

## Génome et réplication de l'ADN

Taille des génomes:

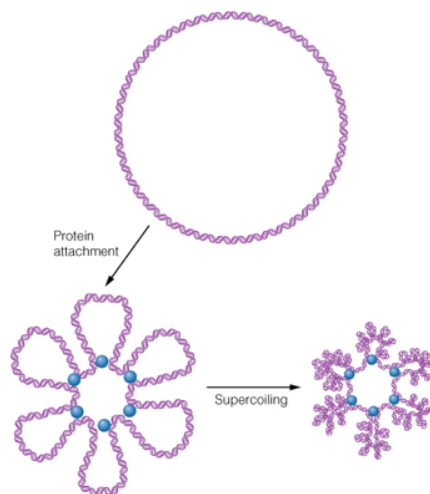
Concept clé:

Les génomes des eucaryotes sont généralement beaucoup plus grands que les génomes des bactéries ou des virus.

Cette contrainte physique et des origines évolutives distinctes font en sorte que l'empaquetage du génome est très différent chez les procaryotes et les eucaryotes.

**Le génome bactérien est sur-enroulé et circulaire:**

Concept clé:



(a) Independent domains of supercoiling, each stabilized by binding to protein.

© 2016 Pearson Education, Inc.

L'interaction du chromosome bactérien avec des protéines permet la définition de domaine indépendant de surenroulement. Chaque boucle dans cette image représente environ 50,000 pb et permettent d'organiser la coordination de la réplication et de la transcription boucle par boucle.

Ce sont de petites protéines habituellement basiques (chargées positivement), ce qui permet leur association avec les acides nucléiques (chargées négativement). Chez *E. coli* cette protéine porte le nom de HU partage certaines propriétés structurales avec les histones.

**\*Quand l'ADN n'est pas répliqué, elle est dans sa forme compacte.**

**QUAND LA BACTÉRIE EST SUR LE POINT DE SE DIVISER, SON NUCLÉOIDE DEVIENT PLUS COMPACT:**

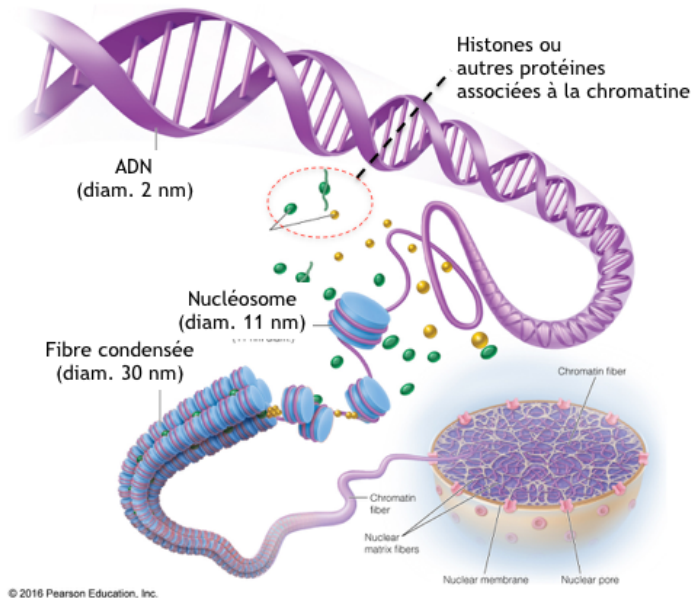


**(b)** Electron micrograph of a dividing *E. coli* cell.  
© 2016 Pearson Education, Inc.

**ADN des eucaryotes est organisé de façon unique**

- Chromosomes linéaires
- Non-circulaire
- La réplication de l'ADN se fait différemment
- Il y a des télomères aux extrémités des chromosomes

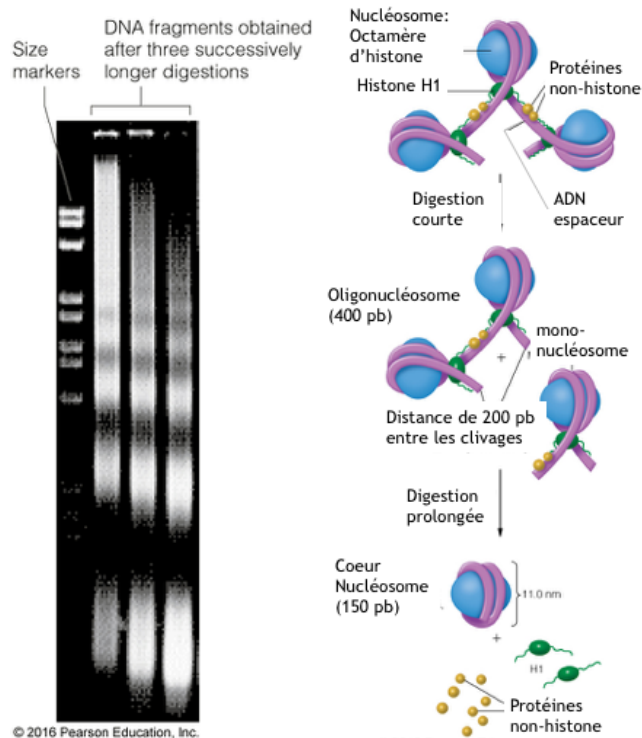
**Chromosomes eucaryotes**



- Organisé sous forme de chromatine compactée dans le noyau
- Formation de nucléosomes qui contient des histones permet le surembroulement de l'ADN
- Les histones interagissent avec l'ADN de manière spécifique

### **Nucléosomes**

- Structure très compacte
- Interactions entre l'ADN et les histones est très forte, dans un nucléosome.
- Une nucléase protège l'ADN associés à un nucléosome de la digestion.
- Quand on digère longtemps la chromatine l'ADN qui est entre les nucléosomes est détruite.
- \*En bas du gel, il y a l'ADN associé à un nucléosome.



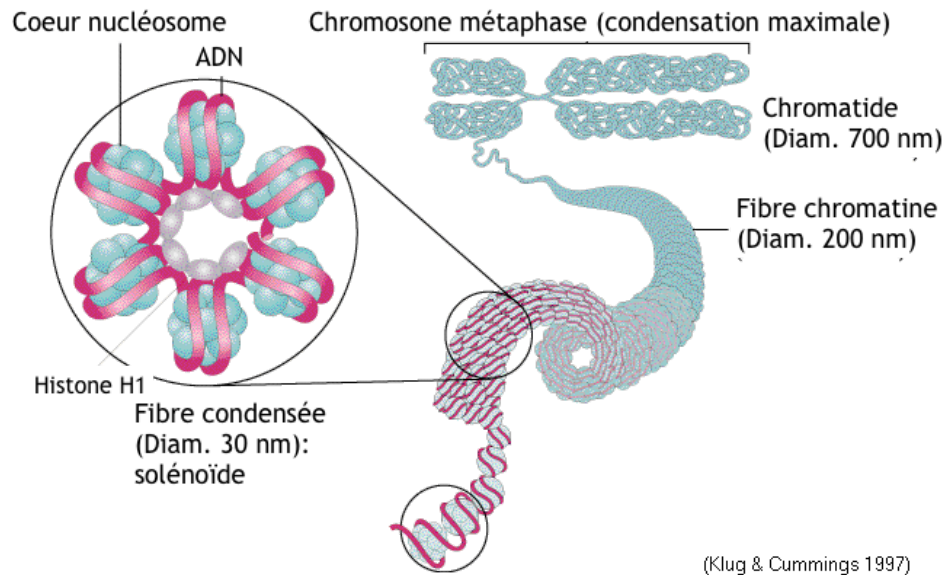
### Structure détaillée:

- Attache l'ADN de manière non-spécifique
- Composition constante chez les eucaryotes
- 146 pb d'ADN associé à un octamère des histones H2A, H2B, H3 et H4 (2 copies pour chacune).
- L'ADN est associé sur l'extérieur du coeur d'histone, y effectuant environ 1.7 tour main gauche. L'enroulement est de type solénoïde (cours 4).
- On joue avec les interactions entre les histones et l'ADN pendant la réplication. (Enzymes spécifiques sont nécessaires)

