

La traduction

I. La machinerie traductionnelle

L'**ARNm** est un messager qui porte l'information génétique ; l'**ARNt** transporte les acides aminés et doit être aminoacylé ; le **ribosome** est une particule ribonucléoprotéique (RNP) constituée de deux sous-unités au sein de laquelle on trouve de l'ARN associé à des protéines, il maintient la structure des ARNr.

La traduction est la construction du protéome : la synthèse protéique s'effectue du domaine N-term au domaine C-term à partir de la lecture du messager de 5' vers 3'.

A. Les ARNm

1. Découverte

Au début des années 60, les scientifiques pensaient qu'un ribosome codait pour une protéine ; mais en 1961 Jacob et Monod ont étudié l'infection des bactéries par le bactériophage T2.

Cette expérience constituait à marquer les ARNr avec des isotopes lourds et légers pour les séparer selon leur gradient de densité. Ils ont fait pousser des bactéries avec un isotope lourd pour synthétiser des ARNr lourds, ensuite ces bactéries ont été transférées sur un milieu avec un isotope léger avant d'être infectées par le bactériophage T2. Le contenu a été déposé sur un gradient de densité. Dans le cas où les ribosomes sont porteurs de l'information génétique, ils observeraient deux pics correspondant aux ribosomes lourds et légers. Mais ils n'ont pu observer la présence que d'un seul pic de densité correspondant aux ribosomes lourds. Cela signifie que le ribosome ne porte pas l'information nécessaire à la synthèse de la protéine phagique.

Une deuxième expérience consistait en l'ajout de ^{32}P dans un milieu de culture. Ce marquage est très court. Après broyage et dépôt sur gradient de densité, on observe une seule molécule qui se trouve dans les mêmes fractions que le ribosome lourd. Il a donc été mis en évidence la présence d'un intermédiaire portant l'information génétique.

2. Caractéristiques des messagers

- 4 nucléotides A, G, C et U ;
- Séquence complémentaire et antiparallèle au brin matrice/transcrit ;
- Séquence identique au brin non transcrit de l'ADN (à part T en U) qui est toujours donné en exemple ;
- Synthèse de 5' vers 3' ;
- Véhicule l'information génétique ;
- Hétérogène en taille.

L'information génétique est portée par une succession de codons présents dans la **phase de lecture ouverte** (ORF). Cette phase commence par un codon AUG et se termine par un codon stop. On a une région non codante en 5' de cette ORF appelée 5'-UTR et qui est importante pour la régulation des gènes chez les bactéries ; et une région non codante en 3' appelée 3'-UTR.

Lorsqu'on isole un ADNc, on ne sait pas où commence la phase de lecture ouverte. Il peut y avoir 3 possibilités étant donné qu'un codon possède 3 nucléotides, cela dépend du cadre de lecture. Il faut donc chercher le premier AUG et le codon stop : si la région est trop courte cela signifie que ce n'est pas la bonne ORF.

3. Les messagers bactériens

Ils sont colinéaires au gène et peuvent coder pour 2 protéines voire plus. La traduction est couplée à la réplication chez les bactéries.

En 5' du messenger bactérien il y a d'abord une Purine qui porte 3 phosphates, suivie de la région 5'-UTR. A la fin du messenger on retrouve la région 3'-UTR.

Il peut y avoir plusieurs ORF dans un messenger, ce sont les messagers **polycistroniques** (1 cistron = 1 ORF) ; les messagers qui ne porte qu'une ORF sont donc les messagers **monocistroniques**.

En amont du cistron (=AUG), il y a une séquence conservée appelée **séquence Shine et Dalgarno** (GGAGG) riche en purines qui peut s'apparier avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Dans les messagers polycistroniques, on retrouve cette séquence Shine et Dalgarno entre chaque cistron.

Les messagers sont des molécules labiles qui ont une durée de vie de quelques minutes. Ils sont dégradés par le **dégradosome** qui referme des hélicases, des endonucléases et des exonucléases 3'-5' (RNase II, PNPase = polynucléotide phosphorylase). Comme il y a toujours une structure secondaire en tige-boucle, il faut des endonucléases qui coupent les liaisons afin de récupérer une extrémité 3' reconnaissable par les exonucléases 3'-5'. Les hélicases, quant à elles, ouvrent la structure en tige-boucle afin de permettre l'action des exonucléases.

