

Les molécules du vivant : Origine et fondements moléculaires de l'hérédité

Philippe Vernier

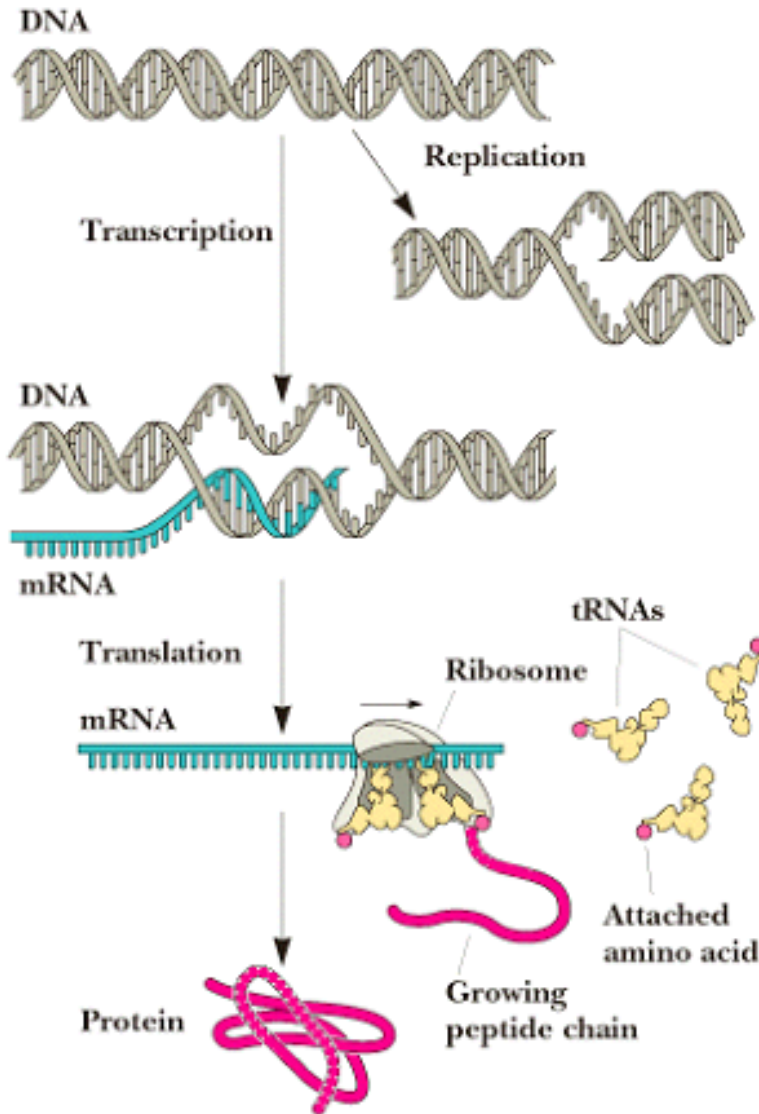
Institut des Neurosciences Paris-Saclay,
C.N.R.S., Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette

philippe.vernier@cnr.fr

Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot
CEA Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette



Le dogme central de la biologie moléculaire



Replication

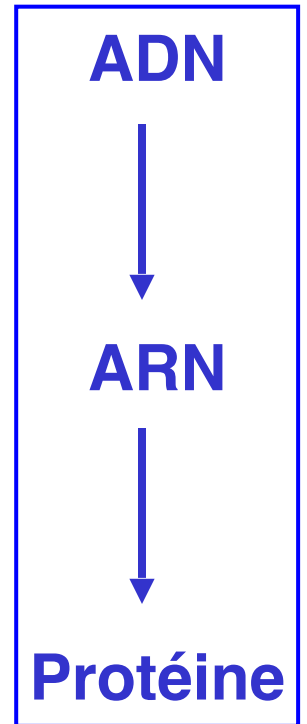
DNA replication yields two DNA molecules identical to the original one, ensuring transmission of genetic information to daughter cells with exceptional fidelity.

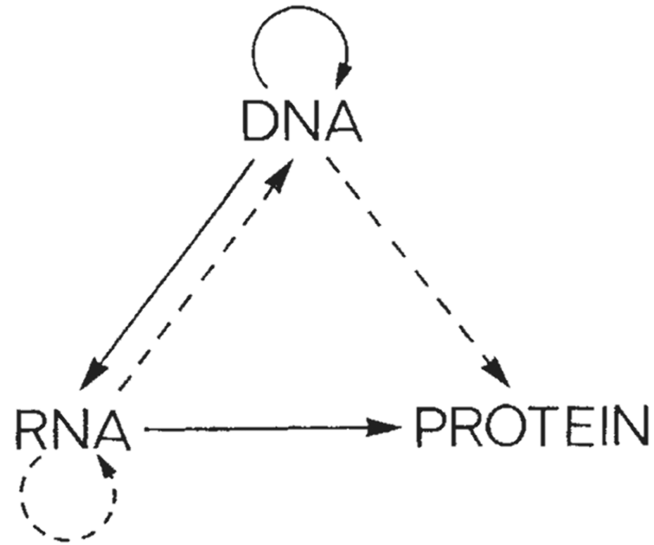
Transcription

The sequence of bases in DNA is recorded as a sequence of complementary bases in a single-stranded mRNA molecule.

Translation

Three-base codons on the mRNA corresponding to specific amino acids direct the sequence of building a protein. These codons are recognized by tRNAs (transfer RNAs) carrying the appropriate amino acids. Ribosomes are the "machinery" for protein synthesis.





Central Dogma of Molecular Biology

by

FRANCIS CRICK

MRC Laboratory of Molecular Biology,
Hills Road,
Cambridge CB2 2QH

The central dogma of molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that such information cannot be transferred from protein to either protein or nucleic acid.

Les acides nucléiques assurent le transfert de l'information génétique dans les cellules

- L'information est encodée dans une molécule d'ADN qui est transcrite en molécule d'ARN
- La séquence de la molécule d'ARN est "lue" grâce à un "code" et traduite en une séquence d'acides aminés qui forme une protéine.

La génétique et l'expression des gènes

Ce dogme, qui associe à un gène l'expression d'une protéine est sérieusement battu en brèche depuis de nombreuses années par les découvertes de la biologie moléculaire.

Le gène, version originale:

- Unité de transmission (des caractères héréditaires)
- Unité de recombinaison
- Unité de mutations

L'évolution du concept de gène:

- Un gène-une protéine
- Gènes "interrompus" (les introns)
- Epissage alternatif
- Transcription et terminaison alternatives
- Les transposons (gènes « sauteurs »)
- Les micro-ARN
- Les histones et leurs modifications
- La méthylation de l'ADN

Du gène à l'ADN

**Idées, concepts et découvertes:
Deux voies longtemps parallèles**

*“On ne connaît pas complètement une science tant qu'on en sait pas l'histoire.”
Auguste Comte*

La découverte de l'ADN

FELIX HOPPE-SEYLER.



Hoppe-Seyler

- Friedrich Miescher (Suisse, 1844-1895)
- Étudie à l'Université de Göttingen sous la direction de Ernst Felix Immanuel Hoppe-Seyler, le père de la biochimie.
- Il découvre, à partir du pus des bandages de blessés de la guerre de Crimée, une substance riche en phosphore et azote, capable de faire de très grandes molécules.



Il montra que cette substance, qui précipite dans l'éthanol acide, était enrichie dans le sperme et le noyau cellulaire: il l'appella "nucléine". Son élève, le pathologiste allemand Richard Altmann introduisit le terme "acide nucléique" en 1889.

La découverte du gène

- Les “botanistes” : J. Kœlreuter, K. Gärtner, M. Wichura (Allemagne); W. Herbert, Th. Knight (Angleterre); Ch. Naudin, L. De Vilmorin, H. Lecoq (France):
Les hybrides sont tous semblables à la première génération.



Johann (Gregor) Mendel (1822-1884) :

Etudie la transmission des caractères chez les petits pois:

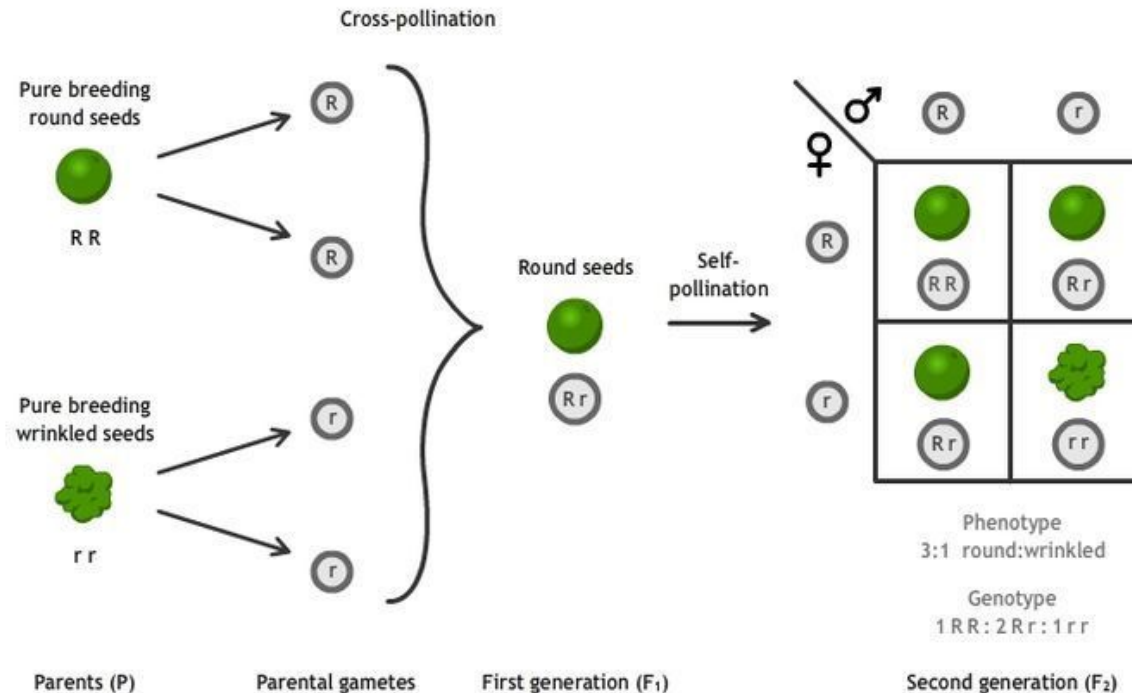
- **Loi de ségrégation des gènes (allèles)**
- **Loi de réassortiment des gènes: Génération F2 différente de la génération F1, définit la “dominance” et la “récessivité”.**

Gregor Mendel, 1866: “Recherche sur les hybrides végétaux”

Les “lois de Mendel”:

1- *Loi d’uniformité des hybrides de 1^{ère} génération*

2- *Loi de ségrégation des allèles, (résultat de la méiose)*



Gregor Mendel, 1866: “Recherche sur les hybrides végétaux”

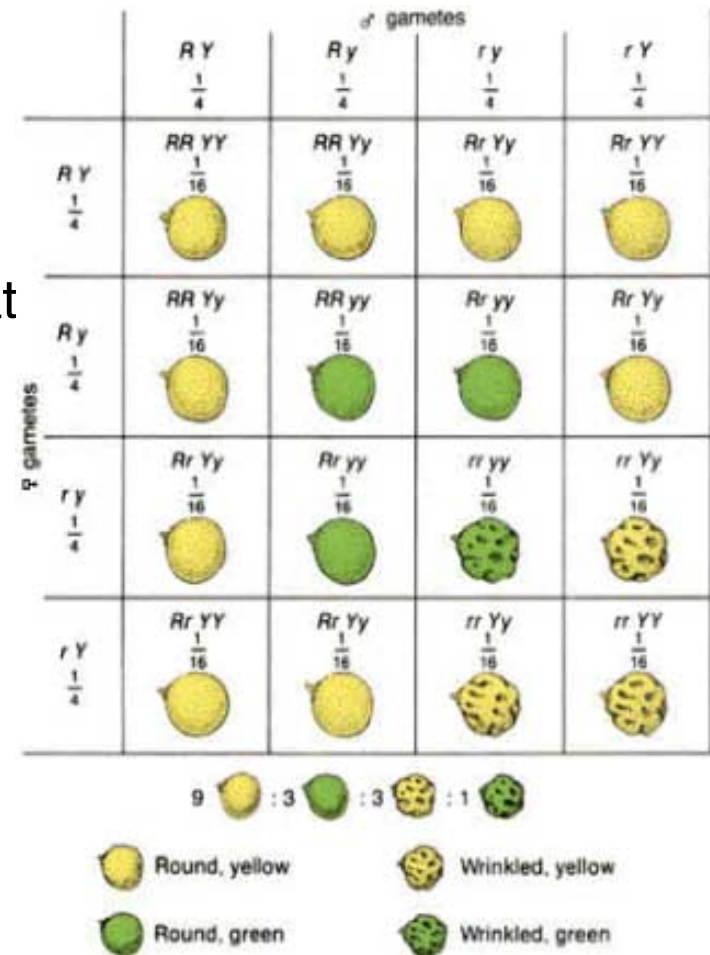
Les “lois de Mendel”:

1- *Loi d'uniformité des hybrides de 1^{ère} génération*

2- *loi de ségrégation des allèles, (résultat de la méiose)*

3- *loi d'indépendance des caractères (caractères non liés)*

Différence entre le “facteur invisible” (génotype) transmis par les gamètes et l'expression des caractères (phénotype). La transmission est quantifiable.



“Redécouvertes” par H. De Vries, C. Correns et E. von Tschermak-Seysenegg en 1900

William Bateson (1861-1926)

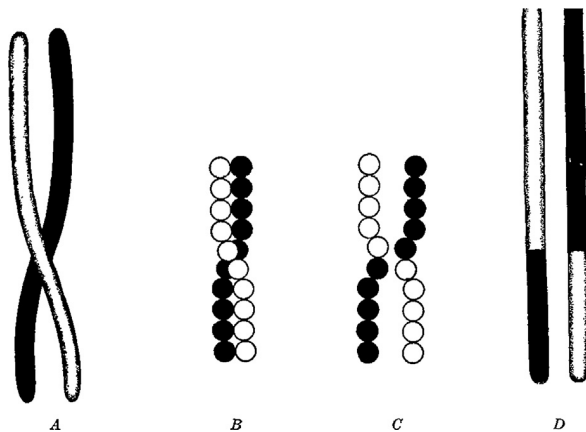


W. Bateson

- Les mutations sont la cause des variations au sein des espèces (*A Defence of Mendel's Principles of Heredity*, 1902).
- Crée en 1906 la Génétique (du grec *genno*, « qui donne naissance ») pour décrire l'étude de l'hérédité et la transmission des variations (*Report of the Third International Conference 1906 on Genetics*).
- Mais c'est Wilhelm Johannsen, un botaniste danois qui utilise la première fois les termes gène ("qui donne naissance"), génotype et phénotype en 1911
- Les gènes peuvent exister sous différentes formes (les allèles)

L'introduction des chromosomes au sein de la génétique

- En 1902, à la suite des travaux d'August Weissmann (gamètes), Walter Sutton et Theodor Boveri proposent de considérer les chromosomes comme les porteurs des facteurs Mendéliens.
- Publication en 1915, du livre « The Mechanism of Mendelian Heredity » par Thomas H Morgan et ses collègues.



Le diagramme de Morgan et al. qui représente le crossing-over

Les chromosomes sont interprétés comme une succession de gènes.

