

La génétique inverse

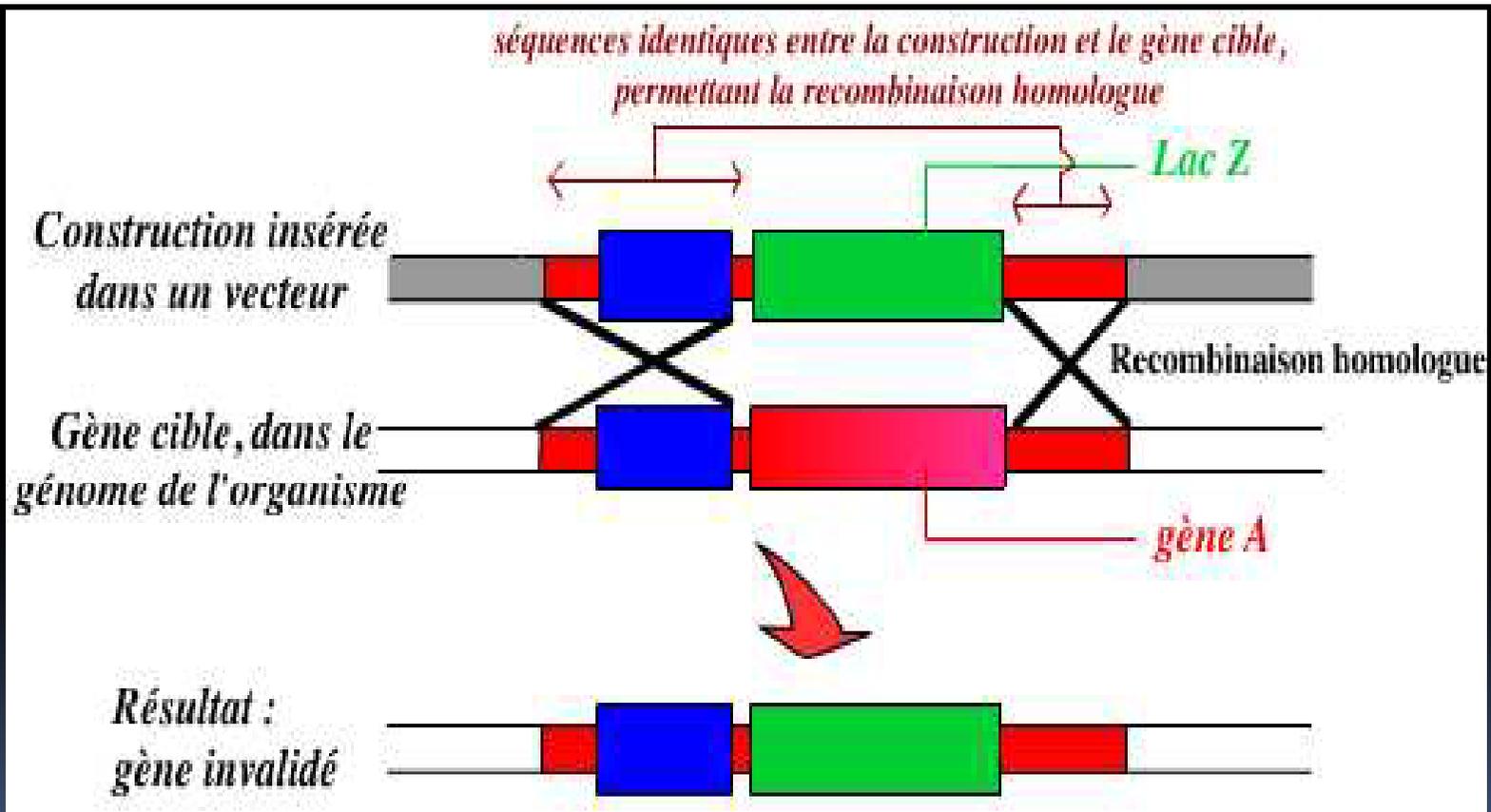
On part du gène étudié ou d'une protéine purifiée pour aller vers un phénotype (ordre opposé de la génétique directe).