4. Les messagers eucaryotes

Ils sont synthétisés sous forme de prémessagers et doivent subir une étape de maturation. Ils sont toujours associés à des protéines dans la cellule, sous forme de mRNP.

Dans le noyau il y a une **cap binding protein** au niveau de la coiffe m7G alors que **dans le cytoplasme** il y a un autre **complexe IF₄** qui se fixe sur le m7G. D'autres protéines sont déposées sur le messenger lors de l'épissage.

Sur le **3'-poly-A**, on trouve une **protein poly-A binding**.

Comme chez les bactéries, il y a une région 5'-UTR et une région 3'-UTR qui entourent la phase de lecture ouverte qui code pour une seule protéine.

La coiffe est importante pour l'initiation de la traduction et le poly-A est utilisé pour la synthèse d'ADNc et de banques de données (ex : MGC).

Stabilité des messagers :

De 5 à 60 minutes chez la levure et de 20 minutes à 24 heures chez les vertébrés.

La dégradation peut être contrôlée, nucléaire ou cytoplasmique.

- Contrôle de qualité : il y a synthèse de NMD lorsqu'il y a apparition d'un codon stop précoce dans le messenger pour le dégrader.
- Contrôle par la séquence ARE riche en « AU » qui permettent la dégradation d'un certain type de messenger.
- Dégradation par ARN interférence : miARN et siARN.

Dégradation des messagers :

Il faut qu'il y ait une **déadénylation** qui raccourci le poly-A, ce qui entraîne un relargage de la poly-A binding protein. Ensuite il peut soit y avoir dégradation par une exonucléase 3'-5' qui appartient à l'exosome, soit une élimination de la coiffe des messagers déadénylés par une exonucléase 5'-3'.

Contrôle de qualité NMD :

Sur un ARNm mature, il y a dépôt d'un **complexe EJC** (exon-junction complex) au niveau d'une jonction exon/exon lors de l'épissage. Ce complexe est éliminé par le passage du premier ribosome traduisant l'ARNm. Mais s'il existe un codon stop prématuré, à plus de 50 nucléotides en amont du point d'épissage, le complexe EJC reste en place. Le complexe EJC et le ribosome interagissent pour déclencher la dégradation de cet ARNm par **NMD** (non-sense mediated decay). Un ARNm présentant un codon stop en amont du site d'épissage est reconnu comme anormal et éliminé.

Si le ribosome est trop loin il n'y a pas d'interaction.

Dégradation ARE dépendante :

ARE est riche en purines (AU).

Une séquence AUUUA répétée plusieurs fois dans la région 3'-UTR du messager est reconnue et le messager est dégradé par l'exosome. Ce système de dégradation n'existe que pour les messagers des cytokines et des facteurs de croissance. Il existe un site de fixation pour la *ARE binding protein*.

Dégradation par l'ARN interférence :

La régulation de l'expression des gènes est réalisée soit par **dégradation** du messager, soit par **inhibition de la traduction** de ce messager en protéines.

Les petites ARN interférents, **siARN**, proviennent de la maturation d'un ARN double brin présent dans la cellule et dégradent les messagers du transgène. Les ARN double brin sont coupés en siARN par le **dicer**, qui est une RNase III, pour donner de petits ARN double brin de 15 à 20 nucléotides environ. Ils sont pris en charge par le **complexe RISC** au sein duquel les deux brins sont séparés pour donner un petit ARN simple brin qui possède une petite séquence complémentaire et antiparallèle à l'extrémité 3' du messager à dégrader.

B. L'ARN de transfert ou ARNt

C'est un transporteur d'acides aminés au ribosome qui traduit le messager. L'ordre d'addition des acides aminés est dicté par l'ordre des codons du messager. La reconnaissance du codon par l'ARNt se fait grâce à des interactions Watson-Crick entre les bases des nucléotides du codon et celles de l'anticodon.

La structure 3D de l'ARNt est en « L ».

