

Université de Djelfa
Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire

Module : Fondements de la biologie moléculaire

- Introduction

I. L'ADN porteur de l'information génétique (Travaux de mise en évidence)

II. Structure et propriétés de l'ADN

- Nature chimique de l'ADN
- Structure moléculaire de l'ADN
- Quelques propriétés de l'ADN

III. Réplication de l'ADN

- Etude expérimentale de la Réplication
- Données générales sur la réplication
- Réplication chez les procaryotes
- Réplication chez les eucaryotes

- **Exercices (TD)**

Réalisé Par : M LAOUN khalil

Année universitaire 2020 /2021

Introduction

La **biologie moléculaire** est une discipline scientifique au croisement de la génétique (étude des effets des différences génétiques entre les organismes), de la biochimie (étude des substances chimiques et des processus vitaux qui se produisent dans les organismes vivants) et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire (étude des processus de réplication, de transcription et de traduction du matériel génétique).

La biologie moléculaire englobe l'étude de la nature, de l'expression, de la transmission et des modifications générales de l'information génétique au niveau cellulaire. Elle analyse en particulier le mode d'action des gènes du point de vue biochimique et moléculaire au niveau de la cellule.

Le terme « biologie moléculaire », utilisé la première fois en 1938 par Warren Weaver, désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique. La biologie moléculaire est apparue au **XX^e** siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.

Après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson (1928-), Francis Crick (1916-2004), Maurice Wilkins (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958), la biologie moléculaire a connu d'importants développements pour devenir un outil incontournable de la biologie moderne à partir des années 1970.

Depuis les années 2000, l'étude de la structure et de la fonction des gènes, cad la génétique moléculaire, fait partie des sous-domaines les plus importants de la biologie moléculaire.

La génétique moléculaire a rendu les gènes des organismes les plus complexes accessibles à l'analyse. Elle a ainsi permis de déchiffrer la programmation des êtres vivants normaux et pathologiques.

La biologie moléculaire a donc des applications :

- Dans le domaine médical, (fabrication industrielle de protéines humaines d'intérêt thérapeutique. Exemple : insuline, interféron, hormones de croissances, etc.)

- Dans la médecine légale et dans la police (permet d'établir avec précision l'identité et la filiation des individus en utilisant les empreintes génétiques ou test d'ADN).
- Ainsi que dans divers autres domaines économiques.

I. L'ADN porteur de l'information génétique

En 1869, Johann Friedrich Miescher (1844-1895, Biologiste Suisse) a montré à partir de noyaux de spermatozoïdes de Saumon que ces noyaux renfermeraient des substances riches en phosphore. Ce sont les nucléines associées à des protéines basiques.

En 1889, Richard Altman (1852-1900, Biologiste Allemand) a mis au point une technique de purification et a pu séparer les nucléines des protéines et a nommé celles-ci acides nucléiques.

1929 : Phoebus Levene (1863-1940, Biochimiste Américain) identifie les éléments constitutifs de l'ADN, y compris les quatre bases adénine (A), cytosine (C), la guanine (G) et thymine (T). En 1929, on distingue alors deux types d'acides nucléiques :

- L'acide désoxyribonucléique (ADN)
- L'acide ribonucléique (ARN)

Dans le noyau, il existe donc des protéines, des ADN et des ARN. Lequel de ces éléments correspond au matériel génétique ?

Pour répondre à cette question, il faut isoler l'un d'entre eux et démontrer que lorsqu'il est introduit à l'état pur dans une cellule, il est capable de lui transmettre une potentialité héréditaire qu'elle ne possédait pas. Cette opération a pu être réalisée à partir d'une expérience de transformation bactérienne.

1.1. Mise en évidence : Expérience de Griffith

Le premier phénomène qui allait permettre de progresser dans l'identification du support de l'hérédité est celui de la transformation bactérienne, rapporté en 1928 par l'anglais Fred Griffith (1877 - 1941). Celui-ci travaille alors au laboratoire de pathologie du ministère de la santé du Royaume Uni.

Matériel d'étude

La bactérie *Diplococcus pneumoniae* appelée pneumocoque est un agent pathogène responsable de la pneumonie chez les mammifères.

Les bactéries virulentes synthétisent une capsule composée de polysaccharides qui empêchent leur phagocytose par les défenses de l'hôte. Ces bactéries présentent une surface lisse et visqueuse et sont dites **Smooth** ou bactérie **S**.

Selon l'étude de polysaccharides, on peut distinguer plusieurs types capsulaires désignés par **SI**, **SII**, **SIII**, etc.

Il existe des mutants sans capsule (mutation, chez la bactérie **R**, du gène codant l'enzyme responsable de la synthèse de la capsule) qui ne sont pas virulentes car ils peuvent être phagocytés. Ces mutants ont une surface rugueuse ou **Rough** et désignés bactéries **R**.

Expérience de Frederik Griffith (1928)

Griffith a injecté des suspensions de bactéries à trois lots de souris :

- Au premier lot, il injecte une suspension de bactéries **R** vivantes.
- Au deuxième lot, il injecte une suspension de bactéries **S** tuées par la chaleur
- Au troisième lot, il injecte une suspension de bactéries **R** vivantes et de **S** tuées par la chaleur.

Résultats :

Les souris des deux premiers lots ne présentaient aucun signe d'infection pneumonique. Résultat normal parce que les formes **R** ne sont pas virulentes et les formes **S** sont tuées par la chaleur. Par contre, les souris du troisième lot mouraient de pneumonie et dans le sang de ces souris mortes, on a trouvé des bactéries **S** vivantes.

Griffith a tiré la conclusion suivante : les bactéries **R** ont donc été transformées en bactéries **S** vivantes par quelque chose provenant des bactéries **S** tuées par la chaleur

(bactérie **R** vivante + bactérie **S** tuée → bactérie **S** vivante).

Les observations de Griffith ont été confirmées par Dawson et Alloway (institut Rockefeller de New-York) par des expériences réalisées *in vitro* (en tube à essai) en 1933. Lorsque des bactéries SIII, tuées par la chaleur, sont incubées avec des bactéries RII vivantes, des bactéries SIII vivantes sont ensuite récupérées. L'injection chez la souris n'est donc pas nécessaire à la transformation.

1.2. Analyse du facteur transformant : travaux de AVERY, Mc LEOD et Mc CARTY 1944

Quelle est la nature de ce quelque chose qui provoquerait la transformation ?

La réponse à cette importante question fût donnée par des expériences d'Avery, Mac Leod et Mac Carty (1944) qu'ils mènent à l'Institut Rockefeller de New-York. Ils reprennent les expériences de Griffith sur la transformation bactérienne, et cherchent à purifier le facteur transformant du pneumocoque..

Ces auteurs ont réalisé la transformation *in vitro* à partir d'extrait de cellules bactériennes transformantes. Ils ont procédé à un fractionnement de la bactérie **S** et ont pu isoler séparément les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques. Avec les protéines, les glucides et les lipides, la transformation bactérienne n'était pas assurée. Par contre, cette transformation *in vitro* était possible avec les acides nucléiques. Mais il existe deux types d'acides nucléiques.

Lequel de ces deux assurerait la transformation ?