### Propriétés des histones

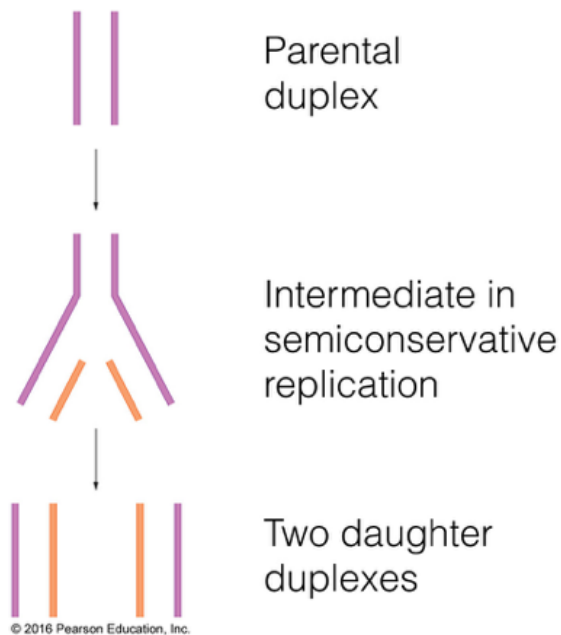
- H1 ne fait pas partie de l'octamère des histones. Elle contribue à la condensation de la chromatine.
- H1 fait le pont entre les nucléosomes. Elle est différente des autres histones.
- Les autres: H2A, H2B, H3, H4

### Chromatine



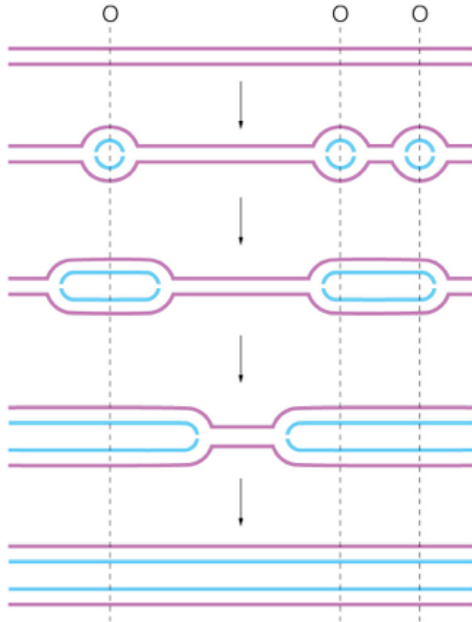
- Sa compaction est permise grâce à la fibre formée par les nucléosomes qui est repliée in vivo.
- Pour permettre la réplication de l'ADN, il faut déjouer ce système.

### Réplication de l'ADN



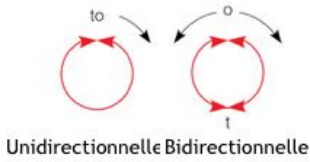
- Semi-conservative: Proposé par Watson et Crick
- Le brin de parentale sert de matrice pour former le nouveau brin.
- Deux duplex: brin parentale + brin fille
- Associée à la division cellulaire et la reproduction sexuée
- **Bidirectionnelle**

- Plusieurs origines de réplication comparé aux bactéries
- Réplication commence à un certains moments de la phase S
- Les deux bulles finissent par se rencontrer
- Plus lent chez les mammifères comparés au bactéries



© 2016 Pearson Education, Inc.

### Réplication de l'ADN (bactérie)



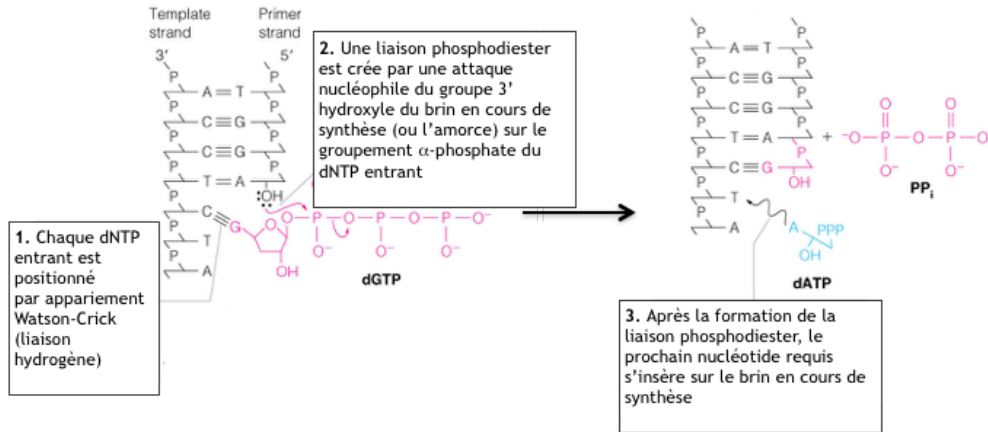
© 2016 Pearson Education, Inc.

- Bidirectionnelle (plasmide)
- Débute à l' « origine de réplication »

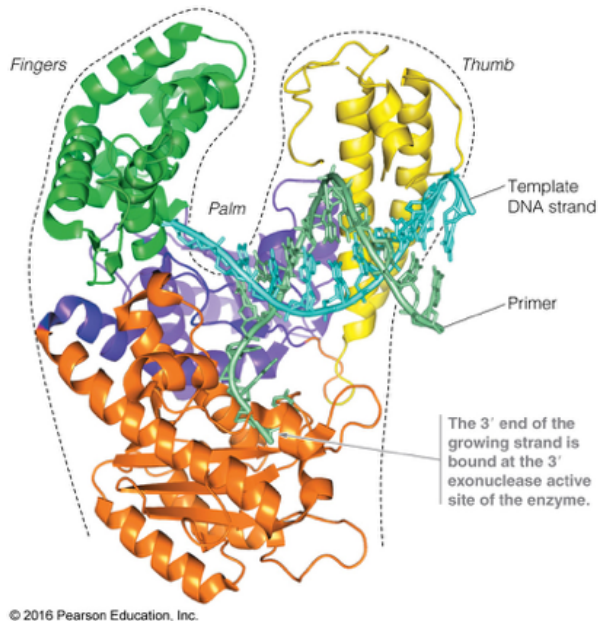
- Prouvé grâce à marquages métaboliques avec de la thymidine marquée au tritium (radioactives).

### Réaction enzymatique catalysé par l'ADN polymérase, pour répliquer l'ADN

- **La formation du lien phosphodiester ( $\Delta G_0' = 13.8 \text{ kJ/mol}$ ) est rendue thermo-dynamiquement favorable par le couplage avec l'hydrolyse du lien phosphoanhydre ( $\Delta G_0' = -46 \text{ kJ/mol}$ )**



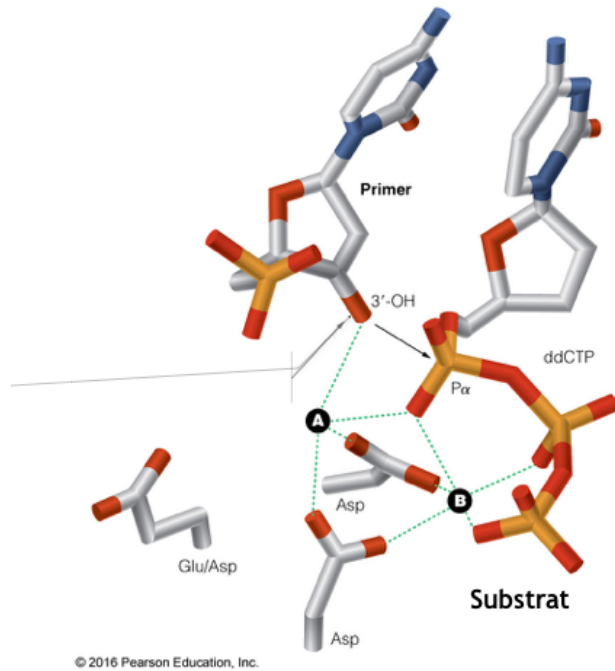
### Structure de l'ADN polymérase



- Similaires chez les procaryotes et les eucaryotes
- Structure en forme de paume

- L'activité exonucléase permet de corriger les erreurs en excisant les nucléotides mal appariés. Elle augmente considérablement la précision de la réplication.
- Ils ont toujours besoin d'une amorce pour faire la réplication de l'ADN
- ACTIVÉ par l'extrémité 3'-OH de l'amorce
- In vivo = amorce d'ARN vs in vitro = amorce d'ADN ou d'ARN