Nomenclature :

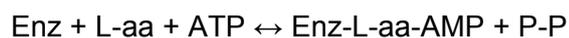
- L'ARNt qui transporte la phénylalanine est l'ARNt^{Phe}.
- Les enzymes qui catalysent l'aminocyclation de l'ARNt sont des **aminoacyl-ARNt synthétases** (ARS) comme par exemple la phénylalananyl-ARNt synthétase ou PheRS.
- L'ARNt chargé qui porte son acide aminé est un **aminoacyl-ARNt** comme par exemple la phénylalananyl-ARNt^{Phe}.

Il existe 20 acides aminés, il y a donc 20 ARS. Par contre, il y a plus d'une trentaine d'ARNt. Les ARNt iso-accepteurs fixent le même acide aminé mais peuvent présenter des séquences différentes et/ou un anticodon différent.

Il y a plusieurs sites actifs dans les ARS : il y a un site de fixation de l'acide aminé, un site de fixation de l'ARNt et un site de fixation de l'ATP. Certains ARS possèdent aussi un site important pour le contrôle de la fidélité de l'aminocyclation ; ce contrôle est très important car c'est le seul qui est réalisé.

L'aminocyclation se fait en 2 étapes :

- Activation de l'acide aminé (L-aa) au niveau de l'enzyme et formation d'un aminoacyl adénylate ;



- Transfert de l'acide aminé sur l'ARNt qui entraîne la libération de l'AMP et le détachement de l'enzyme.

La **première étape** est l'attaque de l' α -ATP par le groupement carboxyle de l'acide aminé avec formation d'une liaison anhydride mixte riche en énergie et libération d'un P_Pi.

La **deuxième étape** est différente selon la classe de l'ARS :

- Pour les enzymes de classe I, il y a transfert de l'aminocycl adénylate sur l'hydroxyle en 2'-OH de l'adénine situé à l'extrémité 3' de l'ARNt (extrémité CCA) ;
- Pour les enzymes de classe II, il y a transfert de l'aminocycl adénylate sur l'hydroxyle en 3'-OH de l'adénine situé à l'extrémité 3' de l'ARNt.

Mais le produit final de la réaction est toujours un ARNt qui porte l'aminocycl adénylate sur l'hydroxyle 3'-OH de l'adénine situé à son extrémité 3'.

Le contrôle de fidélité/qualité :

Il se fait au niveau de l'ARS par deux mécanismes : soit par un **mécanisme basé uniquement sur la cinétique de la réaction**, c'est-à-dire que lors de l'interaction de l'ARNt avec l'ARS, le bon ARNt aura une forte affinité pour son ARS et les échanges enzymes-substrats seront plus lents ce qui permettra un changement de conformation et un blocage de l'enzyme sur l'ARNt ; soit par un **mécanisme basé sur la configuration de l'acide aminé chargé**, comme par exemple dans le cas d'un IleRS qui présente un site de contrôle pour l'isoleucine et qui vérifie la fixation d'une valine . Comme il n'y a pas beaucoup de différence entre la chaîne latérale d'une valine et celle d'une isoleucine, il est possible que l'ARNt fasse des erreurs. Dans ce cas l'aminocycl adénylate entre dans le site de contrôle et la valine est éliminée grâce à l'hydrolyse de la liaison entre l'AMP et l'acide aminé. Par contre, la présence du méthyle dans la chaîne latérale de l'isoleucine empêche sa pénétration dans le site de contrôle et donc son élimination.

Déterminants d'identité :

Il y a des déterminants importants sur l'ARNt, ce sont des nucléotides spécifiques d'un ARNt localisés dans le bras accepteur ou dans l'anticodon. Ils sont importants pour la reconnaissance de l'ARNt par l'enzyme. Ainsi, l'ARS^{Ile} ne transfère l'acide aminé Isoleucine à l'extrémité 3' de l'ARNt^{Ile} qu'après avoir reconnu les traits caractéristiques de la boucle de l'anticodon et de l'extrémité CCA de cet ARNt.