Avery et ses collaborateurs ont montré que le principe actif de la transformation était détruit par les désoxyribonucléases mais n'était pas modifié ni par les ribonucléases, ni par les

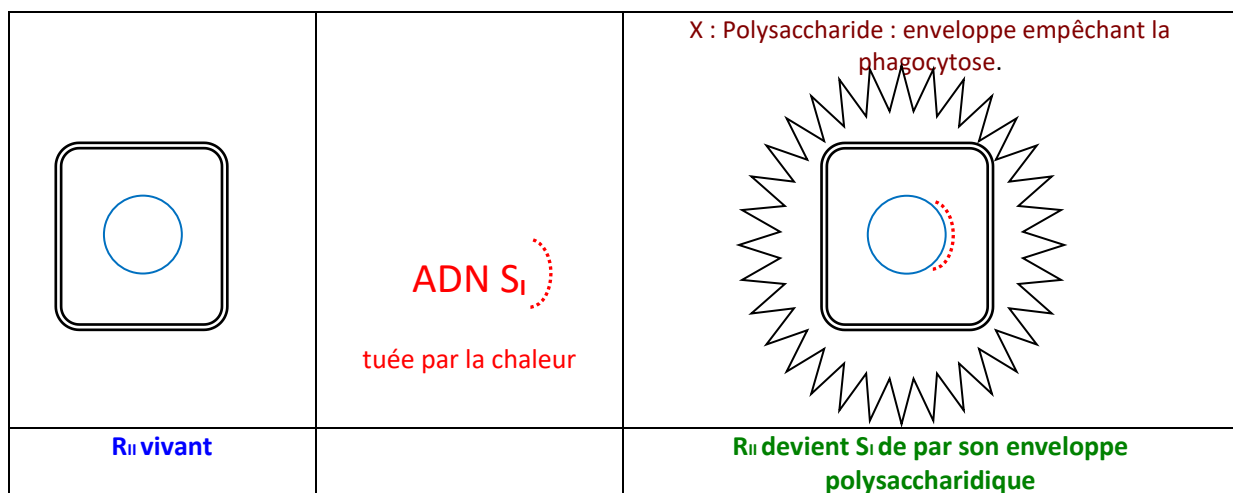
enzymes protéolytiques. Il faut savoir que les désoxyribonucléases sont des enzymes qui digèrent l'ADN tandis que les ribonucléases coupent les ARN et les enzymes protéolytiques coupent les chaînes polypeptidiques.

Bactérie S	Protéine Lipide Glucide	+ R	→ Pas de transformation
	Acide nucléique	+ R	→ Transformation des bactéries R en S

Acide nucléique ----- Désoxyribonucléase ---- → Perte de pouvoir transformant
 Acide nucléique ----- Ribonucléase ----- → conservation du pouvoir transformant

On peut symboliser la transformation de la manière suivante : $R + \text{ADN S (in vitro)} \rightarrow S$

Les ADN purs sont capables de contenir et d'apporter à une bactérie l'information nécessaire à la synthèse d'un type de polysaccharide capsulaire qu'elles ne savaient pas faire auparavant. Tout se passe comme si un gène était transféré d'une bactérie à une autre.



1.3. Analyse du rapport A+T/C+G : travaux de CHARGAFF , LEDERBERG et BEADLE 1950

Malgré une accumulation croissante de preuves jusqu'au début des années 50, la communauté scientifique n'a pas accepté facilement que l'ADN puisse être le support de l'hérédité. Selon les thèses alors les plus largement acceptées, l'ADN n'est qu'une molécule simple, et donc incapable de véhiculer une information complexe.

Certains scientifiques ont cependant saisis immédiatement la portée immense des travaux d'Avery. Ce fut en particulier le cas de E. Chargaff, J. Lederberg, G. Beadle, ou de A. Lwoff.

En 1950, Chargaff (1905-1992, biochimiste d'origine autrichienne ayant émigré aux USA en 1934) publie ses travaux sur le contenu en bases azotées de l'ADN chez diverses espèces, réalisés grâce aux progrès de la chromatographie sur papier.

Il montre alors que le rapport:

- $A+T/C+G$ est variable selon les espèces, mais constant pour tous les membres d'une espèce donnée.
- C/G ou A/T est à l'inverse constant et quasiment égal à un chez toutes les espèces étudiées.

Cette dernière observation sera déterminante pour l'élaboration du modèle de la structure de l'ADN par Watson et Crick quelques années plus tard.

Tableau : composition en bases de l'ADN de différents organismes (données de Chargaff)

Espèce	A	T	G	C	A/T	G/C	A+G/C+T	A+T/C+G
Homme	30,9	29,4	19,9	19,8	1,05	1,005	1,03	1,52
Oursin	32,8	32,2	17,7	17,3	1,02	1,023	1,02	1,86
E.Coli	24,7	23,6	26,0	25,7	1,04	1,011	1,03	0,93

Conclusion :

- quantité d'A proportionnelle à T et quantité C proportionnelle à G
- la somme des purines (A et G) est égale à celle des pyrimidines (C et T)
- le pourcentage de C+G n'est pas nécessairement égale à celui de A+T

1.4. Travaux de HERSHEY et CHASE 1952

Hershey et Chase ont mené leur expérience sur le phage T_2 , virus qui se compose d'une capsid (coque protéique) contenant de l'ADN et une queue.

Pour se multiplier à l'intérieur de la bactérie, le phage se fixe sur la paroi de la bactérie puis pénètre à l'intérieur de celle-ci. C'est la phase d'absorption ou de pénétration suivie d'une phase d'éclipse où on n'observe rien. Au bout de quelques minutes, il apparaît un nombre de phage suite à la rupture de la paroi bactérienne. C'est la phase de lyse suivie de la libération du phage

La question est de savoir quel est le constituant du phage qui pénètre dans la bactérie et qui assure la reproduction du phage ?

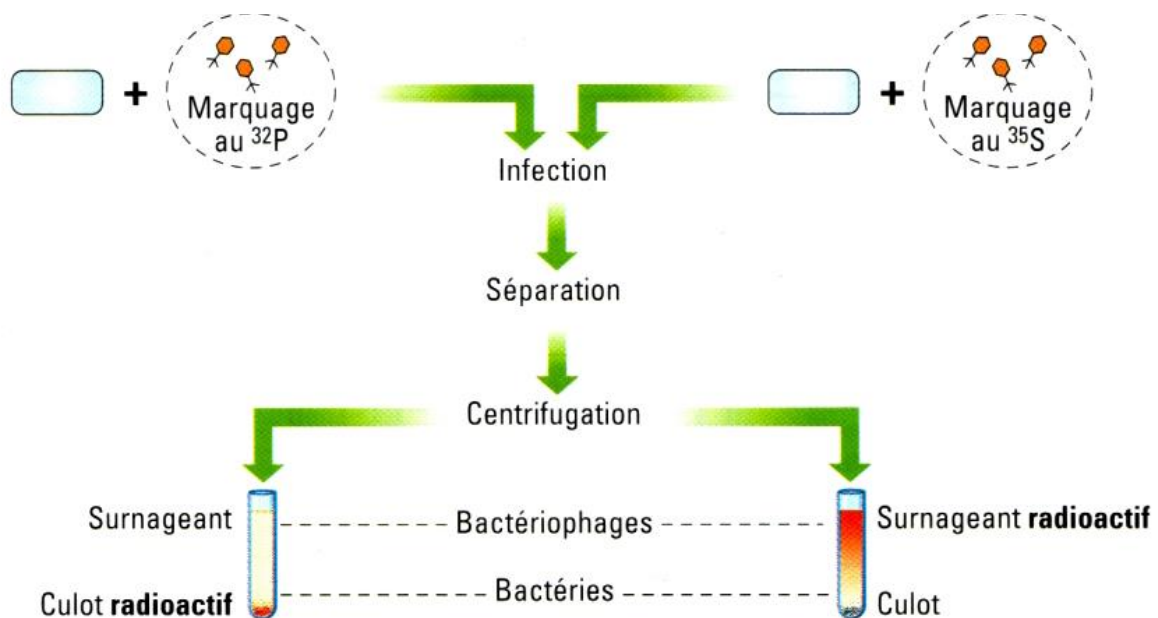
Pour le savoir, Hershey et Chase ont marqué

