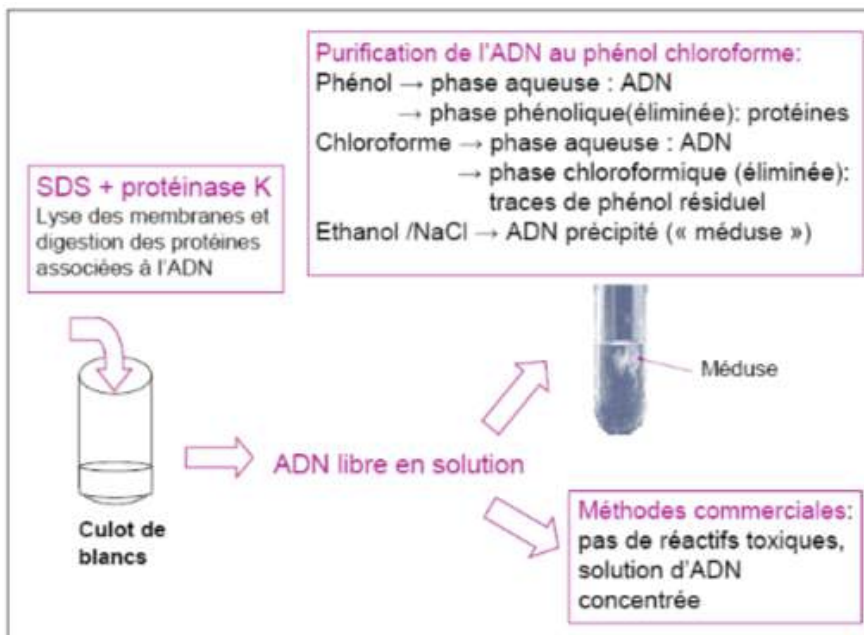


CM2 1- les acides nucléiques en laboratoire

1-1 L'ADN génomique obtenu par extraction



But de l'extraction : purifier l'ADN en éliminant les protéines. On utilise un mélange phénol , chloroformome.

Extraction de l'ADN au phénol / Chloroforme

On mélange un même volume de phénol : il peut aussi être utilisé pour purifier n'importe quel ADN du moment qu'on veut éliminer des protéines. On mélange pour obtenir une **émulsion** et on centrifuge.

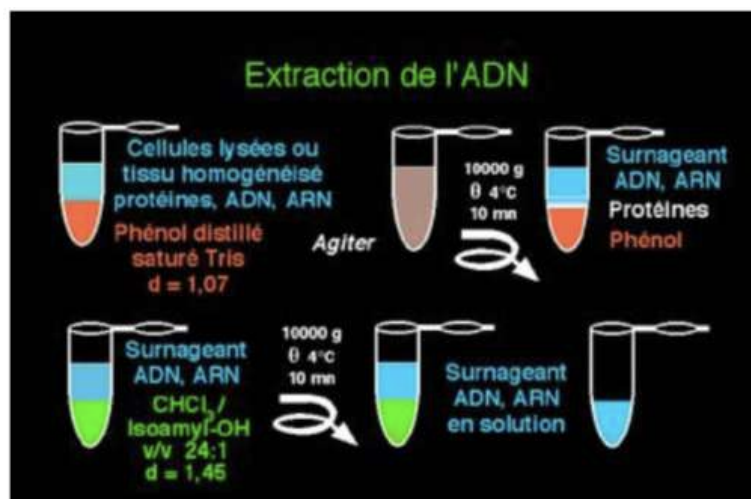
partie inférieure = phénol,

interface = protéines

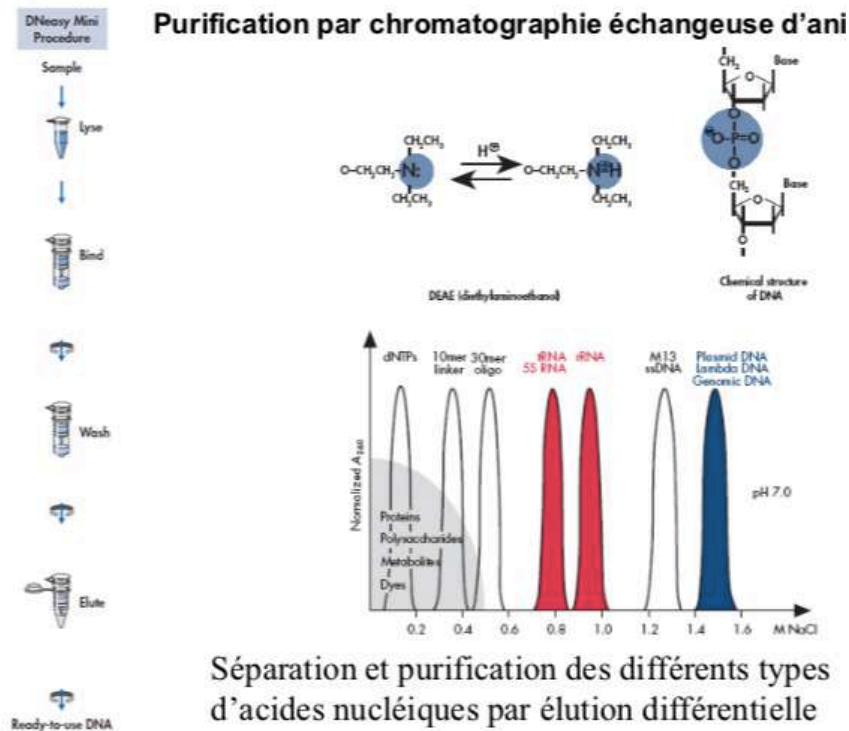
Supérieure = phase aqueuse contenant les acides nucléiques.

Il faut être sûr qu'après il n'y a plus de phénol.

On effectue donc une extraction chloroforme/ isoamyl. **Le phénol se mélange avec le chloroforme ce qui permet de l'éliminer.** On prend le surnageant , on mélange avec un même volume de chloroforme, on fait une émulsion et on mélange et on récupère **le surnageant qui contiendra les acides nucléiques.**



Purification par chromatographie échanges d'anions



1-2 Les ARN obtenus par extraction

1-2 Les ARN obtenus par extraction

B - EXTRACTION DE L'ARN

- **ARN fragiles** +++ → RNases ubiquitaires
- conditions stériles (RNases bactériennes)
- cellules ou tissus traités **immédiatement**
 - détergent : SDS
 - agent dissociant : isothiocyanate de guanidine
 - solution tampon
 - agent réducteur : β mercapto-éthanol /DTT
- inhibition des RNases, dénaturation des protéines
- **séparation ARN/ADN**
 - par précipitation différentielle en fonction du pH
 - par respect des structures nucléaires (ARN libres ds le cytoplasme)
- purification par **traitement à la DNase**

RNeasy Mini Kit

Cells or tissue
Lysis and homogenization
Remove genomic DNA
Add ethanol
Bind total RNA
Wash
Elute

On peut extraire de l'**ARN**, cela est plus compliqué car c'est une **molécule fragile**. Elle est dégradée par les **RNases ubiquitaires**. Elles sont activées par la lyse des cellules et potentiellement la dégradation de l'ARN. Dans le tampon de lyse on utilise de l' isothiocyanate de guanidine qui bloque les RNases. On utilise aussi des agents dénaturants des protéines tels que DTT ou bêta mercaptoéthanol.

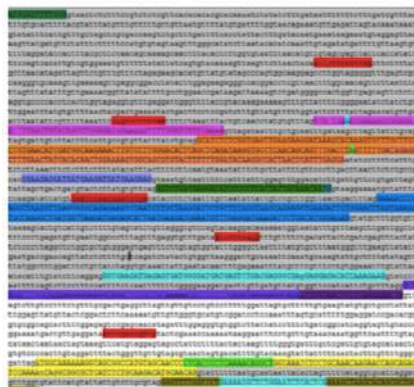
Sur nos mains nous avons des RNases donc utilisation de gants.

2 méthodes : 1° => extraction ARN au phénol : dans ce cas pH acide car il permet d'extraire préférentiellement les ARN.

2° => Utilisation d'une colonne échanges d'ions.

1.3) ADN synthétisés par PCR à partir d'ADN génomique

1-3 ADN synthétisés par PCR à partir d'ADN génomique



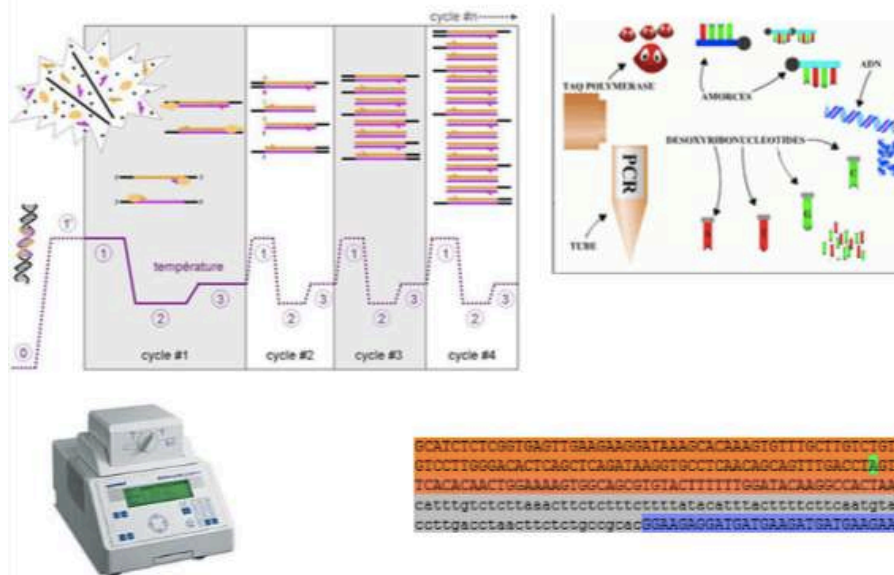
Gène HD2a Tabac

Comment obtenir un fragment d'ADN contenant l'exon 3 et l'exon 4 dans la configuration trouvée sur l'ADN génomique?

En couleurs exons et en tout petit introns

Exon sens : même séquence

Exon inverse : dans l'inverse de 3' à 5' donc ça sera le complémentaire.



7

PCR sur ADN génomique : on obtient un fragment avec les séquences situées entre les deux amorces et on a aussi les introns.

=> Dans le tube on met les amorces , l'ADN , les dNTP et la TAQ polymérase.

Il y a une étape de **dénaturation**, d'**hybridation** puis **élongation**. A la fin des 30 cycles de PCR, on aura à la fin un fragment d'ADN avec aux extrémités les oligonucléotides que l'on a mis dans le tube.

1.4) ADNc synthétisés par RT- PCR

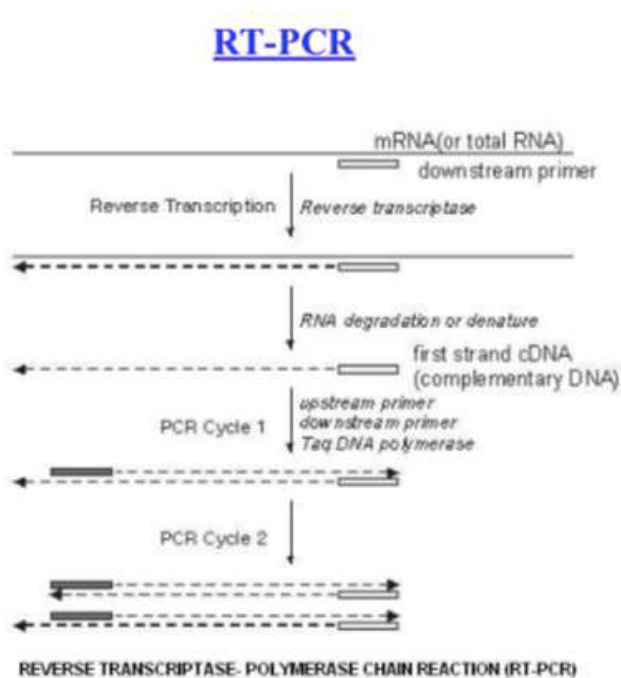
1-4 ADNc synthétisés par RT-PCR à partir d'ARN totaux extraits

ADNc : copie de nature ADN d'un ARN obtenu par l'action d'une reverse transcriptase

Reverse transcriptase : ADN polymérase ARN dépendante

On peut également synthétiser un ADN complémentaire.

Il y a deux étapes : étape **réverse transcriptase** et étape **PCR** :

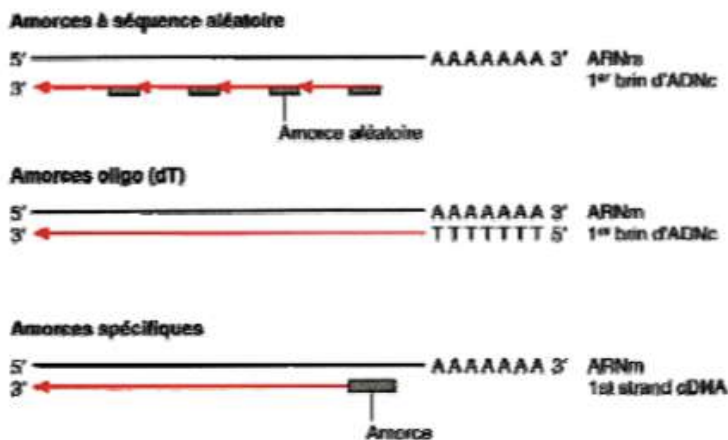


9

On réverse, puis on utilise les ADN complémentaires et un test utilisé pour amplifier un ADN complémentaire particulier. Ce qui permet de savoir lequel faire c'est **la nature des amorces**.

Ex : si je veux hybrider l'actine je prends les amorces de l'actine. C'est seulement au niveau de la PCR qu'on amplifie un en particulier, **lors de la réversion on amplifie tous les ADNc**.

Diverses amorçages pour une Reverse Transcription



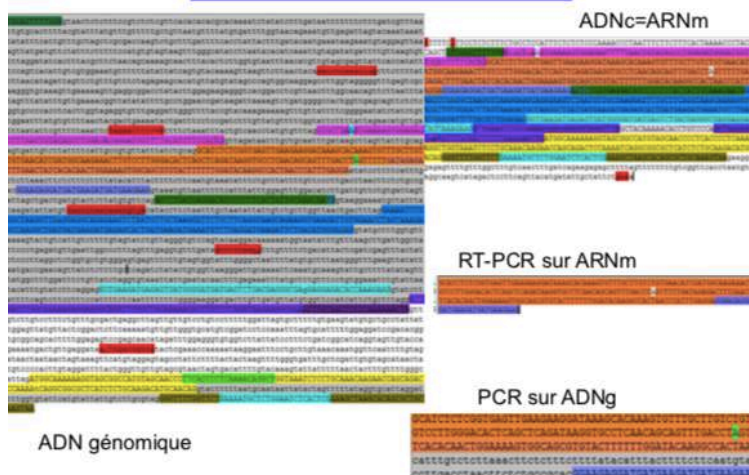
réverse transcriptase a besoin **d'amorces également** : on utilise des amorces **aléatoires**, aléatoirement l'amorce va se positionner plus d'une fois sur la molécule d'ARN. Cela permet la réverse transcription.

