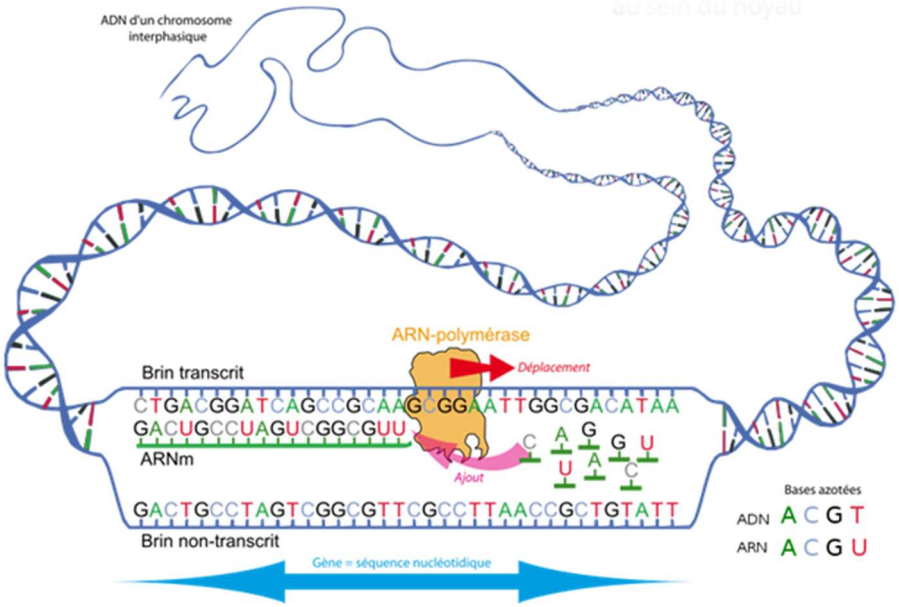



# Cours de Biologie Moléculaire
# Semestre (S5)- SVI

# Table des matières

INTRODUCTION ..... 1

I. Structures et propriétés des acides nucléiques ..... 1

I.1 Acide désoxyribonucléique (ADN) ..... 1

I.2 Acide ribonucléique (RNA ou ARN) ..... 2

II. Concept et techniques de Biologie Moléculaire ..... 3

II.1 Extraction d'ADN ..... 3

II.2 PCR : Polymérase chaine réaction (réaction de polymérisation en chaine) ..... 5

II.3 Electrophorèse ..... 6

II.4 RAPD (Random Amplified DNA) ..... 8

II.4.1 Origines de polymorphisme de type RAPD ..... 8

II.4.2 Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction ..... 9

II.5 Synthèse de cDNA et production des protéines recombinantes ..... 9

II.5.1 Vecteur d'expression ..... 10

II.5.2 Cellule hôte ..... 10

II.5.3 Expression de la protéine ..... 10

II.5.4 Extraction et purification de la protéine recombinante ..... 11

II.6 Détermination de polymorphisme entre génomes par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ..... 12

II.6.1 Technique RFLP ..... 12

II.6.2 Sources de Polymorphisme ..... 12

II.7 Séquençage : nucléotide Méthode de Sanger ..... 13

III. Réplication de l'ADN ..... 15

III.1 La réplication chez les procaryotes ..... 15

III.1.1 Expérience de Meselson et Stahl ..... 16

III.1.2 Synthèse de l'ADN in Vitro (Kornberg 1958) ..... 18

III.1.3 Réplication de l'ADN in vitro (Goulian, Kornberg et Sinsheimer 1958-1968) ..... 19

III.1.4 Observation de Cairns (1962) ..... 21

III.1.5 Les mécanismes de la réplication ..... 22

III.2 Réplicationchez les eucaryotes ..... 25
III.2.1 Cycle Cellulaire ..... 26
III.2.2 Origines Et Initiations ..... 27
III.2.3 Les Enzymes Et Protéines Eucaryotes ..... 27
III.2.4 Modèle de la Réplication chez les Eucaryotes ..... 28
III.2.5 Réplication des Telomeres ..... 30
III.2.6 Modification post réplication de DNA ..... 31
IV. Maintien de l'intégrité du DNA et réparation ..... 31
IV.1 Altérations physiques ..... 33
IV.2 Altérations chimiques ..... 34
IV.3 Systèmes de Sauvegarde ..... 34
IV.3.1 Fidélité de la réplication ..... 34
IV.3.2 Systèmes Préventifs ..... 35
IV.4 Systèmes Multiples ..... 35
IV.4.1 Réversion Directe du Dommage ..... 35
IV.4.2 Réversion en deux Phases ..... 36
V. Variation de DNA ..... 38
V.1 Les Mutations Ponctuelles ..... 38
V.2 La Recombinaison ..... 38
V.2.1 Chez les Procaryotes (E. coli) ..... 38
V.2.2 Chez les Eucaryotes ..... 40
V.3 Eléments Mobiles ..... 42
V.3.1 Transposition ..... 42
V.3.2 Transposition non réplicative (ou conservative) ..... 43
V.3.3 Transposition réplicative ..... 43
V.3.4 Rétroposition ..... 44

# INTRODUCTION

La biologie moléculaire est une science qui s'intéresse à l'étudie de la nature les molécules portant le message héréditaire, les acides nucléiques : ADN et ARN. Leurs structures et leurs propriétés, Leur synthèse (Réplication, Transcription), leurs altérations (Mutations) et mécanismes de réparation, leurs variations (Recombinaison, Mobilité), leurs expressions (Transcription, traduction) et leur régulation.

C'est une discipline qui étudie le fonctionnement cellulaire à l'échelle moléculaire. La biologie moléculaire peut être appliquée dans de nombreux domaines tels que, la médicale (diagnostics, élaboration de vaccins, thérapie génique etc…), L'agriculture (étiquetage des variétés, améliorations des plantes, créations des OGM etc…) et la justice (profils génétiques, recherches parentales et généalogiques, criminologie etc…).

## I. Structures et propriétés des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont de deux types ; l'acide désoxyribonucléique (ADN ou DNA) et l'acide ribonucléique (ARN ou RNA). Ils sont constitués de nucléotides. Chaque nucléotide est composé d'une de 4 bases azotées, de l'acide phosphorique et d'un sucre à 5 carbones (pentose) qui le désoxyribose pour le DNA et le ribose pour le RNA. Les bases azotées sont des composantes principales des acides nucléiques et sont réparties en 2 types ; les bases puriques comprenant l'Adénine ou 6-aminopurine (A) et la Guanine ou 2-amino-6-oxypurine (G) et les bases pyrimidiques comprenant la Thymine ou 2,4-dioxy-5-méthylpyrimidine (T), la Cytosine ou 2 oxy - 4 - aminopyrimidine (C) et l'Uracile ou 2,4-dioxypyrimidine (U).

- Les appariements de Watson et Crick sont A-T et C-G. Trois liaisons hydrogène lient G à C et uniquement deux liaisons hydrogène existent entre A et T.

- l'orientation de la molécule de DNA est donnée par la position 5' ou 3' des radicaux OH du désoxyribose

### I.1 Acide désoxyribonucléique (ADN)

Le DNA est la plus grosse molécule d'un organisme vivant. Son poids moléculaire varie de mille à 100 milles chez les virus et de 100 millions à 1 milliard chez les mammifères. Il a une structure d'une double hélice constituée de 2 monomères enroulé l'un autour de l'autre.

Rôle de l'ADN : pérenniser de génération en génération les informations de l'organisme

**<u>Localisation de l'ADN chez les Eucaryotes</u> :**

- Cellule végétale : noyau (chromosome), mitochondrie, chloroplaste.
- Cellule animale : noyau (chromosome), mitochondrie

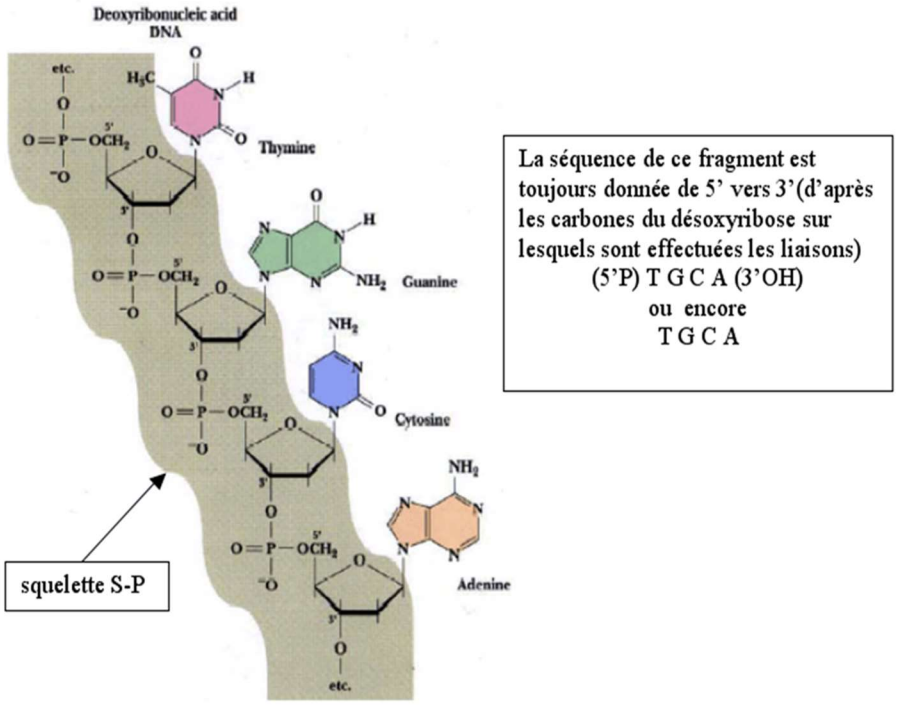



***Figure 1 - La séquence de ce fragment d'ADN est toujours donnée de 5' vers 3' (d'après les carbones du désoxyribose sur lesquels sont effectuées les liaisons (5P')TGCA(3'OH) ou encore TGCA***

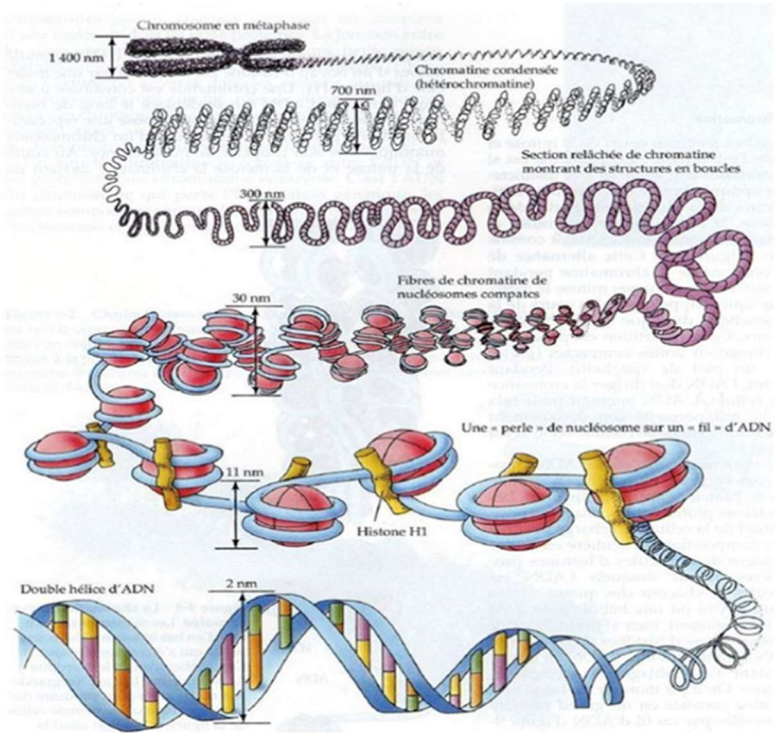



***Figure 2 - Niveau d'empaquetage de l'ADN***

## I.2 Acide ribonucléique (RNA ou ARN)

Une chaine monocaténaire constituée de Bases Azotées : Adénine, Guanine, Uracile et Cytosine, ribose et Acide phosphorique. En partant des appariements des bases azotées, un DNA donne naissance par transcription, au RNA (RNA messager ou mRNA) où C s'apparie avec G et A avec U. Cet mRNA sera

décodé ensuite en protéines (séquences d'acides aminés). L'arrangement des bases (A, G, C et U) trois par trois permet d'établir le code génétique nécessaire pour la synthèse des protéines.

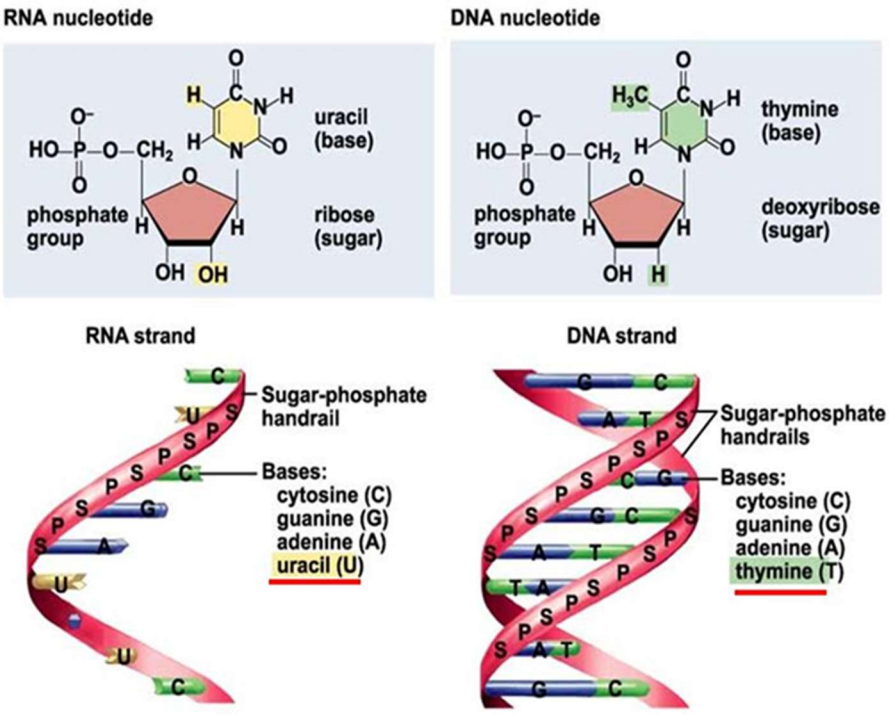



*Figure 3 - Structure ARN /ADN*

## II. Concept et techniques de Biologie Moléculaire

### II.1 Extraction d'ADN

• Broyage mécanique avec l'azote liquide pour briser les cellules (détruit la paroi cellulaire).

• Tampon d'extraction contenant le détergent cationique : CTAB Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. (Solubilise les composantes biochimiques du tissu)

**CTAB: Détergent Cationique**

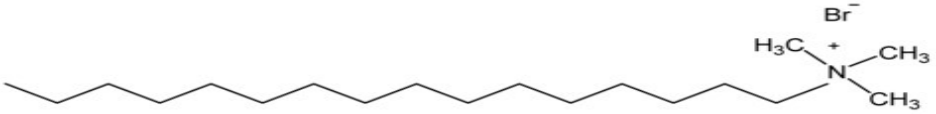


*Figure 4 - Structure de CTAB*

- Détruit les structures lipidiques membranaires.
- Fixe les polysaccharides et polyphénols
- Forme un complexe avec l'ADN et détacher les protéines (histones)

**SDS : Détergent anionique**

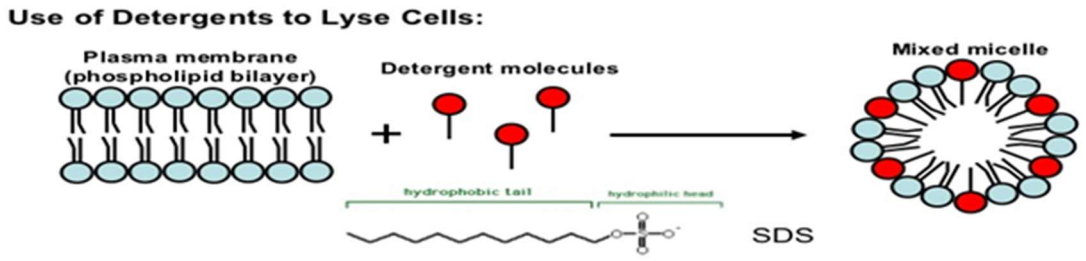



***Figure 5 - Méthode d'extraction par précipitation***

On peut utiliser dans le tampon d'extraction des acides nucléiques le SDS (dodécylsulfate de sodium) qui permet d'une part de détruire la paroi cellulaire et d'autre part de charger les protéines (histones) en le détachant des ADN chargés négativement Le tampon d'extraction à pH basique et contient des sels et de l'EDTA

• EDTA chélate les éléments Mg++ qui activent les DNases

• pH basique permet de charger les protéines (histones) négativement (-) et crée répulsion de charges électriques entre histones et ADN.

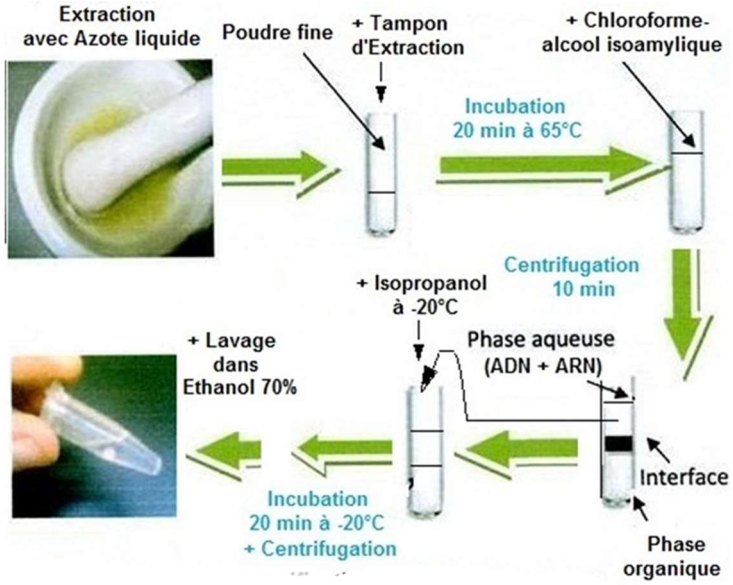



***Figure 6 - Protocole d'Extraction des acides nucléiques des plantes***

L'extraction et purification des acides nucléiques (ADN et ARN) fait appel à l'application d'un protocole utilisant un milieu basique, des concentrations élevées en sel (comme NaCl), EDTA et des détergents. Elle nécessite 3 étapes importantes :

• une action physique, consistant à détruire les structures cellulaires (paroi cellulaire, en particulier) par broyage mécanique, réalisé en présence de l'azote liquide,

• une action chimique (lyse chimique) tendant à solubiliser les composantes biochimiques du tissu

Une purification (isolation) de l'ADN des autres molécules biologiques comme les protéines et les polysaccharides et les composés phénoliques (séparation par affinité aux phases), précipitation de l'ADN

par l'alcool (isopropanol, lavage de l'ADN par l'alcool (éthanol 70%) et solubilisation de l'ADN en vue de son usage dans des traitements ultérieurs

## Estimation de la quantité de l'ADN

Mesure de l'absorbance de l'ADN à 260 nm à l'aide d'un nanodrop. DO = 1 correspond à 50ng/ul

Calcul de la concentration de l'ADN

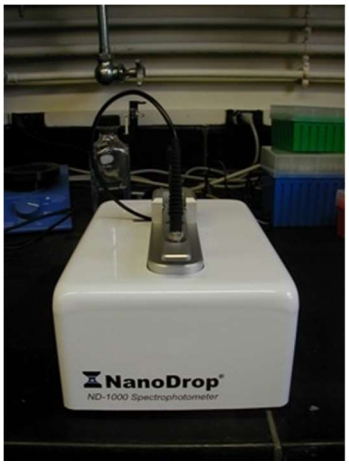
## Evaluation de la pureté de l'ADN

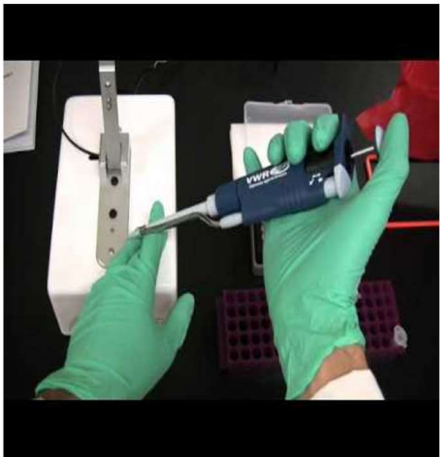
Calcul du rapport DO260/DO280

Valeur comprise entre **1,8** et **2** : solution d' ADN pure

**>2** contamination par les ARN

**<1.8** contamination par les protéines



### II.2 PCR : Polymérase chaine réaction (réaction de polymérisation en chaine)

La PCR est une réaction de polymérisation en chaine utilisée pour les différentes techniques de biologie moléculaire :

