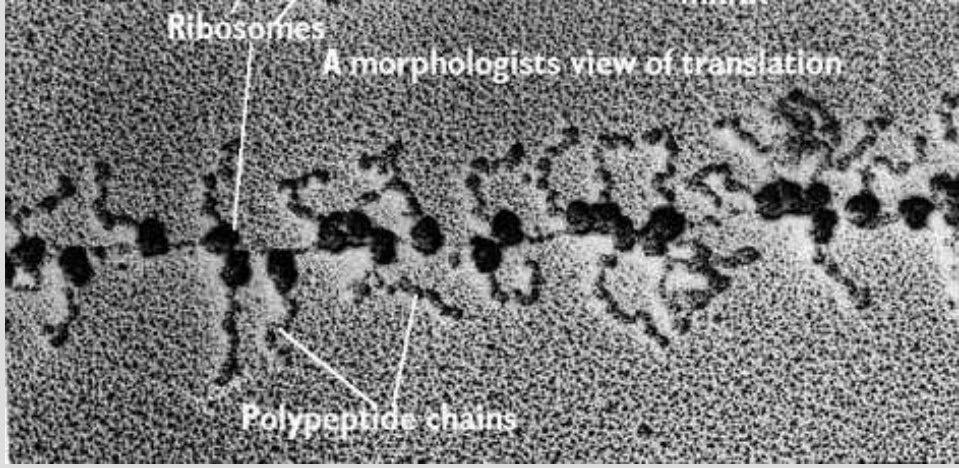
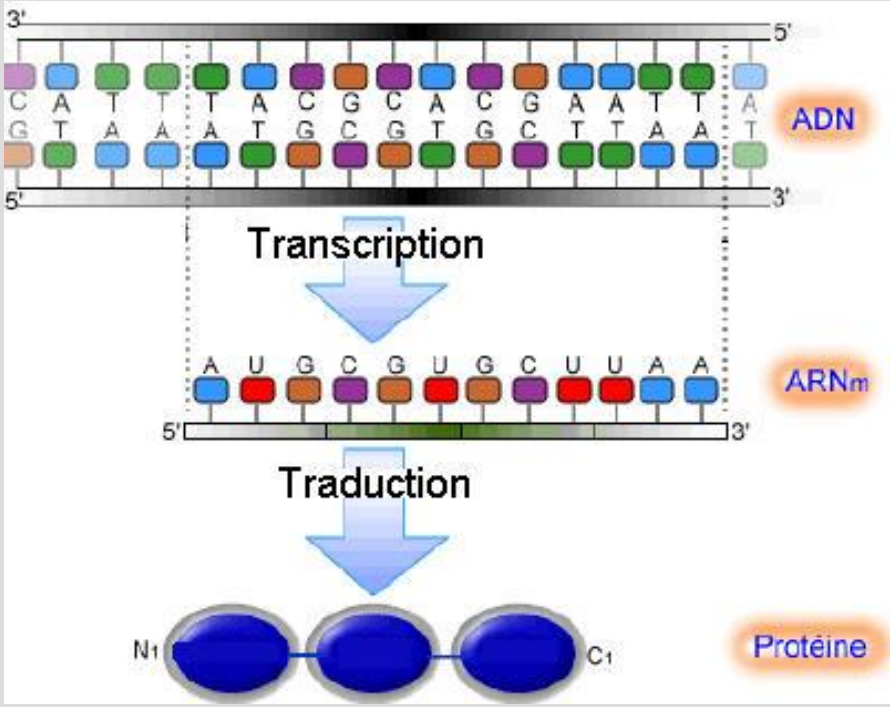
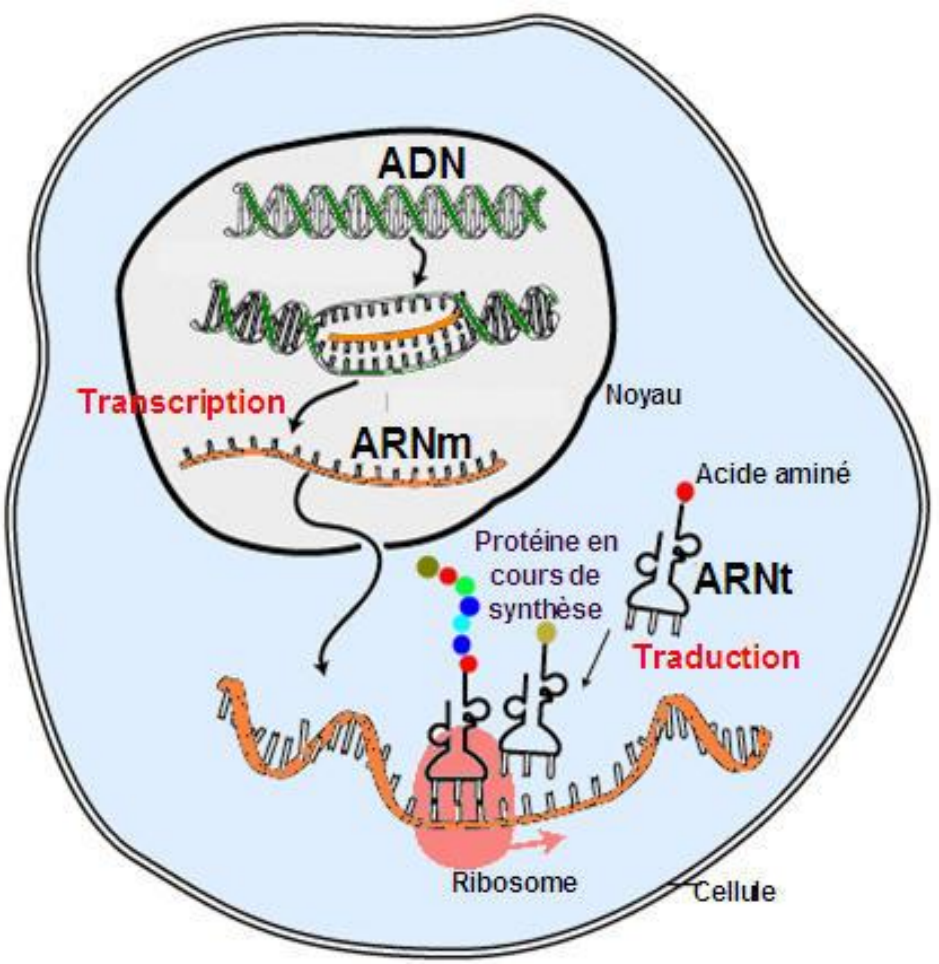
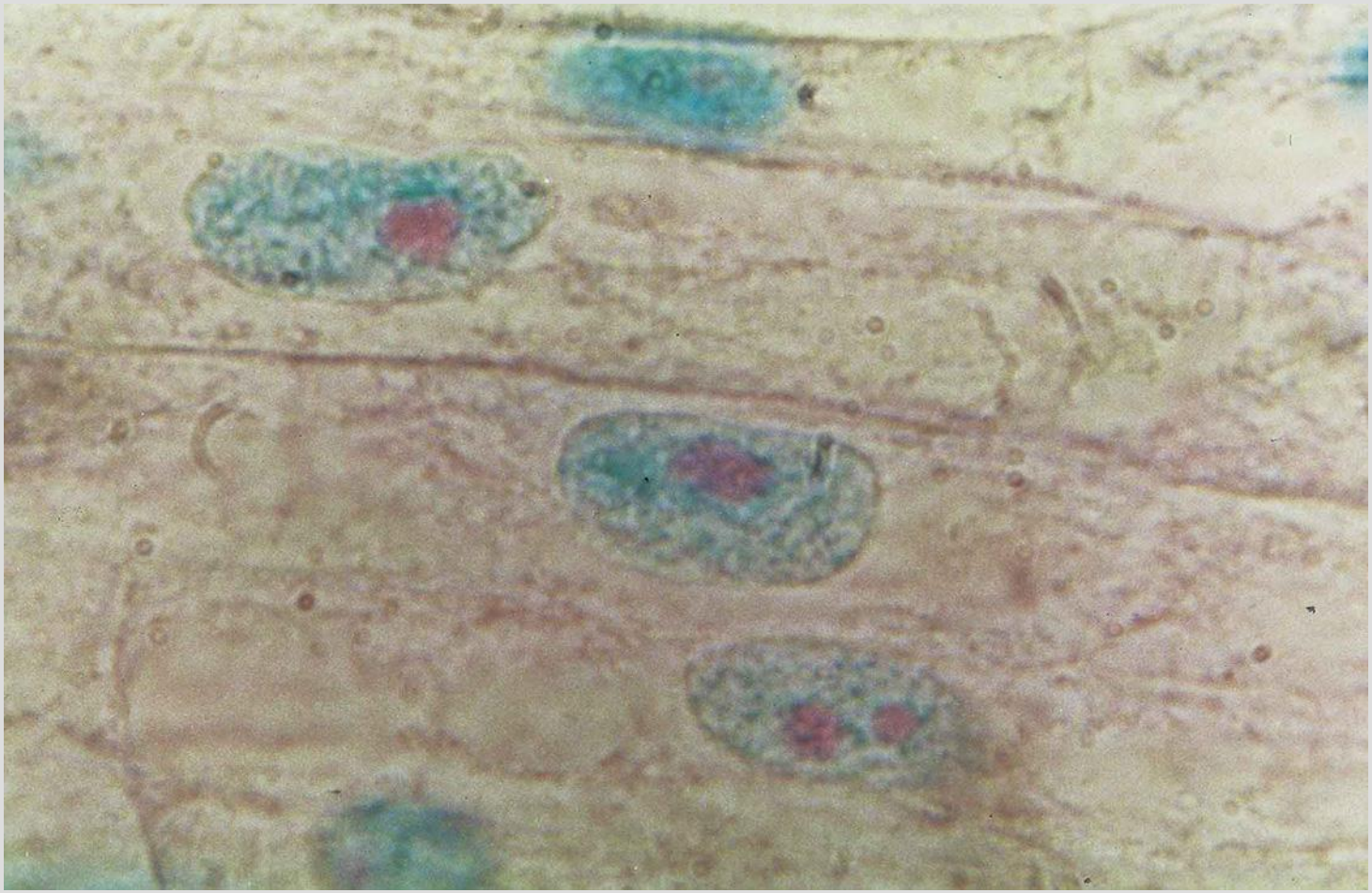
SV – F : Génomique structurale et fonctionnelle



SV – F – 2 et 3 : L'expression du génome et son contrôle







<u>Test de Brachet</u>
sur des cellules de racine d'Oignon (M.O.)
Le vert de méthyle colore en vert l'ADN,
la pyronine colore en rouge l'ARN.

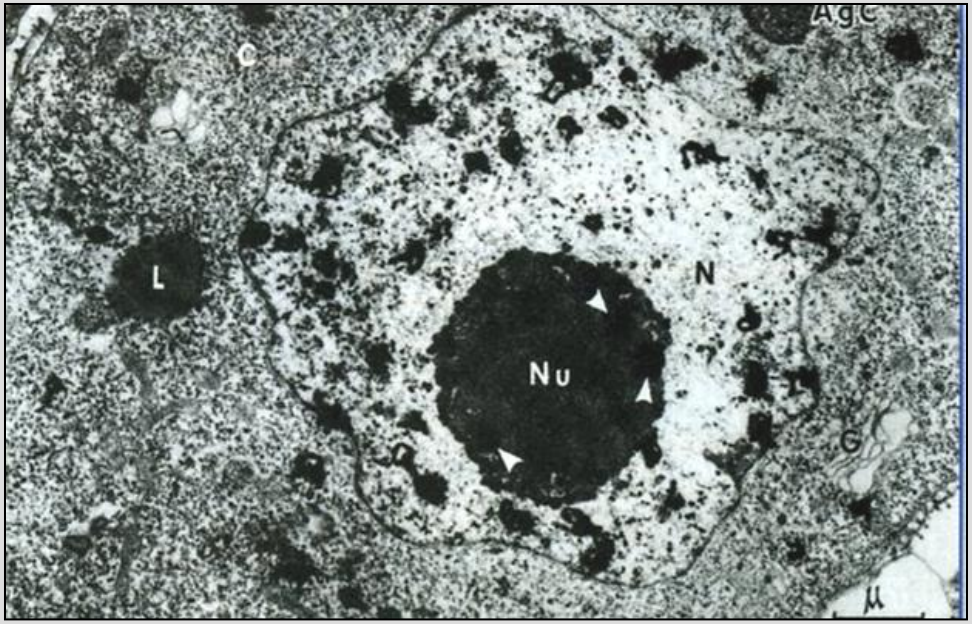
<u>Mise en évidence de la synthèse et du devenir de l'ARN.</u>

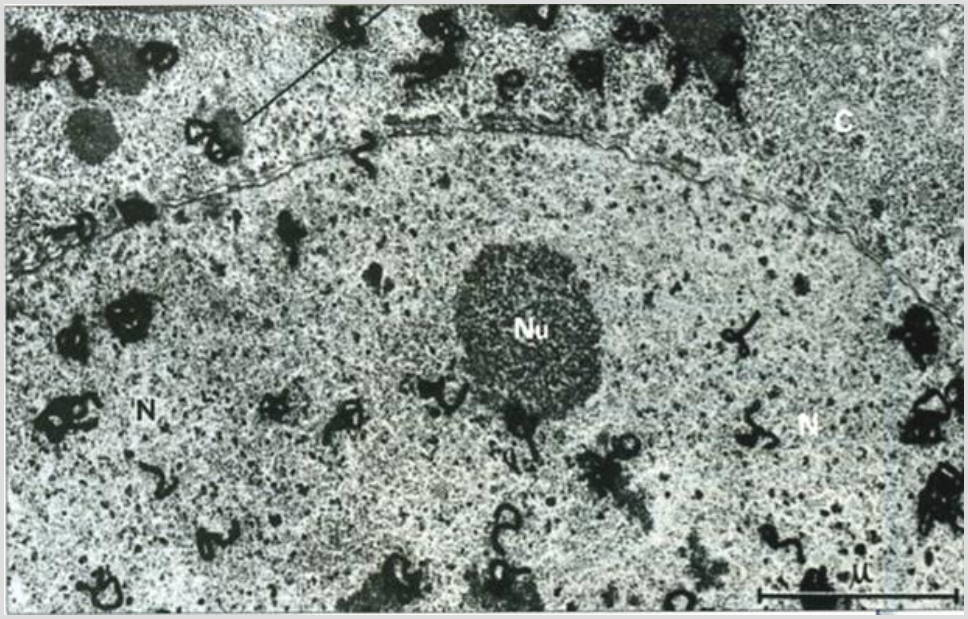
Les cellules sont mises en culture pendant quelques minutes sur un milieu contenant de l'uridine tritiée, nucléotide spécifique des ARN.

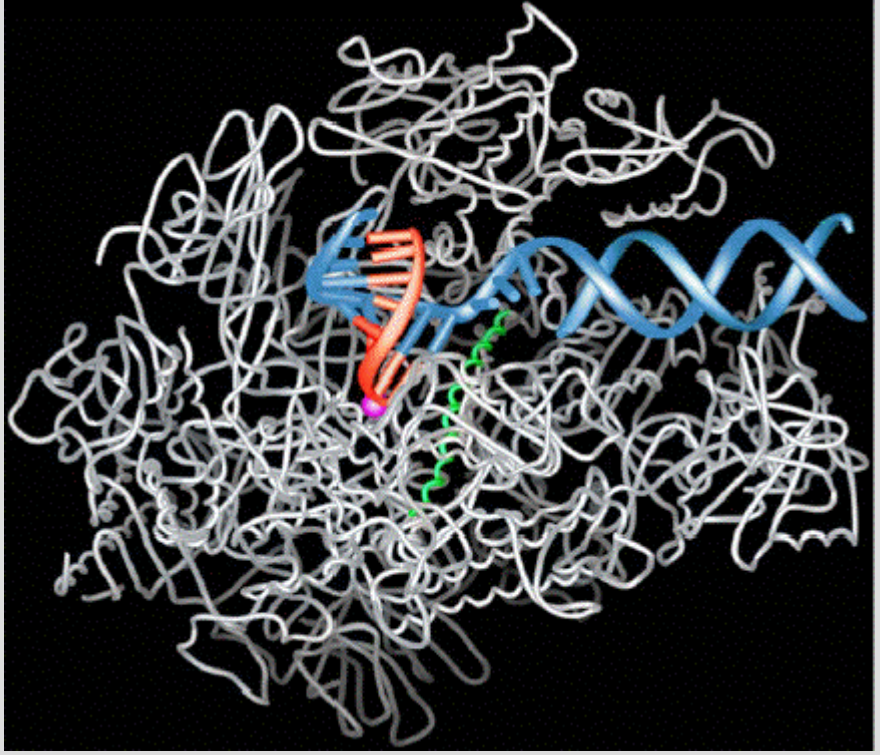
En haut : autoradiographie réalisée après 12 h de chasse (MET x 13 000).

En bas : autoradiographie réalisée après trois jours de chasse (MET x 28 000).

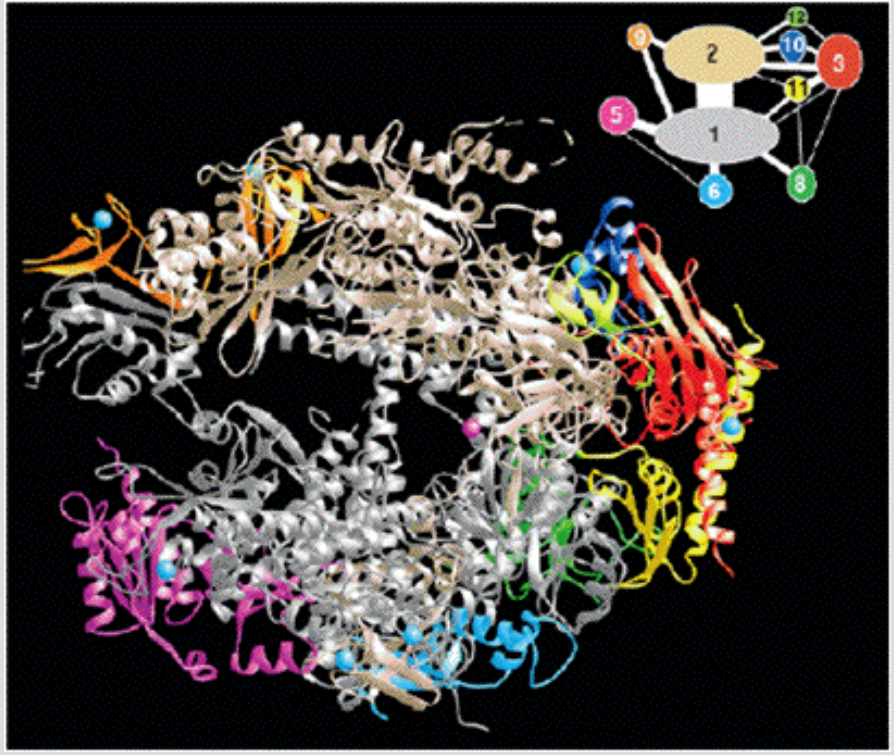
(" SVT 1°S " programme 2001, Nathan Ed.)







en blanc : ARN-polymérase
en bleu : double hélice d'ADN
en rouge : ARN en cours de formation
en vert : structure qui fait avancer le brin d'ADN dans l'enzyme



L ’ARN polymérase II

constituée de 12 sous-unités

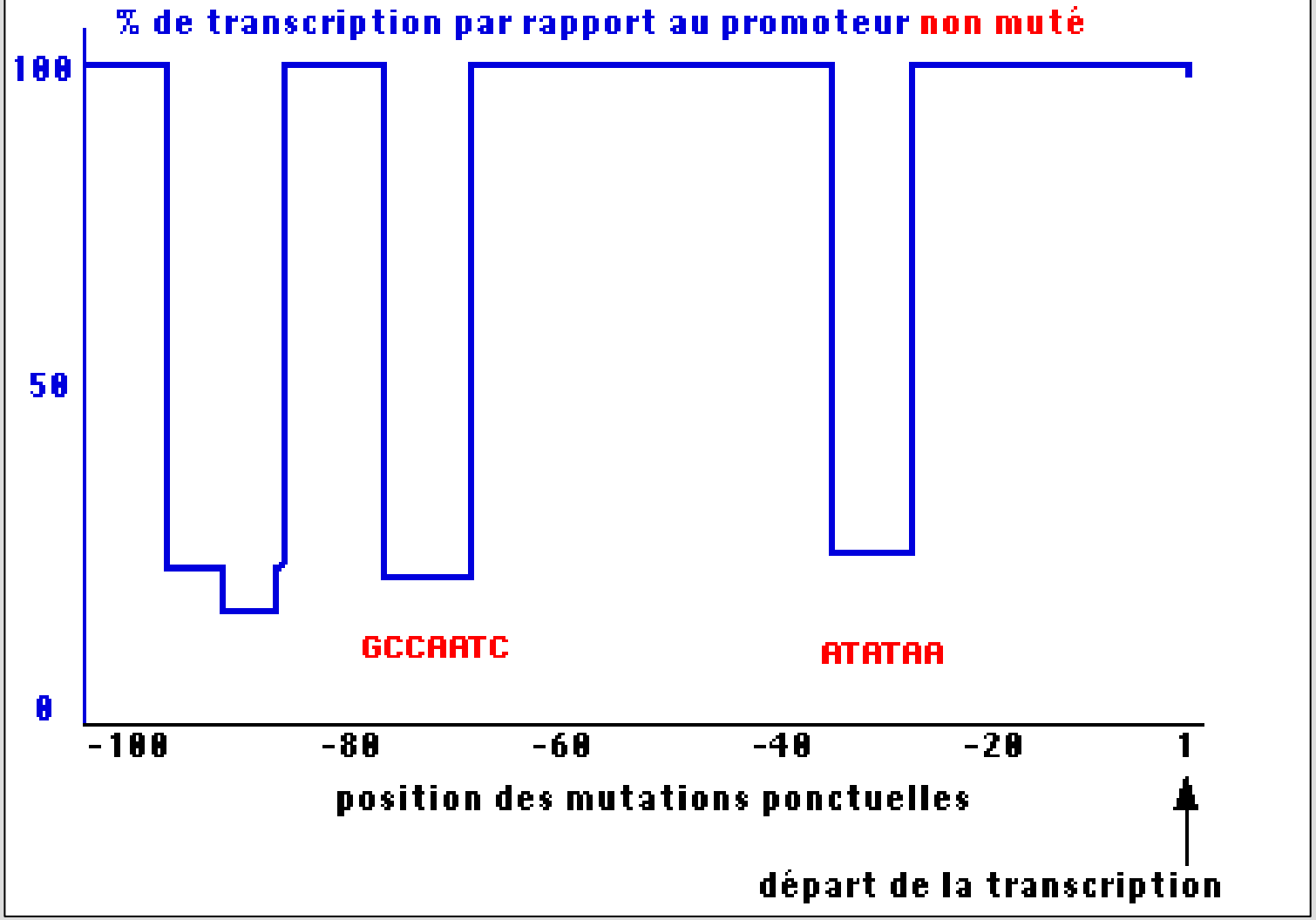
Source des figures : R. D. Kornberg

Nobel Lecture 2006 & ***Cell Death and Differentiation* 14**

L'ARN polymérase de type II

réalise la synthèse de tous les ARN messagers nucléaires qui seront traduits en protéines

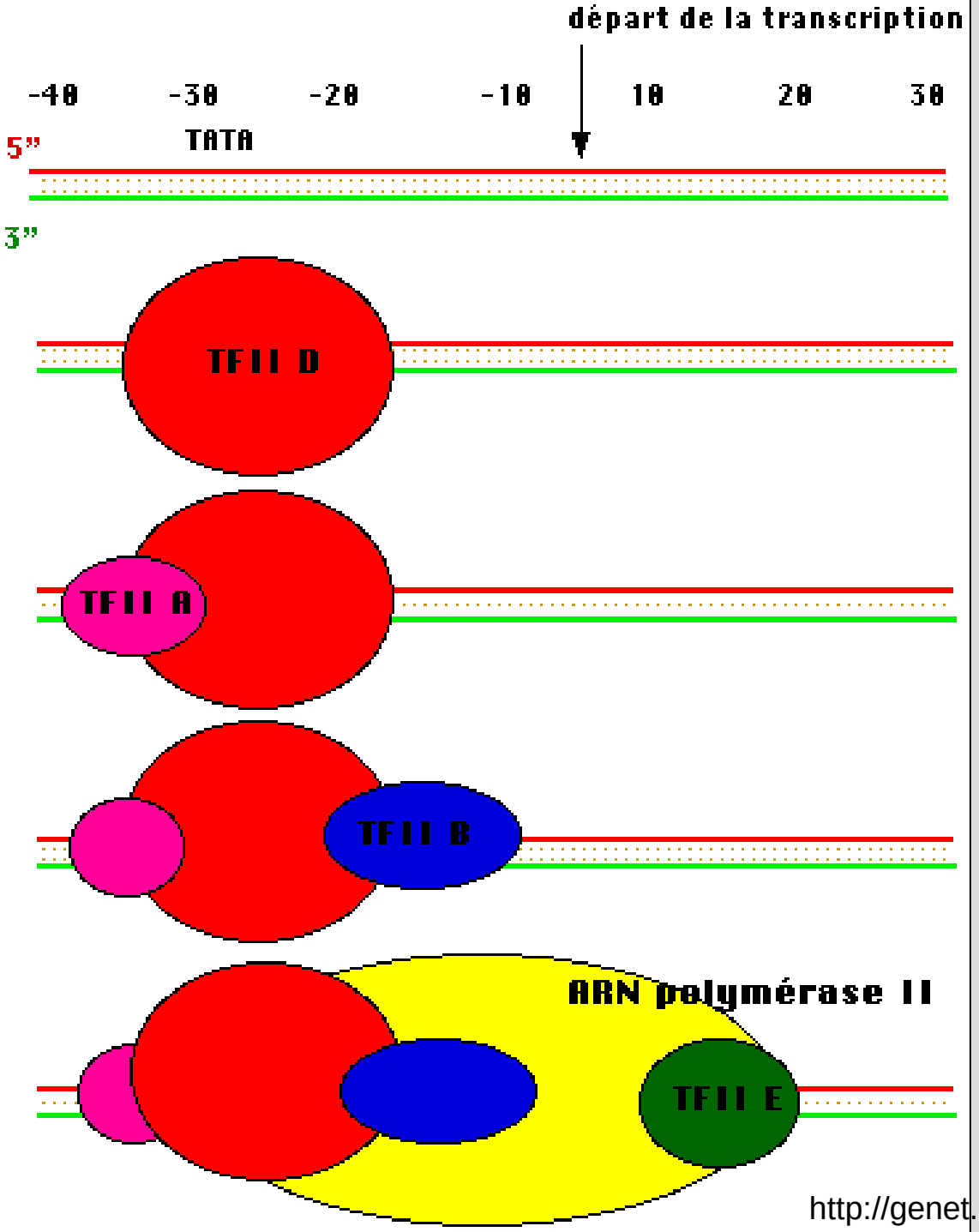
Elle nécessite plusieurs facteurs de transcription (TFII).



<u>Document 1.</u> Identification du rôle de certaines séquences du site promoteur.

L'effet de mutations ponctuelles introduites à presque chaque position sur les 100 pb en amont du site de début de transcription est étudié pour le gène de la globine.
Pour certaines localisations, les mutations affectent de façon très importante la transcription.

