

# REGULATION GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES: OOPPEERROONNSSCCAATTAABBOOLLIIQQUUEESS & ANABOLIQUES

## 1. Introduction

### 1.1. Pourquoi il y a régulation de l'expression des gènes?

Pour répondre aux conditions changeantes de l'environnement immédiat

## 1.2. Qu'est-ce-que la REGULATION GENETIQUE ?

=Un moyen pour la cellule de développer des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des protéines inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires

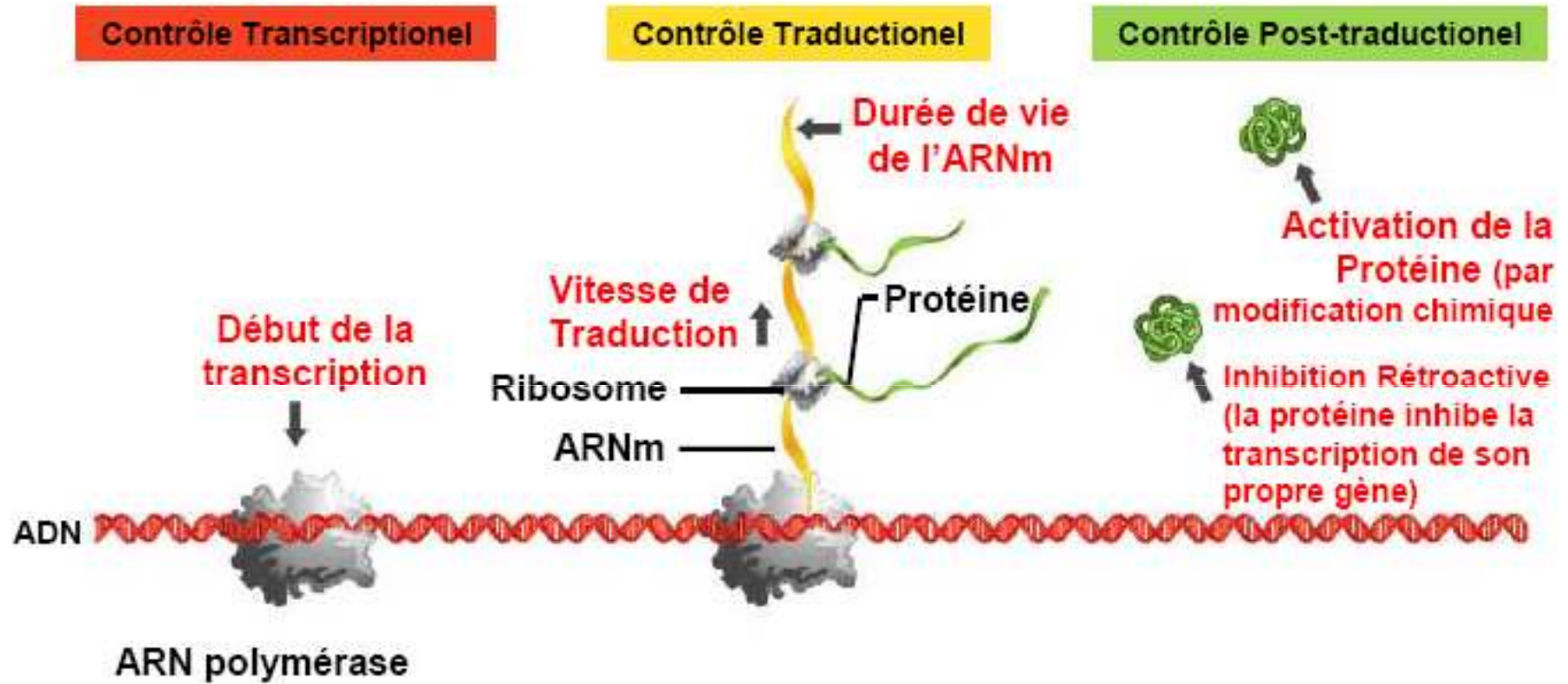
Deux classes de mécanismes de régulation :

- 1- mécanismes opportunistes
- 2- mécanismes généraux

Deux modes de régulation de l'expression d'un gène cible par une molécule régulatrice :

- 1- d'une façon **positive** : l'interaction déclenche la transcription du gène
- 2- d'une façon **négative** : l'interaction empêche la transcription du gène

# 1.3. Niveaux de régulation



## Quelques constats

1. Un organisme unicellulaire, avec un temps de génération très court, doit pouvoir répondre rapidement à des changements de son environnement.
2. Les demi-vies de la plupart des ARNm sont courtes (de l'ordre de quelques minutes).
3. La transcription et la traduction sont couplées et se réalisent dans le même compartiment cellulaire.

**La régulation génique doit prendre effet tôt**

**effectivement**

**LE POINT DE CONTRÔLE MAJEUR =  
L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION.**

## 2. Régulation de la transcription

### 2.1. Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription

#### 2 modes distincts de contrôle de l'initiation de la transcription

- 1- un contrôle constitutif qui dépend de la structure du promoteur
- 2- un contrôle de régulation qui est sous la dépendance de protéines régulatrices

## CONTRÔLE CONSTITUTIF

- ✿ niveau de base de l'initiation de la transcription déterminé par la structure du promoteur.
- ✿ variabilité dans la séquence consensus du promoteur : modification de l'efficacité du promoteur.

## Expression Constitutive

- Expression en tout temps de protéines nécessaires à la survie/croissance
- Généralement servant à:
  - synthèse de l'ADN et de l'ARN
  - Synthèse des Protéines
  - Transport des électrons
  - Enzymes du métabolisme

## Les bactéries expriment seulement un sous-ensemble de leurs gènes à un temps donné

- L'expression de tous les gènes constitutivement dans les bactéries serait énergétiquement inefficace.
  - Ce n'est pas tous les promoteurs qui sont constamment accessible à l'ARN polymérase
- Les gènes qui sont exprimés sont essentiels pour traiter les conditions environnementales courantes, telles que le type de source disponible de nourriture.
  - Quels gènes sont transcrits dépend de quelles molécules spécifiques sont présentes dans le milieu (et dans la cellule)
  - L'expression des enzymes spécifiques exigées pour le métabolisme des molécules particulières peut être *induite ou réprimée sur demande*

# CONTRÔLE de REGULATION

*Principe de base de la régulation de la transcription :*

La liaison d'une protéine spécifique à un site donné de l'ADN influence l'ensemble des événements composant l'assemblage du complexe d'initiation et/ou l'initiation d'une synthèse productive d'ARN par l'ARN polymérase.

## Régulation métabolique

- De façon générale, plus il y a de la nourriture, plus les gènes sont transcrits.
- Beaucoup de nourriture donne beaucoup d'ATP.
  - Beaucoup d'enzymes utilisent l'ATP comme source d'énergie
  - L'ATP est le nucléotide initiateur
  - L'affinité pour un ATP initiateur est moins grande que pour un ATP

d'élongation

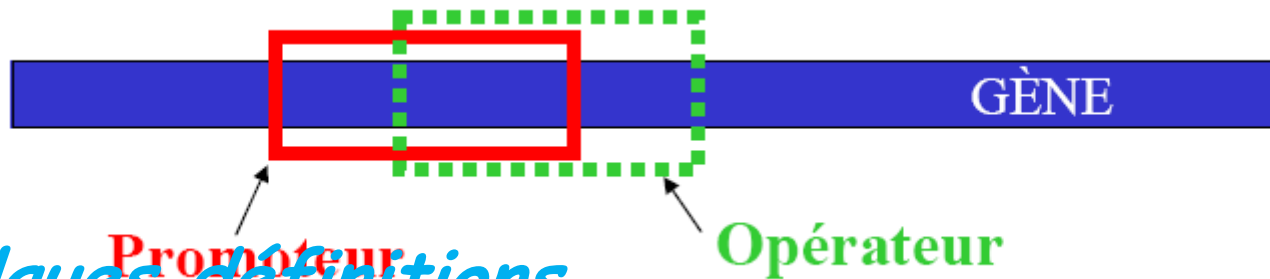
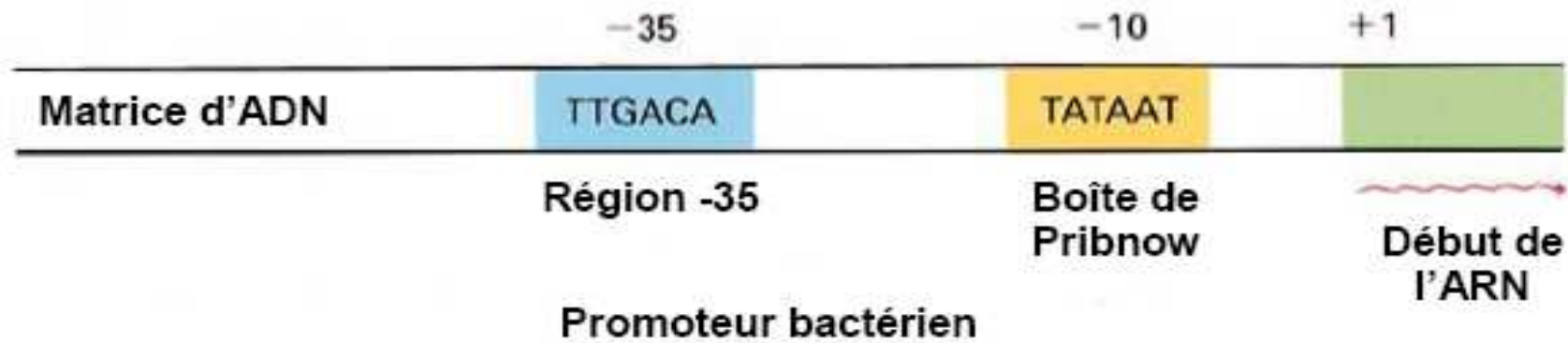
## *Quelques définitions*

🌈 **Facteur de transcription**: protéine de régulation transcriptionnelle.

🌈 **Activateur**: protéine qui stimule l'initiation de la transcription favorise l'expression d'un gène.

🌈 **Répresseur** : protéine qui inhibe la transcription et empêche l'expression d'un gène.

🌈 **Opérateur** : site cible de la protéine répresseur (souvent proche du site d'initiation de la transcription)



## Quelques définitions...

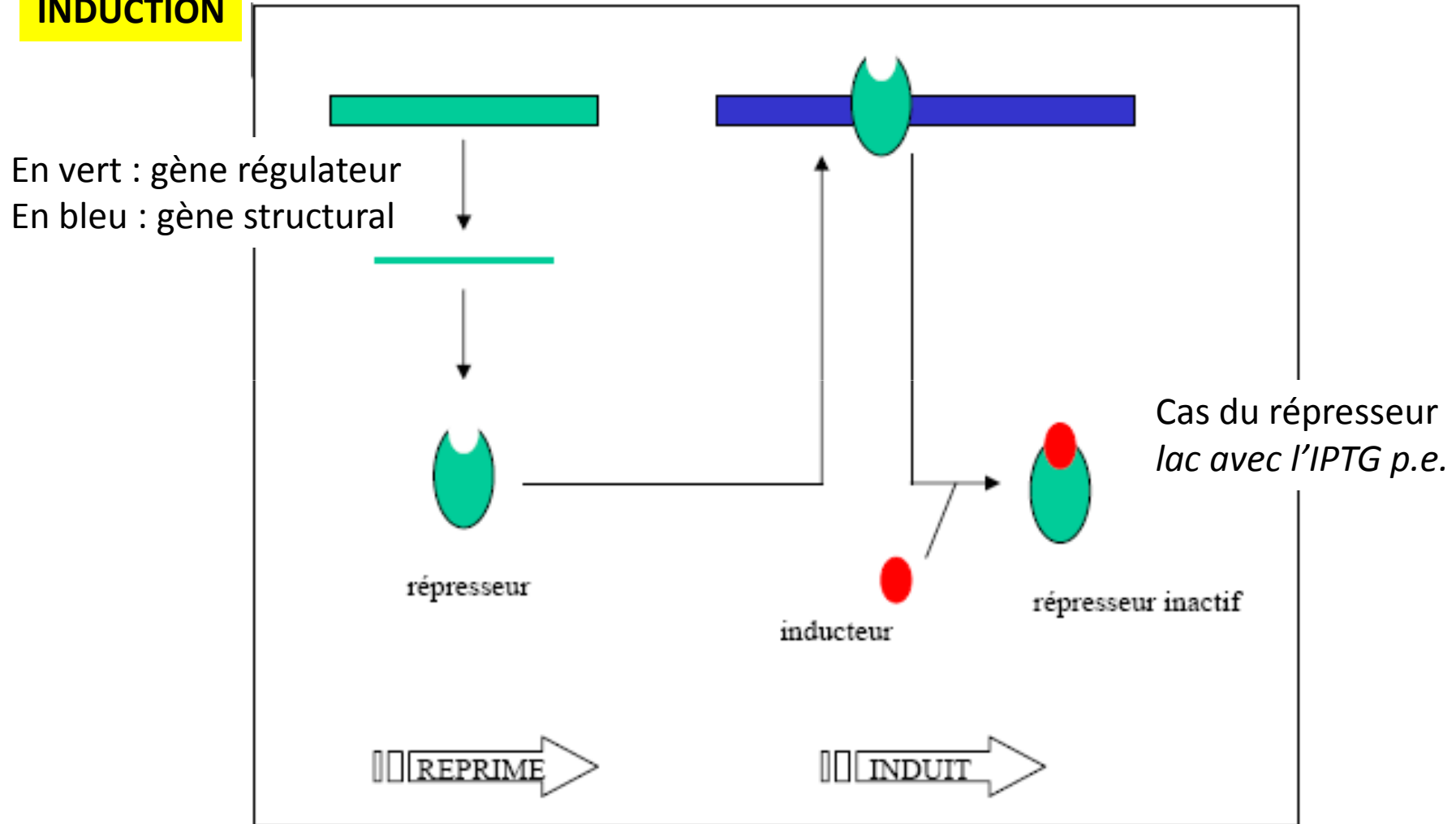
**Gène de structure** : code une protéine structurale, une enzyme ou une protéine régulatrice.

**Gène de régulation** : code une protéine impliquée dans la régulation d'expression d'autre gène.

## 2.2. Contrôles positif-négatif

LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST NEGATIF:

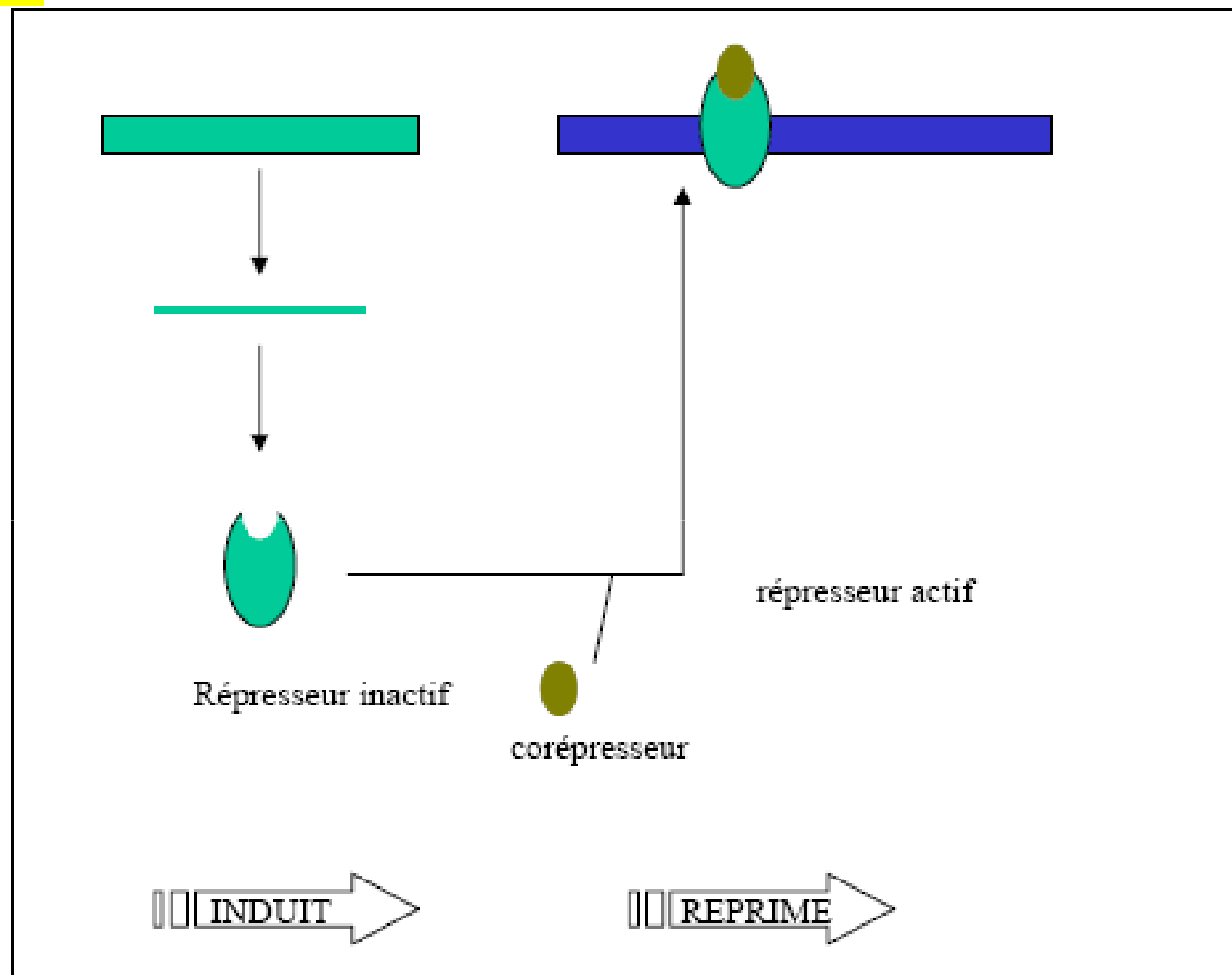
INDUCTION



Lorsque la protéine répresseur se fixe à l'opérateur, l'ARN polymérase ne peut plus initier la transcription ce qui empêche l'expression du gène.

# LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST NEGATIF:

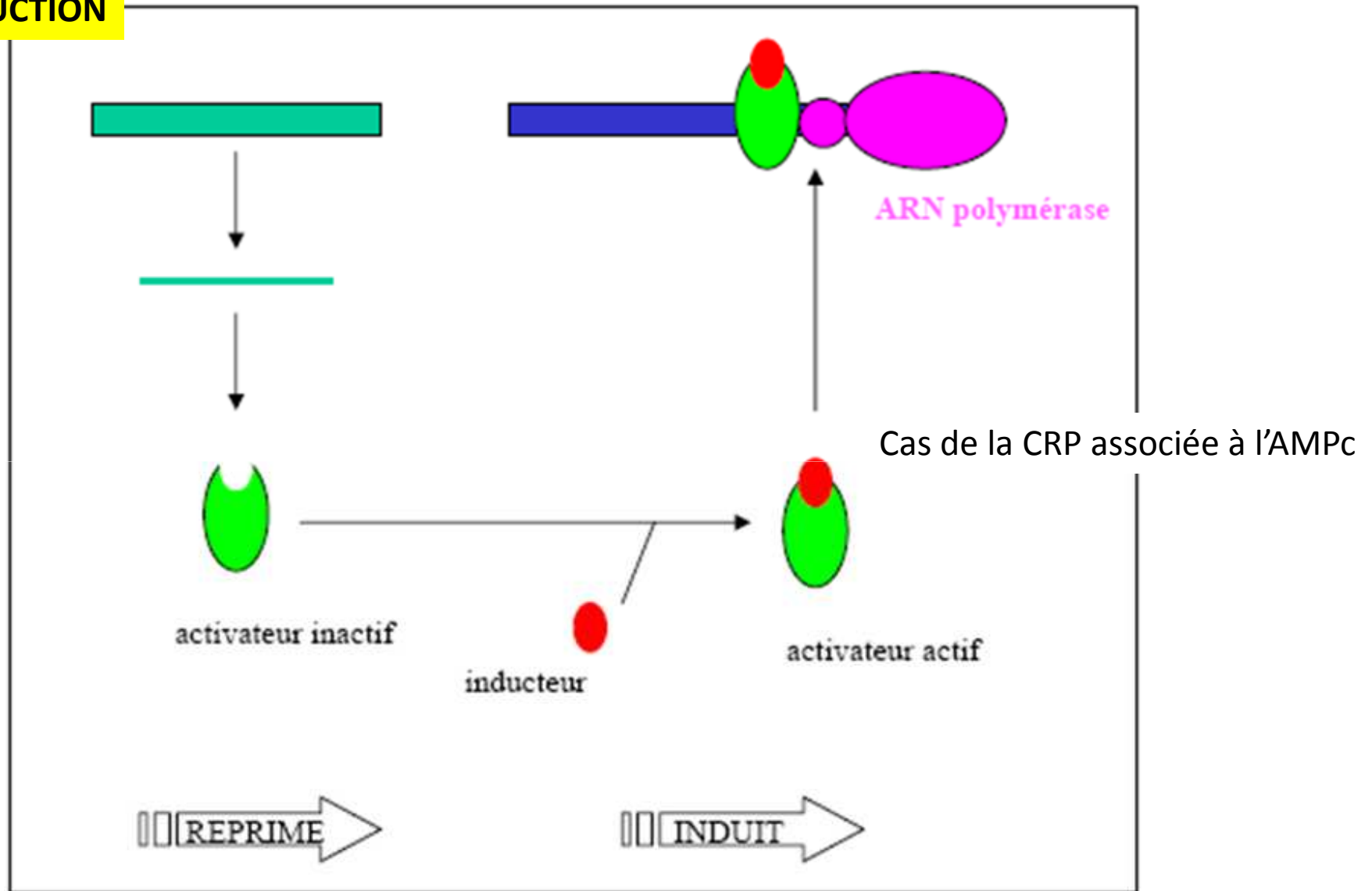
## REPRESSION



Lorsque le co-répresseur se fixe à la protéine répresseur cette dernière s'active et se fixe à l'opérateur , l'ARN polymérase ne peut plus initier la transcription ce qui empêche l'expression du gène.

# LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST POSITIF:

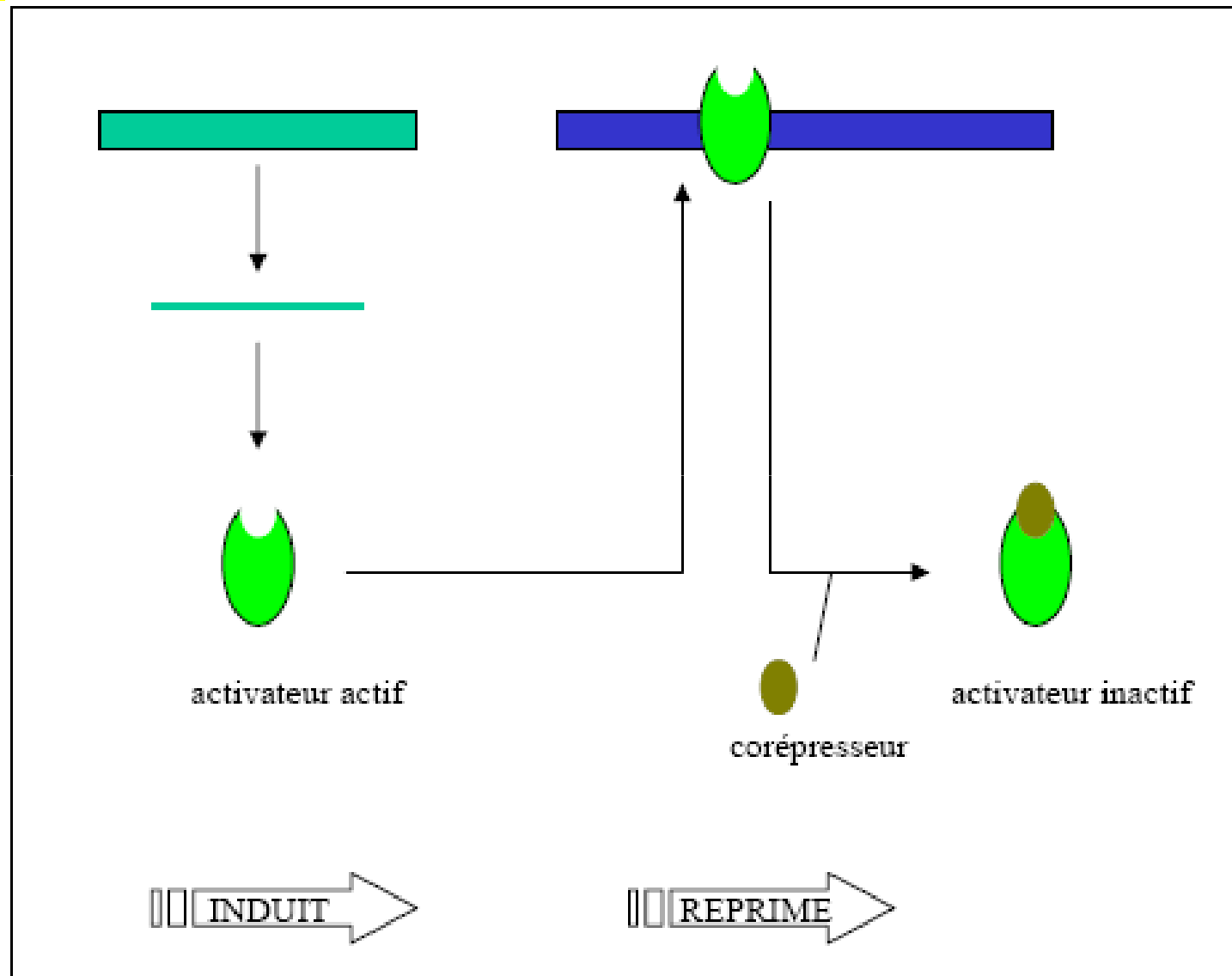
## INDUCTION



Un facteur de transcription doit assister l'ARN polymérase pour l'initiation au niveau du promoteur.

# LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST POSITIF:

## REPRESSION



21 Un corépresseur va inactiver l'activateur → pas de fixation de l'ARN polymérase au niveau du promoteur → pas de transcription.

## En résumé

**Contrôle négatif** : le répresseur inactive la transcription

**Contrôle positif** : l'activateur active la transcription

**Opéron inductible:**

**avec inducteur:**

**activation de la transcription**

**Opéron répressible:**

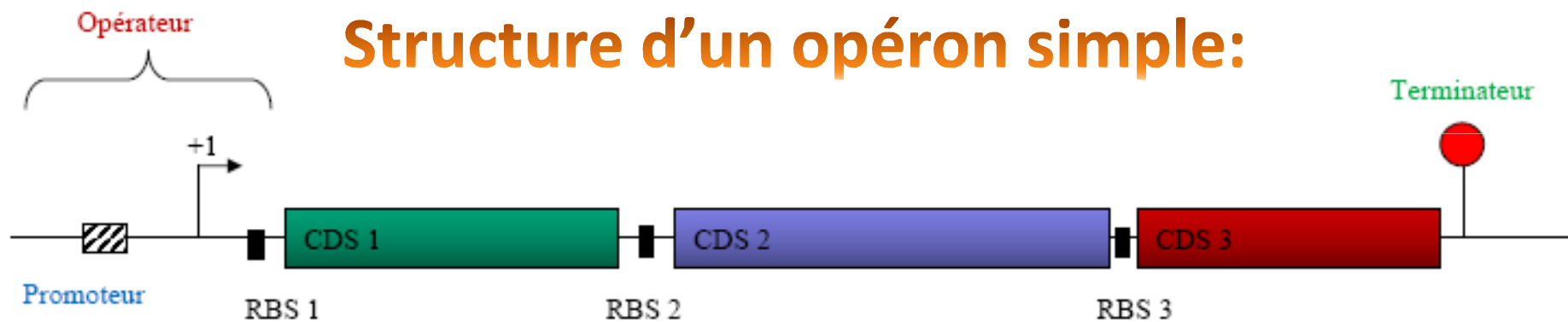
**avec corépresseur:**

**inhibition de la transcription**

## 2.3. Notion d'opéron

@généralement trouvés chez les procaryotes, avec quelques exemples maintenant connus chez les eucaryotes (Némathelminthes, Plathelminthes).

@chez les bactéries, quand un promoteur sert une série de gènes groupés, l'ensemble de gènes s'appelle un *opéron*.



**Opérateur** : contrôle de la transcription

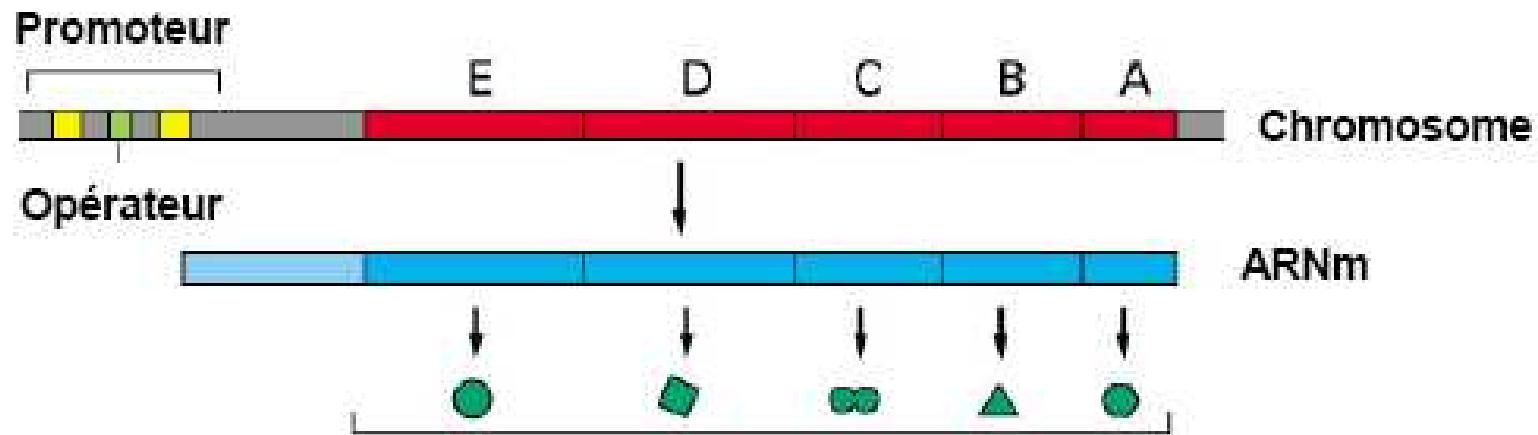
**Promoteur** : fixation de l'ARN polymérase

+1 : début de la transcription

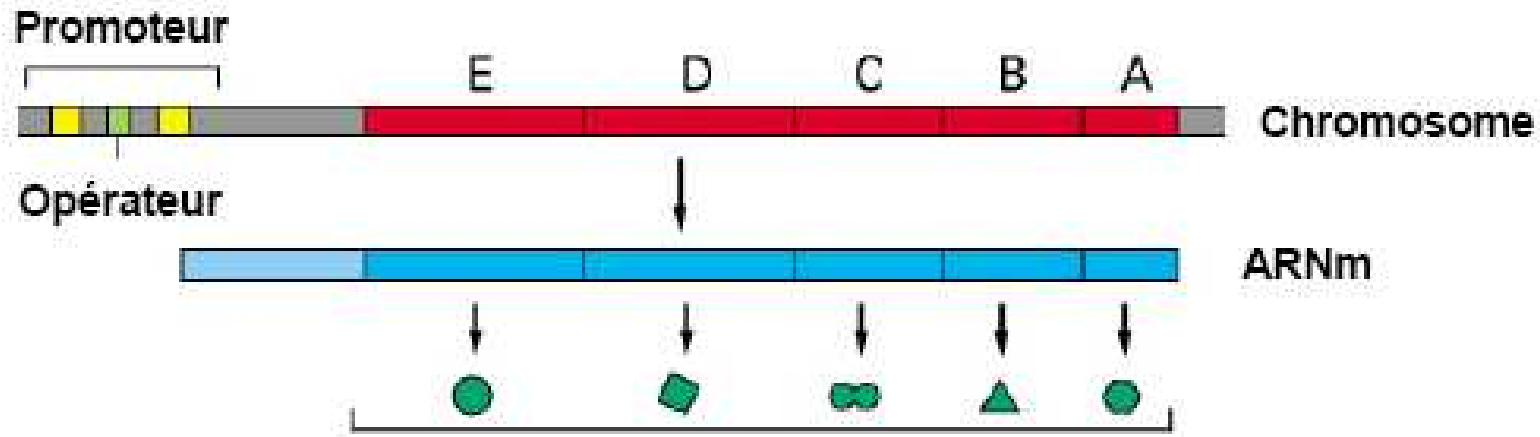
RBS ('ribosome binding site') : fixation du ribosome

CDS ('coding sequence') : séquence codant pour une protéine

**Terminateur** : fin de la transcription

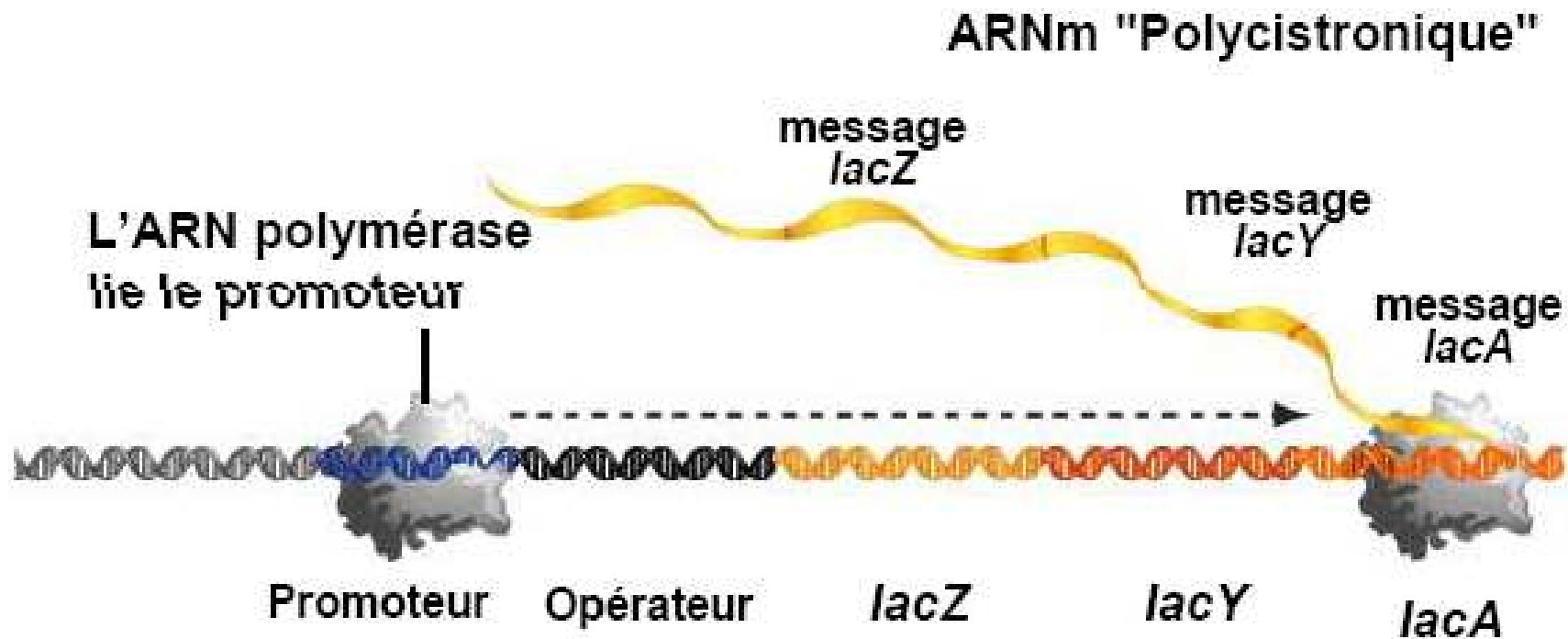


- tous ces gènes sont transcrits en un *ARNm simple*
- chaque section de ces *ARNm* (appelés *ARNm polycistroniques*) peut alors être traduite indépendamment
- les gènes d'un opéron donné codent souvent pour plusieurs enzymes actives dans une *même voie métabolique*