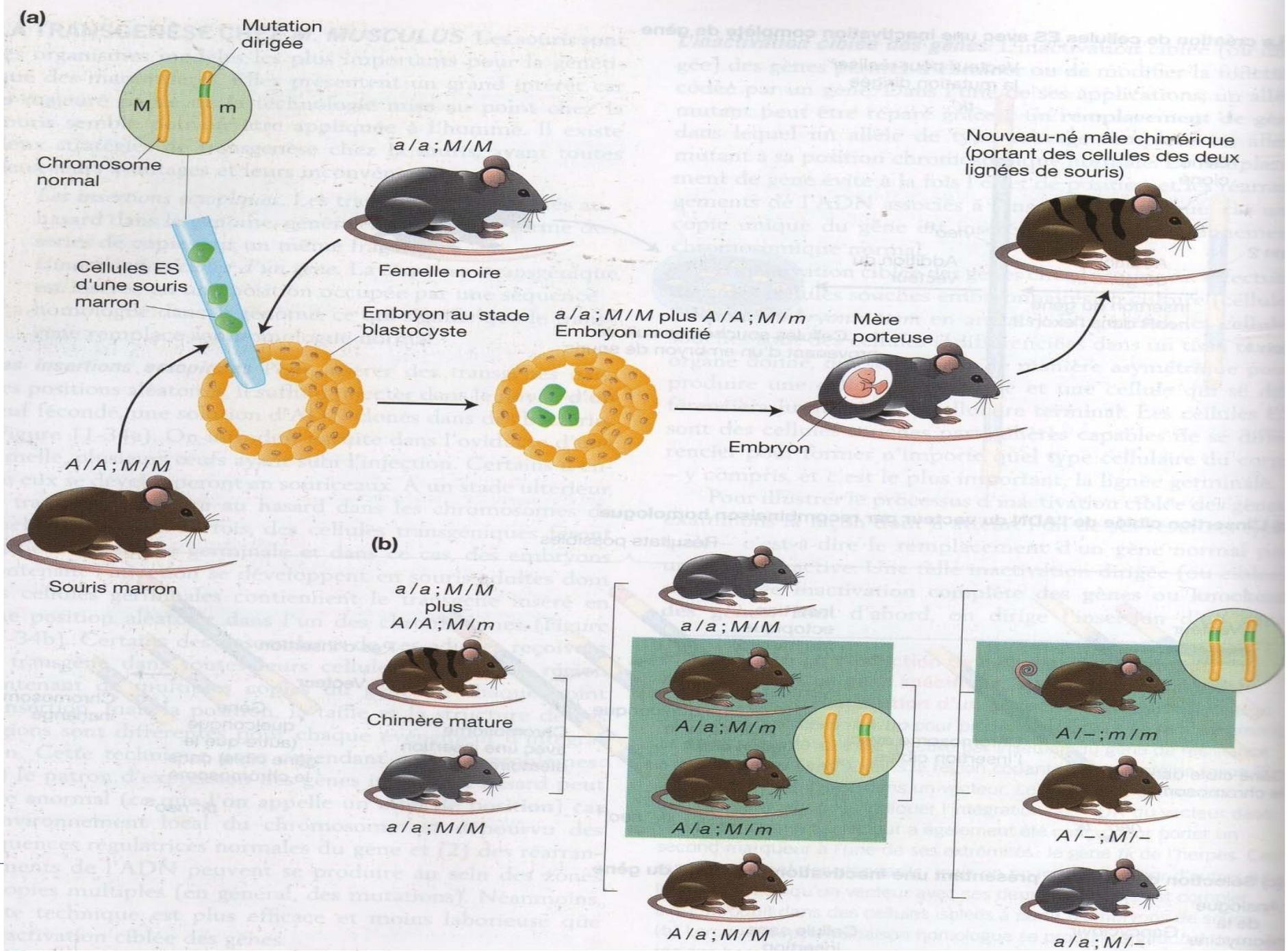
1) les généticiens compare les ORF

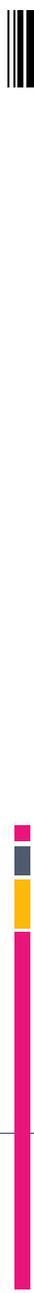
- Analyse des **ORF** par bioinformatique; un logiciel examine chacun des 6 cadres de lectures de tout les chromosomes et recherche les fragments commençant par le codon ATG et se terminant par un codon stop → **recherche d'une homologie de séquence partielle ou totale avec des gènes de fonction connue.**

2) Le knock out des gènes

La fonction d'une ORF peut être recherchée par une **inactivation complète (knock out) du gène** par mutagenèse in vitro puis la recherche de tout phénotype susceptible de donner des renseignements sur la fonction de ce gène. Ce processus est en cours dans les génomes entièrement séquencés.





- 
- Le knock out de nombreuses ORF n'a aucune conséquence phénotypique ; on appelle ces ORF des gènes « orphelins »; d'autres se révèlent essentiels car le Knock out est létal.

3) Analyse génétique à partir d'une protéine purifiée

Une protéine supposée être impliquée dans un phénotype d'intérêt constitue un point de départ pour une analyse en génétique inverse.

- Si une quantité suffisante de la protéine candidate peut être purifiée, on peut déterminer la séquence en AA de cette protéine et en déduisant la séquence d'ADN du gène correspondant à la seq d'AA de la protéine.
- Comme le code génétique est dégénéré plusieurs seq d'ADN différentes peuvent coder la même seq d'AA

- Par conséquent on peut synthétiser diverses oligonucléotides correspondants à toutes les combinaisons possibles de codons. Le mélange d'oligonucléotides est marqué et utilisé comme sonde pour sonder une banque d'ADN génomique ou d'ADNc à la recherche du gène qui a codé cette seq d'AA

Les généticiens ont utilisé cette technique pour cloner le gène responsable de l'hémophilieA