Les ARNt supprimeurs :

Certains tests génétiques ont permis la formation d'ARNt supprimeurs qui modifient la séquence d'un message qui code pour une protéine essentielle pour la survie de la cellule. Ces ARNt sont donc mutés pour être capable de reconnaître le codon stop précoce. Il y a des supprimeurs de mutation non-sens qui reconnaissent un codon stop et permettent la fixation d'un acide aminé pour continuer la traduction ; et des supprimeurs de mutation faux-sens qui correspondent à un changement d'acide aminé par un autre.

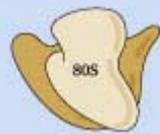
Par exemple, dans le cas où le codon stop UAG entraîne l'arrêt prématuré de la synthèse protéique, un ARNt apparaît et possède un anticodon muté qui permet l'incorporation d'un acide aminé à la place d'un codon stop. Mais parfois, l'acide aminé inséré peut avoir des effets néfastes dans la protéine synthétisée.

Le principe est à peu près le même pour un ARNt supprimeurs de mutation faux-sens sauf qu'il permet l'incorporation du bon acide aminé à la place de celui qui correspondrait à la mutation faux-sens.

C. Ribosomes : ARNr associé aux protéines ribosomiques = RNP

1. Les sous-unités ribosomiques

Les ribosomes sont des complexes de haute masse moléculaire faits de **protéines** et d'**ARNr** organisés en une petite et une grande sous-unité ribosomique. Les deux sous-unités ribosomiques de structure asymétrique s'associent pour former la particule ribosomique complète.

PROKARYOTIC RIBOSOMES (<i>E. coli</i>)		EUKARYOTIC RIBOSOMES (Rat)		
Ribosome (2.52×10^6 D)		Ribosome (4.22×10^6 D)		
Subunits	 (0.93×10^6 D)	 (1.59×10^6 D)	 (1.4×10^6 D)	 (2.82×10^6 D)
RNA	16S RNA (1542 nucleotides)	23S RNA (2904 nucleotides) 5S RNA (120 nucleotides)	18S RNA (1874 nucleotides)	28S + 5.8S RNA (4718 + 160 nucleotides) 5S RNA (120 nucleotides)
Protein	21 proteins	31 proteins	33 proteins	49 proteins

Un canal horizontal traverse la particule : c'est par celui-ci que se glisse l'ARNm tandis que le polypeptide en cours de synthèse sort par un canal latéral du ribosome. Aucune protéine ne se trouve à l'interface des sous-unités où se trouve le messager, elles stabilisent la structure des ARN à l'extérieur des sous-unités.

2. Mise en évidence du polysome

Un **polysome** ou polyribosome est un ensemble de ribosomes reliés entre eux par un ARN messager. Cet ensemble a l'aspect d'un collier de perles en forme de spirale.

Il a été mis en évidence par une traduction *in vitro* en présence d'acides aminés marqués radioactivement.

3. Rôle des sous-unités ribosomiques

On distingue **3 sites voisins de fixation des ARNt** ; le **site P** ou peptidyle contient l'ARNt qui porte l'acide aminé initial – puis plus tard la chaîne polypeptidique croissante ; le **site A** contient l'ARNt qui apporte l'acide aminé suivant dans le ribosome. Ces deux ARNt s'hybrident avec des triplets immédiatement voisins de l'ARNm ; les acides aminés attachés à leur bras accepteur sont positionnés si près l'un de l'autre qu'ils peuvent former une liaison peptidique. Enfin, en 5' du site P se trouve un troisième ARNt déchargé, dans le **site E** à partir duquel il quitte le ribosome.

Un ribosome ne renferme que 2 ARNt à la fois : soit sur les sites E et P, soit sur P et A. Et il change régulièrement de conformation car il est très dynamique durant la traduction.

II. La traduction chez les bactéries

La traduction se fait suivant 3 étapes :

- **Initiation** : positionnement du ribosome au niveau du codon initiateur de la traduction AUG ;
- **Elongation** : addition d'acides aminés ;
- **Terminaison** : libération de l'oligopeptide synthétisé et détachement du ribosome.