### Un mécanisme à deux ions métalliques dans le site actif

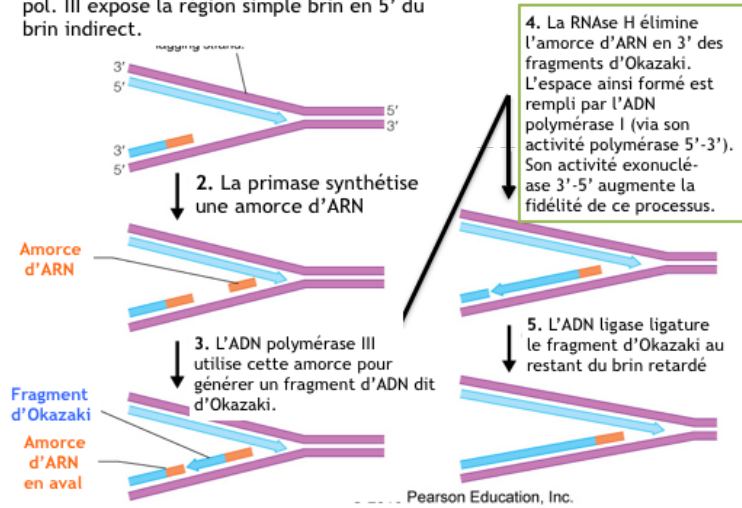


### Concept clé:

- Deux ions magnésium (A et B) interviennent dans le mécanisme de catalyse de la réaction.
- Ils permettent de rapprocher et d'orienter correctement le phosphate  $\alpha$  du nucléotide entrant par rapport au 3' hydroxyle de l'extrémité du brin en cours de synthèse par le réseau d'interactions ioniques indiquées par le trait pointillé dans l'image de droite.
- STRUCTURE DU SITE ACTIF EST similaire chez l'ADN polym I et III

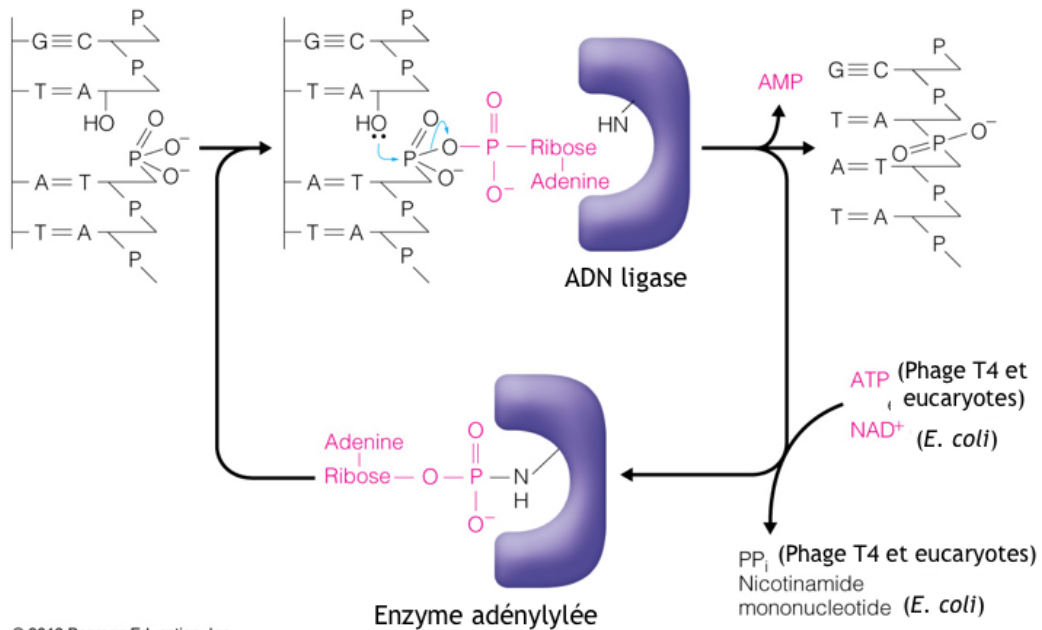
### La fourche de réplication de l'ADN

1. Déroulement de la molécule parentale par l'hélicase et élongation du brin néoformé direct dans le même sens par l'ADN pol. III expose la région simple brin en 5' du brin indirect.



- Il y a deux fourches de réplication
- Brin direct: besoin d'une seule amorce
- Brin discontinu: besoin de plusieurs amorces + des fragments d'Okazaki + plus d'enzymes impliqués

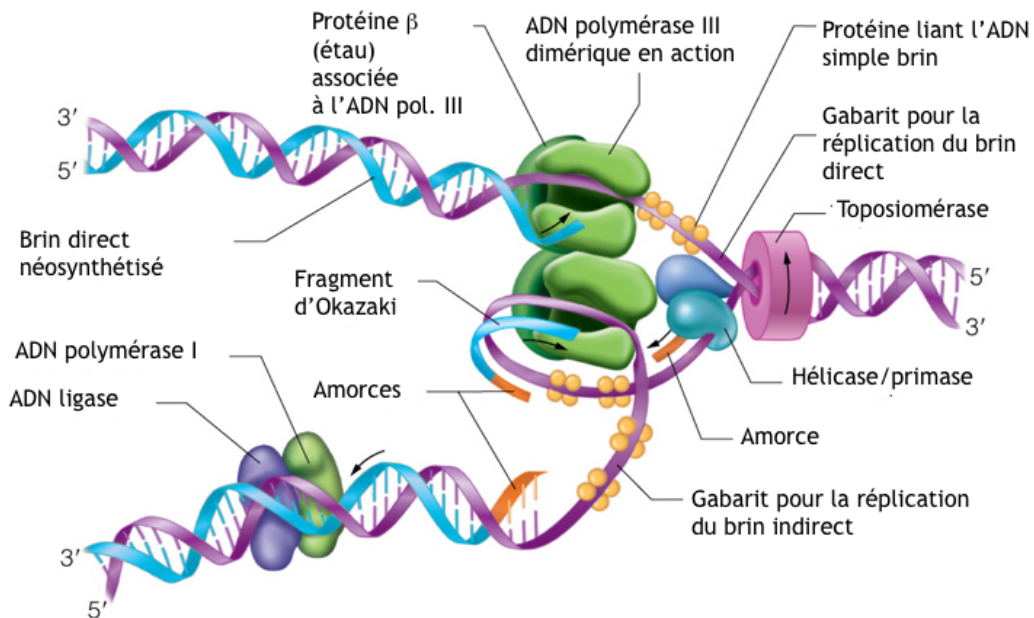
**Réaction catalysé par l'ADN ligase**



- © 2016 Pearson Education, Inc.
- \*La ligase est activé par une adénylation
- L'ADN ligase permet de catalyser la formation des liens phosphodiester manquant entre chaque fragment d'Okazaki. Elle catalyse la réaction du lien phosphodiester entre un

groupement 3'-OH et le 5'-phosphate de deux nucléotides voisins.

### **Fourche de réplication (procaryotes): Joueurs impliqués**



- © 2016 Pearson Education, Inc.
- Le réplisome est le complexe protéique qui permet la réplication de l'ADN.
- Il contient toutes les protéines essentielles à la réplication de l'ADN.
- Il est composé de deux molécules d'ADN polymérase III qui font l'essentiel de la la réplication de l'ADN sur le brin direct et le brin indirect et d'une seule molécule d'ADN polymérase I qui dégrade avec l'aide de la RNase H les amorces d'ARN et les remplace par de l'ADN.
- Comme son activité est nécessaire uniquement sur le brin indirect, cela explique le rapport stoechiométrique 1:2 de l'ADN polymérase I par rapport à l'ADN polymérase III au sein du réplisome.

### **ADN polymérase III ( holoenzyme)**

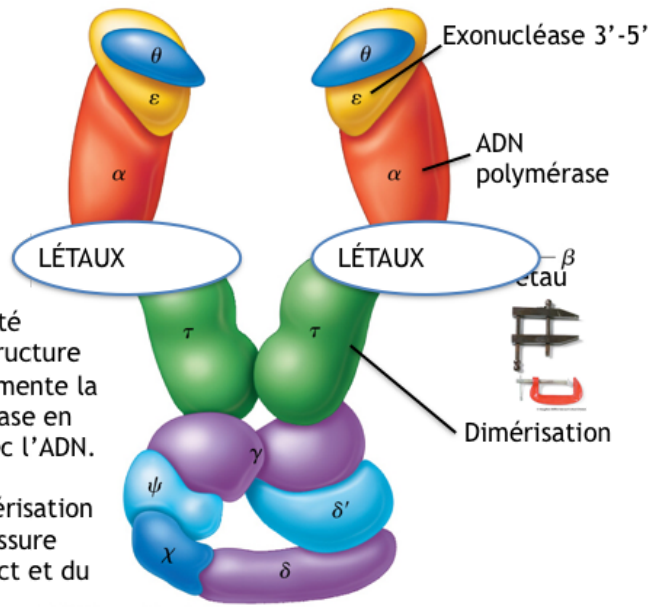
# L'ADN polymérase III holoenzyme est en fait bien plus complexe

## Concept clé:

En fait, l'ADN polymérase III se retrouve sous la forme d'une holoenzyme beaucoup plus complexe à la fourche de réplication.