16 nucléotides minimum pour que ça marche.

On réverse tous les ARN : ARNt, ARNr ...

Si on veut que les **ARNm** des eucaryotes, ils ont des séquences **polyadénylés**, on va utiliser des **oligo dT** qui s'hybrident aux ARN messagers.

Exemple : amplification des séquences E3-E4 de HD2a par RT-PCR sur les ARN de tabac



Si on veut plus d'efficacité on mélange Oligo peptide et amorces.

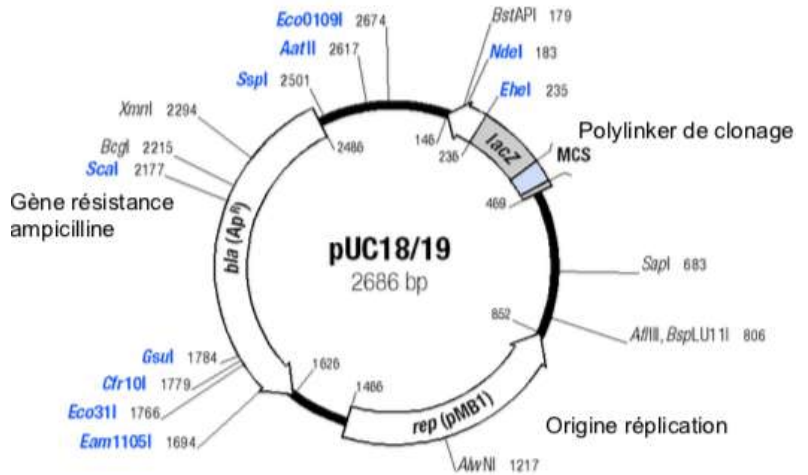
1-5 Les plasmides1.5) plasmides

Plasmide pUC18/19 : sa numérotation commence à 0 et on numérote de 0 à 2686 pb ici. Numéros des enzymes de restrictions qui permettent de déterminer la taille des fragments de restriction.

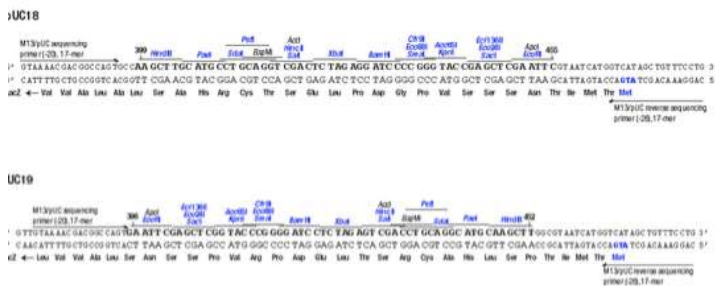
Dans le plasmide se trouve l'origine de réplication en bas à droite (rep).

Un gène de résistance à un antibiotique = bla, il permet de sélectionner les bactéries qui contiennent le plasmide.

MCS : poly linker de clonage : séquence qui a été ajoutée et qui contient un certain nombre de sites de restrictions uniques dans le plasmide.



Séquences du MCS de pUC18 et pUC19



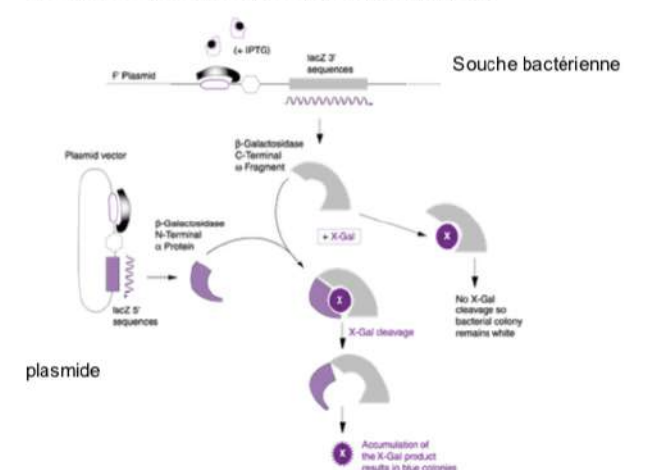
La différence entre les deux est l'orientation

1er de HindIII vers EcoRI et le deuxième c'est l'inverse sinon ce sont les mêmes plasmides.

Dans ces plasmides qui sont fait pour cloner des fragments d'ADN, on trouve des séquences qui s'amorcent aux amorces de séquençage.

M13: séquence réverse : amorce universelle de séquençage

En dessous on a une séquence en AA, cette séquence est localisée au début du gène Lac Z.

1.5.1 Principe de l'alpha complémentation**Principe de l'alpha-complémentation**

Lac Z est en phase de lecture, le plasmide produit une protéine correspondant à cette séquence codante. Cette organisation est faite pour faire l'alpha complémentation :

On voit le plasmide , le gène Lac Z code pour la bêta galactosidase, dans le plasmide on a les séquences qui codent pour un peptide qu'on appelle peptide **alpha** qui correspond à l'extrémité **N-ter** de la bêta galactosidase. Ces plasmides on les transforme dans des bactéries qui contiennent aussi une partie du gène Lac Z qui code pour la partie **C-ter de la beta galactosidase** que l'on appelle **peptide oméga**. Dans une souche bactérienne on a à la fois une partie du gène bactérien et le vecteur on peut reconstituer une beta galactosidase.

X Gal : coloré : il est métabolisé par la bêta galactosidase donc va colorer en bleu. En présence de X-Gal si on a présence d'une bêta galactosidase, les bactéries apparaissent bleues.

Si on insert dans le polylinker de clonage un fragment d'ADN on va perturber la phase de lecture (fortes chances). Il n'y a plus de production de peptide alpha. La conséquence va être que la souche bactérienne

produit toujours le peptide oméga mais pas alpha donc pas de bêta galactosidase active. Les bactéries en question ne sont pas capables de métaboliser donc elles vont apparaître blanches. Il y a donc un insert.

Si on voit des colonies blanches : **il y a des chances que le plasmide contienne un insert.**

1.5.2 Transformation bactérienne et sous clonage

Transformation bactérienne et sous-clonage

- Transformation dans des bactéries **E.Coli compétentes**
 - 30 min 4°C bactéries+ADN
 - Choc thermique
 - 1h 37°C avec milieu
 - Étallement sur boîte en présence de l'antibiotique
- **Sous clonage : chaque clone bactérien est transformé par une seule molécule de plasmide**
- **La transformation bactérienne est la seule méthode de purification et d'isolement des molécules d'ADN**



Pour faire entrer un ADN dans la bactérie on utilise des bactéries compétentes et E.coli plus ou moins modifiées. **Compétentes veut dire qu'elles ont été traitées chimiquement pour permettre à l'ADN de pénétrer dans la cellule.**

Le protocole est en 3 points :

-> on incube les bactéries compétentes avec ADN

-> on fait un choc thermique pour permettre à l'ADN de rentrer dans la bactérie

-> on met du milieu dans les bactéries, on les fait pousser à 37°C, on les incube : le but est de permettre au plasmide d'exprimer le gène de résistance. Ensuite

on étale sur boîte en présence d'anticycline et on peut voir apparaître des clones.

Pour le sous clonage la transformation bactérienne est très importante. Une bactérie est transformable que pour une molécule bactérienne cela vient du fait que lorsque une molécule entre dans la bactérie elle va empêcher une autre molécule d'ADN d'agir. C'est donc **la seule méthode** qui permet de purifier d'ADN à la molécule près.

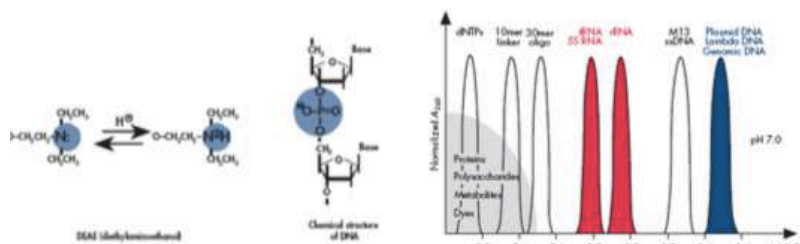
Protocole de la lyse alcaline : 3 étapes

Quand on a fait poussé les bactéries on les récupère: EDTA inhibe les nucléaires, il chélate les ions magnésium

Extraction d'ADN plasmidique par la méthode de la lyse alcaline

Principe de la lyse alcaline

- Culot bactérien resuspendu dans solution 1 **Tris-EDTA** (EDTA : déstabiliser la membrane et inactiver les DNases)
- Ajout de **solution 2** (NaOH, SDS)
 - i) lyse paroi bactérienne ii) dénaturation des acides nucléiques et des protéines
- Ajout de **solution 3** (acétate de potassium pH 5.5 i) renaturation de l'ADN plasmidique
- Centrifugation
- **Purification sur colonne échangeuse d'anions, chromatographie**



On ajoute de la soude et du SDS : ce mélange permet la lyse des parois bactériennes, il permet aussi la dénaturation des protéines et des acides nucléiques.

L'ensemble des acides nucléiques est dénaturé à ce stade aussi bien le plasmidique que le chromosomique

Neutralisation : permet la restauration de l'ADN mais pas de tout l'ADN. Elle permet celle de l'ADN plasmidique car il est de petite taille mais pas celui chromosomique qui est grand et n'aura donc pas le temps.

Centrifugation : élimination des restes de parois et des protéines dénaturées et on

utilise le surnageant pour purifier l'ADN plasmidique .

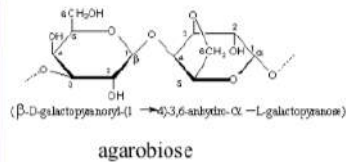
Puis utilisation de colonnes échangeuses d'anions. Colonne chargée plus qui va attirer ADN chargé moins.

2) Visualisation de l'ADN, ARN, protéines

2- Visualisation de l'ADN, ARN et protéines

2-1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Agarose : polymère d'agar



Polysaccharide linéaire constitué de la répétition d'agarobiose

17

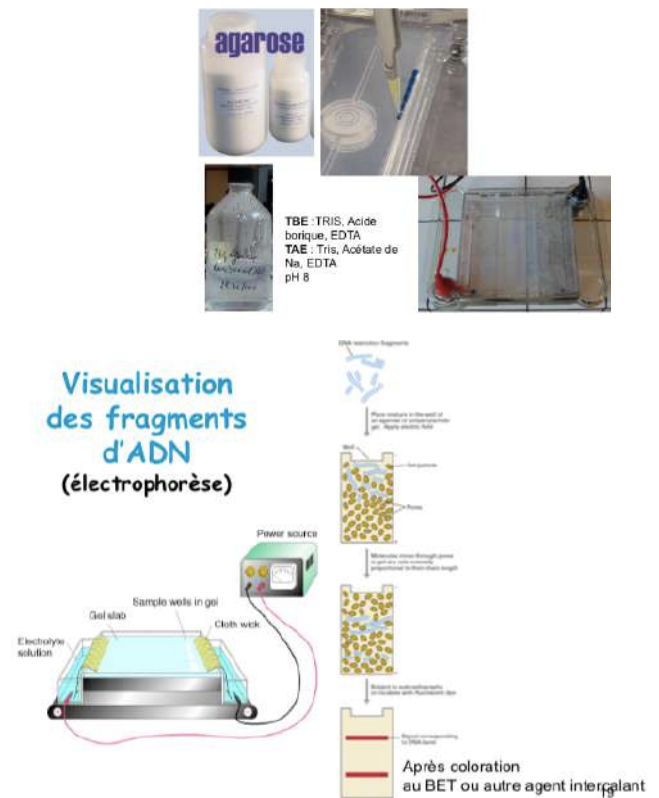
Visualisation de ADN : on utilise un gel d'agarose : polymères d'agar extrait d'algues et qui sont purifiés. 100g d'agarose coûte 150 euros.

Pour faire un gel : gel horizontal pour que les molécules migrent il faut une solution saline : on utilise du TAE. Le gel d'agarose est un gel sous marin que l'on trempe dans la cuve d'électrophorèse. Cela permet de former un tamis avec des pores et les molécules d'ADN vont se déplacer à travers ce tamis moléculaire. Plus il sera petit l'ADN, plus il ira vite dans le gel d'agarose.

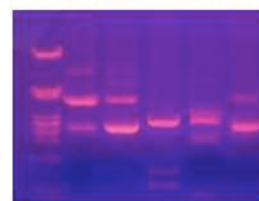
Pour le visualiser on colore l'ADN : le plus utilisé : coloration au bromure d'éthidium qui est un agent intercalant de l'ADN et il apparaît comme rose fuchsia sous lumière UV.

SYBR : apparaît vert : sensibilité équivalente au bromure d'éthidium. L'avantage est dit non cancérigène. Il ne donnerait pas de mutations à l'inverse du bromure d'éthidium.

Bleu de nile : colorent les sucres de l'ADN : bcp moins sensible (utilisés en faculté).



Coloration de l'ADN et visualisation

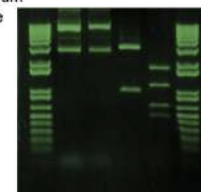


Coloration bromure d'éthidium
UV ; cancérigène, rapide recherche



Coloration bleu de Nile
1h à 15h, non toxique, routine, scolaire

SYBRsafe
Recherche
Sensibilité équivalente
BET



20

Capacité de séparation de l'ADN :

Cela dépend du pourcentage d'agarose : plus le pourcentage est élevé plus on sépare des fragments de petites tailles. Plus il est faible plus on sépare des gros fragments.

Pouvoir résolutif : on ne peut pas donner au nucléotide près et la précision dépend de la taille des fragments. Plus le fragment est petit plus on peut avoir une précision dans la taille en adaptant le pourcentage d'agarose. Dans ce cas on peut se mettre à 50 nucléotides près.

Détermination de la taille des fragments d'ADN:

Séparation des molécules en fonction du % agarose

% d'agarose	Éventail de tailles d'ADN (bp)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

Résolution des gels d'agarose

- 500 - 1 kb près
 - 500 pb
 - 100 pb
 - 50 pb
- taille > 7000 pb
2 000 < taille < 7 000 pb
1000 < taille < 2000 pb
taille < 1000 pb

Migration log : vraie pour ADN linéaire

Peut dépendre de la topologie de ADN : ADN génomique sera toujours coupé de l'ordre de 300 400 kbases donc ils ne peuvent pas être séparés dans le gel. On va avoir une masse qui correspondra à cet ADN génomique qui va être ensuite digérer par une enzyme de restriction : cela va donner des sites de restrictions et on le fait migrer sur un gel : on va observer un SMEARE. Cela montre tous les fragments d'ADN issus des profils de digestion qui sont tous de tailles différentes. Cela est très différent de ce que l'on observe de l'ADN de phages.