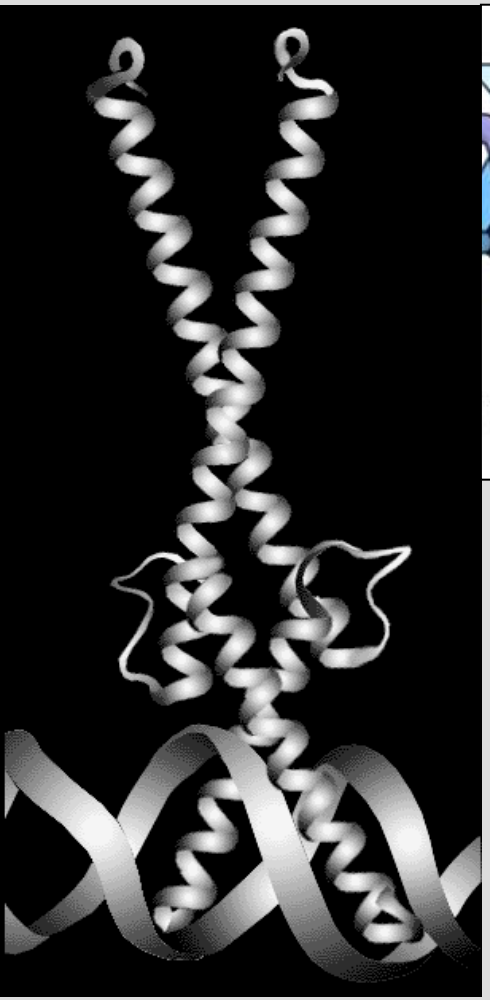
http://genet.univ-tours.fr/gen000600_fichiers/chap5-2.htm

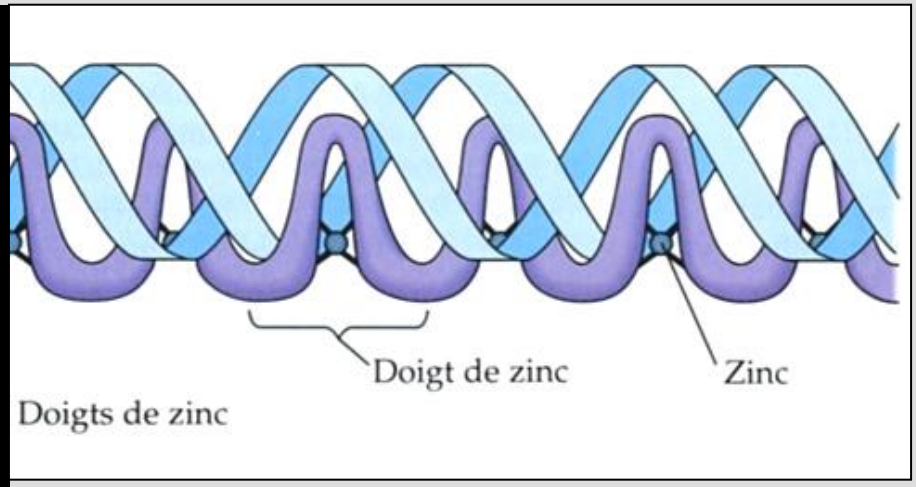


Formation du complexe d’initiation

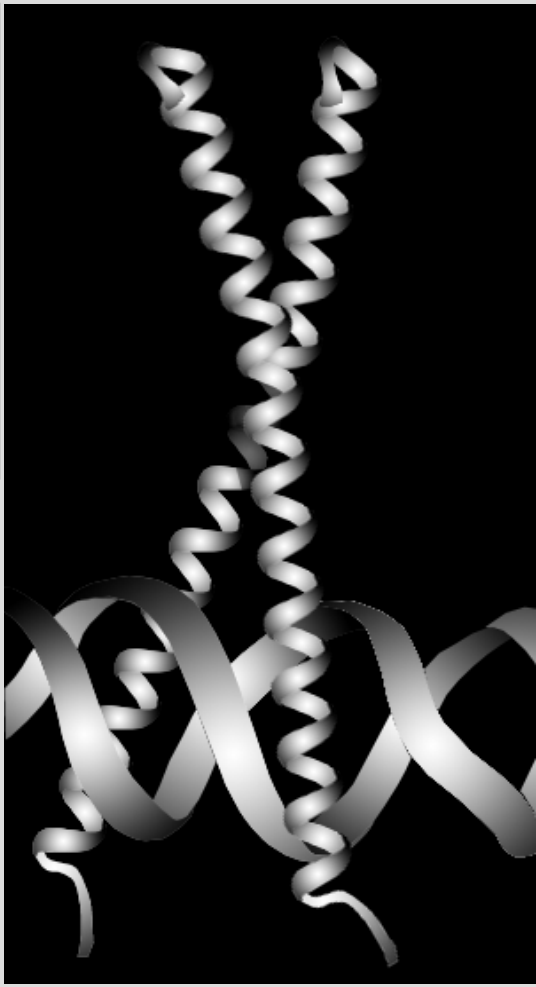
http://genet.univ-tours.fr/gen000600_fichiers/chap5-2.htm

Quelques motifs communs des protéines qui se lient à l'ADN (voir document 21).

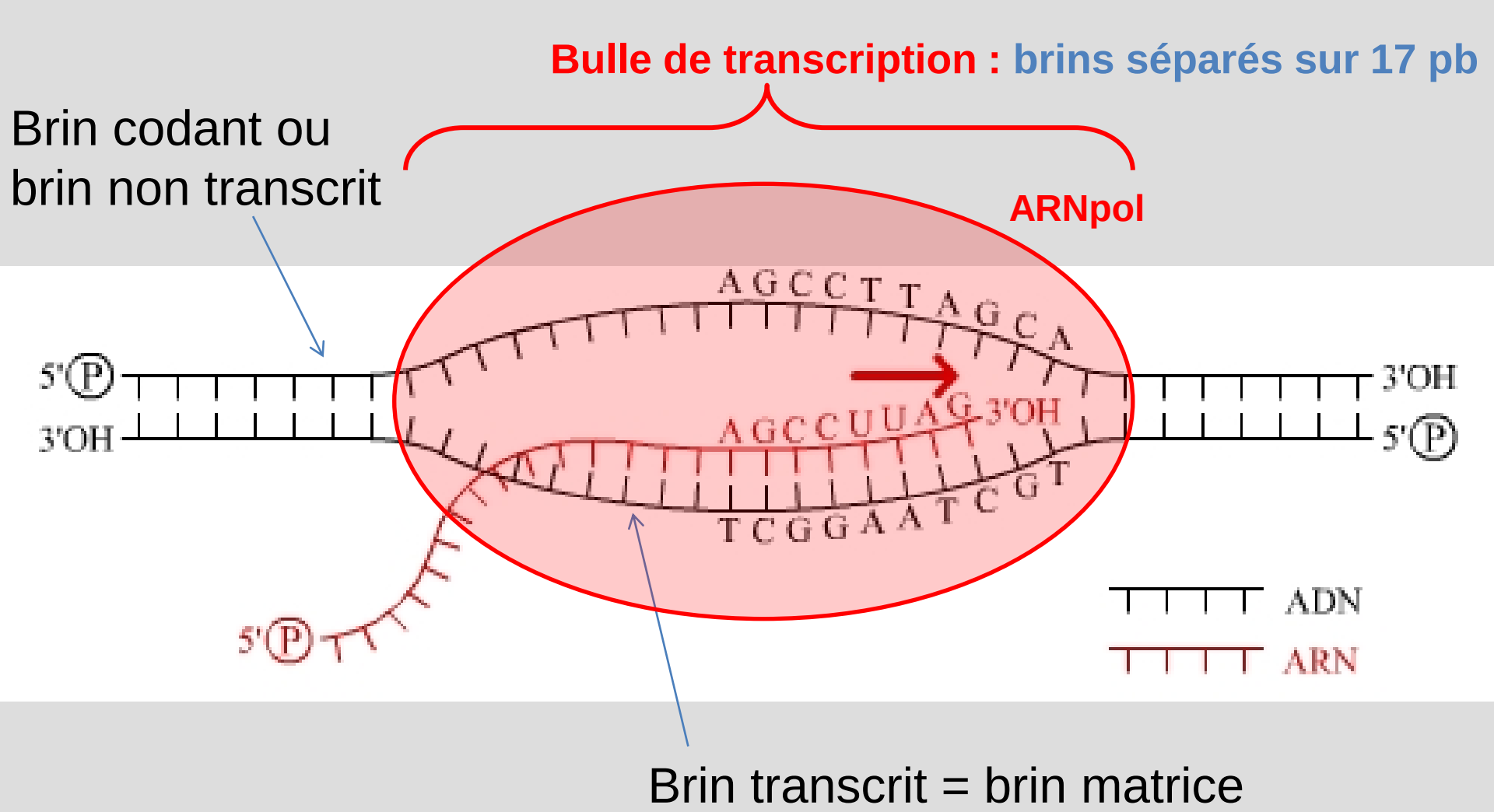




A gauche : domaine de liaison à motif hélice – boucle – hélice
Au centre : domaine de liaison à motif en doigts de zinc
A droite : domaine de liaison à motif fermeture à glissière de leucines.

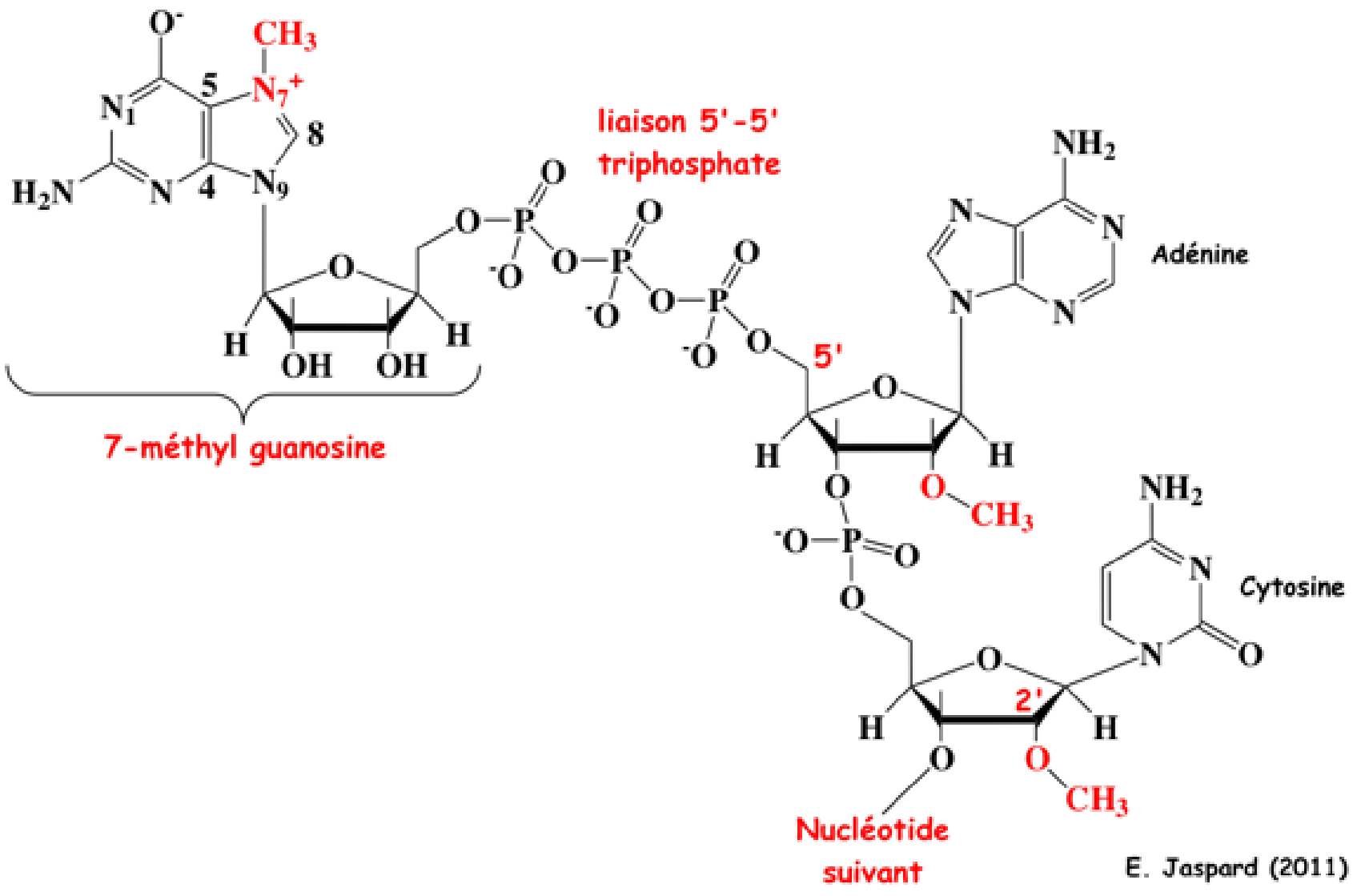


http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/2c.html et CAMPBELL N., " Biologie ", ERPI Ed., 1995



Document 2. Phase d'élongation et formation d'une bulle de transcription.

(http://www.snv.jussieu.fr)

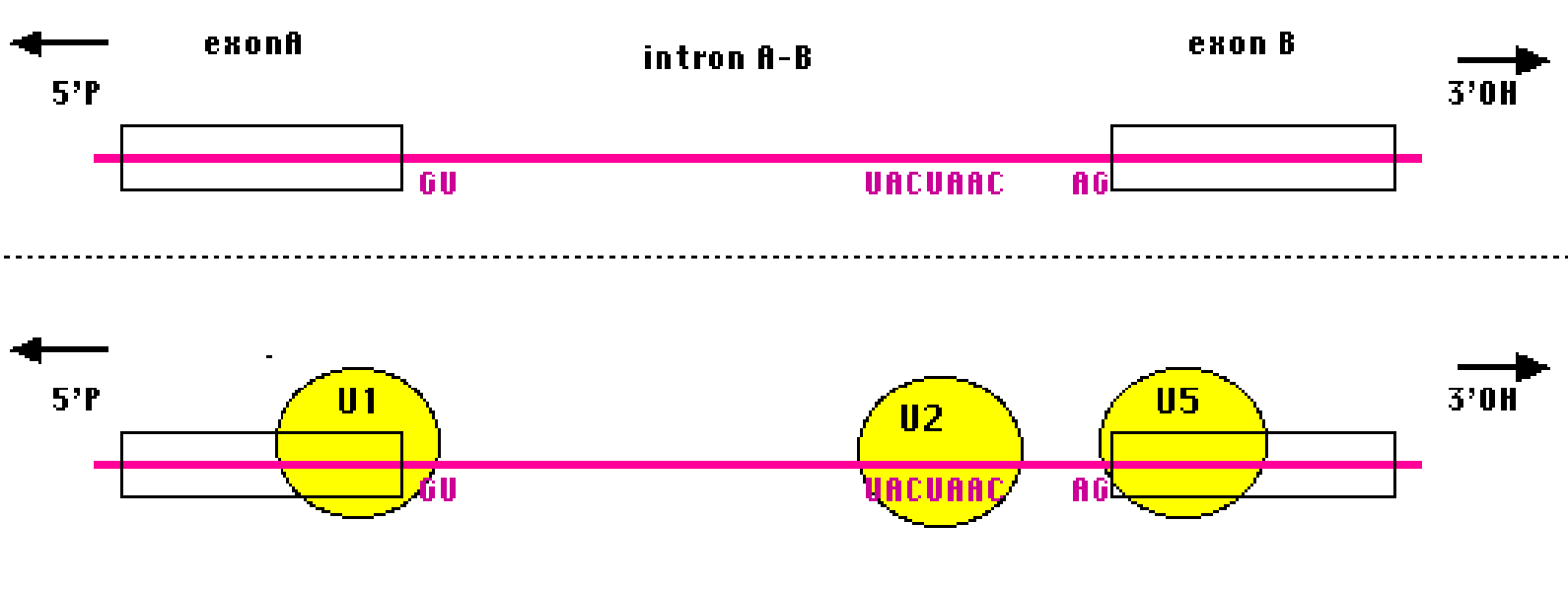


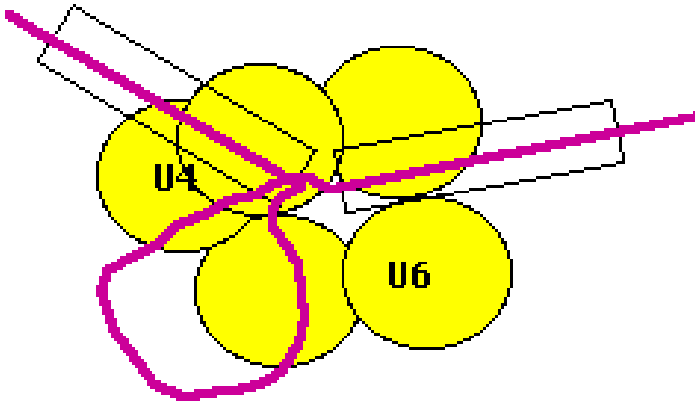
Mise en place de la coiffe en 5’

http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm

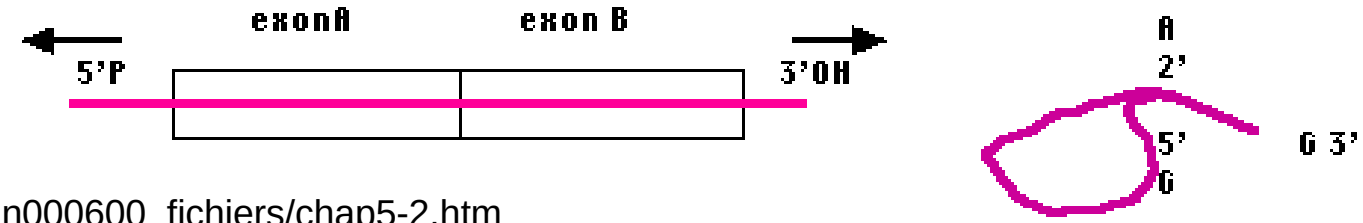
L’épissage

En jaune :
les snRNP

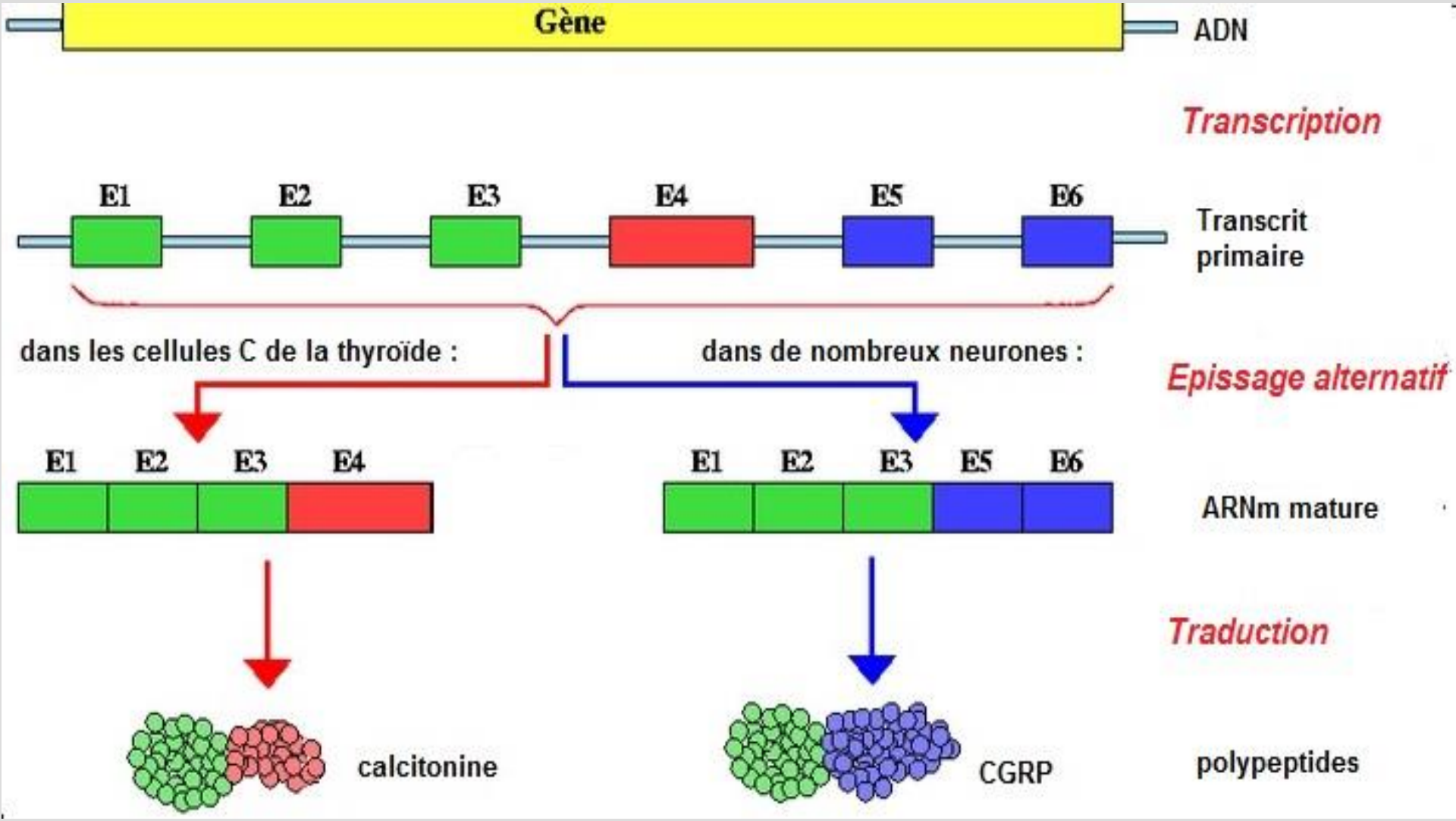




Les différents snRNP s’associent en un édifice qui replie l’intron et permet son élimination sous forme d’un « lasso ».

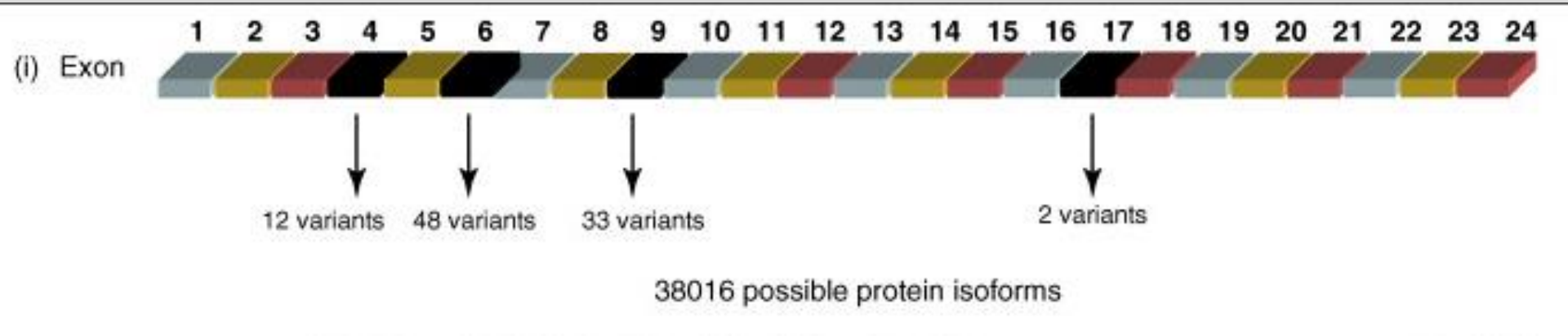


http://genet.univ-tours.fr/gen000600_fichiers/chap5-2.htm

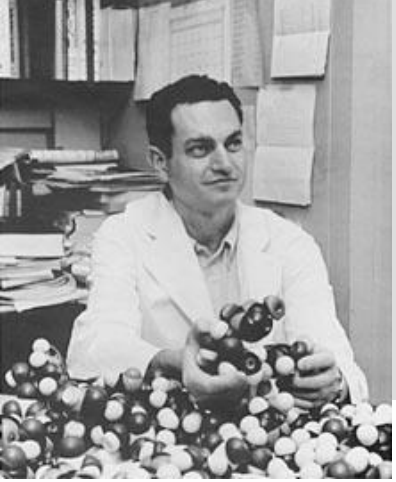


<u>Document 3.</u> Un épissage alternatif tissu dépendant : l'épissage alternatif calcitonine / CGRP.

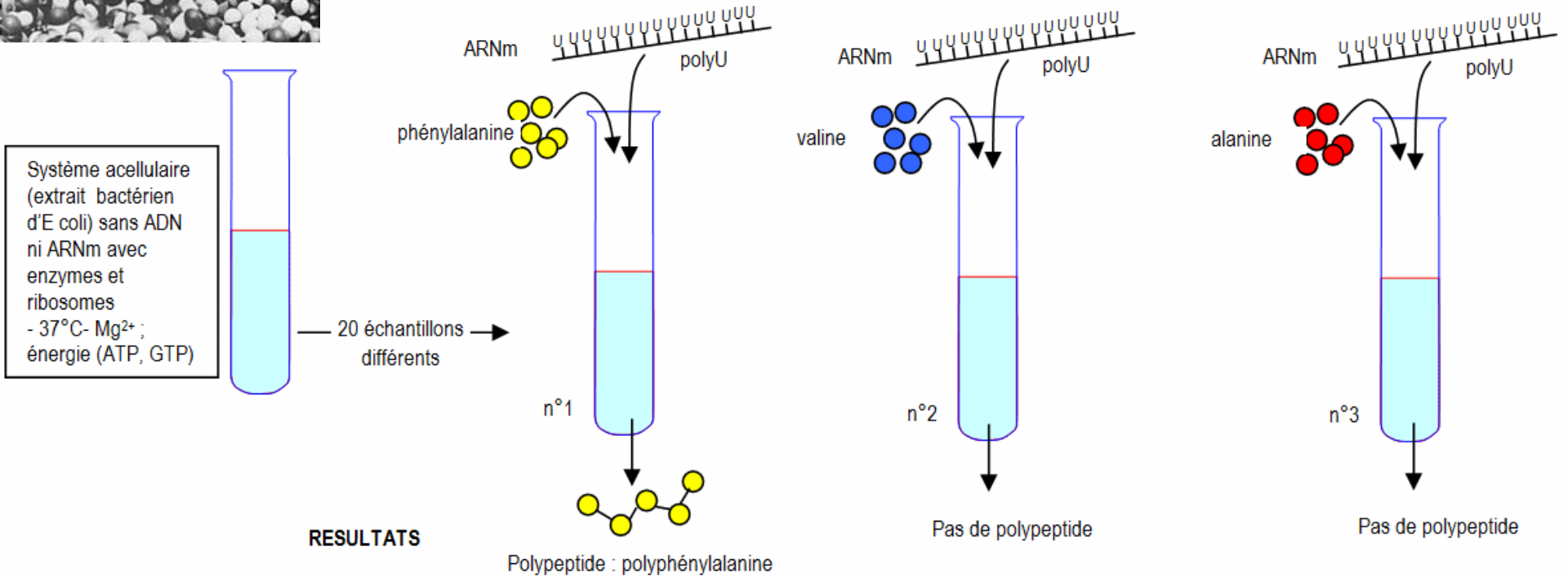
Le gène DSCAM
(Down Syndrom Cell Adhesion Molecule)
de la Drosophile peut coder jusqu'à 38 016 ARNm différents



Les protéines codées sont des protéines membranaires intervenant dans le guidage des axones durant le développement post-embryonnaire.