- L'occurrence des gènes dans les opérons permet à l'expression des gènes d'être commandée de façon *coordonnée*
- Une situation très économique (bien que les taux de traduction des différents gènes (*cistrons*) dans l'opéron peuvent changer
- L'expression (production d'ARNm) des opérons peut être *induite* ou *réprimée* par des molécules effectrices spécifiques (par exemple, produits chimiques, aliments, etc...) un *commutateur génétique* extrêmement important chez les bactéries

Les opérons produisent des ARNm qui codent pour des protéines fonctionnellement reliés. Exemple de l'opéron Llac::



### 3.1. OPERON LAC: Définition et structure

1961 : Jacob et Monod décrivent comment des gènes adjacents impliqués dans le métabolisme du lactose sont régulés de façon coordonnée par un élément génétique localisé à proximité des gènes. Il y a des séquences d'ADN codant pour des produits agissant en trans ou

en cis. (prix Nobel de médecine et de physiologie en 1965)

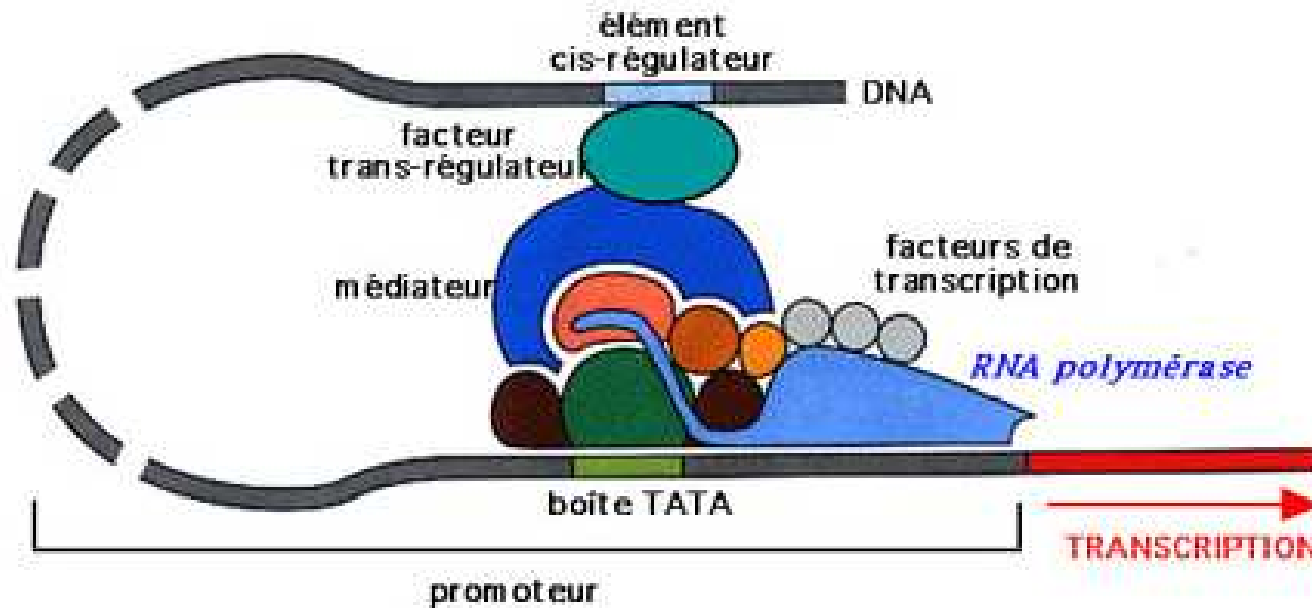
## Quelques définitions...

🌈 **Trans** : les produits sont libres de diffuser pour trouver une cible (activateur, répresseur)

🌈 **Cis** : pour toute séquence d'ADN non transformée en une autre molécule, elle agit in situ et touche l'ADN auquel elle est liée (promoteur et opérateur)

🌈 **Opéron** : ensemble de gènes structuraux et d'éléments contrôlant leur expression : promoteur, opérateur et un gène régulateur.

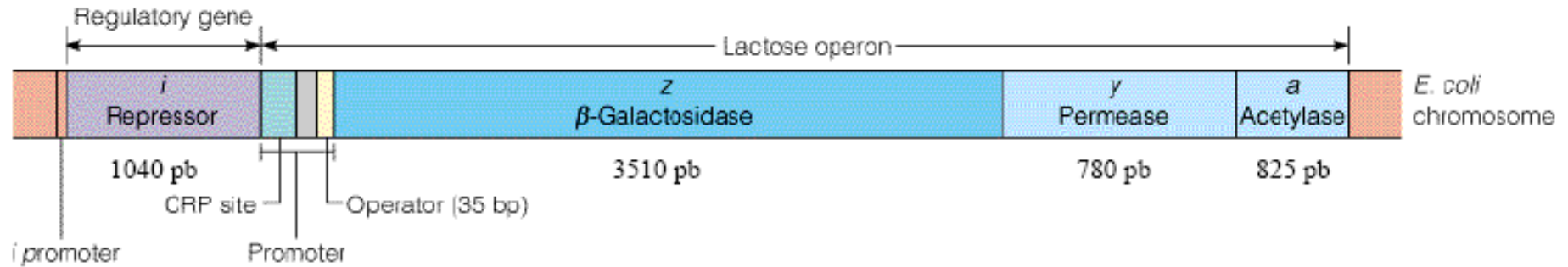
# Régulation de la RNA polymérase



Les activateurs ou inhibiteurs de la transcription (facteurs trans-régulateurs) sont des protéines produites par d'autres gènes qui interviennent pour activer ou pour inhiber la RNA polymérase et par suite induire ou réprimer l'expression du gène à transcrire.

Ces facteurs trans-régulateurs se lient à l'ADN dans la région du gène située en amont de la partie transcrite. Les sites de fixation de ces facteurs trans-régulateurs sur le DNA sont des séquences spécifiques appelées éléments cis-régulateurs.

# L'opéron *lac* : organisation



3 gènes structuraux: *z*, *y* & *a*

- codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose
- sont exprimés continuellement à faible taux
- sont induits environ 1000 fois quand le lactose est présent
- sont modulés par le taux de glucose du milieu



- Le gène *lacZ* encode l'enzyme  *$\beta$ -galactosidase*, qui décompose le lactose (en galactose et glucose)
- Le gène *lacY* encode la galactosidase *perméase*, une protéine de transport pour le lactose.
- Le gène *lacA* encode la *thiogalactoside acétyltransférase*.
- Le gène *lacI* (gène adjacent n'appartenant pas à l'opéron) encode un *répresseur* qui bloque la transcription de l'opéron lactose.

**Les enzymes du métabolisme du lactose sont inductibles**

## Les inducteurs de l'opéron lac

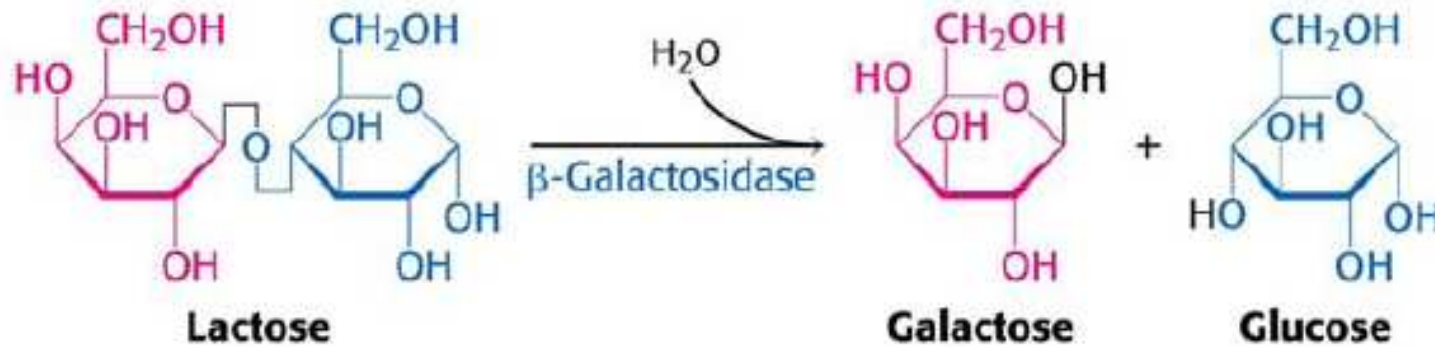
➤ **Lactose**, (substrate de l'opéron), converti en son isomère (par transglycosylation), l'allolactose.

➤ **Allolactose**, inducteur naturel (ou inducteur physiologique, isomère du lactose).

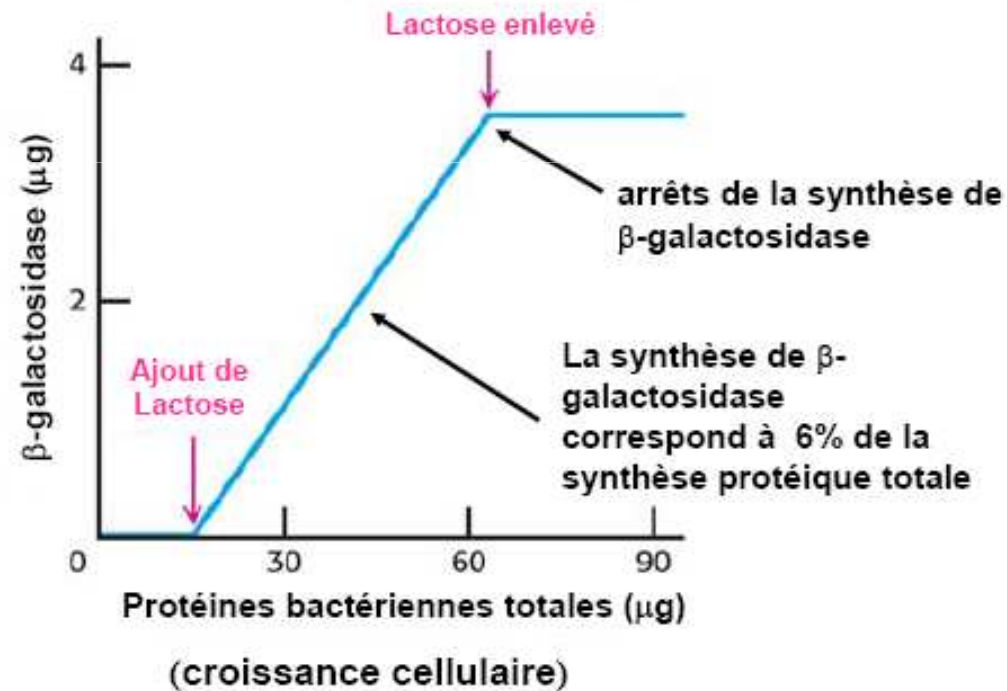
➤ **Inducteur gratuit** : induit l'opéron mais pas métabolisé.

Par exemple : isopropylthiogalactoside (IPTG)

## Equation de la réaction catalysée par la $\beta$ -galactosidase:

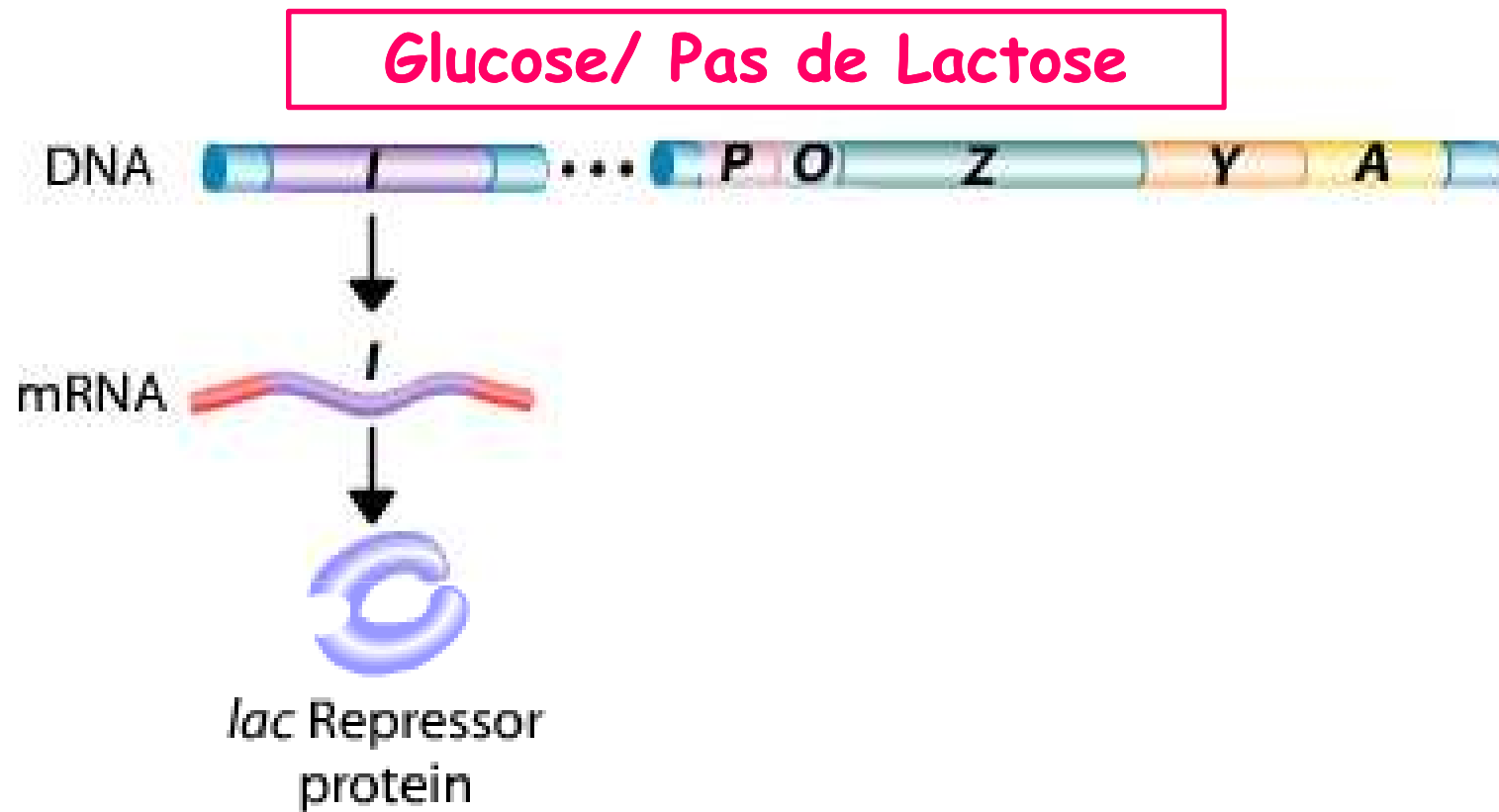


## Cinétique d'induction de l'activité $\beta$ -galactosidase chez *E. coli* :



L'augmentation de la synthèse de  $\beta$ -galactosidase se produit seulement en l'absence des sources préférées de carbone/énergie telles que le glucose