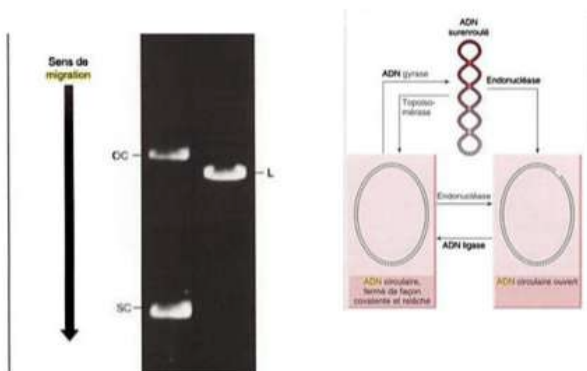
SMEARE car tous les fragments d'ADN sont différents.

Influence de la topologie particulièrement vraie pour les plasmides

Il peut y avoir des super tours qui sont introduits, cela va donner de l'ADN sur enroulé. Lorsque l'on dépose un ADN plasmide qui vient d'être extrait d'une bactérie : la forme majoritaire va être la forme sur enroulé car il migre le plus vite dans le gel d'agarose. Attention on ne peut pas déterminer la taille d'un ADN sur enroulé car il y a la taille de l'ADN et de la structure. On ne connaît pas l'effet de la structure. L'ADN a pu subir des dommages :

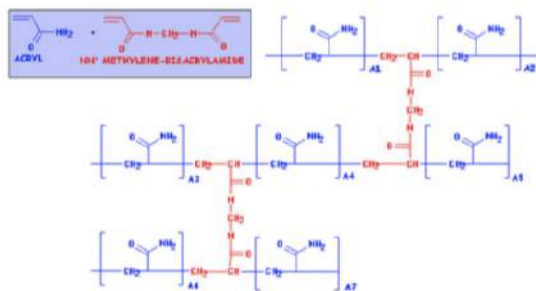
Il peut être coupé que un seul brin c'est la forme cercle ouvert : cela va induire le déroulement de l'ADN comme le ferait une enzyme topoisomérase. L'ADN va migrer moins vite car il prend plus de place sur un gel.

Migration électrophorétique des différentes formes de plasmides



1- plasmide non digéré; 2- plasmide digéré par EcoRI

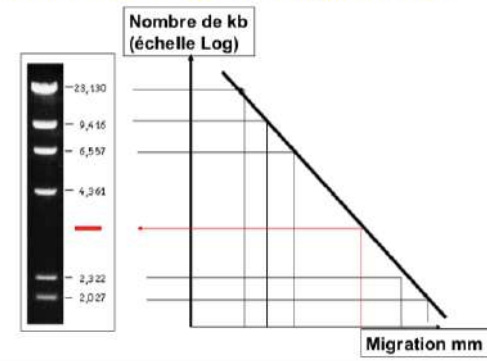
2-2 Electrophorèse sur gel d'acrylamide



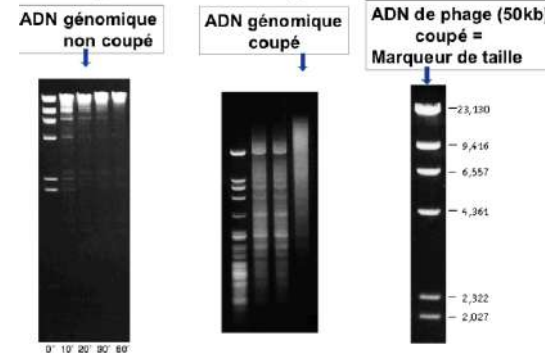
Catalyseurs : TEMED, persulfate d'ammonium

Utilisé pour les protéines, les acides nucléiques de taille inférieure à 100 nucléotides, ou nécessitant un haut niveau de résolution (au nucléotide près (séquençage..)).

Détermination de la taille des fragments d'ADN



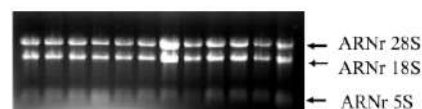
Profils particuliers de migration



ADN digéré par une enzyme de restriction : coupé sur les deux brins : on va avoir la forme linéaire qui migre plus vite que la forme cercle ouvert. On pourra savoir la taille car on pourra comparé à un marqueur de taille d'ADN.

ARN totaux sur gel d'agarose en conditions dénaturantes

Pour l'ADN, gel d'agarose en conditions non dénaturantes
Pour l'ARN, électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes (formaldéhyde, dénaturation des échantillons à 70°C)



On peut également déposer de l'ARN que l'on a extrait de cellules. Les ARN sont simples brins donc lorsque l'on veut les faire migrer au mieux on utilise un gel en conditions dénaturantes. On dénature aussi les échantillons avant de les déposer sur gel et quand on colore un gel au bromure d'éthidium. Si les ARN sont non dégradés on va observer essentiellement 2 bandes qui composent aux ARN ribosomiques.

Si fragments de très petites tailles on peut utiliser l'acrylamide : ils forment des mailles lorsque l'on polymérise le gel. On le polymérise en présence de TEMED et sulfate d'ammonium. C'est le gel support des protéines et visualisation de la taille au nucléotide près. Il est utilisé pour le séquençage.

Séparation des molécules en fonction du % d'acrylamide

Polyacrylamide (%)	masse moléculaire (Kda)	taille (pb)
15-20	10-40	16-65
10-15	40-100	65-160
5-10	100-300	160-480
5	300-500	480-800
2-5	PM>500	>800

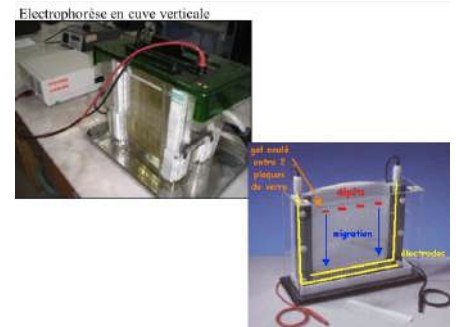
Résolution : 1 paire de base près sur un gel à 5% (séquençage)

Conditions :

- natives = sans agent dénaturant
- en conditions dénaturantes :
 - Acides nucléiques : urée 8M
 - Protéines : SDS 0.1%

On peut faire un gel non dénaturant ou un gel en conditions dénaturantes. Pour les acides nucléiques: les conditions dénaturantes sont de urée 8M. C'est le gel utilisé pour le séquence.

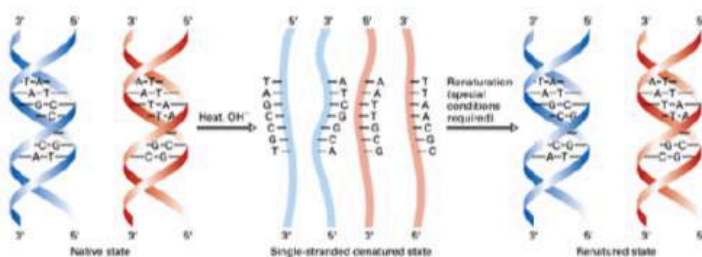
On colore également avec du bromure d'éthidium comme le gel d'agarose et pareil c'est plus le pourcentage est élevé plus on sépare des petits fragments



3) Détection des acides nucléiques par hybridations moléculaire

3- Détection des acides nucléiques par hybridation moléculaire

3-1 Principe de l'hybridation moléculaire



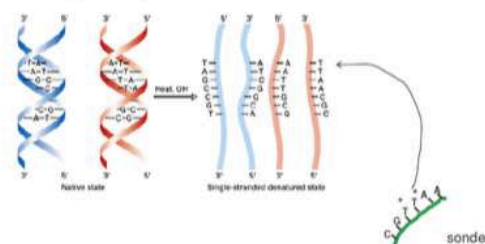
Dénaturation par la chaleur ou la soude

Renaturation en refroidissant ou en éliminant la soude

Utilisation pour détecter un acide nucléique : sonde qui permet de détecter un fragment d'ADN particulier. Cela peut être aussi pour détecter un ARN particulier. On les hybride avec une sonde.

Une sonde : séquence d'acides nucléiques d'au moins 15 nucléotides homologue à une séquence d'ADN ou ARN avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires.

Applications de l'hybridation moléculaire à la détection des molécules d'ADN ou d'ARN parmi l'ADN génomique et les ARN totaux



De façon générale, peuvent s'hybrider tous fragments d'acides nucléiques de séquence complémentaire :

- Deux brins d'ADN
- Deux brins d'ARN
- Un brin d'ADN et un brin d'ARN

Donc l'objet d'intérêt peut être un fragment d'ADN et la sonde peut être une sonde ADN ou ARN, ou un ARN et la sonde peut être de l'ADN ou de l'ARN

définition d'une sonde : séquence d'acide nucléique, d'au moins 15 nucléotides, homologue à une séquence de DNA ou de RNA, avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires

Hybridation peut être entre 2 brins ADN : un ADN révélé par un autre ADN

Hétéroduplexe : un ADN révélé par un ARN

Un ARN révélé par un ARN

On rend la sonde repérable : soit fluorescente soit radioactive.

3.2 Southern Blot

Technique qui permet l'hybridation : le fait de transférer de l'ADN sur une membrane soit de **nitrocellulose** soit de **nylon**.

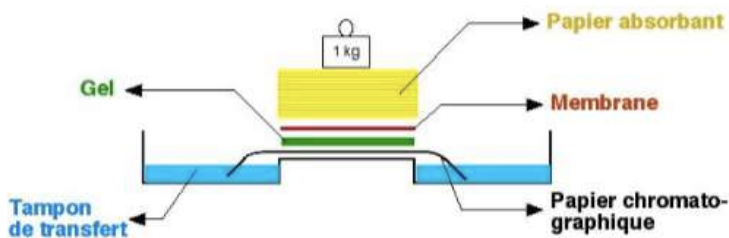
On sépare l'ADN génomique sur un gel d'agarose et on le transfère.

Méthode du Southern Blot

Traitement du gel :

- fragmentation des grands fragments par HCL
- dénaturation de l'ADN par la soude
- neutralisation

Méthode de SOUTHERN



ne peuvent pas la traverser. **On a donc une réplique de notre gel sur la membrane de nitrocellulose.**

Association covalente des acides nucléiques sur la membrane

Préhybridation : saturation des sites de fixation des acides nucléiques

Hybridation avec la sonde dénaturée

définition d'une sonde : séquence d'acide nucléique, d'au moins 15 nucléotides, homologue à une séquence de DNA ou de RNA, avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre bases complémentaires

(**la sonde doit être rendue détectable** : marquée radioactivement, par un fluorochrome, ou contenir un analogue d'oligonucléotide reconnu par un anticorps (marquage « sonde froide »)

Lavages : élimination de l'hybridation non spécifique en augmentant la stringence

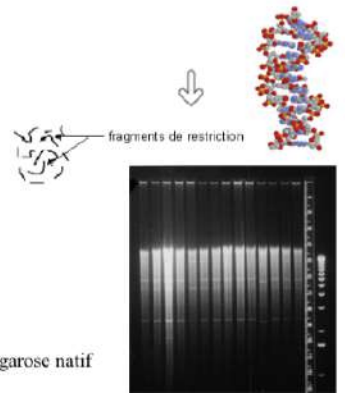
Révélation dépendante de la méthode de marquage de la sonde :
autoradiographie, enzymatique

33



Sir Edwin Southern
(1938-)

Gel d'agarose natif



Traitement du gel :

-> Trempe dans **HCL** l'ADN pour fragmenter les grands fragments

-> **dénaturation** de l'ADN en le trempant dans de la soude

-> Avant de faire le transfert on **neutralise** et on fait un transfert par capillarité.

On passe un papier buvard puis on met sur le papier le gel, sur le gel on applique la membrane puis on met du papier absorbant et un poids de 1kg. On laisse une nuit. Le tampon s'absorbe sur le papier et le tampon va passer à travers du gel en **emportant les acides nucléiques**. Les acides nucléiques restent fixer sur la membrane car ils

-> On rend covalente la liaison acides nucléiques - membrane en exposant la membrane aux UV.

Préhybridation -> Etape de saturation : la membrane fixe les acides nucléiques soit il faut saturer les sites de fixations potentielles de la membrane : c'est la pré hybridation, elle se fait avec du lait écrémé 5%. Cette membrane est hybridée avec la sonde dans un état dénaturé.

Sonde : DOIT ETRE rendue détectable : soit marquage radioactif soit fluorochrome incorporé ou on peut utiliser un oligonucléotide qui va être reconnu par un anticorps.

On hybride la membrane avec la sonde puis étapes de lavages : on élimine toutes hybridations non spécifiques puis on révèle avec une méthode de marquage de la sonde soit par autoradiographie soit par une méthode enzymatique.

Notions de stringence des solutions de lavage

L'hybridation dépend expérimentalement :

- de la température
- de la concentration en sels

Facteurs favorisant l'hybridation :

- Température faible
- Concentration en sels élevée

Des conditions stringentes défavorisent l'hybridation

- Concentration en sels faible
- Température élevée

Gel d'agarose natif



On essaye d'augmenter la stringence pour éviter l'hybridation non spécifique.

L'hybridation : solution que l'on appelle 20 fois SSC : sodium citrate : solution Riche en sels.

Si on veut faire un lavage pas trop scindant on va faire du 2 fois SSC à température ambiante, on commence ici à éliminer ce qui n'est pas très spécifique.

0,1SSC : quand on augmente la stringence à température ambiante toujours

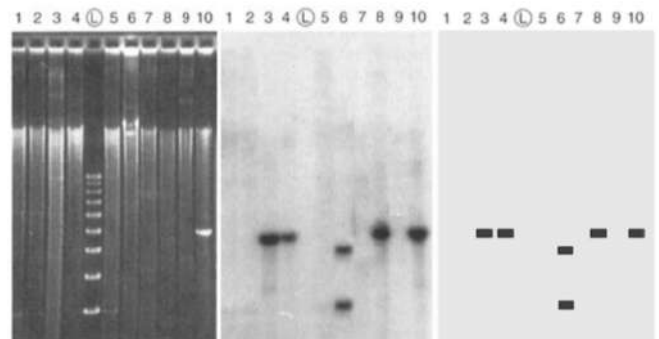
0,05 SSC à 65°C , on ne veut garder que le spécifique

On peut aussi faire bouillir la membrane et la sonde va se décrocher. Cela peut permettre de réhybrider éventuellement avec une autre sonde. On ne révèle que ce qui s'hybride à la sonde.

Hybridation :

dépend de la concentration en sel et de la température.