Expérience de Nirenberg, 1961



Autres expériences : avec

ARNm	polypeptide obtenu
polyA	polymère de lysine
polyC	polymère de proline

http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=2984

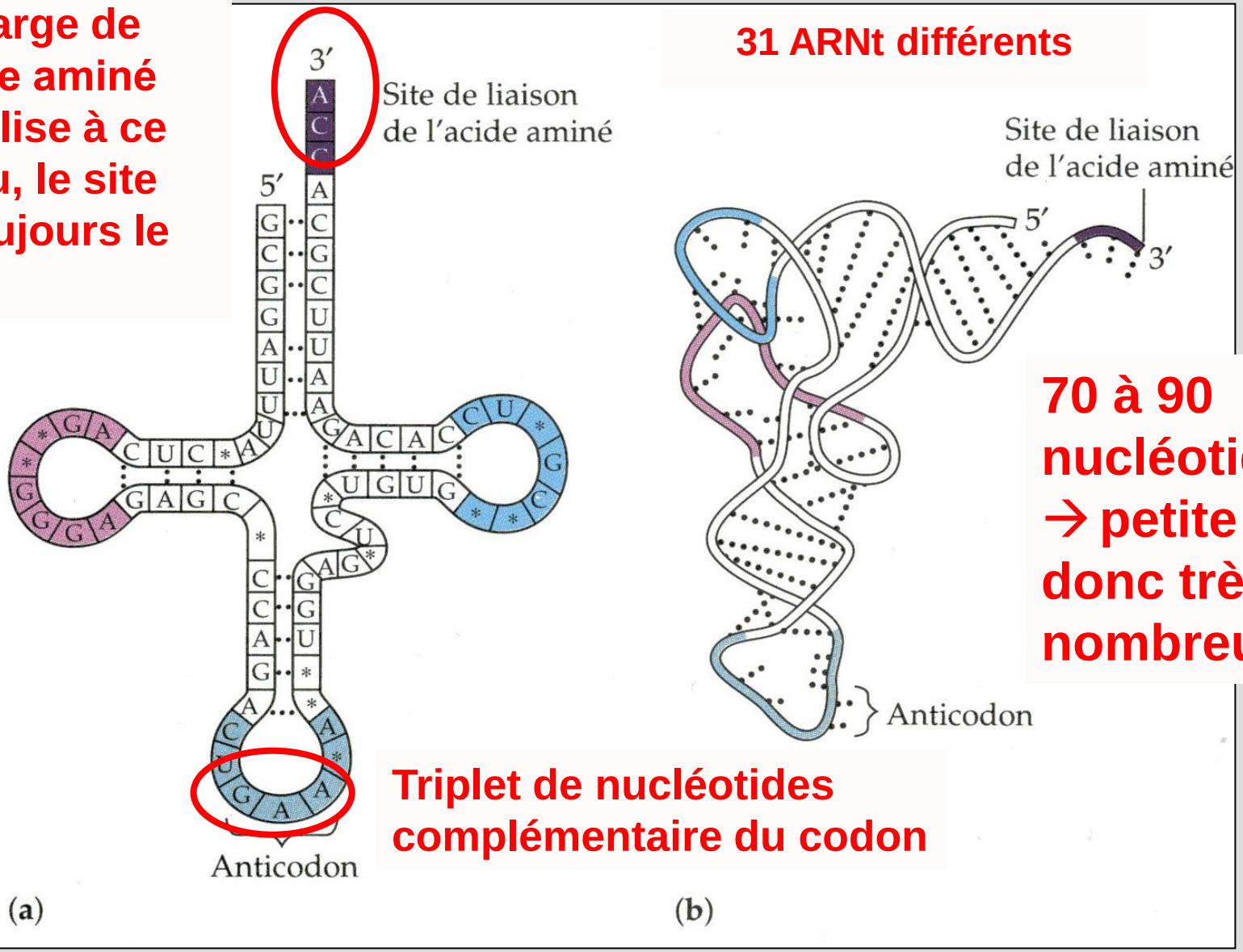
Première base	Deuxième base : U	C	A	G	Troisième base
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC	UCC	UAC	UGC	C
	UUA Leu	UCA	UAA Arrêt	UGA Arrêt	A
	UUG	UCG	UAG Arrêt	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA Gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC	ACC	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met ou départ	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA Glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

- **Unité de base : le codon**
- **Universel**
- **Non chevauchant**
- **Non ponctué**
- **Redondant (=« dégénéré »)**
- **Pas ambigü**
- **3 codons stop : UAG UGA UAA**
- **1 codon initiateur : AUG**

<u>Document 4.</u>
Le code génétique.
(CAMPBELL N., “ Biologie ”, ERPI Ed., 1995).

La charge de l 'acide aminé se réalise à ce niveau, le site est toujours le même

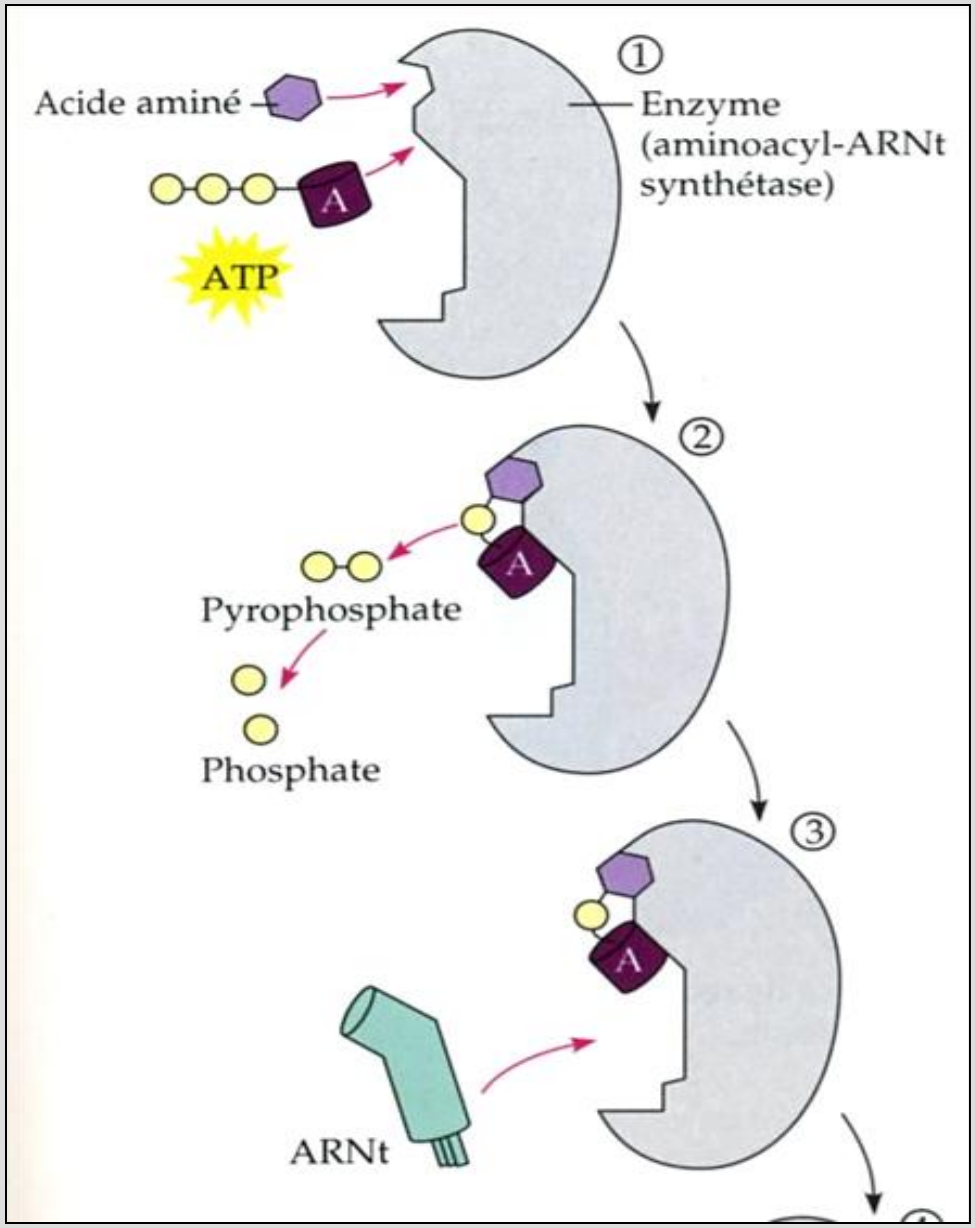
31 ARNt différents

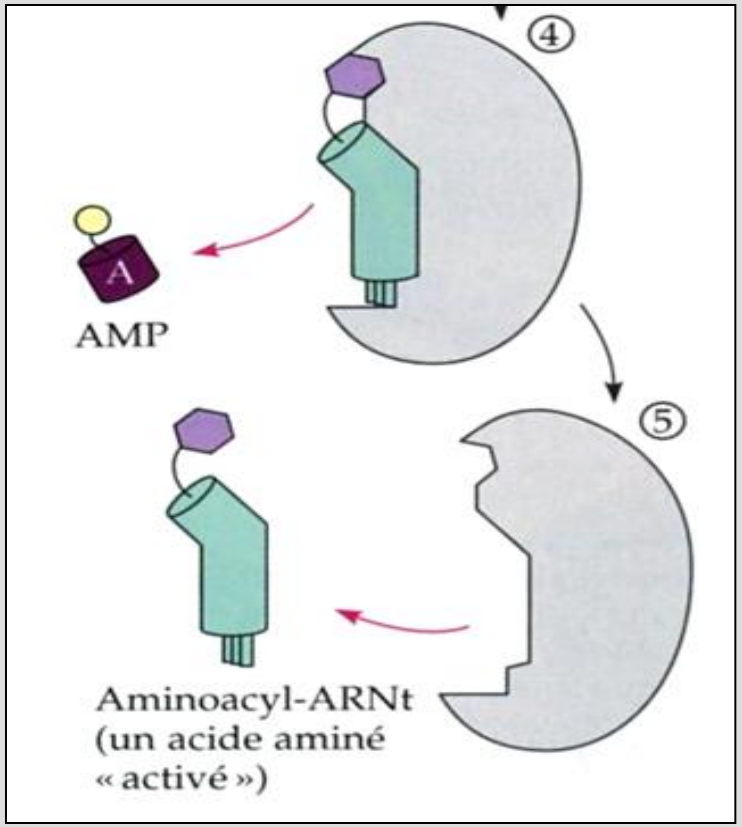


70 à 90 nucléotides → petite taille, donc très nombreux

Triplet de nucléotides complémentaire du codon

<u>Document 5.</u> Structure de l'ARN de transfert.
a. Structure bidimensionnelle en " feuille de trèfle ".
b.Structure tridimensionnelle en L.
(CAMPBELL N., " Biologie ", ERPI Ed., 1995).





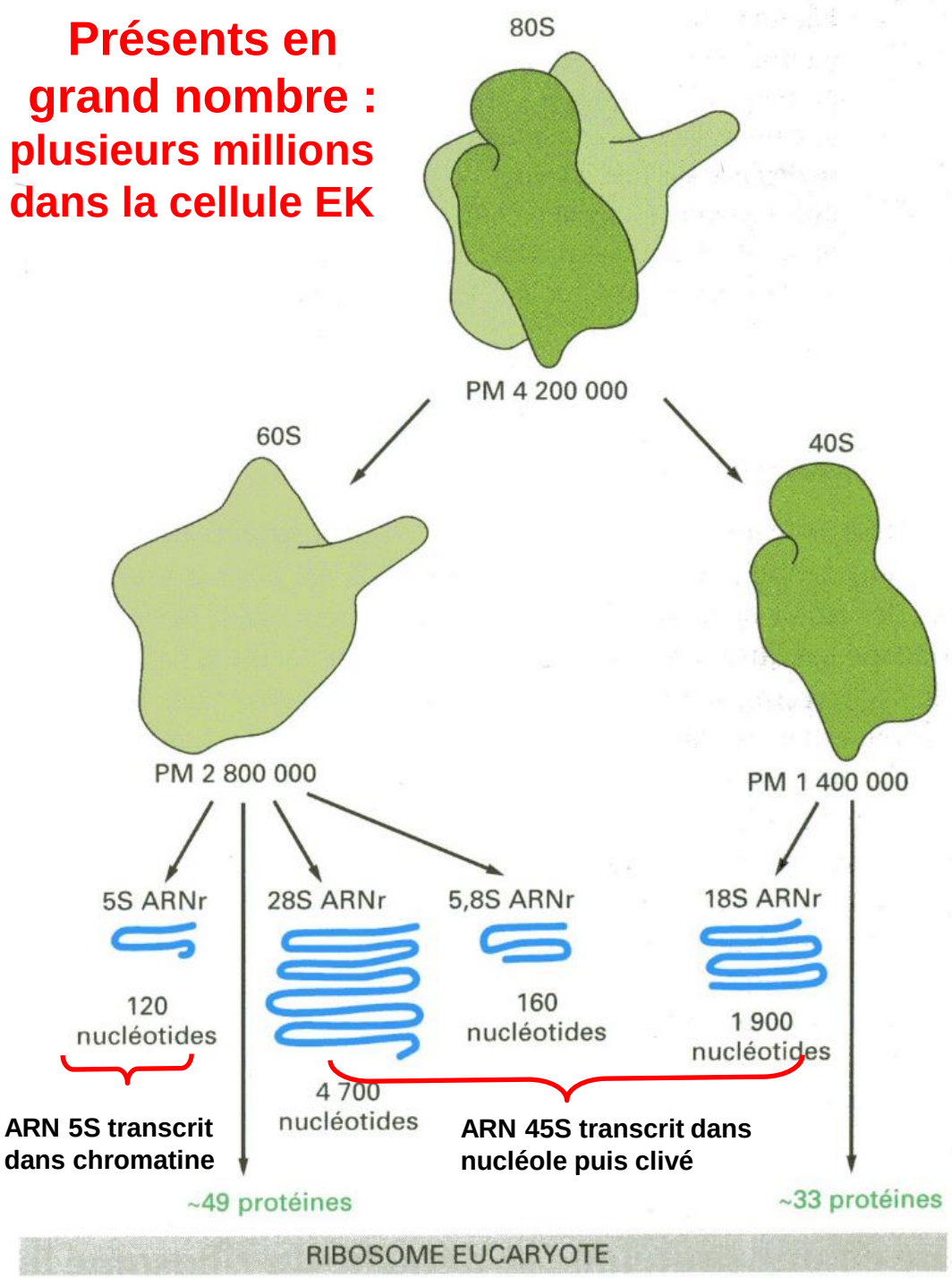
<u>Document 6.</u> Fixation de l'acide aminé sur l'ARNt correspondant par l'aminoacyl-ARNt synthétase.

(CAMPBELL N., " Biologie ", ERPI Ed., 1995).

Document 7. Structure du ribosome des cellules eucaryotes.

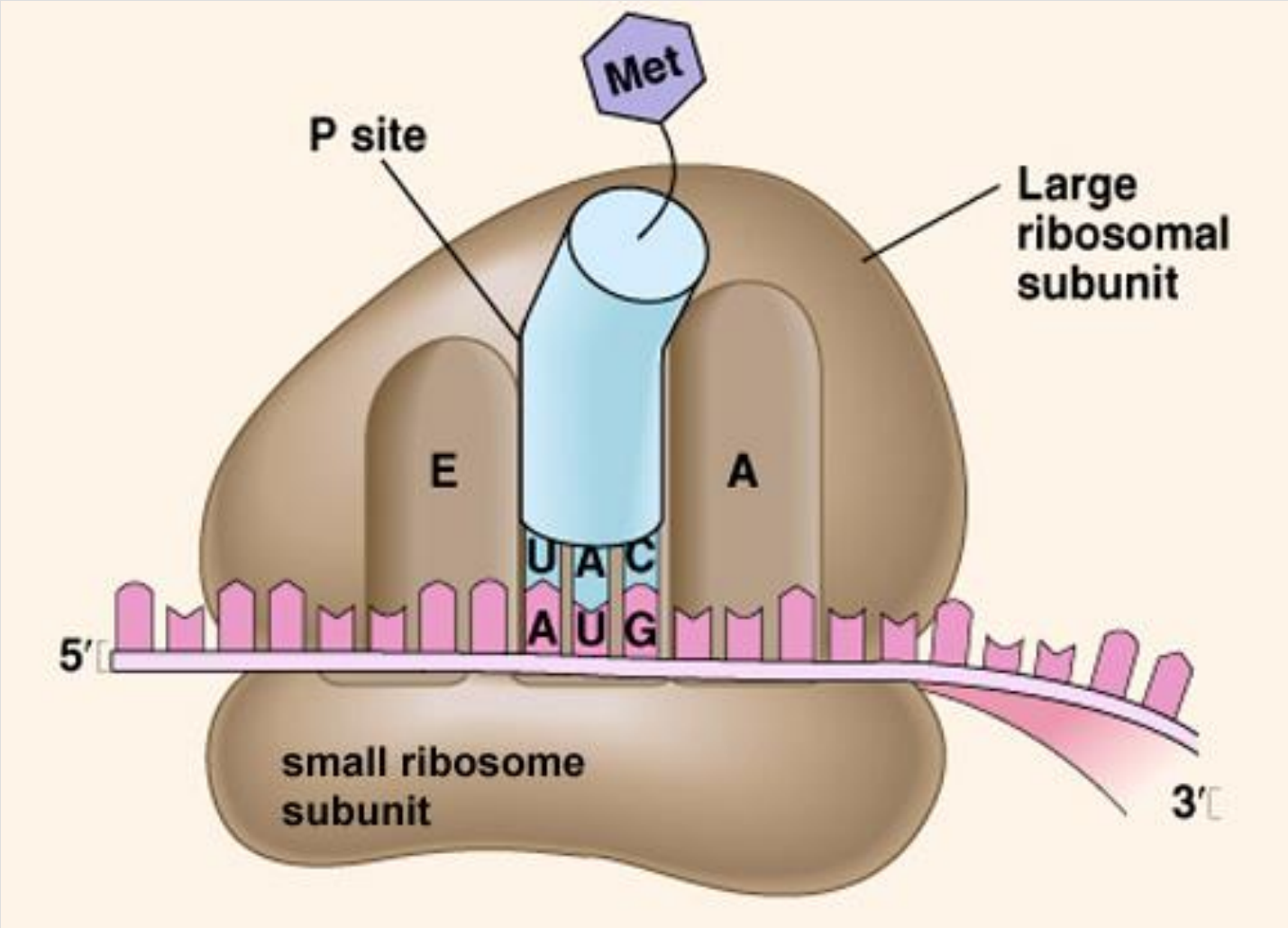
Les composants ribosomaux sont généralement désignés par leur “ S ” qui représente leur vitesse de sédimentation par ultracentrifugation.

(ALBERTS B. et coll., “ Biologie moléculaire de la cellule ”, 3e edition, Médecine-Sciences - Flammarion Ed., 1998).



Premier modèle moléculaire du ribosome de l'Homme. Ce complexe macromolé-culaire est composé de quatre molécules d'ARN (gris) et de 79 protéines (rubans colorés).

http://www.inserm.fr/thematiques/bases-moleculaires-et-structurales-du-vivant/faits-marquants/structure-du-ribosome-eucaryote-a-haute-resolution

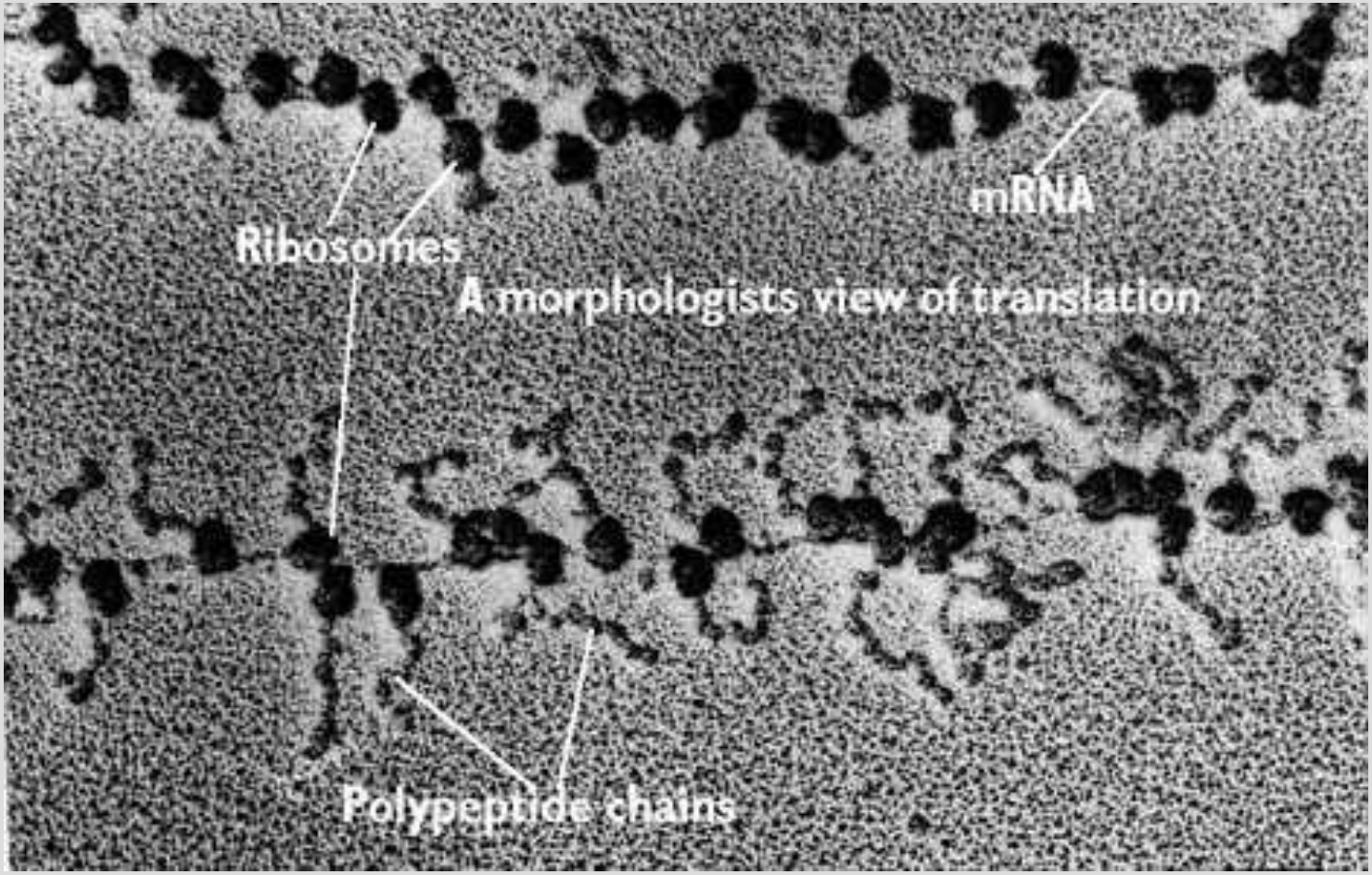


Structure d’un ribosome assemblé

Site E : « exit site » site de « sortie » de l’ARNt déchargé

Site P : site de liaison au peptidyl-ARNt

Site A : site de liaison à l’aminoacyl-ARNt

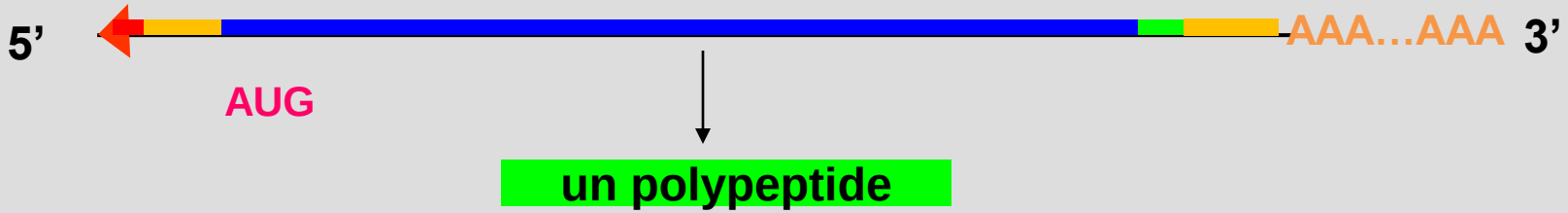


Polysomes

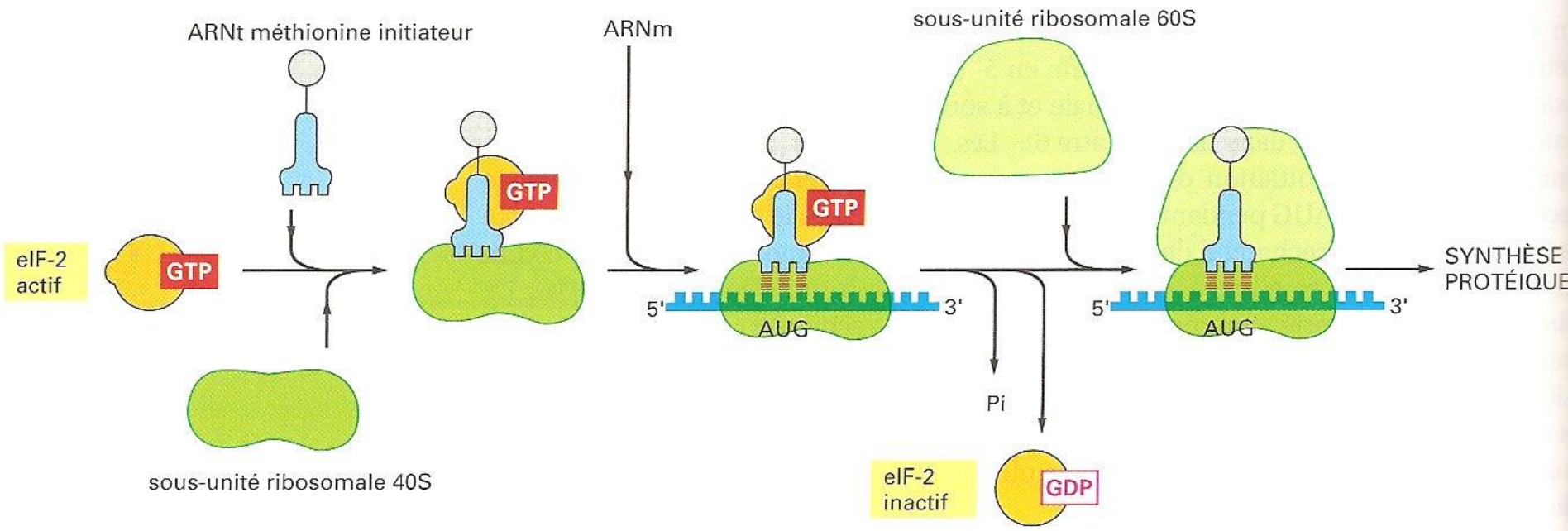
Plusieurs ribosomes sont associés à un même ARNm et chacun d’eux synthétise une chaîne polypeptidique.

Source : « Role of the ribosome »- LODISH, Molecular Cell Biologye http://www.whfreeman.com/lodish4e/index.htm

Rappel : organisation d'un ARNm eucaryote



- site de liaison du ribosome
- séquence non codante
- séquence codante
- codon stop



<u>Document 8.</u> Initiation de la traduction :

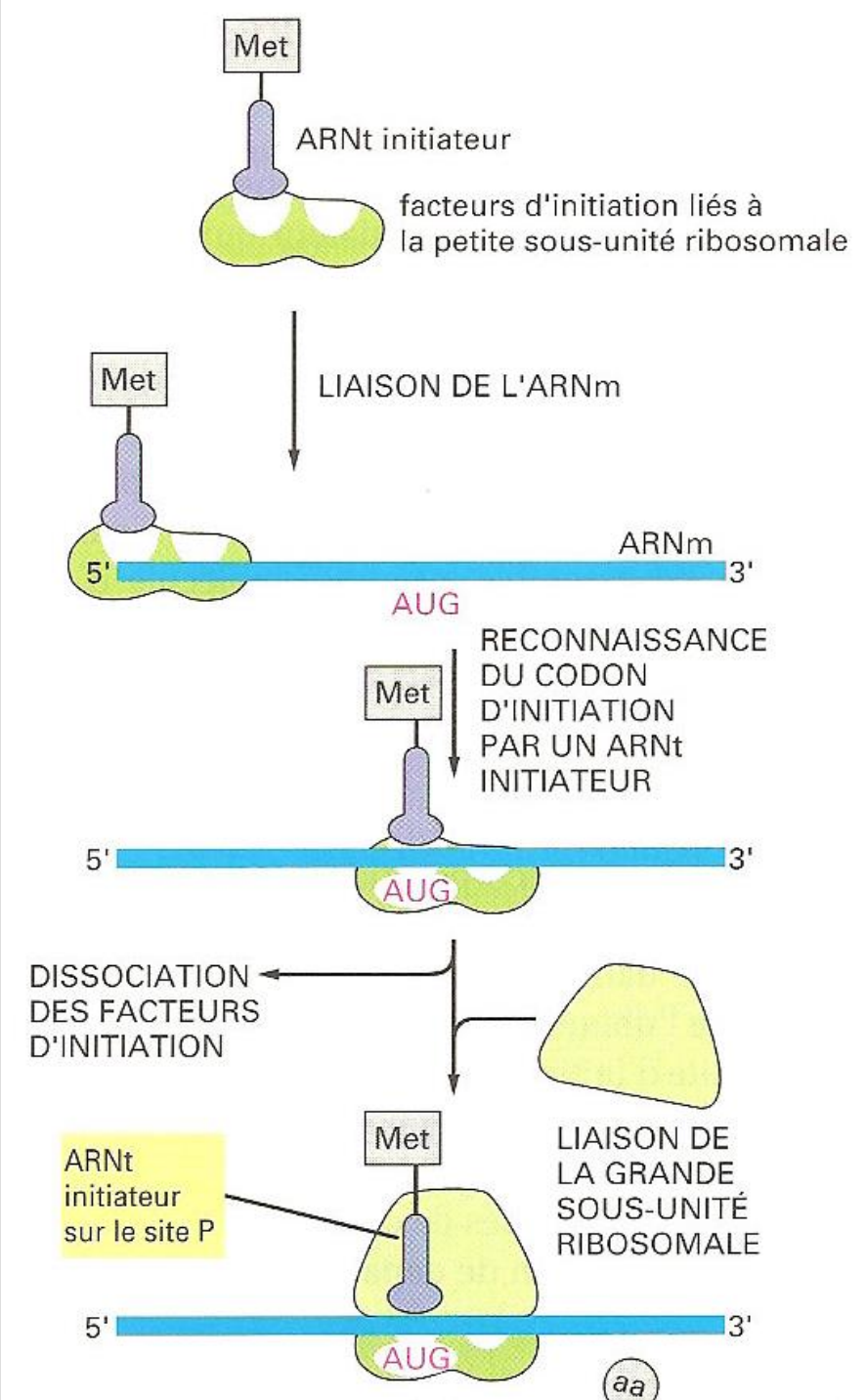
1 - rôle du facteur d'initiation eIF-2.