- l'ADN au **phosphore radioactif** (^{32}P). (l'élément P est présent dans l'ADN mais dans aucun des acides aminés de la capsid). Ils ont ensuite infecté une souche d'E.Coli et ont pu observer le transfert d'ADN du phage marqué dans le cytoplasme de la bactérie. Après la lyse des bactéries ; il y a la libération de

particules virales filles appelées virions dont certaines sont marquées au **phosphore radioactif (^{32}P)**

- Et l'enveloppe protéique du phage T2 au **soufre radioactif (^{35}S)**, le soufre étant présent dans les AA (cystéine et méthionine) de l'enveloppe mais pas dans l'ADN. Ils ont ensuite détaché les capsides des cellules infectées. Après séparation le marqueur radioactif (^{35}S) a été observé dans les capsides mais pas dans les bactéries infectées (aucune particule virale fille n'est marquée au **soufre radioactif**). ce qui montre que le matériel génétique qui infecte les bactéries était l'ADN et non les protéines

Un tel résultat permet de comprendre que c'est l'ADN du phage qui pénètre dans la bactérie et sert à la reproduction du phage.



II. Structure et propriétés de l'ADN

La structure en double hélice de l'ADN est élucidée par Watson et Crick en 1953.

Watson a décrit dans son livre passionnant *La double hélice* (1968) le récit de la formidable découverte réalisée avec Crick . Les deux chercheurs disposent alors des éléments suivants :

- la composition chimique de l'ADN (désoxyribose, bases azotées, et groupements phosphate) ;
- les clichés de diffraction aux rayons X d'ADN cristallisé, clichés dus principalement à Rosalind Franklin et Maurice Wilkins du King's College. Ces clichés montrent une figure en croix, caractéristique des structures en hélice ;
- les travaux de Erwin Chargaff, qui avaient montré que pour toute molécule d'ADN, le nombre de molécules d'adénine est égal au nombre de molécules de thymine, et que celui de cytosine est égal à celui de guanine ;
- les analyses en microscopie électronique, qui avaient montré que le diamètre de la molécule d'ADN est de 20 Å, ce qui suggérerait que cette molécule comportait deux chaînes de désoxyribose-phosphate.

Crick, Watson, et Wilkins reçurent en 1962 le prix Nobel pour leurs travaux, qui ont été qualifiée de "la plus grande réussite scientifique de notre siècle". (Rosalind Franklin aurait du être associée à ce prix même si elle est morte en 1958).

2.1. Nature chimique de l'ADN

L'analyse élémentaire des chromosomes montre qu'ils renferment de nombreux éléments chimiques en particulier l'ADN et l'ARN. Ce sont des substances qui ont des propriétés acides et qui contiennent **pour l'ADN du désoxyribose** et **pour l'ARN du ribose**.

Désoxyribose et ribose sont des sucres en C5 ou pentose. Des expériences utilisant de méthodes diverses (chimique, physique, biologique) ont permis de mettre en évidence la structure des acides nucléiques.

a. Molécules constitutives

Une molécule d'ADN est un polymère formé de l'enchaînement d'unités plus simples appelées nucléotides. Chaque nucléotide est formé d'un assemblage de trois types de molécules :

- Une molécule de sucre (désoxyribose)
- Une molécule d'acide phosphorique
- Une molécule d'une base azotée différente selon les nucléotides.

On rencontre des bases puriques (Adénine et Guanine et l'hypoxanthine (précurseur des bases puriques et présent au niveau des ARNt).) et des bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine). Il existe donc quatre types possibles de nucléotides selon que la base organique est l'adénine, la guanine, la cytosine ou la thymine.

b. Formation des nucléotides et polynucléotides

Le phosphore est attaché au carbone C'5 du désoxyribose et la base au carbone C1. La séquence des trois molécules est : **base-sucre-acide phosphorique**. Les nucléotides sont reliés les uns aux autres par des acides phosphoriques. Une même molécule d'acide phosphorique est reliée d'une part au C5 d'un sucre et d'autre part C3 d'un autre sucre part des liaisons « **ester –phosphates** ».

Dans la chaîne poly nucléotidique, le sucre et l'acide phosphorique alterne tandis que les bases sont portées latéralement par des sucres.

2.2. Structure moléculaire de l'ADN

De tous les ADN rencontrés à l'exception de ceux de certains bactériophages, les chaînes de polynucléotides sont toujours associées par deux. Les deux chaînes sont liées grâce à des liaisons hydrogènes présentes entre toutes les bases de l'ADN : deux liaisons hydrogènes entre les bases A et T, et trois liaisons hydrogènes entre les bases G et C.

Les deux chaînes sont dites **complémentaires**. D'autre part, elles sont orientées en sens inverse c'est à dire l'extrémité phosphorylée de l'une faisant face à l'extrémité hydroxylée de l'autre.

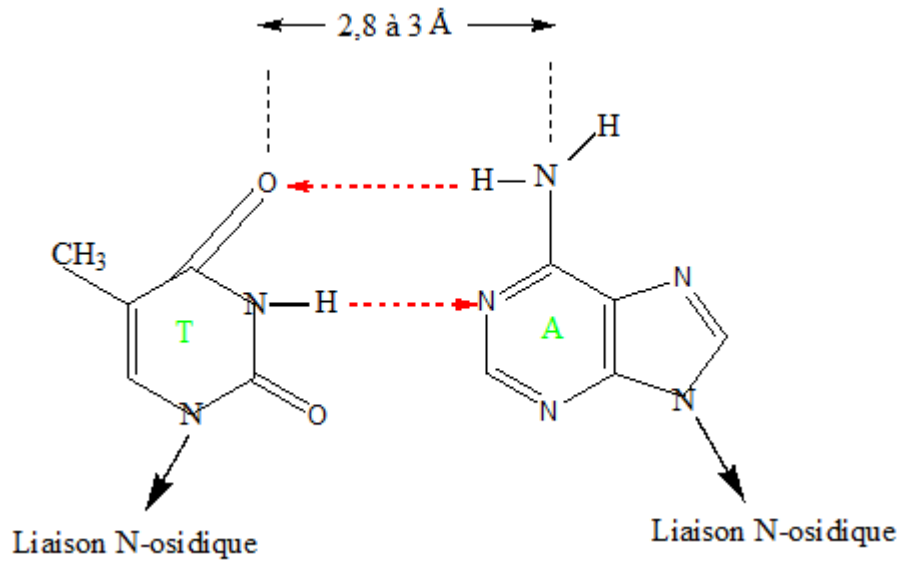
Elles sont alors dites **antiparallèles**.