Au niveau de la température on a la T_m : si on est au dessus on défavorise l'hybridation et si on est en dessous on la favorise. La concentration en sels on a vu que les acides nucléiques se repoussent donc si on veut une hybridation on veut enlever les charges négatives des acides nucléiques : **concentration en sels élevée et température faible (en dessous de la T_m) favorise l'hybridation.**



Le gel

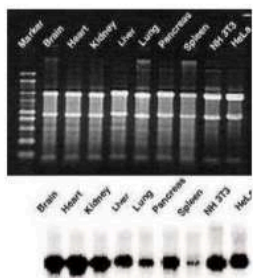
L'autoradiogramme

35

3.3 Northern Blot avec ARN

3-3 Le Northern Blot : transfert d'ARN

- Analyse des ARNm
- Gel d'agarose en conditions dénaturantes (formaldéhyde)
- Traitement du gel limité à un rinçage
- Transfert et hybridation dans des conditions identiques à l'ADN



Gel d'électrophorèse agarose
Coloration Bet
ARN totaux

Hybridation avec une sonde spécifique
autoradiogramme

36

Gel agarose pour séparer les ARN en conditions dénaturantes et on traite plus rapidement le gel que les ADN. Ici on ne traite pas à la soude car sinon on hydrolyse les ARN. On rince juste à l'eau le gel. On transfère et on hybride comme pour ADN. On fait le transfert par capillarité et on hybride avec une sonde comme ADN.

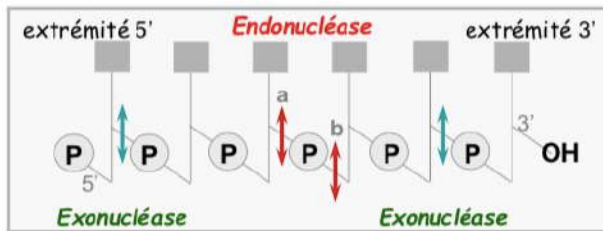
Les ARN totaux : on vérifie leur qualité : 2 ARN r, lorsque l'on hybride avec une sonde spécifique cela permet de savoir dans quel tissu il est exprimé.

RT Q PCR : le Northern Blot ne se fait plus trop, il peut être intéressant pour les voir les ARN associés à un certain gel par exemple pour épissage alternatif.

4-Constructions de molécules d'ADN recombinant

4-1 Les outils enzymatiques

Les enzymes de restriction : **endonucléases** bactériennes clivant spécifiquement les **deux brins du DNA** au niveau d'une séquence en général palindromique, **parfaitement définie**



Les enzymes de restriction : coupure en « a »

Endonucléases sont des enzymes de restrictions qui ont été extraites de bactéries : elles permettent de dégrader des ADN étrangers qui rentreraient dans les bactéries : **ce sont des domaines de défenses.**

C'est une endonucléase : enzyme qui dégrade ADN à l'intérieur de la molécule d'ADN. A la différence des exonucléases qui dégradent par les extrémités 5' ou 3'. Les enzymes de restrictions dégradent à partir des extrémités

Elle digère selon la coupure A : elle libère le 3' OH et 5' phosphate

Hae III: coupe entre le G et le C : séquence palindromique : même séquence sur les deux brins

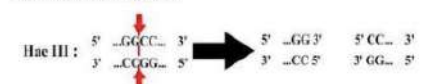
Cela génère des extrémités franches.

EcoRI : site de reconnaissance : GAATTC : elle coupe entre le G et le A sur chaque brin. Cela donne un G avec extrémité 3 prime OH et CTTAA 5 prime phosphate.

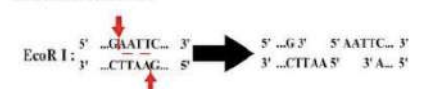


Daniel Nathans
Prix Nobel 1978
1928-1999

Extrémités non cohésives :



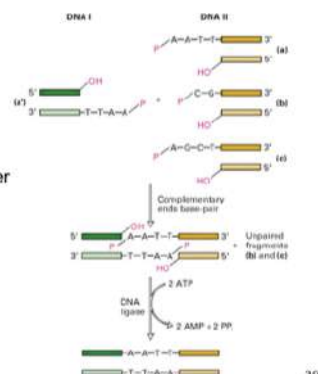
Extrémités cohésives :



Enzyme de restriction : exemple EcoRI : R pour restitution et I c'est la première dans les découvertes.

La T4 DNA ligase

La T4 DNA ligase catalyse la formation de liaison phosphodiester entre une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' OH de l'ADN bicaténaire

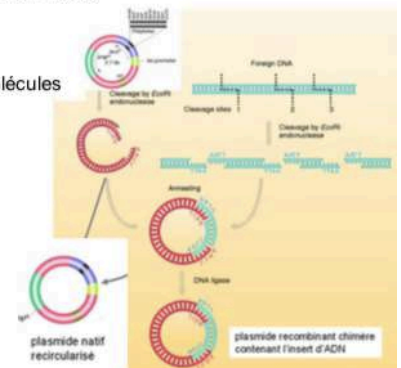


39

4-Constructions de molécules d'ADN recombinant

4-2 Préparation du vecteur et de l'insert : stratégie de sous-clonage

- Choix de sites compatibles vecteur+insert
- Ligation vecteur + insert
- Obtention d'un mélange de molécules
- Transformation bactérienne



On a un vecteur, on a une enzyme de restriction qui doit être compatible. Un vecteur que l'on digère par EcoRI et l'insert aussi. On obtient cela en présence d'une ligase.

Le vecteur peut très bien se refermer ce qui fait qu'on obtiendra pas forcément la chose attendue, on tient un mélange de moelles que l'on va isoler grâce à la transformation bactérienne.

4-Constructions de molécules d'ADN recombinant

4-3 Transformation bactérienne et sélection des molécules d'ADN recombinantes

➤ les plasmides sont introduits dans les bactéries : la transformation



- Bactéries ayant intégré un plasmide poussent sur milieu+antibiotique
- Sélection des bactéries contenant un plasmide avec insert :
 - Digestion par enzymes de restriction, PCR, séquençage

Mélange ADN plus vecteur : on fait la transformation bactérienne, on les étale sur un milieu qui contient la bactérie sur un milieu qui code pour ce plasmide. On obtient des clones bactériens qui peuvent être le vecteur de départ ou celui avec insert.

Etre capable de sélectionner les batteries qui ont le palmiste avec l'insert : principe du sous clonage

Pour les sélectionner on a Différentes techniques :e extrait ADN et digestion enzymatique ou alors on utilise la culture bactérienne pour mettre en évidence l'insert par PCR. Ce sont deux méthodes possibles pour identifier des clones recombinants.

CM3 PREAMBULE : REPLICATION ADN

Préambule : la réplication est semi-conservative



Synthèse in vivo de l'ADN

Watson et Crick ont proposé la structure en double hélices complémentaires : cela faisait penser que cela avait un rôle dans la synthèse (le fait d'être complémentaires).

L'expérience de Meselson et Stahl : la réplication est **semi conservative**. Un rien sert à la synthèse d'un brin complémentaire.

Sur des bactéries sur azote 15 ou bactéries cultivées sur azote 14 : on extrait ADN et on fait un gradient de densité par ultracentrifugation. On sépare les ADN bactériens cultivés sur azote 14 car il paraît plus léger que celui cultivé sur azote 15.

Bactéries sur azote 15 : pendant une génération on les met sur azote 14. On observe un ADN de densité intermédiaire Cela montre que l'ADN de densité intermédiaire : hypothèse est qu'il soit constitué d'un brin d'ADN azote 15 qui est le parental et un brin d'ADN azote 14 qui est néosynthétisé: cela prouve bien qu'elle est semi conservatrice. **Un brin matrice est utilisé pour synthétiser un brin complémentaire.**

La réplication comprend 3 étapes :

Réplication de l'ADN=synthèse de l'ADN *in vivo*

3 étapes:

- i) **initiation de la réplication** au niveau de l'origine de réplication
- ii) **élongation de la réplication**: fonctionnement des fourches de réplication
- iii) **terminaison de la réplication**

L'étape de l'élongation : processus semblable entre procaryotes et eucaryotes

Ce qui différencie est donc l'initiation et la terminaison.

L'étude de la réplication aujourd'hui :

Mécanisme difficile à étudier *in vivo*

Nos connaissances reposent essentiellement sur :

- la reconstitution *in vitro* de système de réplication
- l'analyse de mutants dans les protéines de la réplication

Très nombreuses protéines impliquées sous forme de complexes

Régulations multiples impliquant des modifications post-traductionnelles de ces protéines (non traitées)

Ce cours est une vision très simplifiée des mécanismes de réplication chez les Procaryotes et les Eucaryotes

Intérêt de l'étude de la réplication en infectiologie et en cancérologie

1) Elongation commune procaryotes et eucaryotes : étape 2

1- L'élongation : fonctionnement de la fourche de réplication

1-1 Les protéines de la réplication

1-1.1 Les ADN polymérases

Propriétés :

- ✓ ADN polymérase ADN dépendante
- ✓ Synthèse dans le sens 5' vers 3'
- ✓ Substrats : dNTP, « choisi » complémentaire de la matrice
- ✓ Nécessité d'une amorce pour initier la synthèse
- ✓ *In vivo*, l'amorce est un ARN

Ces propriétés conditionnent le mécanisme de réplication

Protéines impliquées dans la fourche de réplication :

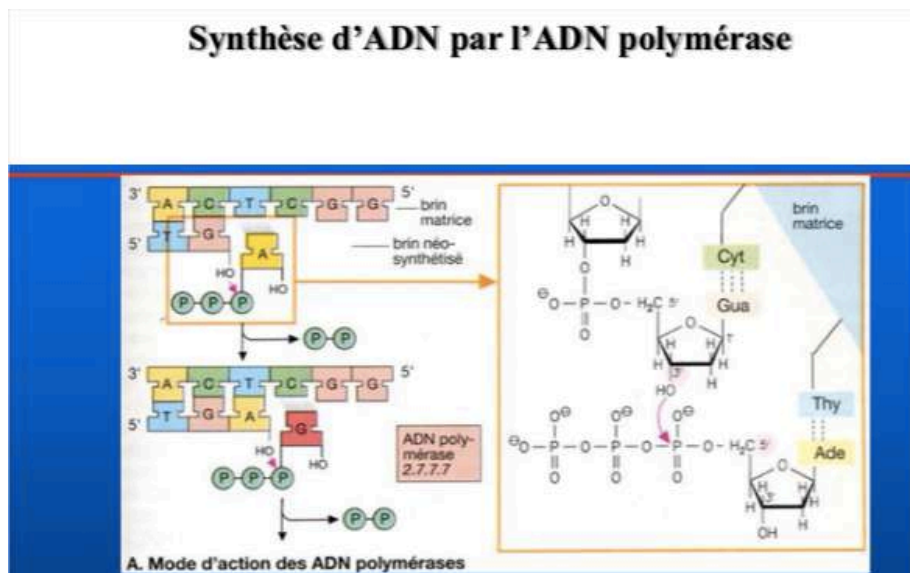
->ADN polymérase : elles ont des propriétés citées sur la photo à côté -, elles vont conditionnées la réplication.

->ADN polymérase ne sait recopier que de l'ADN : donc ADN dépendante

->Sens de synthèse : toujours 5' vers 3'

->Substrats : dNTP (choisis comme complémentaires de la matrice)

-> Elle ne peut pas commencer la réplication : elle a besoin d'une **amorce** : besoin d'un brin d'acides nucléiques déjà hybridé avec la matrice : *in vivo* celui-ci est un ARN car c'est l'ARN polymérase qui synthétise. ARN sont capables de synthétiser des acides nucléiques sans avoir au préalable une amorce.



Mécanisme catalytique de l'ADN polymérase

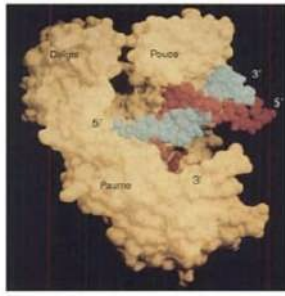
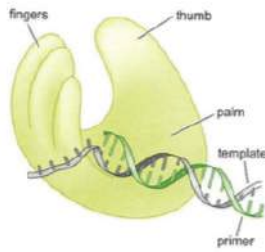


FIGURE 30-10 Structure par rayons X du fragment de l'ADN polymérase I (Klenow fragment) complexée avec un ADN double brin. (a) La surface de l'ADN accessible aux solvants est en jaune, les 12 nt du brin matrice sont en bleu clair et les 14 nt du brin amorce sont en rouge. (b)

Biochimie

Donald Voet, Judith G. Voet



Toujours phosphate en position **alpha** qui est inclut au cours de la synthèse.

On a le brin matrice : hybridation du C au G

Extrémité 3'OH qui fait une liaison phosphodiester avec le 5'phosphate du nucléotide suivant

Si on veut marquer un brin ADN radioactivement : on utilise de l'alpha P32 dCTP : il faut que cela soit le alpha qui doit être radioactif pour que la molécule d'ADN soit radioactive car il est incorporé dans ADN

Travaux par cristallographie de l'ADN polymérase I de Ecoli.

Le schéma de l'ADN polymérase : espace de mains avec des doigts et un pouce. On a le domaine polymérase au milieu dans la paume de la main.

Catalyse au sein du domaine polymérase :

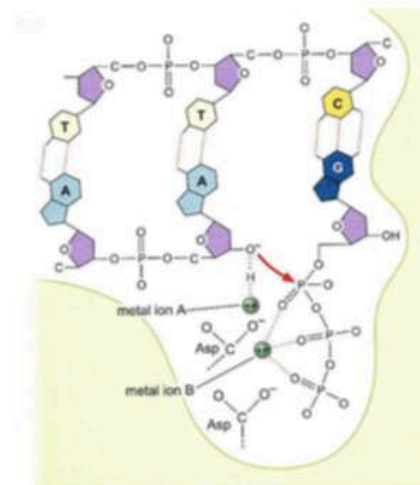
Dans le mécanisme catalytique de la synthèse d'ADN : important la présence d'ions divalents (ions A et B), ils sont présents dans la poche catalytique et maintenus par interactions avec des acides aspartiques. Ces ions divalents sont indispensables à la relation catalytique. Ce sont souvent des magnésiums (on en trouve dans le tampon).

En haut on a le brin matrice et en bas, le bras en cours de synthèse avec une extrémité 3'OH.

Ils ont deux rôles : *ion A* interagit avec le groupement OH de l'amorce et favorise l'apparition d'un groupement réactif qui va venir attaquer le phosphate. C'est une attaque nucléophile par l'oxygène sur le groupement phosphate en alpha .

Ion B : stabilisation du PPi.

Au niveau du site catalytique



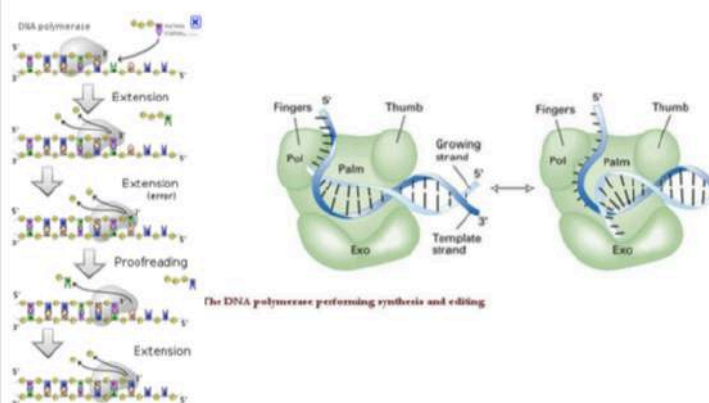
Biologie Moléculaire du gène

dNTP rentrent en permanence dans la poche catalytique.