- Séquençage
- Amplification de l'ADN pour le clonage
- détermination de polymorphisme entre génomes (RFLP…)
- Recherche d'OGM
- dNTP

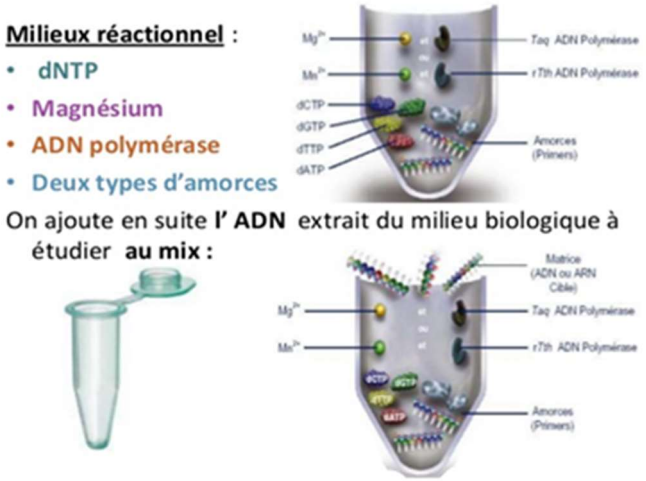



*Figure 7 - Milieux réactionnel de la PCR*

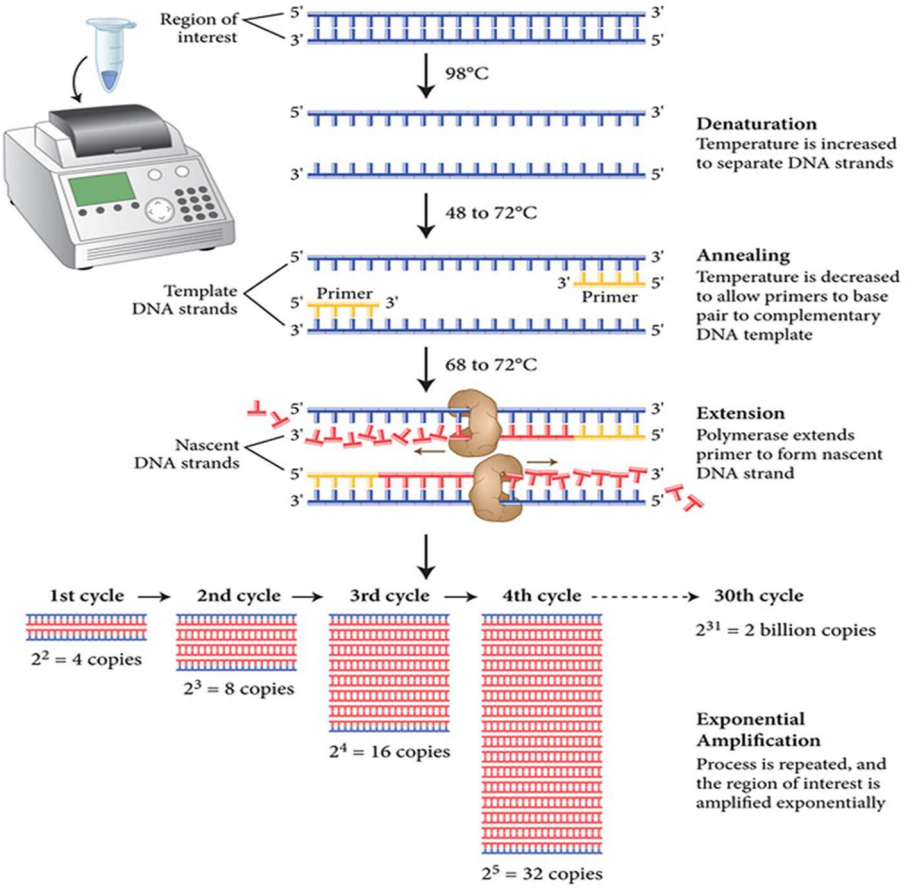



*Figure 8 - Processus d'amplification par PCR*

## II.3 Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous

l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés des champs électriques. La réalisation de l'électrophorèse nécessite 3 composantes principales ; une cuve d'électrophorèse qui porte le support de migration (Gel d'amidon, agarose, polyacrylamide), un générateur de courant électrique continu et une cuve de révélation des produits séparés.

## Types d'électrophorèse selon le sens de migration :

- Electrophorèse horizontale
- Electrophorèse verticale

L'électrophorèse des acides nucléiques (ADN, ARN) exploite en priorité la propriété de la taille des molécules (car charge négative pour tous les acides nucléiques, due au phosphate). Cette technique est réalisée sur gel d'agarose (0,8%) comme support.

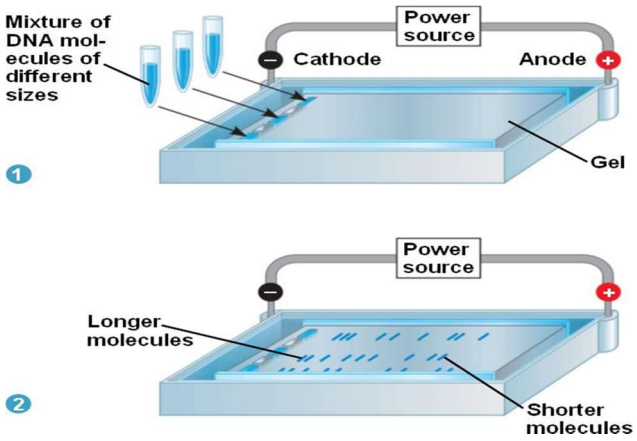



*Figure 9 - Schéma d'électrophorèse Horizontale*

La révélation des acides nucléiques peut être faite par simple incubation des gels dans une solution de bromure d'éthidium ou par coloration au nitrate d'argent.

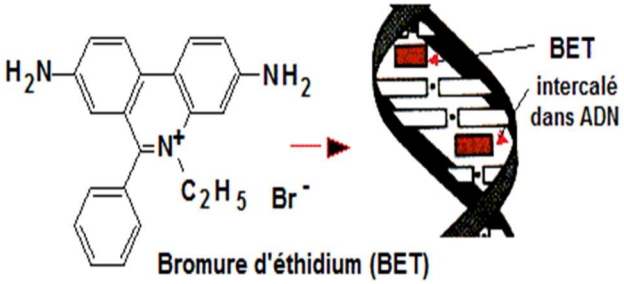



*Figure 10 - Mécanisme de révélation de DNA par le bromure d'éthidium BET*

Lorsqu'on dispose d'une sonde marquée, on peut l'utiliser dans la révélation du DNA après transfert des produits séparés sur membrane de nitrocellulose (soutenu blotting). La détection des fragments de DNA se fait par hybridation selon les appariements des bases A-T et C-G.

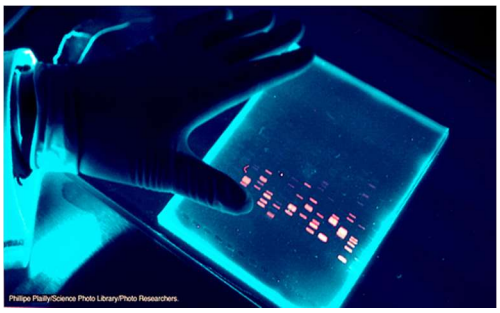



*Figure 11 - Révélations des acides nucléiques Sous UV*

## II.4 RAPD (Random Amplified DNA)

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymatiques et RFLP). La technique RAPD est basée sur la méthode PCR. L'amplification du DNA génomique est, cette fois ci, réalisée à partir d'amorces de séquences aléatoires (10 bases, environ), utilisées seules ou par couples. Lorsqu'une seule amorce aléatoire est utilisée, l'amplification a lieu une fois celle-ci se fixe sur 2 sites complémentaires peu distants (maximum théorique de la PCR : 3000 pb).

### II.4.1 Origines de polymorphisme de type RAPD

Les causes du polymorphisme de type RAPD sont :

- Disparition par mutation (mutation ponctuelle, crossing-over, insertion, délétion, ...) d'un ou plusieurs sites de fixation de l'amorce.

- Eloignement, par insertion, des sites de fixation de l'amorce à une distance supérieure à 3000 pb. Il en résulte la disparition de fragments de DNA

- Rapprochement, par délétion, des sites de fixation de l'amorce à une distance inférieure ou égale à 3000 pb. Il en résulte l'apparition de fragments surnuméraires.

- Rapprochement très accusé des sites de fixation de l'amorce ne donnant lieu qu'à de petits fragments de DNA n'apparaissant pas sur le gel après électrophorèse.

Il apparaît donc que les marqueurs RAPD sont en général dominants, contrairement aux marqueurs RFLP. Ainsi, tous les individus d'une génération F1, résultant d'un croisement de 2 lignées dont l'une possède un marqueur RAPD caractéristique, présentent le même marqueur (la présence d'un marqueur l'emporte sur son absence).

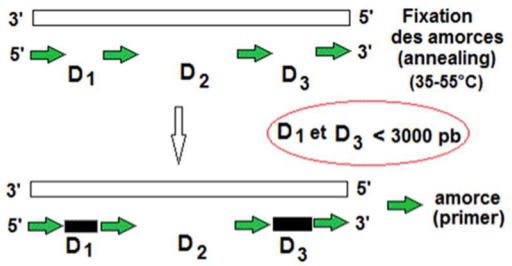



*Figure 12 - Amplification aléatoire de l'ADN : RAPD (Random Amplified DNA)*

### II.4.2 Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

Une enzyme de restriction est une enzyme qui coupe au niveau d'une séquence spécifique de reconnaissance de 4 à 8 bases. (Palindrome)

**5'---GTTAAC-- 3'**
**3'---CAATTG--5'**

L'origine des enzymes de restriction est bactérienne : exemple EcoRI: Escherichia coli typeR I. L'enzyme de restriction génère deux types de coupure ; **sticky ends** (bouts collants avec coupure cohésive) ou **blunt ends** (bouts francs avec coupure franche).

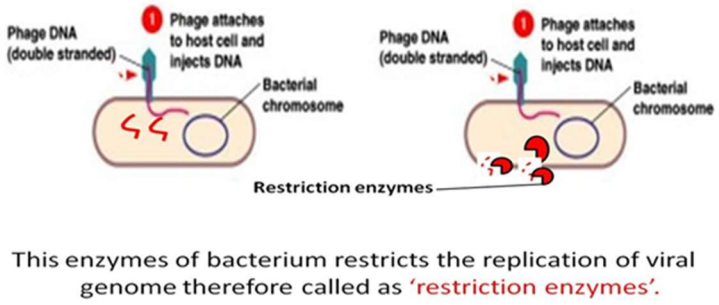



***Figure 13 - Origine des enzymes de restriction***

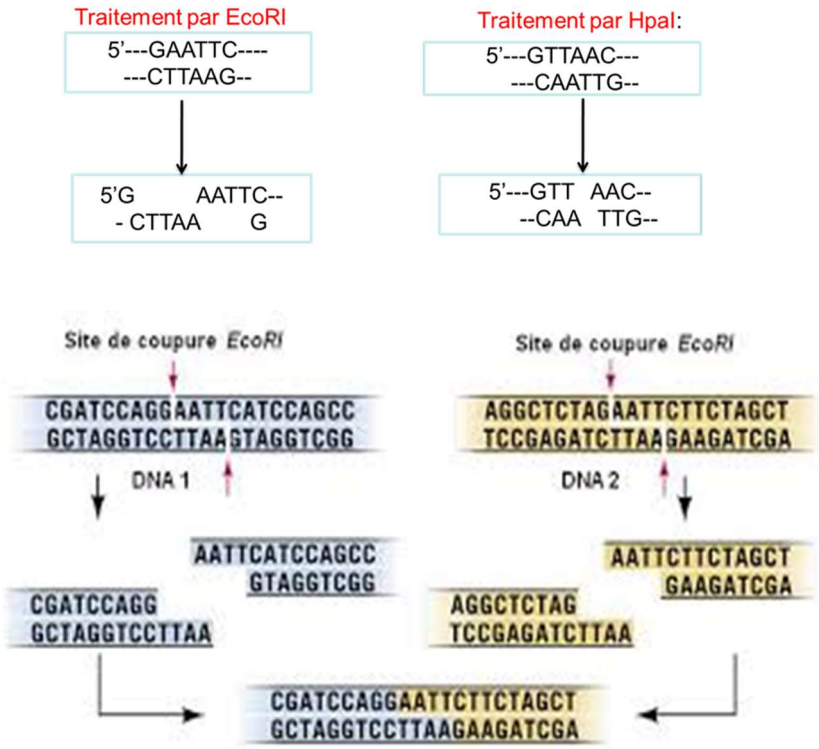



***Figure 14 - Exemple de Digestion avec les Enzymes de Restriction***

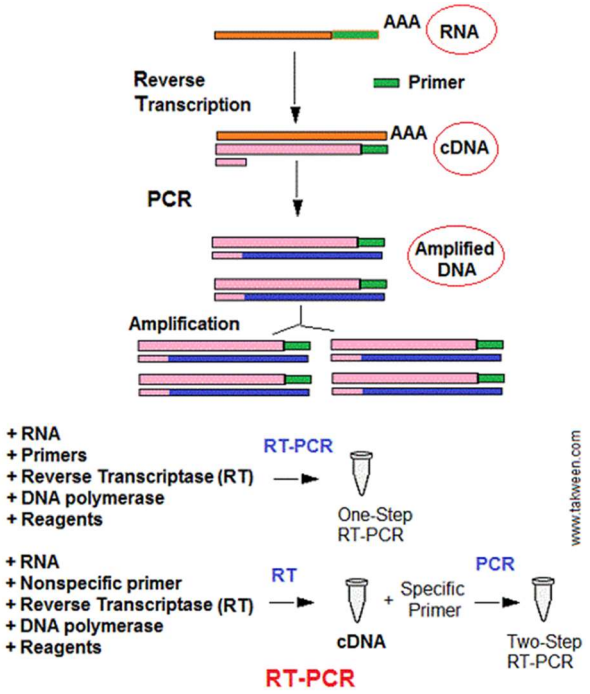
## II.5 Synthèse de cDNA et production des protéines recombinantes

C'est l'une des applications biotechnologiques pour la production des protéines recombinantes qui sont des protéines produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. Il s'agit de

protéines recombinantes élaborées par des cellules dont le DNA a subi des modifications par recombinaison génétique. Par comparaison aux procaryotes, le DNA des eucaryotes est constitué d'introns et d'exon. Il n'est pas possible d'utiliser le DNA génomique pour le clonage du DNA d'eucaryotes. On fait recours à l'utilisation du RNA messager (mRNA) qui avait subi une maturation et correspond aux exons uniquement.

La mRNA est récupéré à partir des cellules qui expriment la protéine d'intérêt. On passe par les étapes d'extraction des ARN totaux et purification des mRNA (1 à 2% possèdent une queue polyA), chromatographie sur colonne oligo-dT (Chromatographie d'affinité exploitant la queue 3' poly(A) des mRNA) et reconversion du mRNA en en DNA par la transcriptase inverse (technique RT-PCR).

Pour produire une protéine il faut disposer essentiellement d'un vecteur et d'une cellule hôte. Le système idéal pour produire une protéine recombinante comporte les éléments suivants : le vecteur d'expression, la cellule hôte, l'expression de la protéine, l'extraction et la purification de la protéine recombiné.




### II.5.1 Vecteur d'expression

Il doit être stable et en grand nombre de copies dans la cellule hôte, posséder un promoteur fort et inductible. Pour exprimer une protéine recombinante, un vecteur doit avoir un promoteur, une origine de réplication, une séquence codante, un marqueur de sélection, un site de liaison aux ribosomes et un signal de recombinaison, Certains vecteurs peuvent contenir des gènes pour des protéines de fusion (TAG) qui facilitent la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité. Les TAG les plus utilisés sont la Glutathione S-transferase et ((His) 6 (6 résidus d'histidine).

### II.5.2 Cellule hôte

IL doit se multiplier en grande densité dans des fermenteurs. Son temps de génération doit être court et impliquant un milieu de culture à coût faible. La cellule hôte peut appartenir à des bactéries, levures, cellules d'insectes et cellules de mammifères.

### II.5.3 Expression de la protéine

La protéine doit être soluble et sécrétée dans le milieu de culture.

### II.5.4 Extraction et purification de la protéine recombinante

La protéine recombinante doit être soluble et facile à extraire et purifier. L'exemple connu des protéines recombinantes est l'insuline recombinante, la première protéine humaine produite par biotechnologies en 1979 et commercialisée en 1982.

L'insuline est sécrétée par les cellules ß des îlots de Langerhans du pancréas. Elle exerce un effet hypoglycémiant. L'insuline est administrée aux personnes touchées par le diabète qui est une maladie caractérisée par l'augmentation du taux du sucre dans le sang et les urines

L'insuline est constituée de deux chaînes polypeptidiques (51 acides aminés en tout) ; les chaînes A et B 21 et 30 acides aminés, respectivement et reliées entre elles par 2 ponts disulfures et 1 pont disulfure intrachaîne dans la chaîne AE.

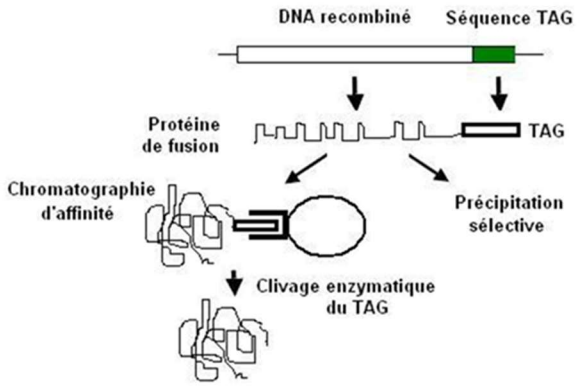



*Figure 15 - Purification de protéines recombinantes par chromatographie d'affinité*

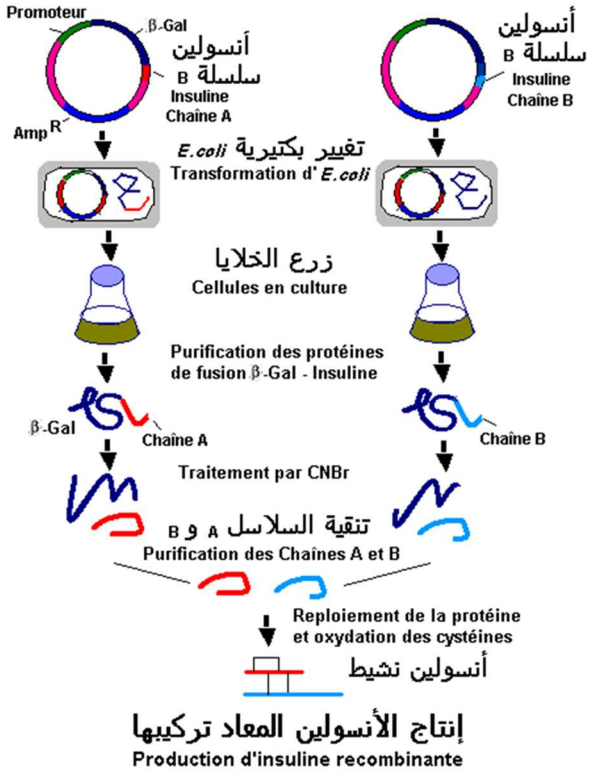



*Figure 16 - Exemple de production de protéine recombinante (insuline)*

## II.6 Détermination de polymorphisme entre génomes par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La technique RFLP repose sur la digestion d'un DNA cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par le DNA. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un DNA sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).

### II.6.1 Technique RFLP

Cette technique comporte les étapes suivantes :

- Extraction et purification de DNA
- Digestion de DNA pure par des enzymes de restriction connaissant les séquences de 3 à 9 nucléotides en générant des fragments d'ADN
- Séparation des fragments par électrophorèse sur gel après amplification par PCR
- Transfert des fragments sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (southern blotting et leur hybridation avec les sondes marquées

### II.6.2 Sources de Polymorphisme

- Les mutations ponctuelles entraînant un gain ou perte de site de restriction
- Les mutations de types insertion ou délétion

Si deux individus diffèrent par un ou plusieurs sites ou, même, par la distance séparant deux sites identiques consécutifs, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par l'enzyme de restriction. Les milliers de fragments obtenus sont transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (Southern, 1975) et hybridé par un DNA sonde, le DNA cible digéré est visualisé par autoradiographie, si la sonde est marquée au P32 (sonde chaude) ou par méthodes biochimiques si la sonde est non radioactive (sonde froide).