Thomas Hunt Morgan (1866-1945) et la drosophile



- Les chromosomes comme supports de l'hérédité
- Les crossing-over et la recombinaison génétique, la liaison des gènes.
- Carte physique des gènes sur les chromosomes (centiMorgan = 1% de recombinaison)
- Confirme que les mutations expliquent la variabilité au sein des espèces
- Le gène: unité de transmission, de recombinaison et de mutation



Alfred H. Strurtevant

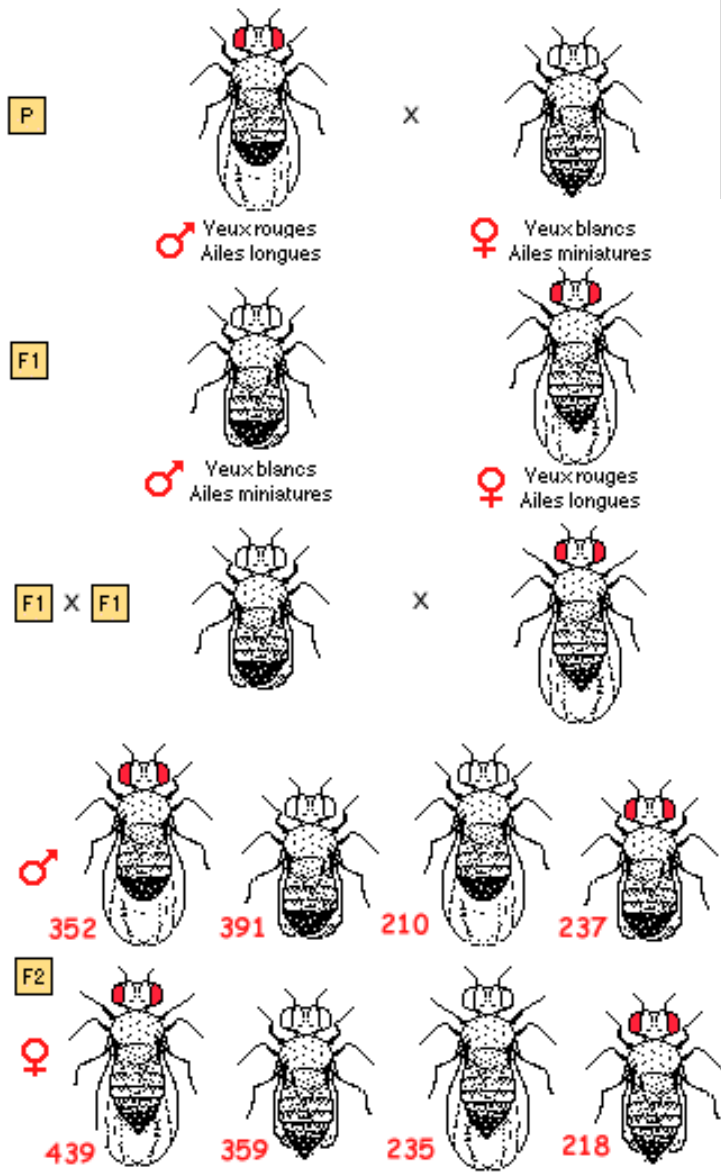


Hermann J. Müller

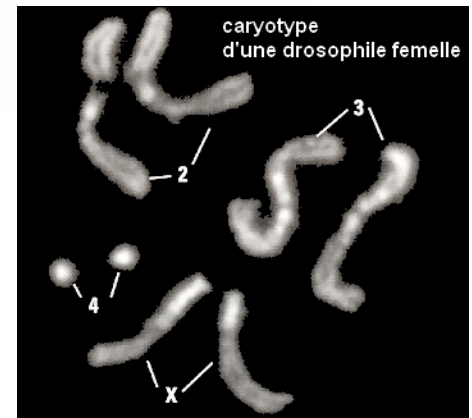
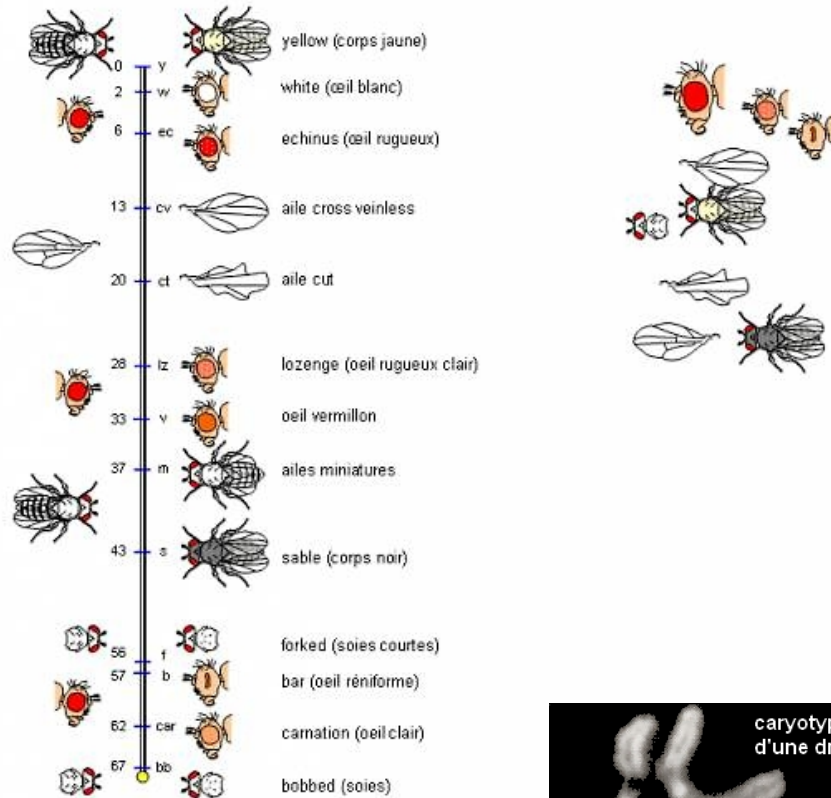


Calvin B. Bridges

La transmission des caractères ne suit pas toujours les lois de Mendel: La recombinaison et la liaison génétique.



DES RECOMBINAISONS INATTENDUES

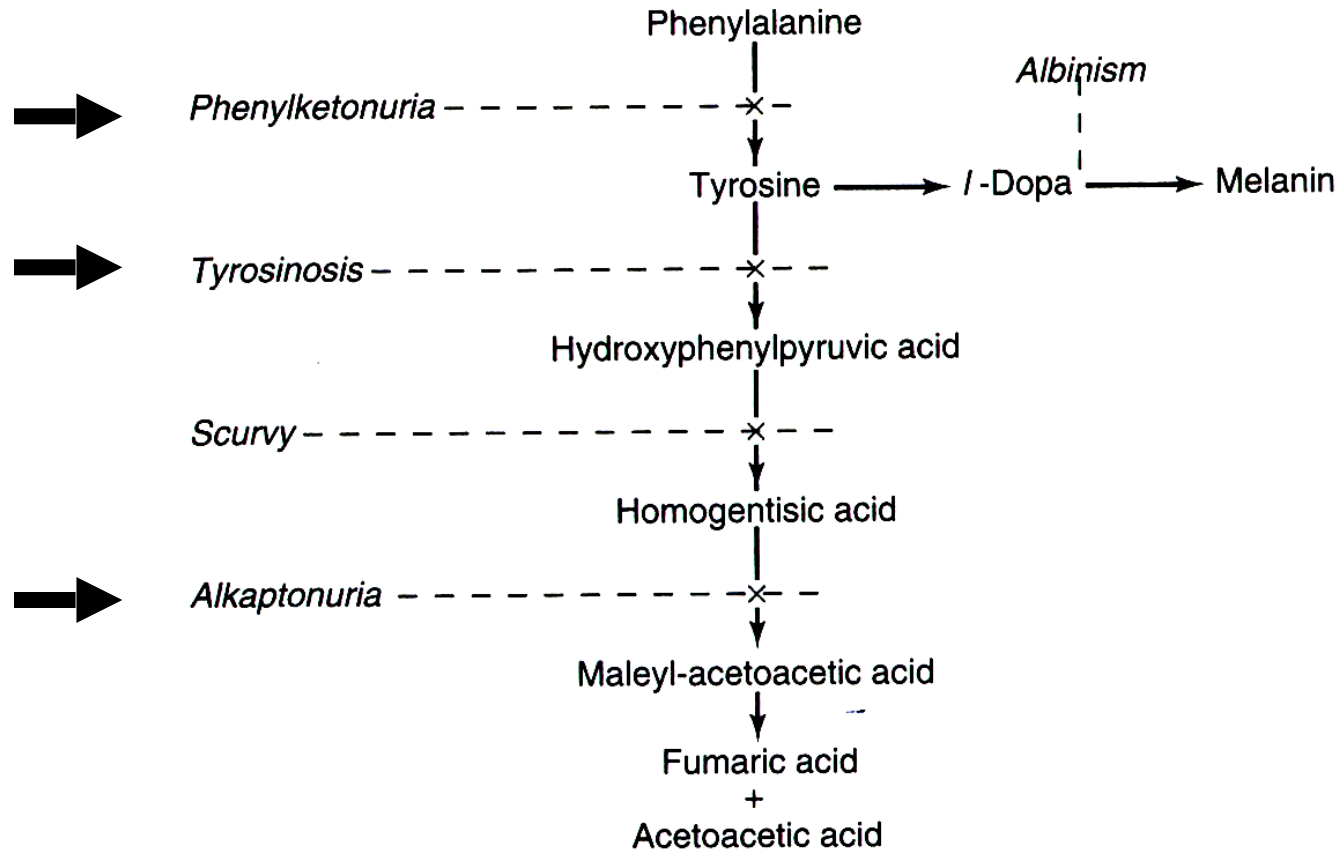


Erreurs innées du métabolisme

- Sir Archibald Garrod (1857-1936)
- La relation directe entre gènes et protéines fut initialement proposée par Garrod, un médecin de l'hôpital St. Bartholomew à Londres, en 1908
- Garrod connaissait à la fois la discipline dominante de l'époque, la biochimie, et la génétique, en émergence.

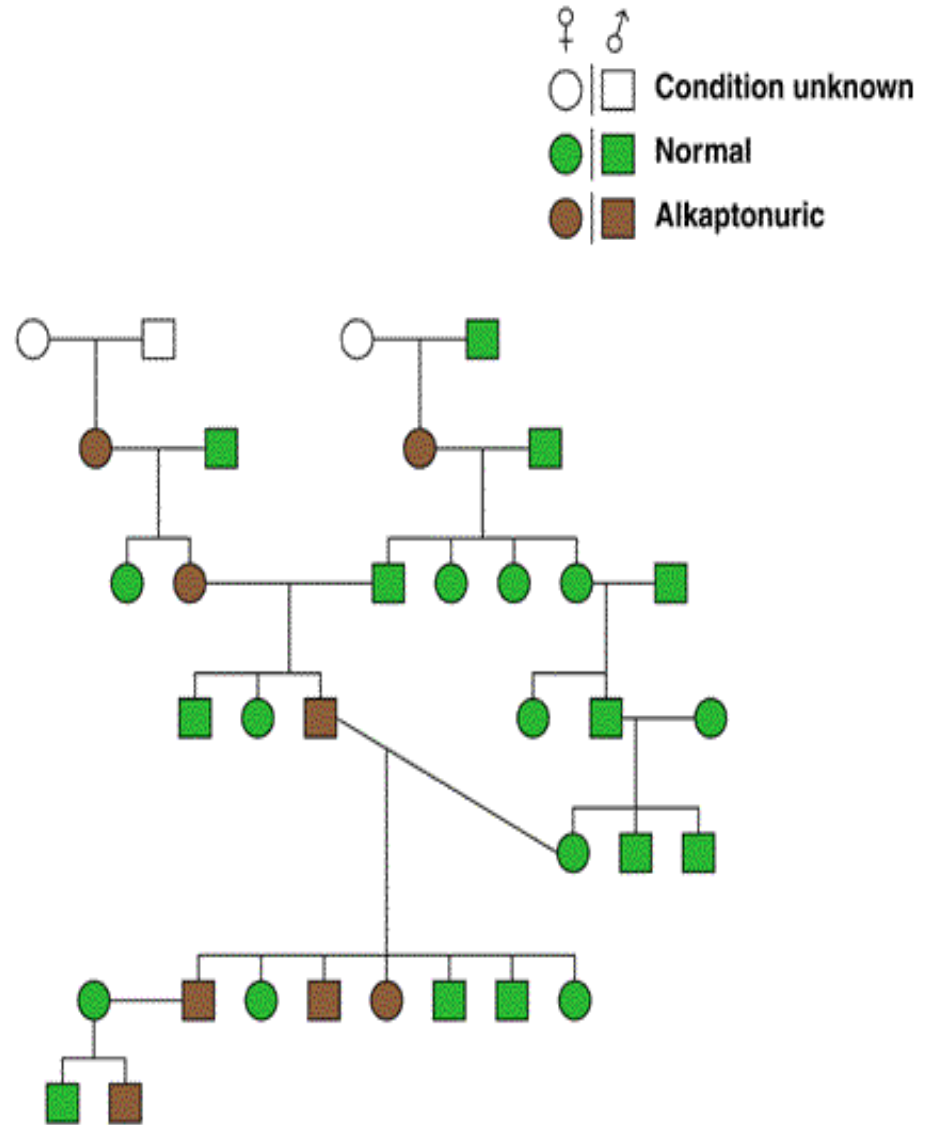


Génétique biochimique



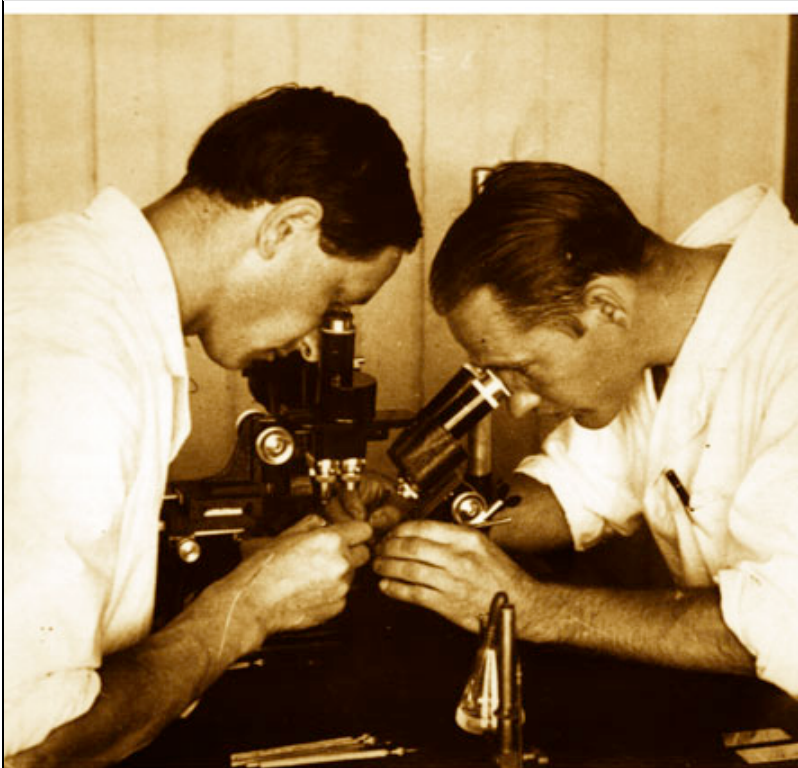
Décrit l'“alcaptonurie”, une maladie innée du métabolisme: l'urine exposée à l'air devient noire. Ce phénomène est dû à l'oxydation de l'acide homogentisique dans l'urine: acide homogentisique = intermédiaire de la dégradation de Phe

En appliquant les lois de Mendel
Garrod conclue que
l'alcaptonurie est une maladie
congénitale, et non pas le
résultat d'une infection
bactérienne, comme la plupart
pensait.