A. Initiation de la traduction

1. Les facteurs de l'initiation

Au cours du démarrage de la traduction, un mécanisme élaboré assure l'association de l'ARNm à la petite sous-unité (16S) et le positionnement du premier codon AUG du cadre de lecture, appelé codon de démarrage, au site P.

Le facteur **IF-1** se fixe au niveau du site A de la petite sous-unité 30S et régule les activités des IF-2 et IF-3.

Le facteur **IF-2** s'associe au GTP et possède une activité GTPase. Ce complexe contrôle l'entrée de l'ARNt^{f-Met} dans le site de la petite sous-unité. L'hydrolyse du GTP en GDP permet l'association des deux sous-unités ribosomiques.

Le facteur **IF-3** empêche l'association des deux sous-unités 30S et 50S.

Les facteurs de démarrage IF-1 et IF-3 se fixent à la petite sous-unité, empêchant ainsi la fixation prématurée et improductive de la grande sous-unité en l'absence d'ARNm. La petite sous-unité reconnaît la séquence Shine et Dalgarno d'un ARNm, s'y fixe par appariement de bases complémentaires ce qui permet à celui-ci de présenter son codon AUG associé au site P.

En même temps, l'ARNt de démarrage portant une N-formyl-méthionine entre dans le complexe accompagné du facteur de démarrage IF-2-GTP. La fixation de l'ARNt^{f-Met} au codon de démarrage AUG, libère IF-3 ce qui permet l'association de la grande sous-unité 50S au complexe.

Le GTP est hydrolysé en GDP et Pi, ce qui déclenche la dissociation d'IF-2-GDP et d'IF-1. Le ribosome est alors formé : l'occupation du site A et la formation d'une première liaison peptidique terminent la phase de démarrage de la traduction procaryote.

2. Formylation du méthionyl-ARNt initiateur : ARNt^{f-Met} ou ARNt_i

Le codon initiateur AUG code pour une N-formyl-méthionine portée par l'ARNt^{f-Met}. Seule la méthionine associée à l'ARNt initiateur est formylée et ne pourra par conséquent pas se lier aux codons AUG internes.

IF-2 reconnaît spécifiquement f-Met-ARNt^{f-Met} et l'entraîne au niveau du site P de la petite sous-unité 30S.

B. Elongation

La phase d'élongation qui s'ensuit, et qui prend le plus de temps dans la biosynthèse des protéines, se déroule en trois temps : positionnement de l'aa-ARNt au niveau du site A, formation d'une liaison peptidique entre les acides aminés et translocation du ribosome.

1. Positionnement correct de l'aa-ARNt au niveau du site A du ribosome

Chaque nouvel ARNt entrant est escorté par le **facteur d'élongation EF-Tu** qui assure son positionnement correct dans le site A. Ce facteur est présent dans 5% des protéines totales et permet de protéger la liaison ester formée. Ensuite l'**activité peptidyltransférase** transfère la chaîne peptidique naissante sur le nouvel acide aminé en formant une liaison peptidique.

Lors du transport de l'ARNt vers le site A, il s'effectue un échange d'ARNt jusqu'à ce que le bon se fixe sur le site A. Il y a ensuite hydrolyse du GTP qui induit un changement de conformation du ribosome et permet l'ancrage de l'ARNt sur le site A. Le facteur EF-Tu est éliminé en association avec le GDP ; il doit être recyclé grâce à l'association d'un **facteur de recyclage Ts** qui possède une plus grande affinité pour le facteur EF-Tu que le GDP. Ensuite, la fixation du GTP sur le facteur EF-Tu chasse Ts par affinité.

De nombreux **antibiotiques** agissent comme **inhibiteurs** de la traduction. La kirromycine se fixe sur EF-Tu et entraîne l'arrêt de la traduction.

La puromycine, un analogue structural d'aminoacyl-ARNt, est un exemple particulièrement intéressant. Les ribosomes reconnaissent la puromycine comme un aa-ARNt et l'attachent par une liaison covalente à l'extrémité d'un polypeptide naissant. Comme la puromycine possède à la position importante une liaison carboxamide à la place de la liaison ester, elle ne permet pas l'élongation de la chaîne. Après l'incorporation de la puromycine, il y a donc terminaison prématurée de la traduction, et libération d'un fragment polypeptidique presque toujours inactif.