Les variations dans le génome c'est-à-dire séquences d'ADN comprend des séquences codantes et des séquences non codantes

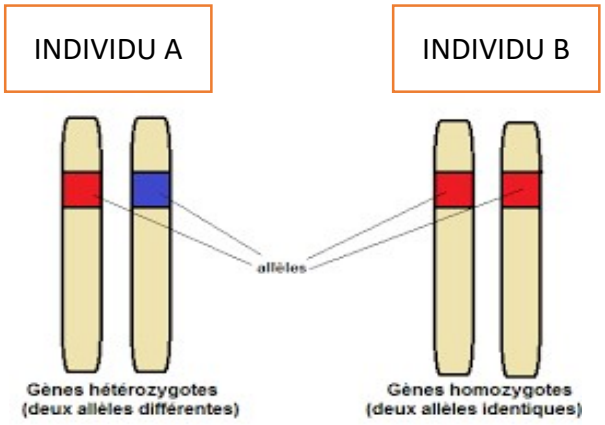



***Figure 17 - Une paire de chromosome***

Restriction Fragment Length Polymorphism

| | |
|---|---|
| Site de coupure EcoRI | GAATTC<br>CTTAAG |
| Pas de coupure en cas de modification du site | GACTTC<br>CTGAAG |

Il s'agit souvent du polymorphisme d'un seul nucléotide.

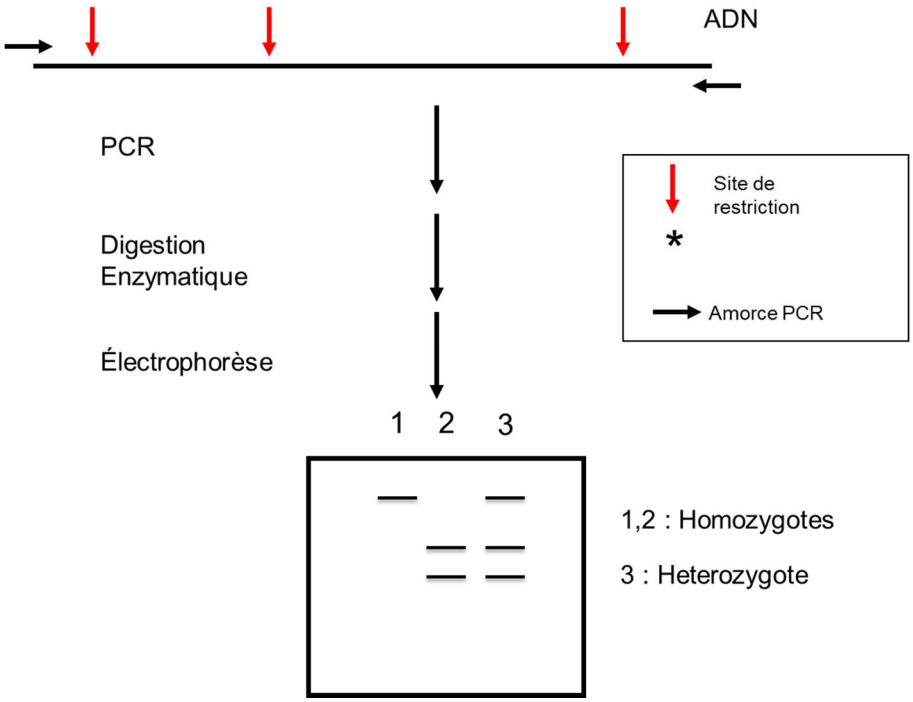
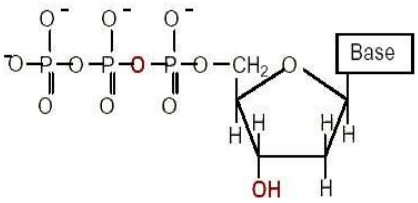
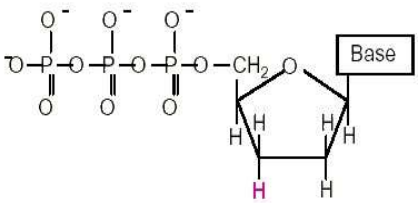



*Figure 18 - Illustration de polymorphisme par RFLP*

## II.7 Séquençage : nucléotide Méthode de Sanger




Déoxyribonucléotide triphosphate (dNTP)




Didéoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP)

**ddNTP : analogues structuraux des dNTP.**
**ddNTP : incapables de réaliser une liaison phosphodiester.**
**ADN polymérase incorpore dNTP ou ddNTP.**

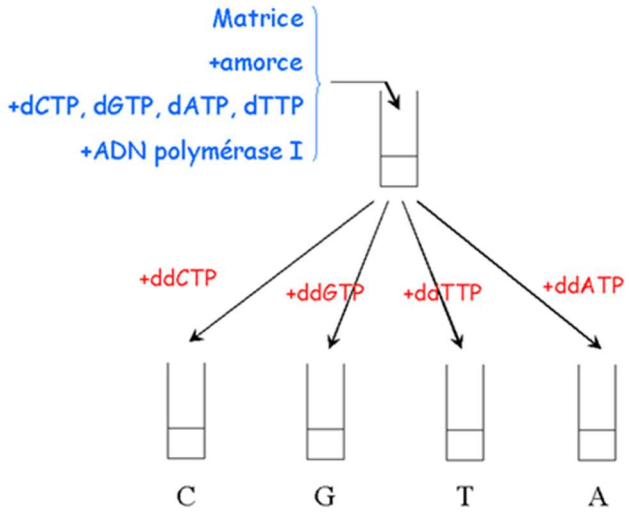



*Figure 20 - Méthode de Sanger*

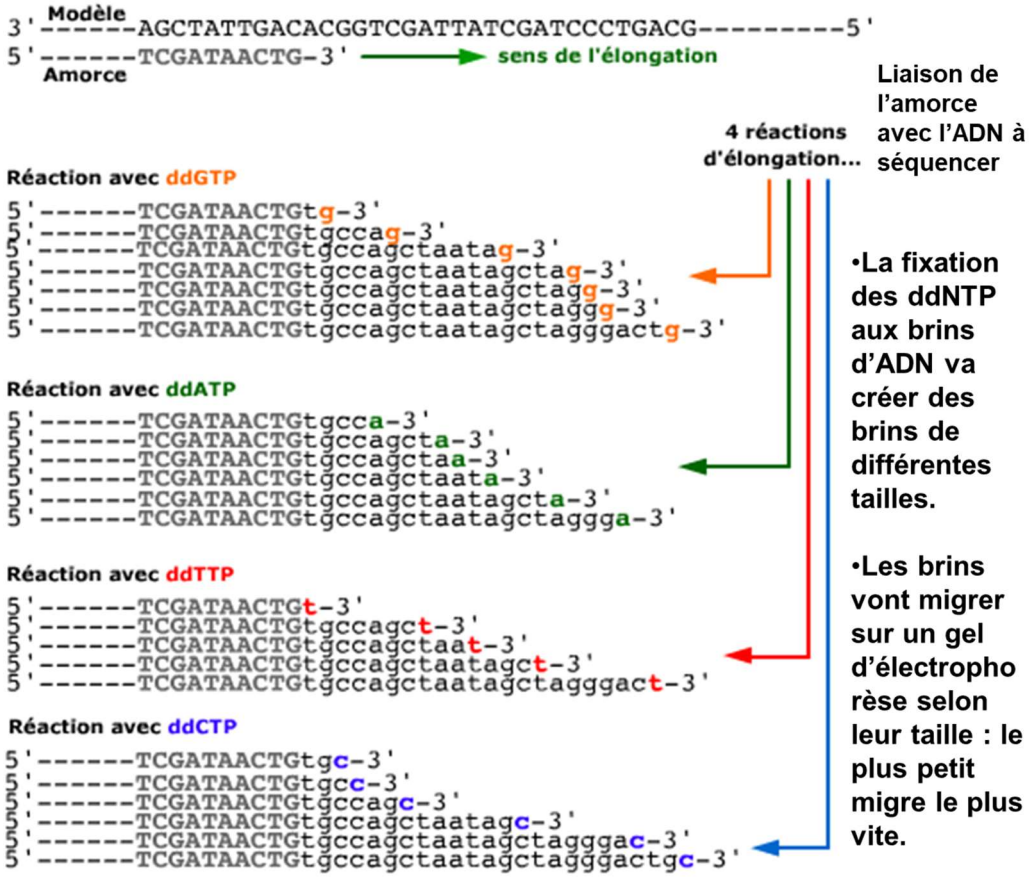



*Figure 21 - Illustration de la méthode de séquençage d'ADN*

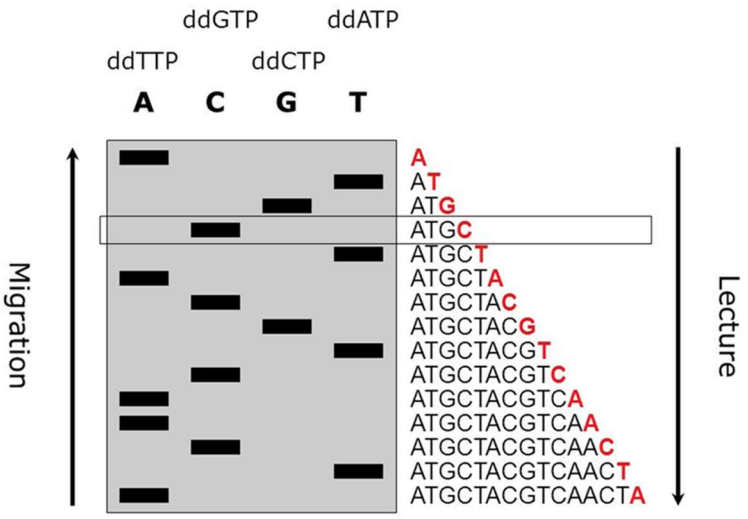



***Figure 22- Autoradiographie du gel de séquence***




***Figure 23 - Migration des différents brins synthétisés sur un gel d'électrophorèse***

## III. Réplication de l'ADN

La constance ou la stabilité de l'ADN résulte de deux processus : la réplication et la réparation. La réplication transmet l'information génétique au cours de la vie de la cellule par la division mitotique. Ainsi, le DNA doit être dédoublé pour que chaque cellule fille reçoive un génome complet identique à celui de la cellule mère de départ. Les mécanismes impliqués dans la réplication du DNA ont d'abord été élucidés chez les procaryotes. Par la suite, ils seront abordés des eucaryotes ou ce processus est moins bien connu. Les mécanismes de réparation des molécules d'ADN s'imposent lorsqu'elles sont abîmées.

### III.1 La réplication chez les procaryotes

Lorsque l'information est transmise, d'une cellule mère à deux cellules filles, les copies (positif et négatif) doivent être représentées dans les deux nouvelles cellules. Le modèle propose que chaque copie conserve

un des deux éléments du modèle (d'où l'expression semi conservative associée à cette duplication), le négatif ancien et un positif nouvellement synthétisé va être hérité par une cellule fille, le positif ancien et un négatif nouvellement synthétisé étant hérité par l'autre cellule fille.

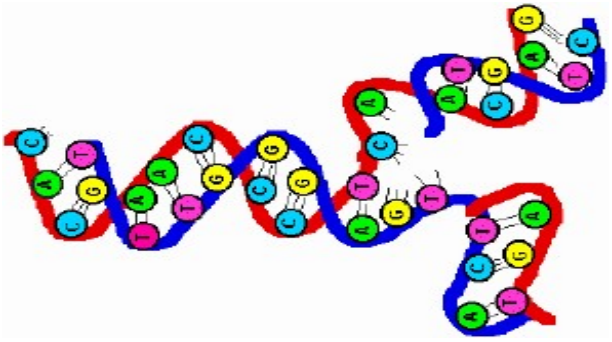


***Figure 24 - Réplication de double brin d'ADN***

### III.1.1 Expérience de Meselson et Stahl

Watson et Crick en 1953 ont mis au point la structure de l'ADN. Cette expérience suggère que la molécule l'ADN est une double hélice formée de deux brins antiparallèles qui peut s'ouvrir en synthétisant deux nouveaux brins, complémentaires des brins originaux.

En 1958, Meselson et Stahl ont essayé de comprendre comment cette réplication est réalisée et quelles sont les modalités qui permettent de passer d'une molécule d'ADN formée de deux brins à deux molécules d'ADN bi caténaire identiques. Pour élucider le mécanisme ou les modalités de la duplication d'un ADN bicaténaire, trois modèles (a, b et c) ont été proposés.

**Mécanisme semi conservative**

Les deux brins de la molécule mère servent des matrices de la synthèse de brin complémentaire. Les deux molécules filles ne conservent que la moitié de la molécule mère.

**Mécanisme conservative**

L'une des deux molécules filles est parfaitement identique à la molécule mère (les deux brins d'ADN sont conservés) et l'autre molécule présentent deux brins nouvellement synthétisés.

**Mécanisme Dispersive**

Les deux molécules filles ne contiennent pas de brins conservés. La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN, permettant de former les deux molécules d'ADN bicaténaires "filles".

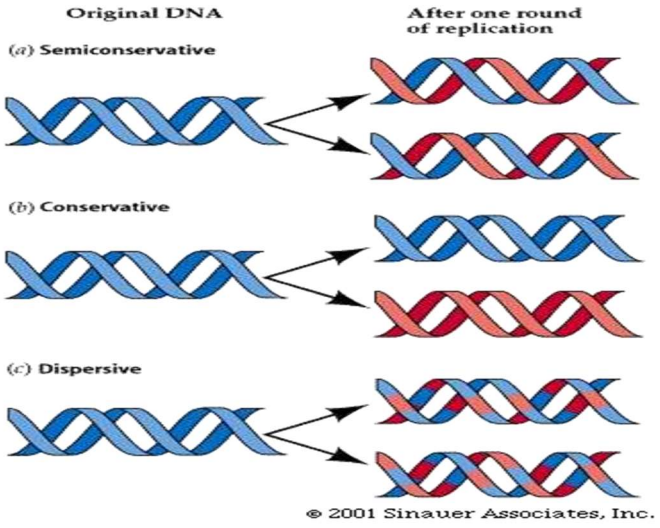



***Figure 25 - Les mécanismes de réplication proposés chez les procaryotes***

## Expérience de Meselson et Stahl

De ces trois hypothèses que l'expérience de Meselson et Stahl va devoir confirmer. En 1958, Meselson et Stahl ont démontré le caractère semi- conservatif de la duplication de la molécule de l'ADN chez les bactéries.

L'expérience de Meselson et Stahl a utilisé comme matériel biologique une cellule procaryote d'Escherichia coli qui présente l'aptitude à se diviser toutes les 30 minutes dans les conditions standard. Ceci permet d'avoir plusieurs générations et plusieurs cycles de réplications dans un temps minime.

Les expériences de Meselson et Stahl ont pu être réalisées en mettant au point les techniques suivantes :
- Mise au point de la technique d'obtention de gradient de densité par centrifugation isopycnique. Meselson et Stahl ont utilisé du chlorure de Césium de densité moyenne 1,72. Après 24h de centrifugation à grande vitesse (ultracentrifugation), ils obtiennent un gradient de densité compris entre 1,70 et 1,75), qui inclus la densité moyenne du DNA (1,710). Les densités "ρ" sont exprimées en g/cm3.
- Les cellules bactériennes ont été cultivées pendant longtemps dans un milieu contenant l'azote lourd (15N) sont repiquées sur un milieu permettant la synchronisation (pendant quelques générations) des divisions et contenant des molécules azotées 14N (azote léger). Des fractions sont prélevées après plusieurs divisions (ou générations) à différents temps d'incubation correspondant.

L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de Césium (indispensable pour ce protocole) et centrifugé à 100.000 g pendant 24h. La position des ADN est repérée par gradient de densité.

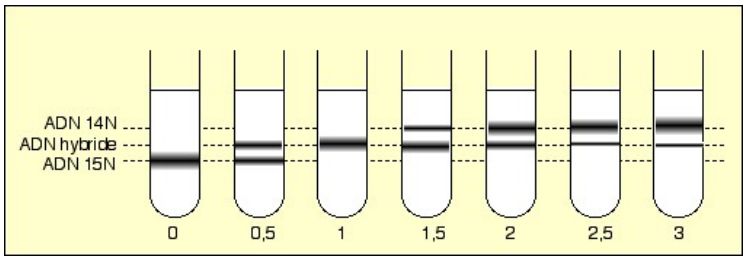



***Figure 26 - Position des différentes bandes d'ADN au cours du temps. (Les chiffres donnent le nombre de divisions (ou de générations)***

L'expérience de Meselson et Stahl montre donc la présence d'un ADN hybride au bout d'une génération cellulaire qui disparaît progressivement au profit de l'ADN "léger" 14N.

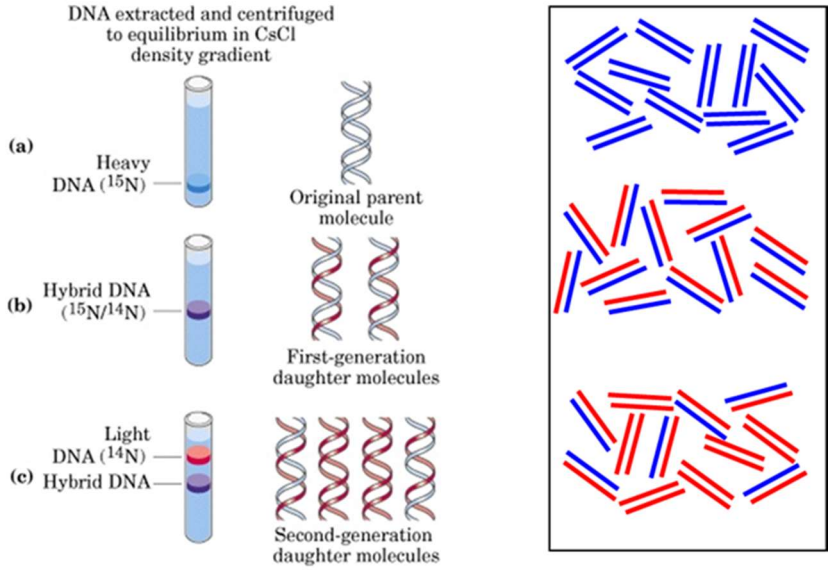



***Figure 27 - Représentation schématique de la population de fragments de DNA au cours des générations***

Après 1 génération tout le DNA est "hybride" et constitué d'un brin "lourd" 15N et d'un brin "léger" 14N.

### III.1.2 Synthèse de l'ADN in Vitro (Kornberg 1958)

Dans une cellule procaryote vivante telle que E. coli, on dispose de tous les éléments indispensables pour synthétiser de nouvelles molécules d'ADN à chaque division cellulaire. L'équipe de Kornberg en 1958 a isolé des fractions cellulaires contenant de l'ADN parental pour la synthèse d'ADN in vitro (dans un tube, en dehors du milieu cellulaire). L'expérience de Kornberg (1958) a permis de mettre en évidence que :
* la présence d'un ADN parental est nécessaire comme modèle
* la présence de précurseurs nucléotidiques triphosphates est aussi indispensable
* l'existence également de l'activité enzymatique : ADN polymérase.

Cette enzyme est capable de relier ces précurseurs et qui s'est avéré fondamentale car elle est capable d'assurer la liaison covalente (5'-3' phosphodiester) entre les nucléotides mais aussi de "choisir" en fonction de la règle d'appariement des bases.

Pour purifier et étudier cette enzyme, Kornberg a mis au point un système de synthèse in vitro à partir d'extraits d'E. coli en faisant appel à des marqueurs isotopiques des nucléotides comportant des phosphores 32 radioactifs (32P)

Ainsi si la synthèse est réalisée, le polymère résultant sera "marqué « en incorporant les précurseurs radioactifs et par la suite sera radioactif et facile à le repérer.

Kornberg décide de choisir des nucléotides triphosphorylés en 5' au lieu des monophosphorylés. Ainsi, l'hydrolyse de polynucléotides produit des mononucléotides phosphorylés en 3'. La cellule utilise effectivement des nucléotides 5' triphosphorylés et l'énergie fournie par la libération du pyrophosphate.