Trp — Asp — Tyr — Gly — Met

Séquence
d'acides aminés

UGG — GAU — UAU — GGU — AUG
GAC — UAC — GGG — GGC — GGA

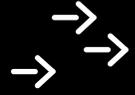
Codons possibles
sur l'ARN

TGG — GAT — TAT — GGT — ATG
GAC — TAC — GGG — GGC — GGA

Séquences
d'ADN possibles

ACC — CTA — ATA — CCA — TAC
CTG — ATG — CCC — CCG — CCT

*** Oligonucléotides antisens
marqués et utilisés pour
sonder des banques
d'ADNc ou d'ADN
génomique



- L'analyse biochimique des facteurs de coagulation chez un individu normal et un individu hémophile a révélé **l'absence** d'une protéine Facteur VII **Chez les hémophiles.**

Il ont déterminé la seq en AA de cette protéine et prédit la séquence d'ADN qui pourrait coder cette protéine. Il ont synthétisé des oligonucléotides complémentaires à cette séquence et sonder une banque d'ADN génomique humaine.

- 
- En comparant les séquences d'ADN du gène codant le facteur VIII chez des individus normaux et des individus hémophiles : **le gène du facteur VIII est muté chez les hémophiles .**
 - Ce qui confirme que **la mutation du gène du facteur VIII est responsable de la maladie.**

Dissection de la fonction des gènes grâce à la technologie de l'ARNi

- Nouvel outil d'analyse très puissant : interférence ARN (ARNi) technique permettant une analyse rapide de la fonction des gènes.
- Méthode inactivant la fonction du gène sans altérer sa séquence (sans mutation héritable).

- Rôle : dans la nature les cellules utilisent l'ARNi :
- protection contre les virus à ARN (combinaison entre l'ARNi et l'ARN du virus ; l'ARN db brin est reconnu par des enz de la cellule **qui le dégrade** → aucune protéine du virus n'est traduite → expression des gènes viraux bloquée.

- prévention de la propagation des éléments transposables et viral (le brin antisens de l'ARNi se fixe aux régions complémentaires du gène ce qui conduit au recrutement de protéines qui modifient l'ADN (méthylation) et empêche sa transcription.)

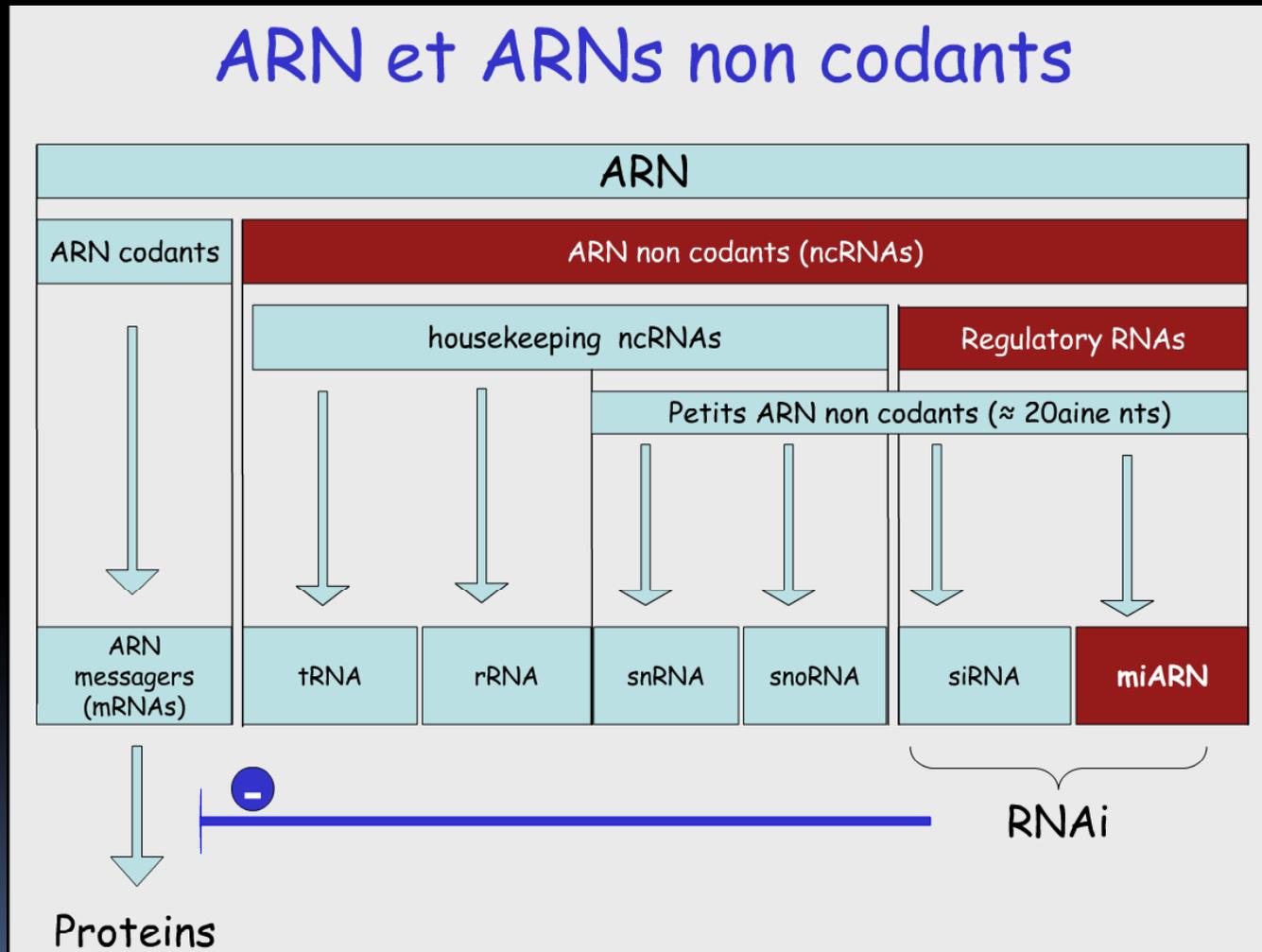
- Régulation de l'expression des gènes (des petits ARNi antisens complémentaires d'un ARNm sens peuvent **se fixer sur l'ARNm et empêcher sa traduction**).