### 3.1. OPERON LAC: Fonctionnement

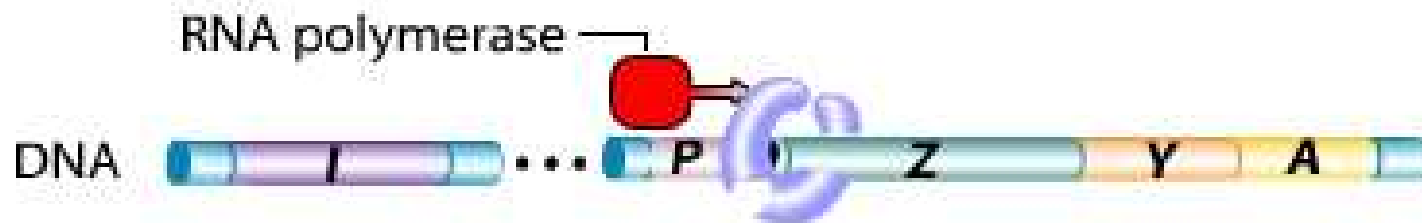


Genotype:  $I^+ O^+ Z^+ Y^+$

35 The Lac repressor protein, encoded by the *I* gene, is expressed in the absence or presence of lactose.

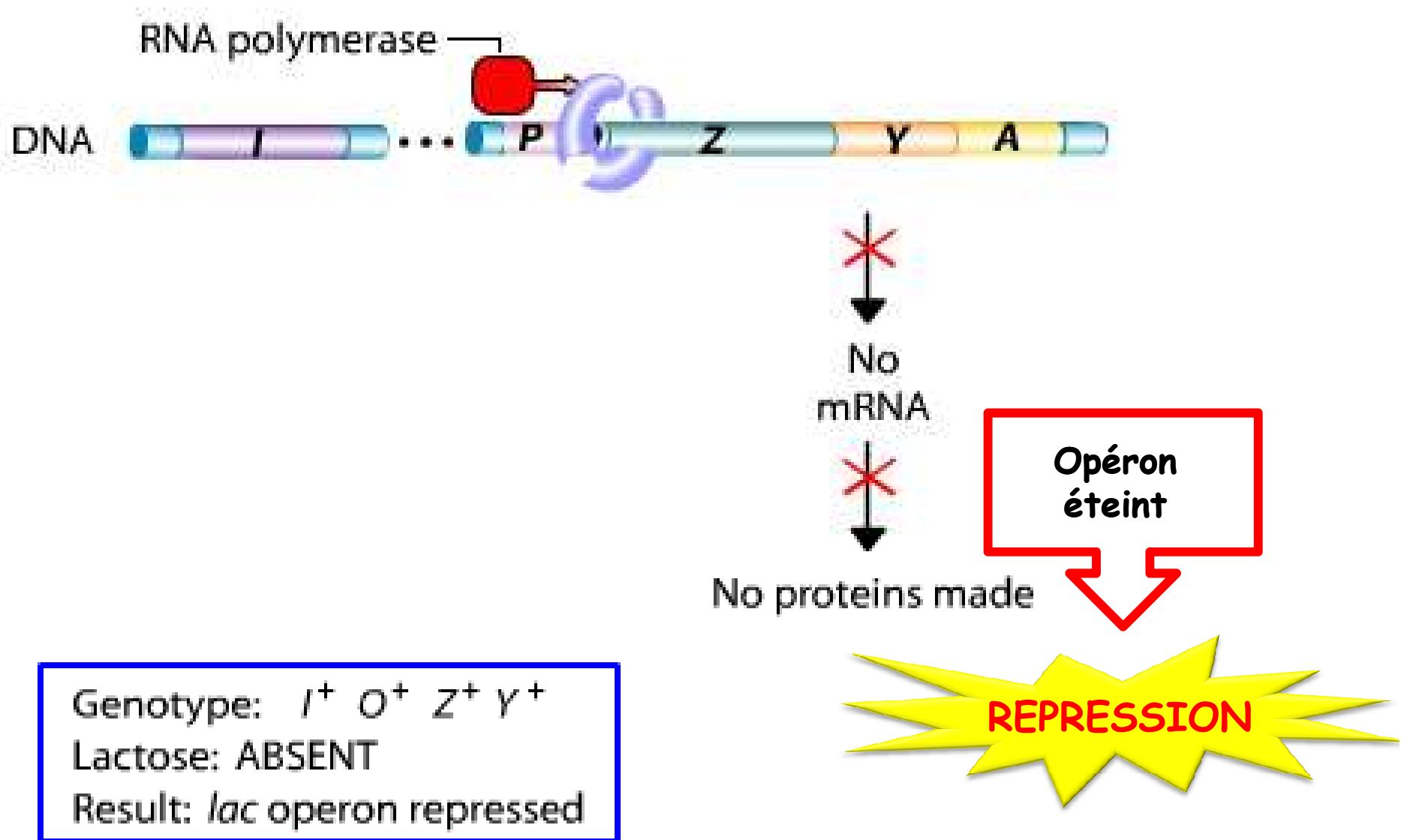
Genotype:  $I^+ O^+ Z^+ Y^+$   
Lactose: ABSENT

In the absence of lactose, the Lac repressor binds to the *lac* operator site.



Genotype:  $I^+ O^+ Z^+ Y^+$   
Lactose: ABSENT

Repressor binding to the operator blocks progression of RNA polymerase, like a DNA roadblock.

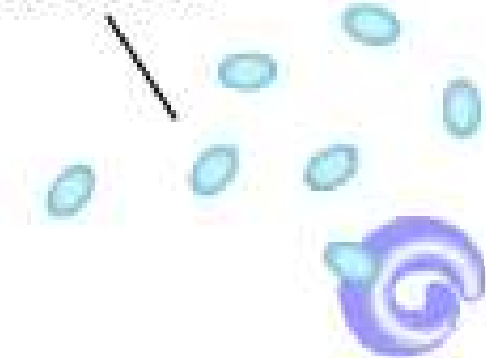


Since RNA polymerase is unable to transcribe the *lac* structural genes, the corresponding proteins are not made.

## Pas de Glucose/ Lactose

DNA  The diagram shows a horizontal DNA strand with several colored segments. From left to right, there is a blue segment, a purple segment, a light blue segment, an ellipsis, a pink segment labeled 'P', a light blue segment labeled 'O', a light blue segment labeled 'Z', an orange segment labeled 'Y', and a yellow segment labeled 'A'. The entire DNA strand is highlighted with a yellow glow.

Lactose

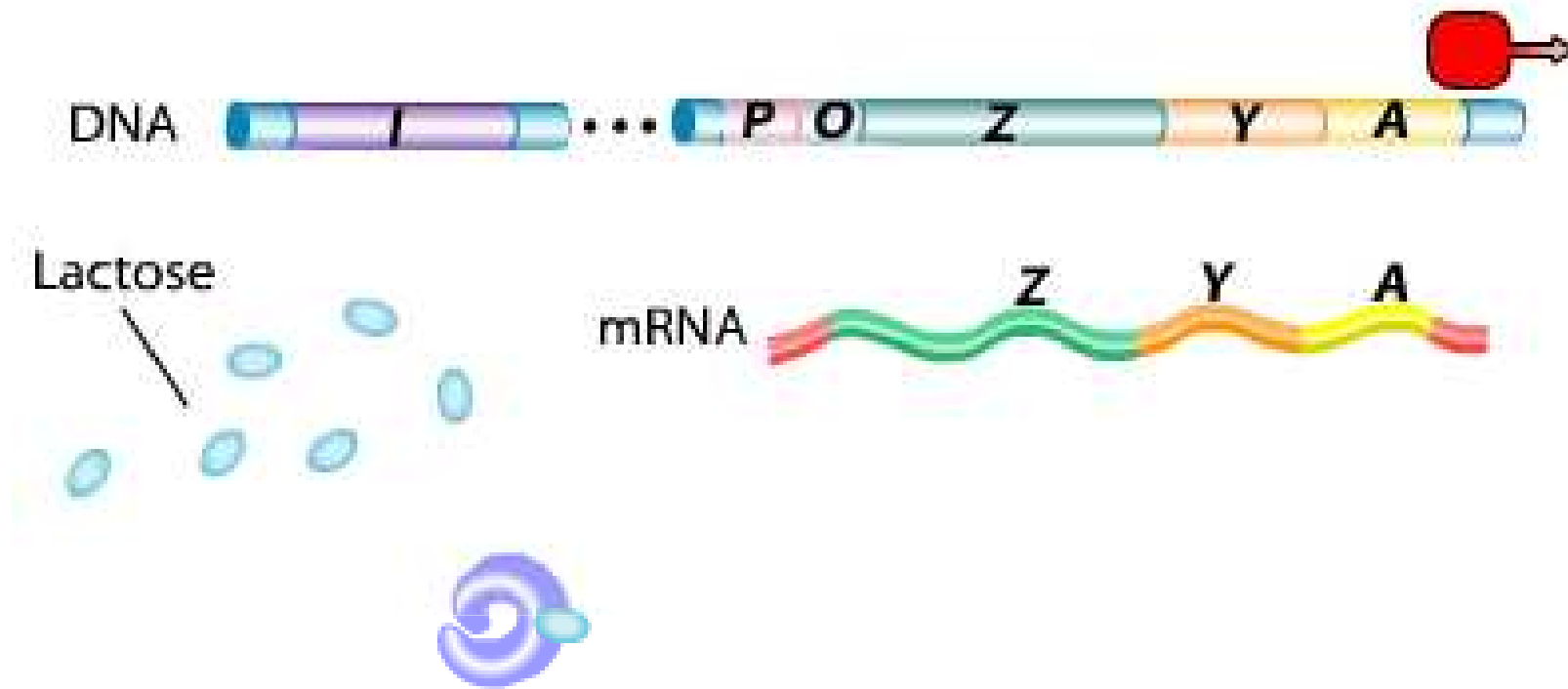


In this conformation, the repressor can no longer bind to the *lac* operator site.

Genotype:  $I^+ O^+ Z^+ Y^+$

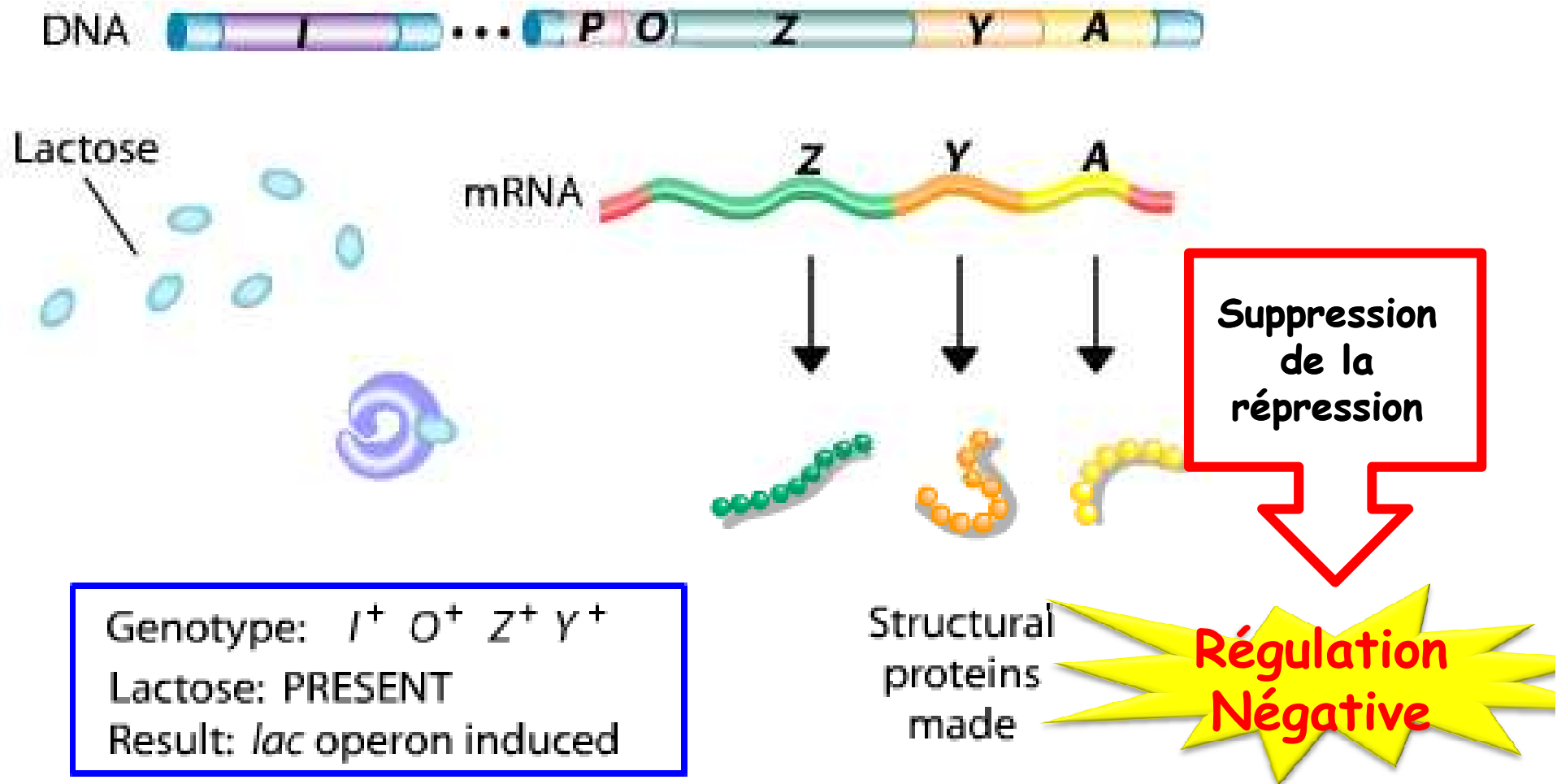
Lactose: PRESENT

When lactose is present in the cell medium, it binds to the allosteric site of the Lac repressor. This changes the conformation of the repressor.



Genotype:  $I^+ O^+ Z^+ Y^+$   
Lactose: PRESENT

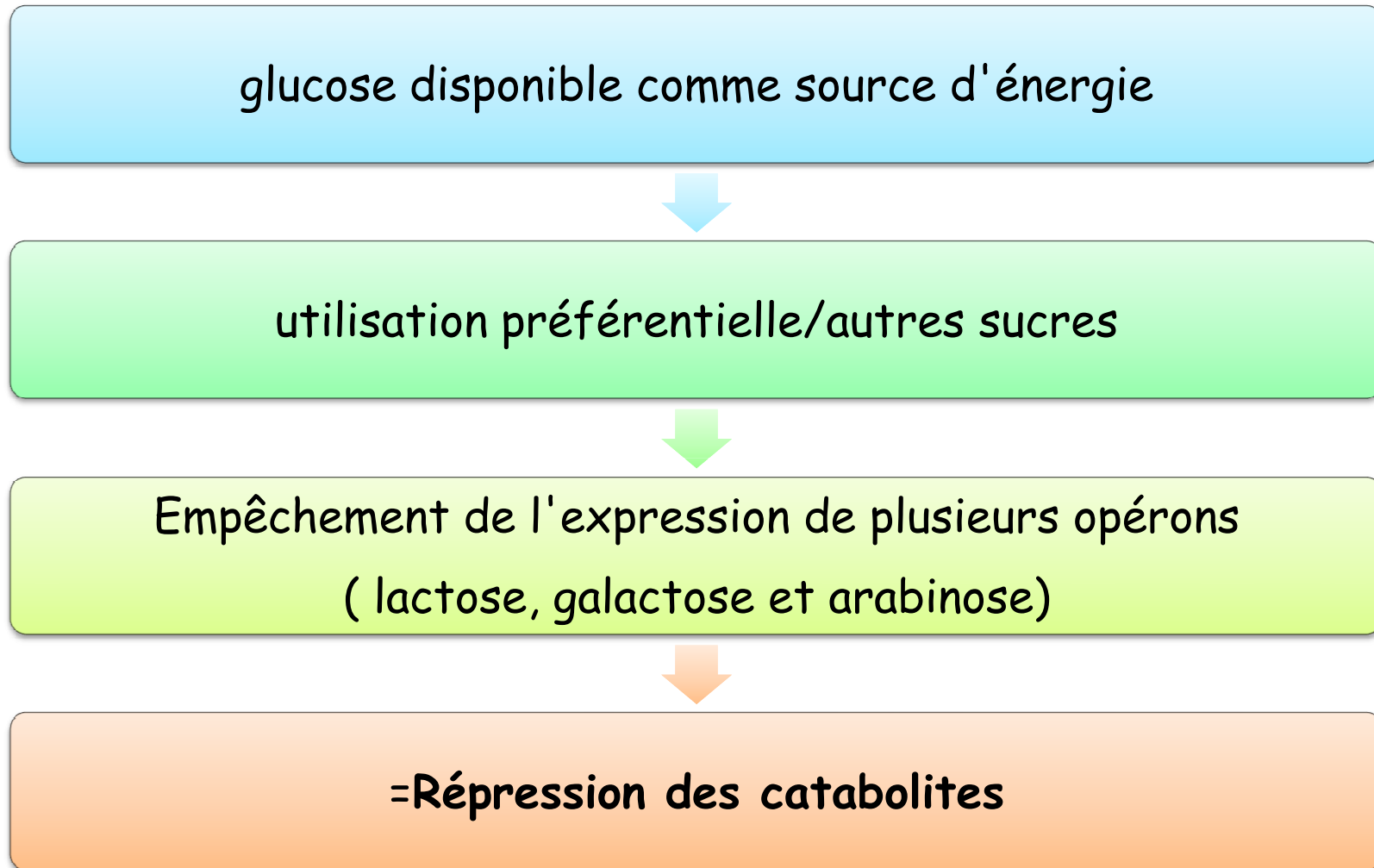
Without the repressor blocking its way, RNA polymerase is able to transcribe the structural genes.



Thus, in the presence of lactose, the *lac* structural genes are expressed. The proteins encoded by the Z and Y genes are required for the metabolism of lactose.