Pas obligatoirement avec un G. C'est lorsque l'on a une hybridation avec la matrice que le nucléotide va être stabiliser dans la poche et que cela va permettre son incorporation.

Les doigts de la polymérase se referment pour le retenir dans la poche catalytique. Ils sont tous présents en permanence mais dès qu'il y en a un qui est stabilisé les doigts se referment et cela permet son incorporation.

Activité proofreading (correction d'erreur) de l'ADN polymérase



ADN polymérase est spécifique des dNTP. Les ribonucléotides sont présents en concentrations 10 fois supérieure à la présence des dNTP. Les rNTP ne peuvent pas entrer. Les ribonucléotides n'ont pas assez de places pour entrer donc pas incorporer dans ADN.

ADN polymérase n'a pas seulement une activité polymérase , elle a aussi une activité exonuclease 3' vers 5' : indispensable à la correction d'erreur de l'ADN polymérase :

c'est l'activité de corrections d'erreurs. En face du A il y a un T donc la OK , autre endroit on a un C en face d'un A ce qui crée un mésappariement : le domaine polymérase est très sensible au fait qu'il soit apparié à la matrice. Si mésappariements l'extrémité 3' de l'amorce n'a plus d'activité, cela empêche l'interaction avec le domaine polymérase et il va donc à ce moment basculer dans le domaine exonucléase. Cela permet d'éliminer le dernier nucléotide incorporé (ici un A). A ce moment ci on a l'amorce et la matrice qui sont complémentaires : lorsque c'est complémentaire l'amorce rebascule dans le domaine polymérase et l'enzyme se remet à polymériser l'ADN.

ADN polymérases procaryotes

ADN polymérases	Fonction
Pol I	Dégradation de l'amorce ARN, réparation, activité correctrice 3'-5' exonucléase 5'-3'
Pol II	Réparation
Pol III	Réplication du chromosome, activité correctrice 3'-5' exonucléase
Pol IV	Réparation et réplication par passage sur lésion (TLS, translesion synthesis)
Pol V (UmuC, UmuD ₂ C)	TLS

5 Ecoli dont 2 dans la réplication :

Polymérase III (réplication du chr) la poly à la propriété de réplication et de correction. On dit qu'elle est prossessive, elle incorpore 1000 nucléotides par secondes.

Poly I : impliquée dans la dégradation des amorces de ARN , elle a deux activités exonucléases: correction d'erreurs 3' vers 5' et une activité exonucléase 5' 3'. Elle n'est pas prossessive , elle fait du 20 à 100 nucléotides par secondes.

Poly V : réplication dans situations particulières.

15 ADN polymérases eucaryotes

Table 1 Summary of eukaryotic DNA polymerase functions

Polymerase	Family	Cellular function
α (alpha)	B	Chromosome replication (initiation, Okazaki fragment priming)
δ (delta)	B	Double-strand break repair Chromosome replication (elongation)
ϵ (epsilon)	B	Nucleotide-excision repair Base-excision repair Mismatch repair Double-strand break repair Chromosome replication (elongation)
ζ (zeta)	B	Nucleotide-excision repair Break-excision repair Mismatch repair Double-strand break repair
γ (gamma)	A	Translesion synthesis
θ (theta)	A	Mitochondrial DNA replication
β (beta)	X	DNA repair
λ (lambda)	X	Base-excision repair
μ (mu)	X	Base-excision repair
σ (sigma)	X	Nonhomologous end joining
Telomerase	RT	Sister chromatid cohesion
η (eta)	Y	Telomere maintenance
ι (iota)	Y	Translesion synthesis
κ (kappa)	Y	Translesion synthesis
Rev1	Y	Translesion synthesis

Chez les eucaryotes on en a 15

3 qui sont impliquées dans la réplication

Polymérase alpha : impliquer dans la polymérisation de l'initiation

Polymérase delta et upsilon : pendant élongation :

delta : allonge le brin discontinu

upsilon : allonge le brin continu

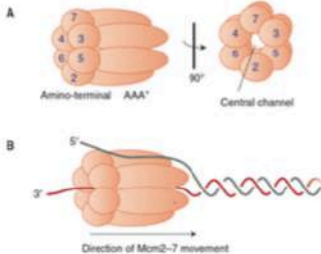
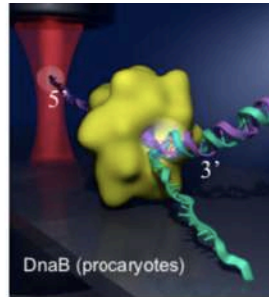
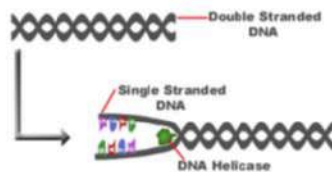
Son rôle est de dénaturer d'ADN double brins au niveau de la fourche de réplication. Cette

hélice est constituée d'un hexamère. Hexamère qui forme un anneau autour d'un seul des brins d'ADN. C'est le cas pour hélicase de Ecoli qui s'appelle DNA B.

Hélicase forme un anneau autour d'un seul des brins d'ADN et se déplace en hydrolysant de l'ATP : elle va ainsi dénaturer d'ADN au fur et à mesure qu'elle se déplace. Affinité que pour un simple brin : non active si elle entoure un ADN double brin.

Hélices des eucaryotes : 7 sous unités, elle fait un héptamère autour du brin 5' 3' et pareil elle dénature ADN en se déplaçant .

1-1.2 L'hélicase



Mcm2-7 (eucaryotes)

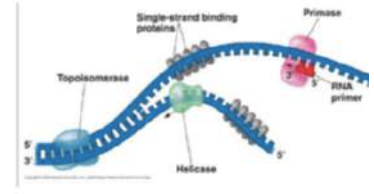
doi: 10.1101/cshperspect.a010124

1-1.3 SSBP = Single Strand Binding Protein

- SSBP: procaryotes
- RPA : eucaryotes

1-1.4 Topoisomérase

Suppression des super tours positifs devant la fourche de réplication



Protéines se liant à l'ADN simple brin : SBP

Une fois que l'hélicase est passée il y a une zone simple brin. Pour qu'elle soit maintenue il y a liaisons avec les protéines SSBP. Ce terme est utilisé chez les procaryotes, chez les eucaryotes on les appelle les RPA.

En avant de la fourche de réplication : si on ouvre à un endroit ADN : en avant il va se sur enrouler car toujours équilibre entre sur et déroulement. Si on le laisse se sur enrouler un moment ça ne va plus fonctionner donc il y a des topoisomérases qui vont empêcher que la fourche soit bloquée en supprimant le sur enroulement.

1-1.5 La primase

- ✓ ARN polymérase ADN dépendante
 - ✓ Responsable de la synthèse des amorces de réplication
 - ✓ Activité stimulée par association avec l'hélicase
 - ✓ Procaryotes (DnaG)
 - ✓ Associée à l'ADN pol α chez les Eucaryotes
- hPrimpol (human primase-polymerase)**

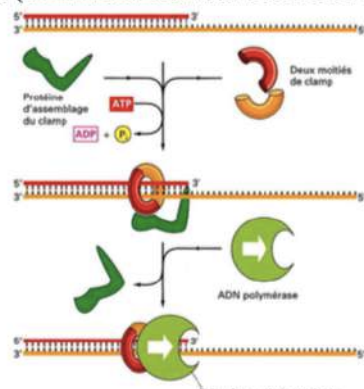
Primase : La primase est une ARN polymérase responsable de la synthèse de l'amorce ARN.

Stimulée par son association avec l'hélicase : important car parfois il peut y avoir un ADN dénaturé. Si la protéine ne synthétisait que de l'ADN quand elle entoure du dénaturé ça voudrait dire qu'on pourrait faire des amorces partout où c'est dénaturé donc le fait qu'elle doit être activée par hélices cela permet de contrôler que les amorces ont bien lieux au niveau des fourches de réplication.

La primase chez les procaryotes s'appelle DNA G,

eucaryotes : associée en complexe avec h primo.

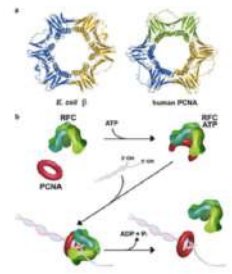
1-1.6 Clamp (ou anneau coulissant de l'ADN polymérase



Clamp :
PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (eucaryotes) protéine β (bactéries)
Protéine d'assemblage :
RFC (replication factor C) (euca.) complexe γ (bact.)

Extrémité 3' de l'amorce est reconnue par un complexe que l'on appelle protéine d'association de-u complexe du Clamp. Ces protéines viennent poser un anneau au niveau de l'extrémité 3' de l'amorce. Cette anneau peut être constitué soit de 2 ou 3 sous unités : dépend de pro ou eucaryotes.

Cet anneau va être reconnu par ADN polymérase et permet ainsi de positionner l'ADN polymérase au niveau de l'extremite 3' de l'amorce.
Cet anneau est responsable : ADN III est processive : son rôle est de stabiliser ADN polymérase sur ADN. Pour qu'elle soit maintenue sur la molécule d'ADN il faut qu'il y ait l'anneau. Donc stabilisation de l'ADN polymérase sur le brin ADN.

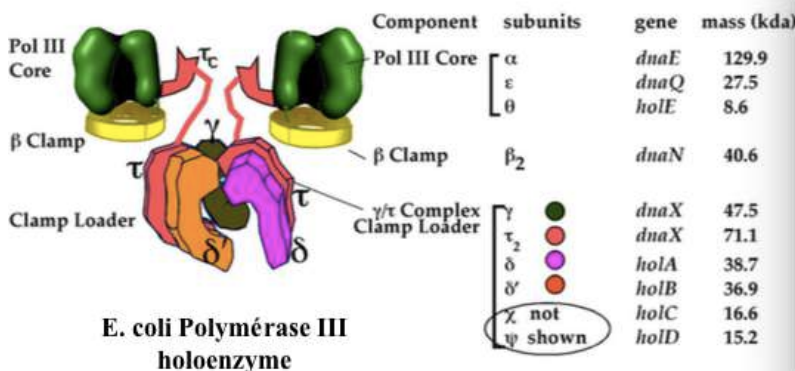


doi: 10.1007/978-94-007-4572-8_14

PCNA : on regarde pour le cancer.

1.7 ADN polymérase holoenzyme

1-1.7 ADN polymérase holoenzyme

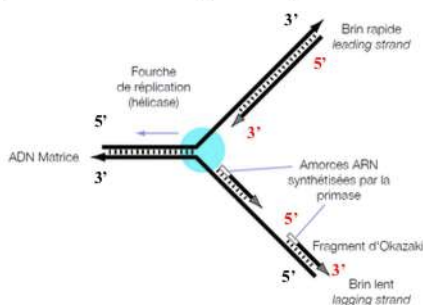


Ce qui permet la réplication sous forme d'ADN polymérase : holoenzyme

On trouve le poseur d'anneau coulissant, un anneau coulissant pour chaque ADN et un ADN poly II pour chaque brin d'ADN répliqué.

1-2 Fonctionnement de la fourche de réplication

1-2.1 Synthèse continue (précoce)/discontinue (retardée)



- Amorces ARN (8-14 nt) et fragments d'Okazaki (de 1000-2000 nt chez les procaryotes, 100 à 400 chez les eucaryotes)
- La synthèse discontinue imposée par le sens de synthèse de la polymérase

Synthèse continu et discontinue

Fourche de réplication : endroit ou ADN se dénature et c'est à cet endroit que se trouve le complexe de réplication (ADN poly et protéines associées).

Fourche de réplication qui va vers la gauche ici les deux brins sont synthétisés en même temps : brin continu et discontinu :

Sur l'un des brins le sens de synthèse de la polymérase de 5' vers 3' c'est le même sens que le sens de profession de la fourche de réplication, au fur et a mesure que la fourche se déplace vers le mur : la synthèse a lieue donc c'est une synthèse continue

Sur l'autre brin le sens de synthèse de 5' vers 3' va plutôt à droite alors que la fourche de réplication se déplace vers la gauche

Au fur et a mesure que les enzymes se déplacer elles synthétisent des fragments d'ADN qui sont les fragments d'okazaki. Si on voulait que la synthèse soit continue sur l'autre brin il faudrait que cela est commencé à un autre endroit. L'astuce ici est d'avoir donc une synthèse discontinue.

Fragments Okazaki : ADN synthétisé en discontinu avec une taille sur la diapo

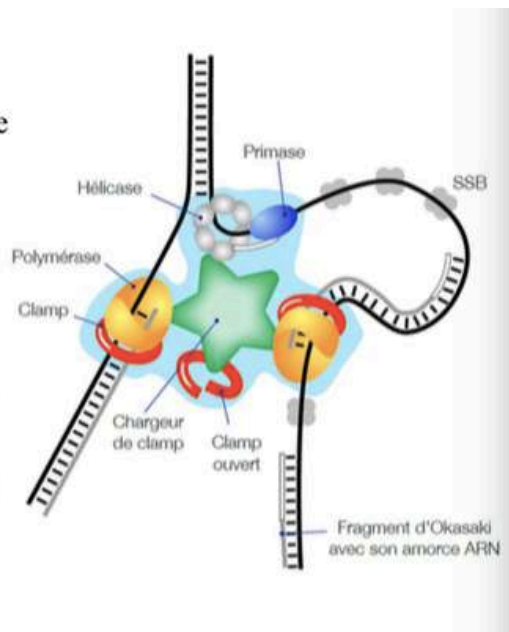
Au début de chaque fragment on a une amorce d'ARN : ce qui est en blanc

Pour le brin continu on a une seule amorce ARN au début de la synthèse

1.2.2 Le réplisome

1-2.2 Le réplisome

- ✓ Complexe protéique assurant la réplication, structuré autour du chargeur de clamp
- ✓ 2 brins synthétisés en même temps par une ADN polymérase chacun
- ✓ Le brin discontinu fait une boucle



Réplisome : Ensemble des protéines impliquées dans la réplication, il est organisé autour de chargeur de clamp, il interagit avec une ADN polymérase sur chaque brin.

Devant la fourche de réplication on a l'hélicase qui dénature d'ADN en s'entourant autour d'un seul des brins puis elle se déplace ce qui provoque la dénaturation.

Primase : ARN polymérase responsable de la synthèse de l'amorce ARN

Dans le modèle thrombone de réplication : le brin discontinu fait

une boucle.

On a le chargeur de Clamp, une molécule de polymérase qui synthétise le brin continu et une qui synthétise le discontinu.