Dans son mélange réactionnel, Kornberg a mis de DNA modèle, de précurseurs naturels, de DNA polymérase active, auquel il ajoute des précurseurs radioactifs. Après la réaction, la radioactivité se trouvera partagée entre le DNA éventuellement synthétisé in vitro (en incorporant des monomères marqués) et l'excédent de précurseurs qui n'ont pas été incorporés

Pour éliminer l'excédent des précurseurs de nucléotides non incorporés, les macromolécules sont précipitées par adjonction d'un acide organique. Ainsi, les petites molécules « acido-solubles" sont

éliminées par centrifugation. Les macromolécules sont récupérées dans le culot, après plusieurs lavages, en se débarrassant de tout précurseur non incorporé dans la chaîne.

L'expérience Kornberg a prouvé qu'une synthèse de polydésoxyribonucléotide est réalisable in vitro mais n'a pas montré que le DNA synthétisé soit conforme au modèle de départ ni que la synthèse soit une réplication semi-conservative.

Par la suite, l'isolement de mutants conditionnels thermosensibles chez E. coli a permis d'identifier les protéines jouant un rôle primordial dans la réplication. C'est ainsi qu'il est montré que l'enzyme « réplicative » n'était pas la DNA polymérase I, mais la DNA polymérase III.

### III.1.3 Réplication de l'ADN in vitro (Goulian, Kornberg et Sinsheimer 1958-1968)

Une autre équipe a suivi le travail de Kornberg pour synthétiser in vitro d'un DNA "biologiquement actif « Cette activité biologique a été détectée par la capacité d'infection d'un DNA de bactériophage ΦX 174. En effet, Les bactériophages utilisent essentiellement, pour leur réplication, les protéines de la machinerie de leur hôte (E. coli dans notre cas).

L'expérience a été menée par l'équipe de Goulian entre 1958 et 1968 pour vérifier si l'information génétique au niveau de l'ADN synthétisé in vitro est conforme à celle qui se trouve sur l'ADN modèle.

Le modèle choisi (phage ΦX 174) correspond à une molécule circulaire d'environ 5000 nucléotides seulement, une particule phagique d'un DNA simple brin appelé le brin +. Le changement d'un seul de ces nucléotides rend la molécule inactive (non infectieuse). Le but est La réalisation d'une copie infectieuse in vitro.

Le problème qui se pose que la ADN polymérase purifié ne peut que relier les nucléotides par des liaisons phosphodiester de l'extrémité 5' à 3'. Ainsi, une autre enzyme a été purifiée in vivo pour circulariser le brin d'ADN Synthétisé qui est l'ADN ligase.

Le système réactionnel in vitro est constitué par :

- ADN simple brin purifié de ΦX174 (Brin +)
- 4 dNTP (avec ou sans BrdU)
- ADN polymérase (extrait de E. coli)
- Ligase

(5-bromodésoxyuridine) au lieu de dTTP

Ce système ne peut assurer que la synthèse de brins moins (-) circulaires complémentaires du brin plus qui est infectieux. Le brin - synthétisé n'est pas infectieux. Il s'est avéré obligatoire de recommencer une synthèse in vitro en utilisant les brins - comme modèles

L'utilisation de BrdU permet de distinguer les brins - et les brins +. En effet, une fois incorporé dans la chaine de nucléotides permettra de l'alourdir est donc peuvent être séparé par une différence de densité. L'expérience est réalisée en deux étapes :

- Etape 1 : Synthèse du brin (-) à partir du brin (+) : [avec BrdU]
- Etape 2 : Synthèse du brin (+) à partir du brin (-) : [sans BrdU

**Test d'activité biologique de l'ADN (+) synthétisé in vitro :**

Capacité d'infection in vivo chez E. coli

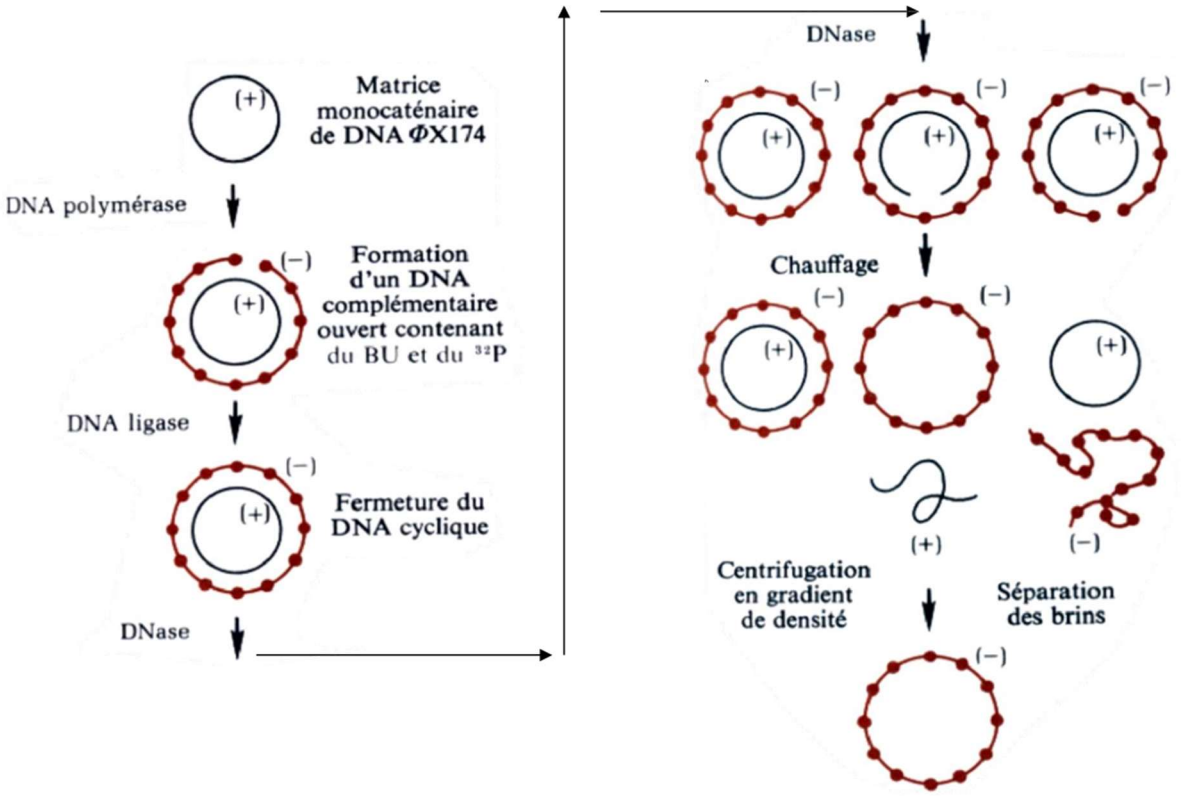



*Figure 28 - Etape 1 ; Synthèse du brin (-) à partir du brin (+)*

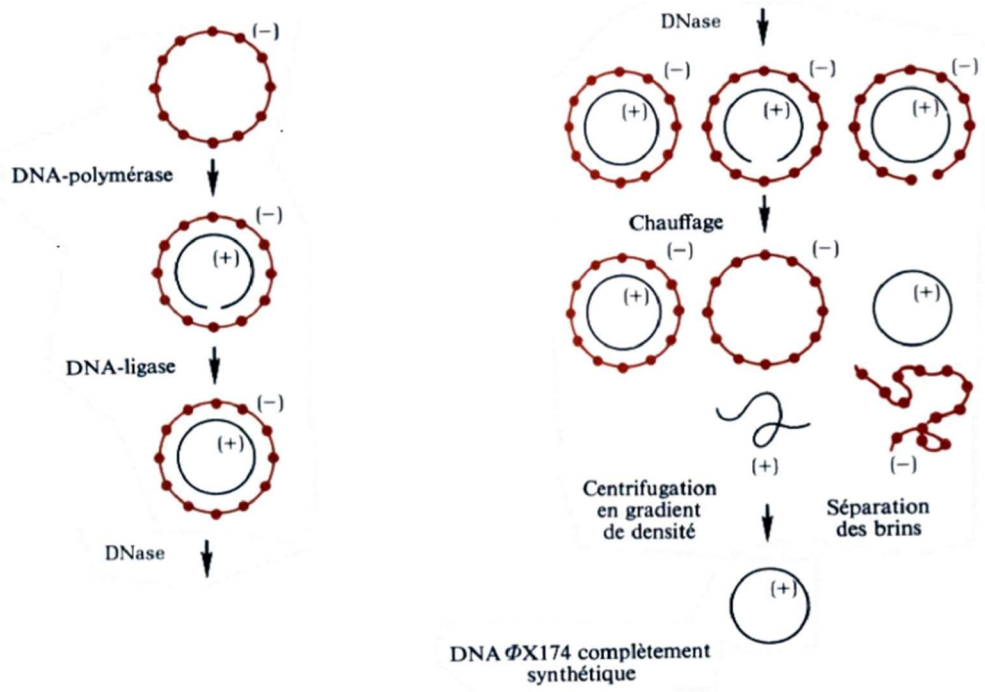



*Figure 29 - Etape 2 ; Synthèse du brin (+) à partir du brin (-)*

- L'ADN de polarité (-) obtenu à la fin de la première étape est utilisé comme modèle.
- La synthèse in vitro durant la deuxième, étape se fait en l'absence de BrdU. Le brin (-) contient déjà du BrdU et qui est plus dense que le brin (+) qui sera obtenu en fin de deuxième étape. La centrifugation isopycnique permet de les séparer
- Le brin (+), isolé en fin de la deuxième étape est utilisé pour tester son activité biologique, c'est-à-dire sa capacité à être reconnu par E. coli et induire la multiplication phagique.
- L'expérience de Goulian entre 1958 et 1968 a permis de montrer que les différentes activités enzymatiques et précurseurs utilisés permettent une synthèse in vitro conforme à l'information génétique de départ.

**<u>Mise en évidence de nouveaux intervenants</u> :**

- Ligase
- ADN polymérase III
- Primase, amorcesRNA

### III.1.4 Observation de Cairns (1962)

Cairns [1962] a été le premier à observer un chromosome entier d'E. coli en cours de réplication en employant des techniques de marquages isotopiques et d'autoradiographie suivis d'observation en microscope électronique.

Les cellules bactériennes ont été cultivées dans un milieu contenant de la thymidine tritiée (marquage isotopique) à faible activité spécifique, pendant un temps dépassant la durée du cycle. Cairns a mis au point une méthode de lyse de la cellule qui permet de libérer le DNA directement sur une grille de microscope électronique en le recouvrant d'une émulsion photographique toute en minimisant les risques de cassures mécaniques de la molécule.

Les observations préliminaires ont montré que le chromosome d'E.coli est circulaire, forme très répandue chez les procaryotes, les virus et le DNA des organites (mitochondries et chloroplastes) des cellules eucaryotes.

Cairns a déduit à partir des images obtenues que la réplication commence en un seul point du chromosome bactérien à partir duquel se forme un « œil » qui ne cessera de grandir jusqu'à ce que deux chromosomes bactériens soient obtenus.

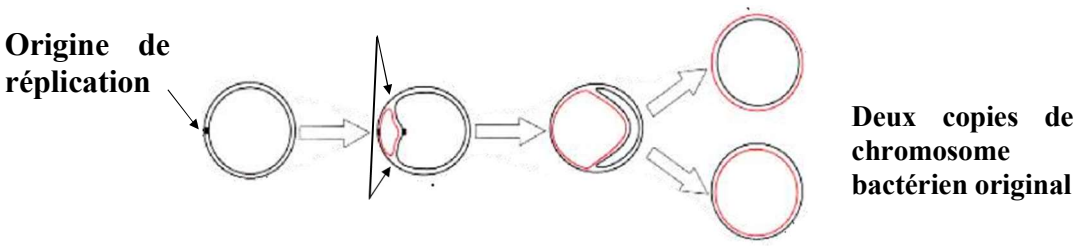



***Figure 30 - Fourches de réplication bidirectionnelle***

D'autres chercheurs ont ajouté à un marquage long par la thymidine tritiée à faible activité spécifique un marquage très bref par de la thymidine tritiée à forte activité spécifique. Après autoradiographie, l'intensité des grains permet de distinguer deux marquages correspondant à de grains d'argent appelés « fourches de réplication».

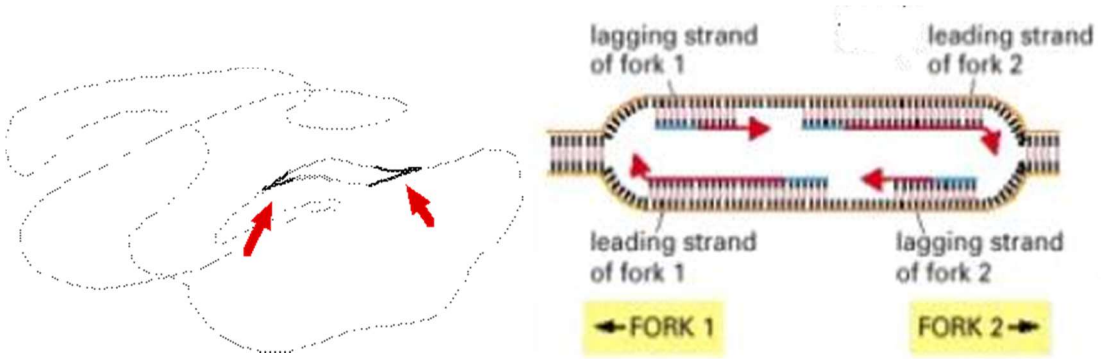



***Figure 31 - Fourches de réplication chez les procaryotes par Cairns en 1962***

Le système enzymatique responsable de la réplication fonctionne à partir du point d'initiation ou « origine de réplication » au niveau de deux fourches qui migrent en sens inverse et se rejoignent en un point opposé du site d'initiation appelé « terminus ».

### III.1.5 Les mécanismes de la réplication

Les études génétiques et biochimiques de la réplication ont montré que le mécanisme est complexe contrairement à ce que évoque Watson et Crick et à ce que supposer les expériences de Meselson et Stahl , de Kornberg (qui isole la réplication de son contexte cellulaire) ou de Cairns (qui fixe une image instantanée).

Les mécanismes de réplication de l'ADN, comportent trois étapes : le début, ou première étape d'initiation, la deuxième d'élongation et la dernière de terminaison.

**Initiation**

La réplication d'un chromosome bactérien est étroitement liée au cycle de croissance. Chez E. coli, l'origine de réplication se situe à l'intérieur du locus génétique appelé « oriC » . Ce dernier contient quatre sites de fixation (9 paires de bases chacun) pour la protéine initiatrice appelée « Dna A ».

La protéine « Dna A » forme un complexe, de 30 à 40 molécules, autour duquel l'ADN oriC est enroulé. Chacune des 30 à 40 molécules se fixe à une molécule d'ATP. L'ensemble de ce processus requiert le surenroulement négatif de l'ADN ce qui facilite la fusion "ou désappariement" de trois séquences répétées de 13 pb riches en AT qui s'ouvrent pour permettre la fixation de la protéine « Dna B ».

Le Dna B » est une ADN hélicase (déroulase) qui casse les liaisons hydrogènes qui unissent les 2 brins de l'ADN. L'énergie est nécessaire est fournie par l'hydrolyse d'ATP. Il existe plusieurs types d'hélicases: Rep protéines, hélicases II et III).

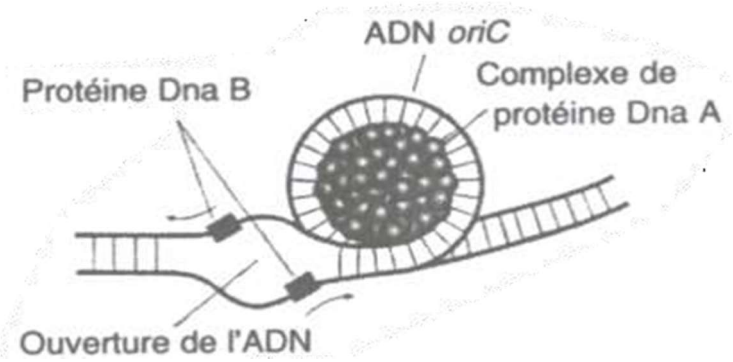



***Figure 32 - Les enzymes impliquées dans l'initiation de la réplication***

Les brins de l'ADN ainsi séparés sont stabilisés sous forme simple brin grâce à la fixation des « protéines SSB » (ou 'single strand DNA binding'). Ces protéines sont des tétramères de 74 kDa. Cette association rigidifie les deux brins de l'ADN, les empêche de se réassocier et les protège des cassures.

Les ADN hélicases doivent se déplacer le long des brins matrices pour ouvrir la double hélice. La vitesse de déplacement est estimée entre 500 à 1000 nucléotides par seconde. Les torsions engendrées sont éliminées d'une façon permanente par par des topoisomérases de type I et II appelées aussi « ADN gyrases. Ça qui permet la progression de la fourche de la réplication

La synthèse de l'ADN par les ADN polymérases ne peut se faire que par élongation à partir d'une amorce (primer). Cette amorce est synthétisée par un complexe protéique appelé « primosome ». Il est constitué d'une RNA polymérase appelée « primase ».

L'acide oxolinique et la novobiocine agissent comme des inhibiteurs efficaces de l'ADN gyrase de la réplication bactérienne. Par conséquent, ils jouent le rôle un d'antibiotique.

**Surenroulements de L'ADN**

Les DNA hélicases se déplacent le long des brins matrices pour ouvrir la double hélice (500 à 1000 nucléotides par seconde en enlevant les tours hélicoïdaux au niveau de la fourche de réplication. Ainsi, le DNA parental circulaire fermé tourne à raison de 50 à 100 tours par seconde sou forme de surenroulements positifs. D'où ma nécessité des surenroulements négatifs de DNA pour la compensation qui permettent la progression de la fourche de réplication. Cette fonction est assurée par des topoisomérases de type I et II appelées aussi « DNA gyrases ».

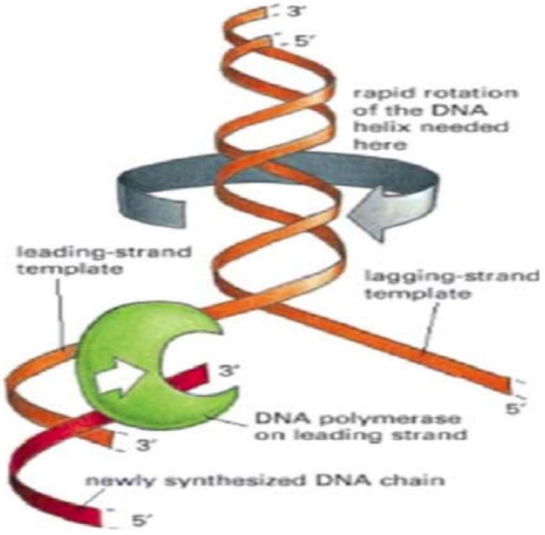



***Figure 33 - Schéma illustrant le mécanisme de réplication et les surenroulements de l'ADN***

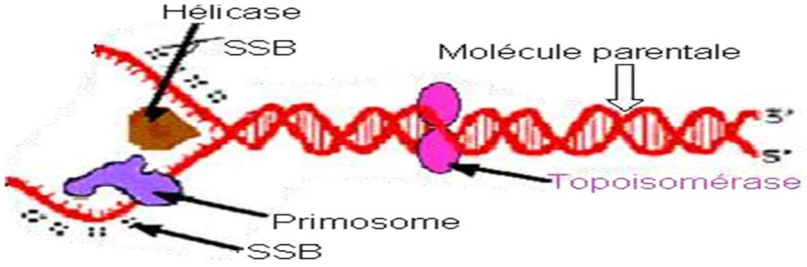



***Figure 34 - Les enzymes impliqués au cours de la réplication***

**Elongation**

L'élongation d'un nouveau brin d'ADN au niveau de la fourche de réplication est catalysée par l'ADN polymérase III. Cette enzyme synthétise en effet, un brin complémentaire à partir de l'extrémité 3'OH libre de l'amorce RNA en utilisant l'ADN comme matrice. La synthèse se fait donc dans le sens 5'→3'. Les protéines SSB sont chassées au fur et à mesure de l'utilisation du brin matrice est répliqué. - Les deux brins complémentaires à l'ADN parental doivent être synthétisés dans le sens 5'→3'. La synthèse se fait d'une façon continue sur le brin dit «le brin direct», «brin principal», «brin précoce» ou «brin avancé». Sur l'autre brin la synthèse se fait de manière discontinue dit «brin indirect», «brin secondaire», « brin tardif » ou « brin retardé.