Un élément clé est la sous-unité  $\beta$  (étau) une protéine à la structure quaternaire circulaire qui augmente la processivité de l'ADN polymérase en renforçant son interaction avec l'ADN.

La sous-unité  $\tau$  permet la dimérisation de l'ADN polymérase ce qui assure que la réplication du brin direct et du brin indirect à la fourche est coordonnée.

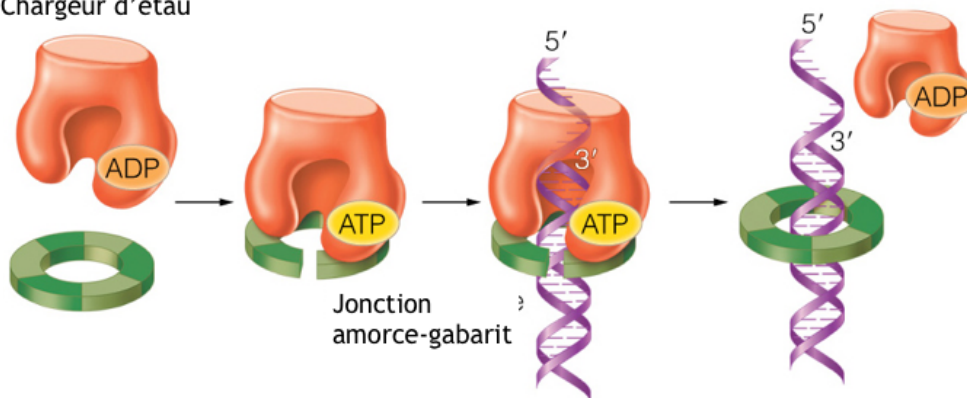


© 2016 Pearson Education, Inc.

Les deux ADN polymérase sont maintenues ensemble par ce complexe. Partie enzymatique: jaune, bleu, orange.

## Comment introduire sur l'ADN la protéine $\beta$ (étau)

Chargeur d'étau

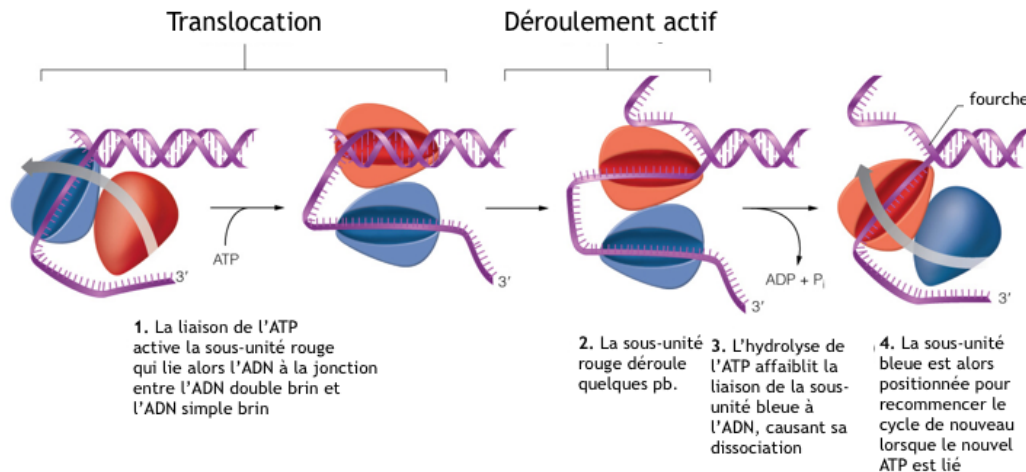


**Concept clé:** La protéine  $\beta$  (étau) étant circulaire son association autour de l'hélice double brin d'ADN est difficile.

La protéine chargeur d'étau lié à l'ATP permet l'ouverture de la protéine  $\beta$ , et son association avec l'ADN double brin, après quoi l'hydrolyse de l'ATP permet la dissociation du complexe.

Protéine létaux permet à l'ADN polymérase de rester attaché à l'ADN\*

## L'hélicase permet la propagation de la fourche de réplication



© 2016 Pearson Education, Inc.

**Concept clé:** l'hélicase en utilisant l'hydrolyse de l'ATP déroule l'hélice double brin. Cela permet à la fourche et à l'ADN polymérase de progresser plus en avant dans la réplication de l'ADN en utilisant ces nouvelles régions simple brins comme gabarit.

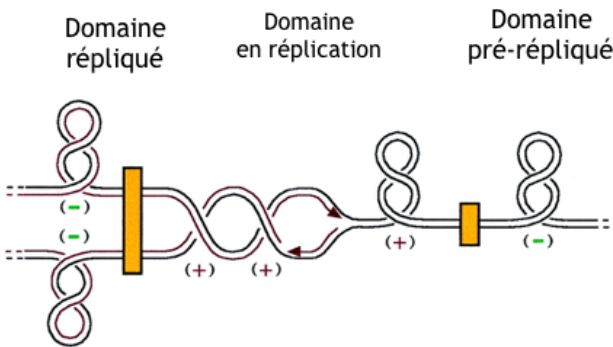
**\*Hélicase rend l'ADN simple brin à partir de la double hélice**

### Rôle de la topoisomérase dans la réplication de l'ADN

- La topoisomérase I relaxe l'ADN surenroulé en entaillant (Nick) un brin d'ADN pour faire passer le brin complémentaire à travers l'entaille avant de lier à nouveau le brin initialement clivé. Elle change donc l'enlacement de 1 par cycle.
- La topoisomérase II peut surenrouler l'ADN négativement ou relaxer l'ADN en créant une brisure double brin et en y faisant passer le brin complémentaire. Elle change donc l'enlacement de 2 par cycle.
- La topoisomérase est essentielle pour la réplication de l'ADN et la régulation de l'expression génique.

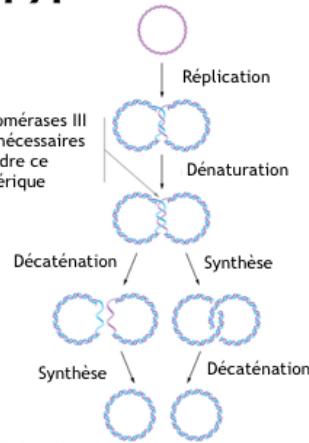
**\*Si on a de l'ADN sans hélicase et de topoisomérase, la réplication de l'ADN n'aura pas lieu.**

# Le rôle des topoisomérases dans la réplication de l'ADN (2)



Lisa Postow et al. PNAS 2001;98:8219-8226

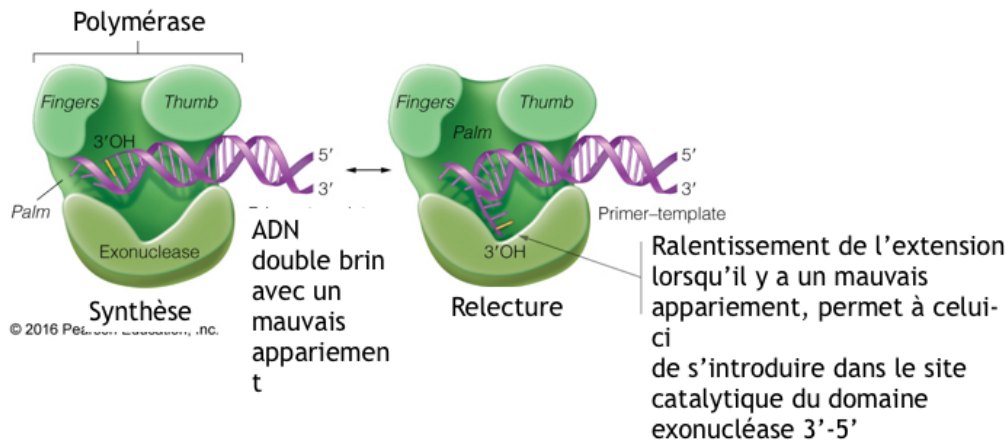
Les topoisomérases III et IV sont nécessaires pour résoudre ce blocage stérique



© 2015 Pearson Education, Inc.