- 1) hélicase interagit avec la primase au fur à mesure qu'elle progresse. Cette interaction stimule l'activité de la primase,
- 2) Synthèse d'une amorce ARN (due à 1)
- 3) Le poseur d'anneau coulissant pose un anneau sur cette amorce

Fragment d'Okazaki : en cours de synthèse : cette synthèse se poursuit jusqu'à ce que l'ADN polymérase arrive au niveau du fragment d'Okazaki précédent.

4) ADN polymérase n'a de l'affinité que pour un ADN qui est partiellement simple brin. Ici il y a double brin donc plus d'affinité

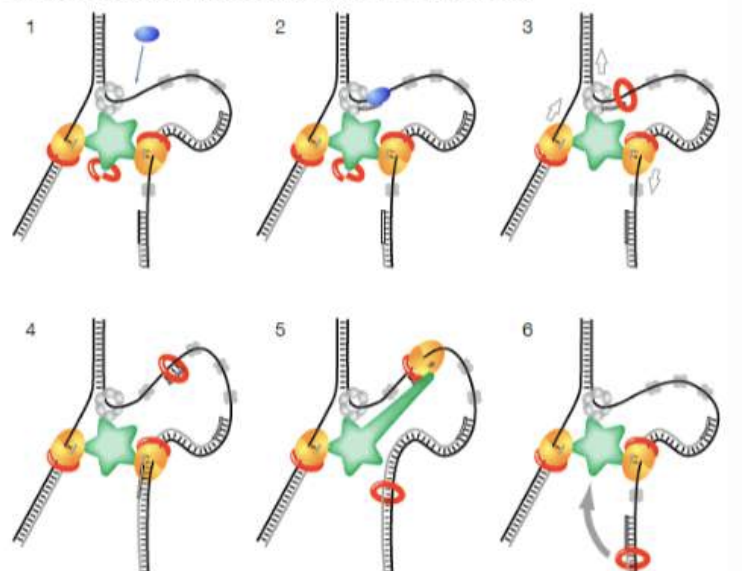
5) Quand elle arrive sur un ADN double brin elle n'a plus d'affinité pour l'ADN, à ce moment le poseur d'anneau coulissant va participer au déplacement de l'ADN polymérase au niveau de l'ADN coulissant et la placer au niveau du fragment d'Okazaki suivant.

6) synthèse de l'ADN puis on repart au départ

Ces anneaux coulissants restent associés à l'ADN et servent de relais et interagissent avec l'ADN et interagissent avec des protéines de réparation de l'ADN ce qui permet aux protéines de rester associées à l'ADN dans le noyau. Les anneaux coulissants sont des points de relais pour la réparation de l'ADN.

Cela est valable en particulier pour les procaryotes

1-2.3 Mécanismes moléculaires de la réplication



C'est le même fonctionnement mais il y a 3 polymérase :

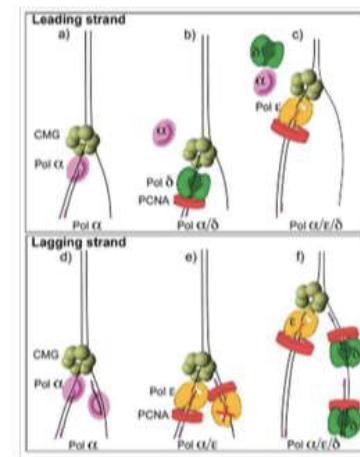
La primase : complexe constituée de deux sous unités alpha polymérise et de deux sous unités primase.

Hélicase (en vert) : la primase polymérise alpha va synthétiser l'amorce ARN (en rose). Comme nous sommes dans un gemme complexe, l'amorce d'ARN va servir directement d'amorce pour permettre la synthèse d'ADN par la polymérise alpha.

La polymérase alpha n'est pas prolessive donc elle va être substituée soit par la delta soit par upsilon qui sont elles prolessives. Si on ajoute une polymérise delta la synthèse du brin continu va être lente (elle n'est pas adaptée à la synthèse eu brin continu) mais si on utilise la polymérise upsilon la synthèse sera rapide. C'est comme ça qu'on a montre que c'est la polymérase upsilon qui synthétise le brin continu. Sur le brin discontinu si on ne met que de la polymérise upsilon : elle n'est pas capable de le synthétiser. Au contraire ici l'expérience montre que c'est la delta qui est adaptée au brin discontinu.

Deux polymérisés qui synthétisent au niveau de la fourche de répliation.

3 polymerases chez les Eucaryotes



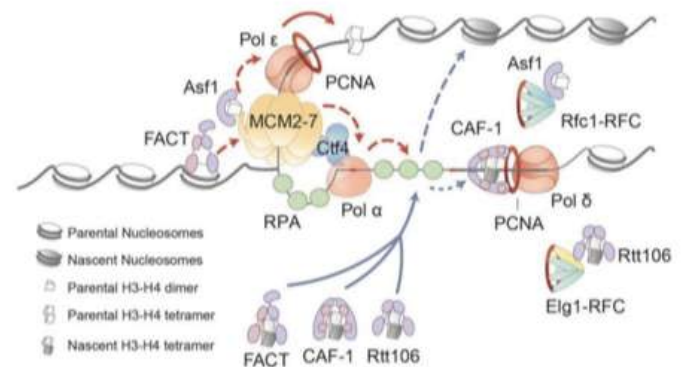
Reconstitution *in vitro* de réplisome
doi: 10.1080/19491034.2016.1205774

Pol α : allongement des amorces ARN (complexe Pol α : Primase)
Pol δ : synthèse lente sur le brin continu
Pol ε : adaptée au brin continu
Pol δ : adaptée au brin discontinu

Chez les eucaryotes : problème : ADN est organisé en nucléosome. Il faut que la fourche de répliation passe aux travers des nucléosomes. Pour ceci on a intervention des chaperons d'histones. Le chaperon d'histone FACT AFS1 lorsque la fourche de répliation arrive prennent en charge les dimères d'histones en défaisant le nucléosome.

Quand la fourche est passée : ce sont des chaperons d'histones qui vont repositionner le nucléosome.

Sauf que *in vivo* la répliation a lieu sur un ADN chromatinien !!



Chaperons d'histone (FACT, Asf1) recrutés par l'hélicase prennent en charge les nucléosomes parentaux
Réassociation des nucléosomes par interaction des chaperons d'histones avec les ADN polymérisés, PCNA (via CAF1) et RPA

1-3 Fidélité de la répliation

1-3 Fidélité de la répliation

✓ Taux d'erreur globale de la répliation : 1 erreur / 10^{10}

✓ Taux d'erreur pol III : $1/10^5$

✓ La diminution du nombre d'erreur dépend

- ✓ activité proofreading de la polymérase : $1/10^7$
- ✓ Correction des mismatch (voir chapitre suivant)

Dans le génome on a une chance d'être répliquée sans erreur. Cette fidélité permet de le répliquer sans introduire d'erreur.

LA fidélité dépend de :

-taux d'erreurs global de la polymérisé III : $1/10$ puissance 5 pb

Pour arriver donc à 10 puissance 10 il faut prendre en compte l'activité exonucléase de la polymérisé et on arrive à $1/10$ puissance 7 . Pour arriver bien à 10 on prend en compte les mécanismes de réparation de 'DAN qui ont lieu pendant la répliation.

2- L'initiation de la réplication

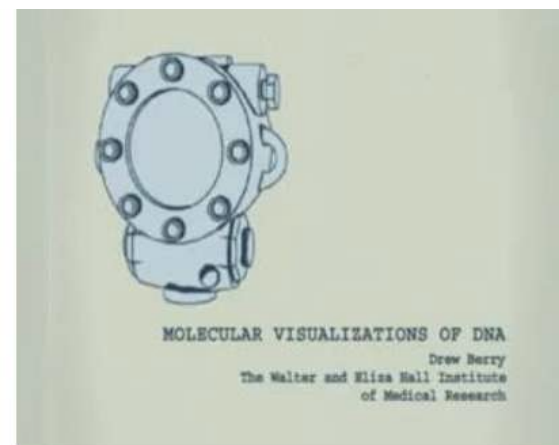
2-1 Le modèle du réplicon (Jacob et Brenner, 1963).

- ✓ Ensemble de l'ADN répliqué à partir d'une origine de réplication
- ✓ L'initiation de la réplication contrôlée par :
 - L'initiateur : protéine nécessaire à l'initiation

-> Le réplicateur : séquences suffisantes en cis pour la réplication composé :

- de sites de fixation pour l'initiateur
- de séquences riche en A/T facilitant la dénaturation

L'origine de réplication est la zone où commence la réplication. L'origine est incluse dans le réplicateur



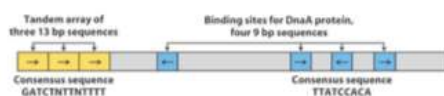
2-2 Initiation de la réplication chez E Coli

- ✓ L'initiateur : Dna A
- ✓ Réplicateur : ORI C / un par chromosome

Chez Coli la réplication est bidirectionnelle ou partent deux fourches de réplication

Sites de fixation en bleu pour Dna A et trois séquences répétées qui sont riches en A et T en jaune ou va se produire la première dénaturation

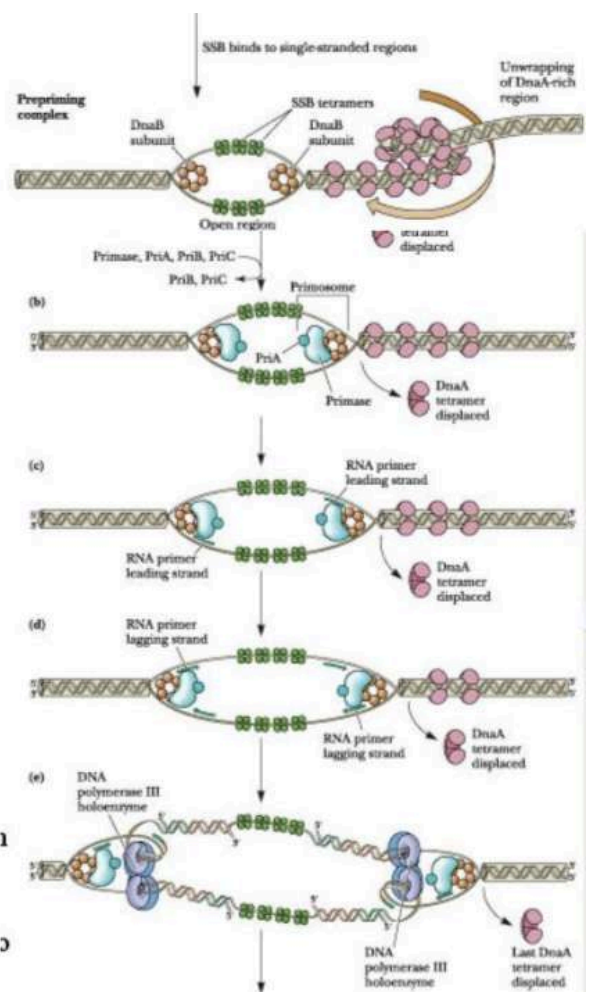
Origine de réplication chez les bactéries



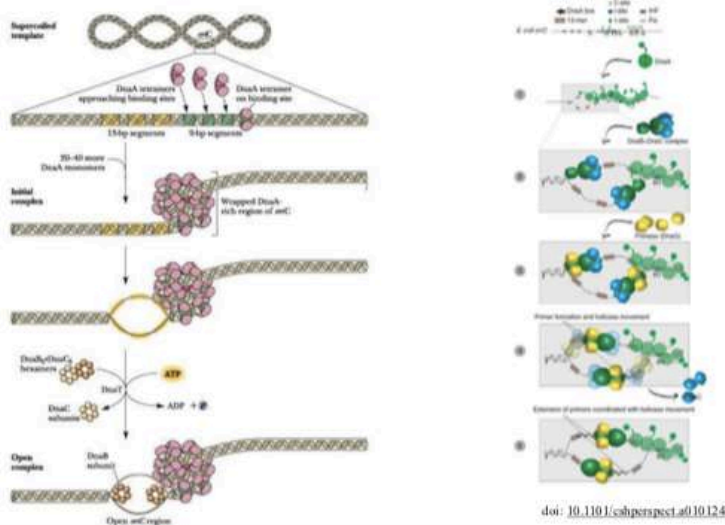
Séquences A/T riches

Séquences de fixation Dna A

Mécanisme de réplication chez les procaryotes



Mécanismes moléculaires de l'initiation de réplication chez E.Coli



En vert : fixation de Dna a et en jaune : riche en A et T

- 1) Fixation coopérative de Dna a sur Ordi C, cela induit une courbure dans l'ADN qui provoque la dénaturation du brin d'ADN au niveau des séquences riches en A et T.
- 2) création d'une zone simple brin qui permet la fixation de l'hélices qui est Dna b chez E.coli, cette hélices est posée par un poseur d'hélices qui est Dna C.
- 3) interaction de Dna a avec hélicase : stimulation donc commence à dénaturer l'ADN et au fur et à mesure elle déplace les sous unités protéiques Dna a .

Single strand binding protei : rprotéines qui se fixent à l'ADN simple brin

Interaction hélicase: permet synthèse d'une amorce d'ARN

La synthèse d'une amorce ARN puis association avec une ADN polymérase. Synthèse continue et discontinue avec formation d'une fourche.

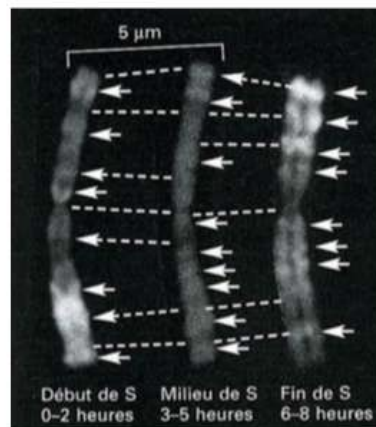
Le brin continu (précoce) commencerait avant celle du discontinu (retardé)

Fin de l'initiation chez les procaryotes, on passe ensuite à l'élongation

2-3 Initiation de réplication chez les Eucaryotes

2.3) Initiation chez les eucaryotes

- ✓ Synthèse d'ADN durant la phase S
- ✓ Couplage au cycle cellulaire
- ✓ En moyenne, une origine tous les 30 000 pb chez les Eucaryotes

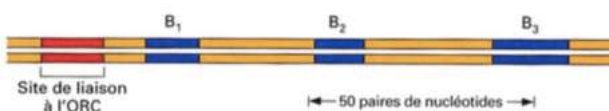


Il y a un cycle cellulaire et la synthèse ne se fait que en phase S. L'initiation est ainsi couplée au cycle cellulaire.

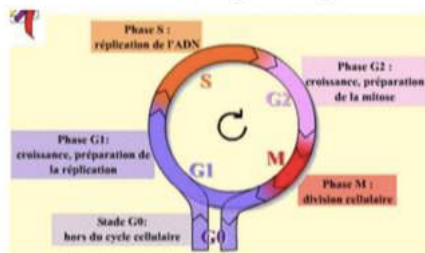
Zone plus blanche : ADN en brin d'être répliqué, certaines origines de réplication fonctionnent au début de phase S d'autres seulement en fin de phase S. C'est très rare que cela fonctionne tout le long de la phase S.