2. Formation de la liaison peptidique

La liaison peptidique est catalysée par la sous-unité 23S.

Un acide aminé présente son groupement amine libre qui attaque la liaison ester du f-Met pour former la liaison peptidique. La liaison ester possède assez d'énergie pour permettre de réaliser cette formation.

Au final, le site P porte l'ARNt déacylé et le site A porte l'ARNt élongateur avec les deux acides aminés.

3. Translocation

Tout d'abord la grande sous-unité glisse sur la petite sous-unité, puis la petite sous-unité se déplace de 5' vers 3' : le ribosome se déplace de trois nucléotides, de telle sorte que le codon suivant entre dans le site A.

Le facteur d'élongation EF-G associé au GTP n'entre dans le site A qu'après élimination du facteur d'élongation EF-Tu, ensuite le GTP est hydrolysé et induit le changement de conformation de EF-G qui entraîne à son tour le changement de conformation du ribosome. Le dipeptide-ARNt se déplace du site A au site P et l'ARNt déacylé se déplace vers le site E où il est éjecté par le ribosome.

C. Terminaison de la traduction

Lorsqu'au cours de l'élongation le ribosome rencontre l'un des trois codons stop UAA, UAG ou UGA, la synthèse s'arrête : il y a terminaison de la traduction. Le site A contient maintenant non seulement un ARNt mais aussi un **facteur de libération**. Les bactéries en ont trois : RF-1 reconnaît les codons UAA et UAG, RF-2 reconnaît les codons UAA et UGA et RF-3 stimule la libération du ribosome de RF-1 et de RF-2 après la terminaison par une réaction qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse du GTP.

Le facteur de libération se lie au codon stop lorsque celui-ci apparaît dans le site A. Dans ces conditions, la peptidyltransférase a une activité hydrolytique : au lieu de transférer la chaîne polypeptidique sur le groupement amine d'un acide aminé, elle la transfère sur une molécule d'eau et libère la protéine nouvellement synthétisée de sa liaison à l'ARNt.

Pour dissocier les sous-unités ribosomiques, il faut un **facteur de recyclage RRF** qui a une structure ressemblant à un ARNt. Associé à EF-G/GTP, il entre dans le site A pour déverrouiller le ribosome grâce à l'énergie de l'hydrolyse du GTP. Pour que les sous-unités ne se réassocient pas, le **facteur d'initiation IF-3** se fixe sur la petite sous-unité.

Traduction d'un messager tronqué, dépourvu de codon stop :

Un ARN de petite taille tel que le tmRNA ou ARN 10sa présente une extrémité 5' qui possède une séquence complémentaire en antiparallèle à son extrémité 3'. Il possède un CCA comme les ARNt et il y a une homologie entre l'extrémité 3' d'un ARNt^{Ala}. Il peut donc être aminoacylé, porter une Alanine et est capable de rentrer dans le site A du ribosome lorsque celui-ci arrive à la fin de l'ARNm. Il possède une phase de lecture ouverte qui code pour 25 acides aminés.

Les oligopeptides tronqués portent une séquence d'acides aminés qui les guident vers le dégradosome. Cette séquence correspond à la séquence de l'ORF de l'ARNmt grâce à la transduction, c'est-à-dire le passage du ribosome d'un messager à un autre.

Lorsque le ribosome arrive à la fin de l'ARNm dépourvu de codon stop, l'ARNmt rentre dans le site A, il y a formation d'une liaison peptidique avec l'acide aminé précédent. Le ribosome se déplace vers l'extrémité 3' de l'ARNm et traduit l'ORF de l'ARNmt permettant l'étiquetage de l'oligopeptide tronqué qui sera dégradé par le dégradosome.