Le phénotype “malade“ est le reflet d’une anomalie biochimique

- Garrod était très en avance sur son temps...
- Ce n'est que dans les années 1930s que George Beadle et Boris Ephrussi ont fait le lien entre la synthèse des pigments et les modifications de la couleur des yeux associées aux mutations des gènes chez la mouche drosophile



Nature Reviews

*George W. Beadle and Boris Ephrussi
carrying out an eye disk transplanta-
tion experiment (CalTech, 1936)*

Les produits de *v* et *cn* affectent différentes étapes de la même voie métabolique

Wild-type *v*⁺ gene



v⁺ enzyme

Wild-type *cn*⁺ gene



cn⁺ enzyme

Precursor X → Intermediate Y → Brown eye pigment

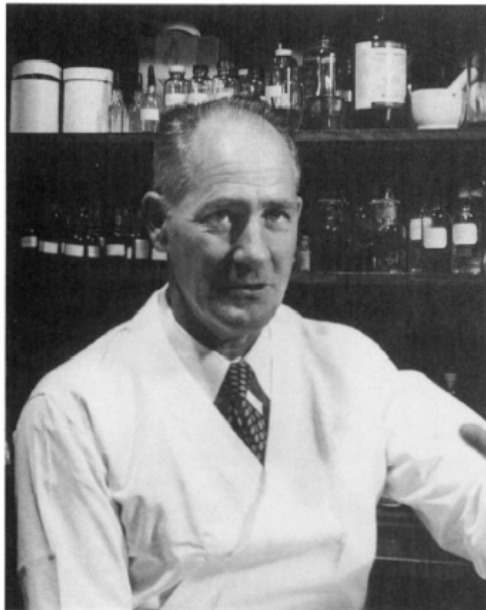


La couleur des yeux (sens des aiguilles d'une montre):

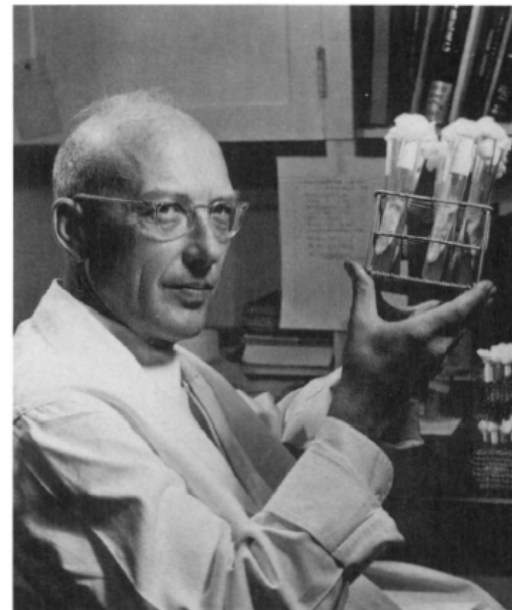
brown, cinnabar, sepia, vermilion, white, wild.

L'hypothèse “un gène-un enzyme”

- L'hypothèse “un gène-un enzyme” fut formulée par les américains George W. Beadle (1903-1989) et Edward Tatum (1909-1975) en 1938
- Prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1958

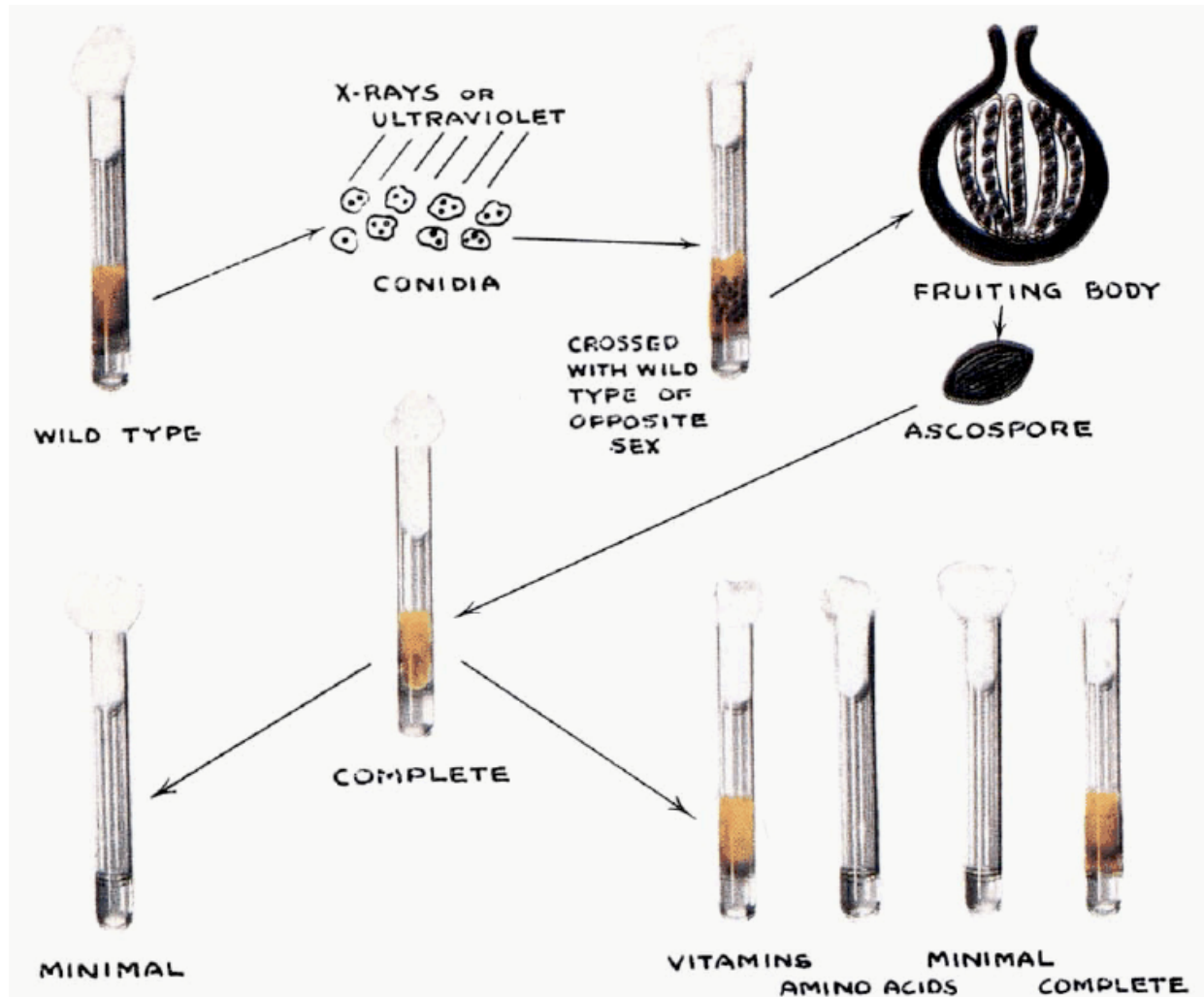


GEORGE BEADLE



EDWARD TATUM

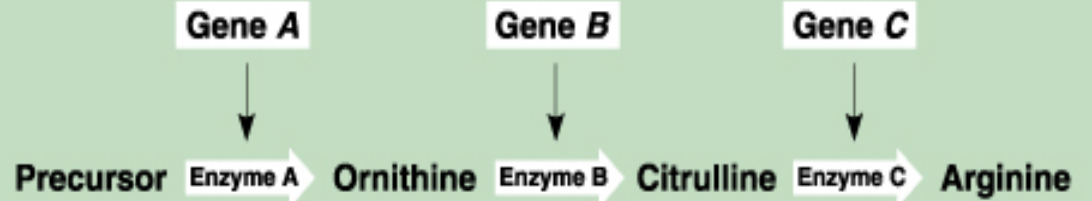
- Beadle et Tatum ont élaboré l'hypothèse d'une relation directe entre un gène et un enzyme spécifique. Pour la tester, ils ont créé des mutants génétiques incapables de réaliser des réactions enzymatiques spécifiques



Dessin de G. Beadle

Minimal medium (MM)
 MM + Ornithine
 MM + Citrulline
 MM + Arginine

WILD TYPE



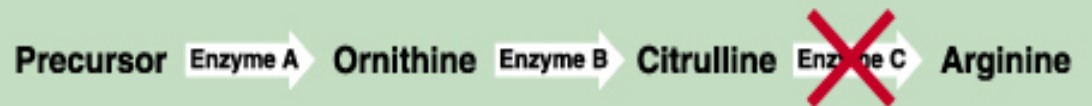
CLASS I
 MUTANTS
 (Mutation
 in gene A)



CLASS II
 MUTANTS
 (Mutation
 in gene B)



CLASS III
 MUTANTS
 (Mutation
 in gene C)



- **Comme Beadle et Tatum l'avaient prédit, les mutations d'un gène unique qui invalident un enzyme spécifiquement, produisent des champignons qui ont besoin pour survivre de la substance que l'enzyme produit habituellement, alors que la substance utilisée par l'enzyme normale s'accumule dans les cellules. C'est exactement ce que Garrod avait observé chez ses patients alcaptonuriques**

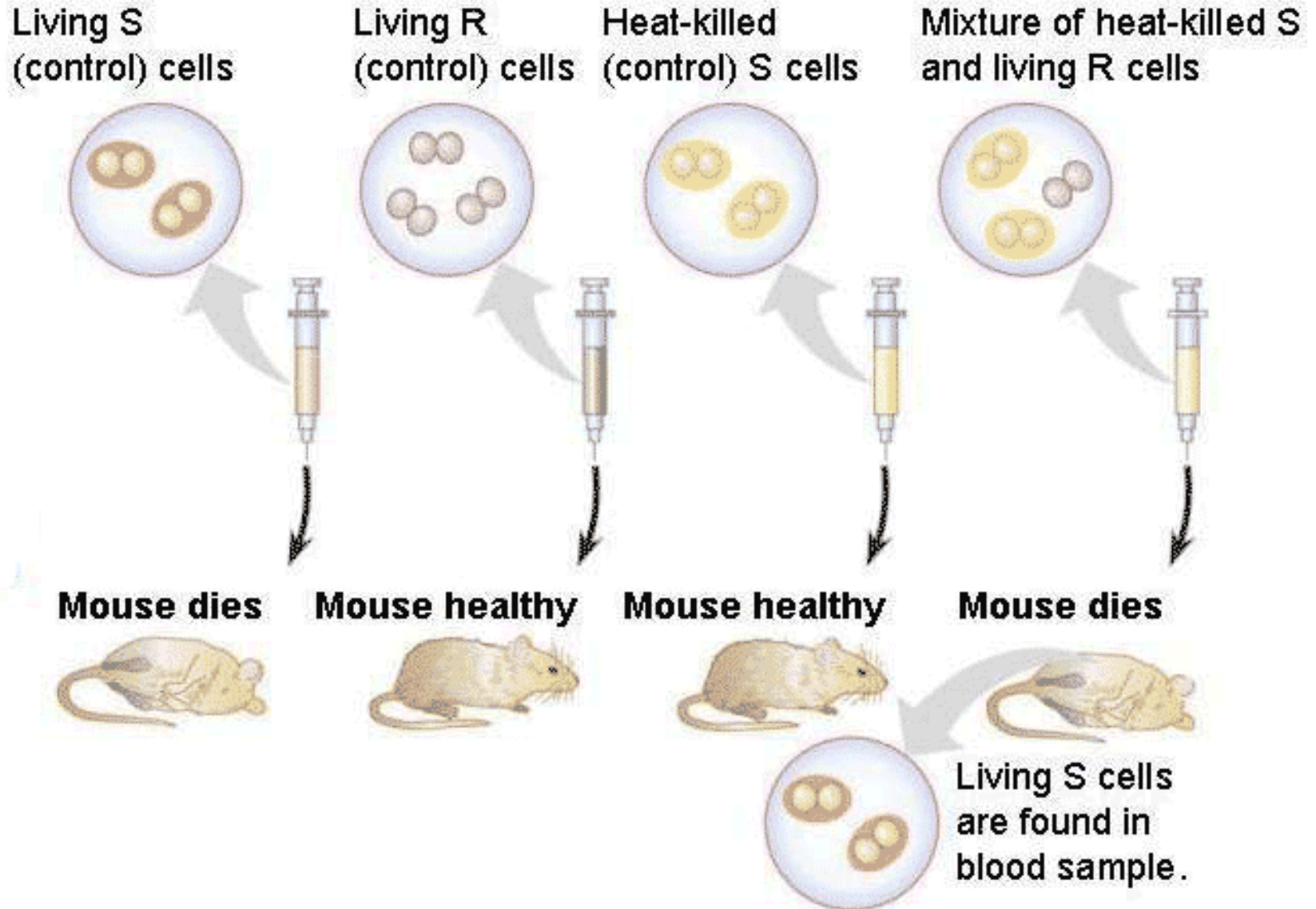
**Ces résultats confirmaient l'hypothèse
“un gène-un enzyme”**

“Le Principe Transformant”

- En 1928, un chercheur anglais, Frederick Griffith mis au point une expérience qui montra la transformation de cellules vivantes (des bactéries non pathogènes en bactéries pathogènes) par un “principe transformant” que l’on découvrira beaucoup plus tard comme étant l’ADN

L'expérience de Frederick Griffith (1928):

Le principe transformant

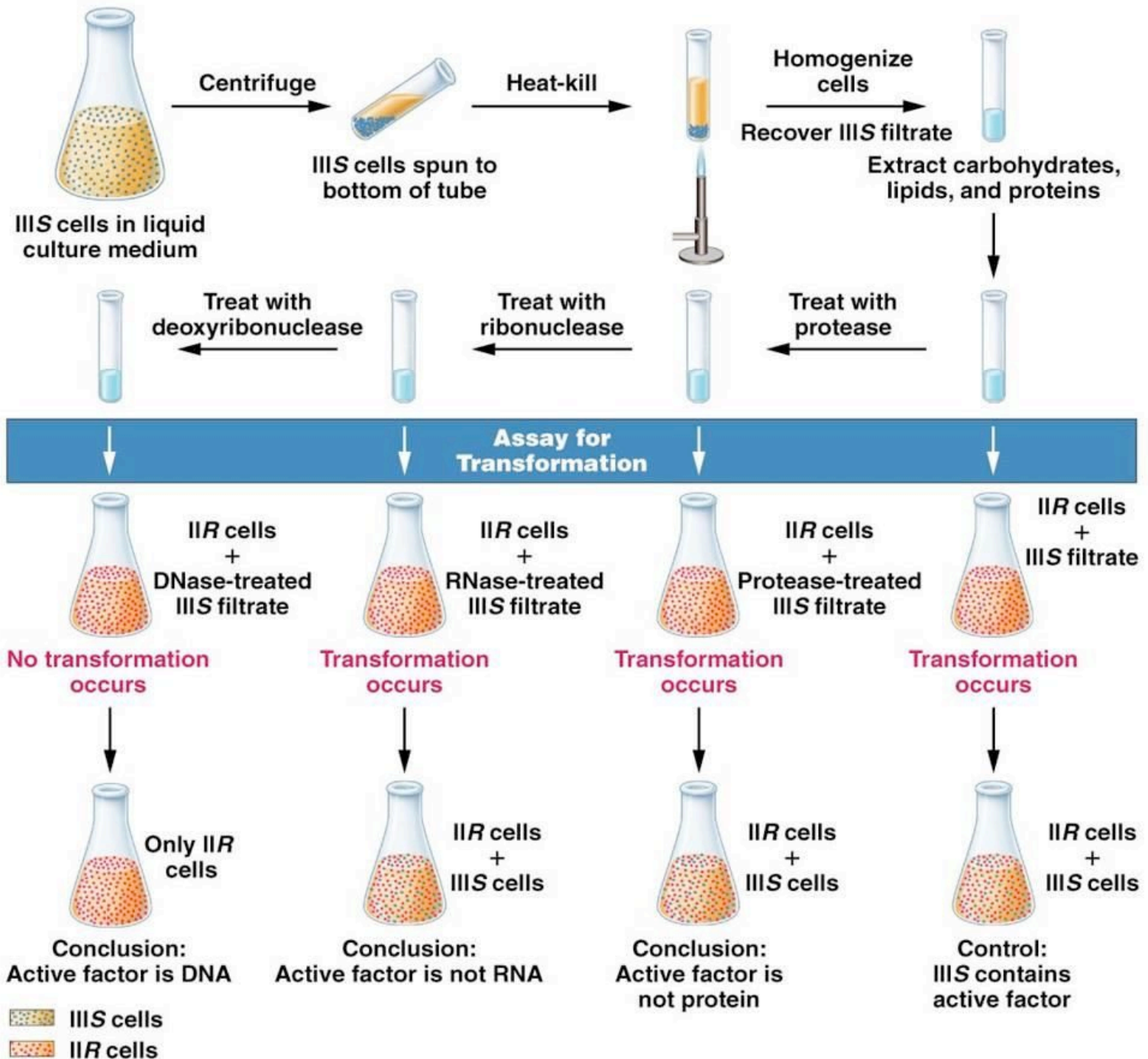


“Le Principe Transformant” est l’ADN

Au début des années 1940s Oswald T. Avery et Maclyn McCarty, au Rockefeller Institute Hospital, ont étudié la question de la transformation des pneumocoques