La forme d'extinction de gène la plus étudiée est appelée interférence ARN (ARNi) chez les ANX et extinction Post transcriptionnelle de gènes (PTGS pour post transcriptional gène silencing) chez les plantes.

- Deux types de petits ARN jouent un rôle **central** dans le mécanisme de l'interférence ARN:
- **a.** Les **siRNA** ("*small interfering RNA*") ou petits ARN interférents (**ARNsi**)
- **b.** Les **miRNA** ("*micro RNA*") ou micro ARN (**ARNmi**).

Classification des ARN

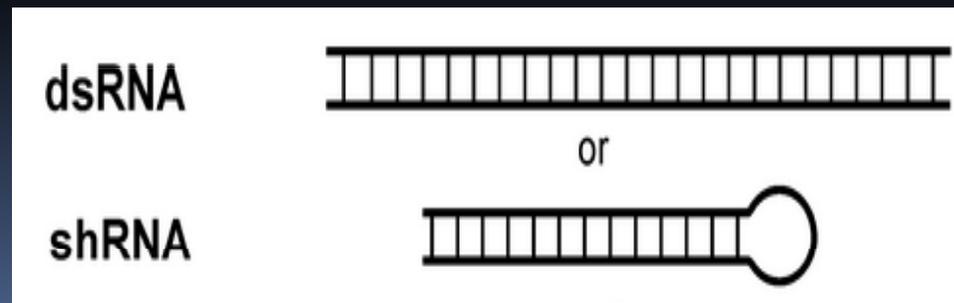
ARN et ARNs non codants



a) ARNsi

Précurseurs des siRNA

- **a.** Les long dsRNA ("*long double-stranded RNA*") : longs ARN double brin parfaitement complémentaires de plus de 200 nucléotides.
- **b.** Les shRNA ("*short hairpin RNA*") sont exprimés dans la cellule après transfection par des vecteurs viraux (plasmide, adénovirus, rétrovirus, ...).