5' -ATTGCCGTATGTATTGCGCT - 3'

3' -TAACGGCATAACGCGA - 5'

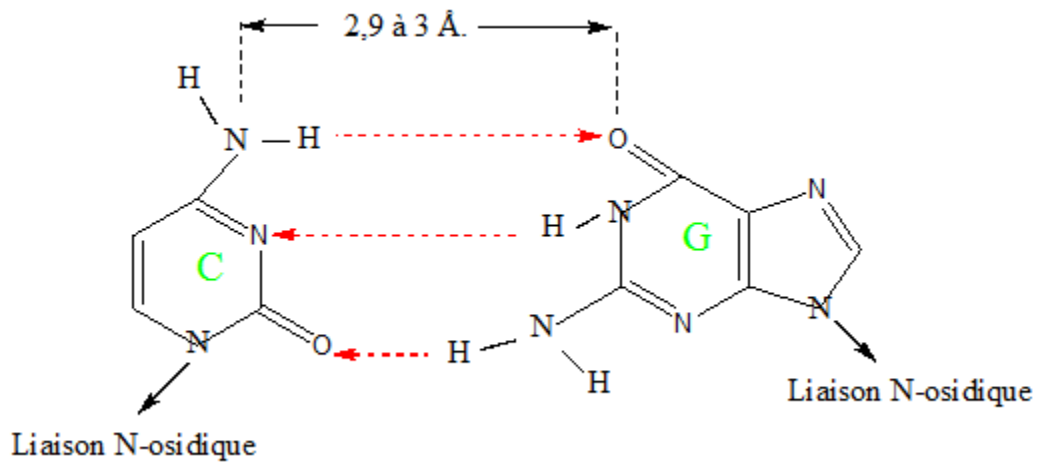
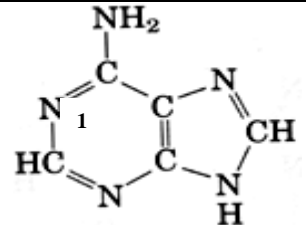
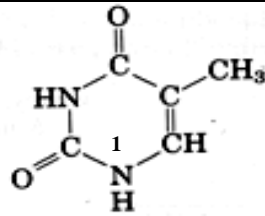
a. Modèle de Watson et Crick

Dans le modèle de Watson et Crick: La double hélice de l'ADN a un diamètre de 20 Å (20 angström = 20.10⁻¹⁰ mètres), un pas de 34 Å qui correspond à 10 nucléotides. L'hélice est dite droite car elle s'enroule à droite en la regardant du haut vers le bas (comme une visse s'enfoncerait dans un mur) ; entre deux paires de bases on mesure un angle de 36°.



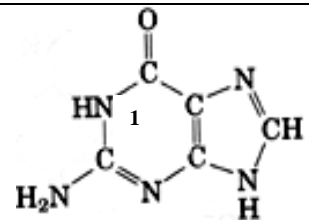
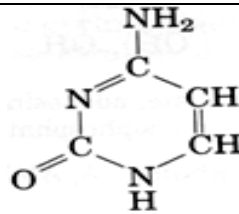
Appariement Adénine – Thymine (2 liaisons H)

- 1^{ère} Liaison (T) C₄ O⁻⁺HN. C₆ (A)
 2^{ème} Liaison (T) N₃ H⁺⁻N₁ (A)



Appariement Guanine – Cytosine (3 liaisons H)

- 1^{ère} Liaison (C) C₄ NH⁺⁻O C₆ (G)
 2^{ème} liaison (C) N₃ ⁻⁺H N₁ (G)
 3^{ème} Liaison (C) C₂ O⁻⁺HN C₂ (G)



b. Autres structures secondaires de l'ADN (formes A et Z)

L'ADN double brin peut avoir trois structures secondaires : A, B et Z. Les bases sont hydrophobes suite à leur nuage électronique π .

La forme B de l'ADN est la conformation majeure de l'ADN en solution. c'est le modèle de Watson et Crick, le plus stable dans les conditions physiologiques.

La forme B a les spécificités suivantes:

- enroulement droit
- diamètre : 2,0 nm
- pas : 3,4 nm
- 10 pb par tour
- rotation du plan des bases : 36°
- Inclinaison de la paire de base par rapport à la perpendiculaire : 1° à 4°
- Allure générale : longue et fine

Forme A : Une forme alternative à la double hélice B est l'ADN A. Cette forme est dominante lorsque le milieu est pauvre en eau ou riche en sel (quantité d'eau disponible pour hydrater la double hélice est insuffisante). Comparé à l'ADN B, l'ADN A est plus compact, avec 9 paires de base par tour d'hélice et $23A^\circ$ de diamètre. L'hélice est droite mais l'orientation des bases est légèrement différente. Elles sont inclinées et dilatées latéralement par rapport à l'axe de rotation de l'hélice. Il en résulte une modification du petit et du grand sillon, qui est plus visible dans l'ADN B. Cette conformation est trouvée *in vivo* dans :

- l'ADN de certaines spores bactériennes, formées en réponse à la dessiccation du milieu
- les hybrides ADN-ARN qui se forment transitoirement à l'amorce de la réplication, et pendant la transcription.

La forme A a les spécificités suivantes:

- enroulement droit
- diamètre : 2,3 nm
- pas : 2,8 nm
- 9 (?) pb par tour
- rotation du plan des bases : 33°
- Inclinaison de la paire de base par rapport à la perpendiculaire : 19° à 20°
- Allure générale : plus courte et plus large que B.

Forme Z : découverte en 1979, par Andrew WANG, Alexander RICH lors de l'observation d'une petite molécule d'ADN constituée uniquement des bases C et G. L'ADN Z présente une conformation est en Zig-zag (d'où son nom). Dans cette molécule d'ADN, les liaisons N-glycosyl des résidus Guanine sont tournées de 180° par rapport à leur conformation dans l'ADN B. Le grand sillon est inexistant dans l'ADN Z (Fig. 1) Cette conformation est trouvée *in vivo* pour des segments de la molécule d'ADN, et aurait un rôle dans l'expression des gènes.

La forme Z a les spécificités suivantes:

- enroulement gauche
- diamètre : 1,8 nm
- pas : 4,5 nm
- 12 pb par tour
- rotation du plan des bases : -30°
- Inclinaison de la paire de base par rapport à la perpendiculaire : -9°
- Allure générale : allongée et mince

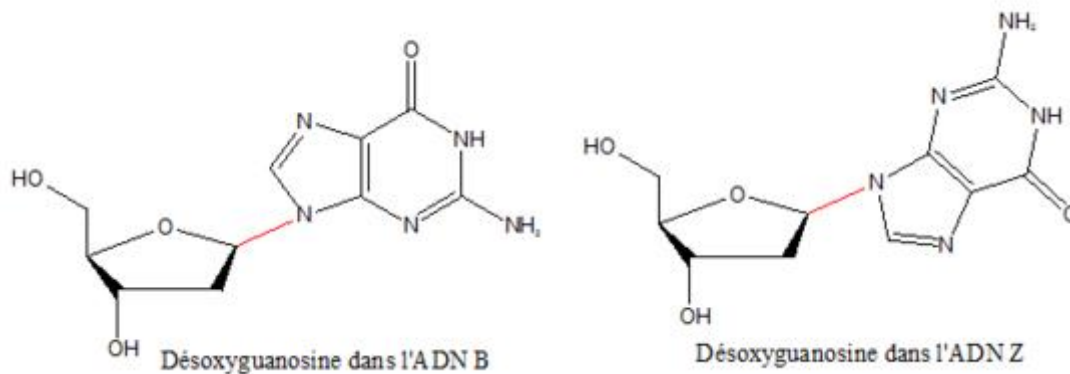


Figure 1. Liaisons N-glycosyl des résidus Guanine dans les ADN B et Z

2.3. Quelques propriétés de l'ADN

a) Solubilité :

La présence de groupement phosphate, dont les groupements hydroxyles sont sous forme ionisés, donne un caractère acide aux acides nucléiques (ADN et ARN). De ce fait, ils sont solubles dans l'eau.