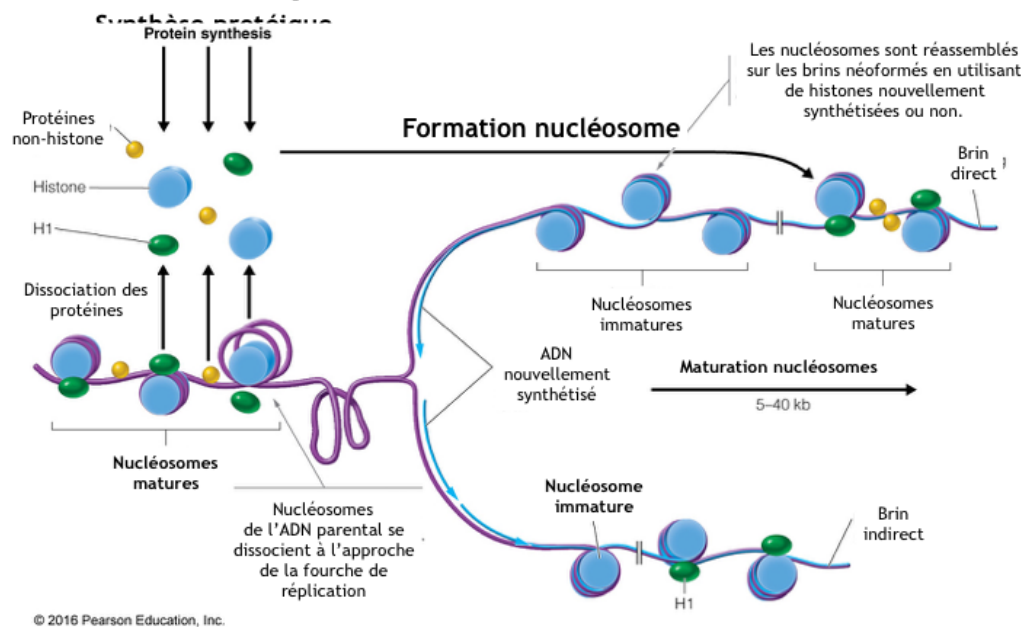
**Concept clé:** le désenroulement de l'ADN catalysé par l'hélicase introduit un surenroulement positif devant la fourche de réplication et négatif derrière la fourche de réplication est réduit par les topoisomérases. Elles sont totalement essentielles à la réplication de l'ADN, car ce surenroulement s'il n'était pas réduit finirait par empêcher stériquement la progression de la fourche de réplication. Finalement, les topoisomérases (IV) interviennent également vers la fin de la réplication pour décaténer les deux molécules filles d'ADN, ce qui est absolument essentiel pour les mêmes raisons à la complétion du processus de réplication

# La réplication de l'ADN est un processus de haute fidélité



**Concept clé:** La réplication de l'ADN est un processus hautement efficace. La chance qu'un nucléotide soit répliqué incorrectement (introduisant une mutation) est inférieure à  $1 \times 10^{-10}$  (Lisa Postow et al. PNAS 2001;98:8219-8226). Le rôle des topoisomérases dans la réplication de l'ADN (2) **Concept clé:** le désenroulement de l'ADN catalysé par l'hélicase introduit un surenroulement positif devant la fourche de réplication et négatif derrière la fourche de réplication est réduit par les topoisomérases. Elles sont totalement essentielles à la réplication de l'ADN, car ce surenroulement s'il n'était pas réduit finirait par empêcher stériquement la progression de la fourche de réplication. Finalement, les topoisomérases (IV) interviennent également vers la fin de la réplication pour décaténer les deux molécules filles d'ADN, ce qui est absolument essentiel pour les mêmes raisons à la complétion du processus de réplication. Les topoisomérases III et IV sont nécessaires pour résoudre ce blocage stérique (soit une erreur tous les 1 milliard de nucléotides répliqués). Deux ordres de grandeurs (un facteur 100) de cette fidélité émanent de la correction (« proof-reading ») des mauvais appariements par la relecture du brin fille effectuée par le domaine exonucléase 3'-5'.

## Des éléments spécifiques aux eucaryotes: la réplication de la chromatine



### Malgré tout, il y a quand même des mutations qui surviennent

#### Concepts clé:

**mutation silencieuse:** le changement de nucléotide ne mène pas un changement dans la structure primaire de la protéine, car elle change le codon original pour un codon mutant synonyme (voir le Cours 17 sur la traduction), c'est-à-dire un codon mutant menant à l'insertion d'un acide aminé identique à celui inséré par le codon original.

Pour un ARN non codant, la mutation silencieuse n'existe pas.

**mutation faux-sens:** le changement de nucléotide mène à un changement dans la structure primaire de la protéine, car elle change le codon original pour un codon non-synonyme, c'est-à-dire un codon mutant menant à l'insertion d'un acide aminé différent à celui inséré par le codon original.

La mutation faux-sens n'a cependant pas toujours une conséquence fonctionnelle.

Par exemple, un acide aminé peut-être remplacé par un acide aminé dans la même classe fonctionnelle.

Deuxièmement, la mutation peut survenir à un résidu peu important fonctionnellement ou structuralement. À nouveau, vous pouvez revoir l'exemple d'alignement du DLR de Raf dans le

## Cours 8.

**mutation non-sens:** lorsque le changement de nucléotide remplace un codon normal (menant à l'insertion d'un acide aminé) par un codon stop qui termine la traduction (voir le cours 17). Si ce codon stop intervient au début de la séquence codante, elle est équivalente à une mutation (disparition ou délétion) complète du gène.

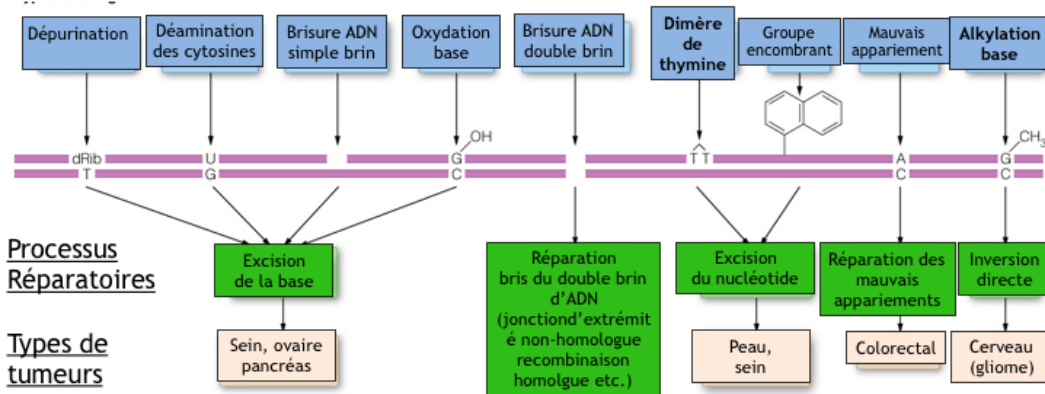
**mutation d'insertion ou délétion:** plusieurs nucléotides sont ajoutés ou enlevés. Dans la séquence codante cela pourrait ajouter ou enlever plusieurs résidus. Ce genre de mutation a également plus de chance que les mutations faux sens d'avoir des conséquences fonctionnelles importantes. Elles peuvent survenir lors de la réparation de l'ADN.

Les mutations par insertion ou délétion provoquent également souvent un changement de cadre de lecture menant habituellement à un changement important de la structure primaire en aval du site muté et la plupart du temps à l'apparition d'un codon stop prématuré (mutation avec un effet non-sens).

**Translocation chromosomique/recombinaison:** dans certains cas de réparation de l'ADN suite à un dommage ou dans des cas d'infections virales ou d'instabilités génomiques dans les tumeurs, il survient des événements de translocations chromosomiques ou de recombinaison qui mène à la fusion de morceaux de chromosomes les uns avec les autres. Il existe de nombreux cas documentés où ces fusions ont mené à des dérégulation de l'expression à la création de fusion protéique, à des gains ou des pertes de fonctions impliquées dans différents cas de cancer.

# Mutations dues à des stressés chimiques: réparation de l'ADN

## Type de dommages



© 2016 Pearson Education, Inc.