III. Biosynthèse protéique chez les eucaryotes

A. Initiation coiffe dépendante

C'est une étape limitante responsable de la régulation de l'expression des gènes. Avant le début de la synthèse, la petite sous-unité ribosomique 40S est chargée avec les facteurs de démarrage **eIF-1** et **eIF-3**. L'**ARNt^{Met}**, après chargement d'une méthionine, recrute le facteur de démarrage **eIF-2/GTP**. Lorsqu'il s'associe avec la sous-unité 40S, le complexe commence à chercher le codon de démarrage de l'ARNm en hydrolysant de l'ATP. Lorsque le complexe atteint le codon de démarrage AUG, un nouveau facteur **eIF-5** permet l'hydrolyse de l'eIF-2/GTP en eIF-2/GDP. C'est le signal qui ordonne à tous les facteurs de démarrage de quitter le complexe, afin de laisser la place à la grande sous-unité.

Chez les eucaryotes, la région 5'-UTR est souvent très courte donc le ribosome reconnaît très vite le codon initiateur AUG.

B. Circularisation des messagers

Lorsque la protéine PABP de la queue poly-A interagit avec les protéines de la coiffe, il y a circularisation du messager et l'initiation de la traduction est optimale.

IV. Adressage des protéines

Dans une cellule, la localisation d'une protéine est essentielle à son bon fonctionnement. Chez les bactéries il y a des protéines dans la membrane interne, externe et dans l'espace périplasmique ; chez les eucaryotes il existe des protéines membranaires, cytosoliques et des protéines dans les compartiments cellulaires (noyau, mitochondries, chloroplastes). Les protéines sont synthétisées soit par des ribosomes du réticulum endoplasmique, soit par des ribosomes libres dans le cytoplasme. L'**adressage** est l'ensemble des mécanismes qui permettent à une protéine d'être dirigée vers la bonne position.

1. Le peptide signal

Dans la région N-terminale des protéines synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux, il y a un **peptide signal** qui joue un rôle dans la localisation du ribosome.

Peptide signal : il possède au moins un acide aminé chargé négativement (basique) suivi d'une région hydrophobe de taille variable, suivie d'un site de coupure qui possède en amont une alanine (A) ou une glycine (G). C'est le même chez les eucaryotes et les bactéries ; des expériences ont été réalisées pour montrer que l'insertion d'un peptide signal bactérien dans une cellule eucaryote permet la bonne localisation du ribosome dans la cellule.

Rôle : en construisant une protéine chimère par fusion d'ADNc codant pour le peptide signal bactérien et d'un ADNc d'une protéine humaine (α -globine) non sécrétée, on a pu observer l'obtention d'une protéine chimère grâce à la formation d'un gène hybride.

Par des expériences de traduction *in vitro*, il a pu être montré que la protéine passe dans le réticulum endoplasmique lors de sa synthèse et perd le peptide signal. En effet, lors de la synthèse de protéines *in vitro* en présence de microsomes (=vésicules closes constituées de la membrane du réticulum endoplasmique), le ribosome se fixe sur les microsomes pour analyser leur contenu.

Localisation du ribosome :

Les protéines du RE possèdent un signal de localisation dans leur région N-terminale. Une particule ribonucléoprotéique appelée **SRP** est impliquée dans le système. Elle renferme un petit ARN associé à 6 protéines. Elle se fixe sur le ribosome qui synthétise la nouvelle protéine portant le peptide signal et provoque un arrêt de la traduction. Ensuite la SRP reconnaît son récepteur situé sur la membrane du réticulum endoplasmique et permet ainsi la localisation du ribosome. La protéine traverse donc la membrane du RE par un **translocon** et le peptide signal est éliminé par une enzyme.

Les protéines nucléaires portent un peptide signal de localisation nucléaire dans leur région N-terminale (NLS). **NLS** est constitué d'acides aminés basiques et il est parfois séparé en deux régions. Contrairement au peptide signal du RE, NLS n'est pas éliminé. Le transport des protéines du cytoplasme vers le noyau se fait activement grâce à des **protéines cargots**.

Les protéines mitochondriales et cytoplasmiques possèdent un signal de localisation dans leur région N-terminale qui sera éliminé après leur transport.

V. Repliement et modifications des protéines

Une protéine peut être synthétisée sous la forme active ou inactive. Les protéines inactives sont non-fonctionnelles et doivent être déstructurées et restructurées. Pour les déstructurer, il y a élimination des ponts disulfures pour permettre la formation d'autres ponts.