La présence dans l'eau de sel dissout plus de l'ADN entraîne une neutralisation des charges négatives des groupements phosphates. On obtient la formation de sel d'ADN ou d'ARN. Les sels d'ADN ou d'ARN précipitent, et peuvent donc être récupérés. On peut les récupérer après centrifugation. On obtient le même résultat avec un traitement à l'alcool à chaud. (Remarque : Dans les cellules, les charges négatives de l'ADN sont neutralisées par les charges positives portées par les histones).

(Résumé : L'ADN devient un sel d'acide en milieu aqueux et est ainsi soluble. Il précipite en présence d'éthanol et d'une forte concentration saline. Cette propriété permet sa purification.)

b) Absorption UV :

Les acides nucléiques absorbent spécifiquement à 260 nm la lumière (UV). Pour évaluer l'absorption de l'ADN, on effectue un balayage spectral entre 220 et 300 nm. Chaque base présente un spectre caractéristique (plus élevée pour les purines (à deux cycles)).

Cette absorption dépend de l'angle d'incidence des rayons UV. En effet pour une longueur d'onde donnée, l'ADN monocaténaire absorbe plus que l'ADN bicaténaire. Ce phénomène est appelé **hyperchromie** (ou phénomène hyperchrome). Dans l'ADN double brin, les bases sont masquées ou se chevauchent, alors que dans l'ADN simple brin il n'y a pas de structure qui cache les bases, donc l'absorbance est plus importante.

La mesure de l'absorbance à 260 nm permet/

- de doser les acides nucléiques d'une solution : 1 unité d'absorbance = 50 µg d'acide nucléique
- et d'évaluer la pureté des Acides nucléiques

c) Dénaturation thermique

La dénaturation thermique correspond au fait que les deux brins de l'hélice se dissocient par l'action de la chaleur. Lors de cette dénaturation les liaisons hydrogènes entre les deux brins sont rompus. Cependant aucune liaison covalente n'est détruite. Pendant la

séparation des brins, induite par la chaleur, la viscosité de l'ADN diminue et l'absorption des UV augmente.

Lorsque l'absorption à 260 nm (D_{260}) est mesurée en fonction de la température, on obtient un **profil de fusion** de la molécule d'ADN ; le point Médian de ce profil, ou courbe, est appelé : **T° de fusion** (T_m pour *melting temperature*) et correspond à la T° à laquelle 50% de l'ADN est dénaturé. Lorsque le plateau de la courbe est atteint (densité optique maximale), la dénaturation est complète et la solution ne contient que l'Adn simple brin. (exemple : Le T_m humain est de 86°C et la dénaturation complète est à 95°C).

L'analyse des profils de fusion permet de caractériser chaque molécule d'ADN et d'estimer sa composition en bases. Ce processus de dénaturation est réversible, si la molécule d'ADN est doucement refroidie. A une certaine T° , les liaisons hydrogènes se reforment, stabilisant ainsi les appariements et la structure double brin de l'ADN

La **température de fusion** ou **T_m** dépend :

- de la longueur de la molécule d'ADN, en effet les petites molécules sont moins stables et ont donc une température de fusion plus faible.
- de la richesse en paires de bases C-G (40% du génome humain) étant plus stable que les paires de bases A-T, ce qui augmente la température de fusion.
- De la force ionique du milieu : Une présence importante d'ions dans la solution (force ionique élevée : $\text{NaCl } 1\text{M}$) perturbera les liaisons hydrogène et provoquera une diminution de la température de Fusion .
- du pourcentage de mésappariement (erreur dans l'ADN) : 1% de mésappariement entraîne une réduction de 1°C de la T_m .

d) Effet hyperchrome

L'arrangement spatial des bases successives dans la double hélice d'un brin d'ADN, empilement des plans avec une distance pouvant varier de 0,24 à 0,37nm, permet des interactions hydrophobes entre bases successives (contact de Van der Waals) qui ont des répercussions sur le nuage électronique des cycles et donc sur leurs propriétés spectrales. Ce phénomène diminue l'absorption des bases dans l'ultraviolet : effet hyperchrome. Cet effet peut être enlevé en dénaturant la molécule : destruction de la double hélice qui supprime les interactions entre bases qui retrouvent leurs propriétés spectrales originales.

La dénaturation, qui libère chacun des deux brins d'ADN, est obtenue par destruction des liaisons hydrogènes soit :

- par addition d'urée en concentration $> 6\text{M}$

- par augmentation de la température (à 100°C)
- ou encore à pH très alcalin.

(Remarque : L'ADN dénaturé a une absorption à 260 nm plus élevée que l'ADN natif, d'un facteur 1,6. Cette propriété est appelée **l'effet hyperchrome** ou **hyperchromicité**.)

e) Phénomène d'hystérésis

Après dénaturation par chauffage, les deux brins d'ADN sont libres. Un refroidissement lent permet un réappariement des deux brins d'ADN qui aboutit à la double hélice originale. Un refroidissement rapide ne permet pas un réappariement total des deux brins, seules certaines régions complémentaires des deux brins reforment des doubles hélices partielles. L'absorption de la molécule aura une valeur intermédiaire entre celle de la molécule native et de la molécule dénaturée : **phénomène d'hystérésis**.

f) Application de la dénaturation des acides nucléique

La propriété de dénaturation-renaturation des acides nucléiques est à la base d'une des plus puissantes et utiles techniques de la génétique moléculaire : **l'hybridation moléculaire**.

En effet l'ADN simple brin dénaturé peut s'apparier à un brin issu d'une autre molécule d'ADN. Par exemple, si deux molécules d'ADN issues d'organismes différents sont dénaturées et si le degré de bases complémentaires est suffisant, il est possible d'obtenir des molécules d'ADN double brin hybrides après renaturation (**Homoduplex ADN₁/ADN₂**).

De plus, une molécule d'ADN simple brin dénaturée peut s'hybrider avec une molécule d'ARN créant ainsi une molécule double-brin hybride après renaturation (**Hétéroduplex ADN/ARN**)

g) condensation de l'ADN (dans les cellules eucaryotes)

La structure de stockage, trouvée chez tous les eucaryotes est le chromosome. L'ADN des eucaryotes est étroitement associé à des protéines, les histones, pour former la chromatine.

Il y a 4 à 5 niveaux superposés de condensation de la chromatine :

La fibre nucléosomique représente l'hélice d'ADN bicaténaire enroulée en spirale autour des protéines basiques, les histones.

Le nucléosome est l'unité élémentaire de la condensation de l'ADN dans les noyaux. Il met en jeu des protéines particulières appelées histones, formée de 4 paires d'histones 2x (H2A, H2B, H3 et H4), organisées en octamère. (Une perle sans ADN = cœur du nucléosome ou chromatosome).

