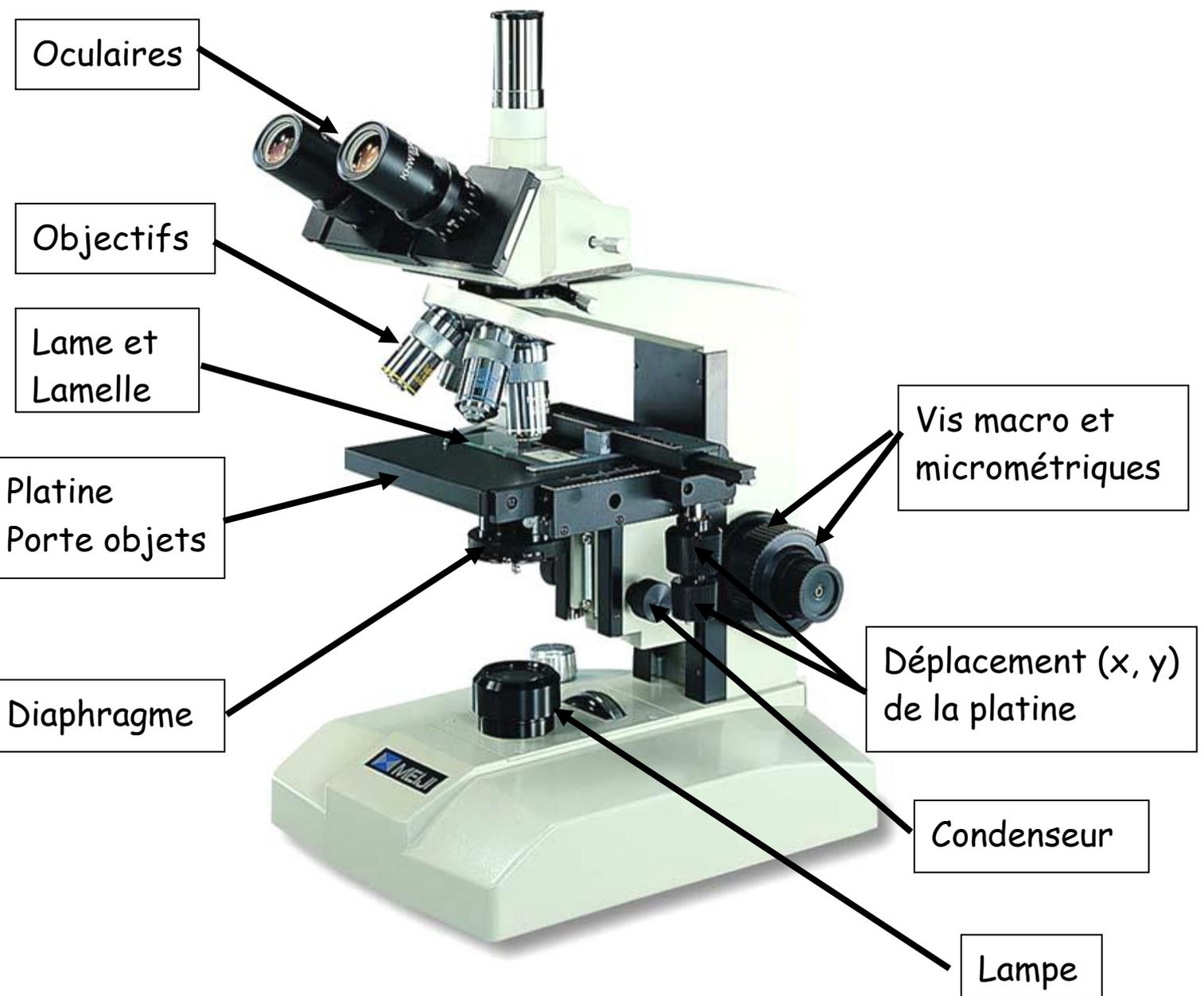


Planche Technique TP1 : Le microscope (TP1)