Origine

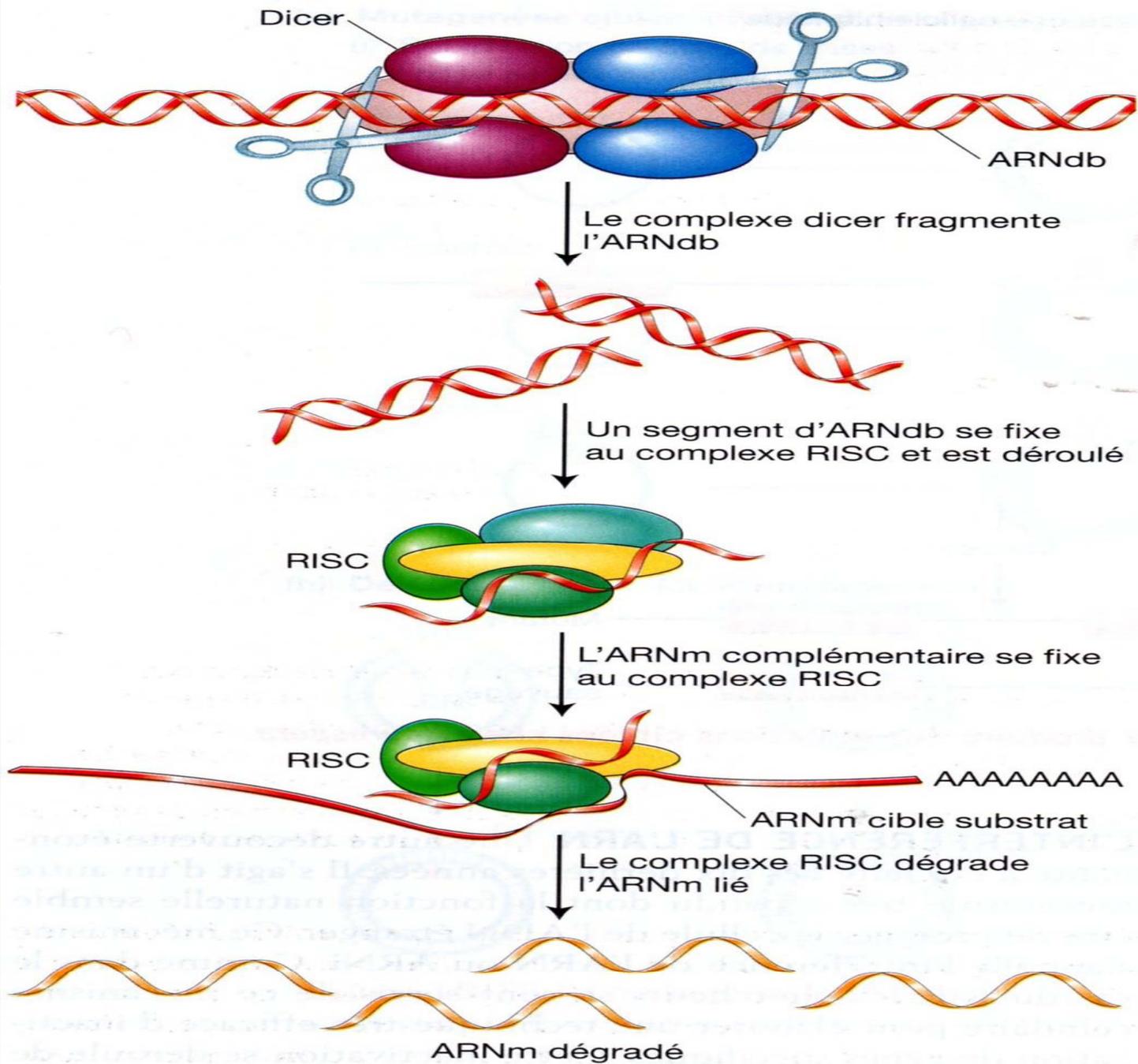
Endogène: des séquences répétées – inversées ou être issus de la transcription de transposons ou très rarement d'ADN hétérochromatique.

Exogène: virus ou des structure artificielles introduites (ARNdb) à des fins expérimentales (transgène).

Biosynthèse

- Après transcription ces précurseurs sont clivés tous les **21** nucléotides par une **ribonucléase** appelée **DICER** ("éminceuse").
- Les courts fragments dsRNA obtenus sont appelés petits ARN interférents ("*small interfering RNA*" - siRNA).
- La ribonucléase DICER transfère les siRNA à un complexe multienzymatique : "*RNA-Induced Silencing Complex*" - **RISC**.

- 
- le **brin sens** du siRNA appelé **passager** est clivé.
 - le **brin antisens** appelé **guide** dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire du brin guide.
 - le complexe RISC hydrolyse l'ARNm qui n'est plus traduit en protéine.