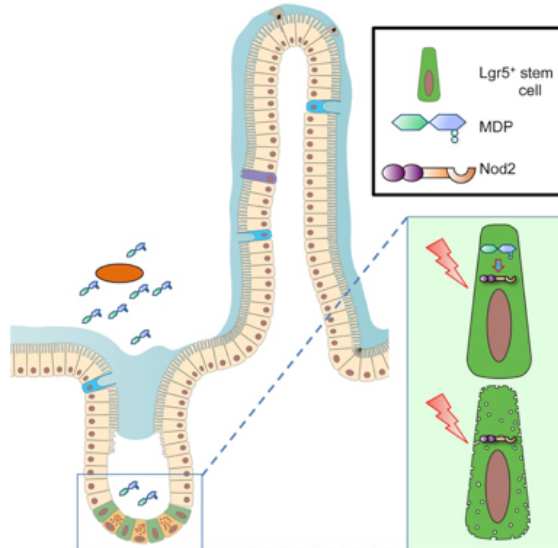
## Concept clé:

Des mutations peuvent également survenir à cause de dommages (chimiques) à l'ADN, principalement aux bases, qui peuvent être induits par différents stress. Des mécanismes de réparation indépendants de la réplication surviennent afin de limiter les dégâts, c'est-à-dire avant que ces erreurs soient "copiées"/reproduites lors de la réplication. Comme tous les processus biochimiques, les mécanismes de réparation ne sont pas 100% efficaces, ce qui mène à l'insertion de mutations.

\*Exemple dimère de thymine: dû à l'exposition aux lumières UV

\*Recombinaison homologue: un chromosome à proximité donne son extrémité à un autre chromosome.

# Toutes les mutations ne sont pas également dommageables



Giulia Nigro et al. Cell Host & Microbe 2014

## Concept clé:

Comme mentionné dans les diapos précédentes, les mutations les plus dommageables surviennent habituellement à l'intérieur d'un gène (dans le promoteur ou dans la séquence codante).

La mutation de certains résidus dans certaines protéines (comme pour le cas de Ras discuté dans le cours 13) aura un plus grand impact.

Prenons l'exemple d'un tissu complexe comme l'intestin. Une mutation dans un gène important serait beaucoup plus néfaste dans les cellules souches (vertes) que dans les cellules différenciées (beige).

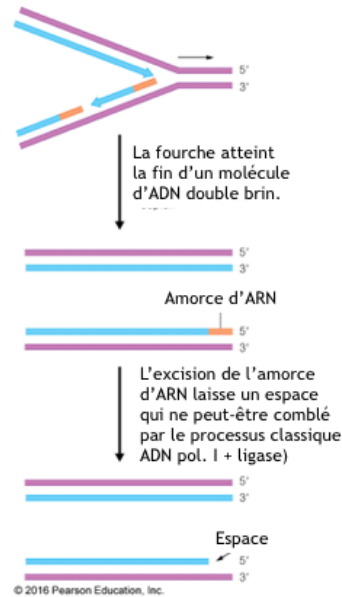
**\*Le type de tissus où la mutation survient est importante.**

# Complétion des extrémités 5' d'un chromosome linéaire (eucaryotes)

**Concept clé:** les chromosome linéaires des eucaryotes introduisent un problème tout à fait différent. La méthode que nous avons vue pour la synthèse du brin retardé ne permet pas de synthétiser l'ADN dans la région correspondant à la dernière amorce d'ARN (voir le schéma).

Une autre solution a été trouvée: les télomères.

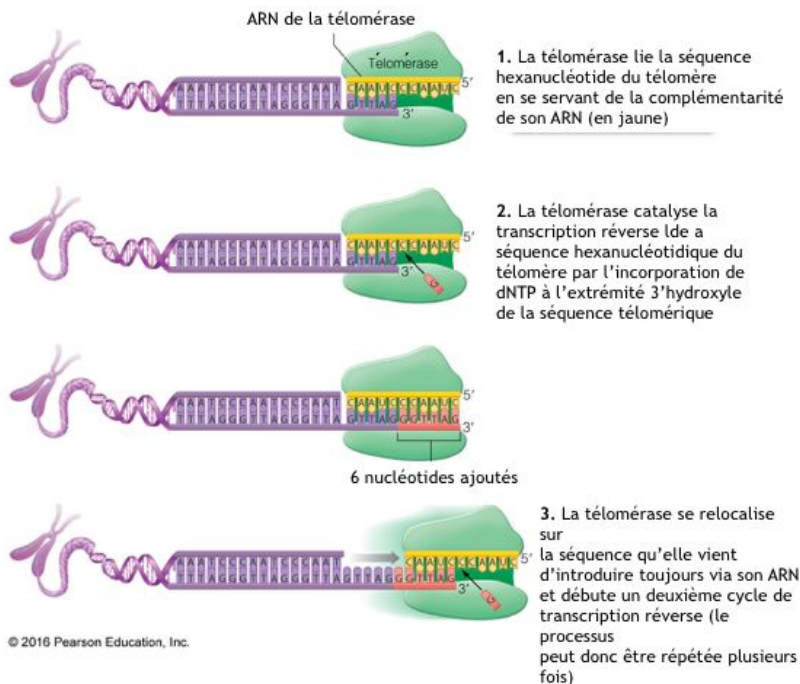
Ces structures évitent des pertes d'information successive qui surviendrait en leur absence à chaque ronde de réplication.



**\*La synthèse des télomères pourvoit à l'espace dans l'ADN linéaire aux extrémités.**

## La synthèse des télomères

### La synthèse des télomères



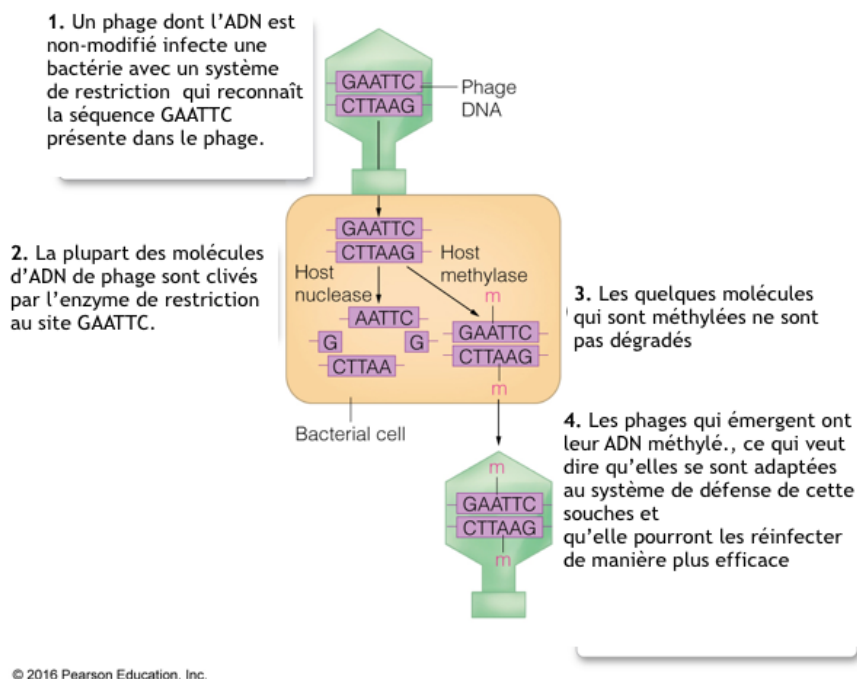
- Activité télomérase (\*seulement la télomérase peut faire ceci)
- Ce sont aussi des séquences répétées (télomères)
- Quand on vieillit, les télomères deviennent de plus en plus courts...éventuellement les cellules souches vont mourir
- L'activité télomérase des cellules cancéreuses est très accrue et n'est pas réduite avec le vieillissement.

### Applications technologiques:

1. Clonage de gènes
2. Séquençage d'un génome

### Les enzymes de restrictions

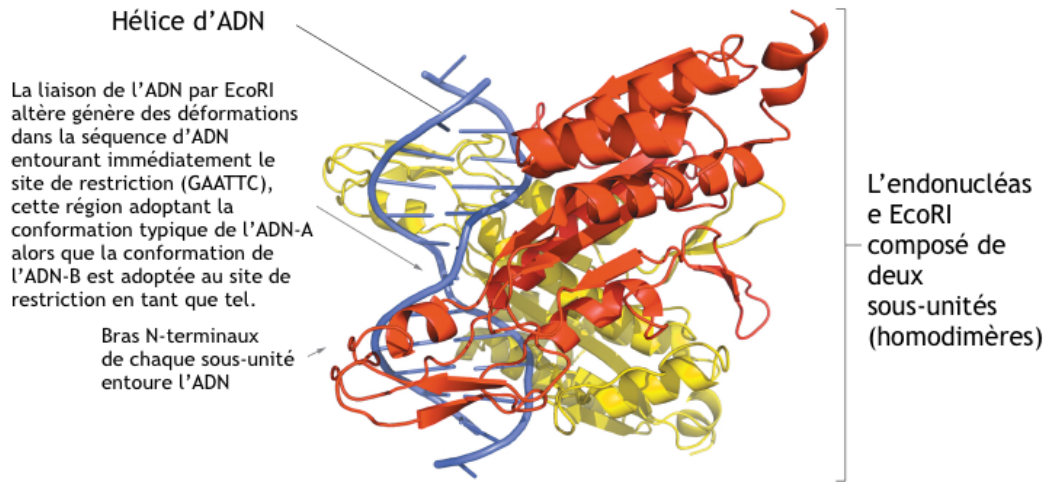
# Les enzymes de restriction



- Chez les procaryotes, elles servent comme système de protection contre des prédateurs.
- Elles vont cliver l'ADN étranger à des régions spécifiques.