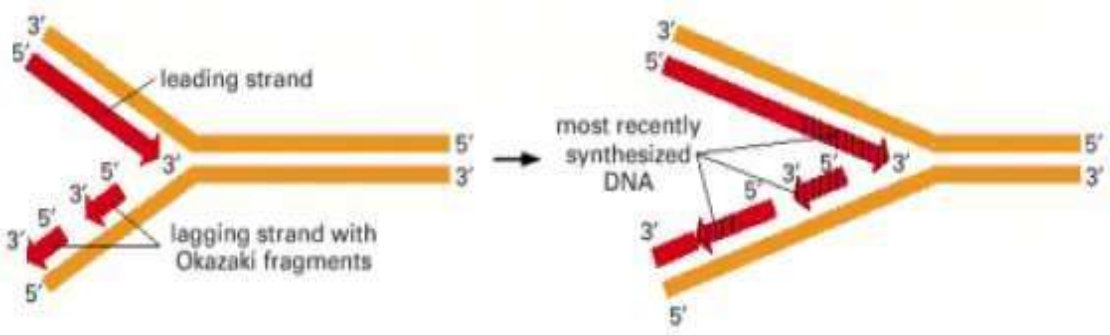



***Figure 35 - Schéma de réplication des deux brins précoces et tardifs***

L'ADN polymérase III est une enzyme très complexe composée de plusieurs sous unités codées chacune par des gènes de structure.

L'enzyme située sur l'autre brin (brin retardé) synthétise de l'ADN de manière discontinue sous forme de petits fragments (1000 à 2000 pb) appelés fragments d'Okazaki. L'ADN est ensuite ouvert par les hélicases, une nouvelle amorce est synthétisée sur le brin 5'→3', les synthèses reprennent jusqu'à ce que le brin retardé soit entièrement répliqué.

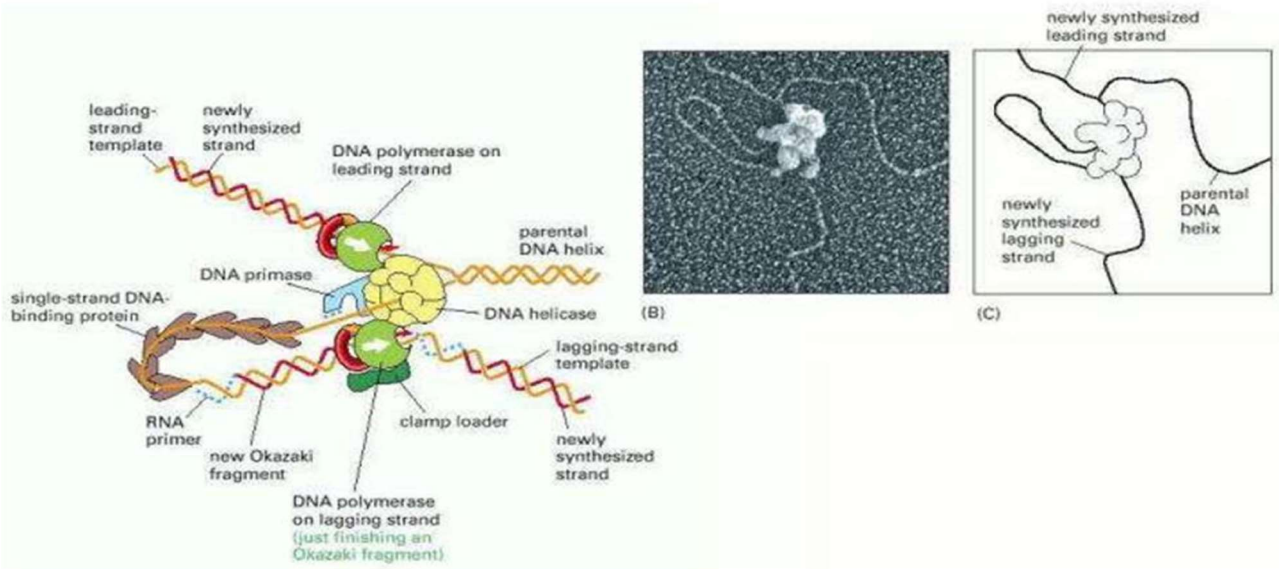



***Figure 36 - Fourche de réplication procaryote en déplacement***

Lorsque l'ADN polymérase III introduit un nouveau nucléotide, le taux d'erreur au niveau de l'ADN néosynthétisé est estimé de 10-9. Les ADN polymérases sont capables de détecter les erreurs qu'elles ont commises et de les corriger immédiatement. Cette activité de contrôle-correction ou « proofreading » des polymérases est dû d'une activité 3' exonucléasique que possèdent ces polymérases.

**Terminaison**

Les amorces sont détruites par une activité « RNase H » qui détruire spécifiquement le RNA des hybrides RNA- ADN de l'amorce. Ce qui entraîne une lacune qui sera comblée par l'action de « l'ADN polymérase I ». Enfin, vient le rôle de l'enzyme « ADN ligase » qui permet de souder le brin discontinu en créant une liaison phosphodiester entre une extrémité 3'OH libre et un nucléoside triphosphate libre. L'ADN ligase de E. coli utilise le cofacteur NAD+ comme source d'énergie.

Les deux fourches de réplication se rencontrent au terminus approximativement à 180° de l'oriC. Les deux cercles résultants restent inter-liés. Ils sont dissociés par la « topoisomérase qui joue ici un rôle de démêlage.

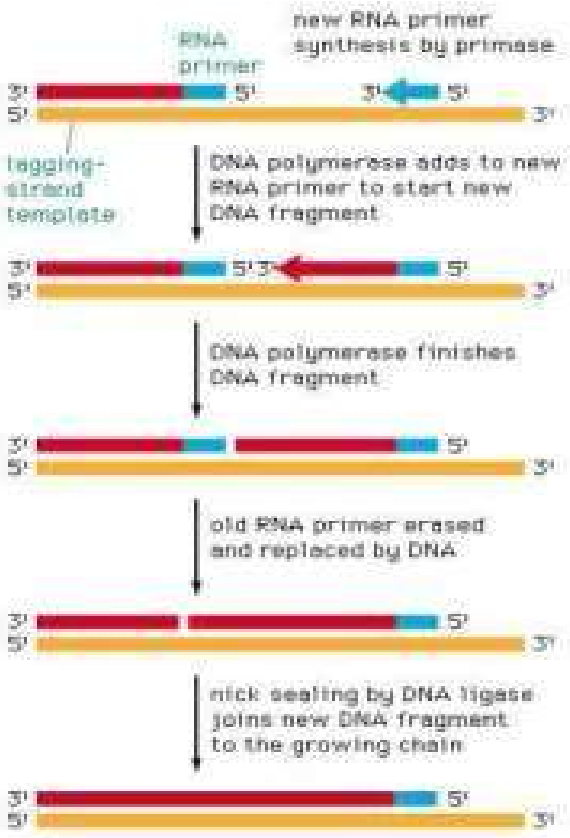



***Figure 37 - Réplication discontinue du brin tardif***

## III.2 Réplicationchez les eucaryotes

La réplication chez les eucaryotes est généralement semblable à celle des procaryotes avec certaines spécificités

**Spécificités du génome eucaryote**

- Sa localisation : il se trouve dans le noyau cellulaire alors que les bactéries ne possèdent pas de noyau
- Sa taille : le génome eucaryote est plus grand que le génome procaryote.
- Son organisation : le génome eucaryote est sous forme de chromosomes formés d'ADN linéaire double brin organisé sous forme de chromatine.

- Sa structure : en nucléosome pour faciliter la condensation de l'ADN dans le noyau. La vitesse de réplication chez les eucaryotes est 10 fois plus faible que les procaryotes (50 nt /S)

Le mécanisme global de réplication chez les eucaryotes est comparable à celui des procaryotes. Elle se fait de manière :

- Bidirectionnelle
- Complémentaire
- Antiparallèle dans le sens 5' ----3' avec des amorces RNA, Fragments d'Okazaki, brin retardé et brin avancé

Dans la cellule Eucaryote, les chromosomes comportent des molécules linéaires d'ADN très longues et il existe plusieurs origines de réplication par chromosome, également caractérisées par des séquences précises.

La réplication chez les eucaryotes débute simultanément en plusieurs points d'un même chromosome (50 000 à 100 000 réplicons dans une cellule de mammifère et 400 chez la levure Saccharomyces cerivisiae.

Sur un même chromosome, il y a plusieurs OR, à partir desquelles il y a deux fourches de réplication. A partir de chaque point quand il y a activation, il se forme un oil de réplication avec les deux fourches qui vont progresser dans les sens opposés (bidirectionnelle). Les portions de fragments répliqués s'appelles les réplicons.

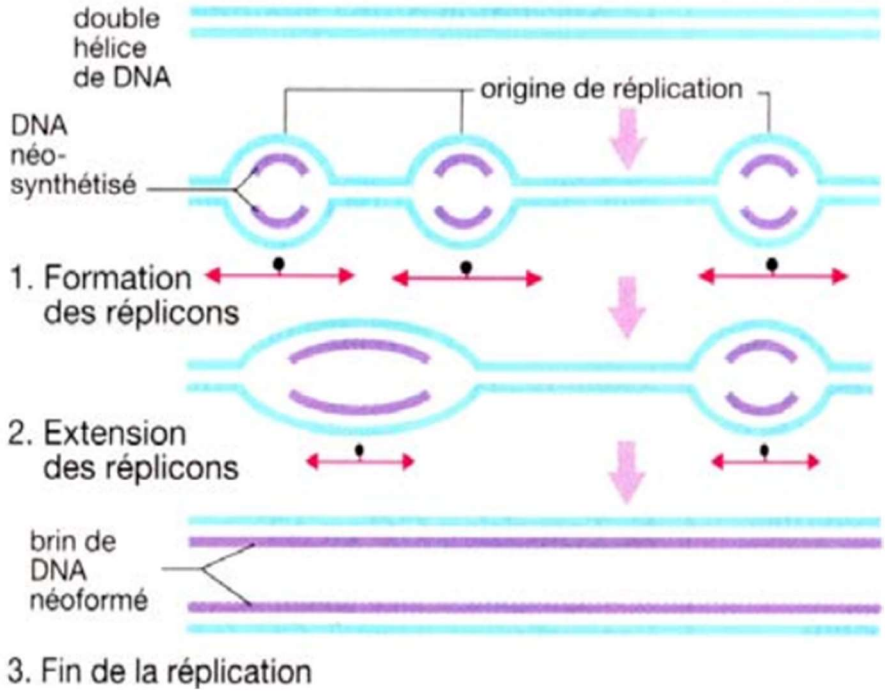



***Figure 38 - Réplication de la double hélice d'ADN des Eucaryotes***

Suivant l'état de condensation de la chromatine, la réplication s'effectue après une activation plus ou moins tardive : si la chromatine est décondensée, elle est répliquée plus précocement, car elle offre une meilleure accessibilité aux enzymes et est donc plus apte à être répliquée. En revanche, si la chromatine est fortement condensée, alors la réplication aura lieu beaucoup plus tard.

### III.2.1 Cycle Cellulaire

Le cycle cellulaire est une autre spécificité des cellules eucaryotes. Le cycle est subdivisé en plusieurs phases : la phase de mitose et les interphases G1, S et G2. Les événements qui aboutissent à la réplication

ont lieu juste avant que la cellule ne se divise en deux cellules filles. La réplication intervient pendant la phase S du cycle cellulaire (synthèse de l'ADN et des histones dure 7 à 8 heures).

Il existe dans le cycle cellulaire, deux points cruciaux de contrôle (2 check points) : R et T.

R : Le passage de la phase (G1) à (S) est régulé par des « cyclines » et des « protéines kinases cycline dépendantes » (Cdk-2 et Cdk-4).

T : Le passage de la phase (G2) à (M) est régulé par la « cycline B », la (Cdk-1) et l'intervention de « kinase-kinase » tels que CAK et (wee-1) et de phosphatase (cdc-25). Les divers enzymes seront activés ou inactivés par phosphorylation ou déphosphorylation.

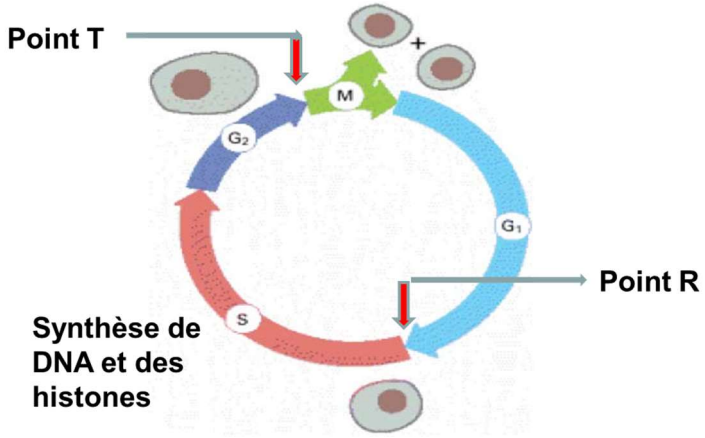



***Figure 39 - Cycle cellulaire des Eucaryotes***

### III.2.2 Origines Et Initiations

Chez les eucaryotes, la réplication d'un génome se fait par groupes d'environ 20 à 50 réplicons (répartis en tandem) se lancent simultanément à des moments définis de la phase S. Ceux qui répliquent au début de la phase S abondent en euchromatine alors que ceux activés en fin de phase S contiennent essentiellement de l'hétérochromatine. Le DNA centromérique et le DNA télomérique se répliquent à la fin.

Les séquences correspondantes aux origines de réplication chez les mammifères n'ont pas encore été bien définies

### III.2.3 Les Enzymes Et Protéines Eucaryotes

Les différentes enzymes et protéines intervenant dans la réplication eucaryote sont :

- Les hélicases : pour séparer les brins parentaux

- Les protéines RFA : pour maintenir les 2 brins séparés (ce sont les équivalents des protéines SSB chez la bactérie)

- Les topoisomérases : pour éliminer les surenroulements.

- La primase (qui est une ARN polymérase ADN dépendante) : pour synthétiser les amorces d'ARN

- L'ADN polymérase eucaryote : il y en a 5 : α, β, ϒ, δ, ε.

**ADN POL δ** :

C'est une ADN polymérase ADN-dépendante. C'est l'enzyme principale de la réplication des deux brins fils :

- Elle réalise la réplication totale du brin avancé en 5’□3’ (initiation et élongation)
- Elle réalise la majorité de la réplication du brin retardé (élongation
- Elle a une activité polymérasique en 5’□3’ et une fonction d’édition en 3’□5’.
- Sa capacité de l’enzyme à rester associer sur le brin d’ADN parental est régulée par un anneau ou clamp, qui est une protéine particulière nommée la PCNA (Proliferating Cellular Nuclear Antigen).
- Elle intervient aussi sur la finition des brins d’ADN (pour combler les lacunes).

**ADN POL α** :

- Elle intervient uniquement sur le brin retardé pour initier la réplication.
- Elle est associée à la primase : elle prend le relai direct au niveau des fragments d’Okazaki eucaryote (100-200 nt), **sur** le brin retardé.

**ADN POL ϒ :**

Elle est impliquée dans la réplication de l’ADN mitochondrial et présente une activité exonucléasique.

**ADN POL ε, ADN POL β** :

Elles sont impliquées dans la réparation de l’ADN

### III.2.4 Modèle de la Réplication chez les Eucaryotes

Le DNA est déroulé au niveau de l’origine de réplication grâce à au moins une topoisomérase, une hélicase et au facteur « RF-A ».

Les nucléosomes sont déroulés en amont des fourches de réplication puis reconstitués en aval. De nouveaux nucléosomes sont également assemblés exclusivement à partir de nouvelles molécules d’histones.

Les nucléosomes nouveaux et préexistants sont répartis d’une façon équitable entre les deux brins fils.

Durant la phase S, le doublement du DNA est parallèlement accompagné du doublement du contenu en histones de la cellule.

- Addition de nouvelles histones en arrière de la fourche de réplication CAF : Facteurs d’assemblage de la chromatine

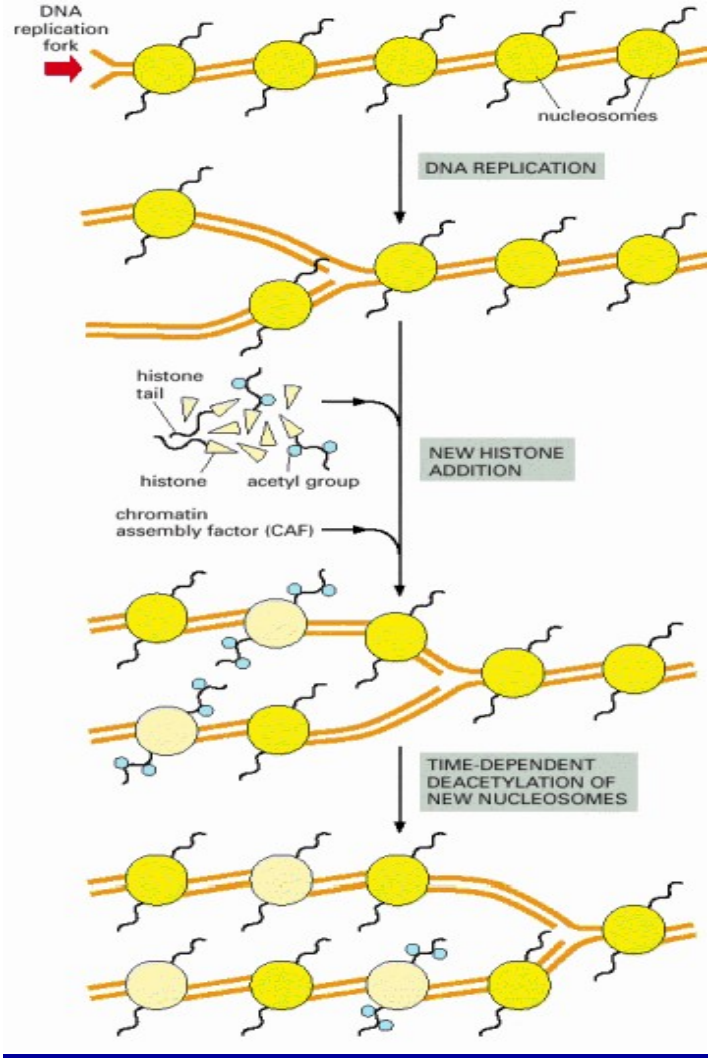



***Figure 40 - Facteurs d'assemblage de la chromatine (CAF) au cours de la réplication***

**Sur le brin retardé**

La « polymérase α-primase » interagit avec le facteur RF-A et synthétise une amorce RNA d'une longueur d'une dizaine de nucléotides. Cette amorce est ensuite allongée grâce à l'activité DNA- polymérasique de polymérase α associée au « facteur RF-C » (une vingtaine de désoxynucléotides). Le fragment d'Okazaki est ainsi amorcé. L'association du « PCNA » (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et d'ATP provoque l'arrêt de la polymérase α et permet la fixation de la « polymérase δ » qui reconnaît l'extrémité 3'OH néosynthétisée et démarre alors la réplication. l'ADN POL δ élonge le fragment en synthétisant de l'ADN.

Pour la finition du brin retardé, La « polymérase β » et « ligases » se chargent de la finition du brin retardé après excision des RNA amorces et remplit la lacune jusqu'à rencontrer le 1er nucléotide du fragment suivant.

La polymérase α libérée est transloquée avec ses protéines accessoires

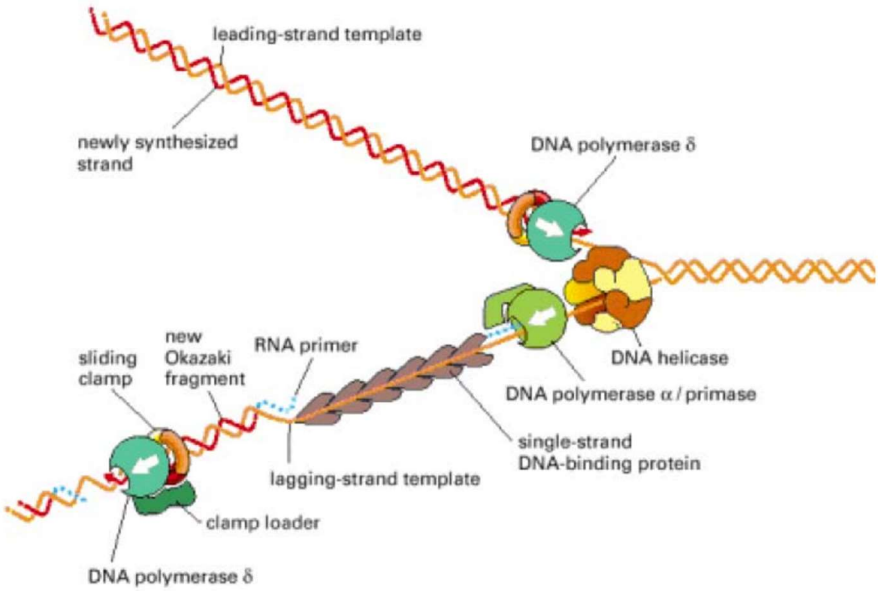



***Figure 41 - Schéma Général de la Réplication chez les Eucaryotes***

**Surlebrin direct**

La réplication est amorcée suivant le même principe. Le brin direct est répliqué en continu alors que la synthèse s'arrête sur le brin retardé environ 250 nucléotides plus loin. Un nouveau fragment d'Okazaki est ensuite initié et ainsi de suite

### III.2.5 Réplication desTélomères

Chez les eucaryotes, les extrémités des chromosomes ou « télomères » sont constituées de centaines de séquences riches en G, non codantes, répétées en tandem (250 à 1500 copies) avec l'extrémité en 3' surplombant l'extrémité 5'.