Conseils d'utilisation du microscope

Réglages à effectuer

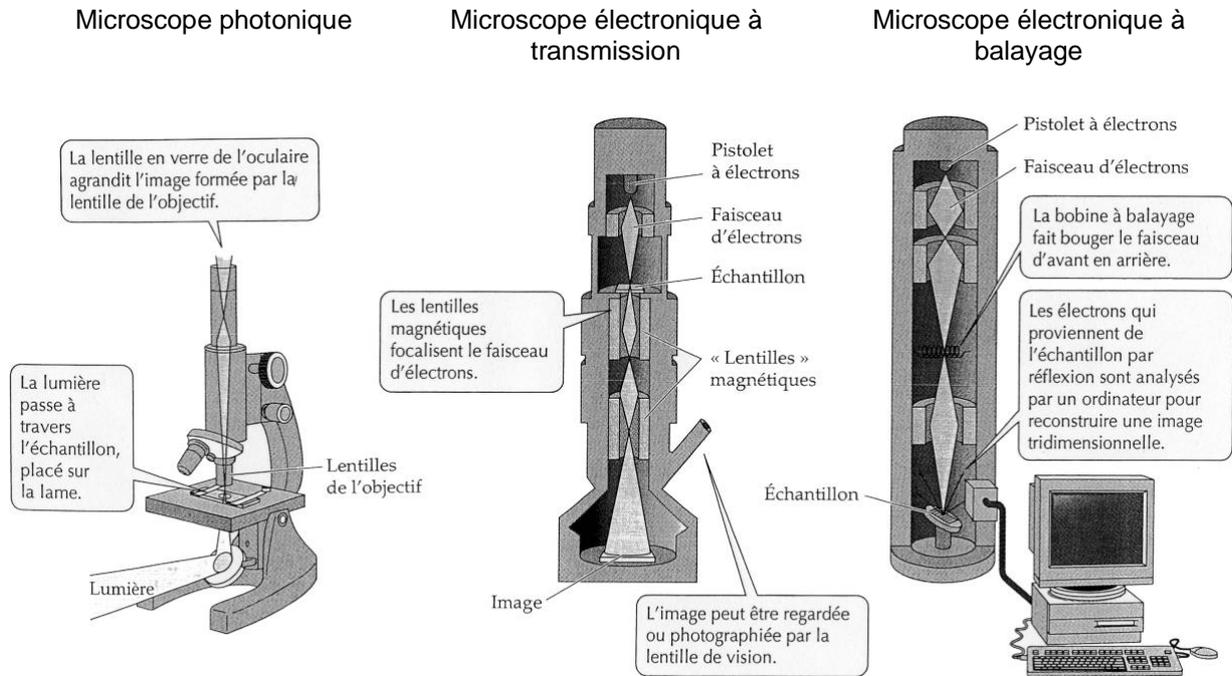
- A. Baissez la platine porte-objets au maximum. Placez la lame à observer sur la platine et fixez-la avec les valets.
- B. Sélectionnez le plus petit objectif en tournant la tourelle porte-objectifs.
- C. Montez la platine **sans regarder dans les oculaires** pour vérifier que l'objectif ne casse pas la lame. Les objectifs x4, x10 ne touchent jamais la lame, mais les objectifs plus gros (x40 et x100) nécessitent de monter avec précaution la lame au contact de l'objectif avant la mise au point.
- D. Regardez dans l'oculaire pour faire la mise au point **toujours en descendant la platine**, ainsi vous ne casserez pas les lames.
- E. Réalisez une mise au point grossière avec la vis macrométrique, puis affinez avec la vis micrométrique.
- F. Centrez correctement l'objet étudié dans le champ de vision.
- G. Réglez l'intensité lumineuse de la lampe en tournant le bouton du potentiomètre au maximum de sa puissance pour obtenir une **lumière parfaitement blanche**.
- H. Réglez la quantité de lumière avec le diaphragme, puis utilisez le condenseur pour affiner la qualité de l'image.
NB L'utilisation correcte du condenseur est indispensable pour obtenir une mise au point nette.
- I. Pour augmenter le grossissement, enclenchez un objectif plus gros en tournant la tourelle porte-objectifs, sans bouger la platine. Pour l'observation à immersion faites basculer l'objectif x40 et, si vous souhaitez enclencher l'objectif x 100, déposez une goutte d'huile à immersion sur la zone de la préparation à observer. **Nettoyer soigneusement l'objectif après observation ! Ne jamais revenir vers des objectifs inférieurs !**