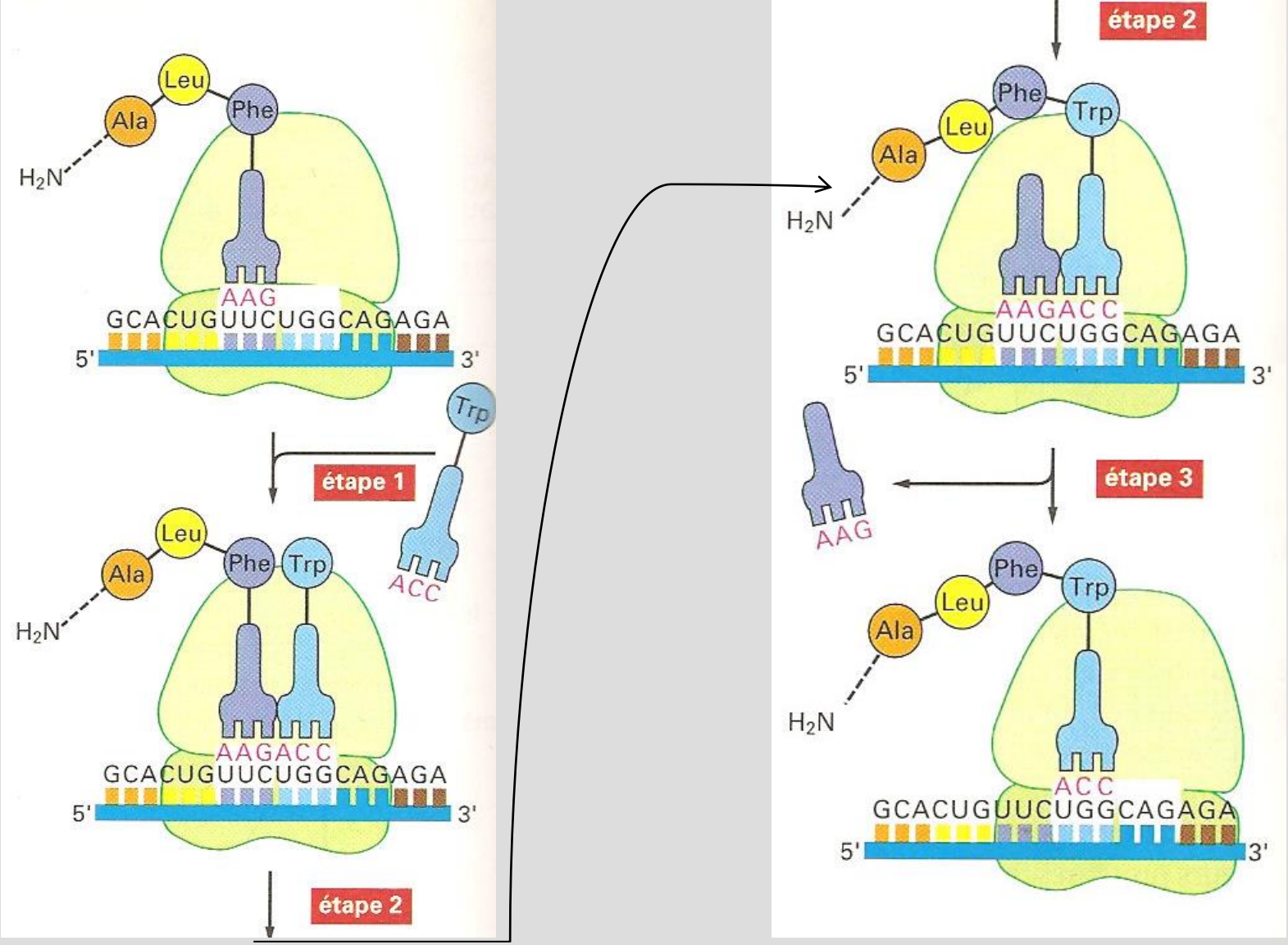
(ALBERTS B. et coll., " Biologie moléculaire de la cellule ", 3e edition, Médecine-Sciences - Flammarion Ed., 1998).

<u>Document 8.</u> Initiation de la traduction :

2 – De la liaison à l'ARNm à la formation du ribosome fonctionnel.

(ALBERTS B. et coll., " Biologie moléculaire de la cellule ", 3e edition, Médecine-Sciences - Flammarion Ed., 1998).



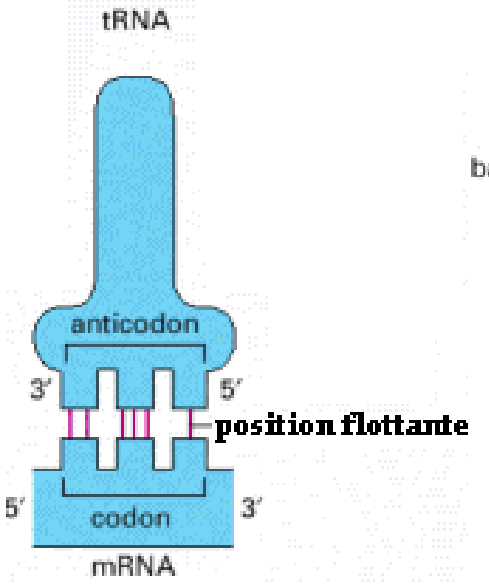


Document 9. L'élongation.

(ALBERTS B. et coll., " Biologie moléculaire de la cellule ", 3e edition, Médecine-Sciences - Flammarion Ed., 1998).

- **appariement codon-anticodon**

- **flottement de la 3ème base ou wobble**

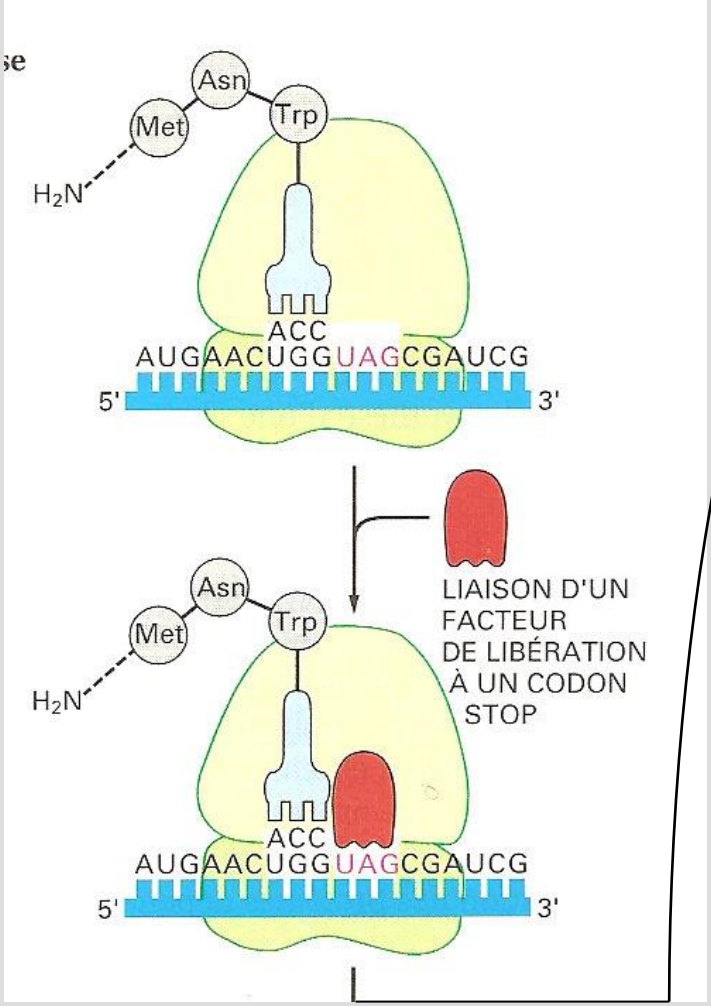


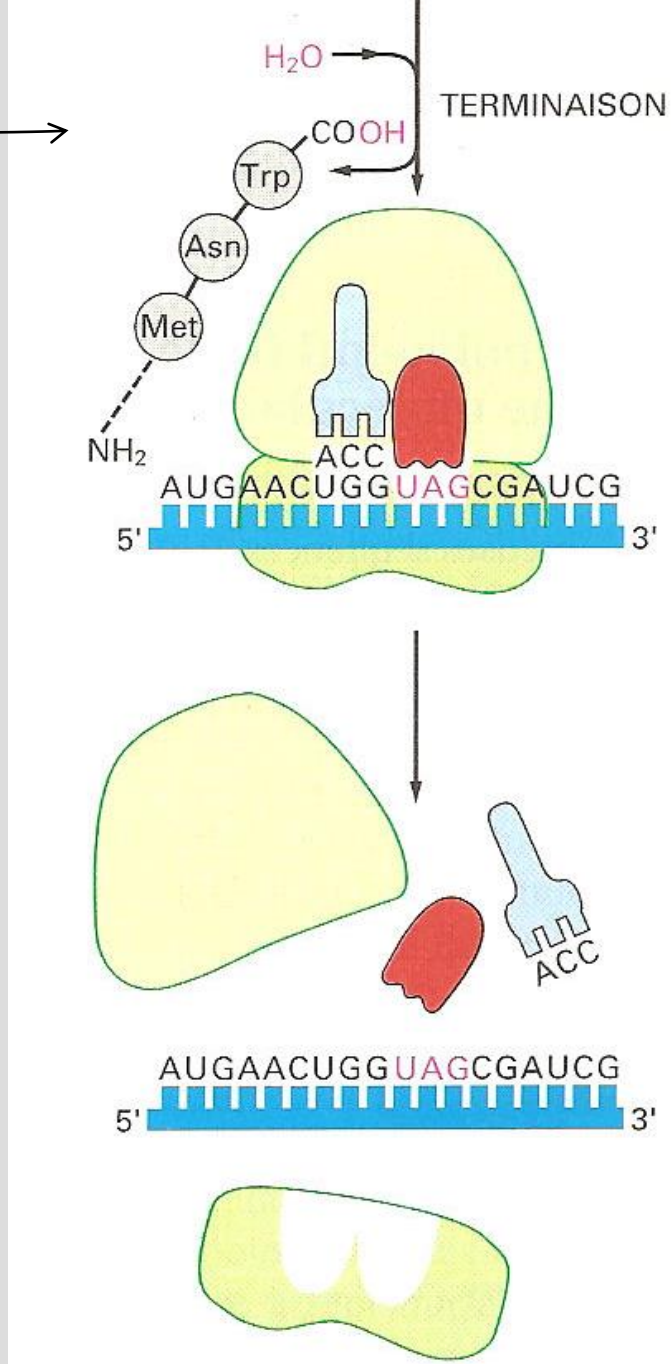
bacteria		eucaryotes	
wobble codon base	possible anticodon bases	wobble codon base	possible anticodon bases
U	A, G, or I	U	G or I
C	G or I	C	G or I
A	U or I	A	U
G	C or U	G	C

I : inosine, équivalent désaminé de la guanosine

Les codons UUU(5’-3’) et UUC de Phe sont tous les deux reconnus par l’ARNt dont l’anticodon est GAA (5’-3’).

source : Alberts

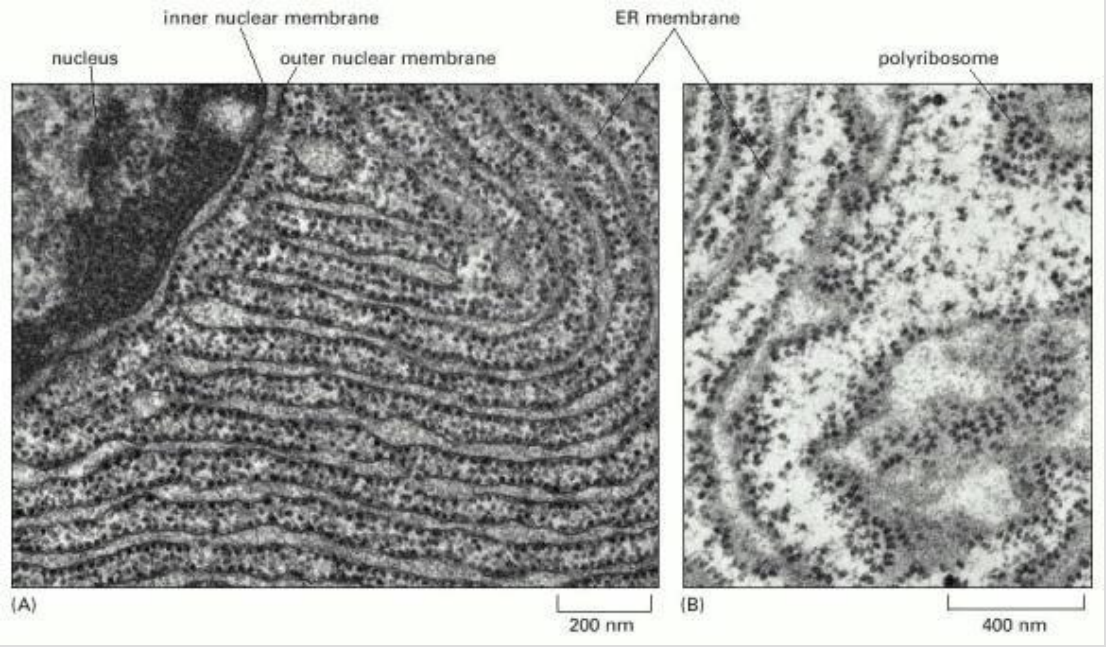




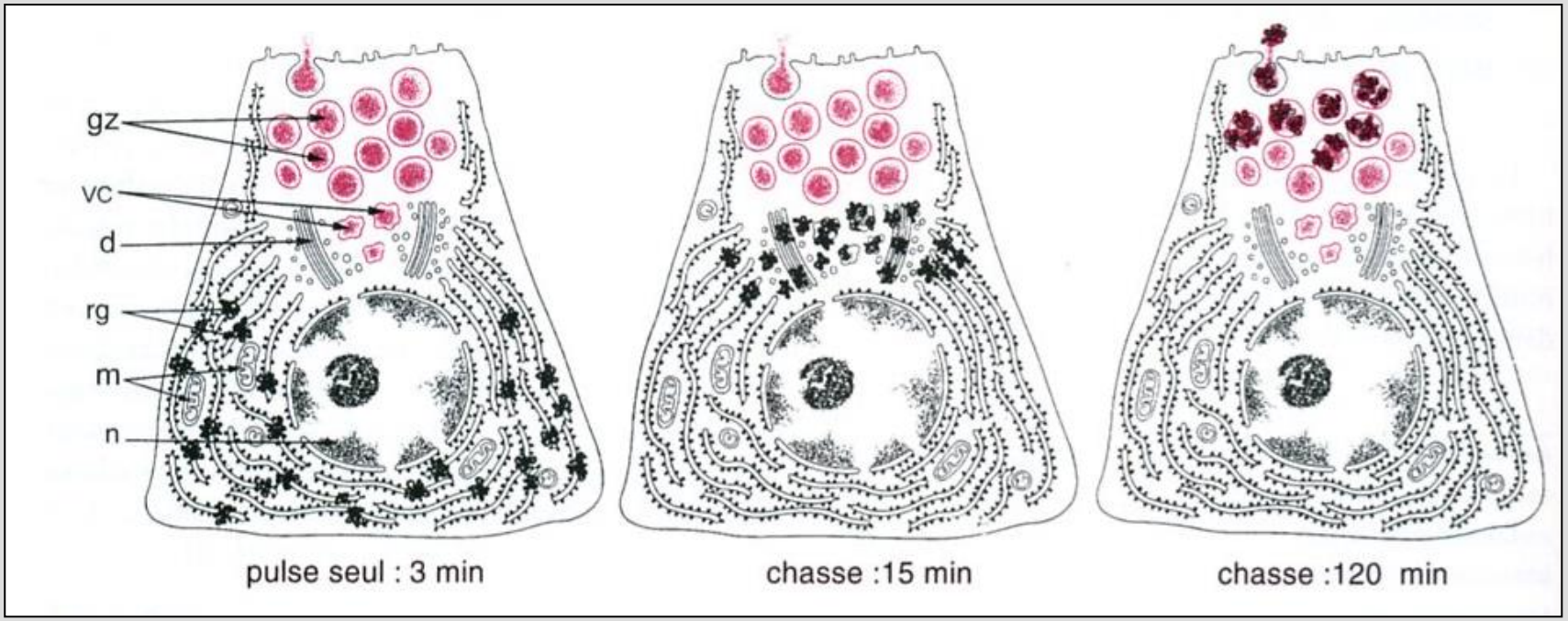
Document 10. La terminaison.

(ALBERTS B. et coll., “ Biologie moléculaire de la cellule ”, 3e edition, Médecine-Sciences - Flammarion Ed., 1998).

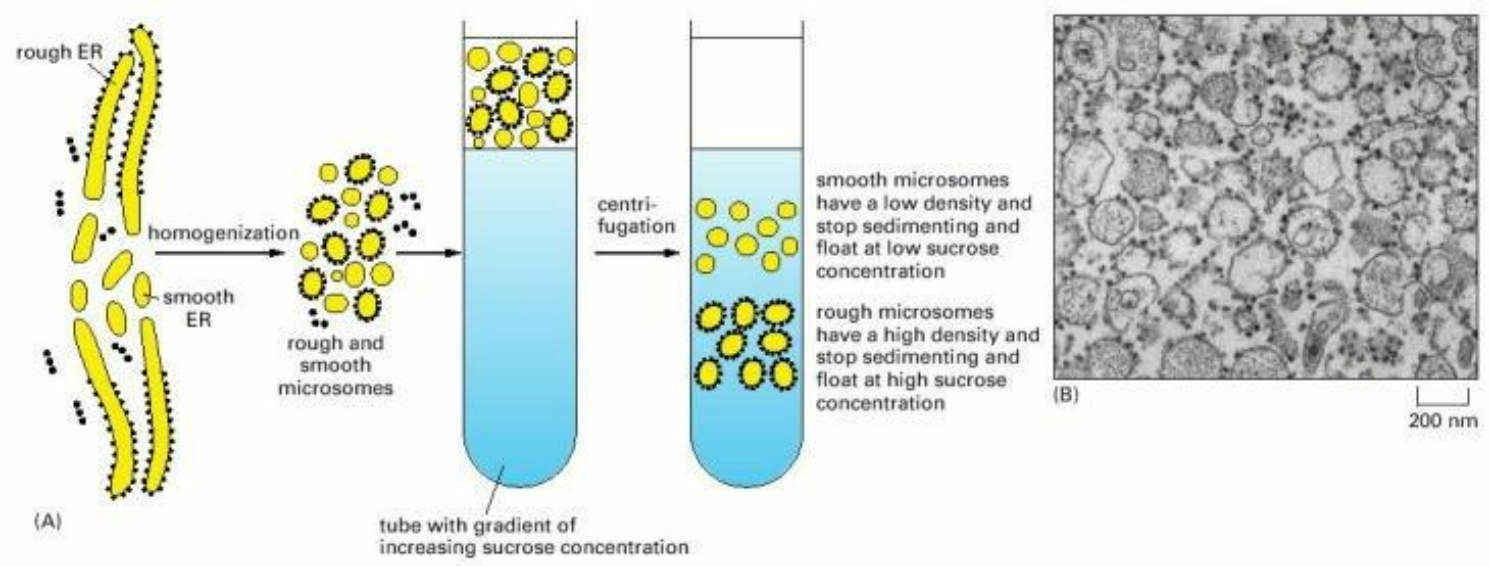
→ **Animation traduction**



Expérience de Palade : localisation de la synthèse protéique et devenir des protéines dans une cellule sécrétrice : la cellule acineuse pancréatique



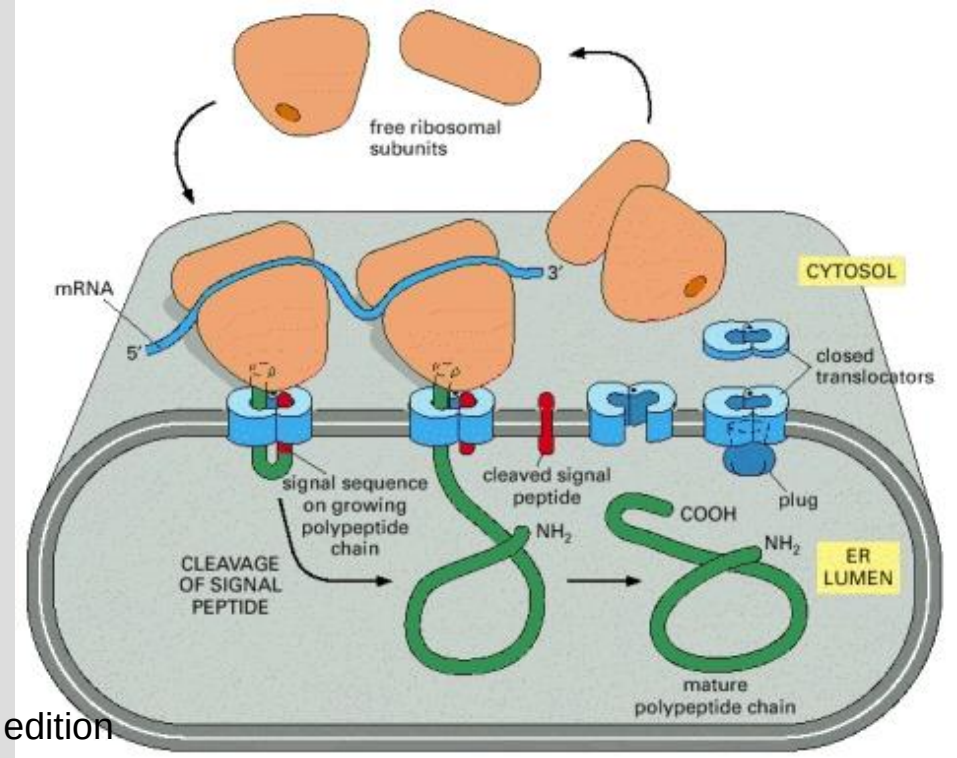
Obtention de microsomes



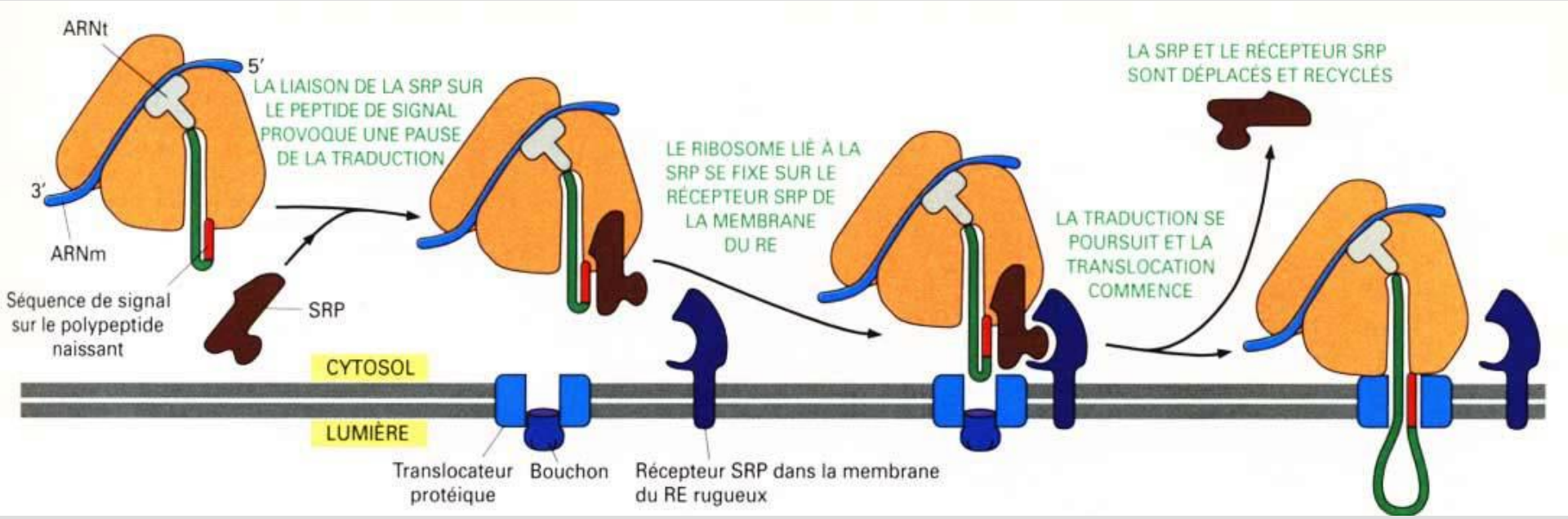
Expériences de traduction in vitro d'une protéine sécrétée :

→ Hypothèse du signal

- Sans microsomes → plus longue
- Avec microsomes → longueur normale
- Sans microsomes et ajout protéases → protéine dégradée
- Avec microsomes et ajout protéases → protéine intacte
- protéine dépourvue de signal + microsomes + protéases → protéine dégradée



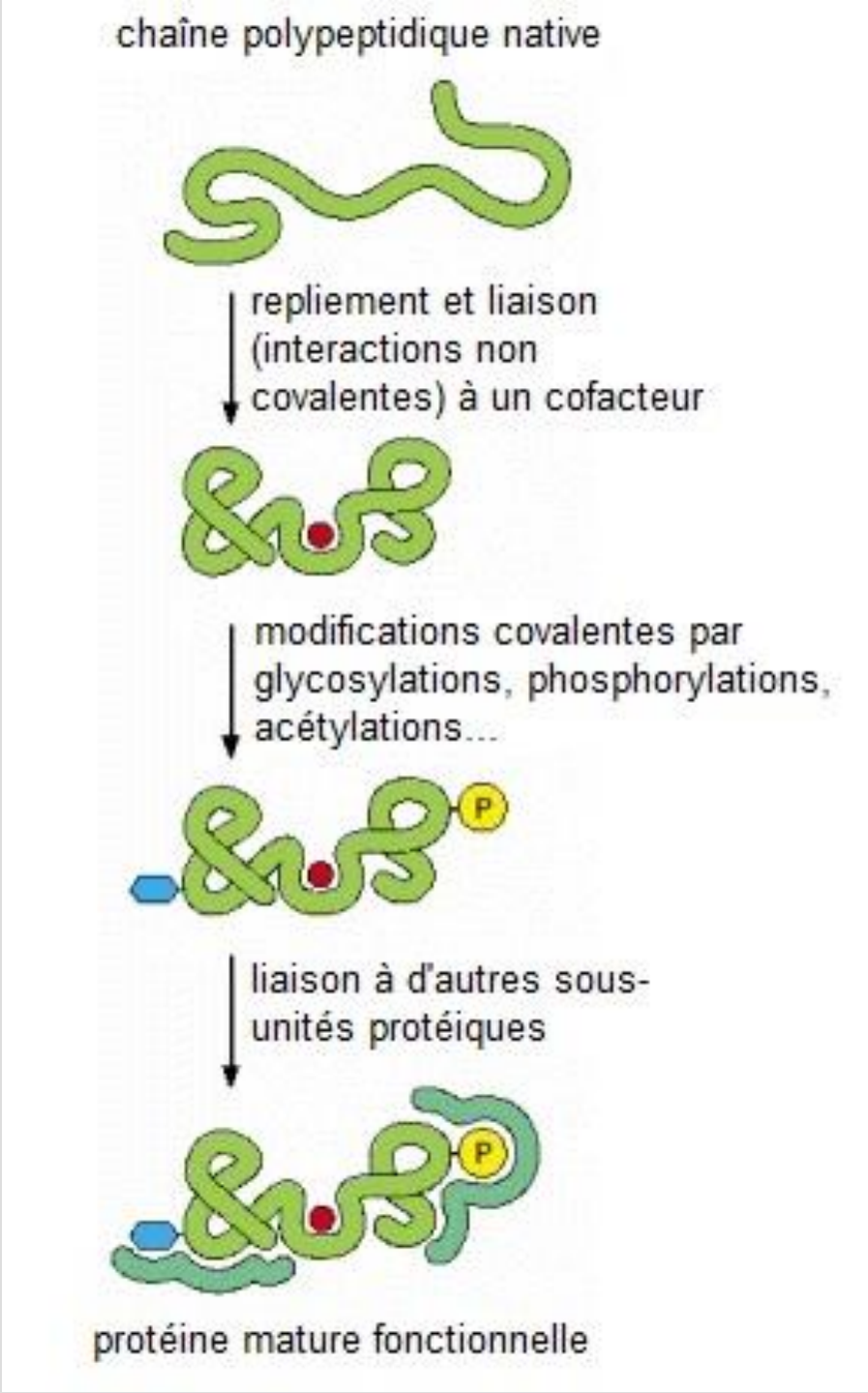
ALBERTS B. et coll., " Molecular Biology of the Cell ", 4e edition



Document 11. Modalités d'adressage au REG et translocation co-traductionnelle des protéines destinées aux membranes et à la sécrétion

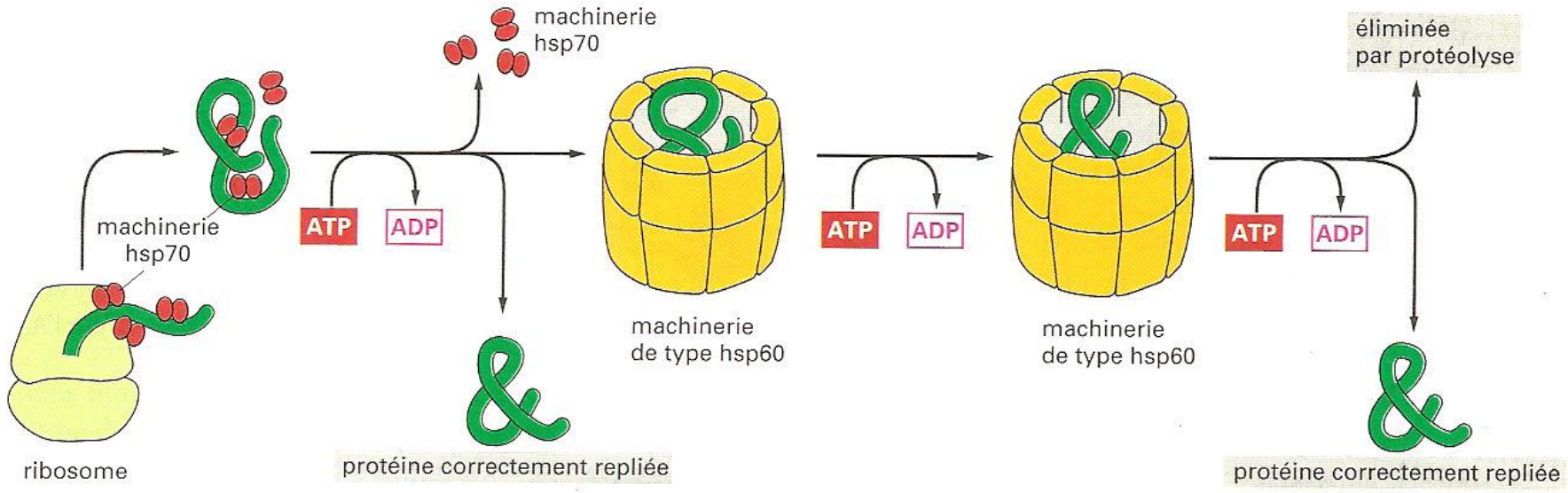
(ALBERTS B. et coll., " Biologie moléculaire de la cellule ", 4e edition)

Document 12. Modalités de maturation des protéines.