Suivant le degré de spiralisation de la fibre nucléosomique, on aura:

- Fibre A, peu spiralée (un tour = nucléosome) , 10nm de diamètre = Euchromatine (condensation de l'ADN d'environ 7 fois.)
- Fibre B, très spiralée (Plusieurs tours = super-superhélice,), 30nm de diamètre = Hétérochromatine → Structure en solénoïde (condensation supplémentaire d'au moins 8 fois.)

La condensation croissante formera les Boucles de chromatine ou microconvules (250nm, facteur de condensation de 30 à 40 fois. Ces différents ordres de condensation engendrent déjà une compaction d'environ 1 700 à 2 200 fois (chromatine condensée, 700nm).

En définitive la condensation de l'ADN dans le chromosome métaphasique (1400 nm) atteint la valeur d'environ 8 500 à 11 000 fois.

L'ADN eucaryote est également associé à des protéines non histones, groupe très hétérogène comprenant:

- des enzymes:)enzymes nécessaires à la réplication, à la transcription, à la réparation...)
- des protéines de régulation de l'expression des gènes, des protéines de structure du chromosome...

III. Réplication de l'ADN

Une des propriétés de l'ADN est l'auto reproduction qui se fait de manière identique à elle-même. **Auto reproduction ou réplication de l'ADN.**

3. 1 Etude expérimentale de la Réplication

a) Les hypothèses

Pour expliquer la duplication d'un ADN bicaténaire, trois modèles ont été proposés. Ces modèles se basent tous sur l'utilisation de la molécule d'ADN "mère" comme matrice pour sa réplication, mais selon des modalités différentes :

Hypothèse 1: modèle conservatif

A partir d'une molécule d'ADN bicaténaire "mère", on forme une nouvelle molécule d'ADN bicaténaire. Dans ce cas la molécule "mère" est donc conservée, tout en "créant" une nouvelle molécule ("fille").

Hypothèse 2: modèle semi-conservatif

Dans ce cas les deux brins de la molécule d'ADN bicaténaire "mère" sont dissociés. Chaque brin sert donc de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire, l'ensemble reformant une molécule d'ADN bicaténaire. Chaque nouvelle molécule "fille" ne conserve donc que la moitié de la molécule "mère".

Hypothèse 3: modèle dispersif

Dans ce cas on ne conserve aucun brin intact La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN, permettant de former les deux molécules d'ADN bicaténaires "filles".

b) Postulat de Watson et Crick

En établissant leur modèle, Watson et Crick, conscients de l'importance de la complémentarité, ont proposé un mécanisme de réplication qui est le suivant. Que le modèle de l'ADN est en fait constitué d'une paire de moules et chacun d'eux est complémentaire l'un de l'autre. Ils pensent qu'avant la réplication, les ponts hydrogènes sont rompus et les deux chaînes se déroulent à la manière d'une fermeture éclair et se séparent. Chaque chaîne joue alors le rôle de moule pour la formation à son contact d'une nouvelle chaîne complémentaire de telle sorte qu'ils obtiendront deux paires de chaîne à la place d'une paire unique originelle.

Ce schéma proposé par Watson et Crick est celui d'un procédé de réplication **semi conservative**.

c) Travaux de Meselson et Stahl 1958

Si l'on utilise une technique permettant de reconnaître les parties des chaînes formées d'éléments anciens et celles formées d'éléments nouveaux, il serait alors possible de savoir si le schéma de reproduction de l'ADN proposé par Watson et Crick est exact ou non.

En utilisant les isotopes comme marqueurs, on peut suivre le devenir des molécules dans la cellule.

L'ADN peut être marqué par plusieurs isotopes, en particulier ceux de l'azote (**N14** et **N15**). Les molécules d'ADN qui contiennent une quantité appréciable d'azote 15 (azote lourd) sont plus denses que celles qui contiennent l'azote 14 (azote léger) et on peut déceler cette différence par centrifugation.

En 1958, Meselson et Stahl ont utilisé pour séparer les molécules d'ADN une méthode de centrifugation dans un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl). Quand une solution concentrée de chlorure de césium est centrifugée à grande vitesse, il se produit un gradient de concentration de CsCl stable à l'intérieur du tube de centrifugation, c'est-à-dire une augmentation continue du CsCl de la surface vers le fond. Si l'ADN est centrifugé dans ce gradient, les molécules se déplacent dans le tube et à l'équilibre, elles se trouveront dans la région du gradient où la densité de solution de CsCl est égale à celle de l'ADN.

Ainsi les différents types d'ADN de densités différentes seront séparés en bandes distinctes le long du tube de centrifugation et l'on pourra les repérer par leur absorption à 260 mm.

Meselson et Stahl ont donc cultivé des bactéries d'*Escherichia coli* pendant plusieurs générations dans un milieu ne contenant que de l'azote 15. L'ADN est donc marqué par l'azote 15. Ils ont transféré ensuite ces bactéries après lavage dans un milieu où l'azote est uniquement léger (Azote 14). Ils ont prélevé à des intervalles de temps variés, des échantillons de bactéries et ils ont mesuré la densité d'ADN que ces bactéries contiennent.

L'intervalle de temps correspond à un dédoublement du nombre de cellules dans la culture.

Le premier dédoublement correspond à la première synthèse d'ADN sans l'azote 15 c'est-à-dire en présence de l'azote 14. Le premier prélèvement correspond donc à la première génération qui contient des ADN hybrides c'est-à-dire ayant un brin ancien lourd (Azote 15) et un brin nouveau léger (azote 14).

Le deuxième prélèvement correspond à la deuxième génération. On trouve des ADN hybrides lourds et des ADN légers en quantité égale.

Le troisième prélèvement correspond à la génération 3, contient la même quantité d'ADN hybride mais trois fois plus d'ADN légers.

Les résultats de **Meselson et Stahl** sont tout à fait cohérents avec le schéma proposé par Watson et Crick. A chaque génération, la moitié de la molécule de la génération précédente est conservée. **C'est la réplication semi-conservatrice**. D'autres résultats expérimentaux notamment ceux obtenus par Taylor chez une Liliacée et chez *Escherichia coli* sont en faveur de ce mode de réplication de l'ADN

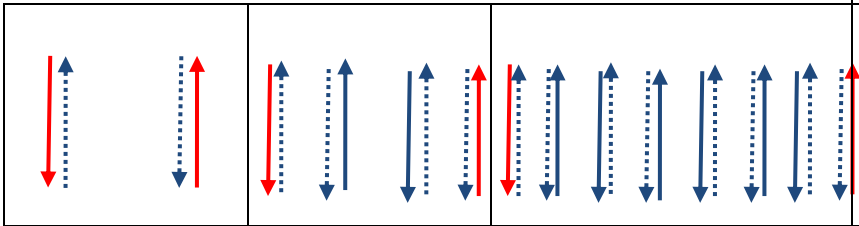
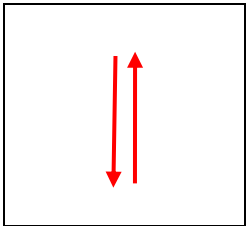
E-Coli Cultivée sur milieu marqué au N^{15}

Après plusieurs générations l'ADN de E-Coli devient uniformément marqué au N^{15}