Problèmes courants et solutions proposées

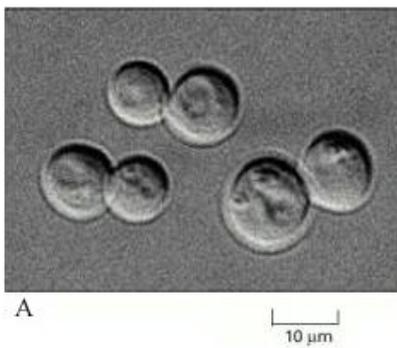
Problèmes rencontrés	Solutions proposées
J'ai changé de grossissement et je ne vois plus rien	Reprenez le plus petit objectif pour recentrer l'objet
L'objet observé est peu visible et jaunâtre	Vérifiez que le potentiomètre est au maximum de sa puissance
L'objet observé est trop éclairé et peu net	Diminuez la quantité de lumière en fermant le diaphragme
La mise au point est nette mais l'objet semble trouble	Le condenseur est mal réglé
L'objet observé semble granuleux	Le condenseur est trop haut, il touche probablement la lame
Comment calculer le grossissement de l'observation	Multiplier le grossissement des oculaires (x 10 ou x 16) par celui de l'objectif sélectionné

TECHNIQUES D'OBSERVATION DES CELLULES : POUR EN SAVOIR PLUS...

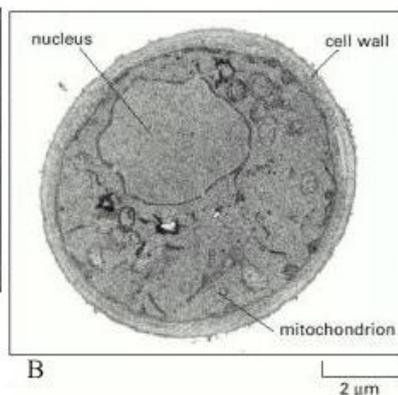
LES MICROSCOPES PHOTONIQUE ET ELECTRONIQUES



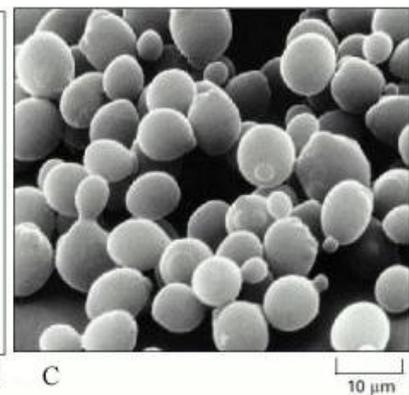
Cellules de Levure (*Saccharomyces cerevisiae*) observées en :