# & s'il y a les 2 Glucose/ Lactose ...?!

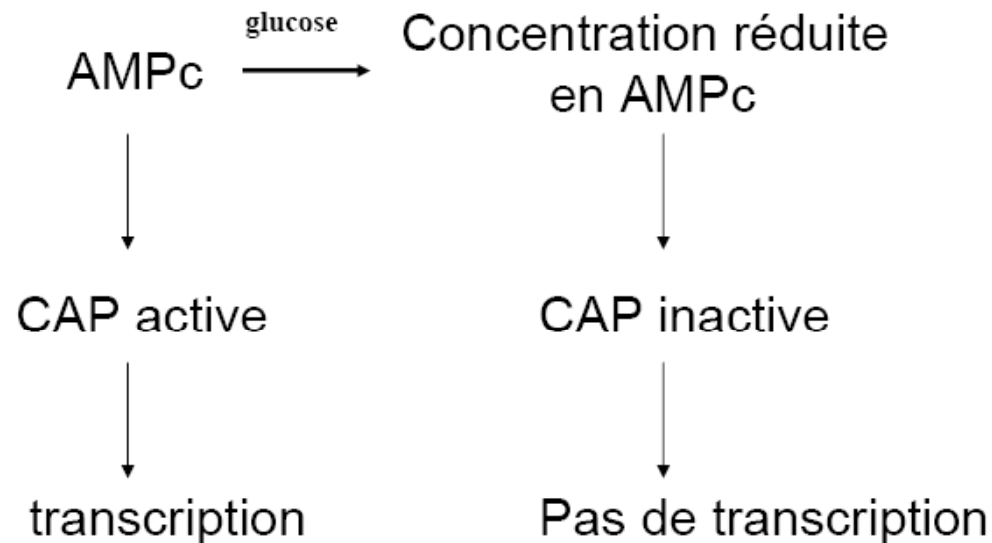
En général:



La répression des catabolites fait intervenir une **régulation positive** au niveau du promoteur.

# COMMENT?

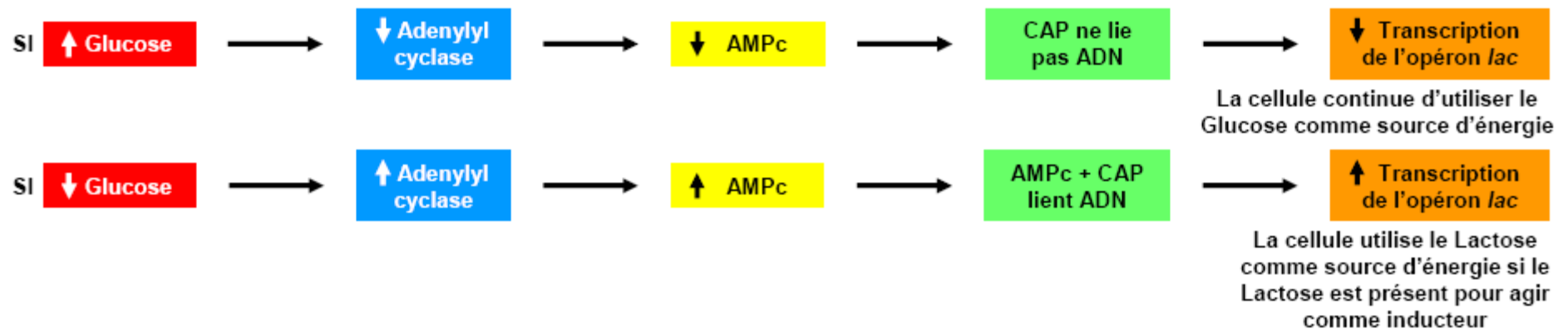
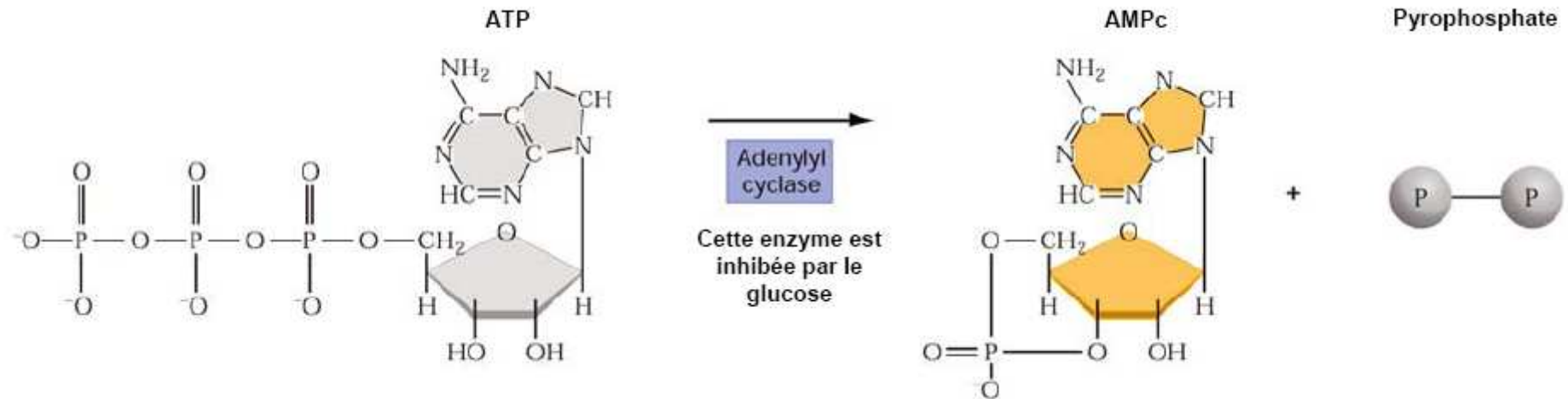
Le glucose entraîne une répression des catabolites en **diminuant** la concentration de l'**AMPc**.



► Peu de glucose => beaucoup d'AMPc => AMPc-CAP active => liaison à l'ADN => transcription: utilisation des autres sucres

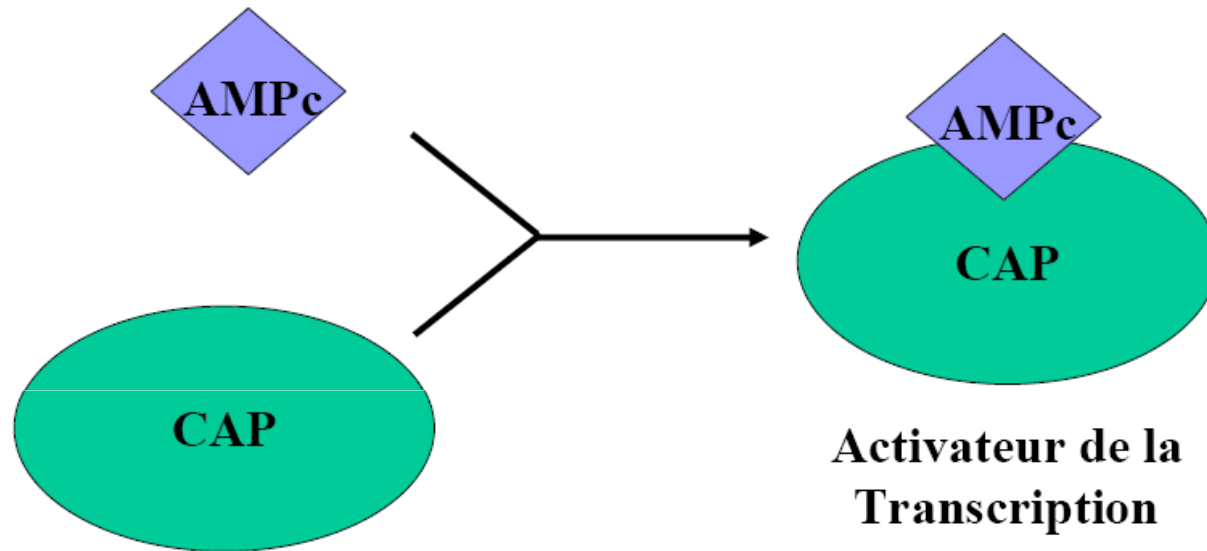
► beaucoup de glucose => peu d'AMPc => CAP inactive => pas de transcription => utilisation du glucose

# En effet:



# CAP?

## La protéine CAP (Catabolite activator protein)



CAP = protéine activatrice des catabolites = facteur de contrôle positif

CAP interrompt les voies métaboliques alternatives lorsqu'elles sont rendues superflues par un apport de glucose.

## CAP : ce qu'il faut retenir

- 1-** active la transcription de plus de 100 promoteurs (=facteur de transcription global).
- 2-** protéine d'environ 45 kDa qui se fixe à l'ADN sous la forme d'un dimère (2 sous-unités identiques).
- 3-** le 1<sup>er</sup> des activateurs transcriptionnels à avoir été isolé (1970) et le 1<sup>er</sup> pour lequel la structure 3D a été déterminée.
- 4-** en présence d'AMPc, forme un complexe (CRP-AMPc) qui se fixe à une séquence cible de 22pb, située près ou au sein du promoteur qu'il contrôle
- 5-** active la transcription du fait de contacts protéine-protéine avec l'ARN polymérase

# RECAPITULATIF

## 3 Scénarios :

### 1- Pas de lactose présent

L'opéron est "éteint" → pas d'ARNm synthétisé

### 2- Lactose présent; glucose présent également

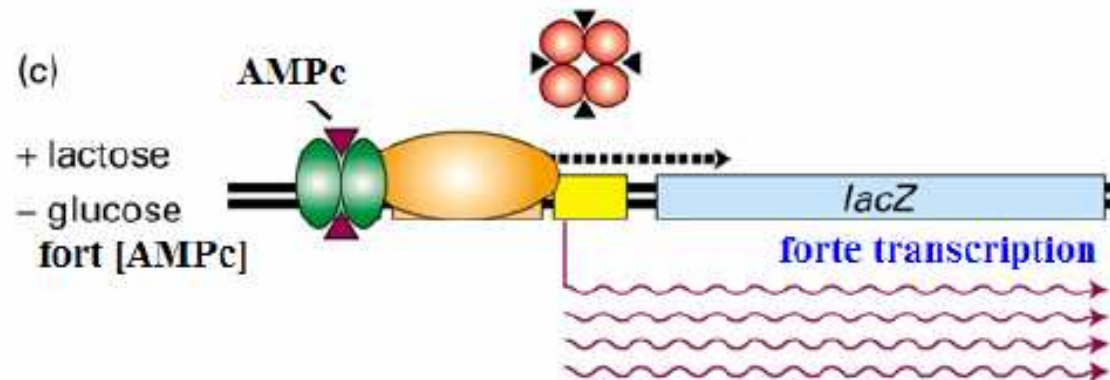
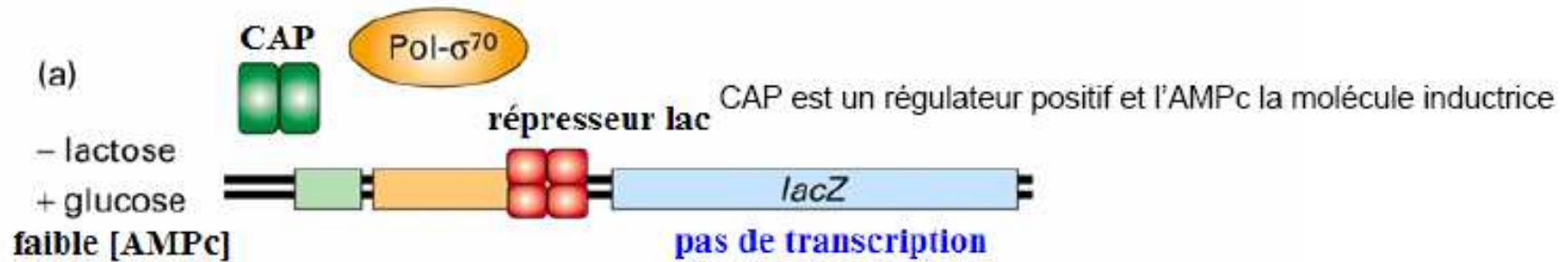
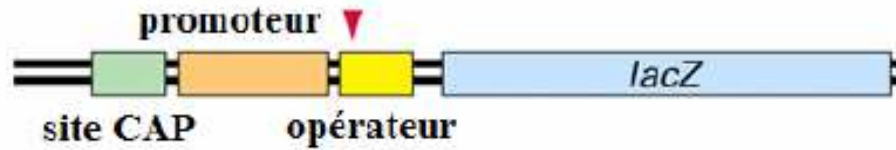
La présence du lactose inactive le répresseur → il y a Transcription

(Parce que le Glucose est présent → cAMP est faible → CRP ne peut aider la transcription)

### 3- Lactose présent; pas de glucose

la présence de lactose inactive le répresseur → il y a Transcription

(Il n'y a pas de Glucose → [cAMP] est élevée → cAMP se fixe à la CRP (activation) → CRP se fixe & 'aide' la transcription : Niveau élevé de transcription)



### 3.1 .OPERON LAC: Mutations

## Analyse génétique de l'opéron

Quels sont les éléments essentiels du système de régulation ?

La génétique a joué un rôle décisif dans la compréhension du fonctionnement de l'opéron lac.

#### OBJECTIF:

→ évaluer les changements qui se produisent dans la spécificité de l'un ou l'autre des intervenants du système en réalisant des **MUTATIONS**.

## les 3 gènes *lacZ*, *lacY* et *lacA* ont une régulation commune

En **absence** de lactose:  $\beta$ -galactosidase  
 lactose perméase  
 galactoside transacétylase

En **présence** de lactose:  $\beta$ -galactosidase  
 lactose perméase  
 galactoside transacétylase

Génotypes	$\beta$ -galactosidase		lactose perméase		galactoside tcase	
	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^+$	0,1	100	1	100	1	100
$i^+ o^+ z^- y^+ a^+$	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	1	100	1	100
$i^+ o^+ z^+ y^- a^+$	0,1	100	<u>0,1</u>	<u>0,1</u>	1	100
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^-$	0,1	100	1	100	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^+$	0,1	100	1	100	1	100

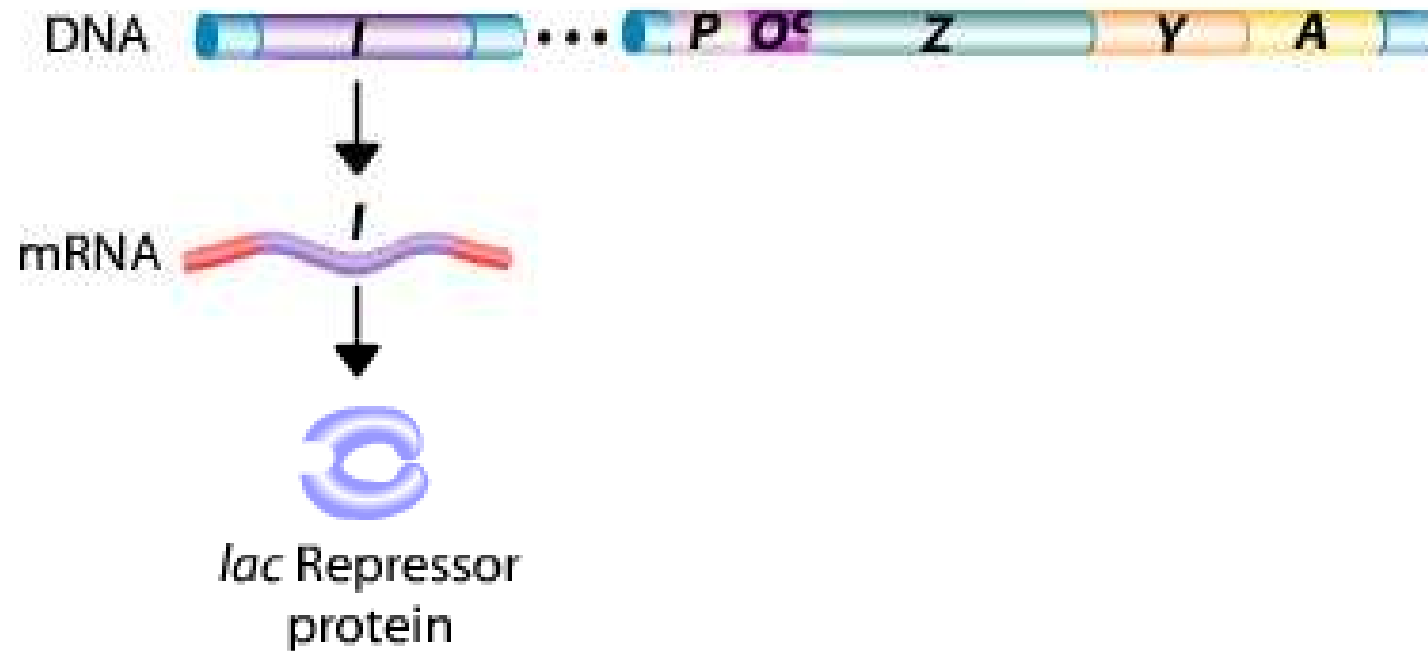
$i^- o^+ z^+ y^+ a^+$     100    100    100    100    100    100

$i^+ o^c z^+ y^+ a^+$     25    95    15    100    10    100

régulation commune des 3 gènes **sous contrôle**  
 de **2 locus régulateurs distincts: *i* et *o***

# Analyse des mutants et diploïdes partiels

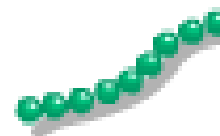
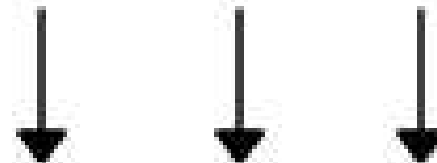
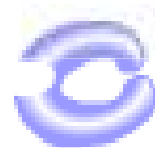
Opérateur Mutant = Mutation  $O^c$