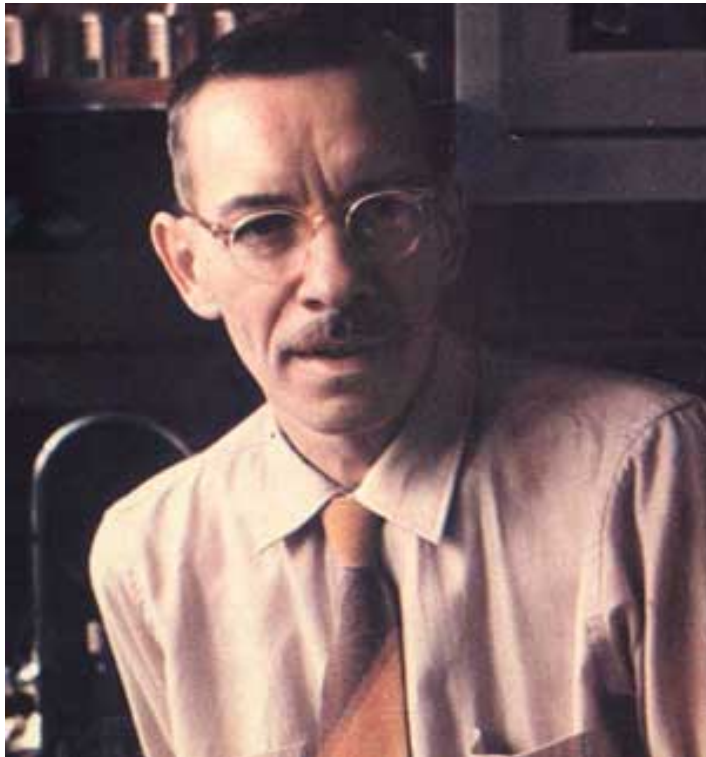
- En utilisant une version améliorée de la méthode de MacLeod, Avery et McCarty isolent une forme active du “principe transformant ” à partir de pneumocoques virulents.
- Ils décident d’en faire une analyse chimique. Les protéases (enzymes qui dégradent les protéines) et les lipases (enzymes qui dégradent les lipides), ainsi que les extraits de glucides n’inactivent pas le “principe transformant ”
- Avery conclut que la substance était dépourvue de lipide, de sucre et de protéine. Il observa que la substance était riche en acides nucléiques mais la ribonucléase, l’enzyme de dégradation de l’ARN, n’inactivent pas non plus le “principe transformant ”



- L'éthanol, en revanche était bien connu pour précipiter l'acide désoxyribonucléique (ADN). De plus, le "principe transformant" avait un très haut poids moléculaire, comme l'ADN, et réagissait comme l'ADN au test de Dische.
- **Donc, le "principe transformant" capable de produire des changements transmissibles et héritable dans un organisme vivant est bien l'ADN.**
- *Mais cette découverte n'eut pas l'impact escompté, les esprits n'étaient pas préparés!*

L'expérience de Hershey-Chase

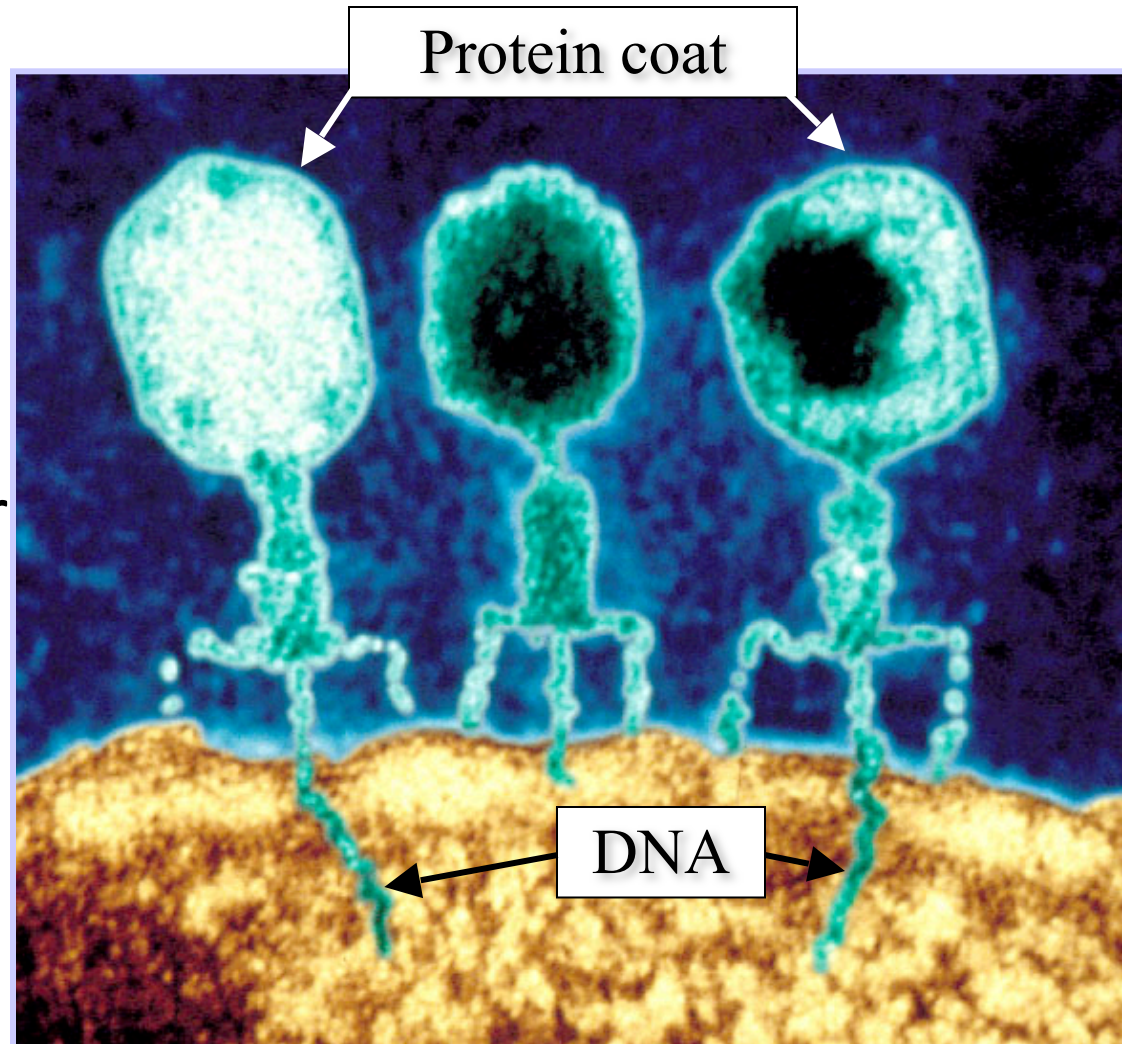
- Les américains Alfred Hershey (1908-1997) et Martha Chase (1930-2003) ont publié en 1952 des résultats probants en utilisant un bactériophage.



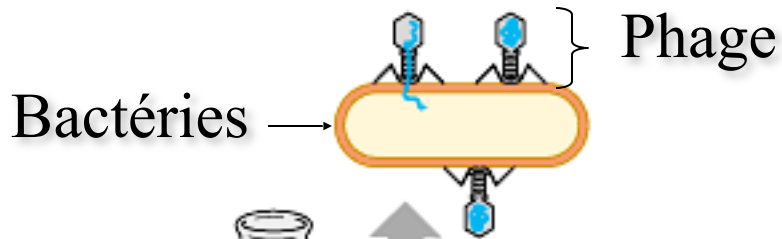
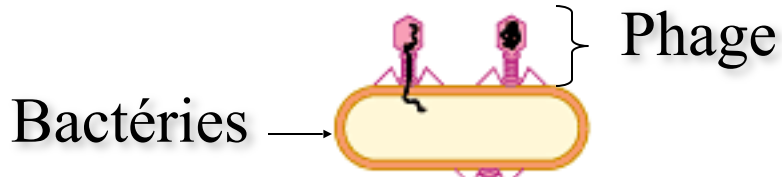
L'expérience de Hershey-Chase

le bacteriophage est un virus qui infecte les bacteries.

Il est constitué d'un cœur d'**ADN** et d'une **enveloppe protéique**



Les protéines d'enveloppe des bactériophages marquées au Soufre-35

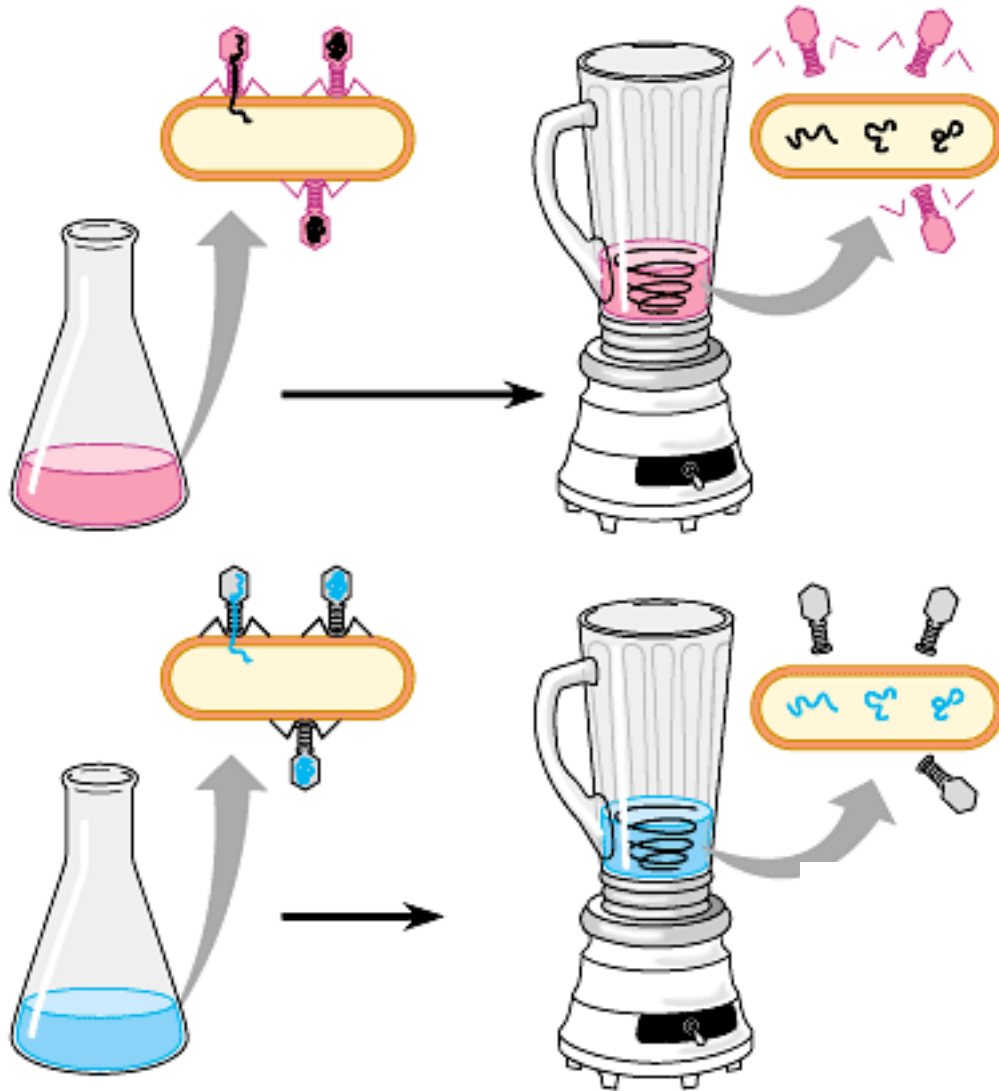


1. Hershey et Chase ont mélangé les virus marqués radioactivement avec les bactéries

Les virus infectent les bactéries.

L'ADN des bactériophages marqué au Phosphore-32

Les protéines d'enveloppe des bactériophages marquées au Soufre-35

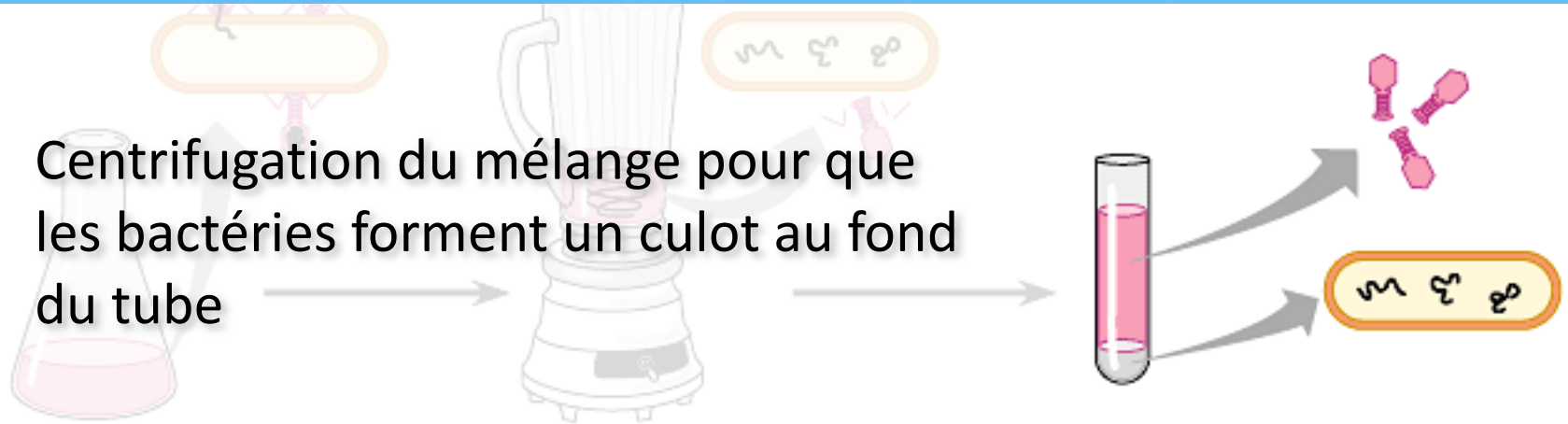


2. Separation des virus et des bactéries en les homogénéisant dans un mixeur

L'ADN des bactériophages marqué au Phosphore-32

L'ADN des bactériophages marqué au Phosphore-32

3. Centrifugation du mélange pour que les bactéries forment un culot au fond du tube



4. Mesure de la radioactivité dans le culot et le surnageant

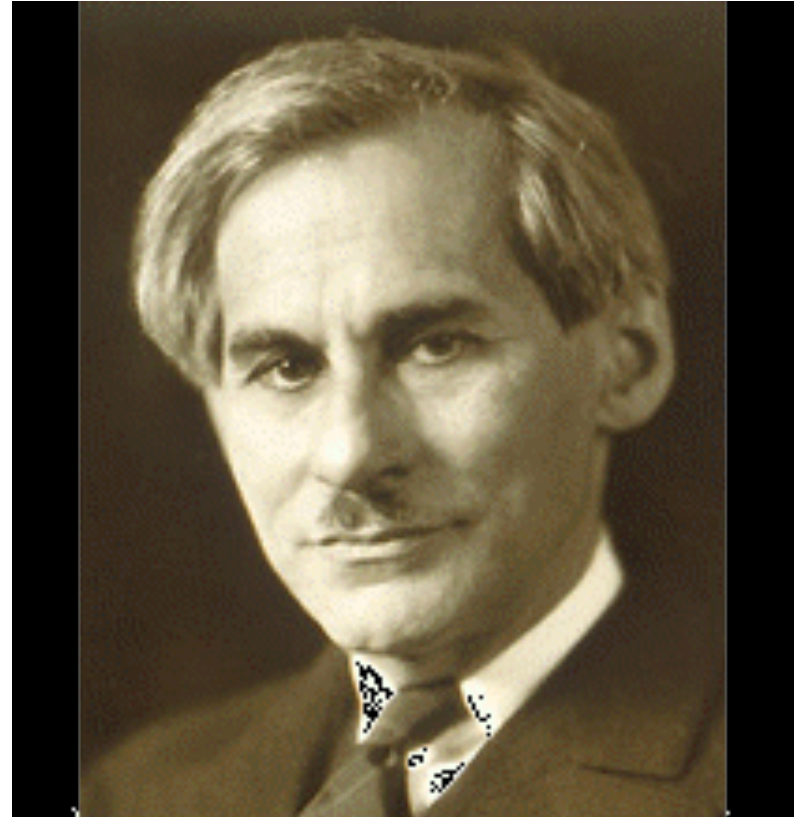


C'est l'ADN marqué que l'on retrouve dans le culot de bactéries:

L'ADN est le « principe transformant ».