Une enzyme appelée « télomérase » contient une petite molécule de RNA (c'est une ribonucléoprotéine) dont une partie est complémentaire à l'unité de répétition télomérique. Cet RNA agit comme un moule pour l'ajout de ces répétitions à l'extrémité 3' par des cycles répétés d'élongation et de translocation. Le brin complémentaire est synthétisé par le mécanisme comparable à celui décrit dans le cas du brin retardé. Ainsi L'amorce RNA à l'extrémité 5' du brin riche en C est hydrolysée et le brin riche en G dépassera en termes de nucléotides le brin riche en C.

En plus, les télomères sont en fait une combinaison entre le DNA télomérique et des protéines spécifiques constituant des structures appelées « capuchons télomériques »

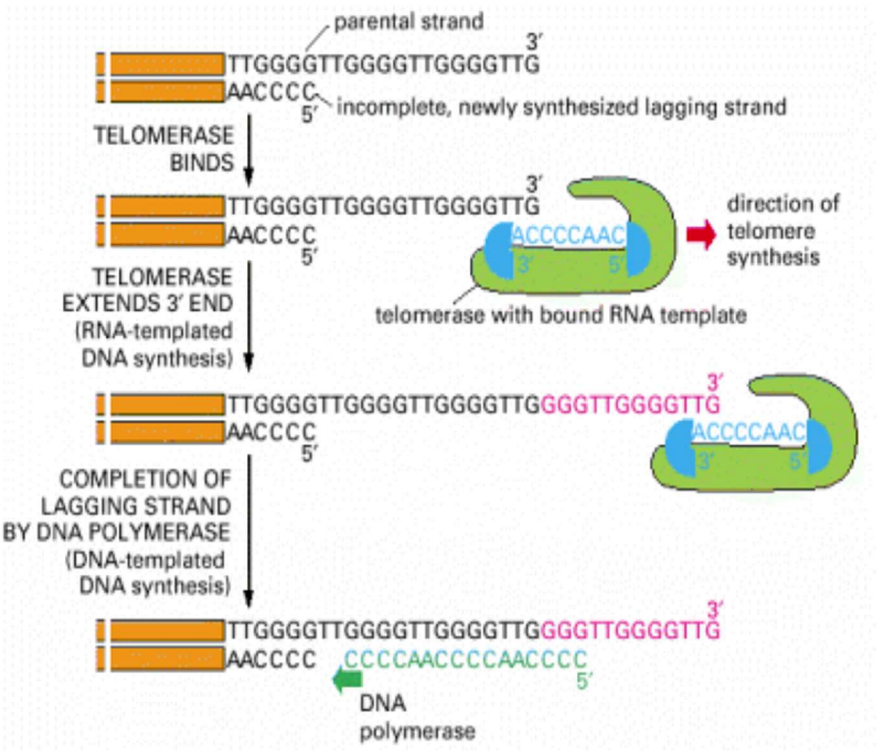



***Figure 42 - Télomères : GCGTTA chez l'homme sur 10000 bp***

### III.2.6 Modification post réplication de DNA

Chez les eucaryotes pendant la réplication, la cytosine est toujours incorporée non méthylée. Après une première réplication d'un DNA méthylé sur ses deux brins, il apparaît donc un DNA où un brin contient des cytosines méthylées tandis que l'autre brin contient des cytosines non méthylées. Il existe donc des enzymes appelées « maintenance méthylases ». Ces enzymes assurent la méthylation des cytosines sur le nouveau brin de façon à maintenir l'information contenue dans la molécule mère.

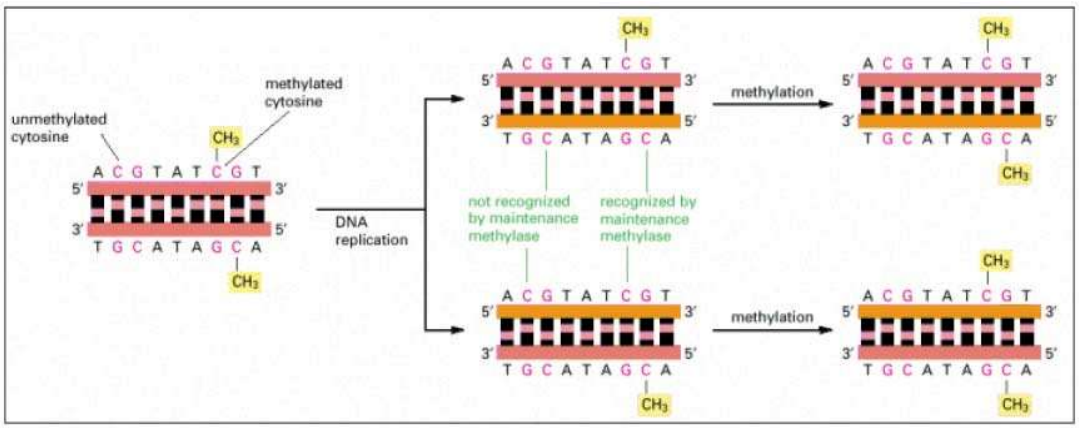



***Figure 43 - Système de réparation d'ADN post-réplication (maintenance méthylases)***

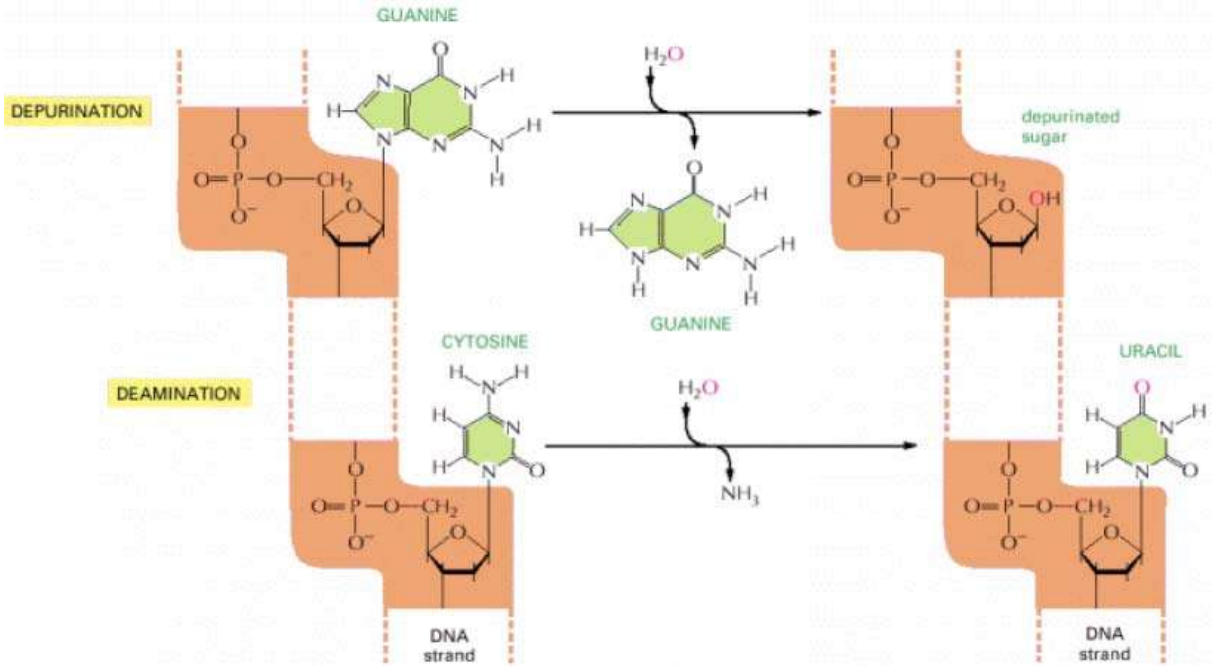
## IV. Maintien de l'intégrité du DNA et réparation

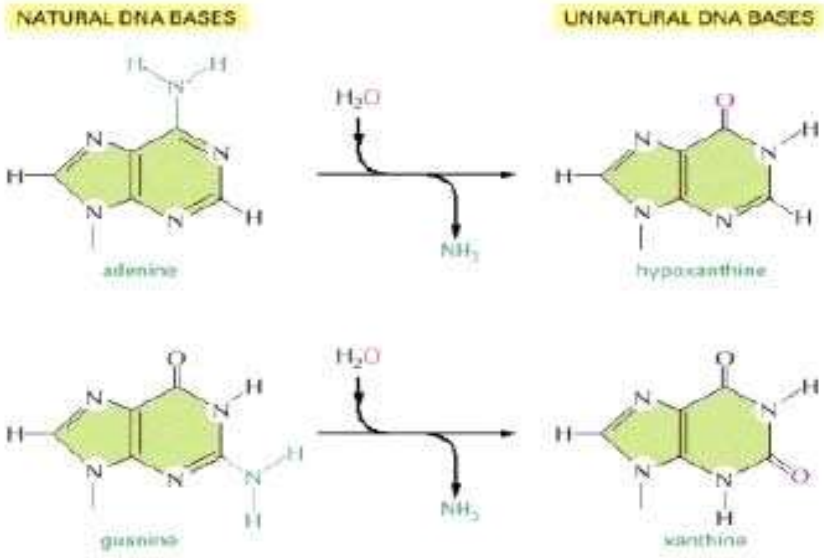
La cellule peut subir des agressions environnementales : physiques et chimiques qui entraînent différentes altérations des molécules cibles. Ces altérations de la molécule de DNA peuvent être pérennes. Pour lutter

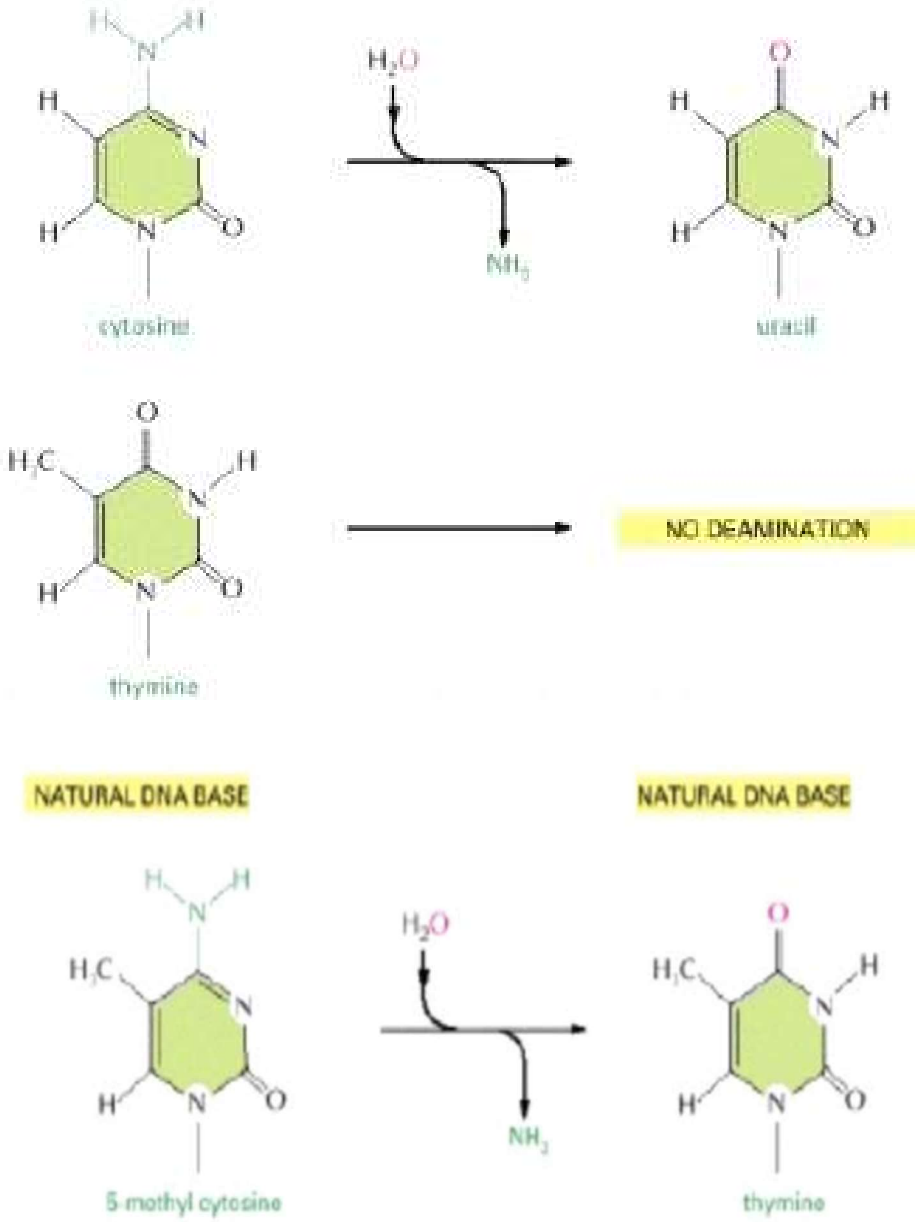
contre ces agressions, une série de systèmes cellulaires sont mises en place pour assurer le maintien de l'intégrité du DNA et la réparation de la majeure partie des altérations.

Les altérations ont lieu au cours des divisions cellulaires et entraînent l'apparition de mutations, de délétions et d'insertions. Les altérations peuvent correspondre à des dépurination, désamination, oxydation, etc.

Dans le cas des altérations provoquées par désamination, les bases modifiées obtenues correspondent à des bases azotées inhabituelles au niveau du DNA.



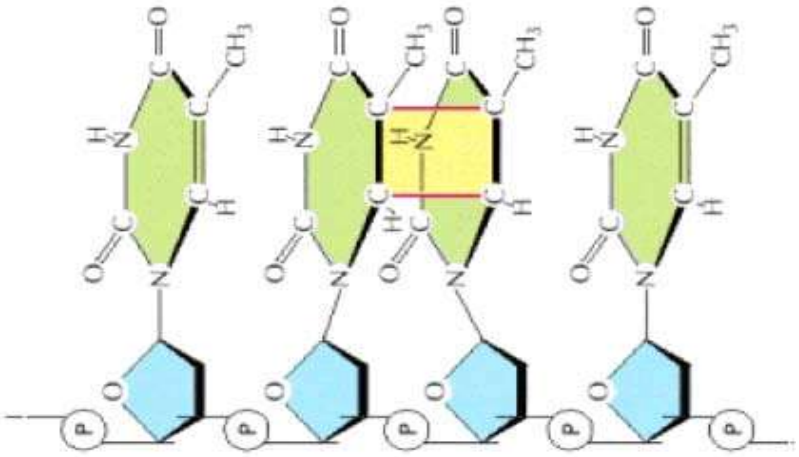



### IV.1 Altérations physiques

Les rayonnements très énergétiques « radioactivité » sont responsables des lésions :

- Directes par modification des bases, rupture de brins, etc.
- Indirectes en provoquant l'apparition d' ions superoxydes (O2-) chimiquement très réactifs.

Les rayons ultraviolets solaires (UV), moins énergétiques, induiront principalement des dimérisations de thymines adjacentes en créant un cycle cyclobutane entre les carbones 5 et 6 de chacune des thymines.



## IV.2 Altérations chimiques

Ce genre d'altération peut résulter simplement du métabolisme normal de la cellule. A titre d'exemple, les ions H+ cellulaires conjugués à l'agitation thermique peuvent disparaître jusqu'à104 bases puriques par jour et par cellule chez l'homme Quel que soit le type d'altérations, chimiques ou physiques et en absence de correction, elles peuvent engendrer des modifications pendant le cycle de réplication.

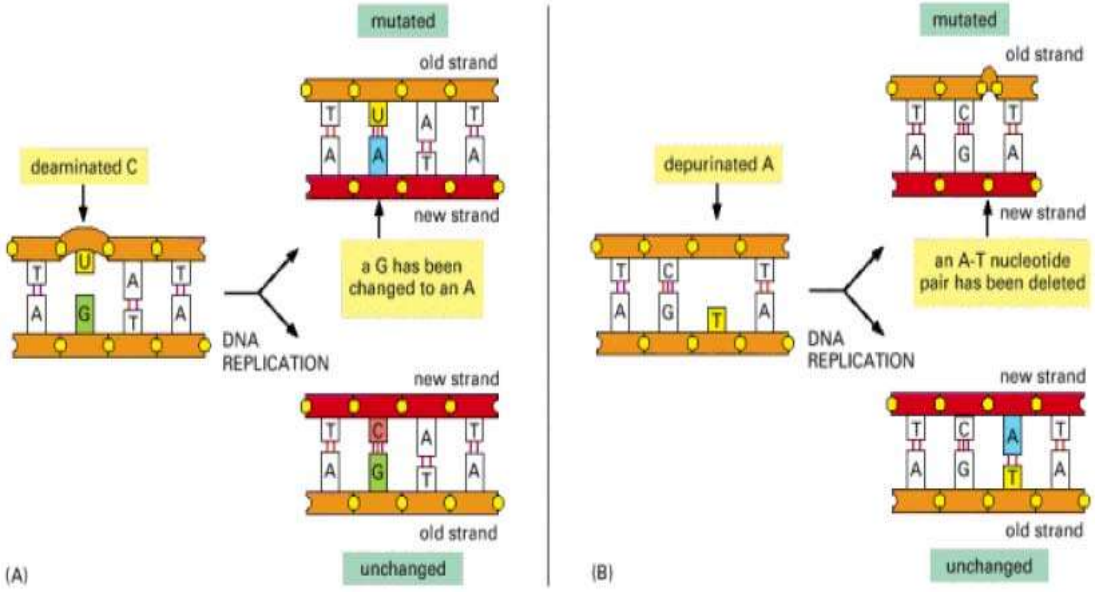



***Figure 44 - Les modifications de l'ADN engendrées par les altérations physiques et chimiques***

## IV.3 Systèmes de Sauvegarde

Le maintien de l'intégrité de DNA est assuré le système de sauvegarde. En effet, au cours de réplication, il se produit des erreurs pendant l'incorporation des nucléotides par la polymérase avec un taux de 10-9. Ceci, malgré l'action correctrice « proofreading » de cette enzyme.

### IV.3.1 Fidélité de la réplication

Il existe un autre système qui permet d'une part, de détecter le mauvais appariement et d'autre part, de reconnaître le nouveau brin où l'erreur a été commise et le couper près de la mauvaise base pour assurer ensuite à la réparation. Ce système de réparation fait intervenir une « recombinaison post réplicative » entre brins fils et brins parentaux.