Genotype:  $I^+ O^c Z^+ Y^+$

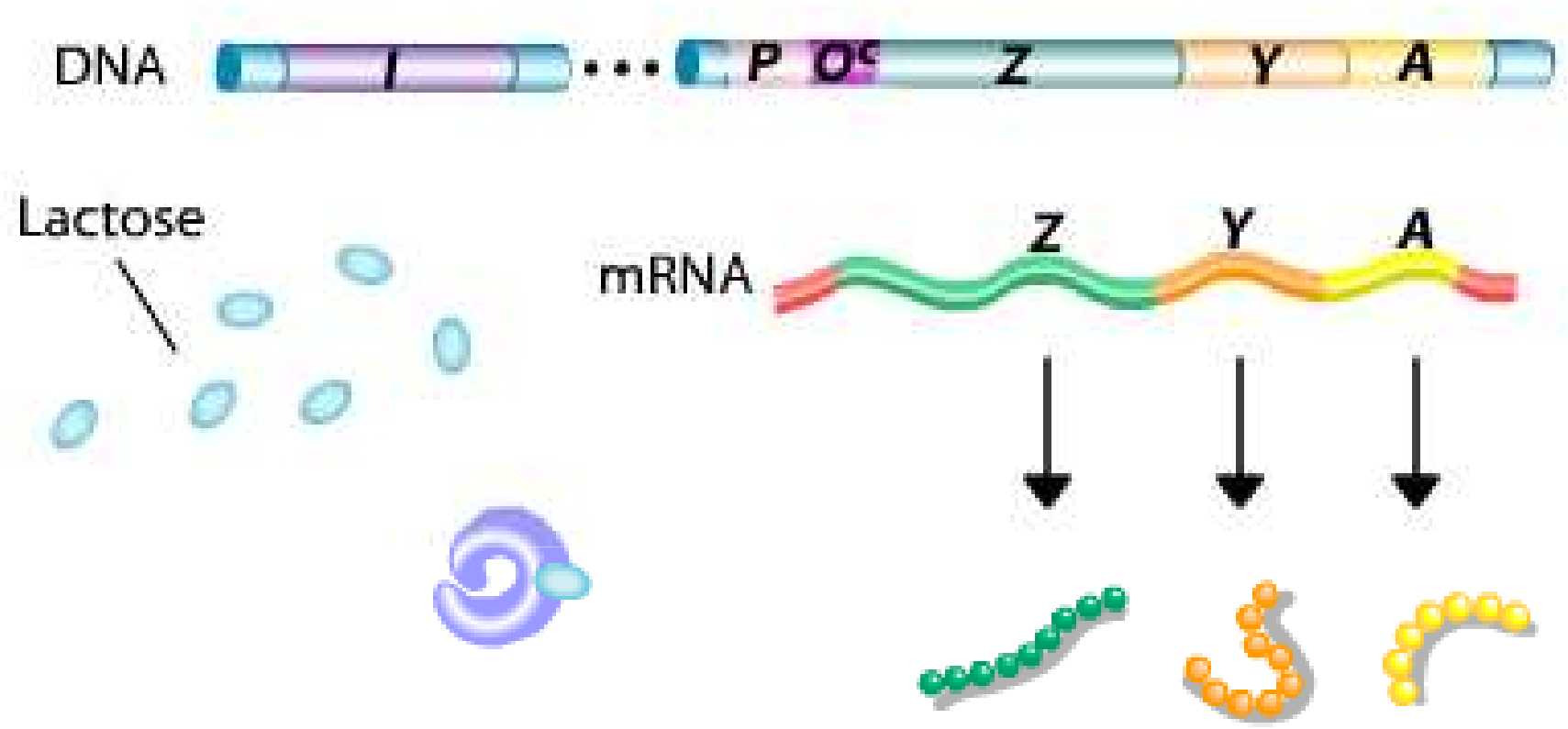


Genotype:  $I^+ O^c Z^+ Y^+$



Genotype:  $I^+ O^C Z^+ Y^+$   
 Lactose: ABSENT  
 Result: *lac* operon induced

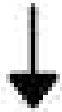
Structural  
 proteins  
 made



Genotype:  $I^+ O^C Z^+ Y^+$   
 Lactose: PRESENT  
 Result: *lac* operon induced

	<u>Lactose absent</u>	<u>Lactose present</u>	
$I^+ O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon ON	
$I^+ O^c Z^+ Y^+$	operon ON	operon ON	→ $O^c$ is constitutive

# Lac I Mutant : Mutation I<sup>-</sup>

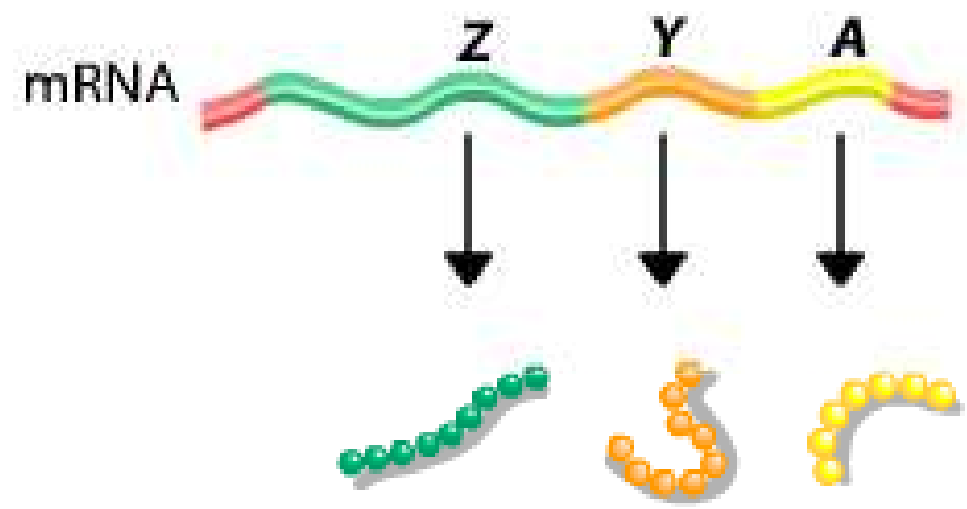


Mutant  
*lac* repressor

Genotype:  $I^{-} O^{+} Z^{+} Y^{+}$

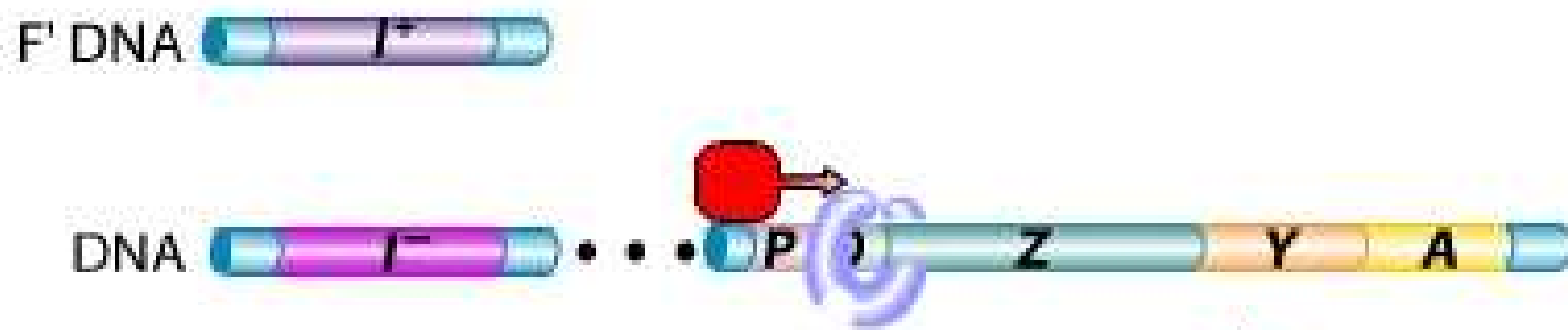


Genotype:  $I^- O^+ Z^+ Y^+$

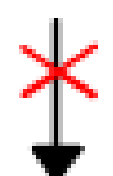


Genotype:  $I^- O^+ Z^+ Y^+$   
 Lactose: ABSENT  
 Result: *lac* operon induced

Structural proteins made



~~↓~~  
 No mRNA

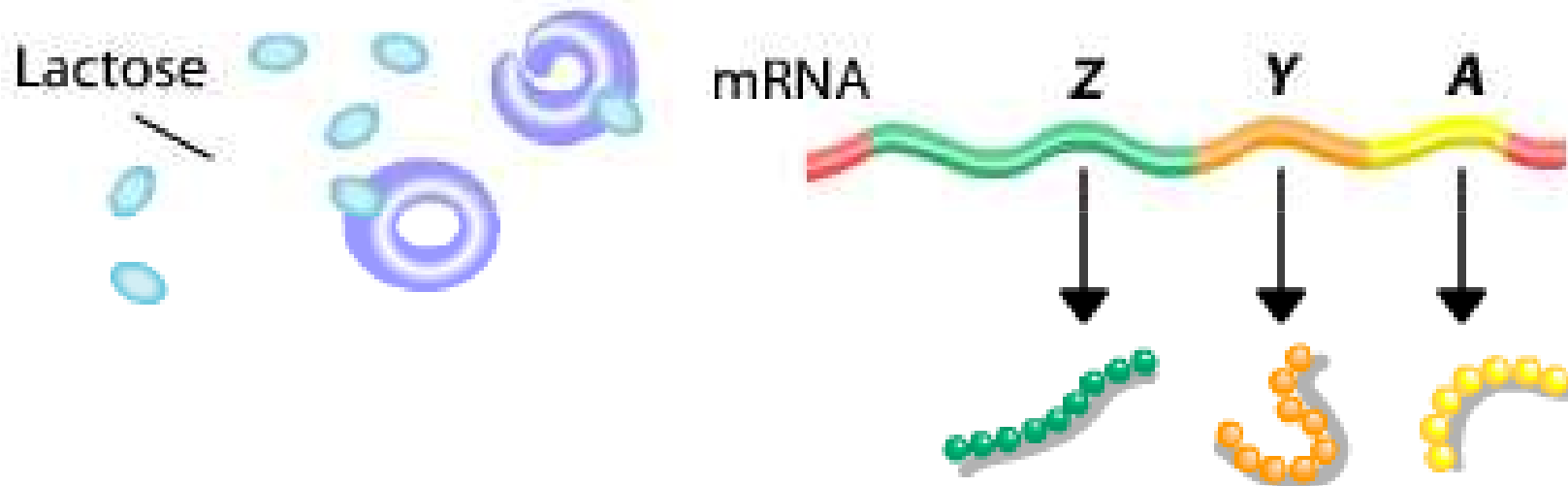


No proteins made

Genotype:  $I^- O^+ Z^+ Y^+ / F I^+$   
 Lactose: ABSENT  
 Result: *lac* operon repressed

F' DNA 

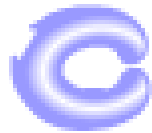
DNA 



Genotype:  $I^- O^+ Z^+ Y^+ / F I^+$   
Lactose: PRESENT  
Result: *lac* operon induced

	<u>Lactose absent</u>	<u>Lactose present</u>	
$I^+ O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon ON	
$I^- O^+ Z^+ Y^+$	operon ON	operon ON	$I^-$ is constitutive
$I^- O^+ Z^+ Y^+ / F I^+$	operon OFF	operon ON	$I^+$ is dominant to $I^-$ <hr/> $I^+$ acts in trans

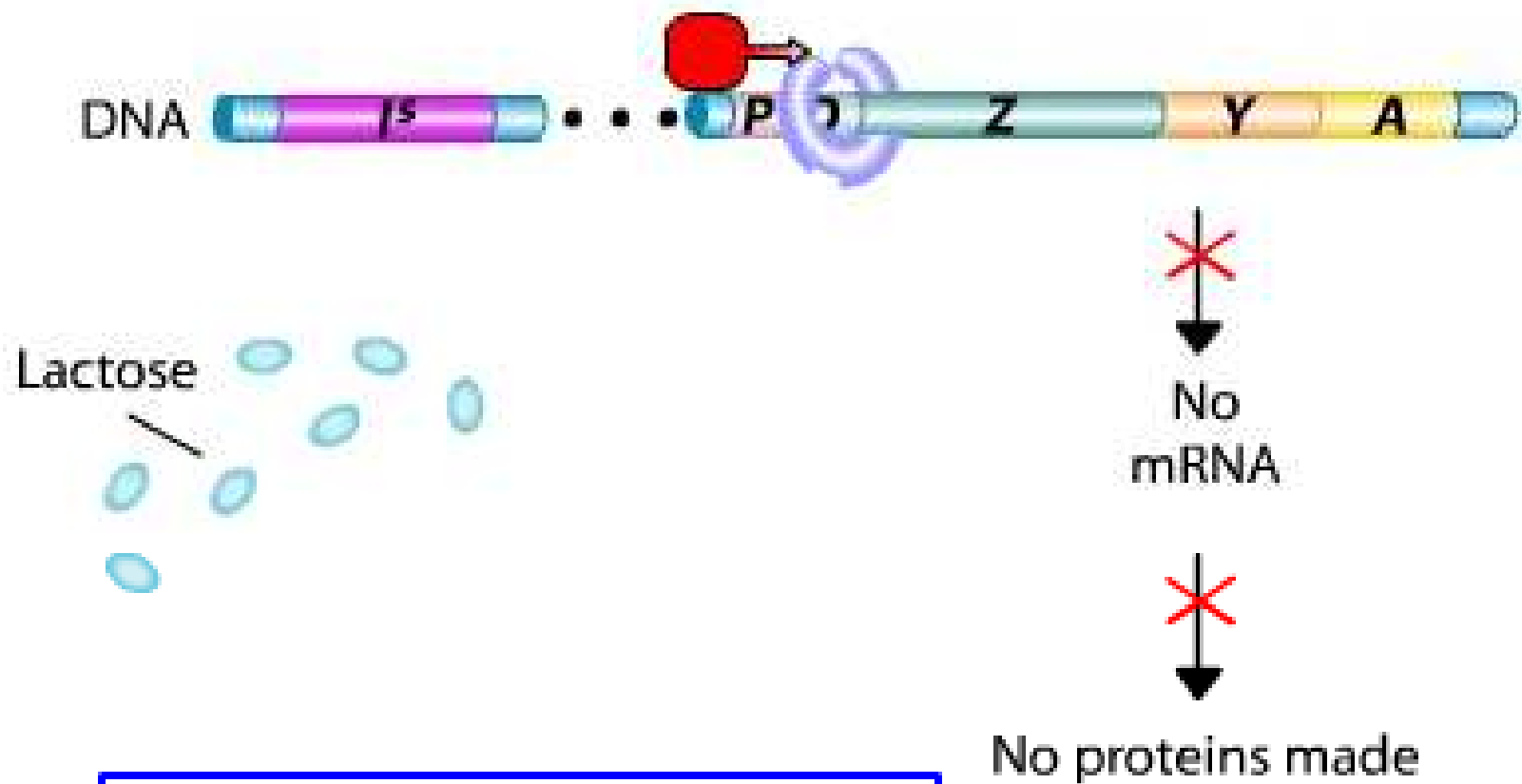
## Lac I Mutant : Mutation $I^S$



Genotype:  $I^S O^+ Z^+ Y^+$



Genotype:  $I^s O^+ Z^+ Y^+$



Genotype:  $I^S O^+ Z^+ Y^+$   
Lactose: PRESENT  
Result: *lac* operon repressed



~~↓~~  
No mRNA

~~↓~~  
No proteins made

Genotype:  $I^s O^+ Z^+ Y^+ / F I^+$   
Lactose: PRESENT  
Result: *lac* operon repressed



~~↓~~  
No  
mRNA

~~↓~~  
No proteins made

Genotype:  $I^s O^+ Z^+ Y^+$   
Lactose: ABSENT  
Result: *lac* operon repressed

	<u>Lactose absent</u>	<u>Lactose present</u>	
$I^+ O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon ON	
$I^s O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon OFF	$I^s$ is always repressed
$I^s O^+ Z^+ Y^+ / F I^+$	operon OFF	operon OFF	$I^s$ is dominant to $I^+$

# RECAPITULATIF

## mutations $O^c$

Les mutations de l'opérateur sont **constitutives**, car le promoteur est incapable de fixer la protéine répresseur;

Ceci permet à l'ARN polymérase d'avoir libre accès au promoteur.