ALBERTS B. et coll., " Molecular Biology of the Cell ", 4e edition

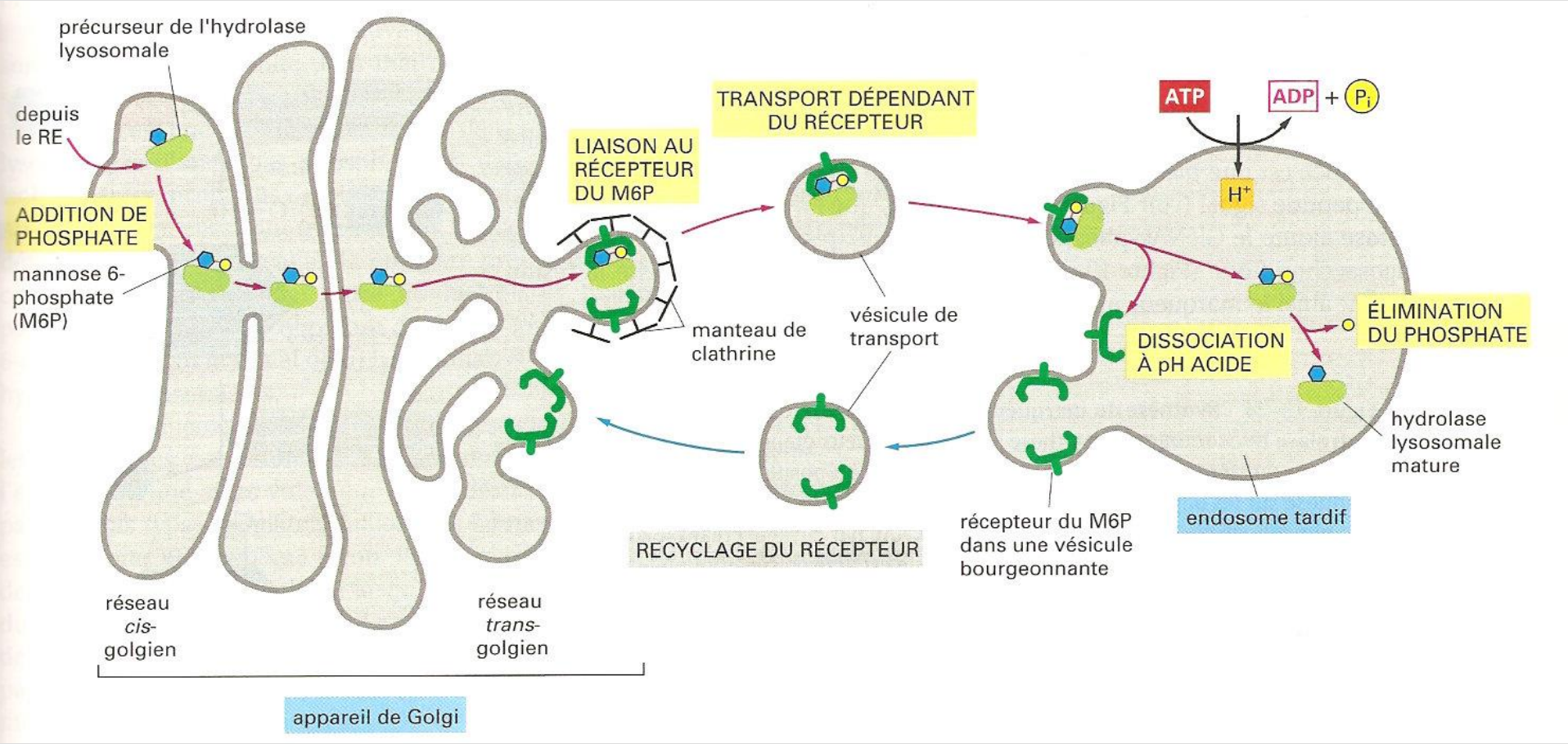
Document 13. Rôle des protéines chaperonnes hsp70 et hsp60.



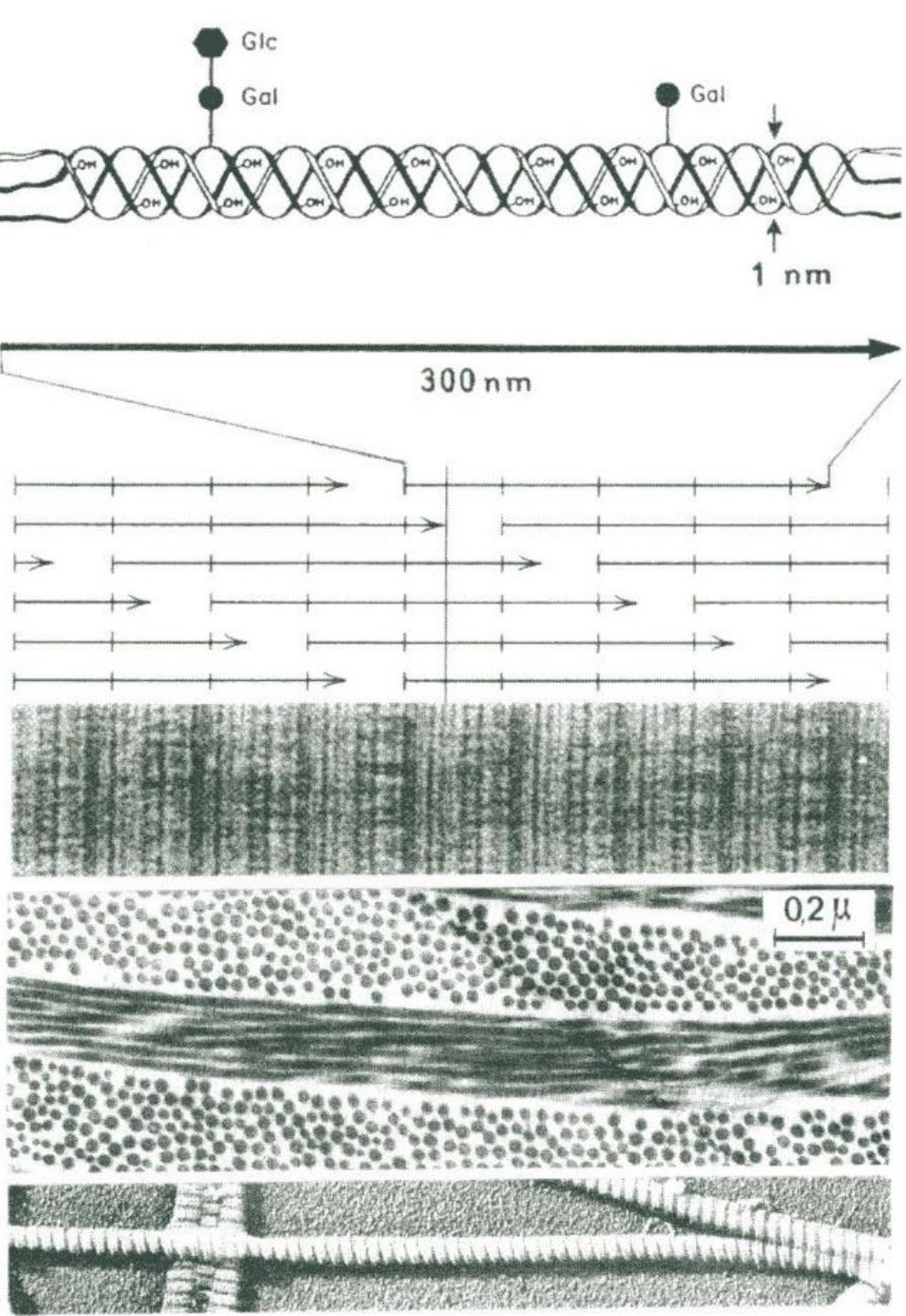
Les protéines hsp70 agissent précocement, en reconnaissant de petites régions à la surface de protéines. Les protéines hsp60 agissent ensuite sur les protéines qui n'ont pas réussi à se replier correctement. L'hydrolyse de l'ATP par les protéines hsp contribue à la liaison et à la libération des protéines et les aide à adopter leur conformation finale.

(ALBERTS B. et coll., " Biologie moléculaire de la cellule ", 3e edition)

Document 14. Transport des enzymes lysosomales vers les lysosomes.



(ALBERTS B. et coll., “ Biologie moléculaire de la cellule ”, 3e edition)



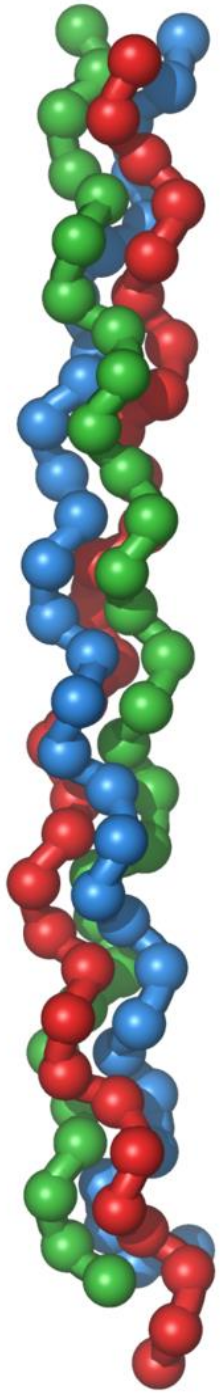
Organisation moléculaire et structure des fibres de collagène de type I.

Le collagène s'organise en fibres épaisses visibles en ME dans les tissus conjonctifs.

(CALLEN JC., " Biologie cellulaire : des molécules aux organismes " ; Dunod Ed., 1999).

Molécules de (tropo)collagène associées en fibrille

Fibrilles associées en fibres



Etapes de la synthèse du collagène

Etape 1 : excision du peptide signal.

Etape 2 : hydroxylation de plusieurs PRO et LYS, N-glycosylation du propeptide C-terminal, O-glycosylation de certaines hydroxyLYS.

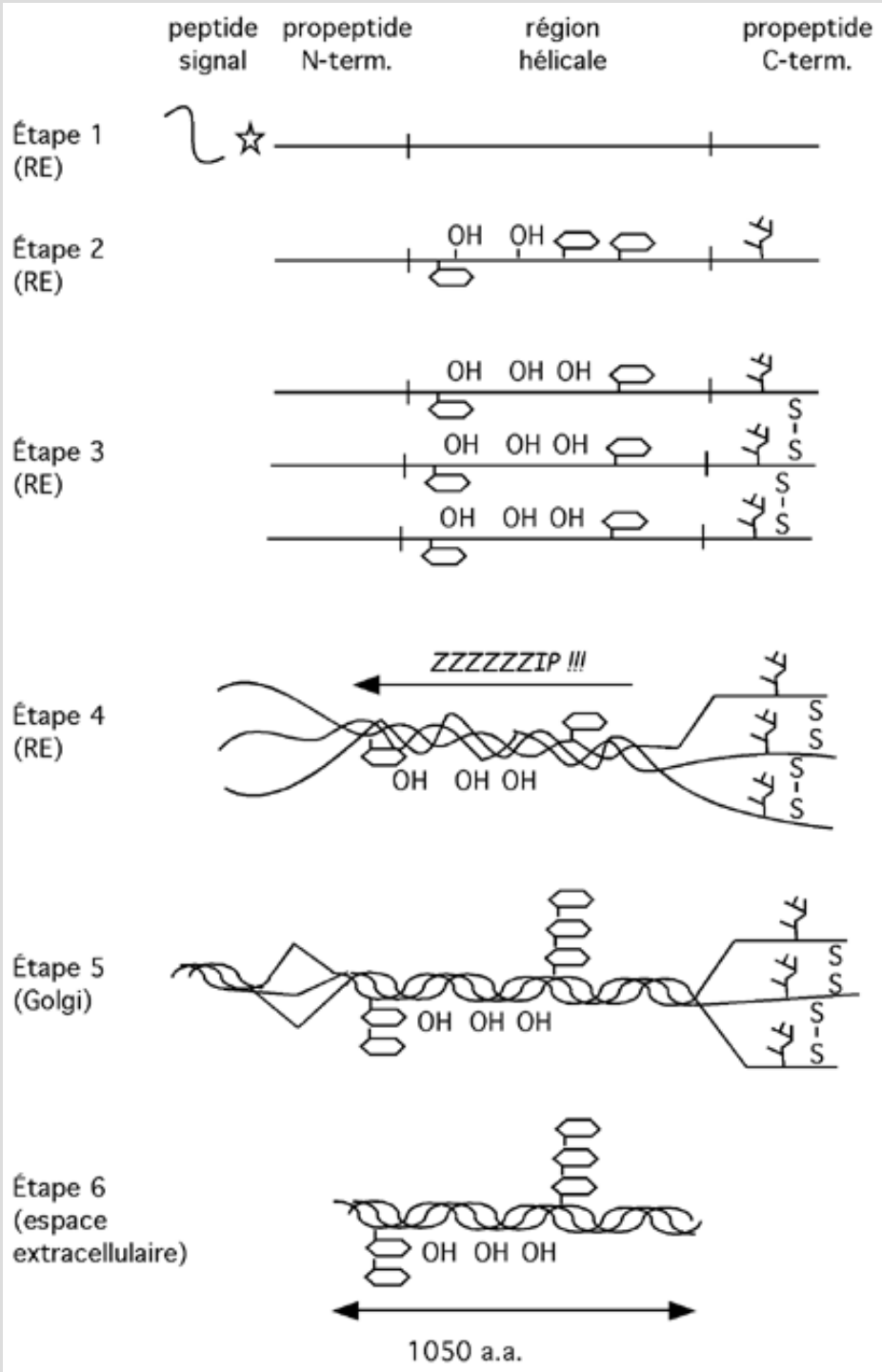
Etape 3 : alignement de trois chaînes grâce à des modifications + formation de ponts S-S entre propeptides C-terminaux.

Etape 4 : dans l'appareil de Golgi, enroulement de la triple hélice « comme une fermeture éclair » en direction du N-terminus.

Etape 5 : suite de la maturation, puis exocytose.

Etape 6 : des procollagène-peptidases ont clivé les propeptides terminaux, libérant une triple hélice mature de tropocollagène.

http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3f.html



<u>Document 15</u>. Maturation dans le REG puis l'appareil de Golgi : exemple de la biosynthèse et de l'acheminement du collagène.

REG
Synthèse protéique (ribosomes) → **prochaîne α** de collagène
Hydroxylations proline et lysine (hydroxylases)
Glycosylations (glycosyltrasnférases)

↓

Appareil de Golgi :
Auto-assemblage des prochaînes en triple hélice (liaisons H) = **procollagène**
Glycosylations (glycosyltransférases)

↓

Vésicules golgiennes :
Transport et exocytose du procollagène

ETAPES INTRA-CELLULAIRES (fibroblaste)

← **Membrane plasmique**

↓

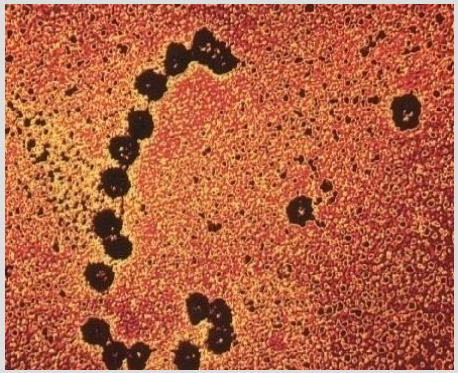
Clivage des extrémités terminales du procollagène = **tropocollagène** (protéases)

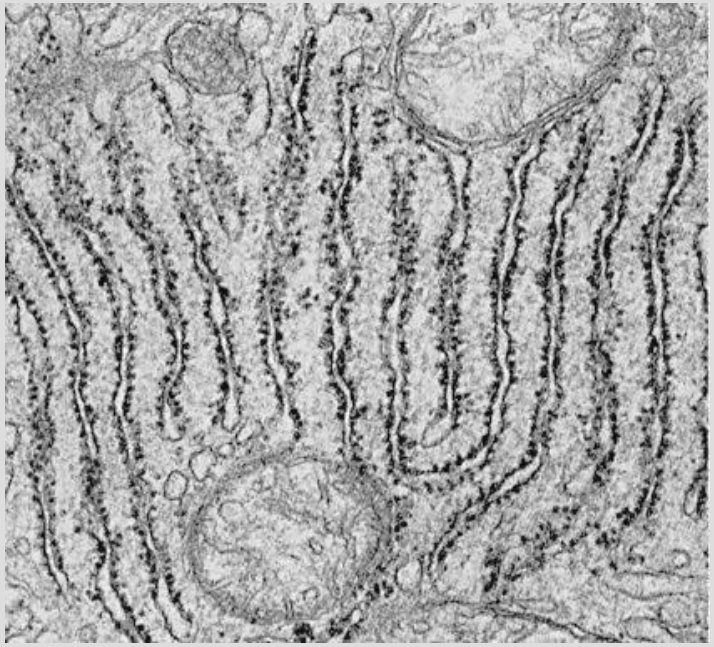
↓

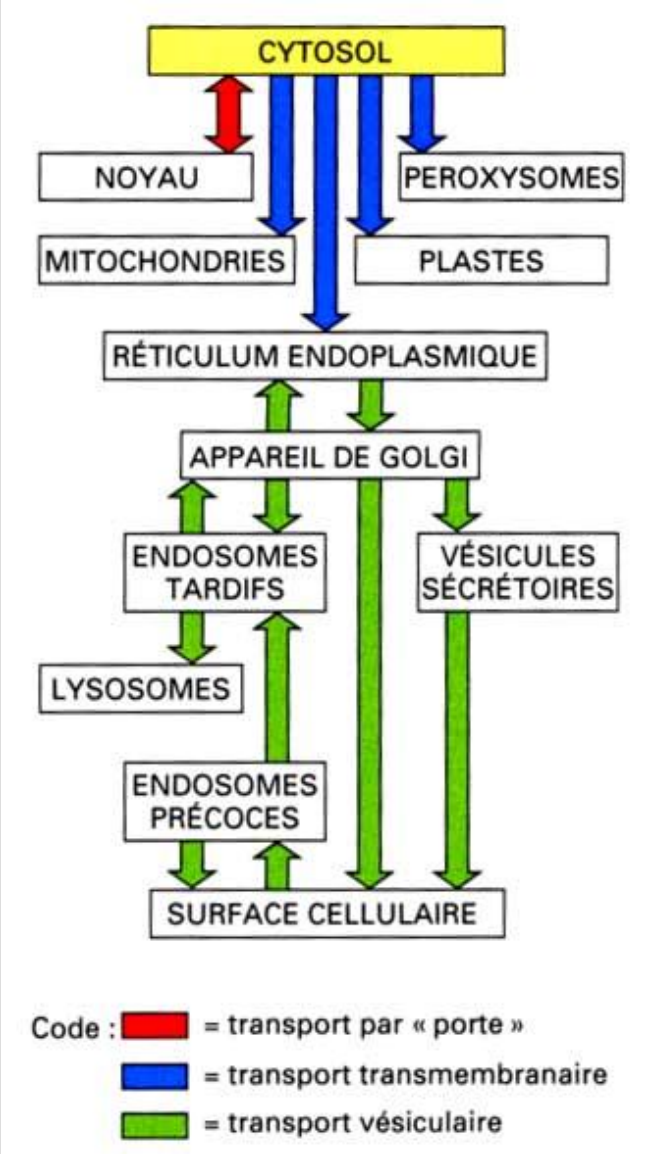
Auto-assemblage du tropocollagène (liaisons covalentes)

ETAPES EXTRA-CELLULAIRES (matrice)

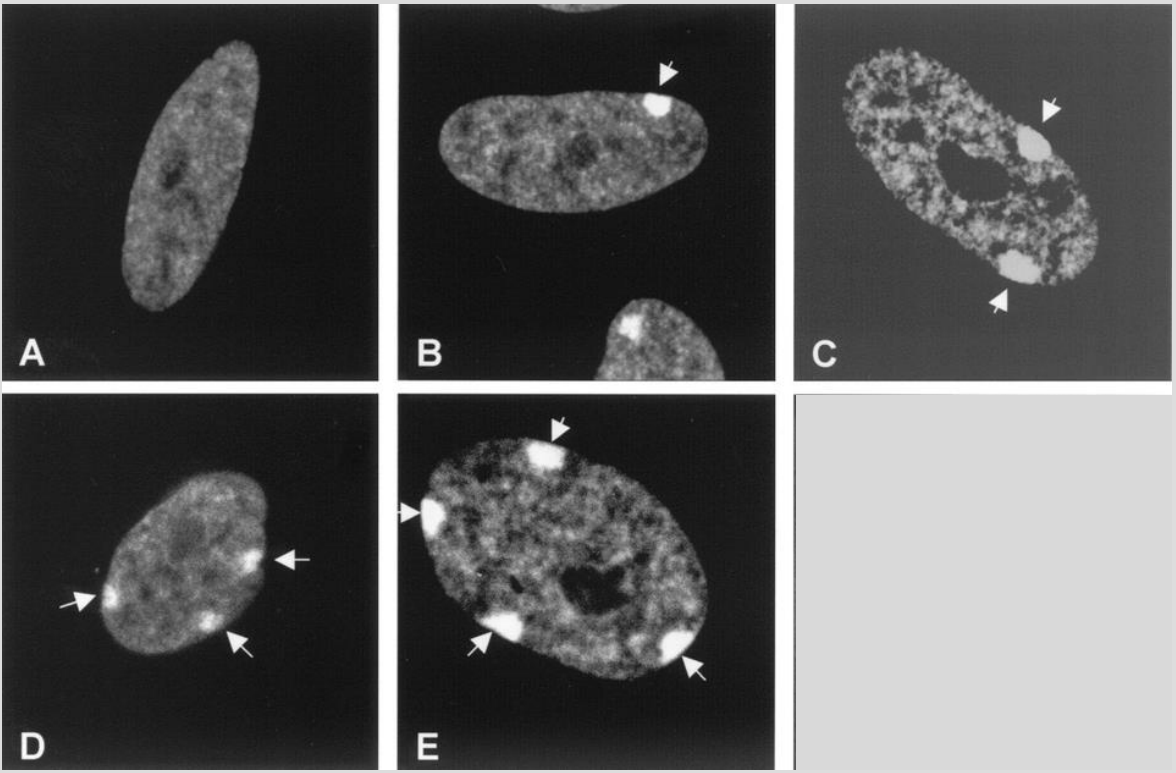
Document 16. Des lieux de synthèse des protéines vers leur lieu de fonctionnement.







Mise en évidence du corpuscule de Barr par immunofluorescence



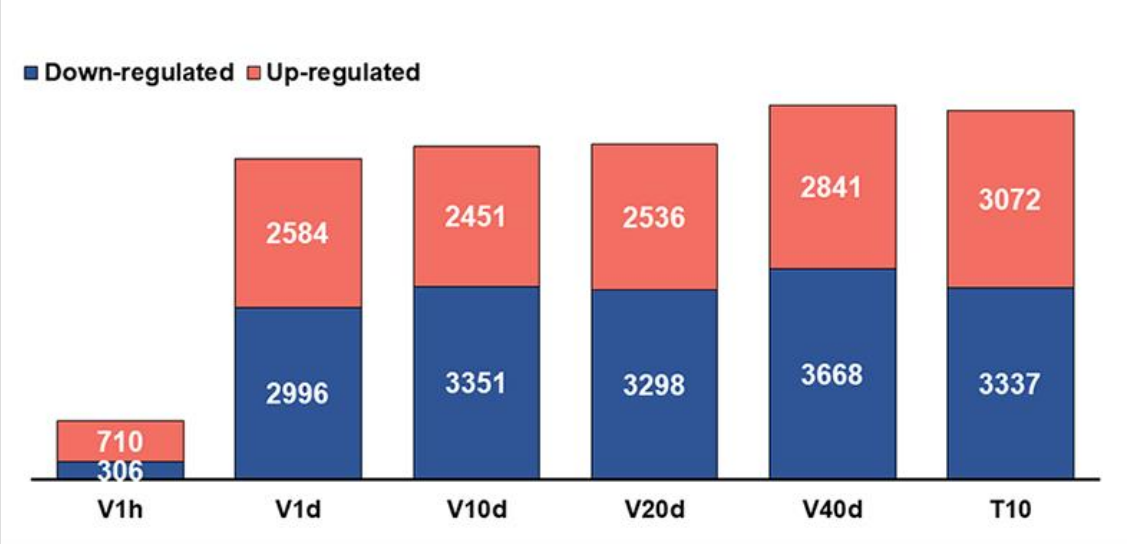
Les cellules utilisées sont des fibroblastes humains au caryotype atypique, contenant un nombre variable de chromosomes X :

A : 46 chromosomes dont XY, 0 cb;
B : 46 chromosomes dont XX, 1 cb;
C : 47 chromosomes dont XXX, 2 cb;
D : 48 chromosomes dont XXXX, 3 cb;
E : 49 chromosomes dont XXXXX, 4 cb.