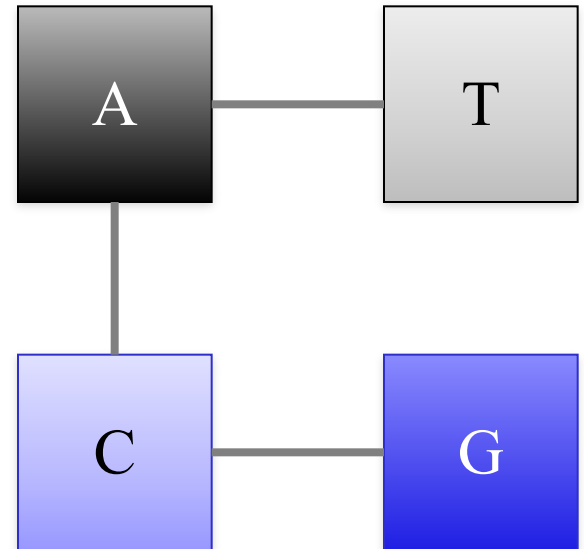
L'hypothèse du tetranucléotide

- **Phoebus Levene (Russo-Amerïcain, 1869-1940)**
- **Il a travaillé avec Albrecht Kossel et Emil Fischer, les grands experts des acides nucléiques et des protéines au début du 20^{ème} siècle**



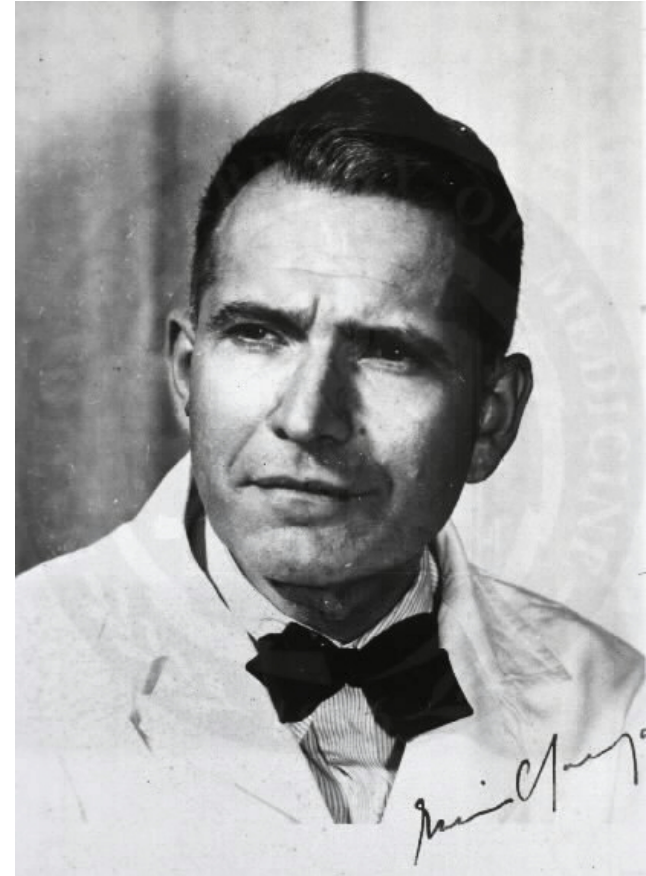
L'hypothèse du tetranucléotide

- Il suggère que l'ADN est un tetramère répétitif, parce que les 4 composants de l'ADN étaient présents en quantité à peu près égales.
- Mais la structure de l'ADN paraît trop simple et trop régulière pour contribuer aux variations génétiques.
- Dès lors, l'attention des chercheurs s'est focalisée sur les protéines, comme substrat moléculaire probable de l'hérédité.



Les proportions des Bases

- En 1951 Edwin Chargaff (1905-2002) observait des “régularités” dans la composition des bases des acides nucléiques, qui reflétaient l’existence de même principes structuraux dans toutes les préparations d’ADN
- En particulier, pour le duplexe d’ADN il a identifié la proportion constante des bases: $\%A = \%T$ et $\%C = \%G$



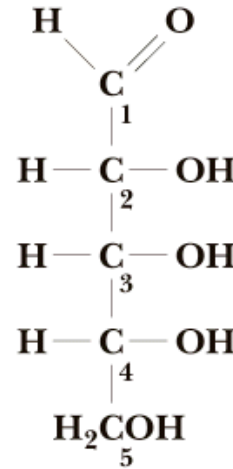
La composition en bases peut changer mais la règle de Chargaff reste valide.

Organism	%A	%T	%G	%C	$\frac{A+G}{T+C}$	$\frac{A+T}{G+C}$
<i>E. coli</i> bacterium	26.0	23.9	24.9	25.2	1.04	1.00
<i>S. cerevisiae</i> yeast	31.7	32.6	18.3	17.4	1.00	1.80
<i>Z. mays</i> corn	25.6	25.3	24.5	24.6	1.00	1.04
<i>D. melanogaster</i> fly	30.7	29.4	19.6	20.2	1.01	1.51
<i>H. sapiens</i> human	30.2	30.3	19.9	19.6	1.01	1.53

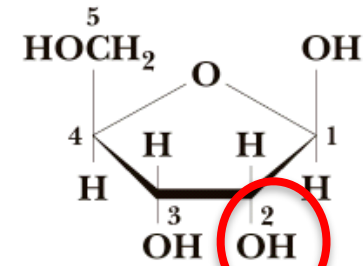
Les acides nucléiques

Les sucres : Pentoses

- D-ribose (ARN)
- 2-désoxy-D-ribose (ADN)
- La différence : - 2'-OH vs 2'-H
- affecte la stabilité, la structure secondaire et la réactivité

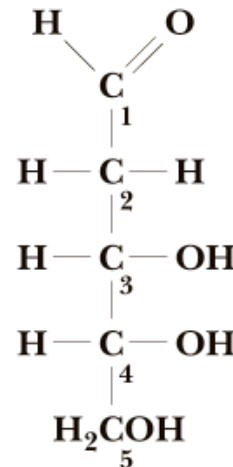


D-Ribose

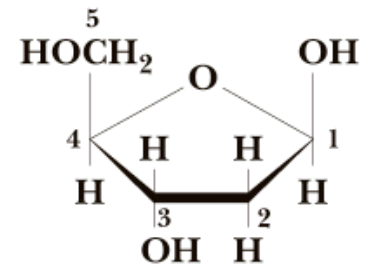


Furanose form of
D-Ribose

β -D-Ribofuranose



D-2-Deoxyribose

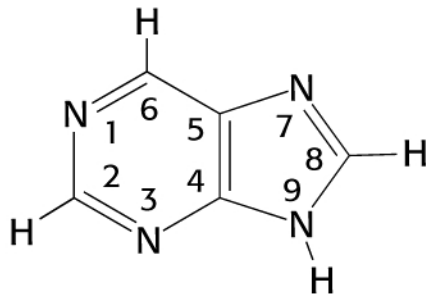


Furanose form of
D-2-Deoxyribose

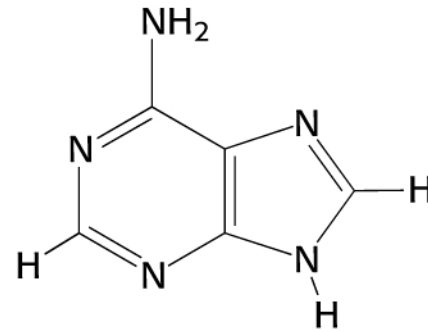
β -D-2-Deoxyribofuranose

Bases nitrées

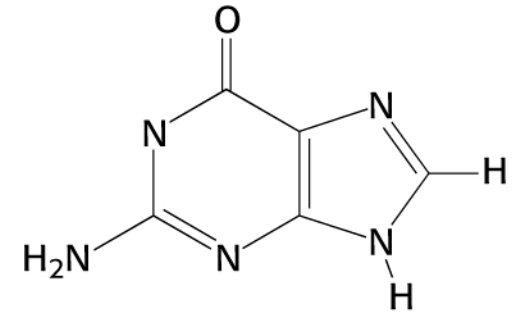
PURINES



Purine

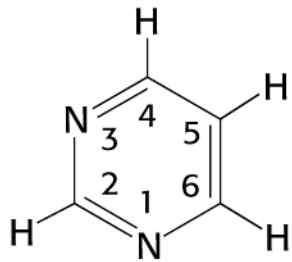


Adenine

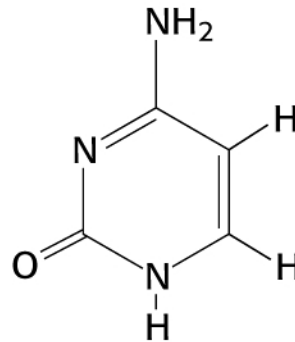


Guanine

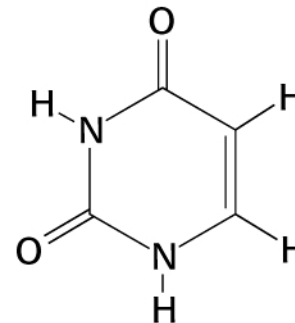
PYRIMIDINES



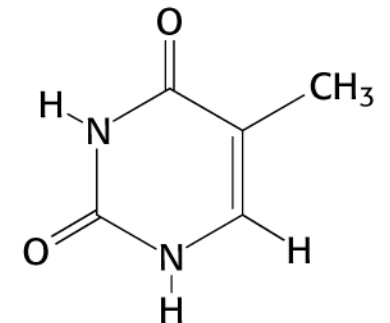
Pyrimidine



Cytosine

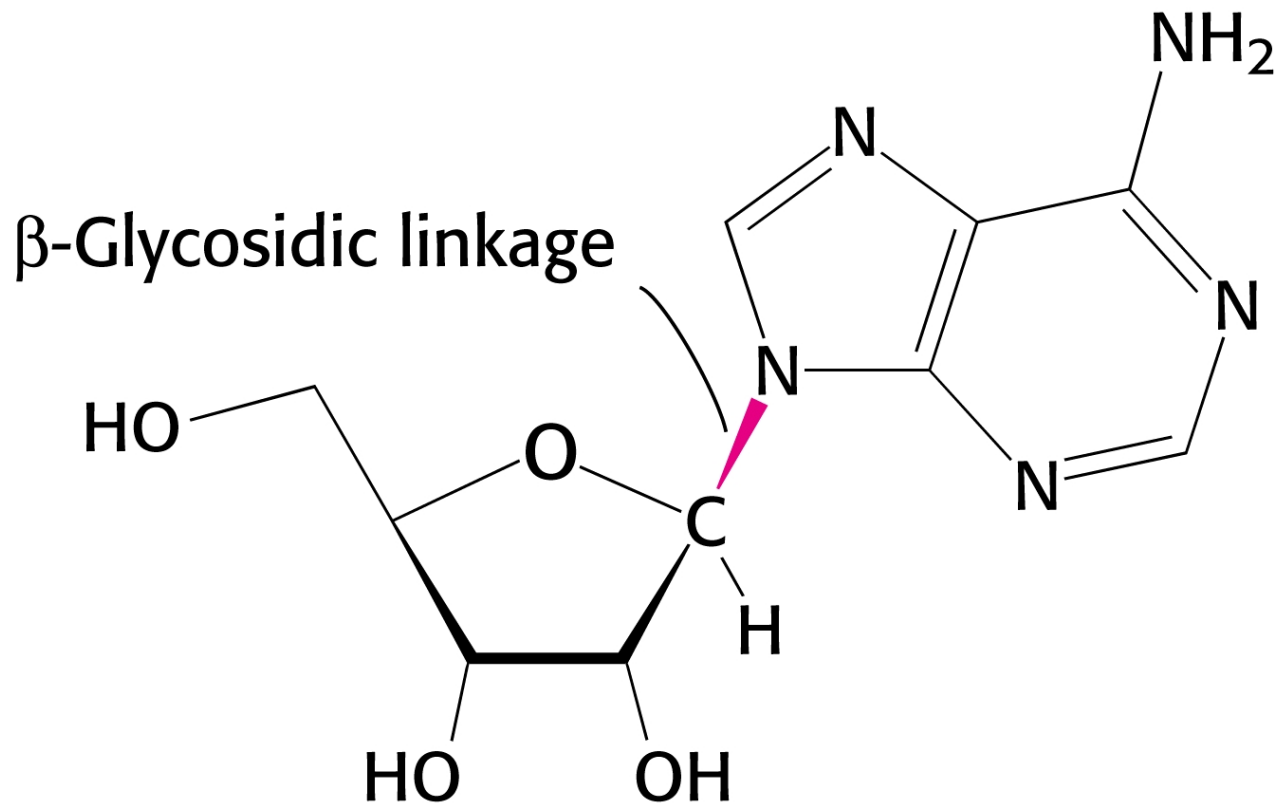


Uracil

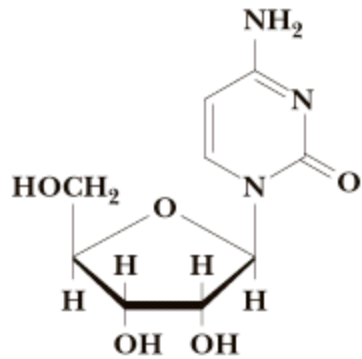


Thymine

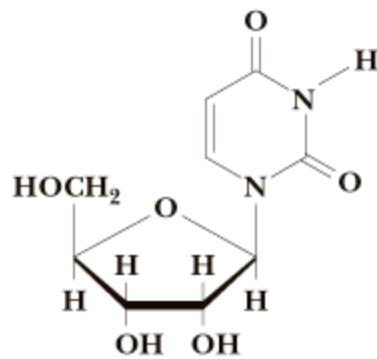
Les bases sont attachées par des liaisons N-glycosidiques au carbone 1 du pentose: Nucléoside



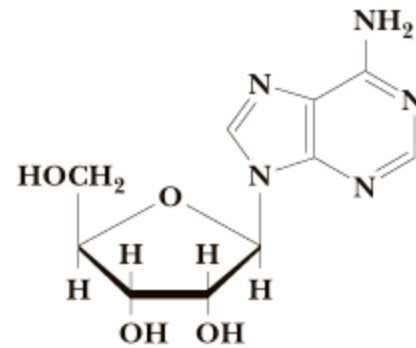
Les nucléosides



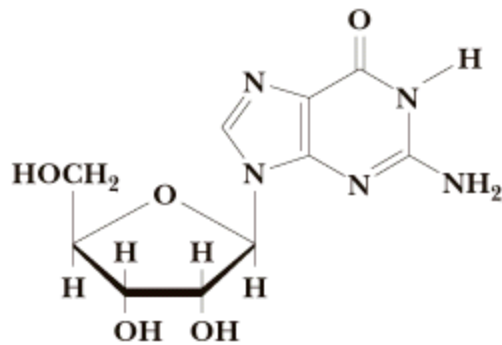
Cytidine



Uridine



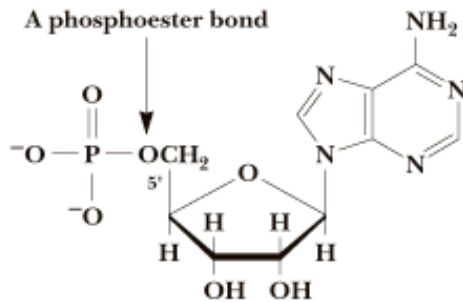
Adenosine



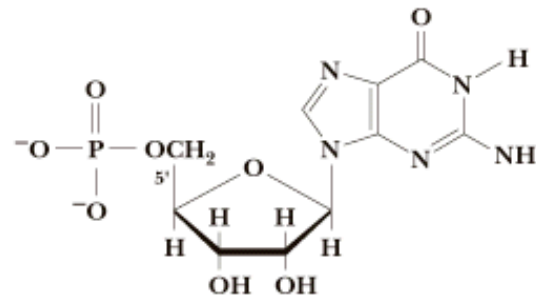
Guanosine

Nucléotides

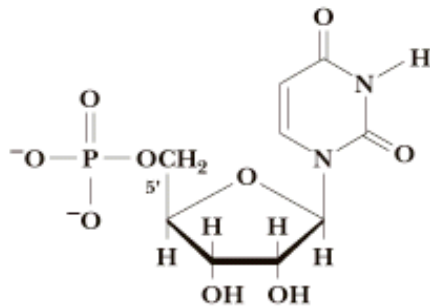
- Ester-phosphate des nucléosides



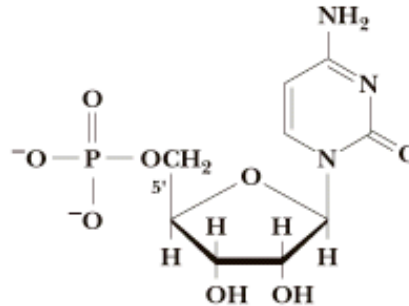
Adenosine 5'-monophosphate
(or AMP or adenylic acid)