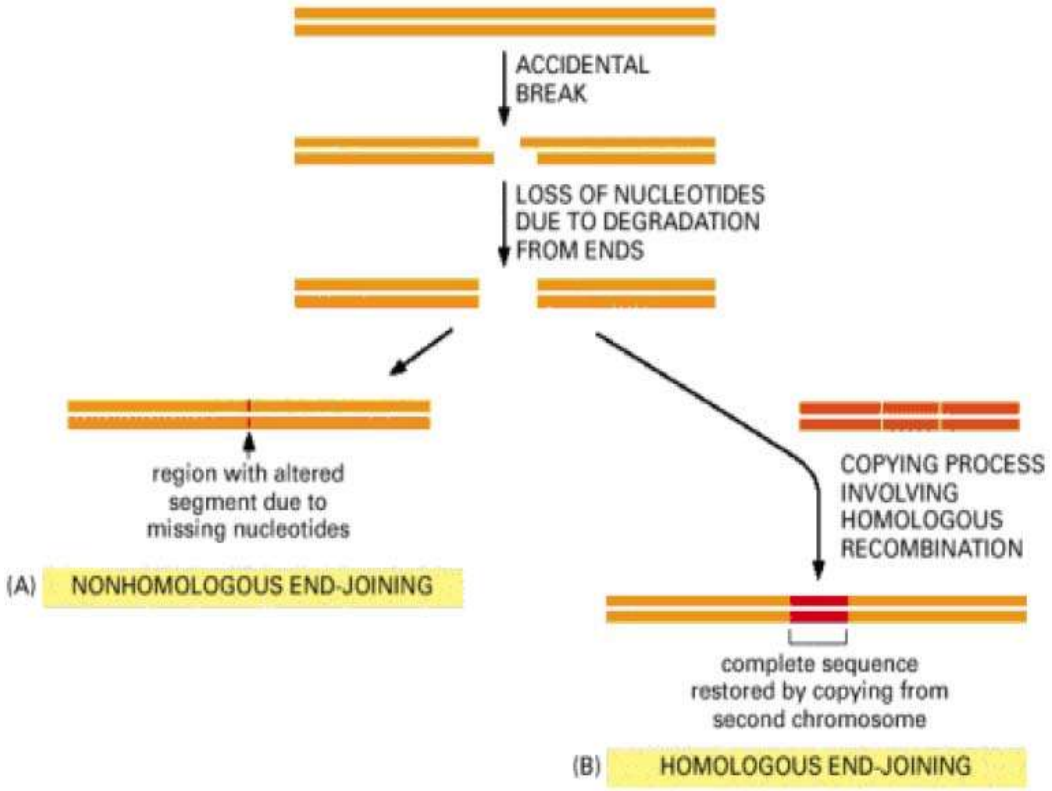



***Figure 45 - Système de réparation de l'ADN par recombinaison post réplicative***

### IV.3.2 Systèmes Préventifs

Il existe des systèmes qui permettent de prévenir les altérations par éliminations des agents responsables. A titre d'exemple :

- Les ions superoxydes (02-) sont détruits par la « superoxyde dismutase ».

- Les ions H+ sont pris en charge par les systèmes de régulation de l'équilibre acido- basique intracellulaire.

- Les oxydations sont réduites par différents systèmes plus ou moins spécifiques : « NADPH2 », « glutathion », « vitamine E »…

chez les eucaryotes supérieurs, le rein et le foie assurent une fonction essentielle de détoxification et d'élimination des substances chimiques toxiques

## IV.4 Systèmes Multiples

En dehors de la réplication, il existe des systèmes multiples qui permettent la réparation.

### IV.4.1 Réversion Directe du Dommage

Les systèmes de réversions directes du dommage sont spécifiques de chaque type d'altération. Les «photolyases» sont des enzymes qui éliminent par photoréactivité des dimères de thymine.

Les guanines modifiées (6-O-méthyl-guanine) peuvent être déméthylées grâce à des « 6-O-méthyl-guanine transférases.

### IV.4.2 Réversion en deux Phases

**Phase I**

La première phase est la reconnaissance de l'altération. Chaque type d'altération possède son propre système de reconnaissance. Par conséquent, cette phase permet l'excision de la base altérée ou d'une partie du brin de DNA où elle se trouve.

**Les glycosylases**

Ces enzymes (Uracile DNA glycosylase, Hypoxanthine -glycosylase I, II, Formimido-pyridine DNA glycosylase, Pyrimidine- dimère glycisylase) permettent la rupture des liaisons osidiques entre la base azotée et le sucre.

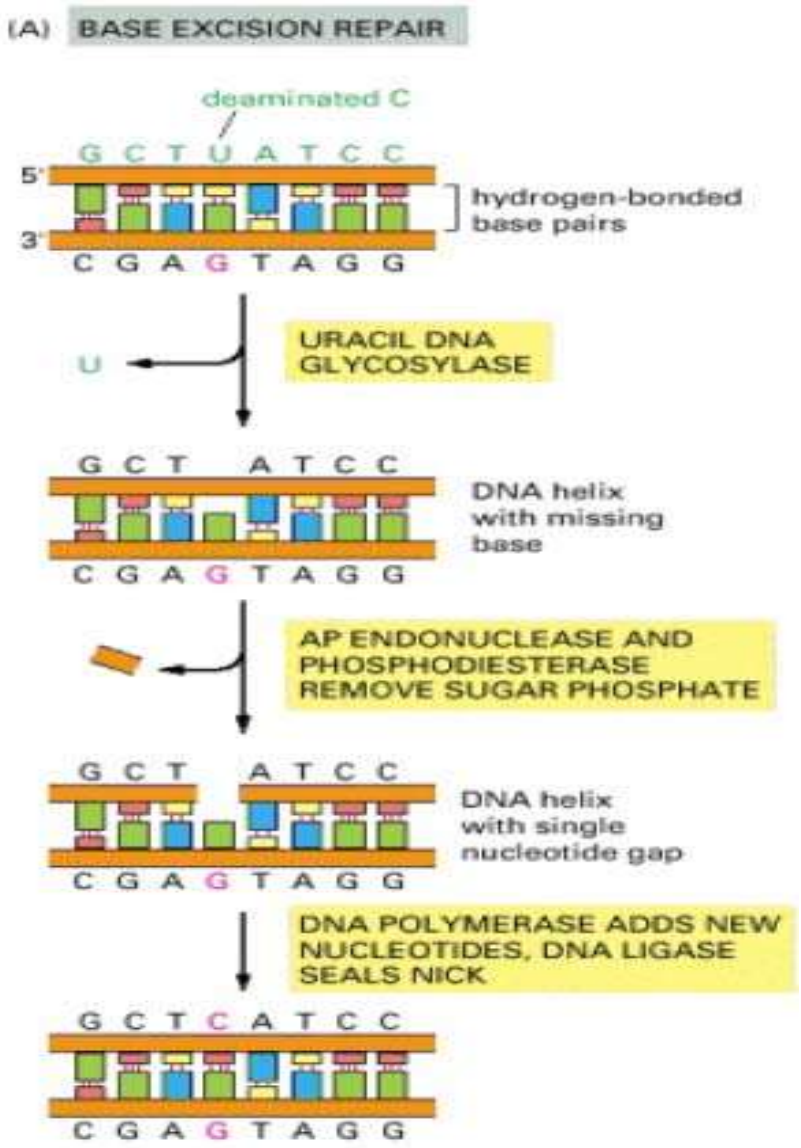



***Figure 46 - Exemple de réparation de l'ADN par réversion en deux phases***

L'action de ces enzymes « DNA glycosylases » permet l'excision de la base azotée altérée libérant ainsi un DNA dépuriné ou dépyrimidiné. Cette action peut se produire par d'autres agents comme le H+.

Par la suite des « AP endonucléases » pour effectuer une coupure endonucléasique au niveau du simple brin comportant la base altérée.

A l'exception, dans le cas de la base modifiée : 5-méthyl cytosine désaminée qui s'apparie avec la thymine, les glycolases ne peuvent pas la reconnaitre.

Par conséquent, le système de réparation ne peut pas avoir lieu et s'est avéré impuissant. Ceci engendre de mutation qui a une fréquence apparente très supérieure à celle de la plupart des autres mutations. Il s'agit de ce qu'on appelle un « point chaud de mutation » ou « hot spot ».

## Système UVR

Un autre système « UVR A, B, C » intervient pour effectuer la réparation. En effet, ce complexe moléculaire reconnaît la lésion. Il est constitué de deux molécules de type A « UVRA » associées à une molécule de type B « UVRB ». Sa fixation au DNA au niveau de la lésion nécessite une molécule d'ATP.

Le dimère de molécules A est libéré pour être remplacé par la suite par une molécule de type C « UVRC ». Le complexe BC réalise une coupure endonucléolytique de part et d'autre de la lésion pour libérer de l' DNA. L'action d'une hélicase permet de détacher le segment de DNA simple brin d'une trentaine de nucléotides et qui est situé entre les deux coupures.

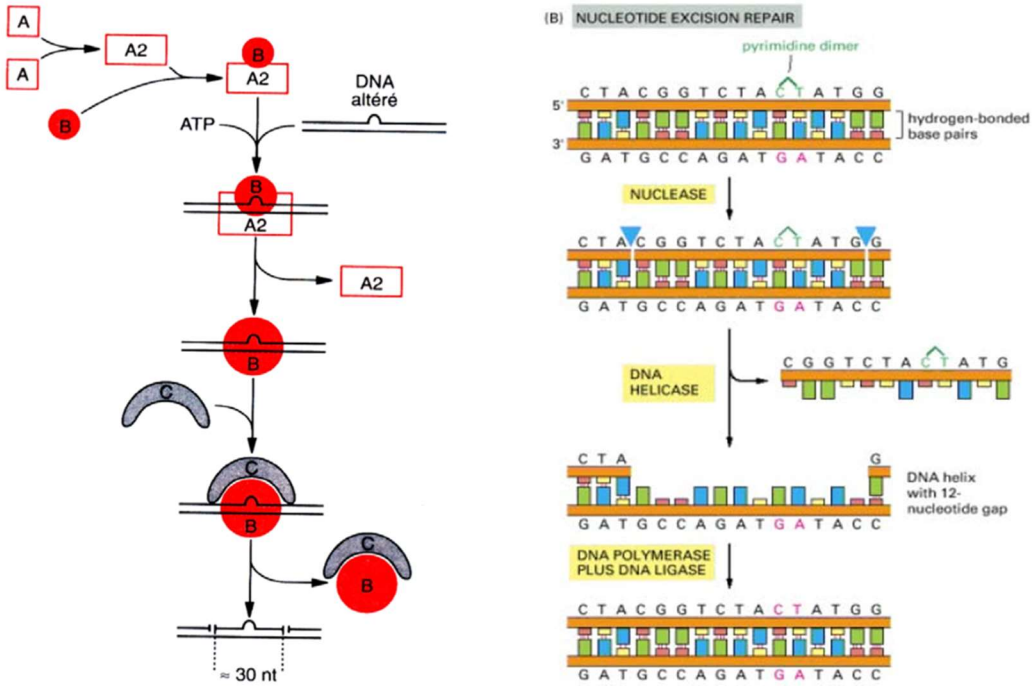



*Figure 47 - Système de réparation par système SVR A, B, C*

## Phase II

Durant la deuxième phase, on assiste au remplacement des nucléotides manquants après l'excision est assuré par l'action conjuguée d'une polymérase qui utilise le brin intact comme matrice en association avec une ligase.

Chez les bactéries, Les enzymes qui effectuent la réparation sont codées par un système de sauvegarde complexe et hautement inter-régulé appelé le « système SOS ». Ce système est composé d'une vingtaine de gènes dont les produits (enzymes) interviennent aux mécanismes de réparation et de recombinaison. Les gènes recA et lexA jouent un rôle indispensable dans ce système

**Remarque :** le dysfonctionnement des systèmes de réparation du DNA peut générer plusieurs maladies héréditaires chez l'homme comme le cancer du côlon, le cancer de la peau (sensibilité UV), syndrome de Werner ou vieillissement prématuré

# V. Variation de DNA

Des phénomènes tels que : la mutation, (délétion, insertion) la recombinaison (conversion génique), transposition) entraîne une variation de contenu de l'information de l'ADN et des modifications informationnelles qui seront héréditairement transmises.

## V.1 Les Mutations Ponctuelles

Les mutations sont des altérations permanentes et héréditaires qui touchent la séquence de base du DNA. Ce genre de variation est à l'origine des erreurs spontanées qui surviennent pendant la réplication du DNA ou de la recombinaison méiotique suite aux effets d'altérations dus aux agents physiques et chimiques sur le DNA

Les mutations les plus simples concernent le changement ou, la variation d'une seule base. Ils peuvent être :

- **Une transition** : purine est remplacé par une autre purine ou pyrimidine est remplacé par une autre pyrimidine)

- **Une transversion** : (purine → pyrimidine ou pyrimidine → purine Ces mutations se traduisent par les variations phénotypiques et peuvent être :

- **Mutation silencieuse** : lorsqu'elle touche du DNA non codant, du DNA non régulateur et n'influence pas la nature de l'acide aminé incorporé dans une protéine Par exemple: le triplet AGG remplacé par CGG (les deux codent Arg

- **Mutation faux-sens :** si elle donne naissance à un acide aminé altéré dans le produit génique. Le codon spécifie un acide aminé fonctionnellement différent.

- **Mutation non-sens :** si elle crée de nouveaux codons qui signalent la terminaison de la chaine peptidique.

Par exemple : CAG $\longrightarrow$ UAG

(Change la Gln en un codon STOP)

Les insertions ou les suppressions correspondent à l'addition ou à la perte d'une ou de plusieurs nucléotides. Ce qui entraîne des mutations à trame décalée ('frame-shift') ou la séquence d'une protéine traduite est complètement changée du côté C-terminal de la mutation.

Ce genre de mutations est à l'origine de polymorphismes génomiques qui constituent la base des diagnostics et des tests DNA.

Des mutations spécifiques sont créées par la génie génétique permettent de créer sur des segments de DNA in vitro. Par la suite, ces molécules sont introduites dans le génome d'une cellule appropriée afin d'en étudier les conséquences. Cette méthode est appelée « la mutagénèse dirigée ».

## V.2 La Recombinaison

### V.2.1 Chez les Procaryotes (E. coli)

**La recombinaison homologue**

C'est un processus qui correspond à l'échange des régions homologues entre deux molécules de DNA. On assiste à l'alignement entre deux double brins DNA homologues. Un complexe proteique RecB et RecC (issue de l'expression des gènes recB et recC du système SOS) se fixe sur le DNA (1) et se déplace sur la

double hélice en la déroulant jusqu'à ce qu'il reconnaisse la « séquence chi » (5'GCTGGTGG3'). Cette séquence symétrique est très fréquente chez E. coli . Après la reconnaissance de cette séquence, le complexe RecBC exerce une activité endonucléasique sur le brin possédant la séquence chi de l'extrémité 3' du DNA qui devient sous forme simple brin. Le brin simple s'associe à des molécules de protéine RecA. Ce qui permet d'amorcer La recombinaison. Le complexe « RecA-DNA simple brin » favorise la reconnaissance de la séquence homologue et la déstabilise en formant une structure combinée entre les deux séquences homologues. La protéine RecA est ainsi libérée. Une nouvelle coupure et deux soudures aboutissent à la formation d'une structure recombinée.

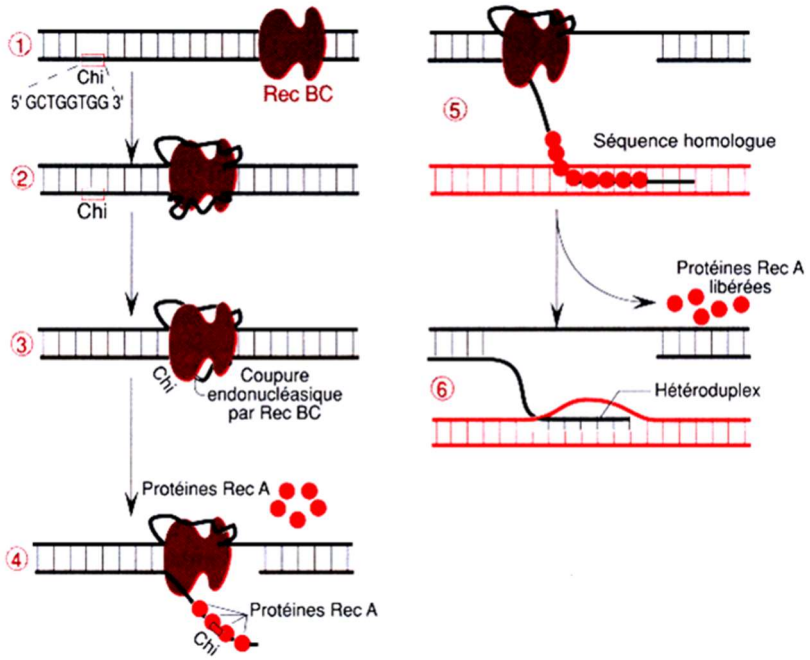
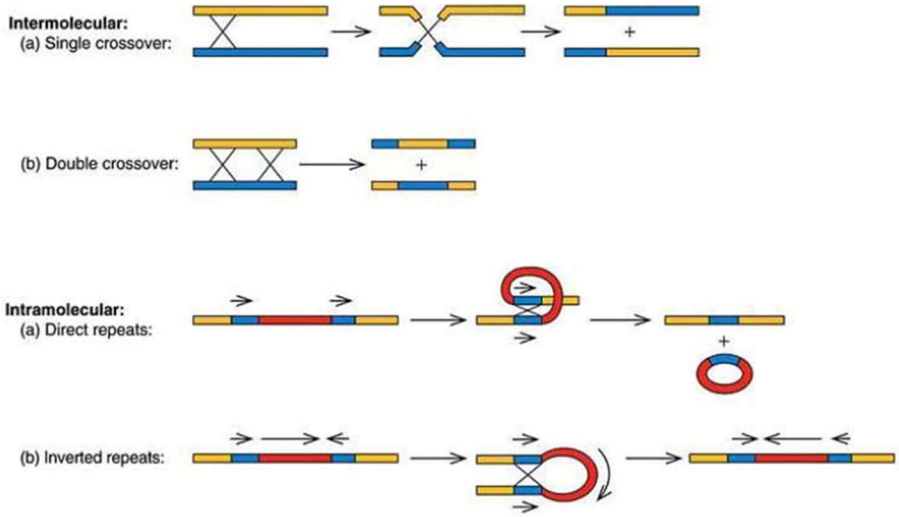



***Figure 48 - Exemple de recombinaison homologue chez les procaryotes***

La recombinaison peut se faire soit entre deux molécules différentes de DNA et on parle de recombinaison intermoléculaire, soit entre deux régions d'une même molécule de DNA et ce qu'on appelle recombinaison intramoléculaire. Les produits recombinés obtenus dépendront du nombre d'enjambement et de l'orientation des séquences homologues.




## Recombinaison spécifique du site

Le DNA du bactériophage λ circulaire s'insérer dans un site spécifique sur le chromosome bactérien d'E.coli. Le site d'attachement sur le DNA du phage présente la même séquence (15 pb) du site d'attachement sur le DNA bactérien. Une enzyme appelée intégrase du phage effectue des coupures au

niveau de ces séquences en favorise la recombinaison entre ces sites par la combinaison avec un facteur d'intégration bactérien. Ce qui permet l'insertion du DNA phagique. Cette forme intégrée ou prophage est hérité de façon stable à chaque division cellulaire jusqu'à l'activation de l'excisionase, enzyme permettant l'induction du cycle lytique.