Présent dans le noyau des cellules des femelles de Mammifères, le corpuscule de Barr a été découvert en 1948 par le Docteur Barr. Il est localisé contre la face interne de l'enveloppe nucléaire. C'est de l'hétérochromatine qui correspond à l'un des deux chromosomes X inactivé, indifféremment d'origine maternelle ou paternelle.

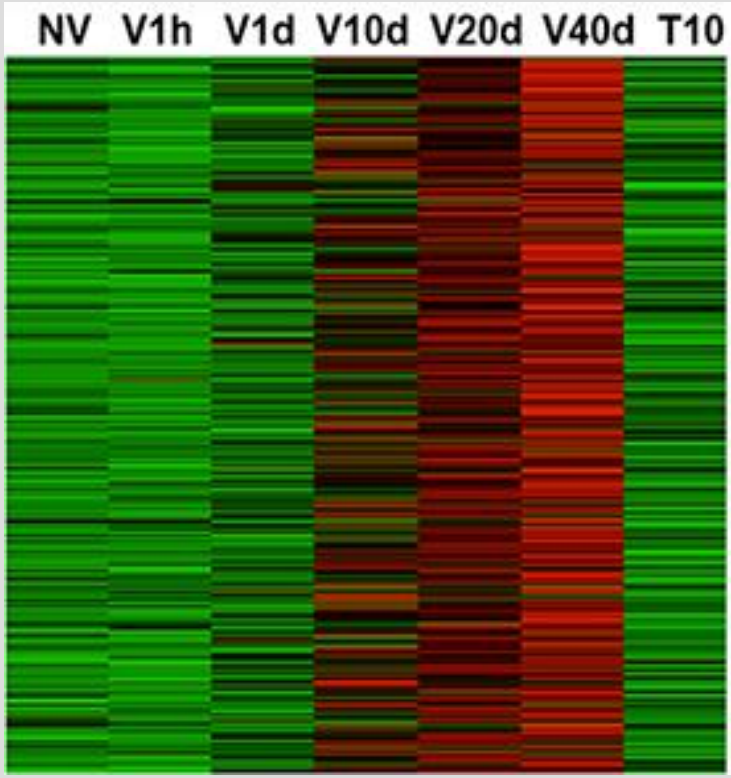
http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/kx/kx.htm

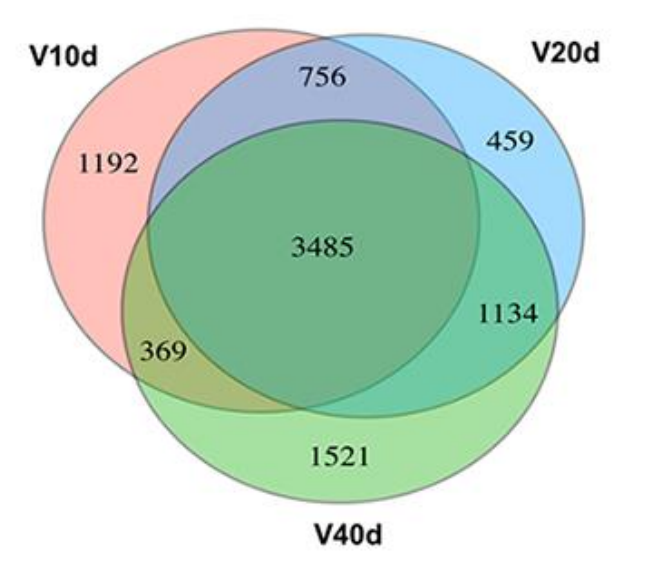
Effets de la vernalisation sur l'expression du génome d'*Arabidopsis thaliana*



Nombre de gènes dont le niveau d'expression change à la suite d'une exposition au froid, selon la durée de cette exposition.

Etude de l'expression d'un groupe de gènes en particulier.
En vert : sous-expression
En rouge : sur-expression

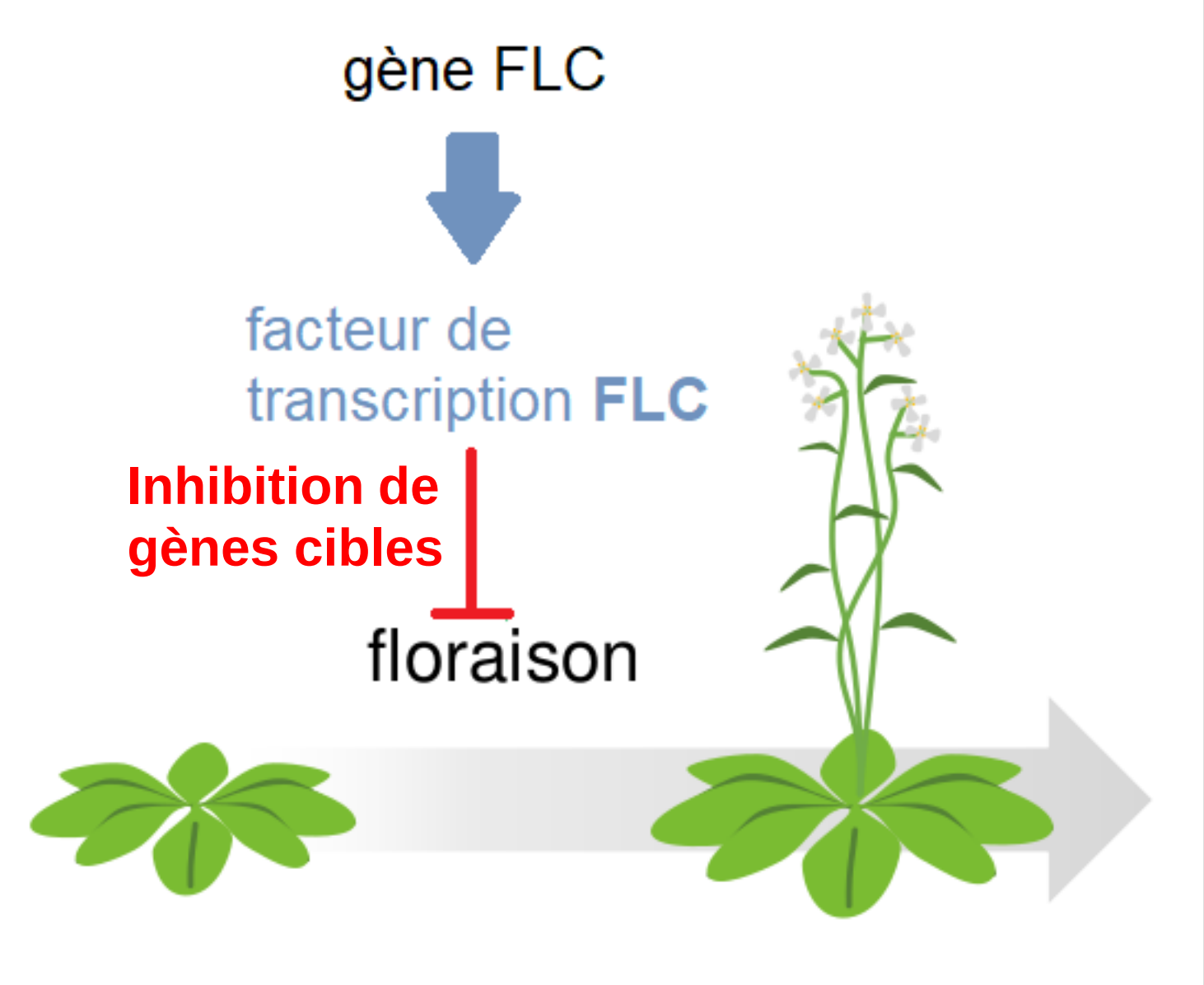




Nombre de gènes exprimés et co-exprimés pour 10 j, 20 j ou 40 j d'exposition au froid.

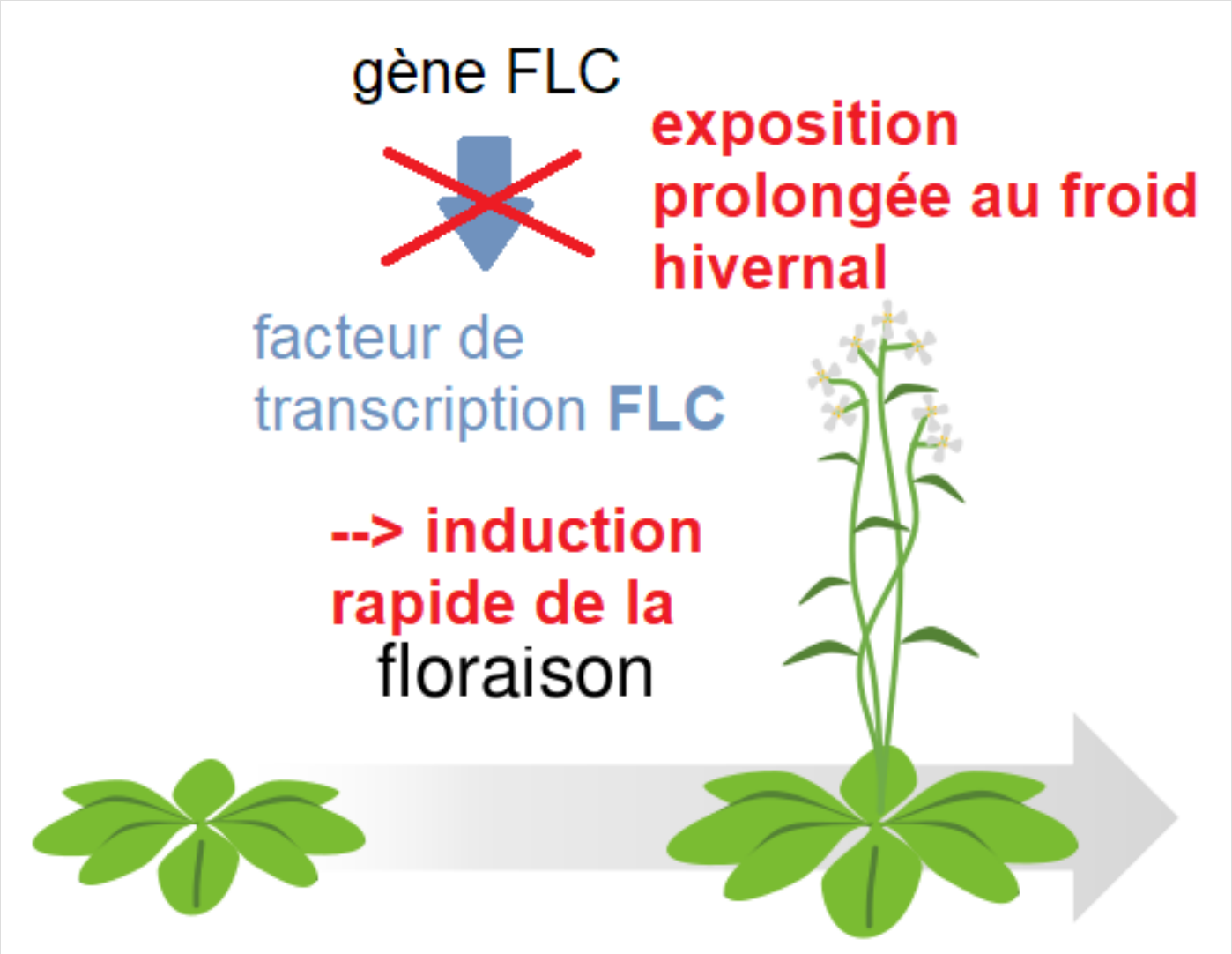
Transcriptome and epigenome analyses of vernalization in *Arabidopsis thaliana* Y. Xi et al. Plant J. 2020 August ; 103(4): 1490–1502.

Effets de FLC sur la floraison d'*Arabidopsis thaliana*

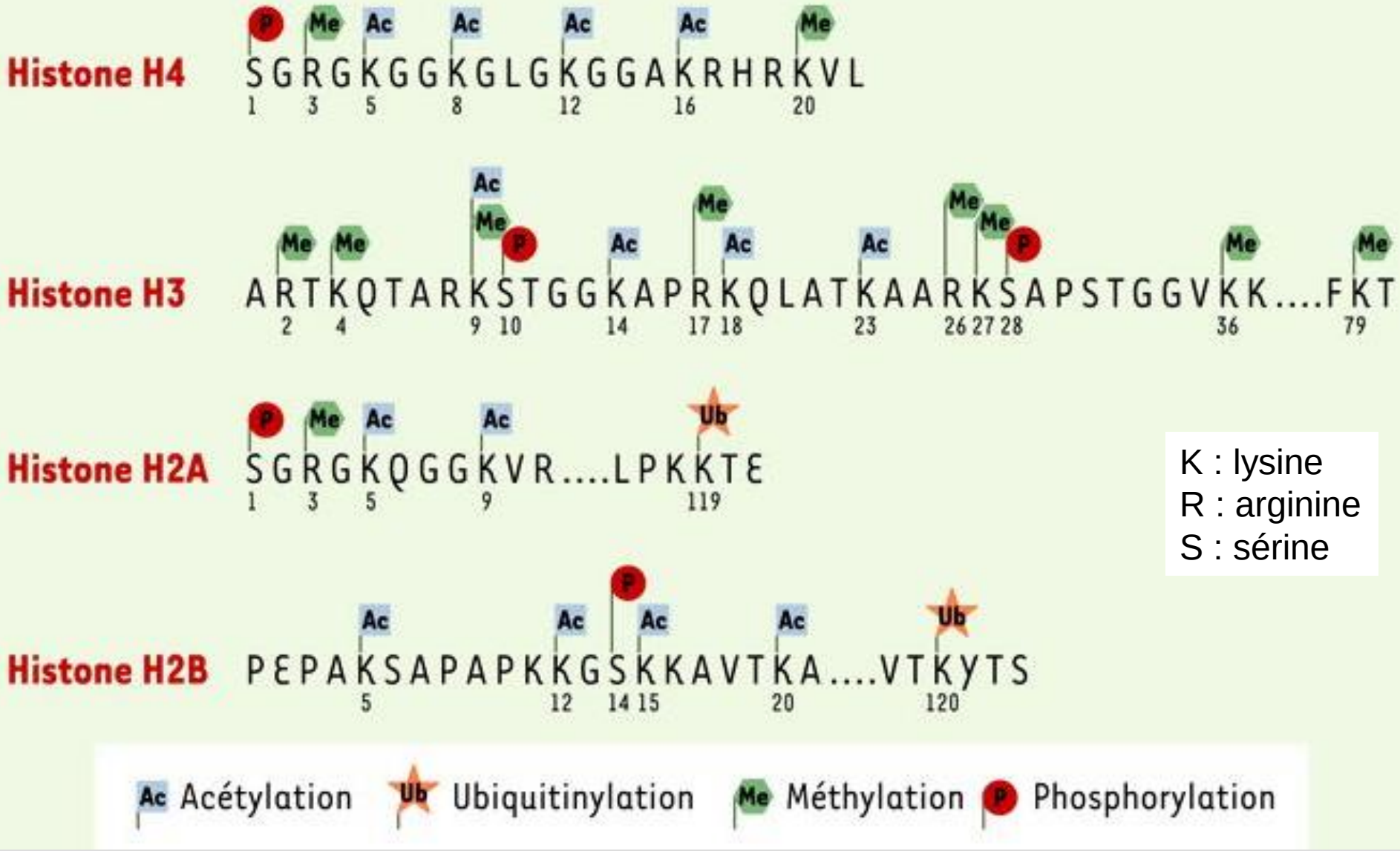


D'après https://planet-vie.ens.fr/thematiques/developpement/controle-du-developpement/comprendre-le-role-de-la-chromatine-dans-la

Inhibition de l'expression de FLC



- **transmise aux cellules filles par mitose**
- **levée lors de la méiose**

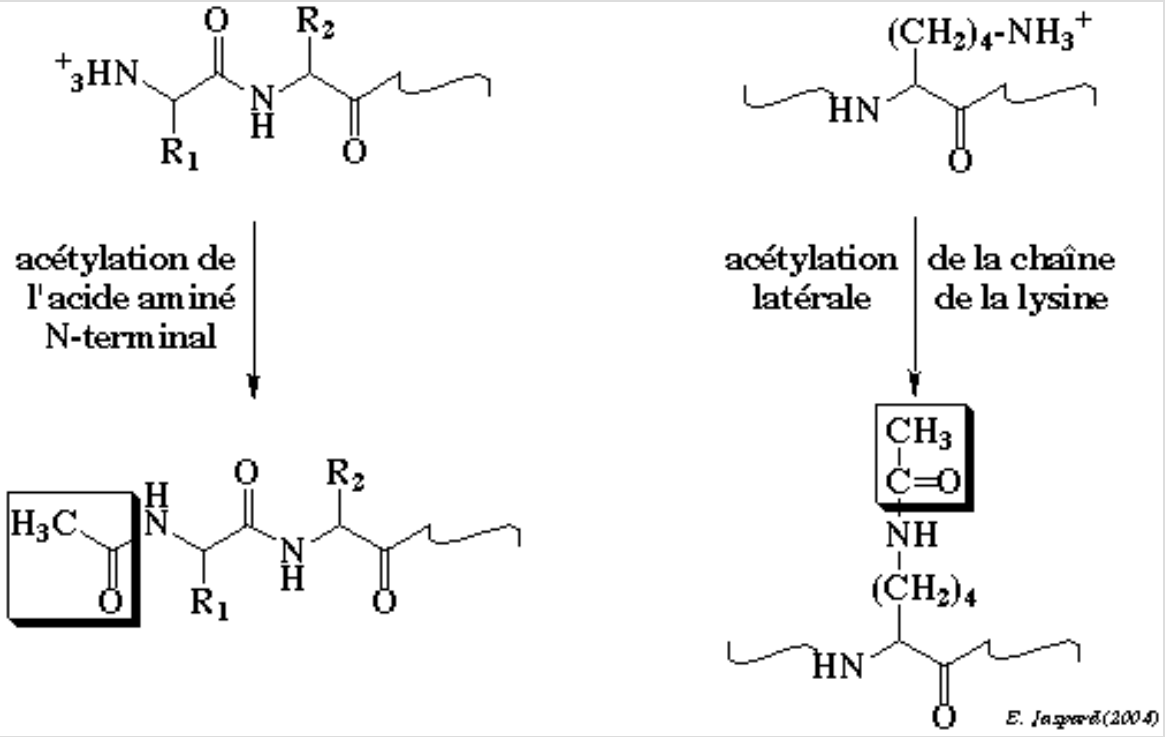


Les modifications post-traductionnelles des histones

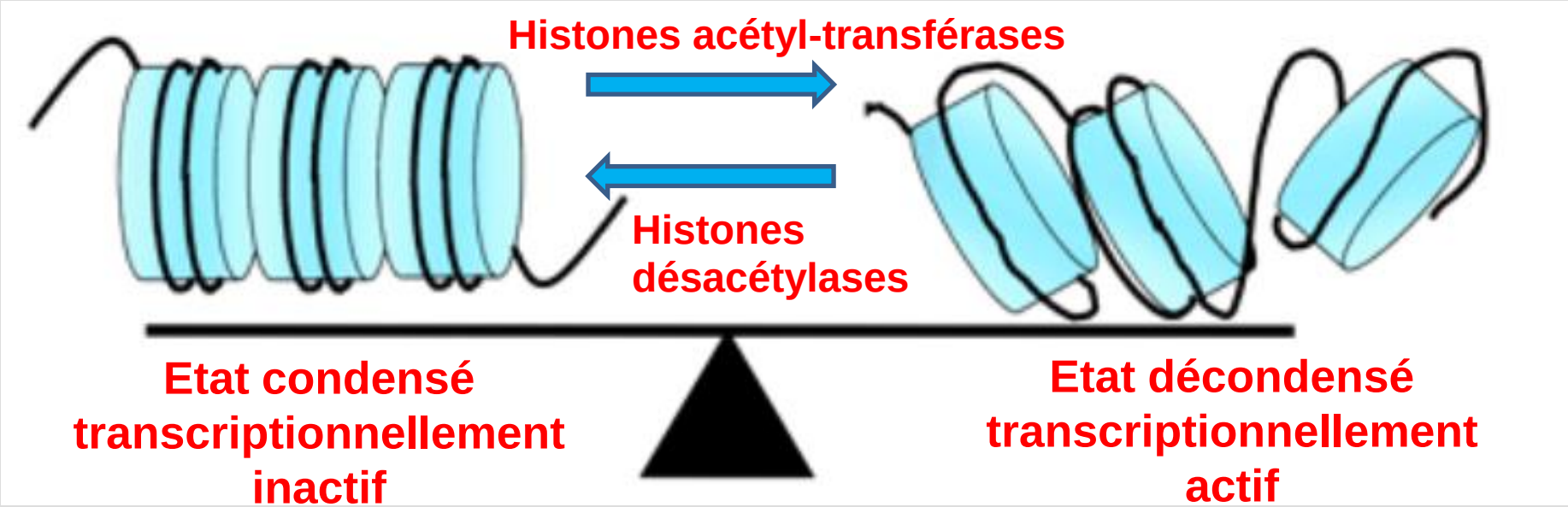
La lysine 9 de l'histone H3 peut être soit acétylée, soit méthylée.

N. Lacoste, J. Côté, M/S : médecine sciences Vol 19, n°10, oct 2003, p. 955-959

http://www.erudit.org/revue/ms/2003/v19/n10/007166ar.html

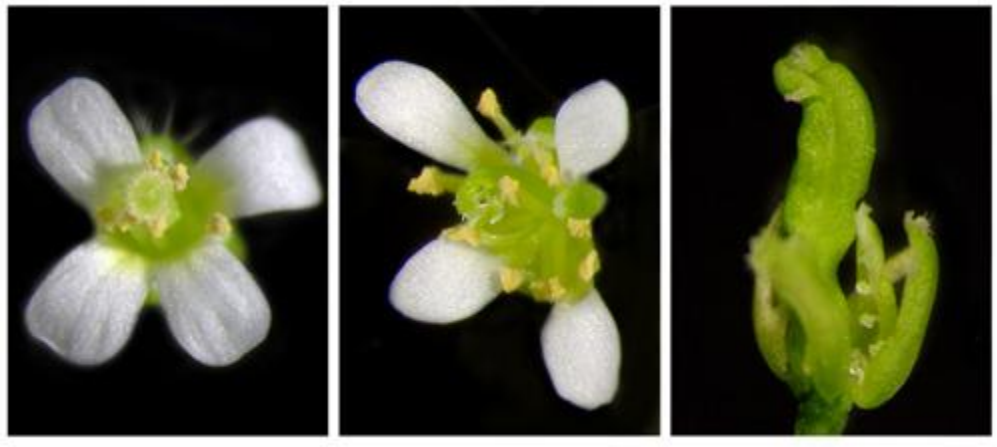


L'acétylation / désacétylation des histones

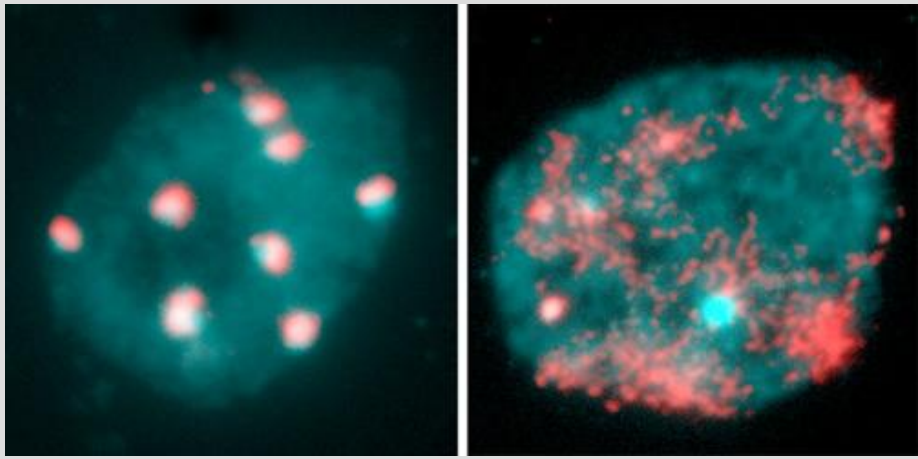


http://mon.univ-montp2.fr/claroline

Effets de l’absence de méthylation CG



Effets de l’absence de méthylation CG sur des fleurs d’Arabidopsis thaliana.
A gauche : fleur sauvage.
Au milieu : l’absence de la méthylation CG conduit notamment à la formation d’étamines supplémentaires toutefois ces plantes restent fertiles.
A droite : dans des mutants déficients pour les mécanismes de sauvetage déclenchés en l’absence de méthylation CG, l’organisation florale est profondément bouleversée et ces plantes sont totalement stériles .



Effets de l’absence de méthylation CG sur la structure de noyaux de cellules de feuille d’A. thaliana.
A gauche :architecture habituelle, les séquences hétérochromatiques (en rouge) sont compactées.
A droite : forte relaxation de l’hétérochromatine consécutive à l’absence de méthylation CG pendant plusieurs générations successives.

http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles07/olivier-mathieu.htm

La méthylation de l ’ADN est contrôlée

Comment l’abeille devient reine

On comprend pourquoi la gelée royale fait que certaines larves deviennent des reines et d’autres des ouvrières.

De grande taille, lente à se mouvoir, la reine d’une colonie d’abeilles passe l’essentiel de sa vie – quatre à cinq ans – à pondre, choyée par sa cour. Les ouvrières, au contraire, petites, agiles et stériles ne vivent que quelques semaines. Pourtant, la reine et les ouvrières sont génétiquement identiques. Comment un même génome peut-il produire des individus si différents ? Une équipe germano-australienne vient d’éclairer les mécanismes moléculaires en jeu.

On savait l’alimentation en jeu : les larves élevées comme de futures reines et la reine survivante (après avoir éliminé ses rivales) sont nourries exclusivement de gelée royale. Les autres larves, qui deviendront des ouvrières, sont nourries surtout de miel et de pollen.

En 2008, l’équipe de Sylvain Forêt et Ryszard Maleszka, de l’Université de Canberra, en Australie, a montré que la suppression d’une enzyme, l’ADN méthyltransférase, chez des larves nourries pour devenir ouvrières, fait qu’elles se développent en reines fécondes : supprimer cette enzyme a le même effet que la gelée royale. Cette enzyme étant nécessaire à la méthylation de l’ADN, c’est-à-dire à l’ajout de groupes méthyle sur certaines bases (des cytosines) de l’ADN, la gelée royale apporte vraisemblablement des substances inhibant ce processus, dit épigénétique.

Supposant que les gènes ne s’expriment pas de la même façon chez la reine et les ouvrières, ces biologistes associés à un groupe du Centre allemand de recherche sur le cancer, à Heidelberg, ont séquencé les génomes de reines et d’ouvrières et identifié tous les sites méthylés de l’ADN. Ils ont observé que quelque 560 gènes étaient méthylés différemment. La méthylation paraît réguler le type et la quantité des protéines produites chez une reine et chez une ouvrière.

Comment les enzymes de méthylation repèrent-elles les cytosines cibles parmi les dix millions de sites possibles chez l’abeille ? On l’ignore, mais un mécanisme expliquant les différences entre reines et ouvrières se dessine : la présence ou l’absence de gelée royale détermine différents profils de méthylation de leur ADN. En ajustant l’expression de certains gènes, ces profils donnent lieu à des caractéristiques anatomiques, physiologiques et comportementales distinctes.

➜ Jean-Jacques Perrier

F. Lyko et al., PLoS Biology, vol. 8, e1000506, 2010

Une reine et sa cour.

© Pour la Science - n° 398 - Décembre 2010

La gelée royale contient des substances qui inhibent la méthylation de certains gènes : la larve se développe en reine

L’alimentation du père entraîne des variations de la méthylation de gènes dans les spermatozoïdes, ce qui exerce des effets dans la génération suivante

Pères gras, filles diabétiques ?

L’empreinte de l’environnement sur les gènes se transmettrait des pères à leurs filles.

Chez l’animal, des mères obèses durant la gestation et la lactation enfantent plus souvent que la normale des petits atteints eux-mêmes d’obésité ou de maladies métaboliques à l’âge adulte. Le surpoids des pères a-t-il aussi un effet sur la descendance ? Probablement, montre l’équipe de Margaret Morris, de l’Université des Nouvelles Galles du Sud, à Sydney : des femelles de rats sont plus souvent atteintes de diabète si leur géniteur a été nourri trop grassement.