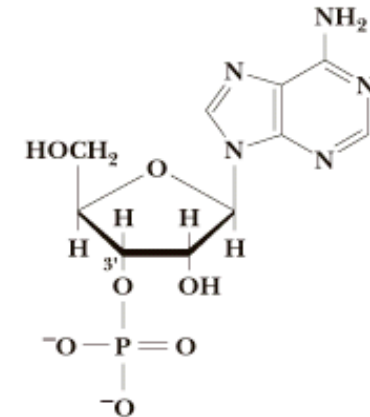
Guanosine 5'-monophosphate
(or GMP or guanylic acid)



Uridine 5'-monophosphate
(or UMP or uridylic acid)



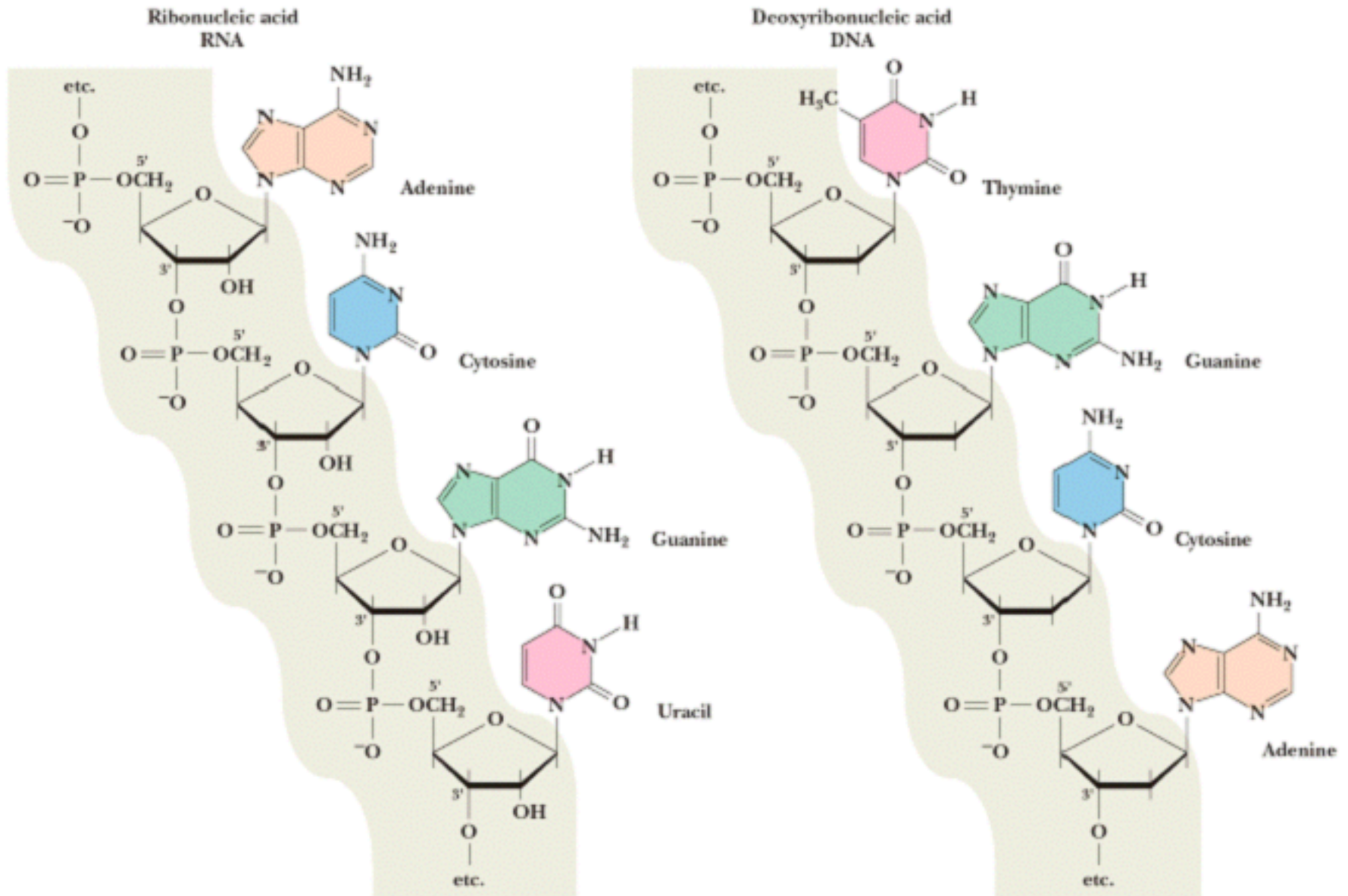
Cytidine 5'-monophosphate
(or CMP or cytidylic acid)



A nucleoside 3'-monophosphate
3'-AMP

Les autres fonctions des nucléotides

- Les nucléoside 5'-triphosphates sont des donneurs d'énergie
- Les bases servent d'unités de reconnaissance
- Les nucléotides cycliques sont des molécules de signalisation et des régulateurs du métabolisme et de la division cellulaire
- ATP est essentiel pour le métabolisme énergétique
- GTP gouverne la synthèse des protéines
- CTP gouverne la synthèse des lipides
- UTP gouverne le métabolisme des sucres



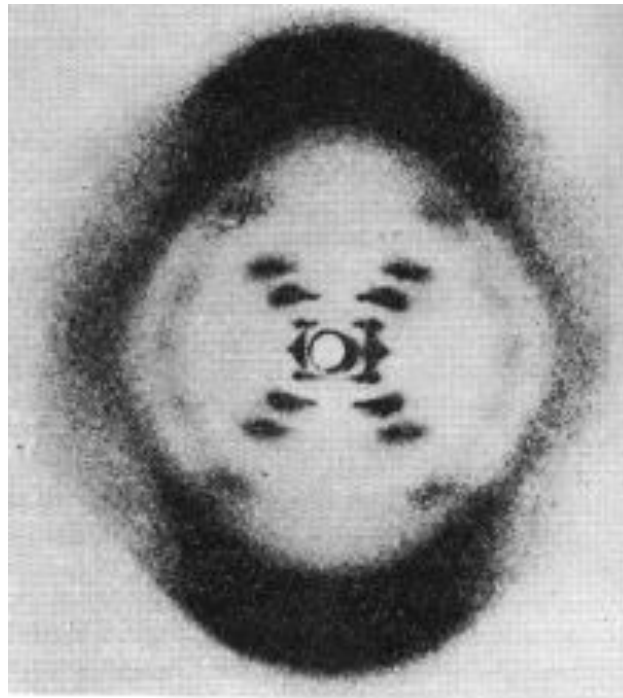
Les monomères de nucléotide sont unis par des liaisons phosphodiester 3'-5' pour former les polymères d'acides nucléiques (polynucleotide)

Acides Nucléiques

- Le squelette d'acides nucléiques peut prendre une conformation étendue.
- Les résidus nucléotidiques sont tous orientés dans la même direction (5'-3') ce qui donne au polymère son orientation et son sens.
- La séquence D'ADN (et d'ARN) est toujours lue dans la direction 5'-3'

Crystallographie aux rayons-X appliquée aux acides nucléiques

- entre 1940 et 1950: Maurice Wilkins (1916-) et Rosalind Franklin (1920-1958) ont étudié la structure de l'ADN aux rayons X



Principle	Data	Source
X-ray crystallography	Stacked layers of subunits in spirals; long chain, no ruling out of two chains, sugar-phosphate in the outside	Wilkins and (mostly) Franklin
Organic chemistry	4 nucleotides	Levene
Biochemistry	α-helix, model building	Pauling
Chromatography	Base ratios	Chargaff
Chemical bonding	Right form of the bases	J. Donahue
Mathematics	Attractive forces between DNA bases	J. Griffith

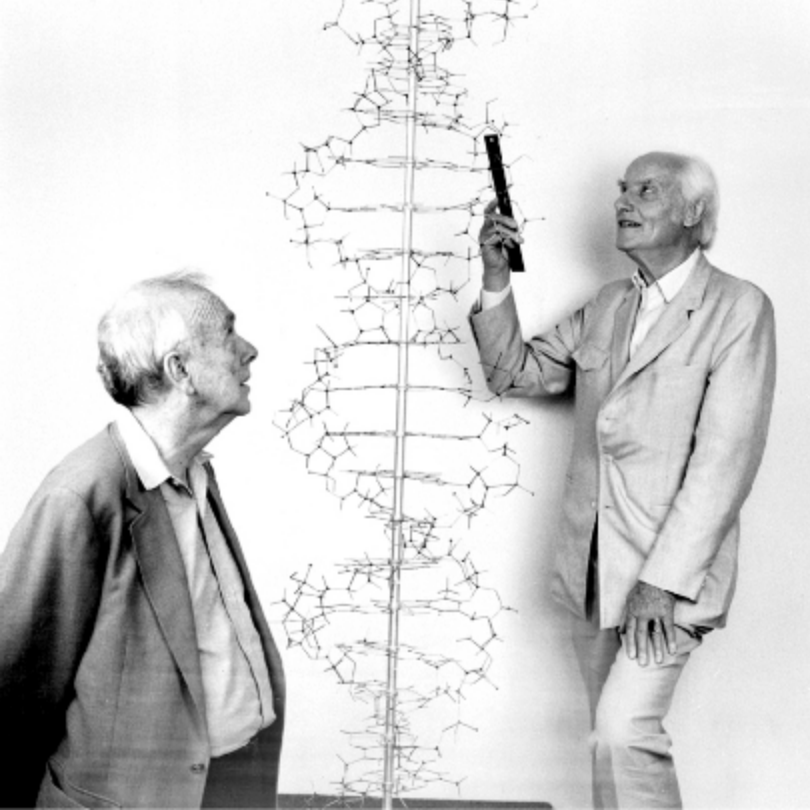
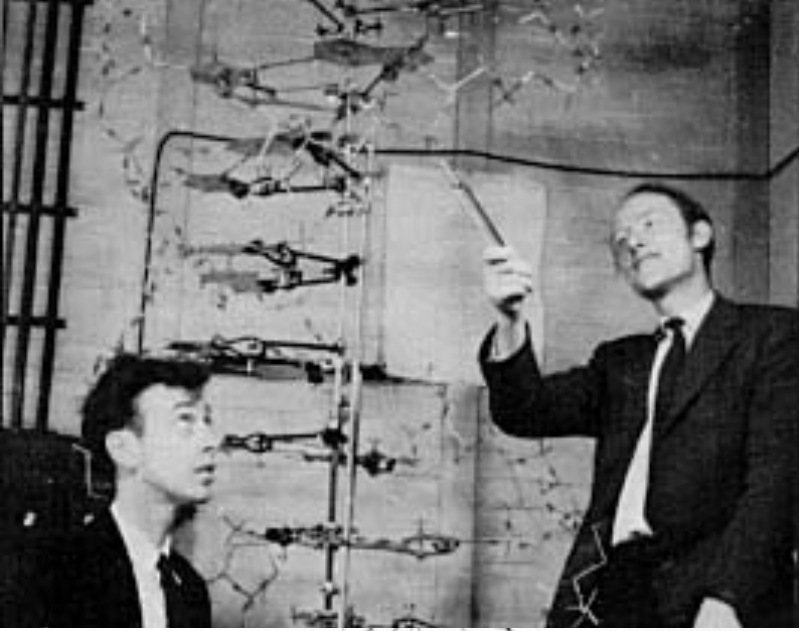
La structure de l'ADN Watson et Crick...

- **James Watson (Américain, 1928-)**
- **Francis Crick (Britannique, 1916-2002)**



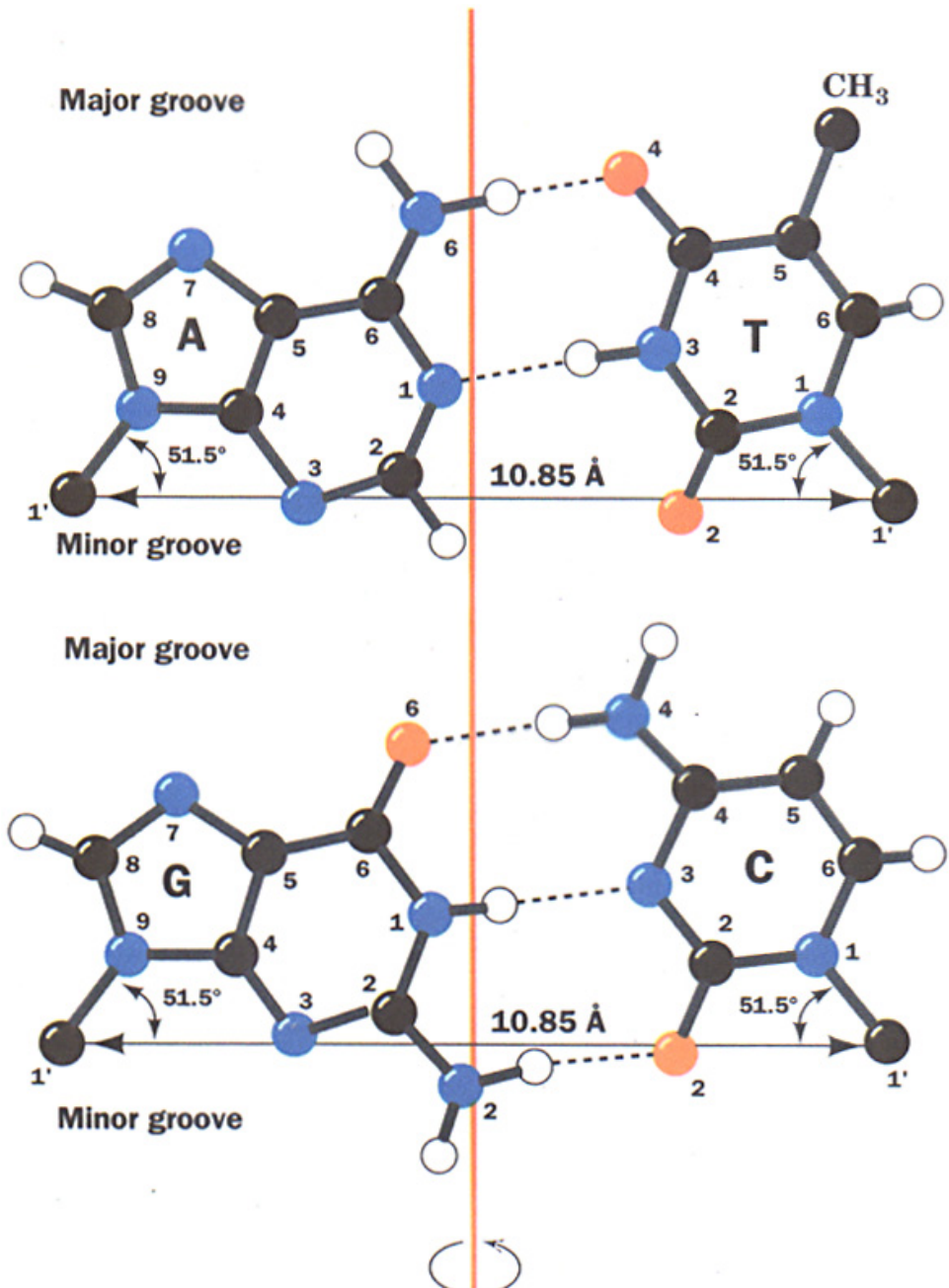
Ce que Watson et Crick ont réellement fait

- **W & C ont apporté l'idée que les appariements A-T et C-G avaient la même forme moléculaire**
- **Ce qui permet de comprendre la constance du diamètre de la molécule d'ADN, en utilisant les rapports de Chargaff**
- **L'application de la modélisation moléculaire qui a conduit au modèle de 2 chaînes d'ADN anti-complémentaires enroulées en double hélice**