### Structure des enzymes de restrictions

# Structure d'une enzyme de restriction



**Concept clé:** la plupart des enzymes de restriction reconnaissent des séquences palindromique (double symétrie), où la séquence est identique sur les deux brins.

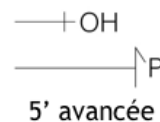
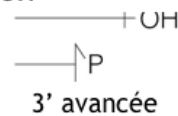
## Un répertoire immense d'enzyme de restriction

**Concept clé:** Il existe des centaines d'enzymes de restriction disponibles commercialement avec des site de restriction variées qui permettent un éventail de manipulations diverses. Voici 4 exemples qui donnent une impression bien incomplète de cette diversité.

Enzyme	Source bactérienne	Site de restriction
BglII	<i>B. globiggi</i>	A↓GATCT
HindIII	<i>H. influenzae Rd</i>	A↓AGCTT
PleI	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	CTCAGNNNN↓
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG

**Note:** la flèche indique le site de clivage

Trois type de clivages principaux produisant 5'-PO<sub>4</sub> et 3'-OH



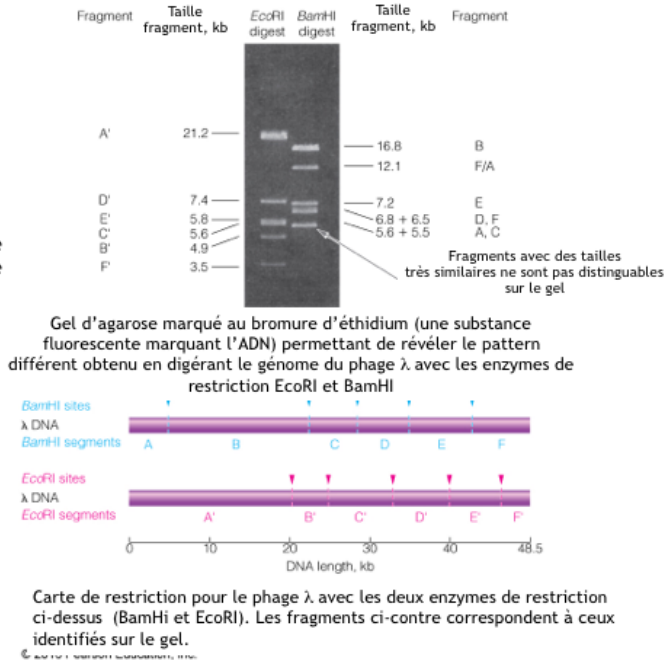
© 2016 Pearson Education, Inc.

\*Les trois types de clivages à droite sont effectués par des enzymes de restrictions.

# Les enzymes de restriction: un outil essentiel pour manipuler l'ADN

## Concept clé:

Les enzymes de restriction sont utilisées dans la caractérisation génétique (voir ci-contre) et dans le clonage comme nous le verrons dans les prochaines diapos.

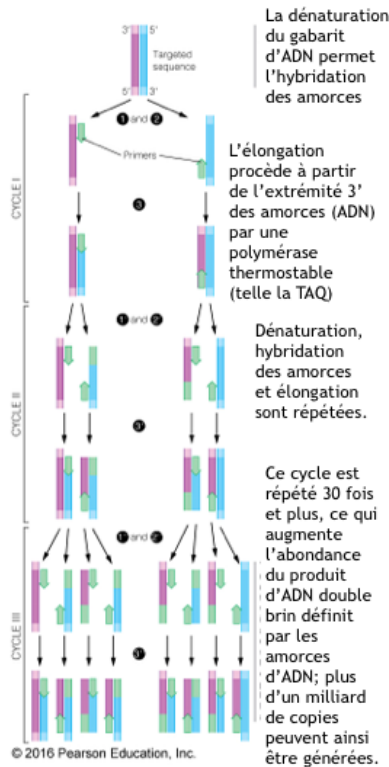


\*On utilise plusieurs enzymes de restrictions pour cartographier l'ADN.

\*Les enzymes de restrictions servent à faire le clonage.

## PCR: UNE INNOVATION IMPORTANTE

- On se sert de cycle de dénaturation pour répliquer les deux brins d'ADN complémentaire d'ADN de manière direct. C'est le début de l'ère du clonage.



## Concept clé:

La compréhension de la répliation de l'ADN a permis l'invention entre autre de la PCR (polymerase chain reaction).

La PCR permet d'amplifier une séquence d'intérêt parmi un échantillon complexe en se servant d'une paire d'amorce d'ADN qui encadre la région d'intérêt.

La PCR repose sur des enzyme ADN polymérase de haute fidélité et thermostable.

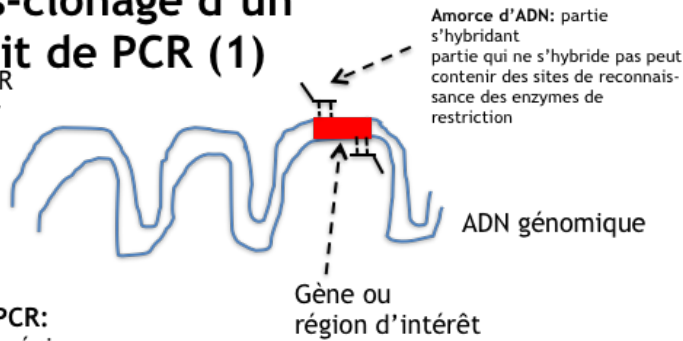
Elle consiste en l'alternance entre trois phases dénaturation, hybridation et élongation qui peuvent être répétées plusieurs fois pour amplifier la séquence d'intérêt (voir le schéma à droite pour une explication des résultats de la PCR pendant les quelques premiers cycles).

## Exemple d'utilisation: (cas d'un patient malade)

- 1) Prendre tissus d'un patient atteint d'un cancer quelconque
- 2) Utiliser une amorce spécifique
- 3) Faire PCR
- 4) Permet de voir si le patient a un cancer
- 5) FAIRE DES EXPÉRIENCES EN LAB AVEC LES COPIES D'ADN QUE L'ON A DU PATIENT.

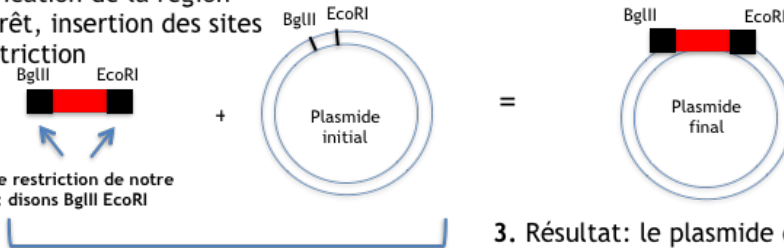
## Le sous-clonage d'un produit de PCR (1)

**Concept clé:** la PCR permet d'amplifier une séquence d'intérêt et donc de l'isoler d'un échantillon très complexe.



**1. Résultat de la PCR:** amplification de la région d'intérêt, insertion des sites de restriction

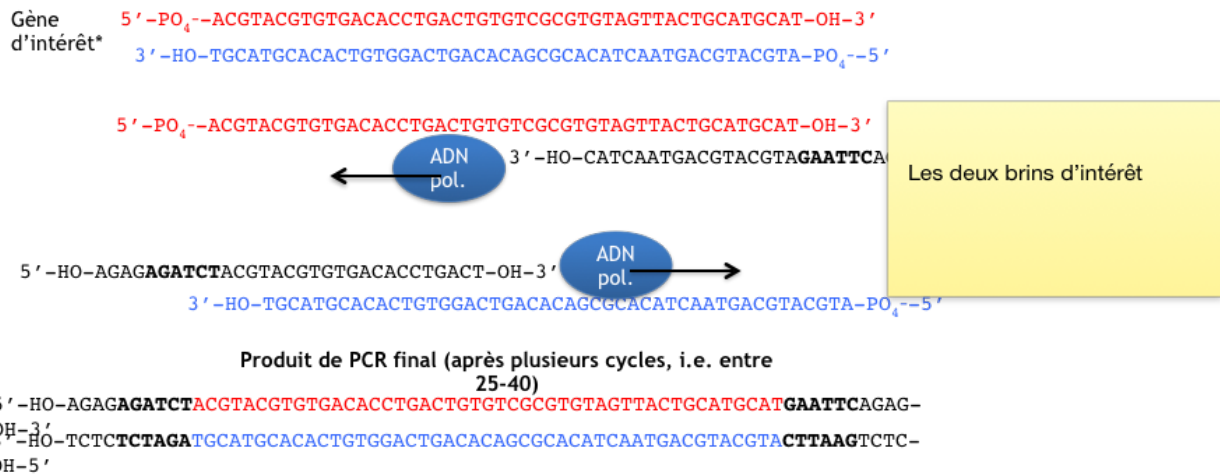
site de restriction de notre choix: disons BglIII EcoRI