Microscopie photonique

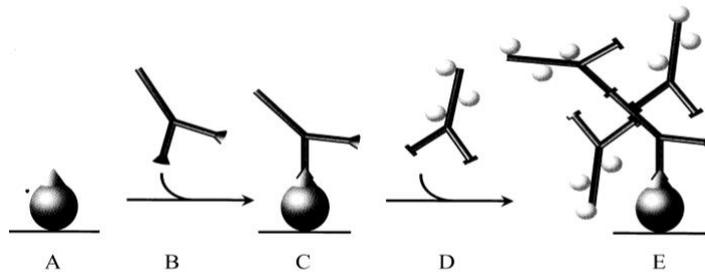


Microscopie électronique à transmission



Microscopie électronique à balayage

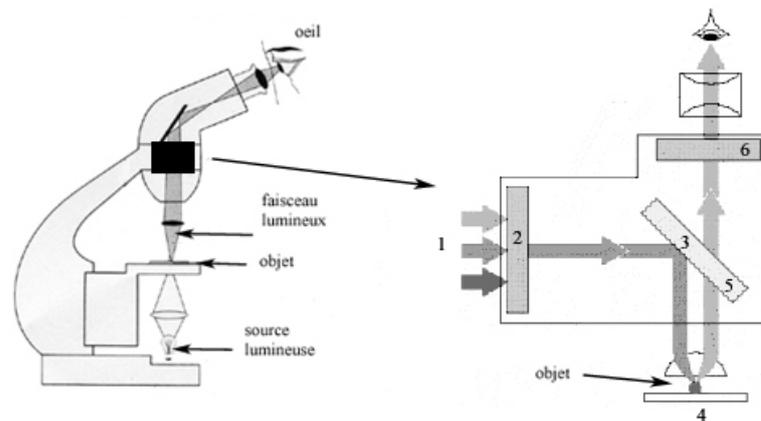
PROTOCOLE D'IMMUNODETECTION



- A : Antigène dans le matériel biologique
B : Incubation avec le 1^{er} anticorps
C : Reconnaissance de l'antigène par l'anticorps
D : Incubation avec un 2^{ème} anticorps couplé à un marqueur (enzyme, bille d'or, fluorochrome)
E : Reconnaissance du 1^{er} anticorps par le 2^{ème} anticorps.

LE MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE

Principe :



- 1 : Source lumineuse
2 : Filtre laissant passer les longueurs d'onde d'excitation
3 : Miroir dichroïque réfléchissant les longueurs d'ondes d'excitation
4 : Les fluorochromes localisés sur l'objet après excitation réémettent de la lumière
5 : Miroir dichroïque laissant passer les longueurs d'ondes d'émission
6 : Filtre ne laissant passer que les longueurs d'onde spécifique du fluorochrome.

LOCALISATION DE PROTEINES DANS DES CELLULES VIVANTES : GFP

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine qui provient de la méduse *Aequora victoria*. Elle est impliquée dans la bioluminescence émise par cet organisme. Elle contient un chromophore capable d'absorber la lumière bleue et d'émettre une fluorescence verte. La fluorescence est une propriété de certaines molécules, capables d'absorber une radiation de longueur d'onde donnée et de réémettre, après un bref intervalle de temps, une radiation de longueur d'onde plus élevée. Le gène codant la GFP a été cloné et séquencé dans les années 1990 et la protéine possède 238 acides aminés.

Applications

La GFP peut servir de marqueur moléculaire, en effet elle garde sa fluorescence quand elle est fusionnée à une autre protéine.

Par des techniques de génie génétique, le gène codant la GFP est "fusionné" en phase au gène codant la protéine que l'on veut étudier. Cette fusion est transférée dans le noyau d'une cellule (figure1). Il est alors possible d'observer, au microscope à fluorescence, la localisation de la protéine-GFP synthétisée, dans des cellules vivantes (dans la membrane plasmique, les mitochondries, le noyau..) (figure2). Cette technique est aussi très utilisée pour suivre la dynamique d'une protéine au cours du temps ; par exemple : le trafic intracellulaire d'une protéine, le déplacement des organites à l'intérieur d'une cellule, la migration cellulaire, l'organogenèse, la migration d'un virus dans un organe ou un organisme..., peuvent être ainsi visualisés en temps réel. La GFP est donc utilisée comme une étiquette : on peut visualiser n'importe quel objet si l'on est capable d'y accrocher la GFP.