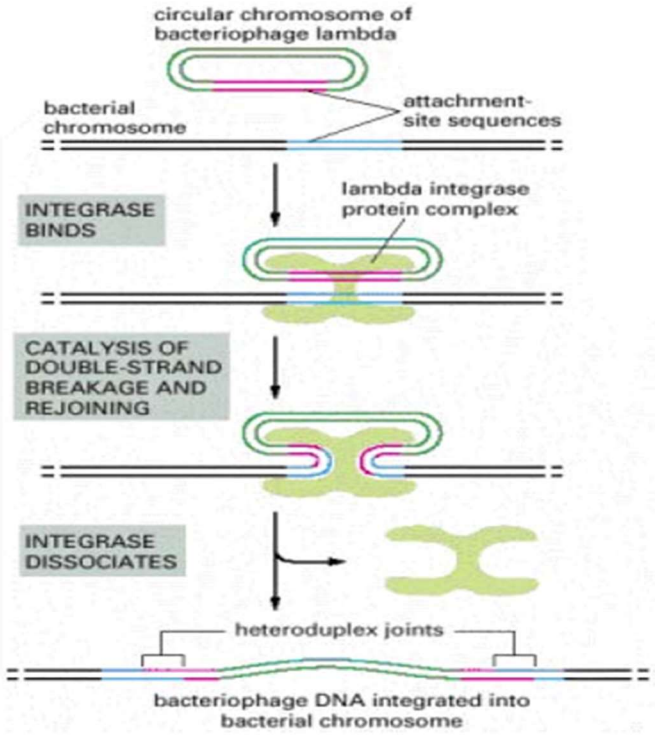
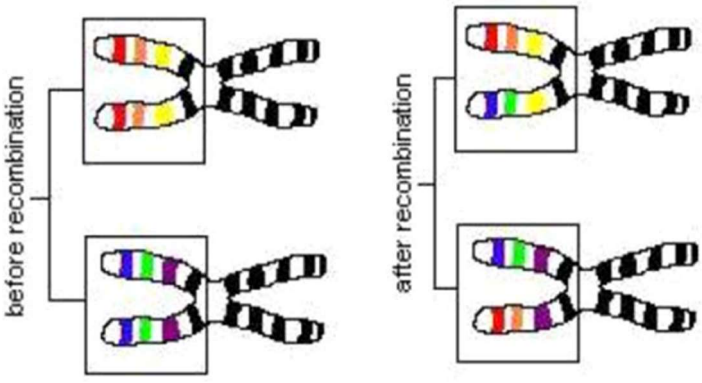



***Figure 49 - Exemple de recombinaison spécifique de site cher E coli***

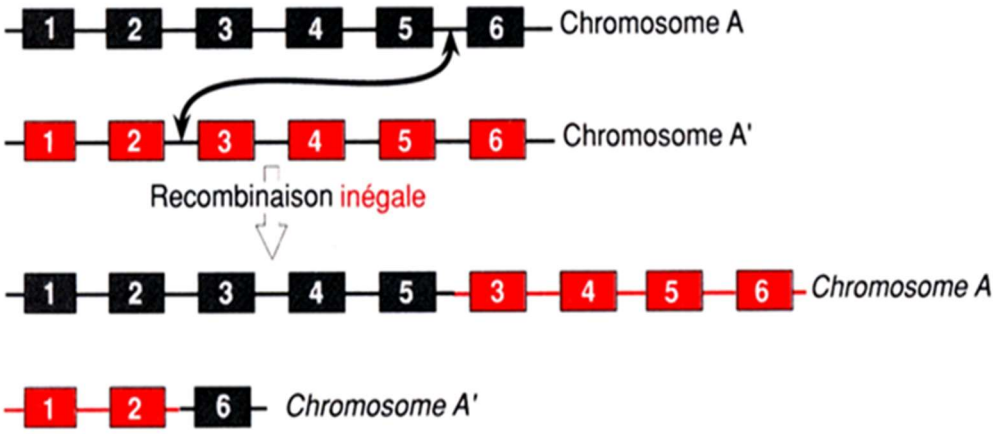
### V.2.2 Chez les Eucaryotes

**Recombinaison homologue**

Chez les eucaryotes, ce phénomène se produit généralement pendant la méiose où les chromosomes homologues dupliqués s'alignent en parallèle à la « métaphase I » en formant des synapses. Le processus de recombinaisons est fréquent et aussi indispensables au bon déroulement de la méiose. Par conséquent, il se produit un large brassage de l'information génétique. Des portions importantes (plusieurs millions) de paires de bases sont échangées entre les chromosomes homologues. La recombinaison commence par l'appariement de deux séquences homologues. Comme le génome des eucaryotes est constitué de séquences répétitives, on peut assister à l'association de deux copies de ces séquences situées au niveau de deux points différents du génome permettant ainsi d'initier une recombinaison. Suivant les points ou s'effectue la recombinaison, des délétions, des insertions, des conversions géniques ou des remaniements chromosomiques peuvent en résulter. Ces altérations peuvent être à l'origine de certaines pathologies.



Des recombinaisons inégales peuvent se produire au sein des séquences homologues répétées en tandem en entraînant l'expansion ou la contraction du nombre de leurs copies.




## Recombinaison spécifique du site

Chez l'homme, La recombinaison spécifique du site est à l'origine de la diversité importante des anticorps du système immunitaire.

L'immoglobulines de système immunitaire sont constituées de deux chaînes lourdes glycosylées (chaînes H) et de deux chaînes légères (chaînes L) reliées par des ponts disulfures et liaisons hydrogènes. Les deux types de chaînes contiennent une partie constante (C) et une partie variable (V). Cette dernière est codée par trois gènes. Les gènes qui codent pour les protéines du système immunitaire appartiennent tous à une même famille de gènes. Tous les gènes dérivent d'un même motif ancestral dupliqué de nombreuses fois. Les duplications importantes ne sont pas seules de l'extrême diversité des molécules impliquées dans les réactions immunitaires. Les séquences de DNA codant pour les parties variables et celles codant pour les parties constantes sont proches les unes des autres dans les cellules productrices d'anticorps. Le processus fait intervenir respectivement une ou deux recombinaisons spécifiques du site pour les chaînes variables ou les chaînes constantes.

**Remaniement de l'ADN au cours de la maturation d'un gène d'anticorps.** Dans les cellules indifférenciées, l'ADN des gènes d'anticorps comporte des segments qui codent pour différentes régions : des centaines de régions variables différentes (*V*) (nous n'en montrons que trois ici), plusieurs régions de jonction (*J*) et une ou plusieurs régions constantes (*C*). Pendant la différenciation des lymphocytes B (globules blancs), on observe une délétion d'un long segment d'ADN allant de la fin de l'un des segments *V* au début de l'un des segments *J*. En conséquence, un segment *V* (dans le cas étudié ici $V_2$) et un segment *J* deviennent adjacents et constituent un gène à transcrire. Le transcrit d'ARN subit une maturation de la façon habituelle, c'est-à-dire que les introns disparaissent de même que les segments *J* surnuméraires ; la traduction de l'ARNm ainsi produit forme l'une des chaînes polypeptidiques d'une molécule d'anticorps. On considère que les acides aminés codés par le segment *J* font partie de la région variable du polypeptide. La flexibilité du génome permet l'assemblage des régions d'ADN *V*, *J* et *C* selon des combinaisons aléatoires (ce diagramme simplifié n'en représente qu'un petit nombre) ; elle munit ainsi le système immunitaire de toute une gamme de lymphocytes producteurs d'anticorps, chacun adapté à un envahisseur particulier

Les diverses combinaisons de chaînes polypeptidiques qui constituent chaque anticorps représentent une autre source de diversité chez ces protéines.

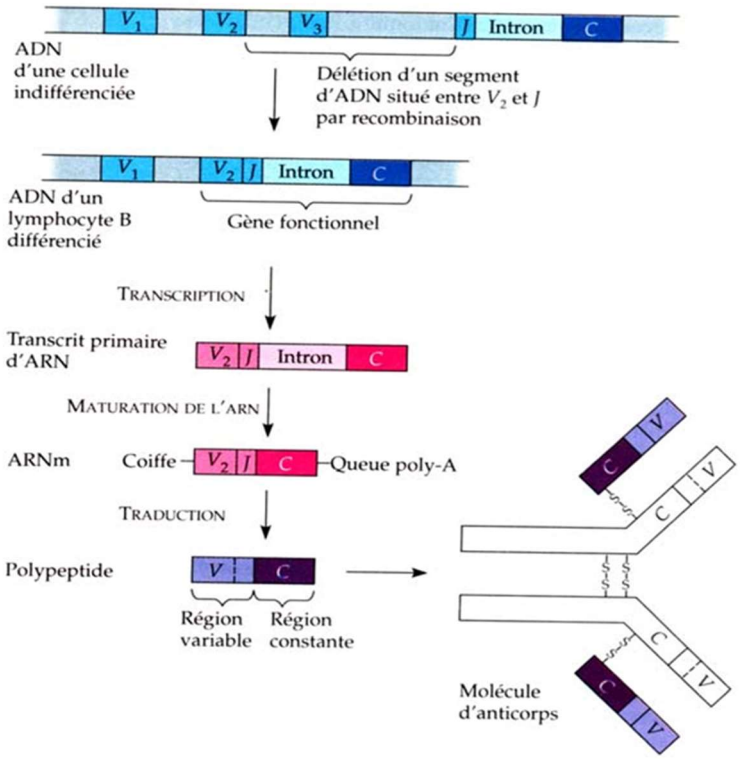


*Tableau 1 - Maturation du DNA correspondant à une chaîne courte d'un anticorps*

**Les gènes codant pour les immunoglobulines chez l'homme**

| Chaîne | Localisation chromosomique | Nombre de gènes V | J | D | C |
|---|---|---|---|---|---|
| Kappa | 2p12 | < 300 | 5 | 0 | 1 |
| Lambda | 22q11 | < 300 | ⩾ 6 | 0 | ⩾ 6 |
| Lourdes | 14q32 | < 300 | 6 | > 20 | 9 |

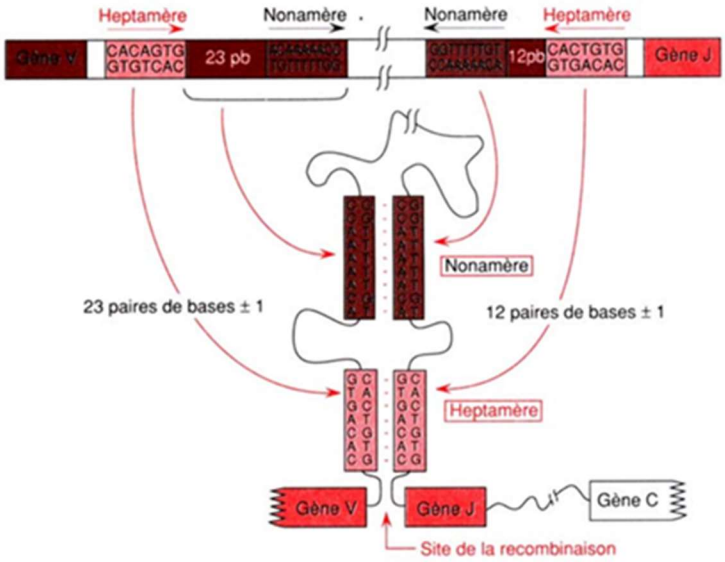



*Figure 50 - Mécanisme de la recombinaison et signaux du DNA impliqués*

La présence du système héptamère-nonamère ne permet de préciser parfaitement de la recombinaison V-J. L'imprécision porte sur trois bases ce qui permet d'obtenir jusqu'à 4 chaînes différentes à partir de deux gènes V et J identiques

## V.3 Eléments Mobiles

### V.3.1 Transposition

Les transposons sont des segments de DNA mobiles capables de se déplacer d'un endroit à un autre à l'intérieur du génome cellulaire. Les transposons peuvent se situer dans toute position du génome de la cellule. Dans le cas des bactéries, un transposon peut sauter d'un locus chromosomique à l'autre ; d'un plasmide au chromosome ou vice-versa ; ou d'un plasmide au chromosome.

Les expériences de croisements du Maïs menés par la généticienne McClintock B [1947] ont permis de montrer des variations de la couleur des grains. Ces variations pourraient être liés à la présence d'éléments génétiques mobiles capables d'atteindre différents endroits du génome.

Les mécanismes impliqués dans ce phénomène de transposition sont multiples et qui reste un événement rare. Certaines transpositions sont stables alors que d'autres ne le sont pas et disparaissent assez rapidement.

Le transposon présente une structure les gènes codant pour les protéines nécessaires à son insertion telles que : la transposase, la résolvase,…). D'autres protéines cellulaires sont également nécessaires pour assurer l'insertion. On cite le cas de « mating type » chez la levure (changement du type sexuel) dont l'insertion est effectuée de manière régulée en un point précis du génome.

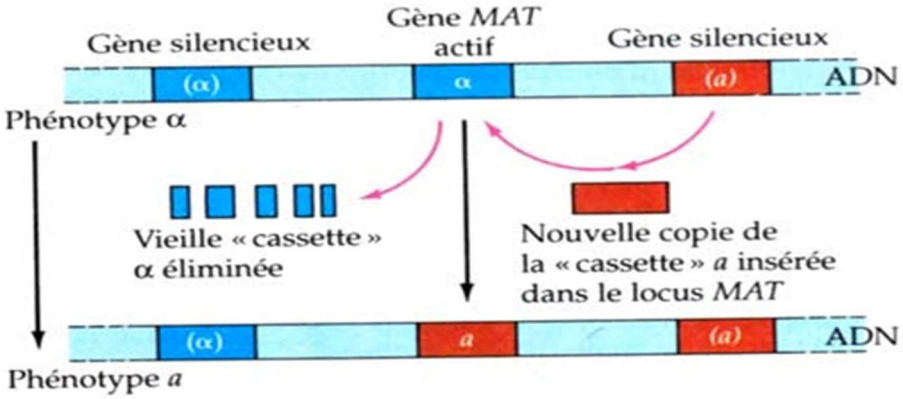



***Figure 51 - Mécanisme de la cassette pour le changement de type sexuel chez la levure***

Les transposons peuvent aussi contenir d'autres types de gènes. Par exemple les gènes conférant la résistance à des antibiotiques.

- Le gène dans lequel le transposon est inséré est inactivé.
- les gènes entre deux copies de transposon peuvent être supprimés par recombinaison homologue entre eux.
- des inversions et d'autres réarrangements des séquences de DNA de l'hôte peuvent également se produire.

Le DNA cible est coupé par la transposase en créant des bouts cohésifs entre lesquels le transposon est inséré. Ceci permet d'avoir deux possibilités :

### V.3.2 Transposition non réplicative (ou conservative)

Dans ce cas le transposon ne subit pas de réplication avant son déplacement. Il est transféré dans le DNA cible. On assiste à une délétion du site donneur.

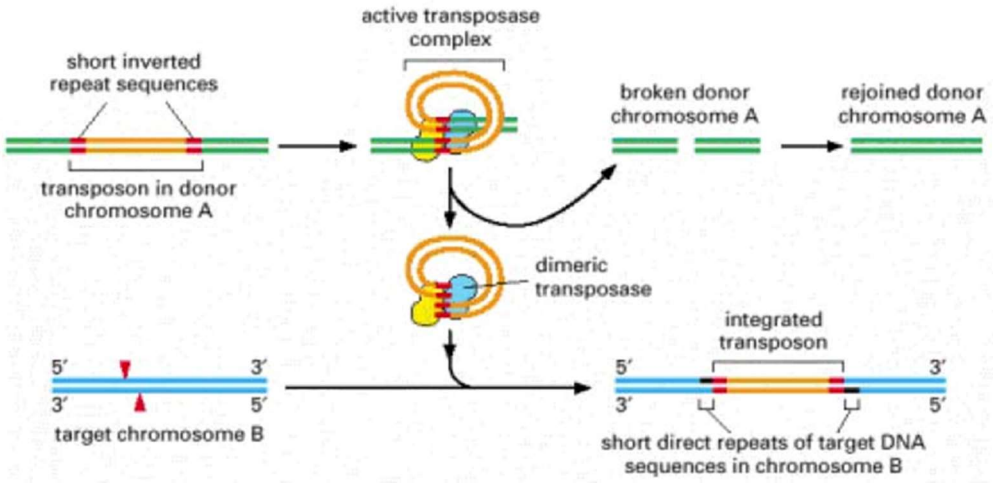



***Figure 52 - Transposition non réplicative***

### V.3.3 Transposition réplicative

Le transposon à insérer est répliqué. La nouvelle copie sera déplacée et donnée au DNA cible. Le transposon maintient sa plca dans le site ancien.

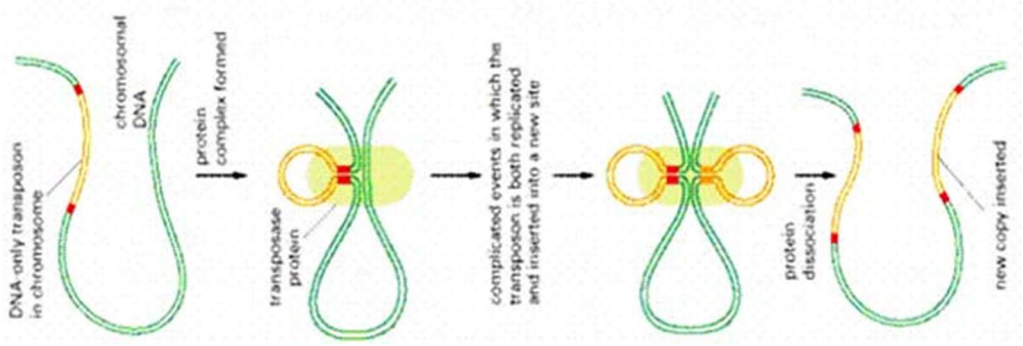



***Figure 53 - Transposition réplicative***

De très nombreux transposons sont connus chez de multiples organismes. Leur structure et leur mécanisme de fonctionnement sont variés et complexes. Les plus simples sont les éléments « IS » (séquences d'insertion) d'E. coli qui existent en une dizaine par génome.

***Tableau 2 - Exemples de transposons les plus étudiés***

| Nom du transposon | Organisme |
|---|---|
| Tn3 | *E. coli* |
| Tn1 | *E. coli* |
| Tn5 | *E. coli* |
| Tn10 | *E. coli* |
| Copia | drosophile |
| FB | drosophile |
| P | drosophile |
| DS | drosophile |
| Ty 1 | *Saccharomyces cerevisiae* |

### V.3.4 Rétroposition

Certaines séquences de DNA eucaryotes présentent des caractéristiques proches de celles des transposons. Elles possèdent également des caractéristiques qui les rapprochent de certains virus, plus précisément les « rétrovirus ». Ces séquences présentent une structure de DNA qui provient d'une « rétrotranscription » d'un RNA. Ceci permet de suggérer la présence d'une autre catégorie d'éléments mobiles appelés : les « rétroposons » ou « rétrotransposons ».
Le mécanisme de transposition de ces éléments postule que le rétroposon est d'abord transcrit en un RNA présentant ainsi une structure comparable à celle d'un rétrovirus. Par la suite ce RNA est rétrotranscrit en cDNA par la transcriptase inverse. La copie cDNA s'intègre ensuite dans le génome comme le ferait un rétrovirus.

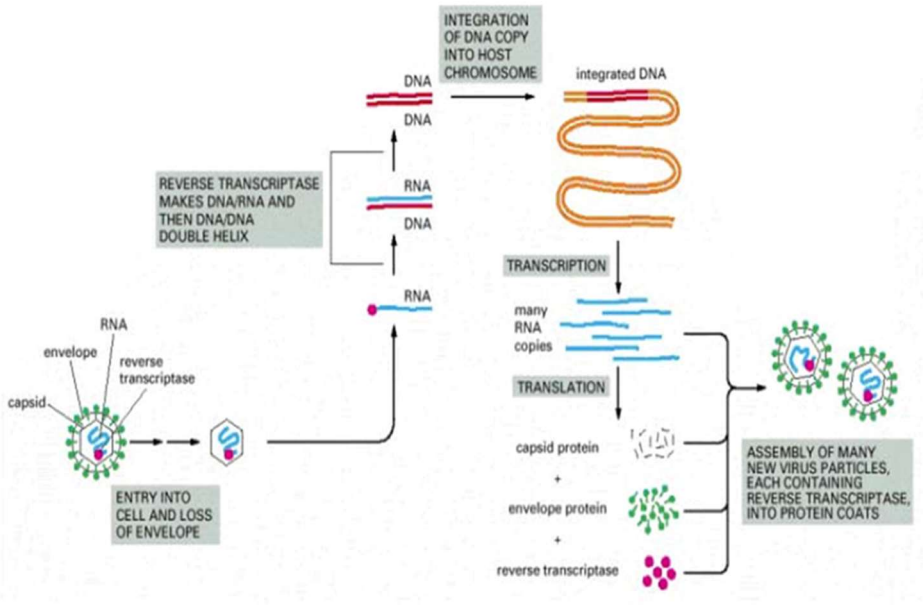



***Figure 54 - Cycle de vie d'un virus***

L'analyse de séquence de certains de ces rétroposons montre qu'ils contiennent des séquences codant pour la transcriptase inverse, indispensable à la rétroposition.

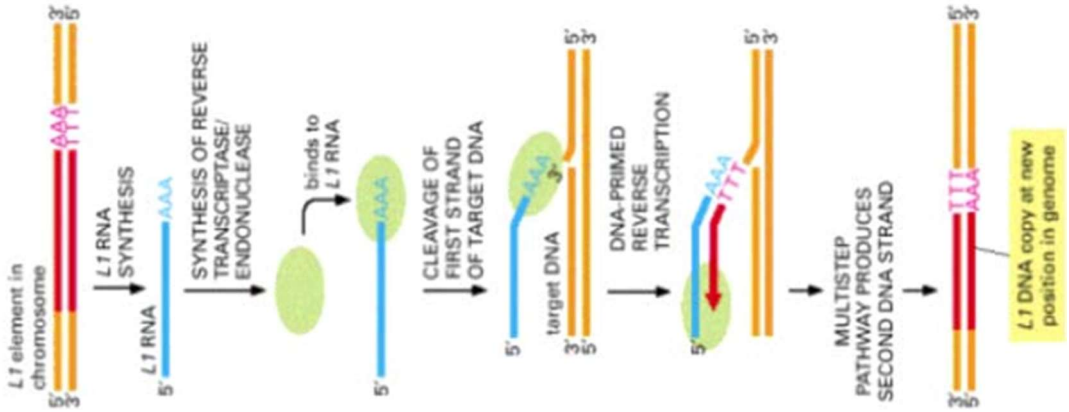



***Figure 55 - Mécanisme de rétroposition***