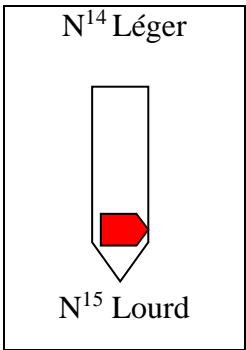
G0
100% N^{15}

Ajout de E.Coli marquées au N^{15}
Dans un milieu contenant du N^{14}

1 ^{ère} Réplication G1	2 ^{ème} répliation G2	3 ^{ème} Réplication G3
100% hybride (2/2)	50% hybride (2/4)	25% Hybride (2/8)



Extraction de l'ADN et centrifugation sur gradient de densité d'un sel de métal lourd ($CsCl$)



Force gravitationnelle

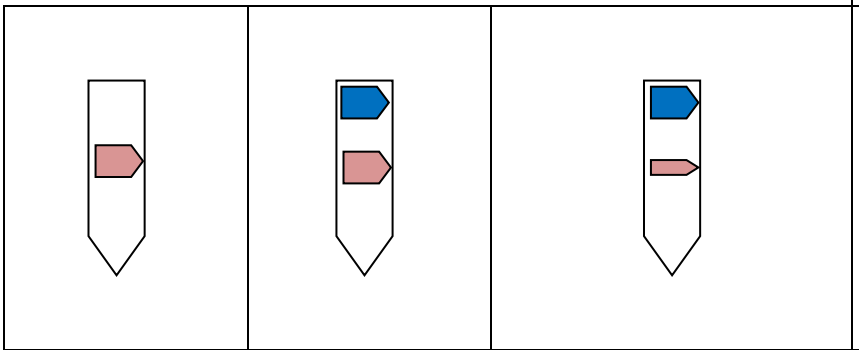


Fig.1 : Résumé des travaux de Meselson et Stahl en 1958.

NB / l'azote N^{15} contient un neutron de plus que l'isotope naturel N^{14} ; par conséquent, les molécules contenant du N^{15} sont plus dense que celle contenant du N^{14}

3.2 Données générales sur la réplication

a) Polymérisation unidirectionnelle

La polymérisation est unidirectionnelle, en effet les brins étant polarisés la polymérisation se fera toujours dans le même sens : 5' vers 3'. Il y a formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH du brin en voie d'élongation et l'extrémité 5' phosphate du nucléotide ajouté.

b) Les ADN polymérases

Les ADN polymérases (ou désoxynucléotidyl-transférase) sont les enzymes responsables de la polymérisation des nucléotides lors de la réplication de l'ADN. Elles ont besoin d'une matrice d'ADN pour produire le brin néo-synthétisé, et pour se faire elles lisent le brin matriciel de 3' vers 5' pour synthétiser de l'ADN dans le sens 5' vers 3'.

Les ADN polymérases procaryotes sont de 3 types (I, II et III) et les ADN polymérases eucaryotes de 5 types (α , β , δ , ϵ et γ).

Les ADN polymérases nécessitent un certain nombre de conditions d'activités :

- Les 4 désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) en quantité équimolaire.
- Des ions magnésiums (Mg^{2+}) qui stabilisent l'ADN et les protéines.
- Une matrice d'ADN (mono ou bicaténaire).
- Une amorce d'ADN ou d'ARN ayant une extrémité 3'OH libre.

Lors de la formation de la liaison phosphodiester entre un désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate et le brin en voie d'élongation, il y a hydrolyse de la fonction triphosphate et formation de pyrophosphate (PPi).

dNTP +	(dNMP) _x ----- (dNMP) _n	ADN-Poly → Mg ⁺⁺	(dNMP) _x ----- + (dNMP) _{n+1}	+ PPi
Desoxyribose Nucléotide Triphosphate (A,T,Cou G)	Matrice ADN Et son brin Complémentaire partiel		Brin complémentaire étendu d'un nucléotide (n+1)	Pyrophosphate inorganique

c) Activités des ADN polymérases

Les ADN polymérases ont des activités bien spécifiques :

- Une activité polymérasique 5' vers 3' qui est leur activité principale.
- Une activité exo-nucléasique qui correspond à la dégradation d'une des extrémités du brin néo-synthétisé de l'ADN lors de la réplication et qui peut être de 2 types :
 - De 3' vers 5', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 3'OH. L'activité exo-nucléasique 3' vers 5' permet ce qu'on appelle le proofreading, qui correspond à la correction d'un mauvais appariement de base en cassant la liaison phosphodiester et en remplaçant le nucléotide mal apparié.
 - De 5' vers 3', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 5'phosphate, lors de la jonction des segments d'ADN synthétisé sur le brin retardé (cf. suite du cours).

3.3 Réplication chez les procaryotes

a) Action des ADN polymérase et des protéines

Les ADN polymérases I (ou enzyme de Kornberg) sont les plus nombreuses (400 molécules/cellule). Elles présentent l'activité polymérasique 5' vers 3' ainsi que les activités exo-nucléasique 5' vers 3' et 3' vers 5'. La vitesse de synthèse des ADN polymérase I est faible (20 nt/s) et ce sont des enzymes peu processive (10-20 nt/événement) ; ces caractéristiques ne leur permettent pas de faire la majorité de la réplication des ADN procaryotes. Elles sont utilisées dans la réparation de l'ADN ainsi que pour combler les brèches laissées par l'ADN polymérase III.

Les ADN polymérases III (ou enzyme cœur) sont des multimères hétérogènes de gros poids moléculaire (900 000 Da) (moins nombreuse 15 molécules/cellule) qui sont responsables de la synthèse des fragments longs de l'ADN, ayant une vitesse de synthèse rapide (environ 1000 nt incorporés/s) ainsi qu'une grande processivité (105 nt/événement). Elles présentent les activités polymérasique 5' vers 3' et exo-nucléasique de 3' vers 5' mais pas exo-nucléasique de 5' vers 3'.

Protéines mise en jeu :

- Les protéines de reconnaissance (ou DNA A.) reconnaissent les sites d'initiation et de terminaison.
- Les hélicases (ou DNA B) déroulent la double hélice par rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les deux brins de l'ADN, avec consommation d'ATP.

- **Les protéines SSB** (pour single stranded binding protein) ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches répliquatives.
- **La primase** est une ARN polymérase ADN dépendante qui synthétise l'amorce.
- **Les topo-isomérases** relâchent les contraintes de torsion de l'ADN, elles sont de deux types et seule la topo-isomérase de types II consomme de l'ATP.
- **Les ADN ligases** (ou DNA G) catalyse la formation de la liaison phosphodiester, mais est incapable de placer les nucléotides. Lors de réparation de l'ADN les nucléotides en place ne sont plus triphosphatés, l'ADN ligase a donc besoin d'un apport en ATP.

b) Déroulement de la réplication

Ouverture de la double hélice et formation de la fourche répliquative : L'ouverture de la double hélice sur 40 pdb est permise par reconnaissance de l'origine de réplication (site riche en liaison A-T) par les **DNA A**. L'ouverture de l'ADN entraîne la formation de **l'œil de réplication** (OriC) et des deux fourches de réplication. **Les hélicases** (DNA B) se mettent alors en place pour permettre le déroulement des deux brins ; les **topo-isomérases**, (ADN-Gyrase chez E.Coli) se présentent en aval (en avant) de la fourche et permettent de diminuer la tension due à l'ouverture de l'hélice et facilitent l'avancée de l'hélicase. D'autre part les **protéines SSB** protègent les ADN simples brins pour les empêcher de se réenrouler.