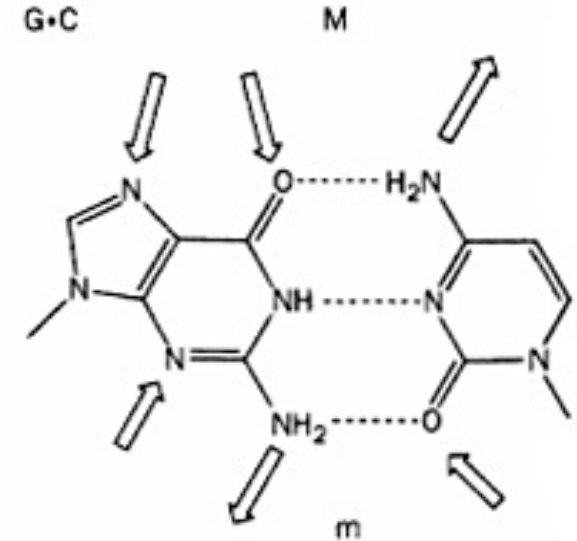
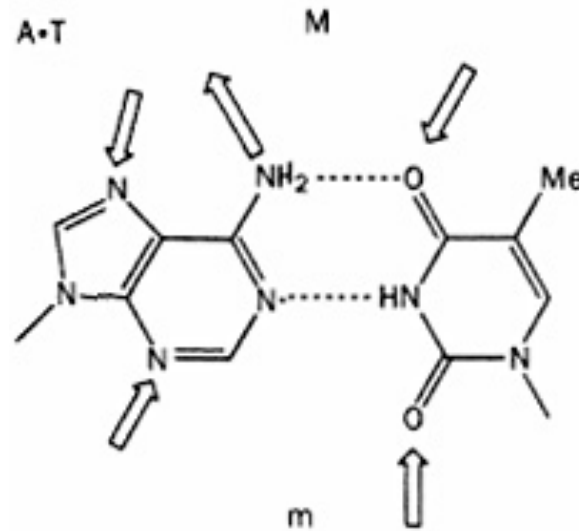
Geometry of Watson Crick Base Pairs

- A:T and G:C pairs are spatially similar
- 3 H-bonds vs 2
- Sugar groups are attached asymmetrically on the same side of the pair
- Leads to a major and minor groove
- Bases are flat but the hydrogen bonding leads to considerable flexibility
- Base stacking is flexible



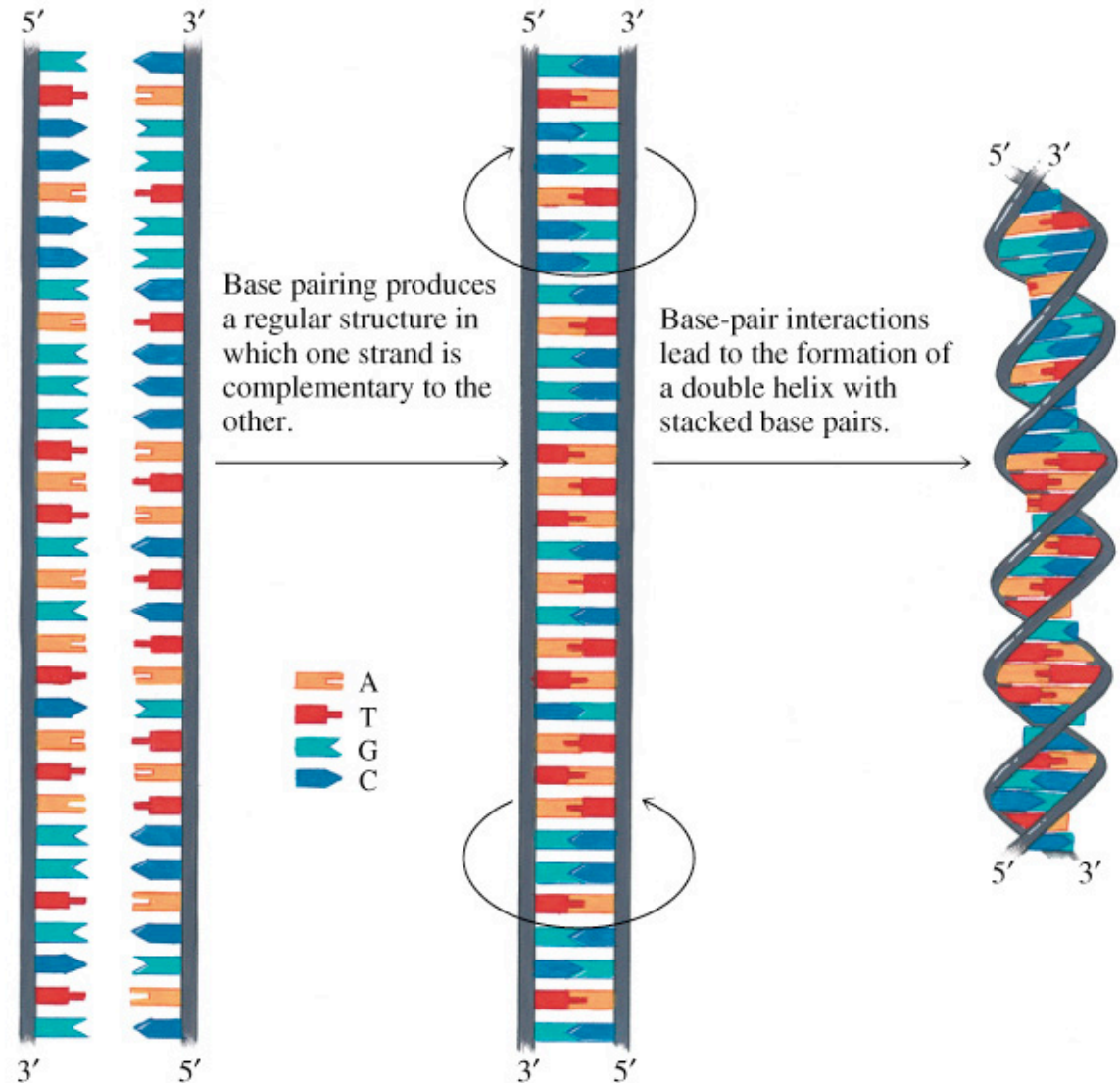
Definition of Major and Minor Groove

Hydrogen bonding of WC base pair



Mechanisms of recognition

H-bonding of adjacent antiparallel DNA strands form double helix structure

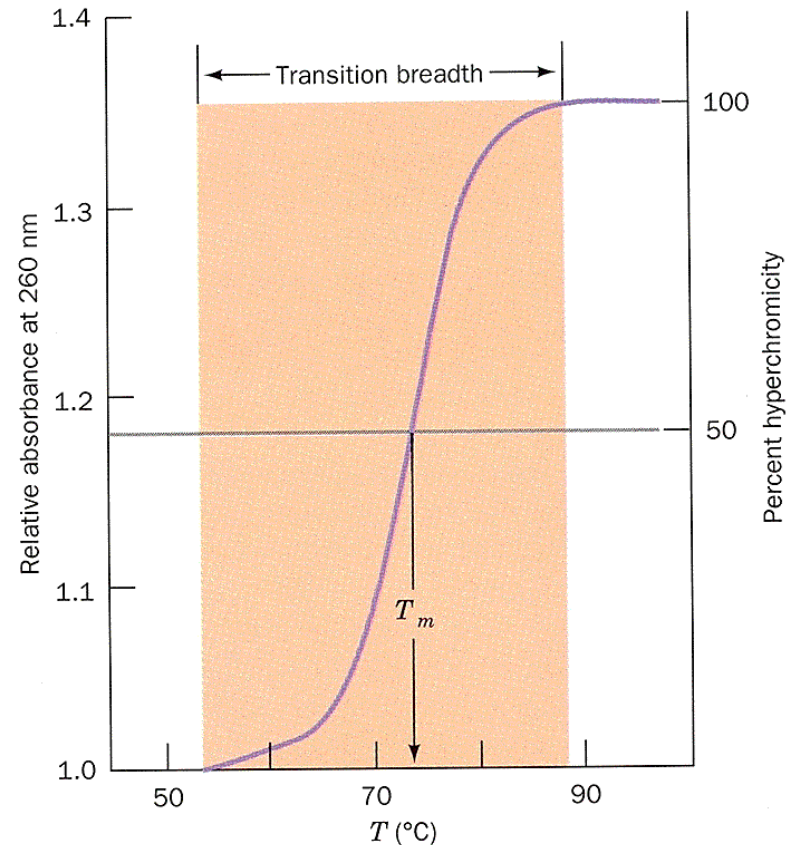


Properties of DNA Double Helix

- Distance between the 2 sugar-phosphate backbones is always the same, give DNA molecule a regular shape.
- Plane of bases are oriented perpendicular to backbone
- Hydrophilic sugar phosphate backbone winds around outside of helix
- Noncovalent interactions between upper and lower surfaces of base-pairs (stacking) forms a closely packed hydrophobic interior.
- Hydrophobic environment makes H-bonding between bases stronger (no competition with water)
- Cause the sugar-phosphate backbone to twist.

Denaturation of DNA

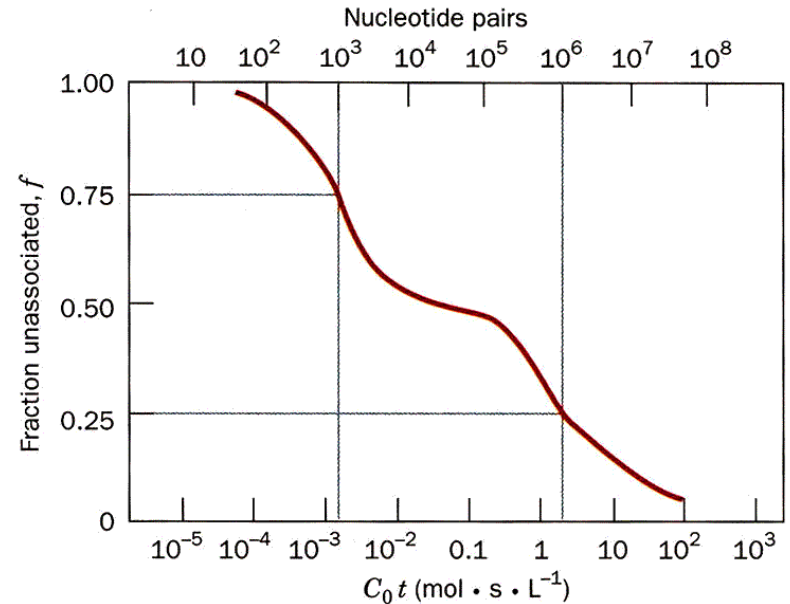
When a solution of duplex DNA is heated above its **melting temperature** (T_m), the complementary strands separate and assume a random coil conformation. This denaturation is accompanied by an increase (~40%, **hyperchromicity**) in UV absorbance (260 nm). The sigmoidal melting curve indicates that the melting process is **cooperative**. T_m increases linearly with the mole fraction of G-C base pairs.



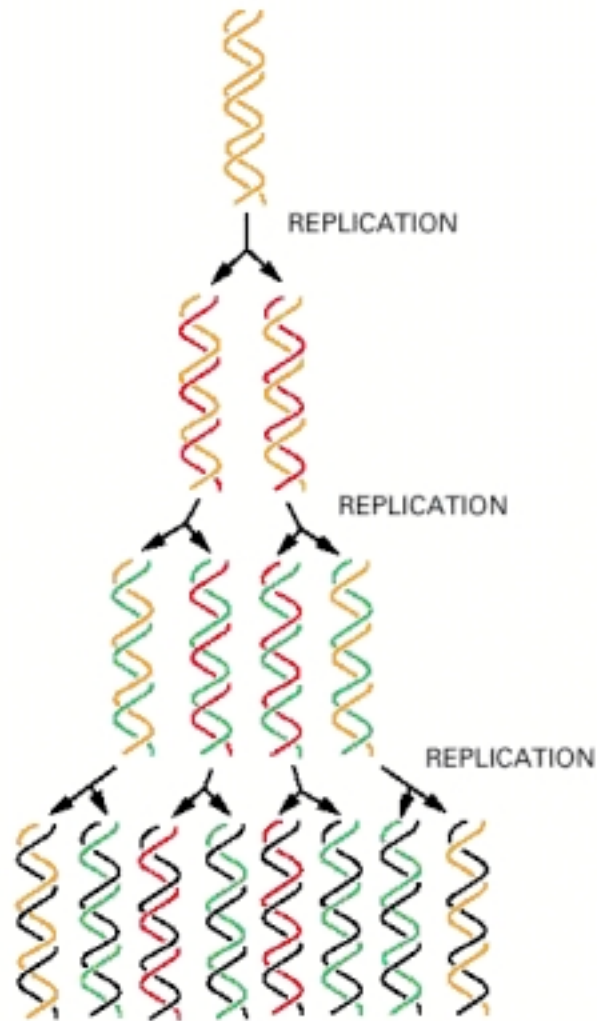
Denatured DNA can be renatured

Annealing conditions ($\sim 25^\circ\text{C}$ below T_m) permit base-paired regions to reform and over time to completely recover native duplex structure. This procedure forms the basis of **hybridization**, the formation of complementary hybrid DNA-RNA double helices. The renaturation rate is an indicator of the “sequence complexity” for a specific DNA.

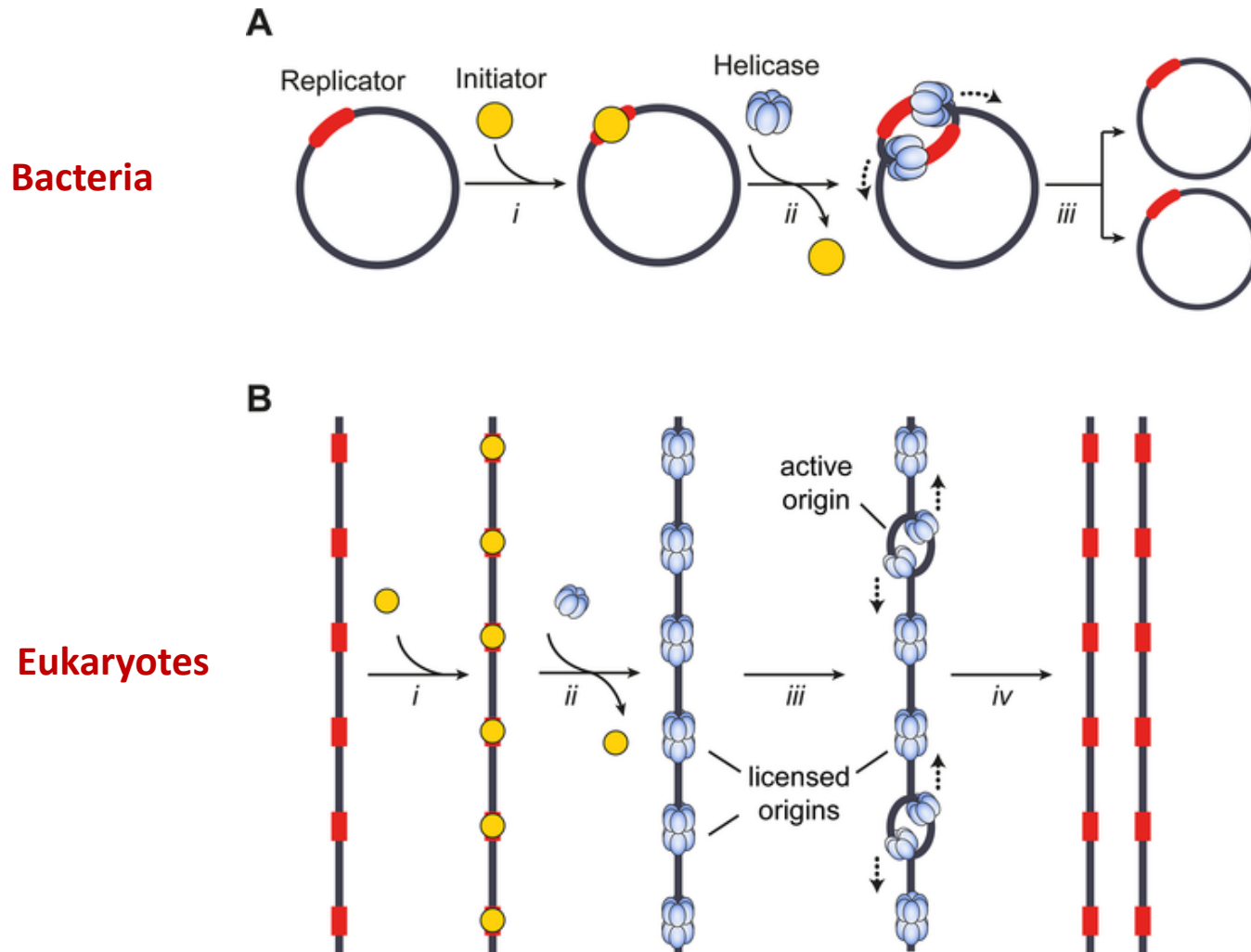
The rate of renaturation is often plotted as the fraction reassociated as a function of C_0t , the product of the initial concentration of denatured DNA and the time elapsed during annealing.