On estime u'il y a une origine toutes les 30000 pb.

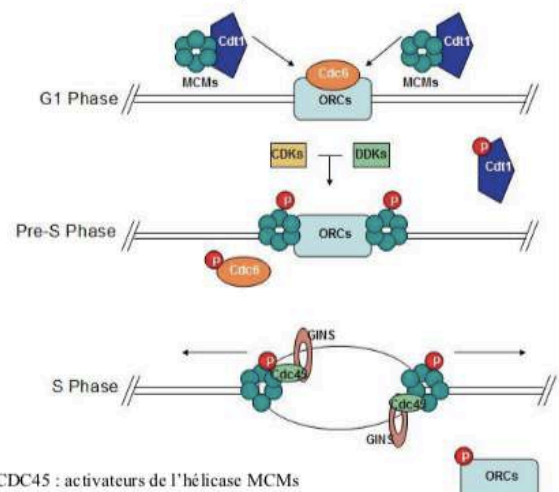
Structure des origines de réplication de levure
(ARS : autonomously replicating sequences)



Protéine initiatrice ORC (Origin Recognition Complex)



Mécanismes moléculaires simplifiés de l'initiation chez les Eucaryotes

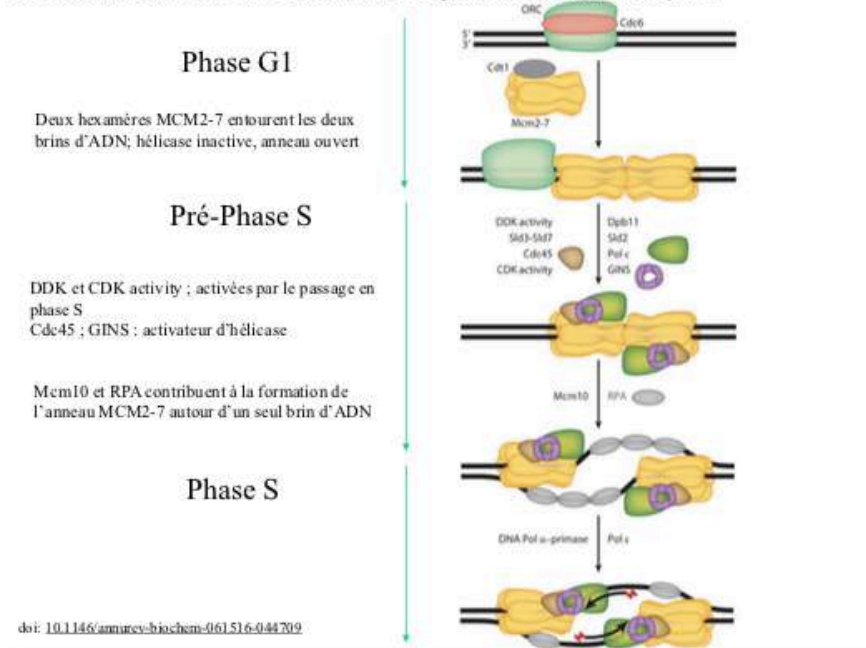


GINs, CDC45 : activateurs de l'hélicase MCMs

Origine de réplication de levures : ARS

ARS sont constipées d'un cycle due liaison pour initiateur : chez eucaryotes il s'appelle ORC. Et 3 séquences riches et A et T ou va se produire la dénaturation.

Mécanismes moléculaires de l'initiation de réplication chez les Eucaryotes



Un partie des évènements se produit en phase G1 et une partie se produit en phase S :

G1 : sélection des origines de réplication

ORC s'associe aux origines et permet de recruter des molécules d'ADN hélicase

Hélicase reste inactive car elle forme d'un bien hexamere mais il est ouvert donc non active, elle est juste associée à l'origine de réplication

S : cyclines qui dependent du cycle cellulaire : les CDK sont activés : ces CDK sont des cyclones qui sont des kinases qui phosphorent CDT1 CDC6 et ORC.

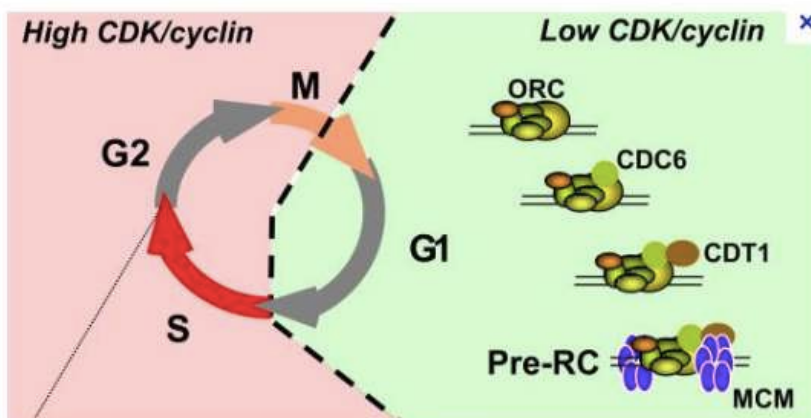
Une fois que ORC est P il quitte l'origine par contre CDC6 et CDT1 quittent aussi le complexe mais leur P les conduit vers la dégradation par le protéasome.

Tous ces événements permettent le recrutement de l'hélices permettent de fermer l'hélicase, elle devient active débarrassée de ORC et commence à dénaturer l'ADN. On a au stade 3 hélicase pas encore active car elle entoure deux brins mais après elle n'entoure plus que un brin donc elle va dénaturer d'ADN. A ce moment elle va être active donc il y a recrutement du complexe ADN alpha primate et cela va induire la synthèse des amorces par la primase et synthèse ADN donc début de l'élongation..

Phase G1 : sélection des origines de réplication et placement de hélicase non active

Phase S : hélices devient active et cela veut dire que c'est le début de l'élongation

Pourquoi une origine de réplication est sélectionnée une fois durant le cycle cellulaire



Chaque origine de réplication ne fonctionnera qu'une seule fois donc seules les sélectionnées en G1 seront actives. Cela évite que plusieurs régions du génome soient répliquées plusieurs fois. C'est la sélection par ORC

Pendant les phases G1 : taux de kinases est faible donc ORC... sont non P.

Phase S jusqu'à la mitose : haut niveau de kinases donc ORC est P. Quand il est P il ne peut pas sélectionner d'origines de réplication

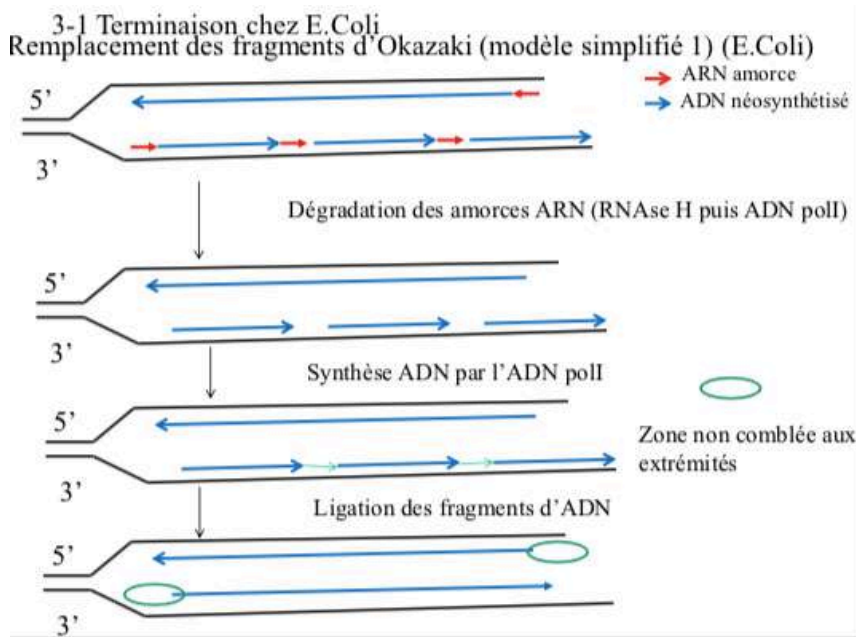
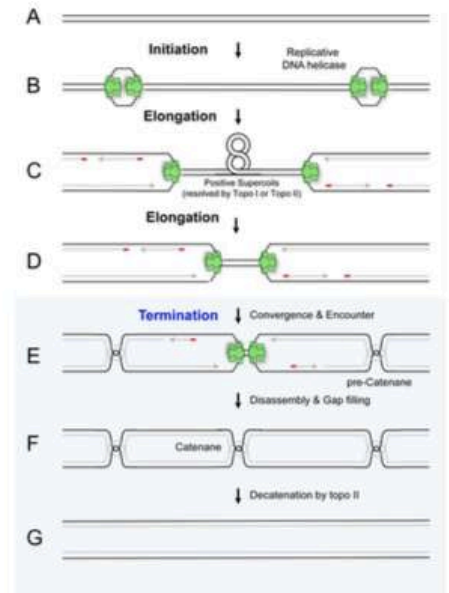
3) Terminaison de la réplication

Fin de la réplication : Lorsque les fourches de réplication se rejoignent.

Lorsqu'elles se rejoignent on produit un ADN À 4 brins, 2 brins vont être dissociés de la II par els topoïsomérase
Remplacement des amorces ARN par de l'ADN et s'assurer qu'ils sont sur les deux Brins continus.

Mécanisme différents entre procaryotes et Eucaryotes :

doi: [10.1038/nrm.2017.42](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42)

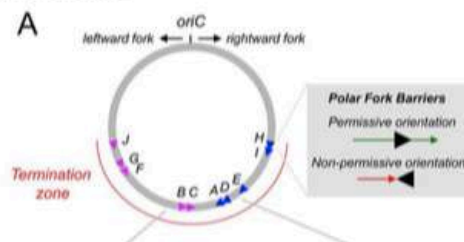


1) Dégradation tout d'abord des amorces ARN (en rouge) , ces amorces sont dégradées par une activité ARNase H. Cette activité dégrade de l'ARN associé à de l'ADN Tout l'ARN va être dégradé sauf le dernier ribonucléotide car il est lié à de l'ADN car il a servi d'amorce. Il sera dégradé par l'activité exonucléase 5' 3' de l'ADN poly I

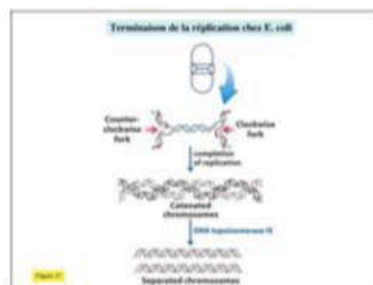
2) cette extrémité 3' OH sert d'amorce pour combler l'espace laissé par la dégradation des amorces. On obtient des fragments qui sont totalement de l'ADN et on a intervention d'une ligase qui lie les fragments entre eux et c'est comme ci que sont éliminés les amorces ARN chez les procaryotes.

Fin de la réplication sur ADN circulaire

Termineurs de réplication



Une ADN topoïsomérase de type II (la résolvasse) sépare les molécules filles



Dans la zone du bas du cercle on a des zones de terminateur de réplication

On a deux molécules d'ADN doubles brins emprisonnées l'une dans l'autre : concatémères d'ADN : il faut une topoïsomérase la IV chez Coli qui s'appelle aussi la résolvasse.

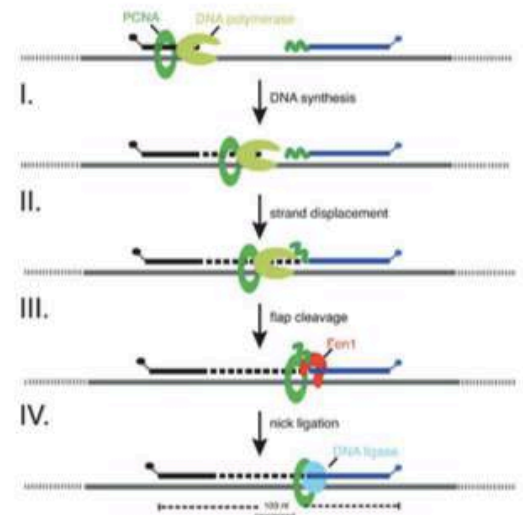
Puis la cellule va se diviser des lors.

CHEZ LES EUCARYOTES

3-2 Terminaison de la réplication chez les Eucaryotes

Remplacement des fragments d'Okazaki (modèle simplifié) (eucaryotes)

A Schematic of Okazaki fragment maturation assay



Fen1 Flap Endonuclease 1 (FEN1)

5'-3' exonuclease

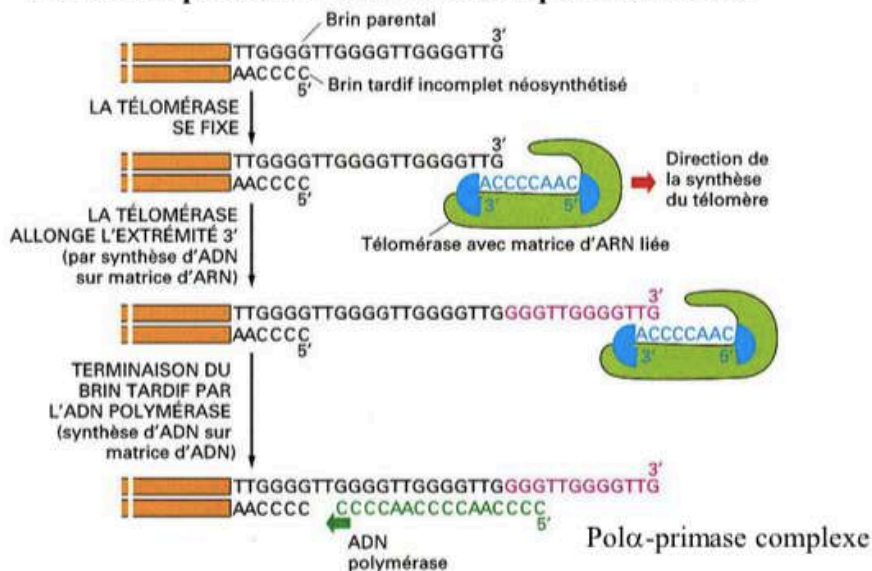
doi: 10.1093/nar/gkv899

Différence : il n'y a pas d'activité RNase H qui soit impliquée dans l'élimination des amorces, il y a juste un déplacement de brin et quand elle trouve le morceau d'ARN elle le déplace : il va être dés hybridé et elle resynthétise de l'ADN en même temps.

Ensuite intervention d'un complexe protéique que l'on appelle Fen 1 = endonucléase qui reconnaît l'ARN déplace et coupe à la jonction ARN ADN. Ainsi elle élimine l'amorce et une DNA ligase permet de lier les deux fragments d'ADN.