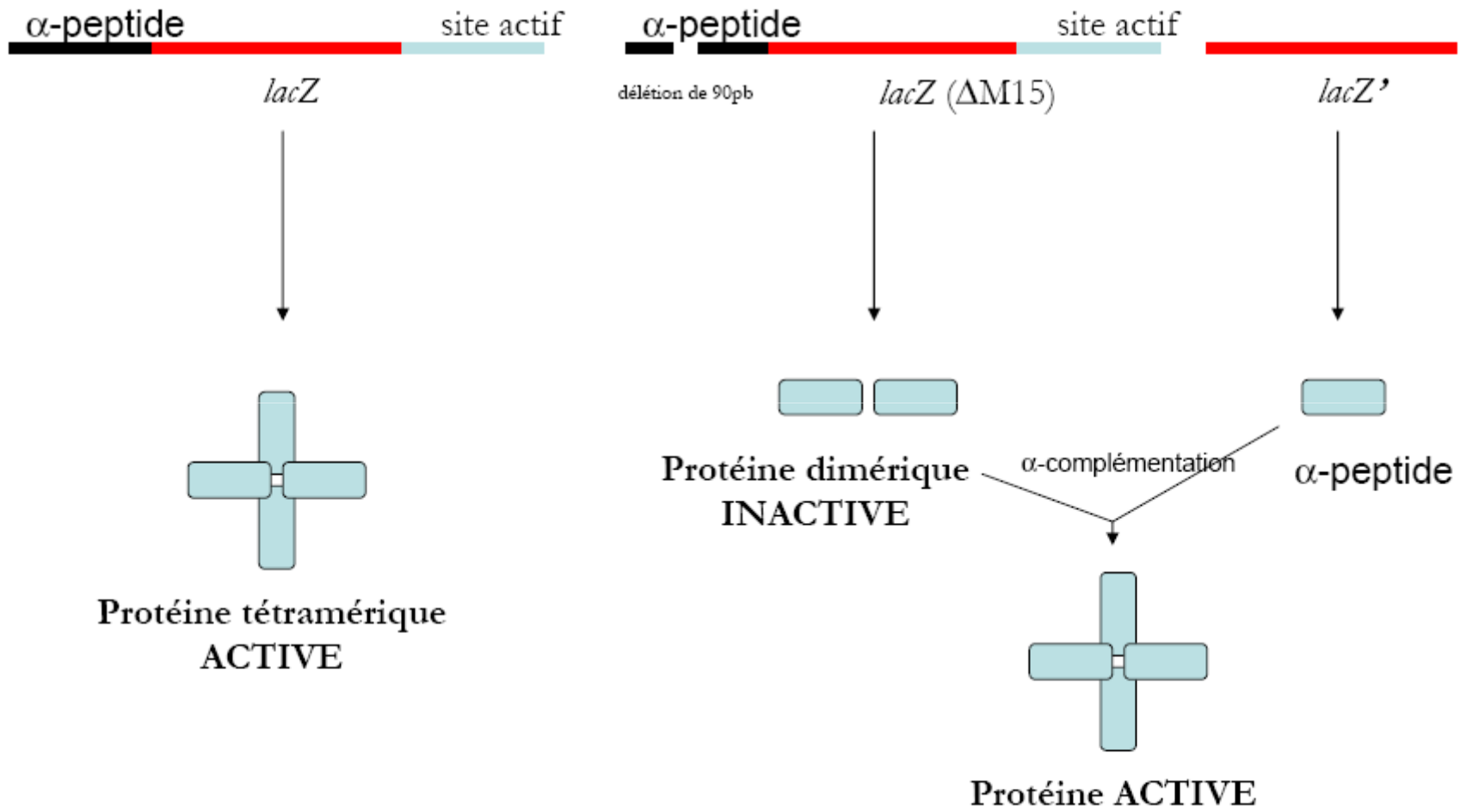
Les mutations  $O^c$  agissent en *cis*, car elles ne touchent que les gènes structuraux qui leur sont contigus.

## mutations du type lac I

Les mutations qui inactivent le gène *lac I* entraînent:

**OU BIEN** l'expression **constitutive de l'opéron**, car la protéine du répresseur mutant ne peut plus se fixer sur l'opérateur.

**OU BIEN** la **répression de l'opéron** car la protéine du répresseur mutant ne peut plus être désactivée par le lactose.



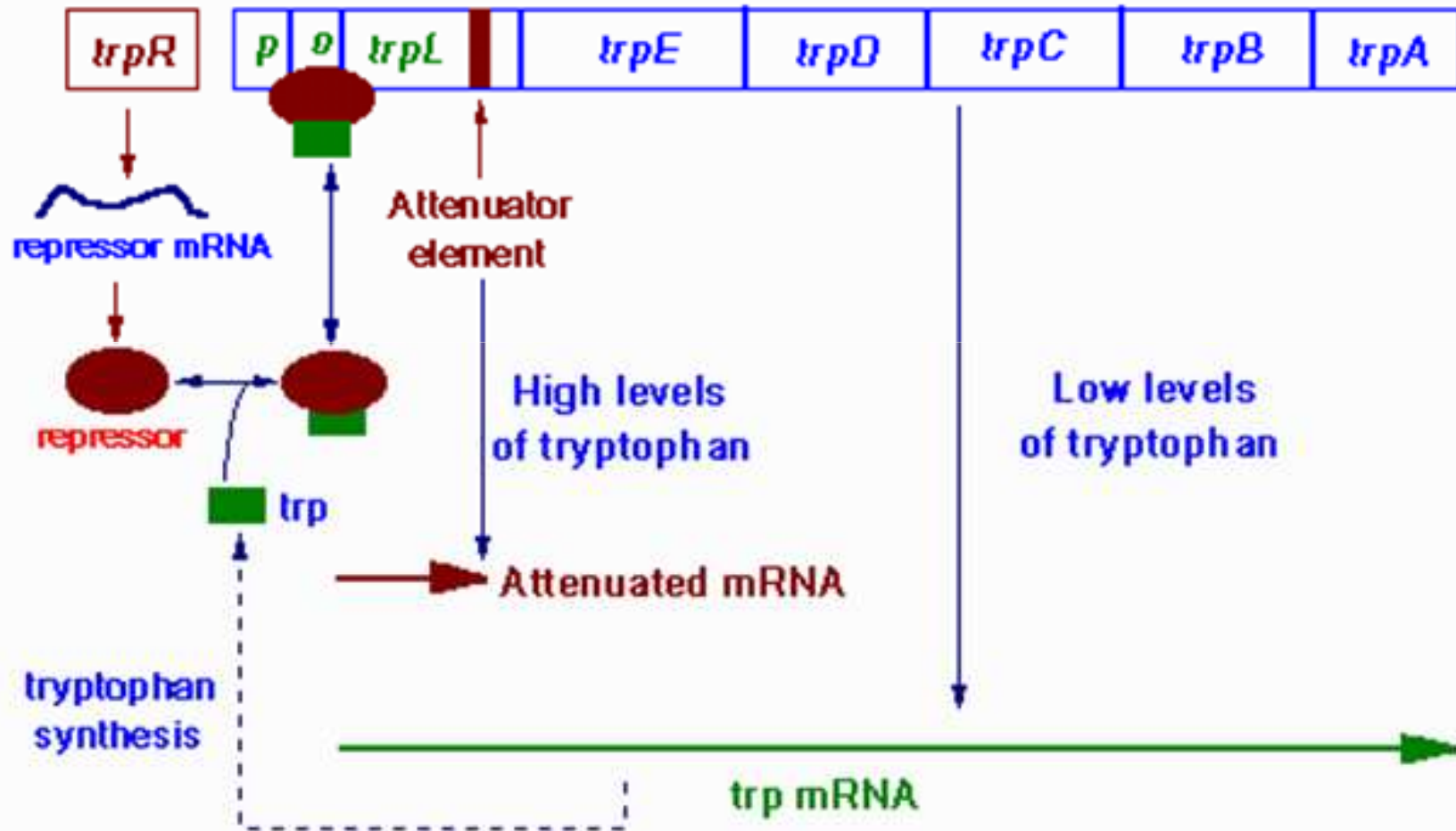
## 4.1. OPERON trp: Définition et structure



- L'*opéron trp* code pour les enzymes requises pour la synthèse du tryptophane (*trpAE*)
- La synthèse de l'ARNm de l'opéron est contrôlée par un *répresseur* qui bloque la transcription lorsqu'il est lié par le tryptophane (*co-répresseur*)

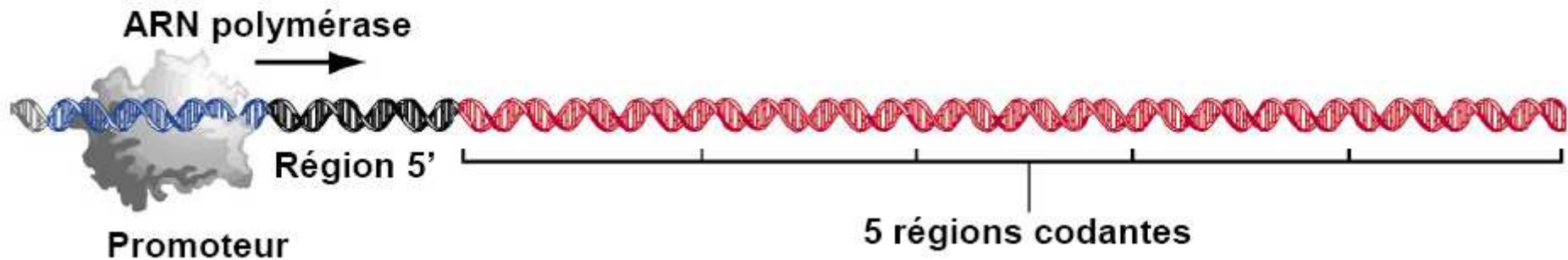
<i>trp E</i>	<b>Anthranilate synthase</b>
<i>trp D</i>	<b>Phosphoribosyl anthranilae transférase</b>
<i>trp C</i>	<b>Phosphoribosyl isomérase/indoleglycérol phosphate synthase</b>
<i>trp B</i>	<b>Tryptophan synthétase <math>\alpha</math></b>
<i>trp A</i>	<b>Tryptophan synthase <math>\beta</math></b>

# Structure of the *trp* Operon

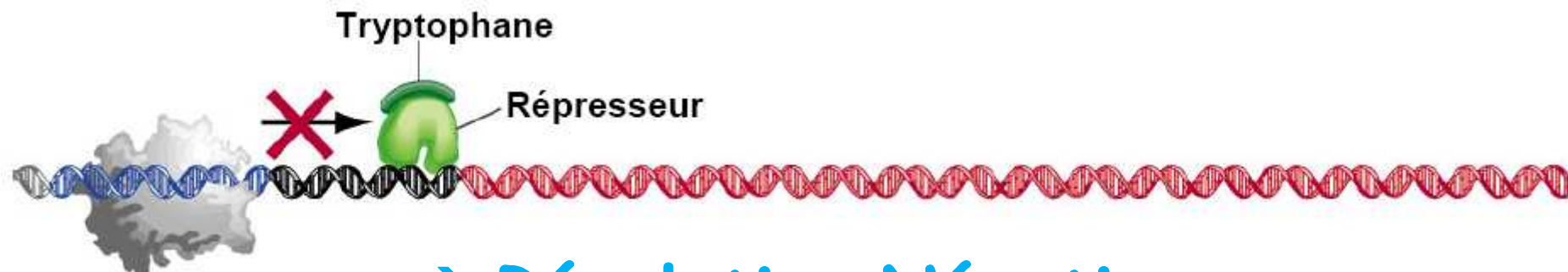


## 4.2. OPERON trp: fonctionnement

Lorsque le tryptophane est absent, la transcription se produit



Lorsque le tryptophane est présent, la transcription est bloquée.



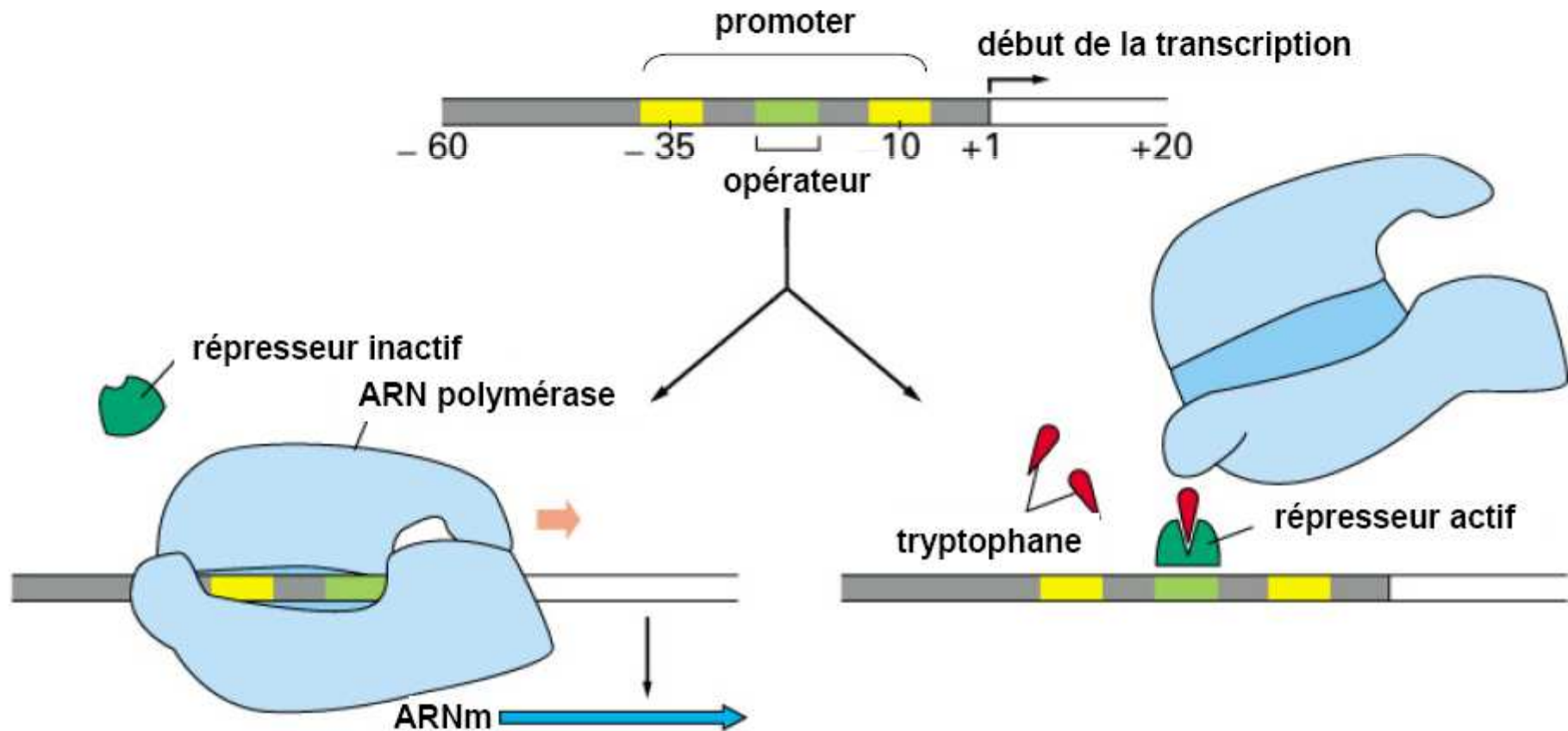
→ Régulation Négative

# Régulation de l'opéron tryptophane chez *E. coli*

## Mécanisme n°1 Interaction répresseur-opérateur

La fixation du tryptophane au répresseur trp altère sa structure

Un déplacement de 0,8nm des hélices impliquées dans la reconnaissance permet au répresseur d'interagir avec l'ADN.



Cependant, en l'absence du répresseur, la synthèse de l'ARNm de l'opéron *trp* est encore **partiellement réprimée** par la présence de tryptophane

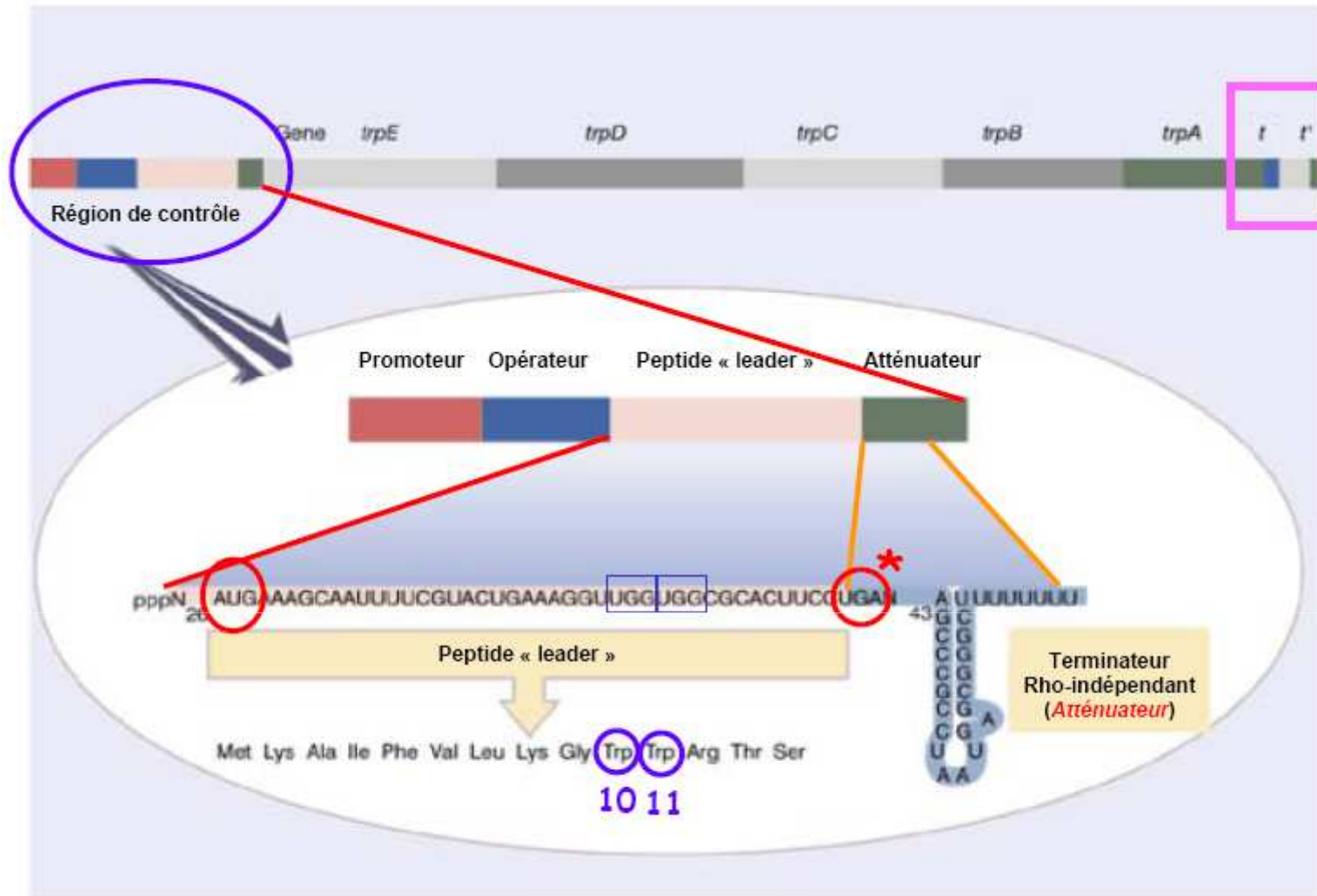
Expression de l'opéron *trp* dans des souches *trpR*<sup>+</sup> et *trpR*<sup>-</sup>