**2. Digestion avec les enzymes de restriction BglIII et EcoRI; ces derniers sont donc séparés du nombre de pb correspondant à la taille de l'insert dans le plasmide final.**

**3. Résultat:** le plasmide contient maintenant l'insert entre les résidus BglIII et EcoRI; ces derniers sont donc séparés du nombre de pb correspondant à la taille de l'insert dans le plasmide final.

## Le sous-clonage d'un produit de PCR (2)



**Légende:** détails de l'hybridation entre le gène d'intérêt et les amorces lors du premier cycle de la PCR (basé sur la réaction décrite à la diapo précédente).

### Concept clé:

Dans la PCR l'utilisation de la température pour désassembler l'ADN bicaténaire permet à l'ADN polymérase thermorésistante de répliquer les deux brins en continu. Il n'y a donc pas de fragments d'Okazaki ni donc d'ADN ligase requise pour réaliser une PCR.

Ingrédients: ADN polymérase thermorésistante, dNTP (nucléotides triphosphate) et des amorces (deux la plupart du temps) et un ADN gabarit contenant la région cible d'ADN à amplifier.

### Digestion et ligation

# Digestion et ligation

## 1. Produit de PCR final (Insert)

5' -HO-AGAGAGATCTACGTACGTGTGACACCTGACTGTGTGCGGTGTAGTTACTGCATGCATGAATTCAGAG-  
OH-3'  
3'-HO-TCTCTCTAGATGCATGCACACTGTGGACTGACACAGCGCACATCAATGACGTACGTACTTAAGTCTC-  
OH-5'

## 2. Digestion BglIII et EcoRI (Insert)

5'-PO<sub>4</sub>--GATCTACGTACGTGTGACACCTGACTGTGTGCGGTGTAGTTACTGCATGCATG-OH-3'  
3'-HO-ATGCATGCACACTGTGGACTGACACAGCGCACATCAATGACGTACGTACTTAA-PO<sub>4</sub>--5'

## 3. Digestion BglIII et EcoRI [Plasmide linéaire (vecteur)]



## 4. Nouveau plasmide circulaire contenant l'insert

1) Prélever l'ADN

2)PCR

3)MODIFIER LES BRINS

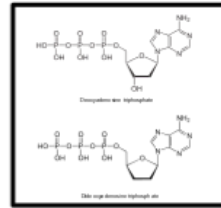
4)INSÉRER LE NOUVEAU GÈNE DANS PLASMIDE BACTÉRIES

5) ELLE VA ÊTRE RÉPLIQUÉ PAR LA SUITE DANS LES BACTÉRIES

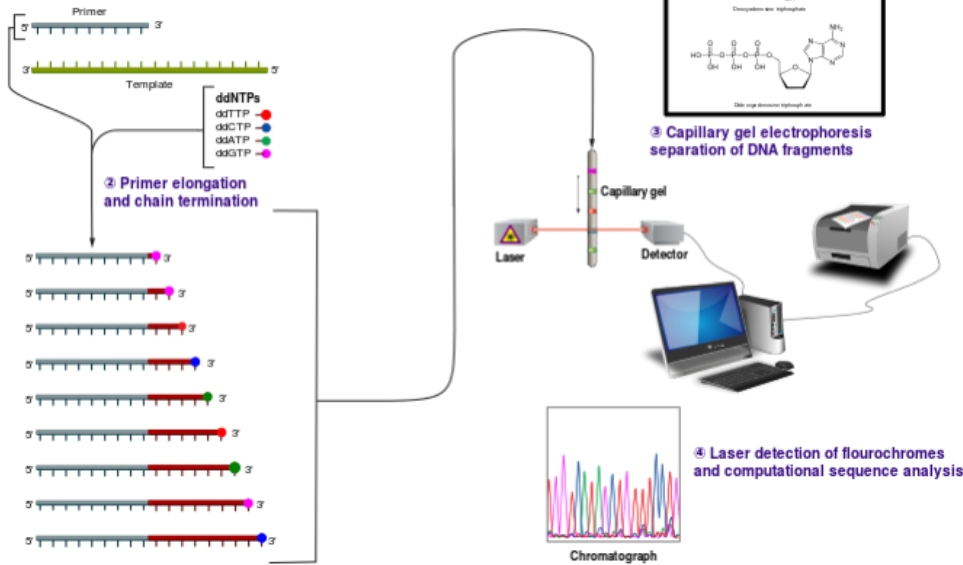
# La maîtrise de la réplication de l'ADN: source d'innovations technologiques: 2. le séquençage de l'ADN

## ③ Reaction mixture

- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flouochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



## ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

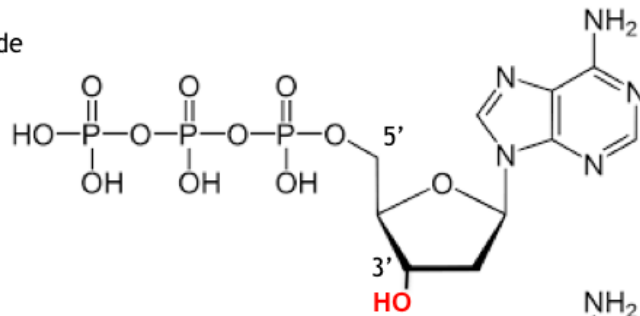


- On ajoute beaucoup de ceux avec le groupement hydroxyle et peu de ceux sans le groupement hydroxyle. Celui sans le groupement hydroxyle comprend un fluorochrome.
- Inventer par Sanger

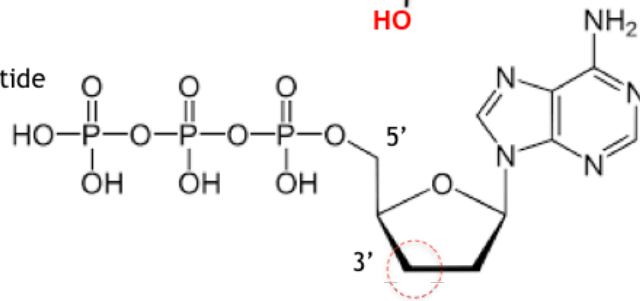
# Désoxy versus Didésoxynucléotide

\*\*\*\*

Désoxynucléotide  
(naturel)



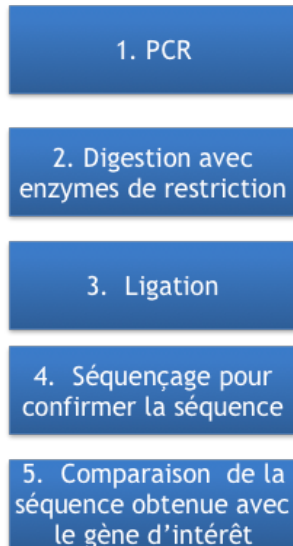
Didésoxynucléotide  
(artificiel)



## Concept clé:

L'absence du 3'-OH empêche la poursuite de l'élongation de la chaîne. En effet, un didésoxynucléotide peut-être intégré dans la chaîne d'acide nucléique en cours de synthèse, car il peut former des liaisons hydrogène normales et qu'il a un 5'-triPO<sub>4</sub><sup>-</sup> disponible pour la catalyse. Cependant l'absence du 3'-OH empêche l'attachement du nucléotide suivant: il manque un groupement partenaire essentiel à la formation du lien covalent.

## Ces méthodes permettent donc le clonage d'un ADN d'intérêt (résumé)



- \* 2. Pour permettre l'insertion du gène d'intérêt
- \* 3. Pour lier le gène d'intérêt