Les chercheurs australiens ont soumis neuf rats mâles à un régime hypergras dès leur quatrième semaine, et huit rats contrôles à un régime normal, puis les ont mis chacun en présence d’une femelle nourrie normalement, pour qu’ils se reproduisent. Les descendants femelles ainsi obtenus ont présenté, à partir de quatre semaines, deux signes de diabète dont l’intensité a augmenté avec l’âge. La cause en était la réduction du volume des îlots de Langerhans, qui, dans le pancréas, produisent l’insuline. De plus, l’expression de plusieurs centaines de gènes y était anormale.

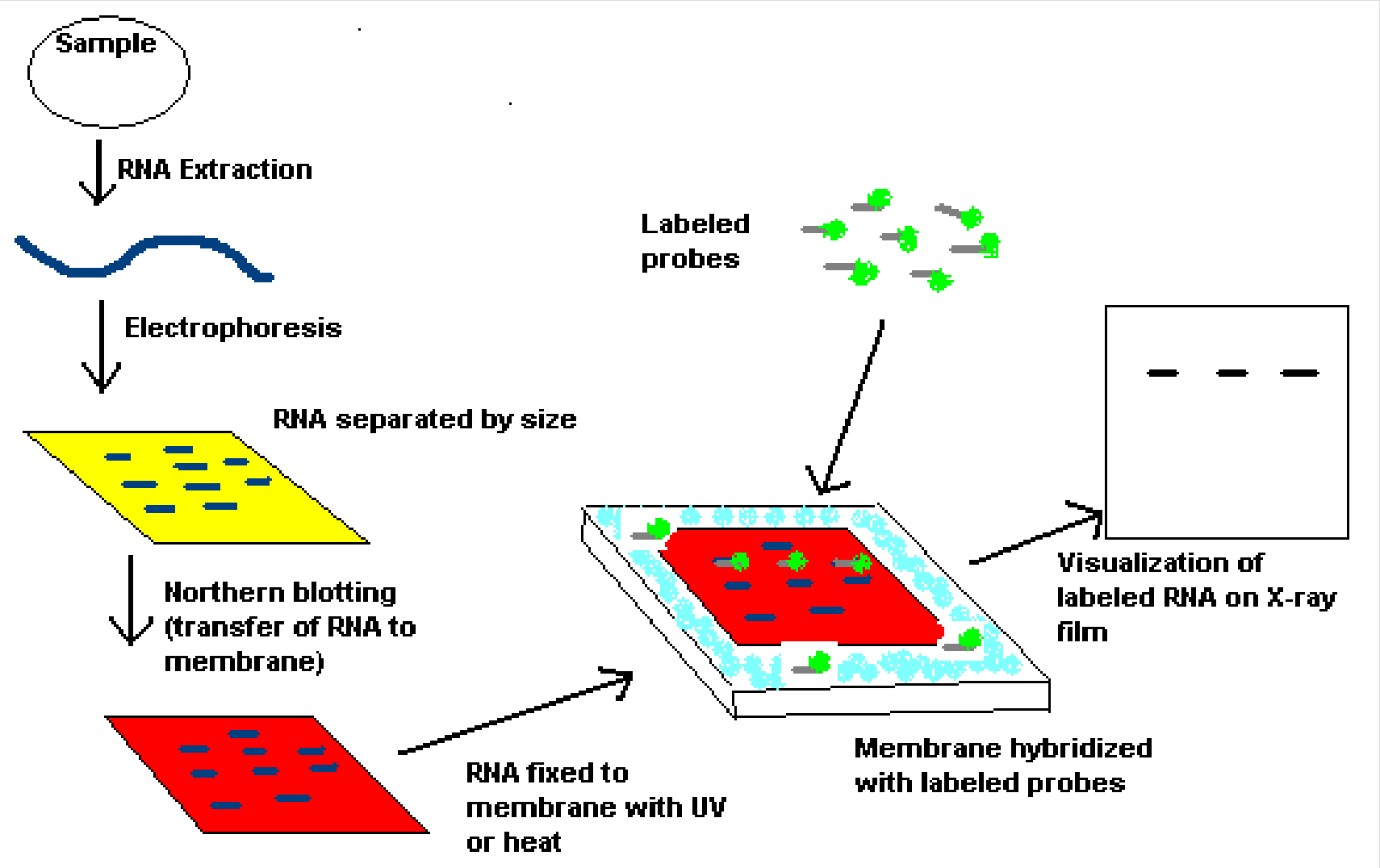
Ces résultats suggèrent que des changements chimiques, dits épigénétiques, sont intervenus dans l’ADN des spermatozoïdes des pères : des variations de la méthylation de l’ADN (la fixation de groupes méthyle en différents sites de la molécule), qui perturbent l’expression de certains gènes. Ainsi, en modifiant l’expression des gènes paternels, l’alimentation exercerait des effets d’une génération de rats à la suivante. Chez l’homme, il est vraisemblable que des facteurs liés au mode de vie influent aussi sur la régulation épigénétique et l’expression des gènes.

➜ J.-J. P.

S.-F. Ng et al., Nature, vol. 467, pp. 963-967, 2010

© Pour la Science - n° 398 - Décembre 2010

Technique de Northern blot ou transfert d'ARN

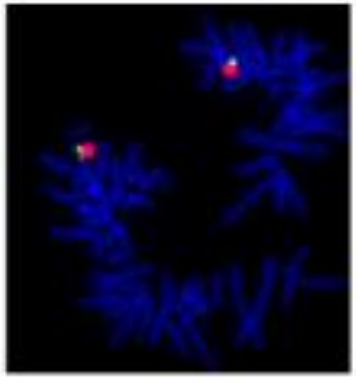


Elle consiste à transférer les molécules à analyser sur un support solide (par exemple, une membrane de nitrocellulose ou de nylon) puis à utiliser une sonde spécifique ARN de la cible recherchée.

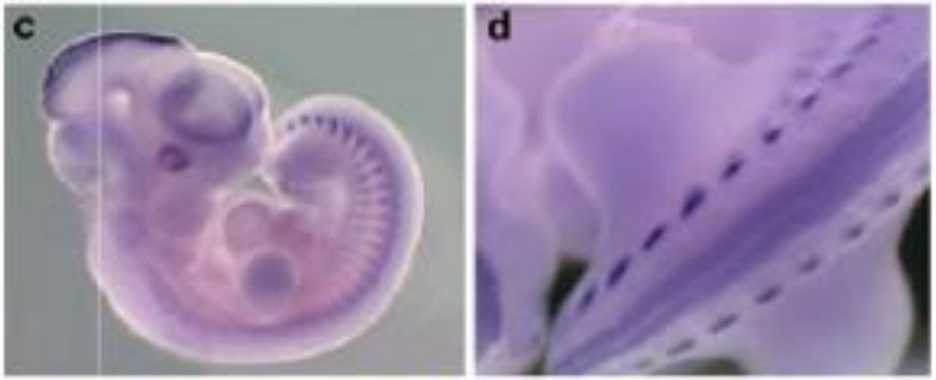
Définition de l'hybridation *in situ*

= révélation *in situ* d'une séq. d'acide nucléique dans une cellule

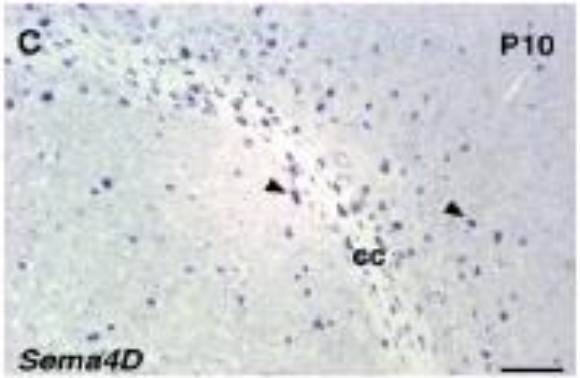
L'HIS consiste à repérer donc identifier et localiser une portion ± grande d'un acide nucléique.



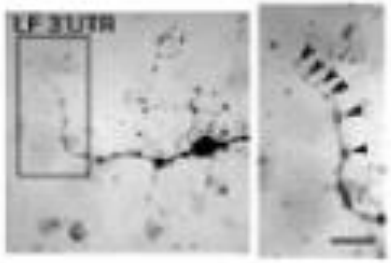
Chromosomes Interphasiques (FISH)



Un organisme entier de petite taille



Une préparation histologique



Cellules en culture

Présence d'ARNm témoignant de la transcription du gène correspondant

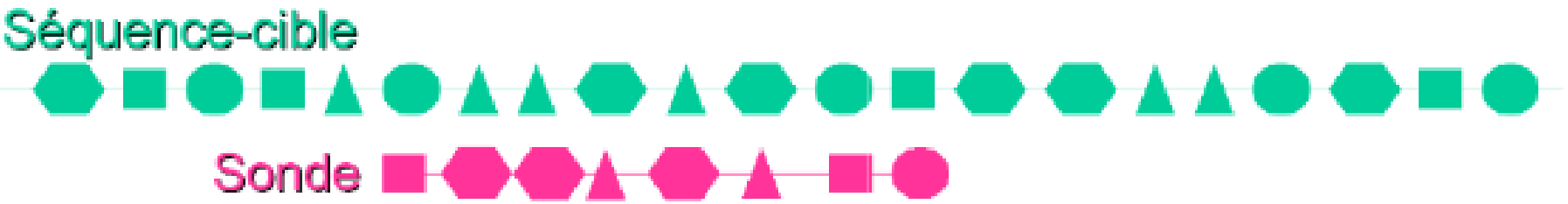
http://www.snv.jussieu.fr/~wboudier/ens/cours/cours-HIS.pdf

Principe de l'HIS:

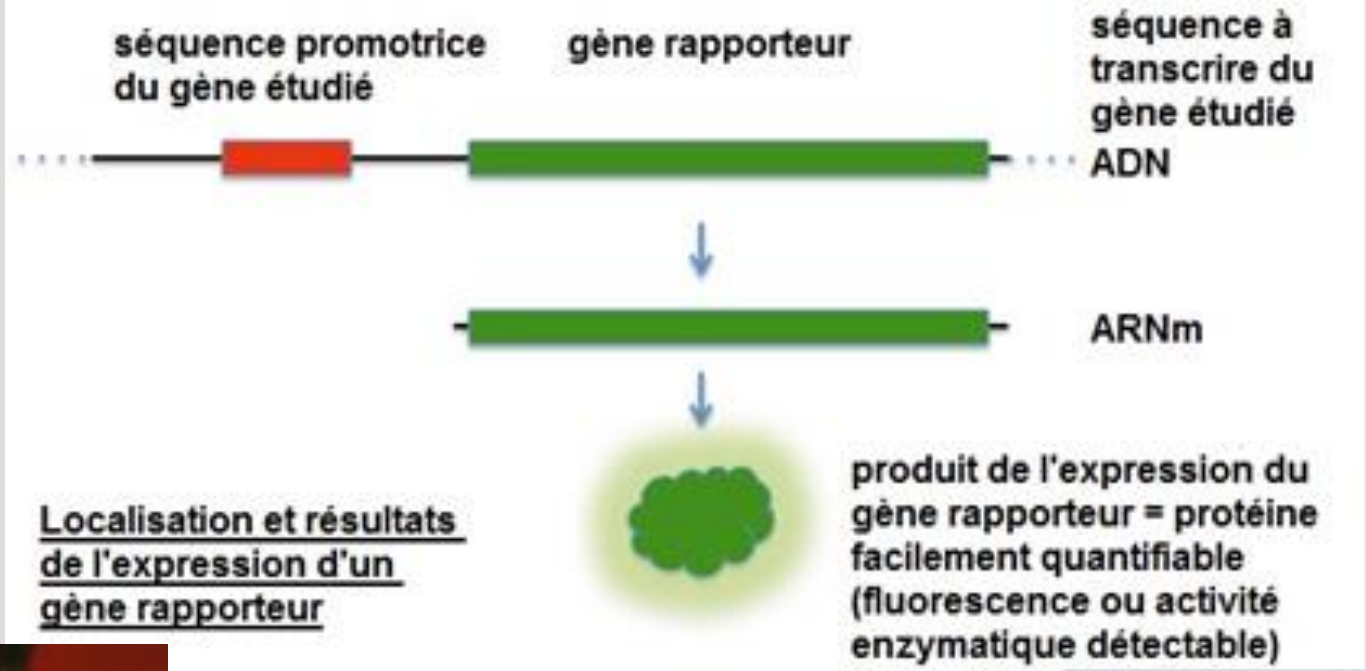
- Repose sur la propriété qu'ont 2 séquences nucléiques complémentaires de s'apparier de façon spécifique avec une affinité extrêmement forte.

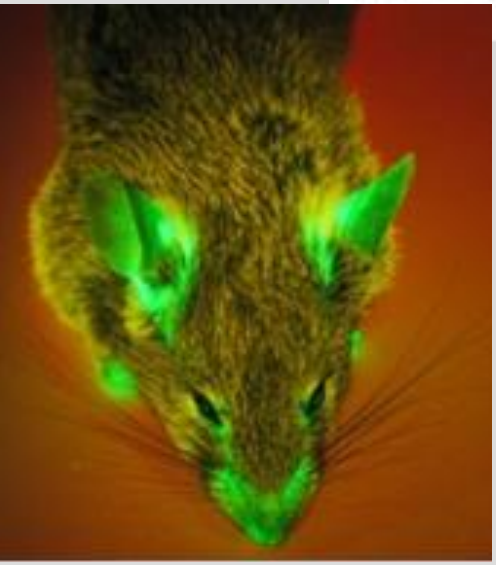
- acide nucléique marqué : « sonde »

- acide nucléique recherché : « séquence-cible »



- ARNm = structure monocaténaire
enchaînement de 4 ribonucléotides monophosphate (adénosine, guanosine, uridine et cytidine)

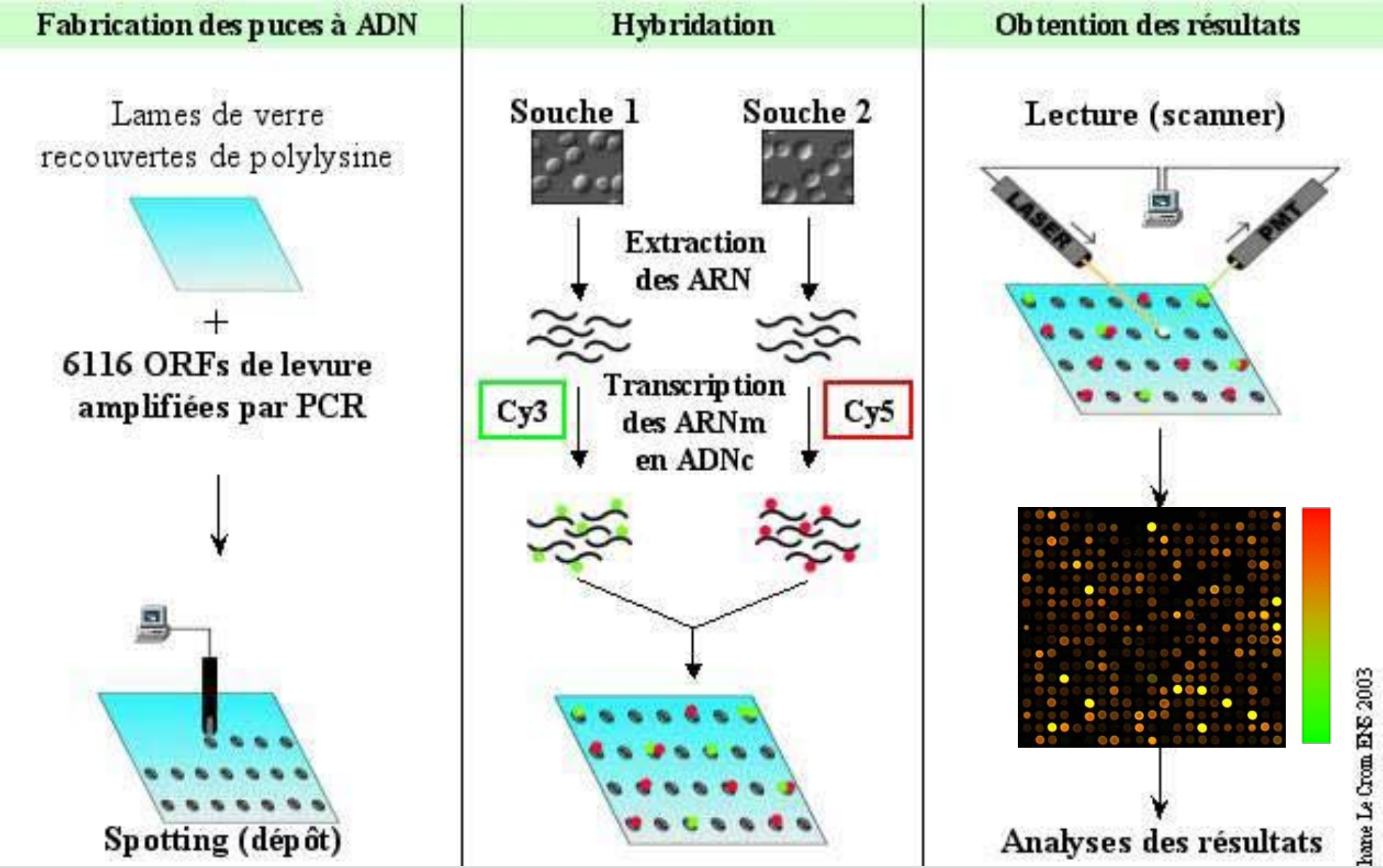




Analyse de la transcription à l'aide des gènes rapporteurs

Lucie, souris transgénique exprimant le gène de la GFP.
Laboratoire de Biologie Animale, (Université de Limoges http://www.unilim.fr)

Fleur d'*A. thaliana* en cours de développement.
Le gène GUS a été inséré après le promoteur du gène dont on étudie le rôle. Barre d'échelle = 100 µm.
(http://www.biomedsearch.com/nih/Arabidopsis-bZIP-transcription-factors-TGA9/20805327.html)

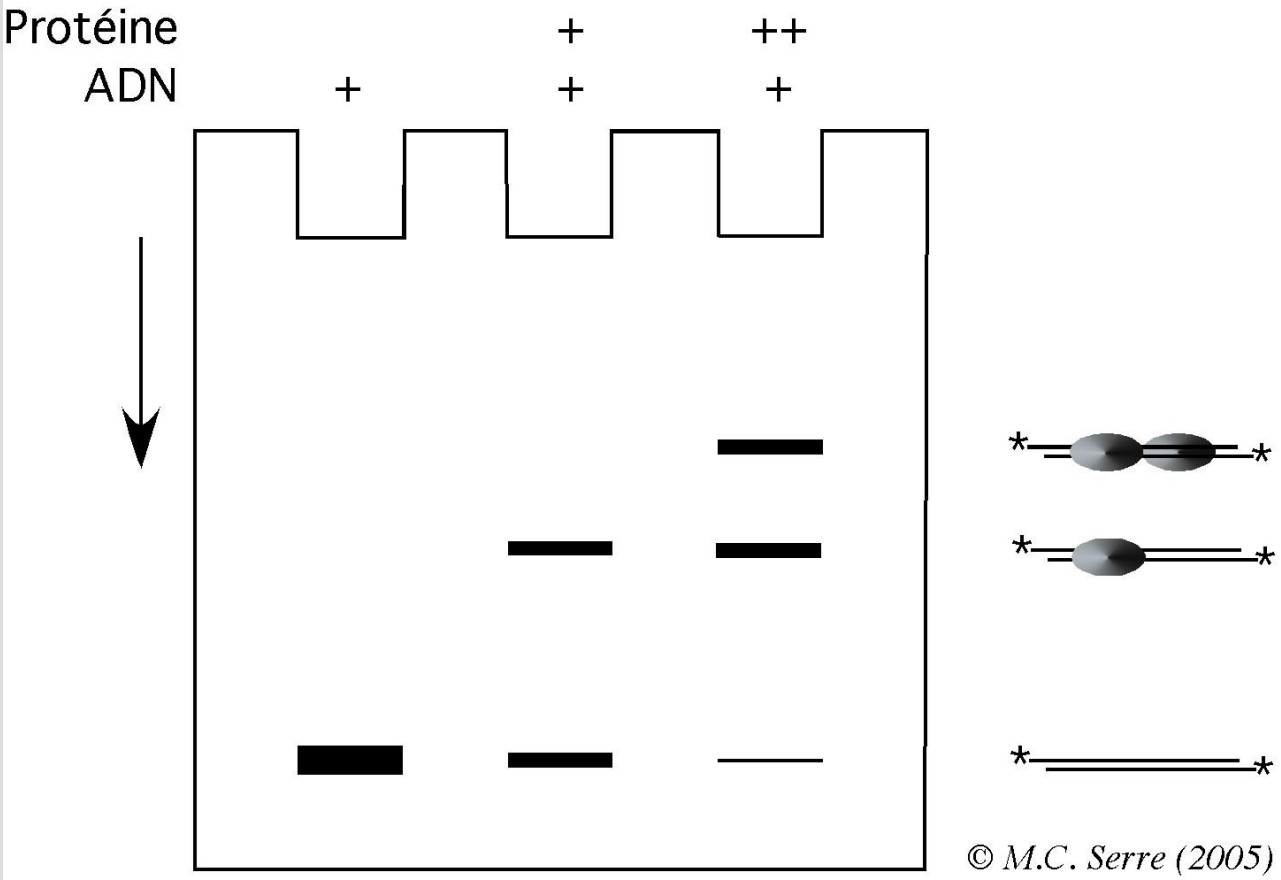


Le principe de la puce à ADN

Technique de retardement sur gel

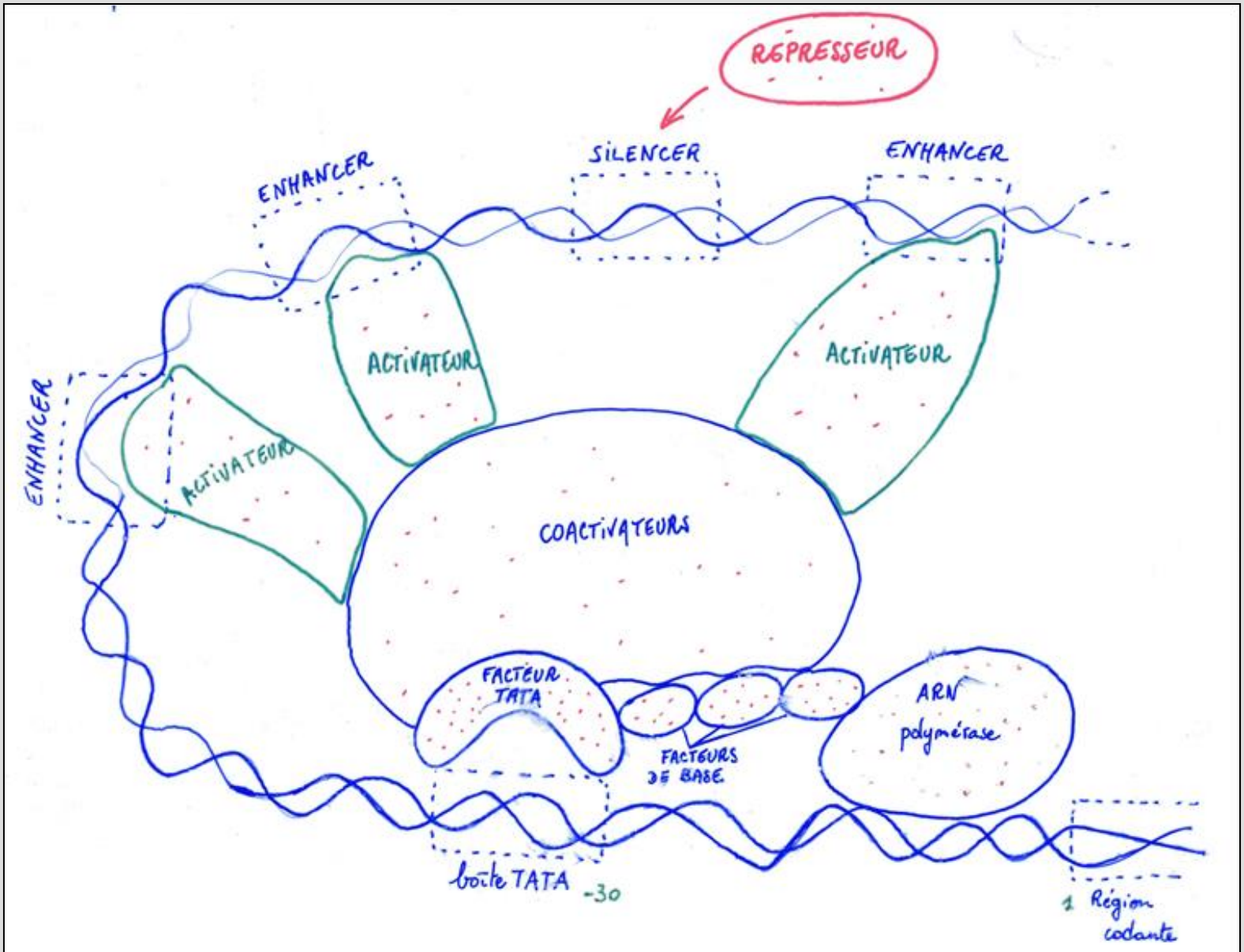
Un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migre moins vite sur un gel qu'un ADN ou un ARN nu. Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'oeil si une séquence particulière d'ADN ou d'ARN a été reconnue et liée par une protéine.

http://www.igmors.u-psud.fr/enseignement/mcserre/Cours-IPAN/cours-IPAN.html



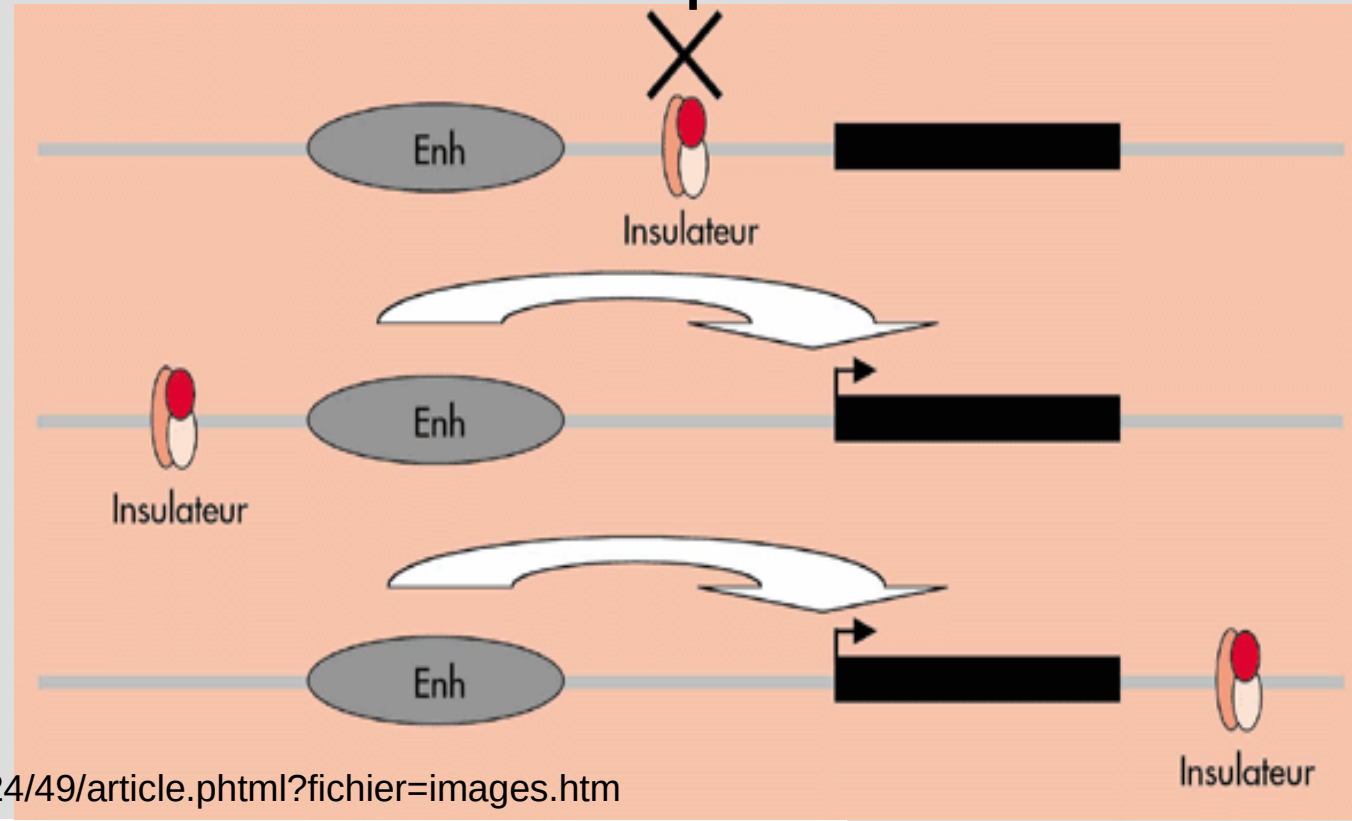
Dans le cas présent, le fragment d'ADN porte deux sites de fixation de la même protéine. Selon la concentration en protéine de la solution, le second complexe apparaît ou pas.