Elongation du brin précoce dans le sens de déplacement de la fourche : Le brin qui servira de matrice au brin précoce est lu dans le même sens que l'avancée de la fourche, c'est-à-dire de 3' vers 5'. Au niveau de l'origine de réplication les **ADN polymérases** nécessitent une amorce qui sera mise en place par les **primases**. Cette amorce ARN, servira à **L'ADN polymérase III** pour l'initiation et l'élongation du brin précoce.

Elongation du brin tardif dans le sens inverse du déplacement de la fourche : Le brin qui servira de matrice pour le brin tardif doit également être lu dans le sens 3' vers 5'. **L'ADN polymérase III** sera également responsable de l'élongation du brin tardif. La synthèse de ce brin (pour respecter le sens d'élongation de 5' vers 3') sera segmentée en fragment de taille relativement constante = fragments d'**Okasaki**. Les fragments d'Okasaki des procaryotes mesurent 1000 à 2000 pdb (eucaryote=100 à 200 pdb). A chaque segment il y a recrutement d'une **primase** pour la synthèse d'une amorce d'ARN constitué de 10 à 50 nucléotides selon l'espèce. Par la suite les amorces vont être détruites par des protéines à activité ribonucléasique telles que des RNases, et **l'ADN polymérase I** va remplacer les amorces ARN par l'ADN. La dernière liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' du premier fragment

et l'extrémité 3' du deuxième fragment, ce qui correspond à l'épissage, sera réalisée par la **ligase**.

Terminaison : La terminaison survient lorsque les fourches se rejoignent . Ce site de terminaison, diamétralement opposé à OriC, se caractérise par une séquence de reconnaissance et de fixation pour la protéine « Tus » qui inhibe la fixation de l'hélicase (ADNB). Les deux molécules seront dissociées par la **topo-isomérase II** .

1.4 Réplication chez les eucaryotes

a) Rappels sur le cycle cellulaire

Le **cycle cellulaire** correspond à la vie d'une cellule depuis sa formation, par division de la cellule mère, jusqu'au moment où cette cellule a fini de se diviser en 2 cellules filles. → Il comprend l'interphase et la mitose. L'interphase est la plus longue période. Elle comprend 3 sous-phases: G1, S et G2 (G=gap, intervalle)

Phase G1 :

- Phase de synthèse métabolique préparatoire à la phase S de synthèse de l'ADN
- Durée: 1h à 1 an voire 10 ans !

Remarque : Après M, la cellule peut entrer en:

- Phase G1 pour un nouveau cycle de division: S, G2, M
- Phase de survie puis de mort
- Phase de différenciation: G0

Phase S :

- Phase de REPLICATION de l'ADN parental
- Il existe plusieurs origines de réplication chromosome linéaire à partir desquelles la réplication progresse dans les 2 sens (Les ADN circulaires possèdent une seule ARS)

Phase G2 :

- Débute dès que la réplication est achevée (C'est une phase de préparation de la mitose (Facteurs de condensation, Phosphorylation des histones H1, Accumulation de MPF jusqu'au seuil déclencheur, Dédoublément des centrioles)
- Dure 4 à 5 heures

b) Le réplicon

Le réplicon est l'unité de réplication de l'ADN eucaryote, il contient une origine et une terminaison. L'ADN peut être répliqué à plusieurs endroits en même temps.

Les réplicons sont des segments de taille variant de 30 000 à 150 000 bases et dont le nombre peut aller de 1 à 35 000 chez les eucaryotes. La vitesse de synthèse va jusqu'à 50 000 pdb/min pour les eucaryotes et encore plus rapide pour les procaryotes ne présentant pas de chromatine.

L'origine de réplication, localisée au milieu d'une petite séquence répétée (riches en paires de bases A-T) est reconnue par des protéines. Elle mesure environ 2000 pdb pour les eucaryotes, contre 200 paires de bases (pdb) pour les procaryotes.

C) Caractéristiques générales de la réplication (des eucaryotes).

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes est tout à fait comparable à la réplication de l'ADN chez les procaryotes. Elle est généralement bidirectionnelle, elle est discontinue entre les deux brins d'ADN. Des amorces d'ARN sont nécessaires. Cette réplication est également complémentaire, antiparallèle et dans le sens 5' → 3'.

La replication se fait en de nombreux points d'initiation. Elle fait intervenir un nombre d'ADN polymérase plus important que chez les procaryotes. De nombreuses protéines interviennent comme facteurs de réplication.

On connaît au moins 5 ADN polymérase chez les eucaryotes.

- **ADN Pol α -primase** (alpha) ce complexe synthétise de courtes amorces ARN à l'origine de la réplication sur le brin avancé ainsi que des amorces ARN pour les fragments d'Okazaki du brin retardé. Cette polymérase ne possède pas de fonction exonucléasique.
- **ADN Pol β** (béta): Cette polymérase est impliquée dans des processus de réparation de l'ADN. Elle ne possède pas de fonction exonucléasique.
- **ADN polymérase γ** ((gamma) est présente dans les mitochondries mais est codée par un gène nucléaire. Elle est impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial
- **ADN Pol δ** (delta): C'est la polymérase principale qui intervient dans la réplication de l'ADN chez les Eucaryotes, avec l'ADN Pol ϵ , dans la synthèse du brin avancé et du brin retardé. Elle possède aussi une activité exonucléasique 3' vers 5' intervenant dans la correction des erreurs et dans des processus de réparation. Cette polymérase correspond à la Pol III des levures.
- **ADN Pol ϵ** (epsilon): Elle possède une activité polymérase 5' vers 3' et une activité exonucléase 3' vers 5' et intervient dans la réplication et la réparation de l'ADN.

L'ADN simple brin au cours de la réplication est stabilisé par des protéines **RP-A** ou **RF-A** correspondant aux protéines SSB des procaryotes.

Les amorces d'ARN sont détruites par la **RNase H**. Les lacunes formées sont comblées par les polymérase béta ou alpha.

Au niveau du noyau, il y a présence de foyer de réplication de l'ADN, la réplication se fait donc de manière ponctuelle c'est l'ADN qui se déplace et non pas les ADN polymérase.

d) Les télomères

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes eucaryotes. Si l'extrémité des chromosomes était libre il y aurait perte de matériel génétique (car l'élimination potentielle de l'amorce d'ARN la plus externe pourrait entraîner un raccourcissement de l'ADN à chaque cycle de réplication).

Les télomères sont formés grâce à des télomérases qui sont des ribonucléoprotéines pouvant s'associer à des séquences répétées spécifiques de l'extrémité du chromosome (séquences de type TTGGGG à l'extrémité 3' et séquences complémentaires riches en cytosine à l'extrémité 5'). Les télomérases jouent le rôle de matrice pour les ADN polymérases qui synthétiseront les télomères. La protection des extrémités des chromosomes des eucaryotes est donc assurée ces enzymes spécifiques (*télomérases*).

Les télomères ont différents rôles :

- maintenir l'intégrité des informations génétiques,
- protéger les ADN vis-à-vis des exo-nucléases,
- éviter les fusions des chromosomes au niveau des extrémités,
- rôle dans l'organisation de la chromatine durant l'interphase

(NB : Attention, les télomérases ne sont pas actives dans les cellules différenciées.)

Séance de Travaux Dirigés (voir TD)