Pendant ce temps on l'anneau couissant qui recrute ces différentes protéines. Au départ il y a l'ADN polymérise puis substituée par Fen 1 et ensuite par la ligase qui va lier les fragments.

3-3 Fin de réplication d'un ADN linéaire par la télomérase



TER : ARN de la télomérase; TERT Télomérase reverse transcriptase

La télomérase : télomères riches en séquences répétées. La nature de la séquence répétée dépend de l'espèce.

Télomérase : enzyme constituée d'un ARN (bleu) et aussi d'une partie protéique (vert) qui a une activité reverse transcriptase. Elle synthétise de l'ARN à partir d'ADN. La télomérase allonge les télomères pour les préserver et car son ARN est complémentaire de la séquence du télomère. L'activité reverse transcriptase va recopier de l'ADN en se servant de l'ARN comme matrice. La télomérase saute sur ses extrémités. Elle va se déplacer et au fur et à mesure elle allonge le

télomère. ARN présent dans la télomérase est le TER.

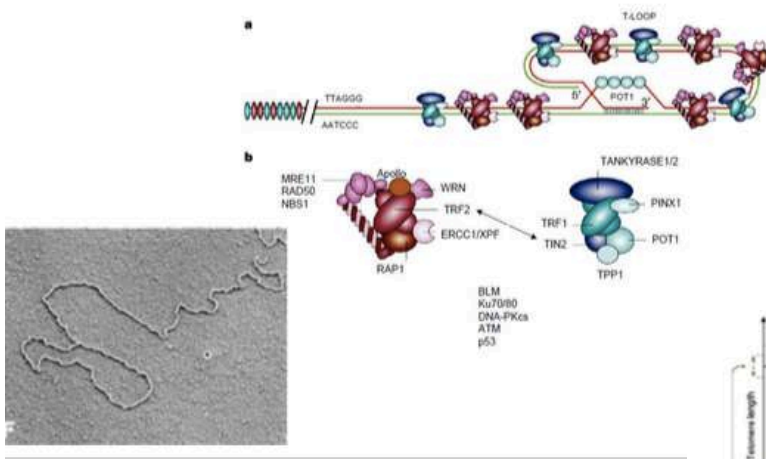
Ca s'allonge jusqu'à ce que la primase interagisse avec le télomère et cela permet de combler le télomère et de le rendre double brin grâce à l'ADN polymérase.

L'activité télomérase n'est pas dans toutes les cellules ; elle est présente dans les cellules qui ont un pouvoir de divisions accéléré. Une cellule somatique de l'organisme n'a plus d'activité télomérase : conséquence si on met en culture des cellules humaines, il y a un petit

nombre de divisions et elles vont se raccourcir de plus en plus et il n'y aura plus de télomères. Donc raccourcissement des télomères = mort cellulaire.

A voir avec Juliette

La boucle-T des télomères associée à des protéines de réparation

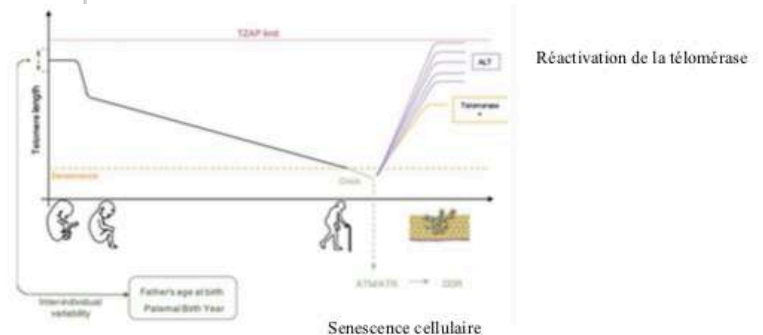


Même si la zone est contrôlée il reste toujours une extrémité simple brin à l'extrémité 3' du télomère. Cette zone va se réapparues dans une boucle que l'on appelle la boucle T.

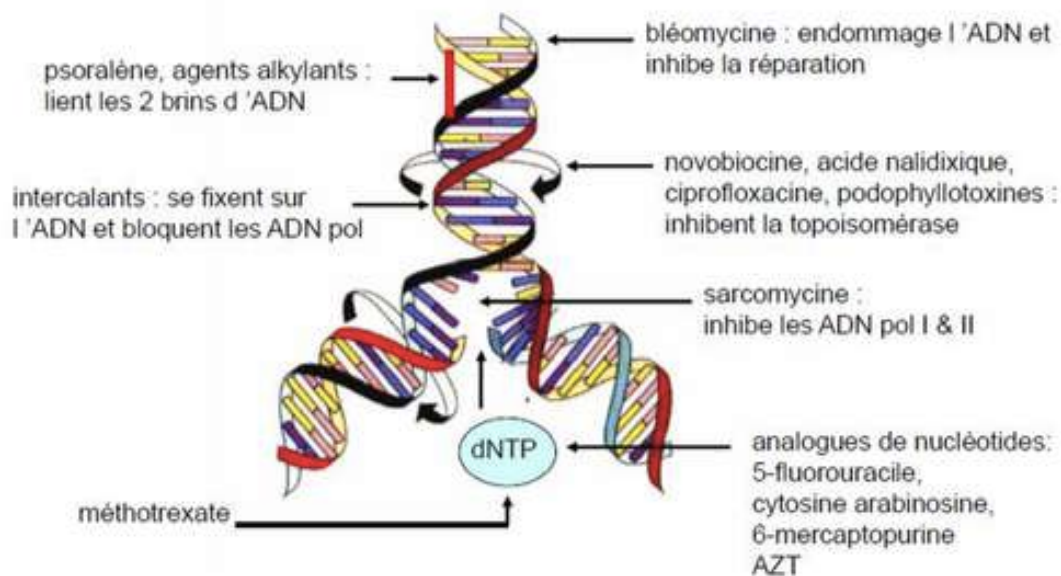
Le fait de réapparues la zone simple brin en boucle T permet une protection.

Complexes protéiques associés à la boucle T ;

Ku70/80 : complexe protéique de la réparation.



La réplication : une cible thérapeutique

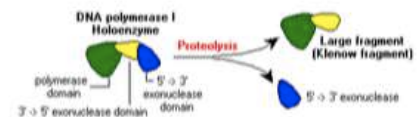


La réplication est une cible thérapeutique aussi bien en ce qui concerne le cancer que les infections . Il y a beaucoup d'inhibiteurs qui ont été développés comme les analogues des nucléotides, lors de leur incorporation ils bloquent la réplication :

- > on a le 5 flououracile (utilisé en chimiothérapie),
- > on a AZT qui est utilisé pour bloquer la réplication de HIV.
- Certaines toxines comme la sarcomycine qui inhibe les ADN polymérases

Approches méthode 2

1- L'ADN polymérase de Klenow



Remplissage d'extrémités par l'ADN polymérase de Klenow



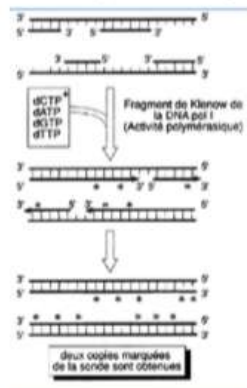
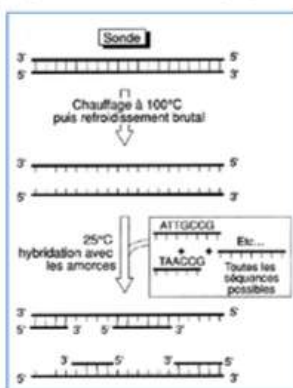
ADN polymérase I de Coli : élimination des amorces,

- elle a :
- > un domaine polymérase,
 - > un domaine exonucléase en 5' 3' = domaine de corrections d'erreurs
 - > un domaine exo dans l'autre sens = activité pour éliminer les amorces

ADN polymérase de Klenow n'a pas d'activité exo 5' 3'

Amorce avec 3'OH : on peut combler les extrémités : c'est le remplissage par l'ADN polymérase de Klenow.

Marquage de sonde avec la polymérase de Klenow par random priming



Elle est utilisée pour marquer des sondes, on utilise la technique de random priming.

La sonde reconnaît spécifiquement une cible : lorsque l'on marque la sonde on utilise une étape de synthèse.

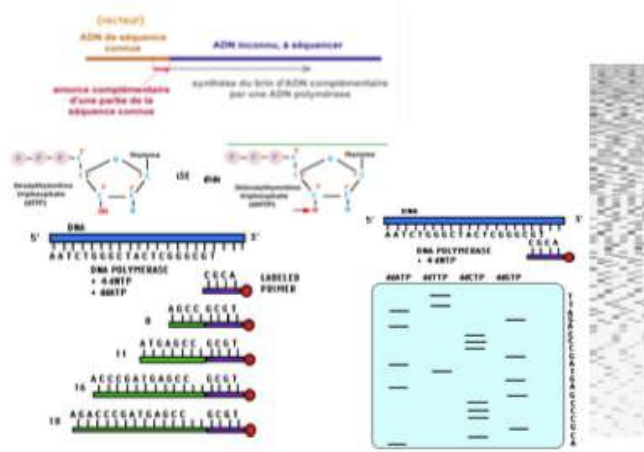
1) On dénature la sonde en la chauffant à 100°C

2) on hybride avec les amorces qui peuvent être des hexanucléotides (toutes les séquences possibles de 6 nucléotides), elles vont aller s'hybrider en plusieurs endroits de la sonde.

3) ajout d'un nucléotide dont un est radioactif , à ce moment synthèse d'ADN et incorporation du nucléotide radioactif. On obtient une sonde qui a

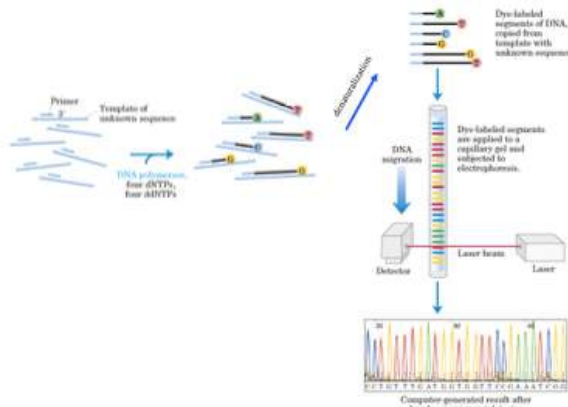
un brin sur deux marqué radioactivement.

Le séquençage selon Sanger



Chaque fois qu'on aura un T on pourra incorporer un A et la synthèse pourra s'arrêter, cela génère un ensemble de fragments de tailles différentes que l'on sépare sur un gel d'acrylamide. On lit du bas du gel vers le haut du gel et on a le fragment de 5' vers 3'. On lit le fragment complémentaire du brin que l'on avait dans le tube donc du brin synthétisé (on lit).

Le séquençage automatique selon Sanger (enzyme : la séquenase)



La première utilisée pour le séquençage de Sanger. Mtn on utilise des cytanases qui fonctionnent à plus hautes températures.

On a une séquence d'ADN à séquencer : on utilise une amorce qu s'hybride à l'ADN. On fait une synthèse d'ADN en présence de didésoxynucléotides (désoxy en 2 et 3'). Si au cours de la synthèse le didésoxy s'incorpore cela va bloquer la synthèse car on ne pourra pas ajouter de nucléotide sur l'extrémité.

Pour faire une relation de séquençage on mélange les 4 dNTP, les amorces, un des 4 didésoxynucléotides, et ADN.

Un séquençage automatique : au lieu d'avoir 4 didésoxy séparément dans chaque tube on a les 4 mélangés au reste dans un seul tube. Le principe est que chacun des didésoxy est marqué par un fluorochrome différent.

Il n'y a pas d'étapes de gel, c'est déposé sur une électrophorèse capillaire. Le gel permet de séparer les fragments en fonction de leur taille. A la sortie du capillaire on a un laser qui lit la couleur.

Le séquenceur automatique fournit un chromatogramme qui correspond à la lecture du laser. Puis on a un logiciel qui nous donne la séquence.

2- Les Taq polymérase

	Taq. DNA polymerase	Pfu DNA polymerase
5'→3' exonuclease activity	YES	NO
3'→5' exonuclease activity	NO	YES
Terminal transferase activity	YES	NO
Error rate (x10 ⁻⁶)	4.91	1.90
Fragment size	≤ 10 kbp	≤ 5 kbp
Optimum activity temperature (°C)	72	72
Half life (min, at 95°C)	80	Not confirmed
MgCl ₂ (mM)	1.5	-
MgSO ₄ (mM)	-	2.0

2 classes de Taq Polymérase:

- avec activité de correction d'erreur (la Pfu)
- sans activité de correction (Taq polymérase)

L'activité terminal transférase n'existe que pour les Taq polymérase

- Clonage dans les plasmides type pGEMT easy

Elles ont été découverts dans les années 80. N a deux types de TAQ :

-l'original et la PFU

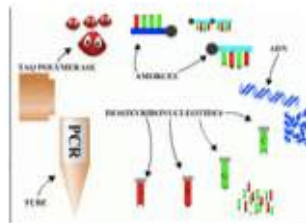
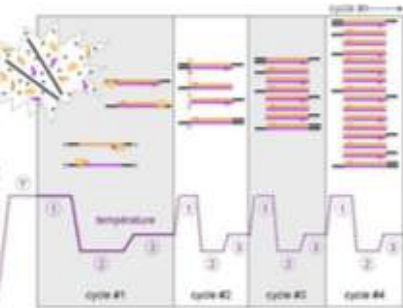
Pfu : activité de correction d'erreurs

L'original fait elle beaucoup d'erreurs quand elle synthétise l'ADN. Elle conserve son activité 3' 5' exonucléase donc fait moins d'erreurs par conséquent.

Si on veut la séquence d'origine on utilise des Pfu.

Original : activité terminale transférase :
elle permet d'ajouter des nucleotides aux extrémités 3' sans qu'il y ait une matrice ADN.

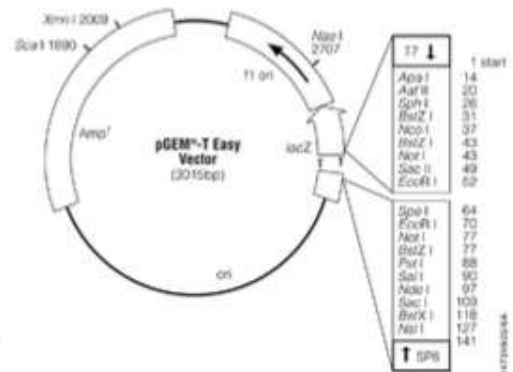
PCR=Polymerase Chain Reaction



<https://www.dnalc.org/view/15475-The-cycles-of-the-polymerase-chain-reaction-PCR-3D-animation.html>

Les Taq polymérase

Clonage de produits de PCR grâce au T simple brin



Vendu ouvert avec un T simple brin : il permet de s'associer à un produit PCR qui est lui A simple brin en 3' car la TAQ ajoute des A en 3'