b) ARNmi

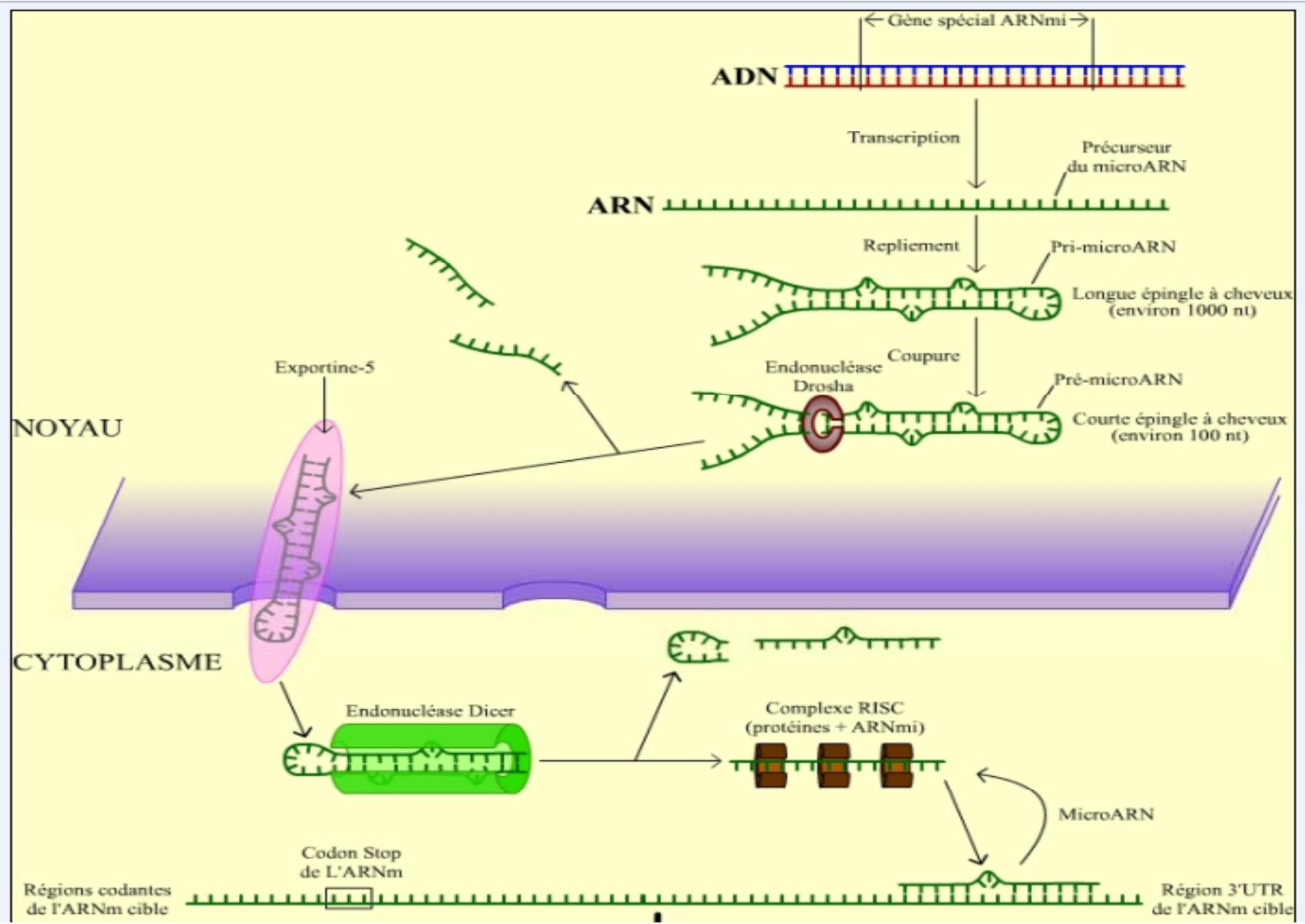
- Les miRNA ont été identifiés dans tous les règnes (mammifères, drosophile, *C. elegans*, plantes ...).
- plus de **1000 gènes** codant des miRNA ont été identifiés chez l'homme. (**bioinformatique, approche génétique, séquençage en masse des petits ARN** dans la cellule).
- **60%** des gènes codant des protéines contiendraient des séquences cibles de miRNA à l'extrémité 3'UTR (unrelated transcribed region).

Précurseurs et gènes:

- Les miRNA sont d'origine **endogène** : ils sont synthétisés dans le noyau sous forme de **pri-miRNA** ("*primary-miRNA*")
- à partir des **gènes (poly-cistrons)** les miRNA sont transcrits par l'**ARN polymérase II ou III**.
- ont le **motif canonique "TATA-box"** en amont du site de début de transcription
- Un quart des miRNA proviennent des introns de gènes codants pour des protéines
- Certains miRNA peuvent provenir d'exons non traduits .

Biosynthèse

- 2^{ème} forme d'extinction génique est médiée par de petits ARN (ARNmi) → issu du clivage par Dicer d'un précurseur en épingle à cheveux imparfaitement appariés de 70 à 130 nucléotides → obtention de long fragments de 19 à 24 nucléotides → s'hybrident avec les régions 3' non traduites (UTR) de molécules d'ARNm matures et bloquent leur traduction .