Figure 1

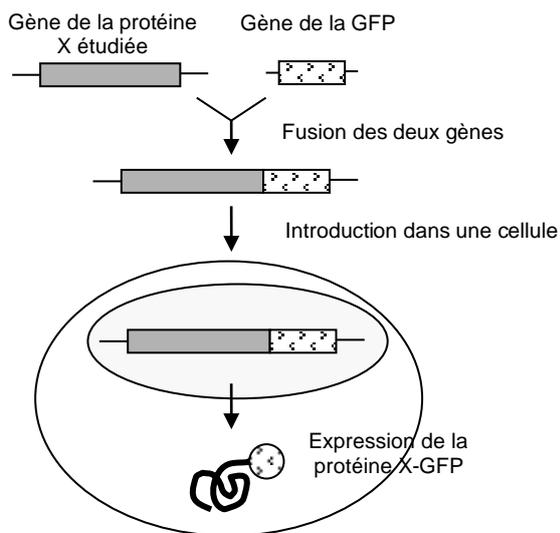
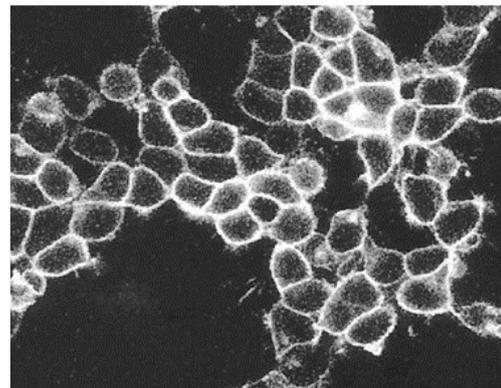


Figure 2 :



Visualisation d'un récepteur-GFP de la membrane plasmique dans des cellules de mammifères en culture

Planche Technique TP2 : Matériel de laboratoire utilisé pendant le TP



Boite de Pétri



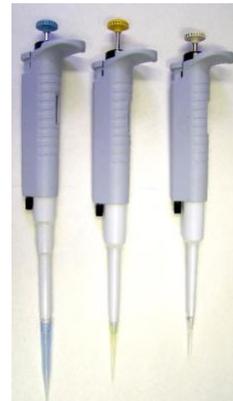
Erlenmeyers



Bechers



Pipettes Pasteur



Pipettes automatiques

Planche Technique TP2 : Savoir utiliser correctement un pipetman

Presentation

Le mécanisme de pipetage comprend un piston en acier inoxydable, poli, un joint d'étanchéité et un joint torique qui ne requièrent aucune lubrification. La poignée est moulée dans un matériau à très faible coefficient de variation thermique.

Le Pipetman s'utilise avec des cônes en polypropylène.

Les cônes jetables évitent toute contamination d'un échantillon à l'autre.

De plus, pour assurer une protection efficace de l'utilisateur contre toute contamination éventuelle, le Pipetman est équipé d'un éjecteur de cône.

Le Pipetman comprend un système d'ajustement du volume qui permet de compenser les variations de volume dues à des liquides dont la viscosité et la densité sont différentes de celles de l'eau.

Le volume nominal de chaque modèle est inscrit sur le dessus du bouton poussoir.

Utilisation

Monter le cône approprié sur l'embout porte-cône. Pour assurer l'étanchéité, appuyer fermement le cône sur l'embout en effectuant un mouvement de rotation.

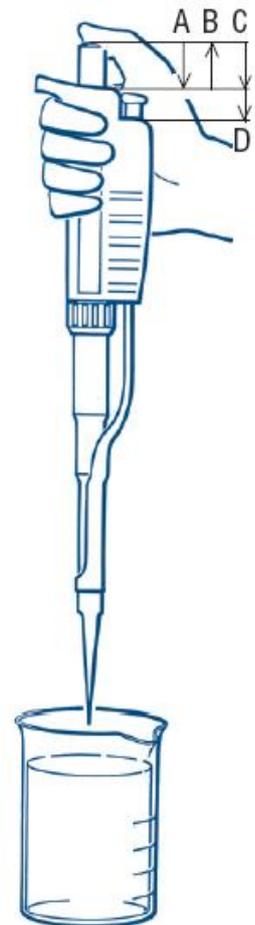
Ne jamais manipuler un liquide avec un Pipetman sans l'avoir au préalable équipé d'un cône.