Bien que certaines chaînes polypeptidiques se replient spontanément, d'autres requièrent l'assistance de protéines qualifiées de chaperons.

Il existe deux types de chaperons : les chaperons de **type Hsp70** qui sont des protéines individuelles qui nécessitent des ATPases pour changer de conformation et des **chaperonines** qui sont des complexes formant un tube hydrophobe dans lequel la protéine sera restructurée en présence d'ATP.

Modifications des protéines après le repliement :

Certaines modifications se font dans le lumen du réticulum endoplasmique, telles que les **glycosylations** : l'O-glycosylation (= ajout d'oligosaccharides sur le groupement OH de la Thr ou la Ser), la N-glycosylation (= ajout d'oligosaccharides au N du NH_2 de l'Asn).

Autres modifications : acétylations (Lys), méthylations (Lys), phosphorylations (Ser, Thr, Tyr), ubiquitinations.

VI. Le code génétique

1. Système de traduction in vitro

La machinerie traductionnelle est constituée d'extraits de germes de blé et de réticulocytes de lapin. Ces extraits contiennent les principales molécules indispensables à la traduction, c'est-à-dire des ribosomes, des ARNt, des amino-acyl-ARNt synthétases, de l'ATP, des enzymes régénératrices d'énergie et des cations Mg^{2+} et K^+ . La traduction *in vitro* peut se faire à partir d'ADNc ou d'ARN. Dans le cas d'ARN eucaryotes, la **séquence Kozak CCACCAUGG** au niveau du site d'initiation AUG permet d'optimiser la traduction car c'est un **site de reconnaissance** pour la fixation des ribosomes chez les eucaryotes comme la séquence Shine-Dalgarno chez les bactéries.

Expérience de déchiffrement du code génétique :

Dans 20 milieux réactionnels contenant chacun un seul acide aminé radioactif, on ajoute des rUDP et on synthétise un ARNm artificiel poly-U grâce à la polynucléotide phosphorylase. On procède *in vitro* à la traduction de cet ARNm et on analyse le produit de la traduction sur un filtre. Les acides aminés qui n'ont pas formé d'oligopeptide ne précipitent pas et traversent le filtre alors que l'acide aminé correspondant à la séquence du poly-U a été traduit en une protéine qui précipite en présence de TCA (acide trichloroacétique). Cette expérience a donc pu montrer que le codon UUU correspond à l'acide aminé Phénylalanine.

Le code génétique est dégénéré et universel :

Un acide aminé est codé par plusieurs codons mais un codon ne code que pour un seul acide aminé. Par exemple, la méthionine n'est codée que par un seul codon alors que la phénylalanine est codée par 4 codons différents mais n'est reconnue que par un seul ARNt. Lorsqu'un codon se termine par A ou G il peut s'apparier avec un anticodon qui commence par un U dans les deux cas. Cela permet de minimiser l'importance des mutations ponctuelles.

Il existe des variations mineures chez la mitochondrie, quelques bactéries et chez les eucaryotes unicellulaires.

Théorie de Wobble :

Un ARNt^{Ala} reconnaît trois codons différents : GCU, GCC, GCA parce que l'anticodon porte une inosine qui est capable de reconnaître les nucléotides U, C et A. Un anticodon qui porte une uracile peut reconnaître les nucléotides A et G.

Les deux premières bases d'un codon forment toujours des appariements de type Watson-Crick et sont importantes dans la spécificité ; la première base de l'anticodon détermine le nombre de codons reconnus par un ARNt ; quand un acide aminé est codé par plusieurs codons, les codons qui diffèrent au niveau des premières bases seront reconnus par des ARNt différents. Il faut un minimum de 32 ARNt pour décoder 61 codons.

Mutations dans le cadre de lecture :

Les mutations **non-sens** impliquent un arrêt prématuré de la traduction dû à la présence d'un codon stop précoce. Les mutations **faux sens** sont parfois silencieuses et consistent en un remplacement d'un codon par un autre, elles peuvent induire la synthèse de protéines inactives. Les **insertions/délétions** induisent un décalage du cadre de lecture.