	Avec Tryptophane (%)	Sans Tryptophane (%)
<i>trpR</i> <sup>+</sup>	8	100
<i>trpR</i> <sup>-</sup>	33	100

## Mécanisme n°2

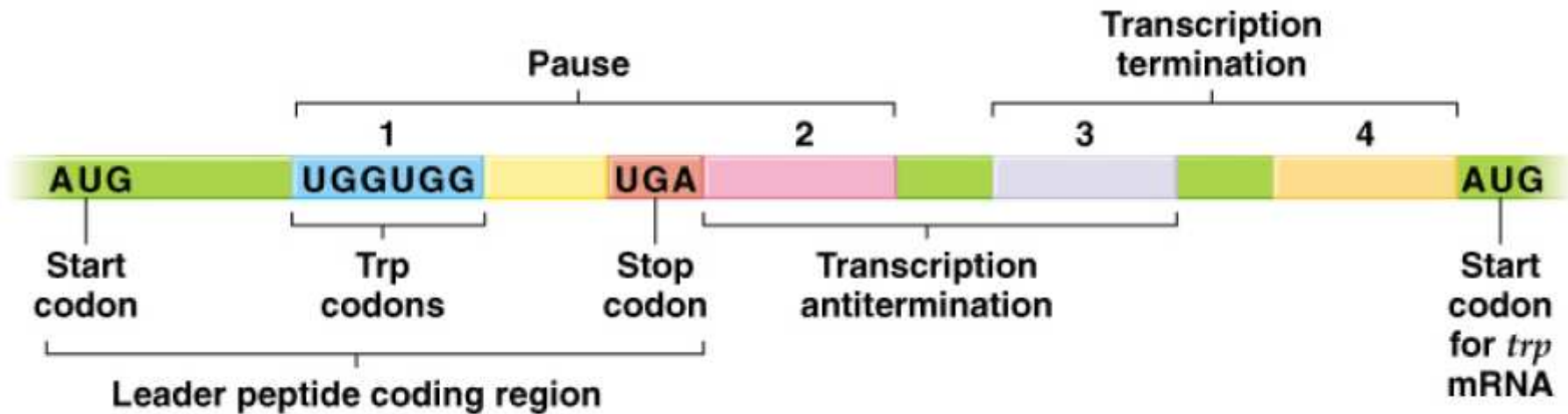
# Terminaison de la transcription

- La transcription est également contrôlée par atténuation, processus qui aboutit à la traduction d'un petit polypeptide.
- Quand les cellules sont privées de tryptophane, les gènes de l'opéron sont exprimés au taux le plus fort;
- Quand la privation en tryptophane est moins sévère, les gènes de l'opéron s'expriment à un niveau plus faible que le maximum.
- L'atténuation régule le niveau de transcription par un facteur de 8 à 10 et combiné avec le mécanisme 1 (interaction répresseur-opérateur) il y a diminution de la transcription d'un facteur 560 à 700.

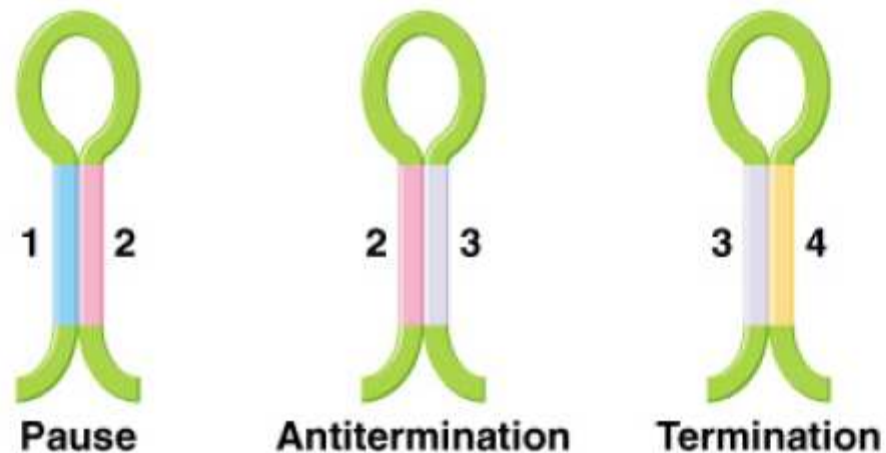


- Une petite séquence codante en avant de l'opéron trp contient deux codons pour le tryptophane de suite
- Lorsque la quantité de tryptophane dans la cellule est limitée, le ribosome *arrête* à ces codons trp
- La capacité du ribosome de lire ces codons régule un choix de tige et boucle (*terminateur* ou *anti-terminateur*)

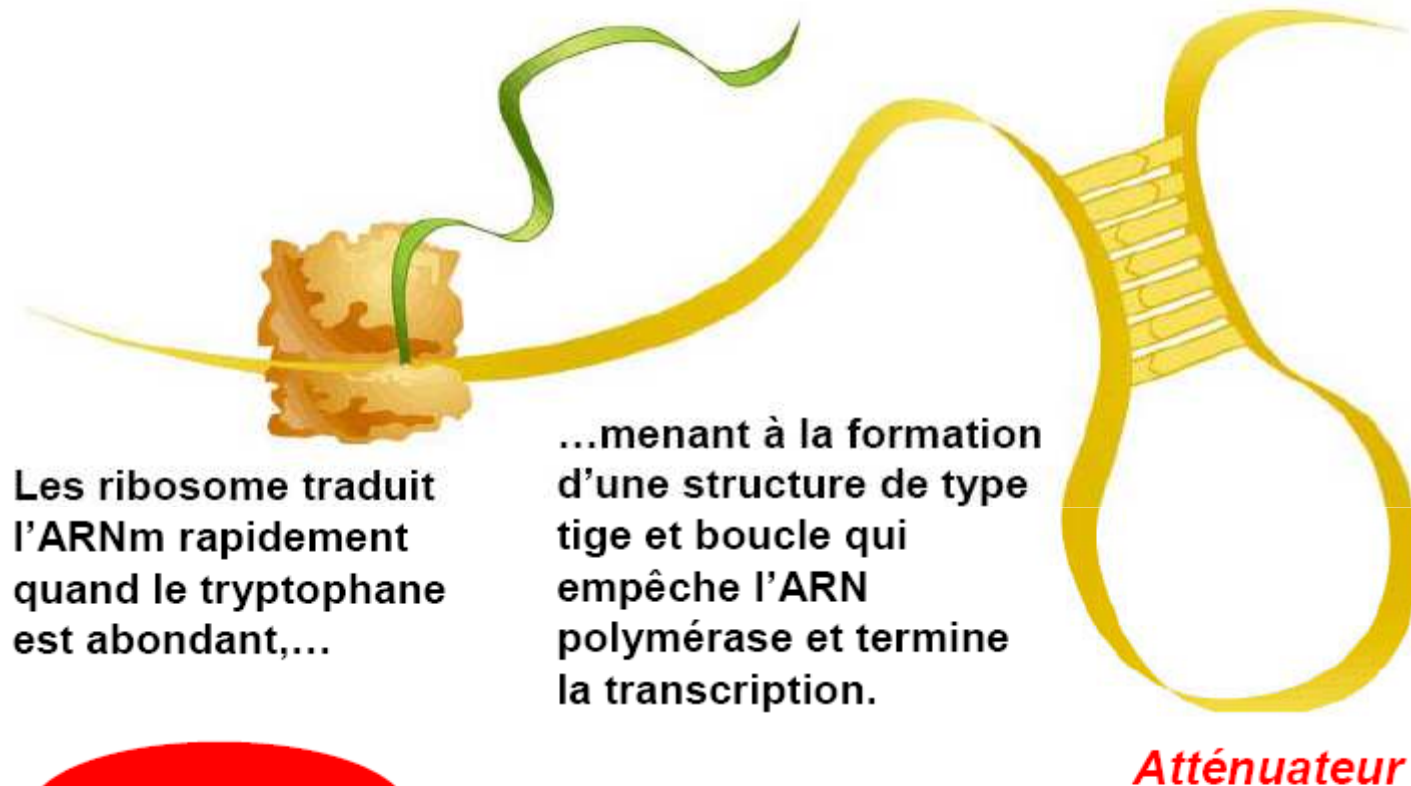
## Organisation de la région leader/atténuateur de l'opéron *trp*



### Structures ARN alternatives



# La position du ribosome joue un rôle important dans le phénomène d'atténuation



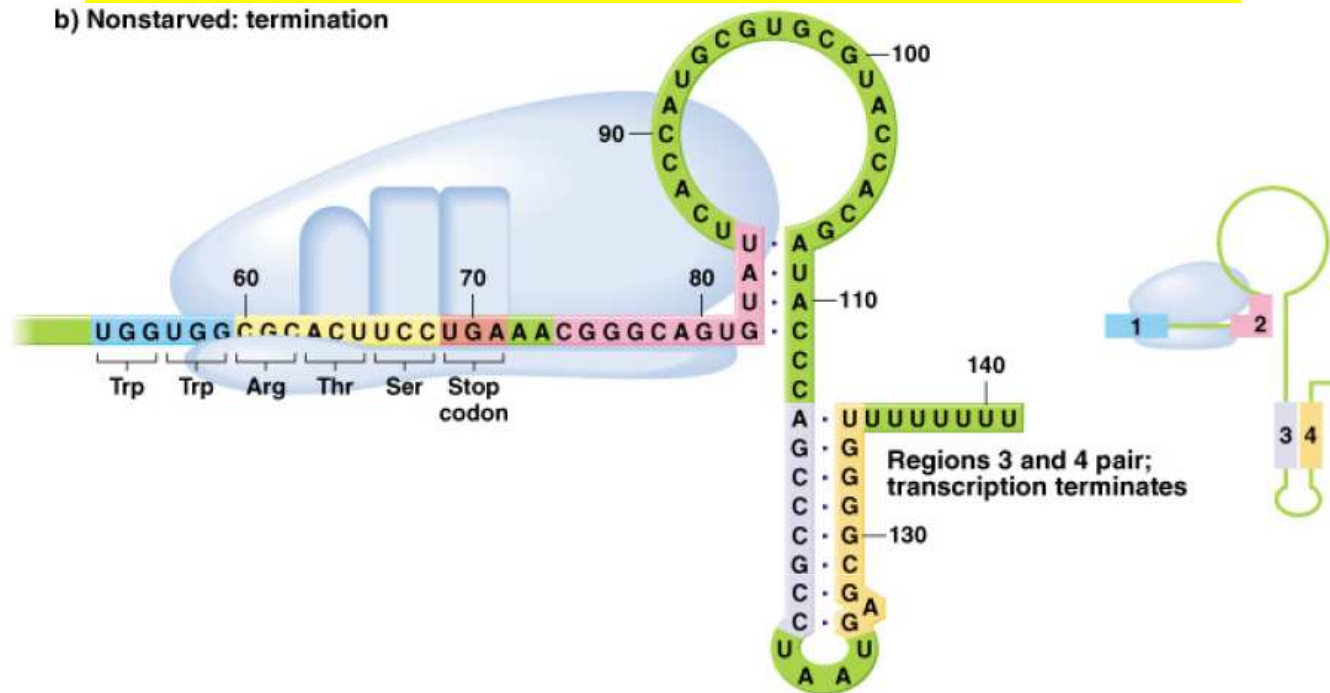
Atténuation

Atténuation: mécanisme qui contrôle la capacité de l'ARN polymérase de lire un *atténuateur*, qui est un *terminateur* placé au début de la transcription



## Situation 2:

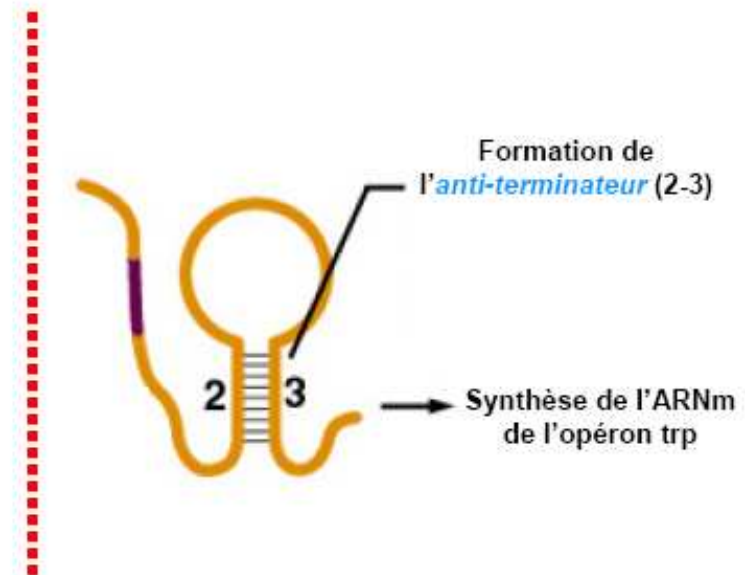
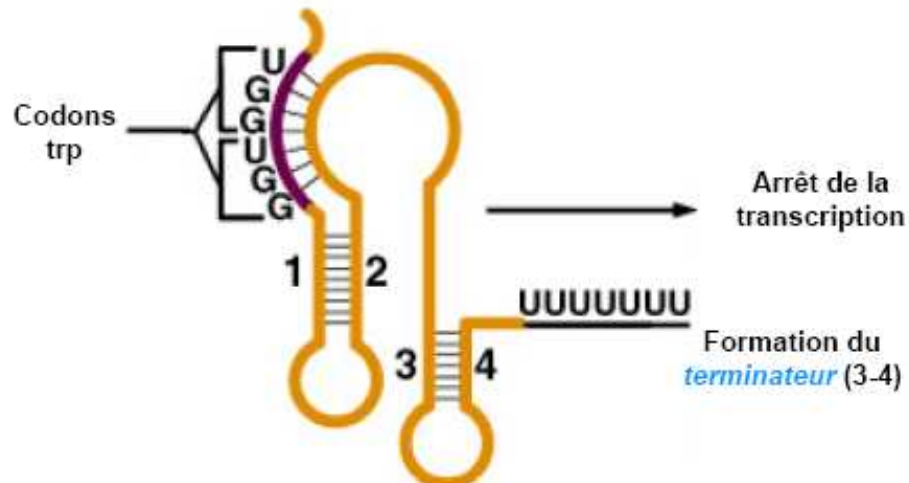
# Phénomène d'atténuation pour des cellules non-privées de trp



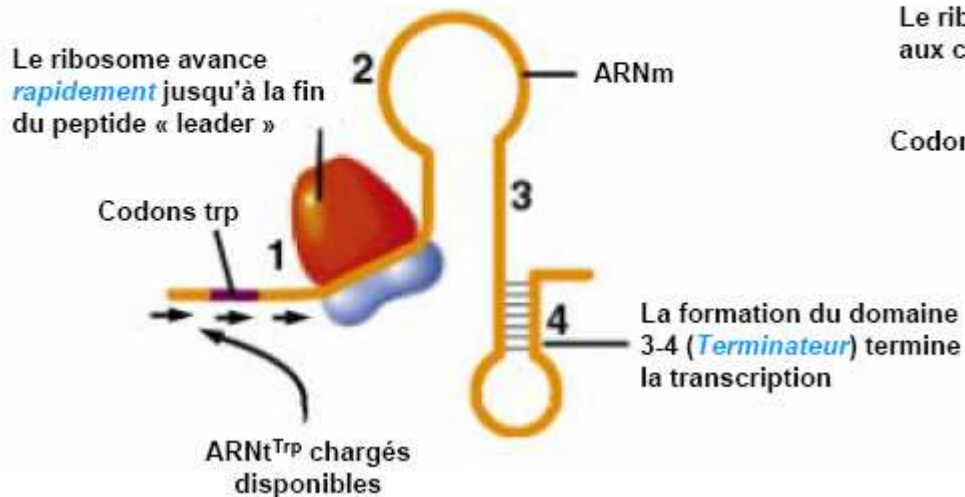
### le tryptophane est abondant:

- 1- le ribosome ne s'arrête pas au niveau des codons trp; il continue à traduire la séquence leader, s'arrêtant au niveau de la région 2
- 2- la région 2 ne peut s'apparier avec la région 3; cette dernière s'apparie alors avec la région 4.
- 3- cet appariement 3-4 constitue la séquence « atténuateur » et fonctionne comme signal de terminaison
- 4- la transcription s'achève avant que l'ARN polymérase atteigne les gènes permettant la synthèse du tryptophane

# RECAPITULATIF



## En présence de Tryptophane



## En absence de Tryptophane