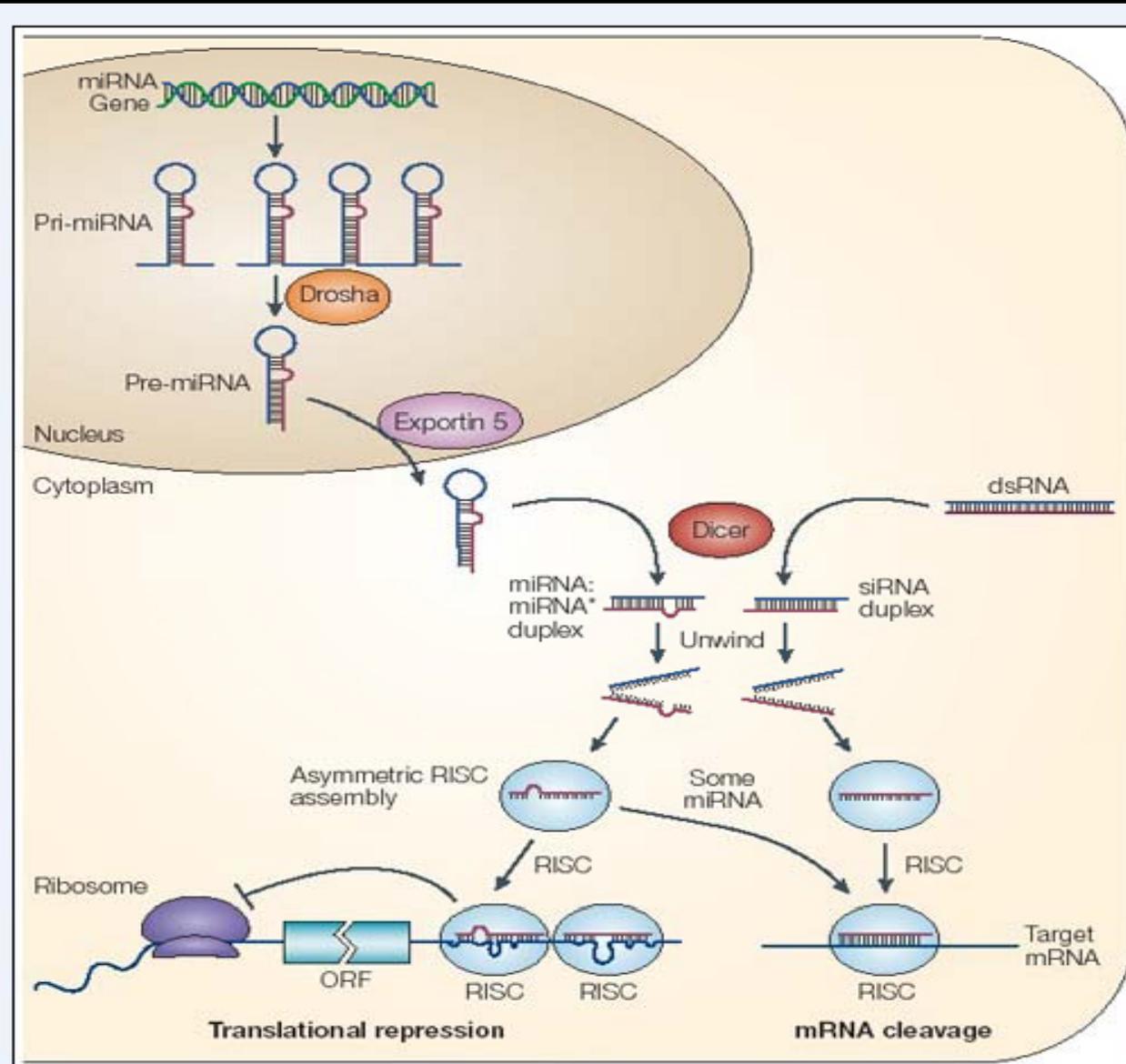




❖ **L'interaction miARN/ARNm peut avoir deux conséquences possibles :**

- ✓ • **l'inhibition de la traduction de l'ARNm ou**
- ✓ • **la lyse (partielle) de l'ARNm et donc indirectement la diminution de son expression.**

Mécanisme d'action des miRNA et siRNA



	siRNA	miRNA
Localisation	Localisé dans les régions répétées du génome	Présent dans toutes les régions du génome
Taille	ARNsb de 21 à 22 nucléotides	ARNsb de 19 à 25 nucléotides
Origine	Endogène ou exogène	Toujours endogène
Transcription	Transcription par une ARN polymérase II	Transcription par une ARN polymérase II ou III
Précurseur	Précurseur en épingle à cheveux ou double brin	Précurseur : pri-miARN transformé en pré-miARN par Drosha (RNase III) dans le noyau
Maturation dans le cytoplasme	Activé par Dicer (RNase III) dans le cytoplasme Formation d'un complexe ribonucléoprotéique RISC amenant l'ARN simple brin à sa cible ARNm	Activé par Dicer (RNase III) dans le cytoplasme Formation d'un complexe ribonucléoprotéique RISC amenant l'ARN simple brin à sa cible ARNm
action	Hybridation parfaite à la cible Dégradation de l'ARNm par clivage	Hybridation imparfaite à la cible Inhibe la traduction OU Dégrade l'ARNm

Fonctions des miRNA et siRNA

- ❖ L'ARN interférence est un mécanisme hautement conservé entre espèces et permet **d'éteindre** l'expression d'un gène
- ❖ Le rôle naturel du silencing par ARN semble être:
 - la régulation fine des gènes
 - la défense contre les éléments transposables et les virus.
 - la recherche des gènes cibles dans différentes maladies.
 - Contrôle du développement
- ❖ siRNA et miRNA sont des **régulateurs négatifs** de l'expression de gènes en agissant sur des séquences spécifiques post transcriptionnellement

Application de l'ARN interférence:

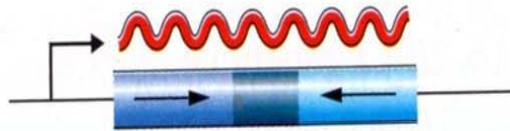
- **Génétique inverse** (découvrir la fonction inconnue d'un gène connu).
- afin d'utiliser L'ARNi comme outil d'analyse , les chercheurs introduisent dans les cellules de petites molécules d'ARN db synthétiques qui induisent la même voie de dégradation que celle induite par l'ARNi et entraîne l'extinction du gène pour lequel on voudrait étudier la fonction.