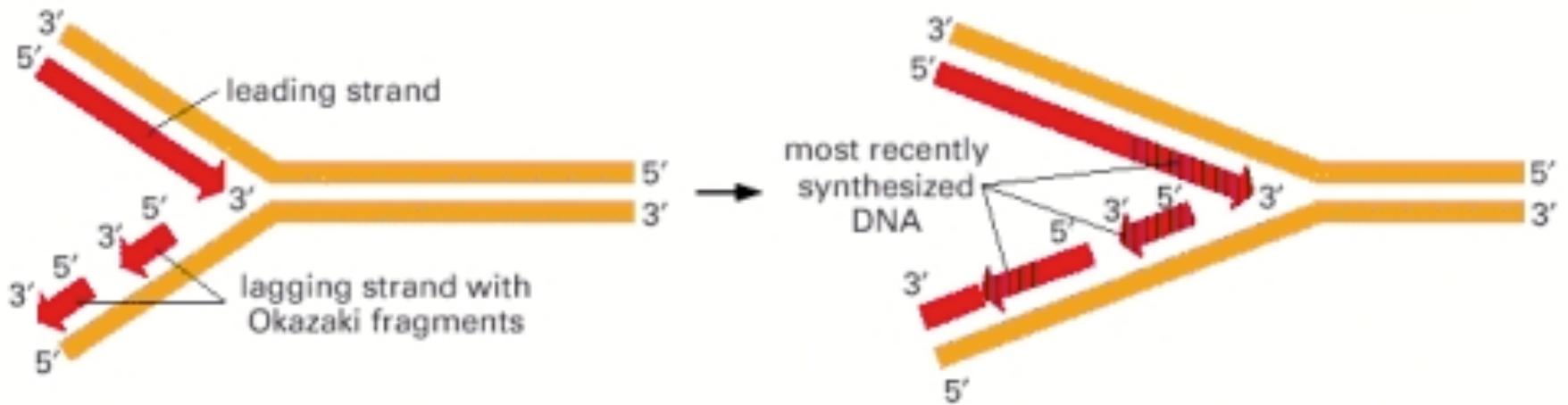
DNA Replication



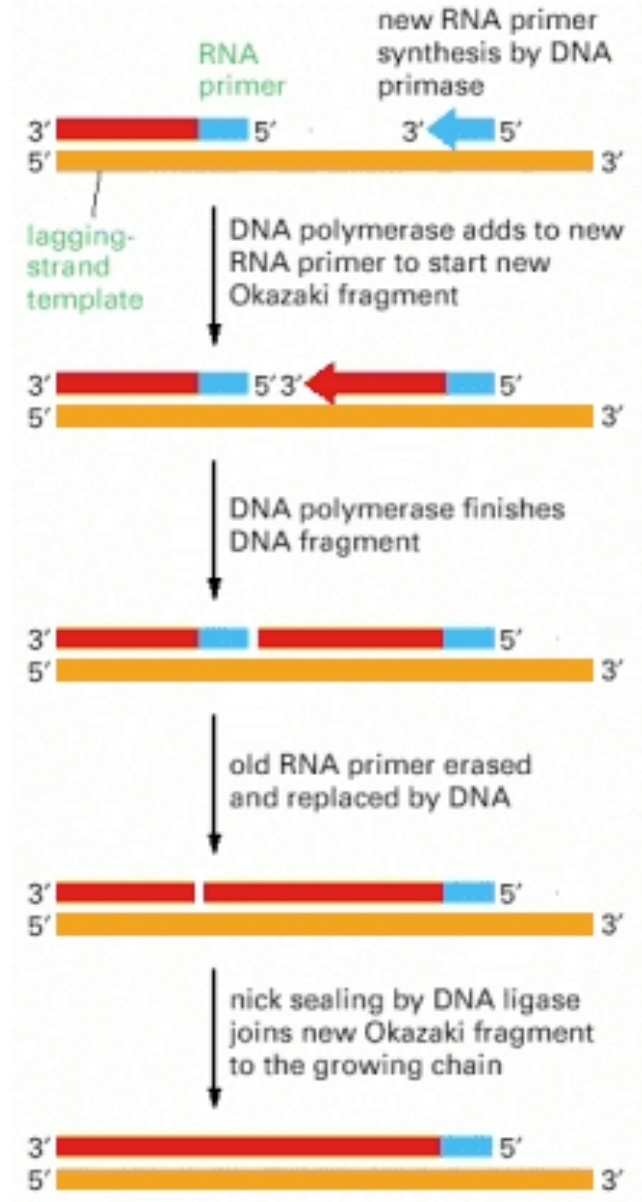
Principles of DNA replication initiation



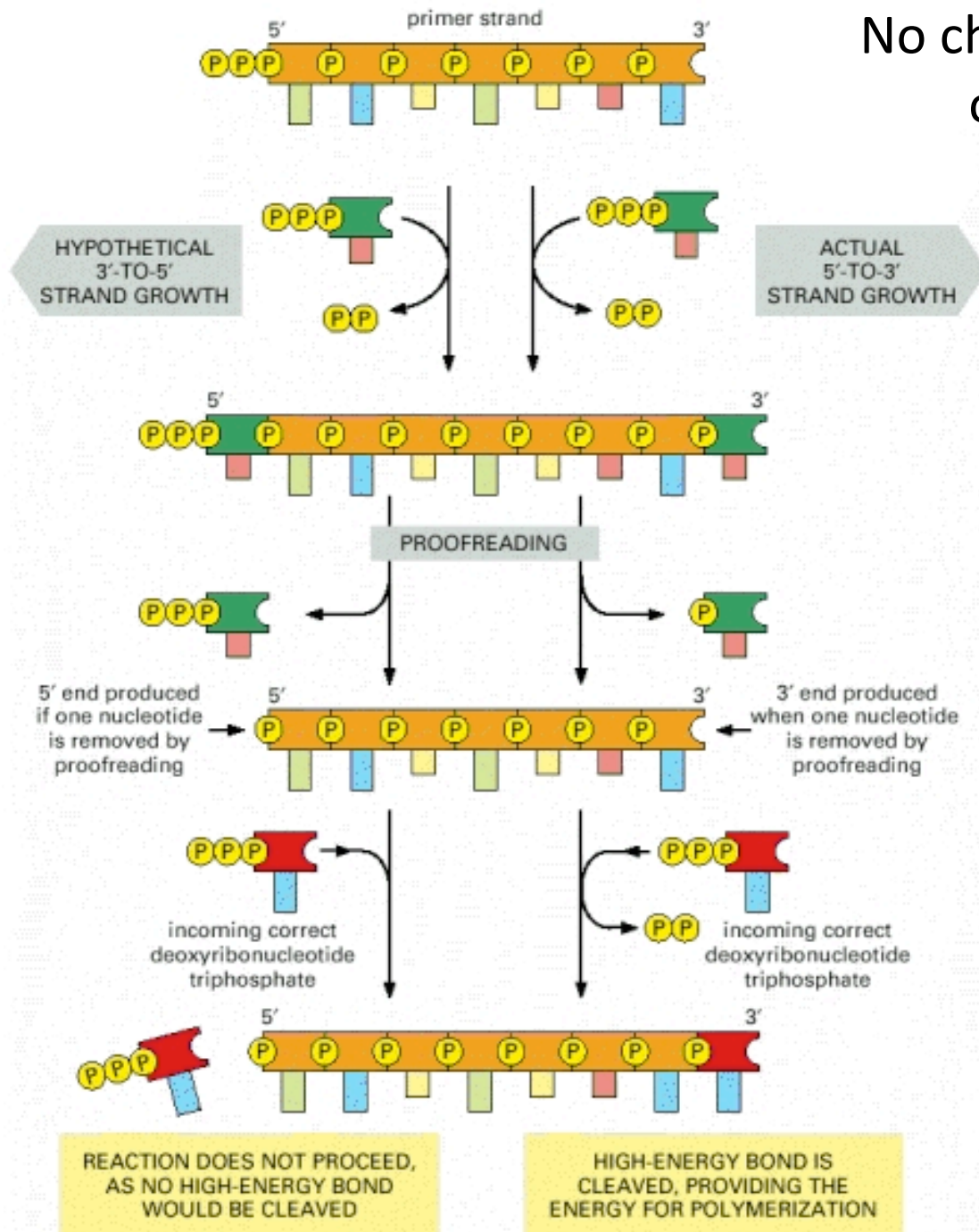
Replication: the problem of two strands



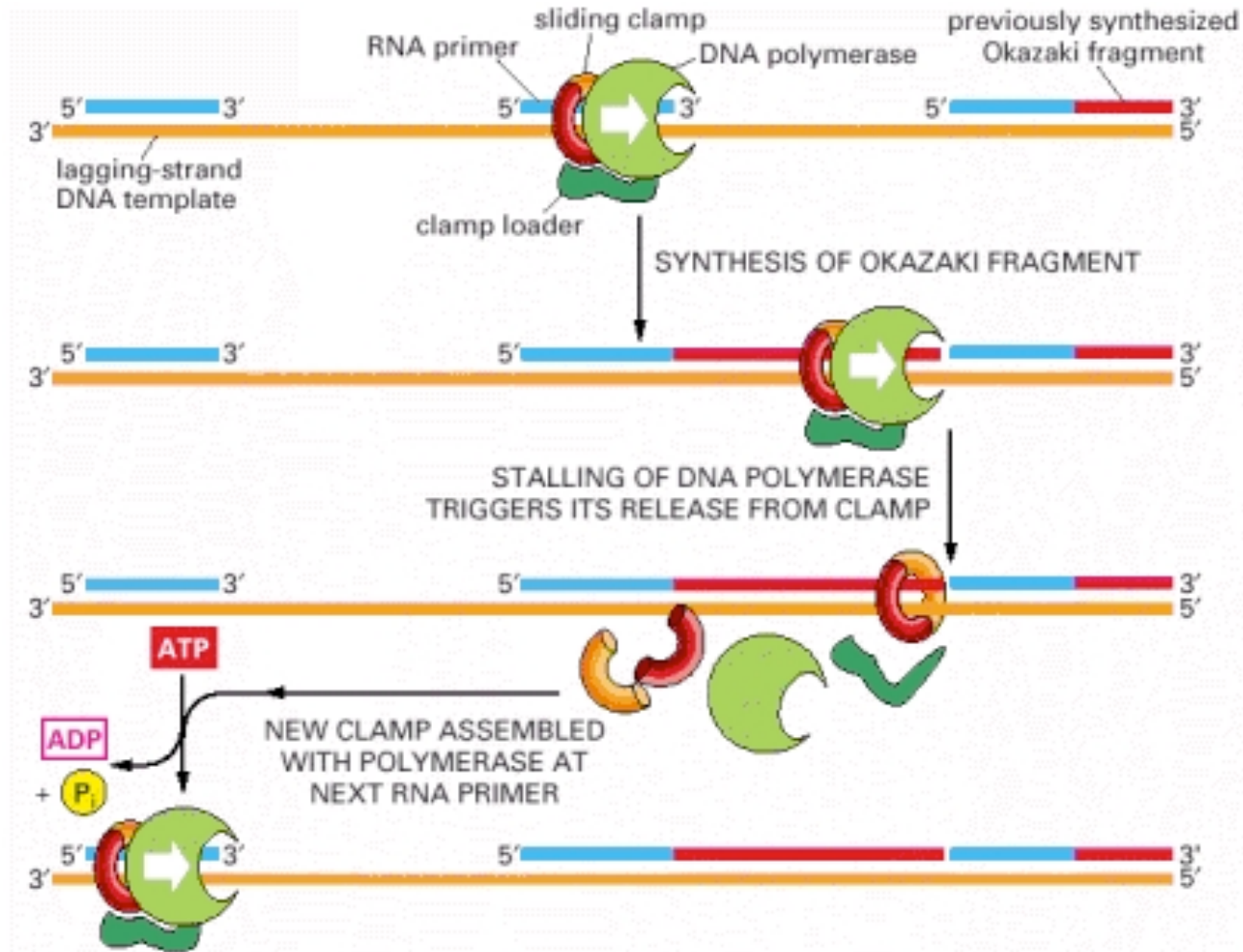
Steps of DNA synthesis during replication



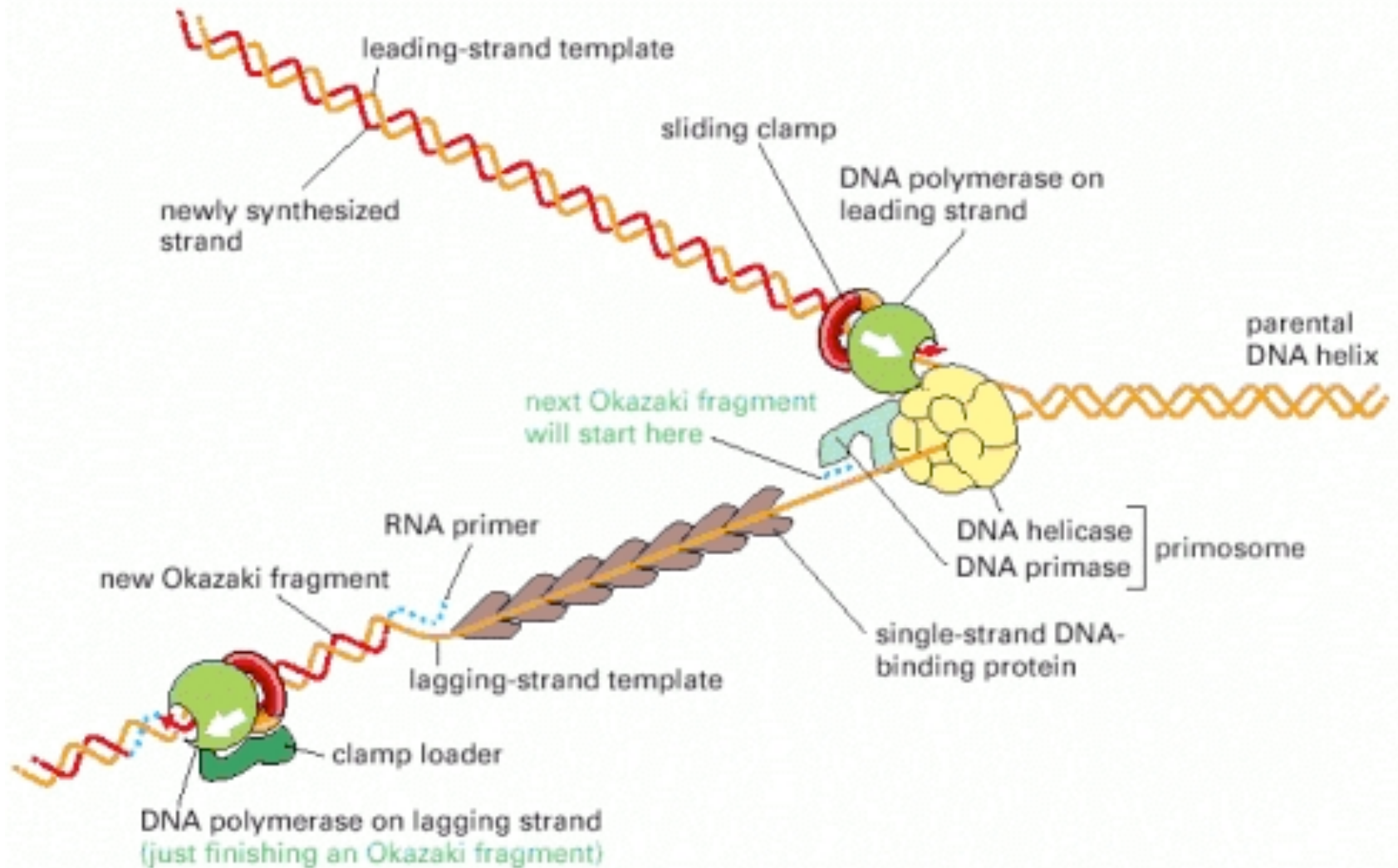
No choice: 5'-3' orientation of the DNA strand



Action of the DNA polymerase during DNA replication



The proteins that act at a bacterial DNA replication fork



The moving replication fork