Aspiration

- Presser le bouton poussoir jusqu'à la première butée positive (Figure A).
 - Tout en maintenant le Pipetman vertical, plonger l'extrémité du cône dans l'échantillon à prélever (profondeur d'immersion de 2 à 4 mm).
 - Relâcher lentement et régulièrement le bouton poussoir pour aspirer le liquide dans le cône (Fig. B).
 - Attendre 1 seconde et retirer le cône du liquide. Essuyer éventuellement les gouttelettes de liquide qui pourraient adhérer sur les parois extérieures du cône avec un papier non tissé (par exemple, mouchoir de cellulose).
- Prendre soin de ne pas toucher l'orifice du cône.

Distribution

- Placer l'extrémité du cône de façon à former un angle de 10 à 40° contre la paroi interne du tube récepteur. Presser doucement le bouton poussoir jusqu'à la première butée positive (Fig. C).
- Attendre 1 seconde. Presser complètement le bouton poussoir afin d'expulser la dernière fraction de liquide (Fig. D).
- Tout en maintenant le bouton poussoir complètement pressé, retirer le Pipetman tout en glissant le cône le long de la paroi du tube récepteur.
- Relâcher complètement le bouton poussoir.
- Ejecter le cône souillé en pressant le bouton de l'éjecteur. Il est nécessaire d'utiliser un nouveau cône si un liquide différent doit être pipeté.



Recommandations

Les recommandations ci-dessous vous permettront d'obtenir du Pipetman les meilleures performances de justesse et de reproductibilité.

- **Le Pipetman doit être manipulé doucement et régulièrement.**
- **La profondeur d'immersion du cône dans l'échantillon doit être la plus petite possible. Eviter de la faire varier de façon importante au cours de l'aspiration.**
- **Maintenir le Pipetman en position verticale.**
- **Il est nécessaire de changer de cône lorsque des liquides différents sont pipetés ou lorsque vous souhaitez ajuster le volume.**
- **Il est impératif de changer de cône lorsqu'une goutte de liquide reste piégée à l'extrémité du cône.**
- **Le liquide ne doit jamais entrer dans l'embout porte-cône.**
Pour cela :
 - **Presser et relâcher le bouton poussoir avec douceur.**
 - **Ne jamais mettre la pipette, poignée vers le bas avec du liquide dans le cône.**
 - **Ne jamais poser la pipette à plat lorsque le cône contient du liquide.**

En cas de bulles d'air dans le cône lors de l'aspiration d'un échantillon :

- Rejeter l'échantillon dans son tube original.
 - Vérifier que l'immersion du cône dans l'échantillon est correcte pendant l'aspiration.
 - Pipeter l'échantillon plus lentement.
- Si la bulle persiste, changer de cône.

Reglage Du Volume

Le volume du liquide à aspirer doit être réglé grâce au volumètre.

Les chiffres sont colorés soit en noir, soit en rouge pour indiquer la position de la décimale, en fonction des modèles.

Le volume peut être réglé en tournant la vis ou le bouton poussoir.

Le bouton poussoir est plus facile et plus rapide à utiliser si vous portez des gants.

La vis peut, elle, être utilisée pour atteindre précisément le volume désiré.

Lors du réglage du volume, pour obtenir le maximum de précision, régler doucement le volume en faisant attention à ne pas dépasser la graduation.

Veillez à ne jamais dépasser la graduation maximale.

Model	Color of volumeter numbers		
	Black	Red	Increment
P2	μL	0.01 μL	0.002 μL
P10 to P20	μL	0.1 μL	0.02 μL
P100-P200	μL	-	0.2 μL
P1000-P5000	0.01 mL	mL	0.002 mL
P10mL	mL	0.1 mL	0.02 mL

Apprendre à lire le volumètre des pipetman