1 L'ARNdb est synthétisé *in vitro*

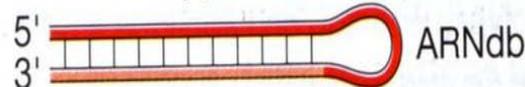


2 L'ARNdb est injecté dans la cellule

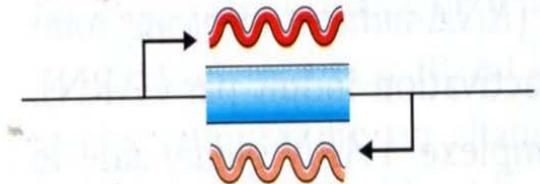
1 Un transgène contenant une répétition inversée est introduit dans le génome



2 Le transcrit d'ARN forme une boucle ainsi qu'une tige de séquences complémentaires appartenant au même brin



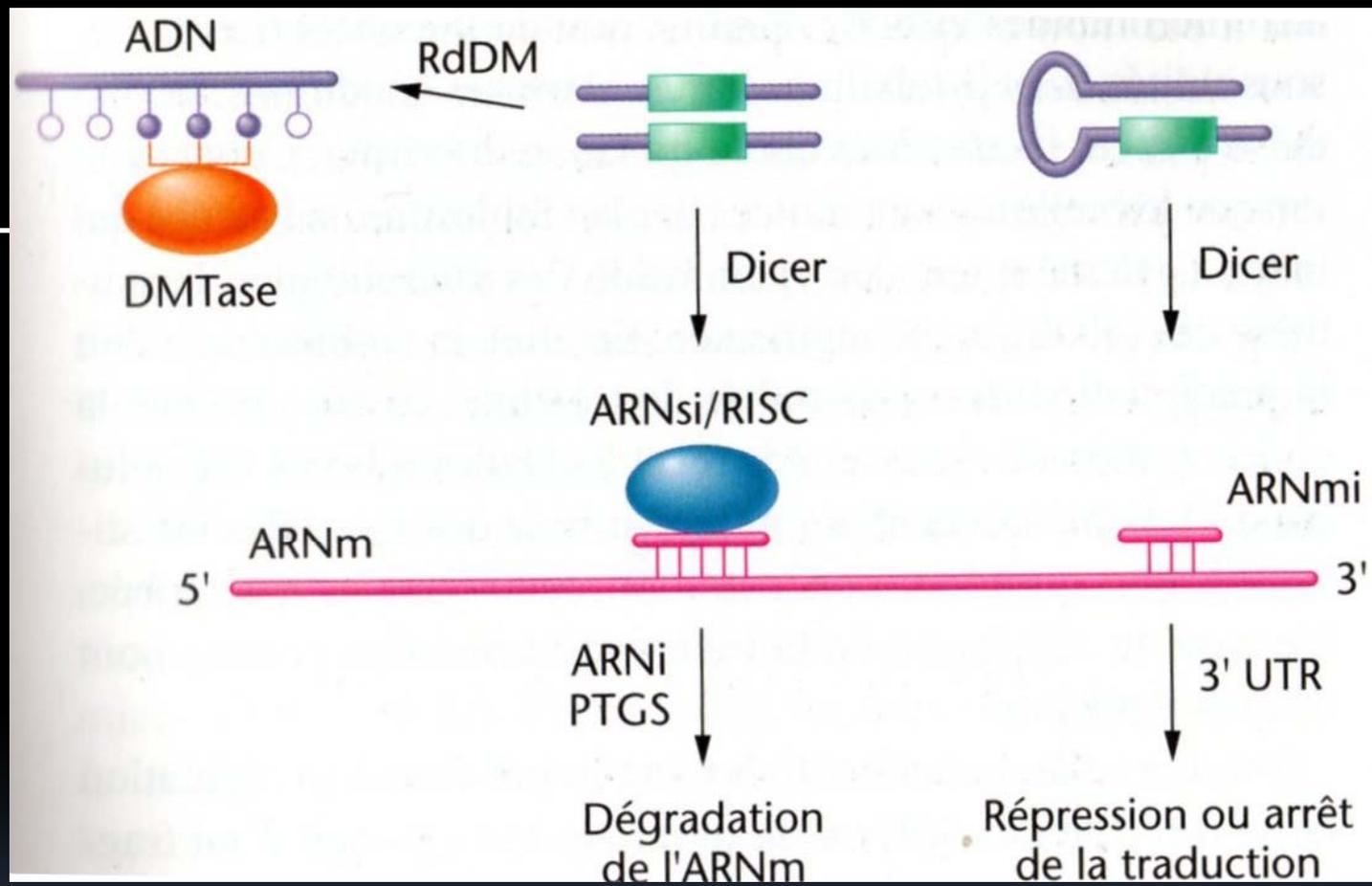
1 Un transgène contenant deux promoteurs orientés en sens inverse est introduit dans le génome



2 Des molécules complémentaires d'ARN sont transcrites et s'hybrident



Trois façons de créer et d'introduire de l'ARNdb dans la cellule



Mécanisme de régulation génique par extinction de gènes dépendante des ARN

Rdm: méthylation de l'ADN dirigée (RNA directed DNA methylation)

DMTase: ADN méthyl Transférase

Code génétique

LE CODE GÉNÉTIQUE

<u>Première lettre</u> <u>extrémité 5'</u>	<u>Deuxième lettre</u>				<u>Troisième lettre</u> <u>extrémité 3'</u>
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G