Document 19. Contrôle exercé au niveau du complexe de transcription.

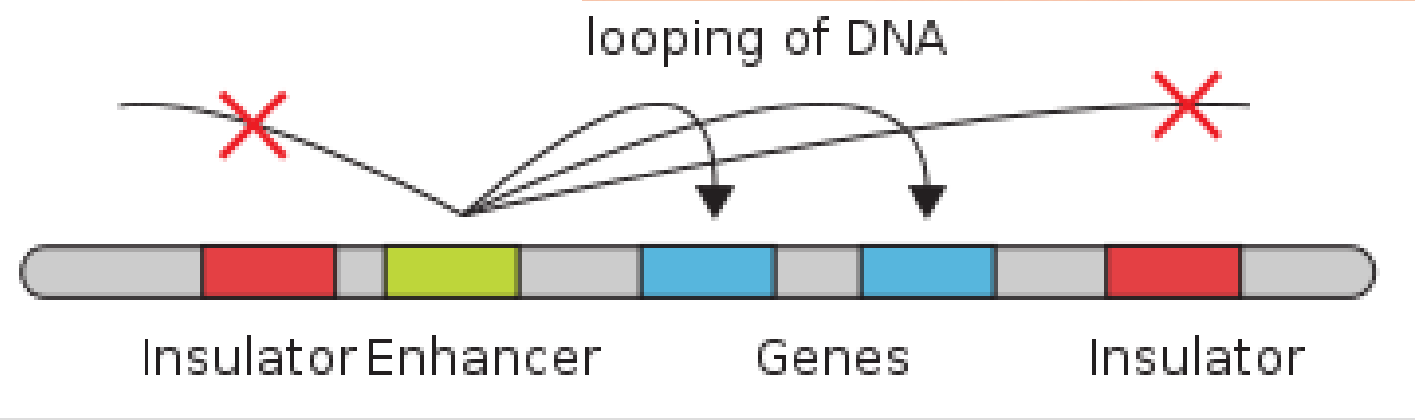


Document 20. Séquences insulateurs et domaines de transcription.

L'insulateur « protège » un gène (en noir) de l'action d'un enhancer uniquement s'il est situé entre ce gène et l'enhancer.

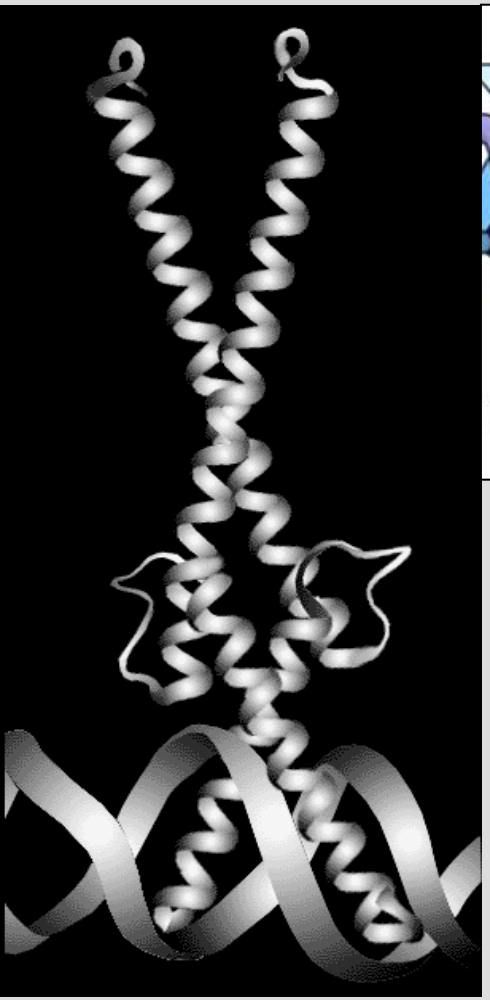


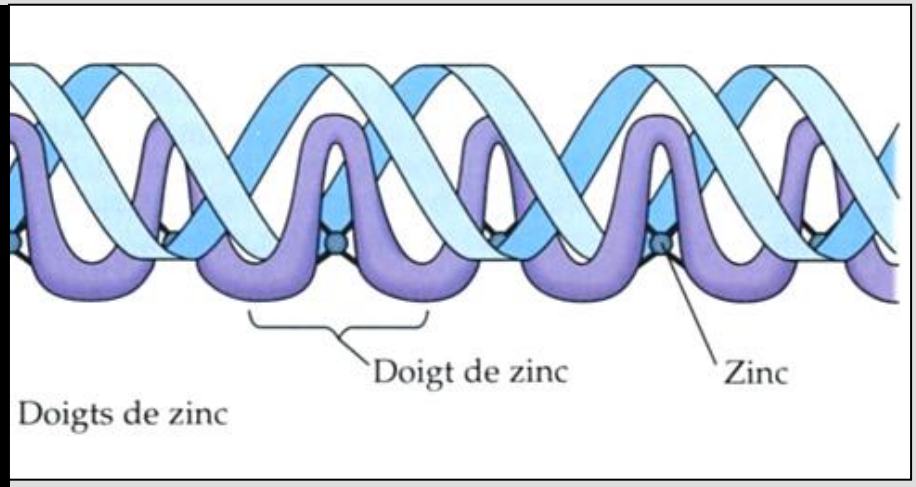
http://www.jle.com/e-docs/00/02/24/49/article.phtml?fichier=images.htm



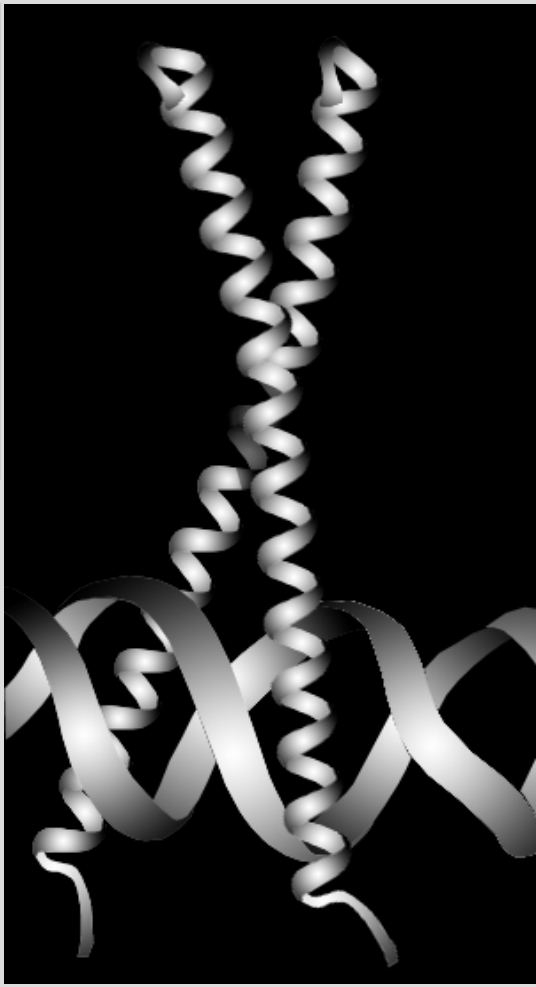
Les insulateurs délimitent des domaines de transcription.

Quelques motifs communs des protéines qui se lient à l'ADN (voir document 21).



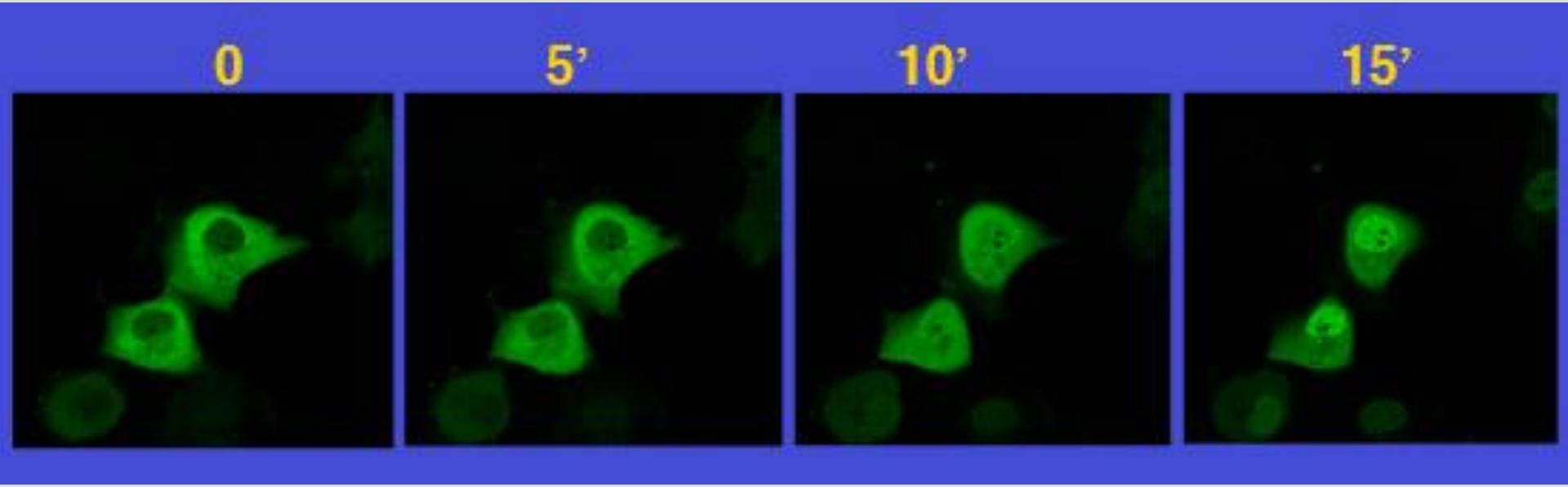


A gauche : domaine de liaison à motif hélice – boucle – hélice
Au centre : domaine de liaison à motif en doigts de zinc
A droite : domaine de liaison à motif fermeture à glissière de leucines.

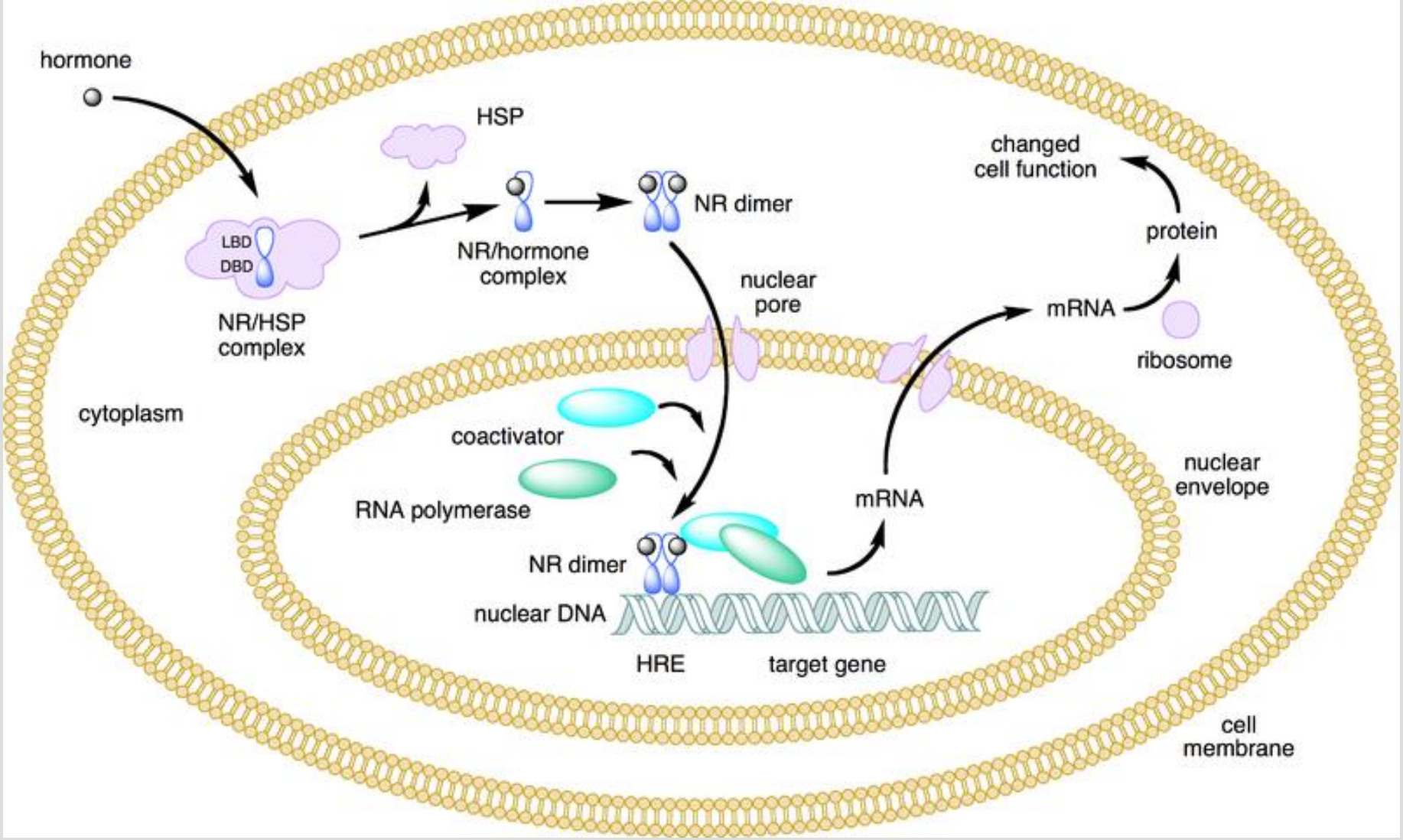


http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/2c.html et CAMPBELL N., " Biologie ", ERPI Ed., 1995

Mise en évidence de l'importation dans le noyau d'un récepteur nucléaire suite à la liaison avec une hormone stéroïdienne.

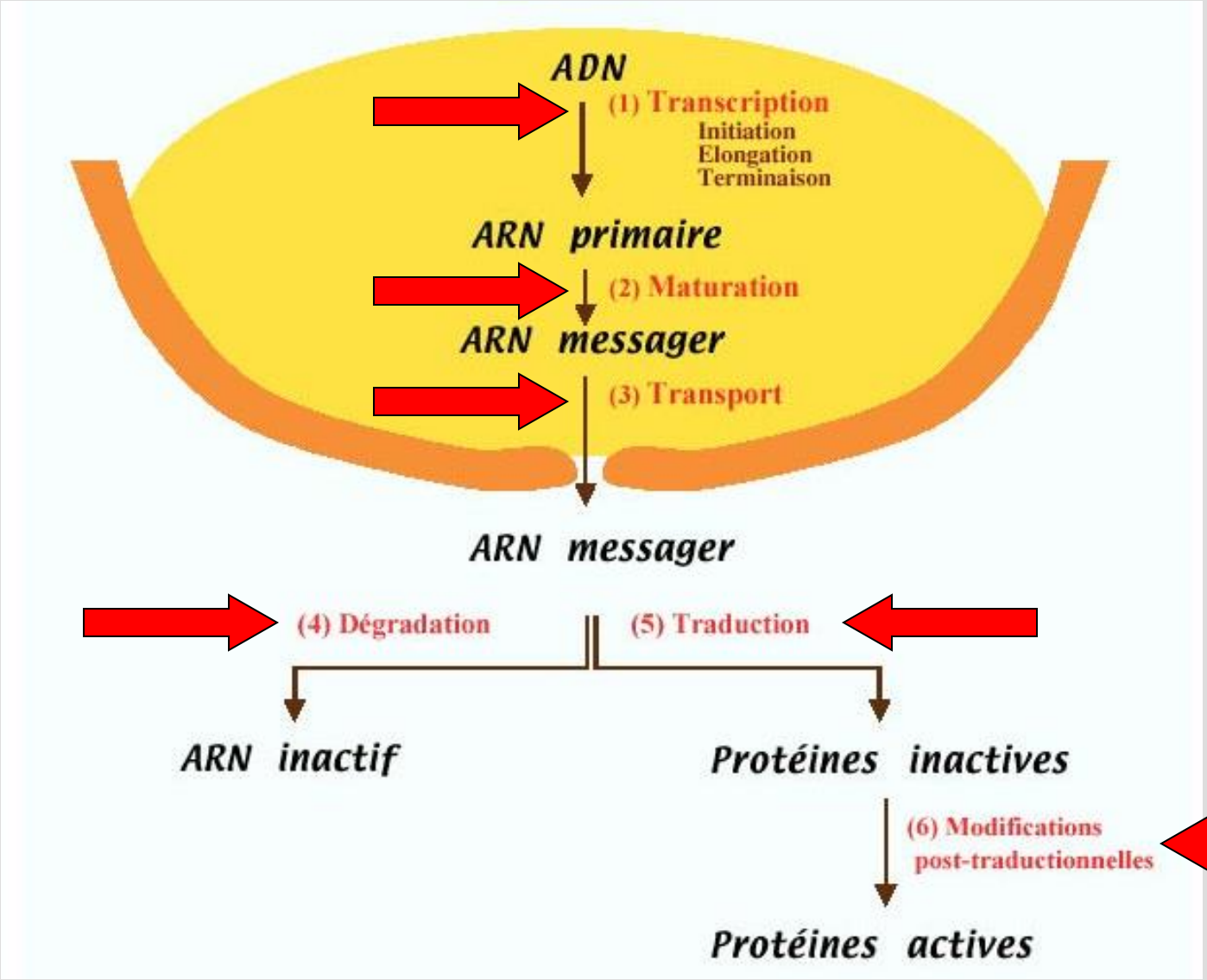


http://www.u-picardie.fr/servlet/com.univ.utils.LectureFichierJoint?CODE=1225182978501&LANGUE=0

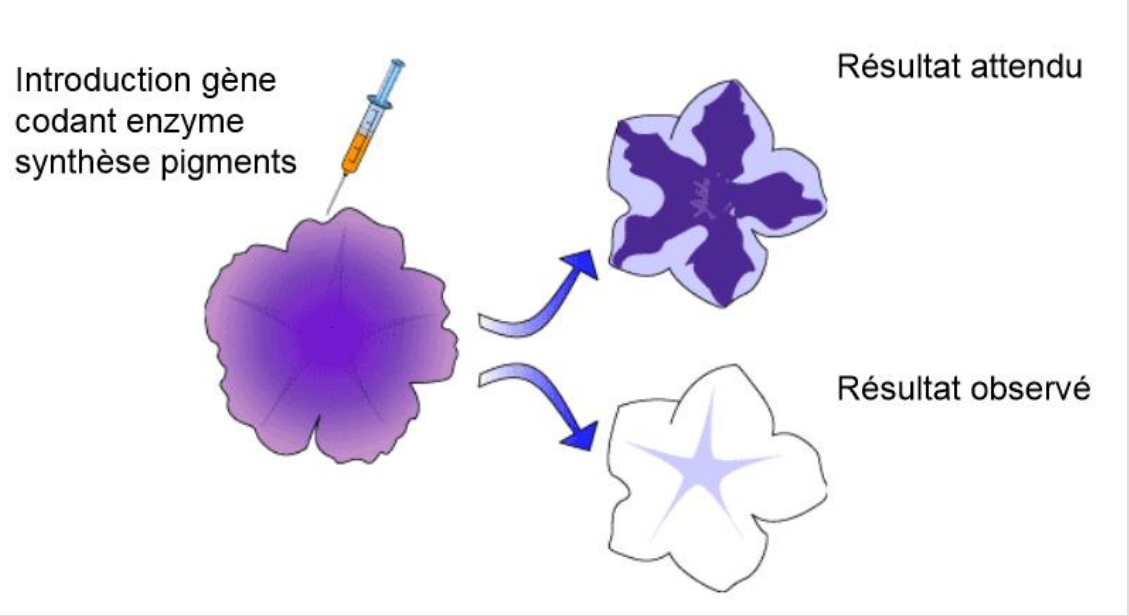


Régulation de la transcription via un facteur de transcription ligand dépendant :
le récepteur nucléaire au hormones stéroïdes.

http://www.u-picardie.fr/servlet/com.univ.utils.LectureFichierJoint?CODE=1225182978501&LANGUE=0



<u>Document 22</u>. Les différents niveaux de contrôle de l ’expression des gènes chez les Eucaryotes.



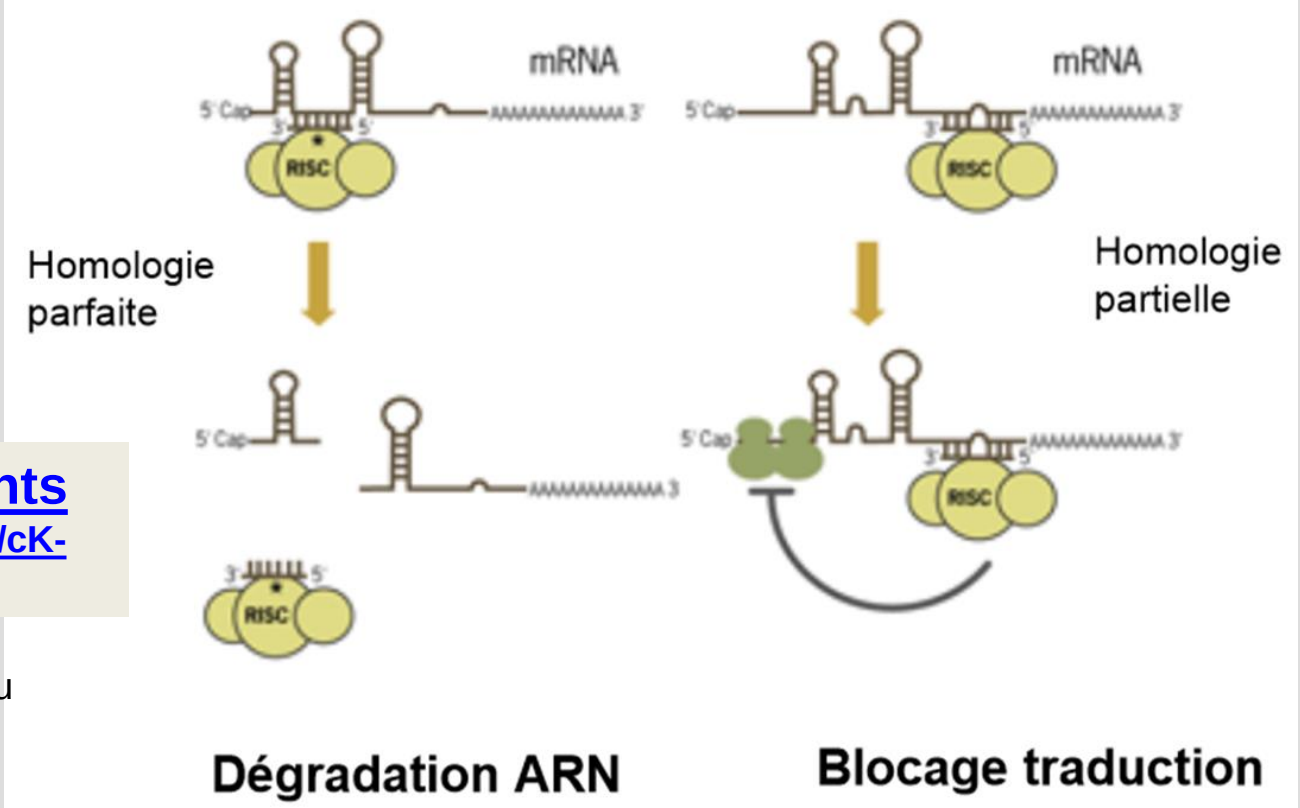
Les ARN interférents

Historique de la découverte

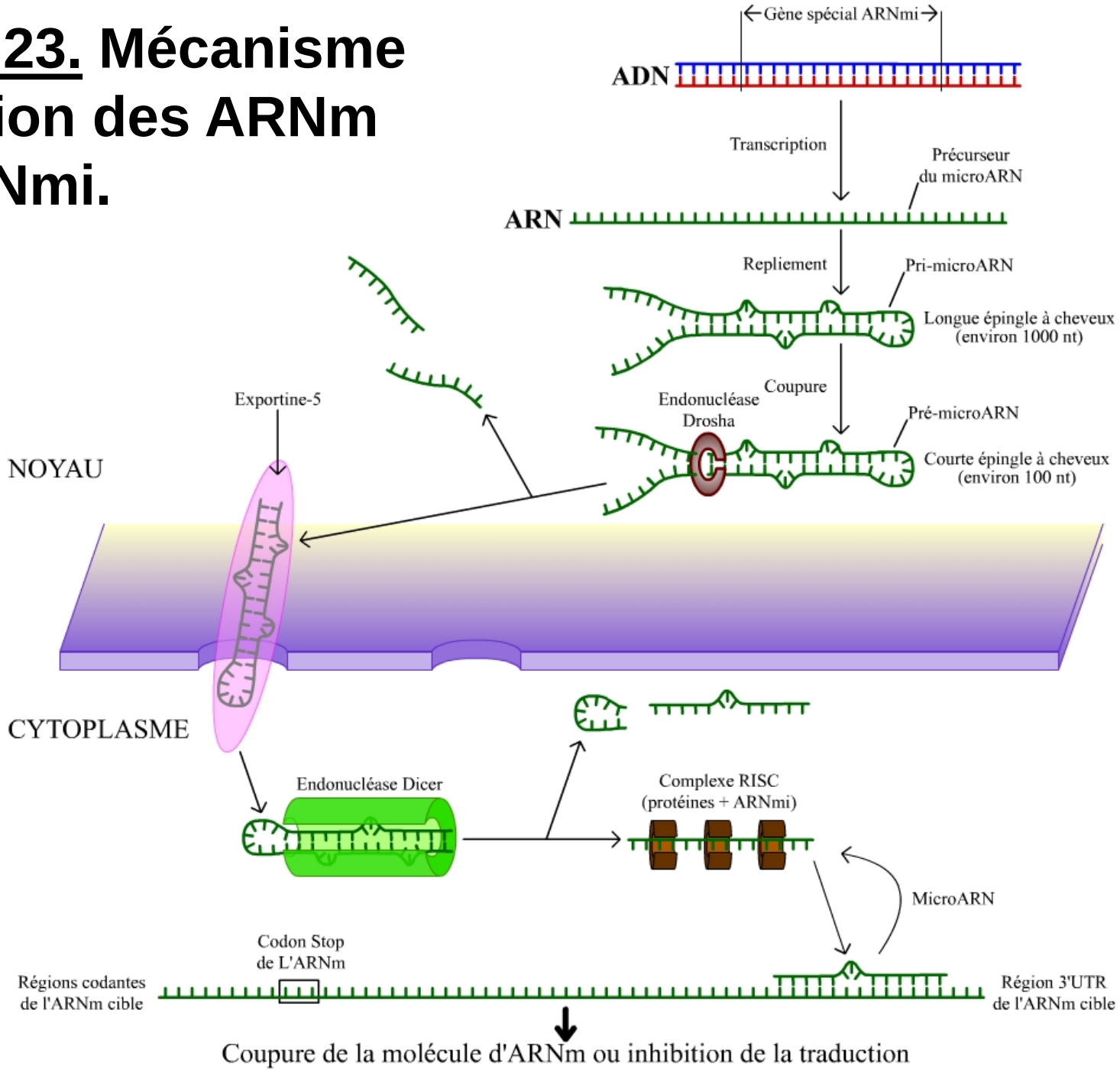
Les mécanismes de contrôle par ARNi

→ **Vidéo ARN interférents**
https://www.youtube.com/embed/cK-OGB1_ELE?wmode=transparent

http://www.u-picardie.fr/servlet/com.univ.utils.LectureFichierJoint?CODE=1225182978501&LANGUE=0



Document 23. Mécanisme de l'inhibition des ARNm par les ARNmi.



http://planet-vie.ens.fr/content/petits-arn-interferents