

7.1- LA STRUCTURE ET LA RÉPLICATION DE L'ADN

M. Alexandre Desjardins Cormier
Traduit à partir de: https://www.youtube.com/watch?v=190ZG_HW1a

1

NOTIONS CLÉS

- Les nucléosomes aident à superenrouler l'ADN.
- La structure de l'ADN a suggéré un mécanisme de réplication de l'ADN.
- Les ADN-polymérase peuvent ajouter des nucléotides uniquement à l'extrémité 3' d'une amorce.
- La réplication de l'ADN est continue sur le brin directeur alors qu'elle ne l'est pas sur le brin discontinu.
- La réplication de l'ADN est réalisée par un système complexe d'enzymes.
- Certaines régions de l'ADN ne codent pas pour des protéines mais elles ont d'autres fonctions importantes.

2

APPLICATIONS ET COMPÉTENCES

- Application : la recherche sur la structure de l'ADN par diffraction des rayons X réalisée par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins.
- Application : l'utilisation des nucléotides contenant de l'acide didéoxyribonucléique pour interrompre la réplication de l'ADN en vue de la préparation d'échantillons pour séquençage de bases.
- Application : les séquences répétées en tandem sont utilisées dans le profilage de l'ADN.
- Compétence : l'analyse des résultats de l'expérience réalisée par Hershey et Chase ayant apporté des preuves que l'ADN constitue le matériel génétique.
- Compétence : l'utilisation d'un logiciel de visualisation moléculaire pour analyser l'association entre les protéines et l'ADN au sein d'un nucléosome.

3

QUEL EST LE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE?

- Milieu du 20^e siècle c'est compris qu'un matériel génétique est passé de génération à génération de manière systématique
- Pas claire quelle molécule y est responsable
- Matériel génétique = Protéine ou ADN?



4

L'EXPÉRIENCE HERSHEY-CHASE

- Alfred Hershey et Martha Chase: entreprit expérience afin de déterminer la molécule qui transmet le matériel génétique
- Se sont servi de bactéries *E. coli* et bactériophage

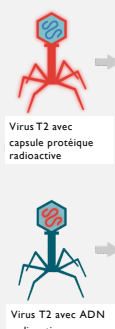


Martha Chase et Alfred Hershey

5

SUITE

1. Croissance de virus dans 2 cultures radioactives:
 1. Une solution radioactive phosphoreuse qui s'associe à l'ADN
 2. Une solution radioactive sulfureuse qui s'associe aux protéines



Virus T2 avec capsule protéique radioactive

Virus T2 avec ADN radioactive

6

SUITE

2. Les deux bactériophages radioactifs ont été permis d'infecter des cellules *E. coli*
 En infectant des bactéries, elles sont en mesure d'injecter leur matériel génétique dans ces cellules

7

SUITE

3. Les bactéries *E. coli* sont examinées ensuite pour voir s'il y a du matériel radioactif à l'intérieur

8

SUITE (À FAIRE AVEC LE GROUPE)

Milieu de croissance radioactive	résultats	interprétation
Soufre radioactif		
Phosphore radioactif		

9

STRUCTURE DE L'ADN

10

STRUCTURE DE L'ADN

- Ou s'associe la base azotée et le phosphate sur le Désoxyribose dans l'ADN
- Allons dessiner un diagramme du désoxyribose et ses carbones
- Comment numériser les carbones? Trouves l'Oxygène et vas au sens de l'horaire

11

STRUCTURE DE L'ADN

- Dessiner un double brin d'ADN en indiquant ses bouts 5' et 3'

12

STRUCTURE DE L'ADN

- Dessiner un double brin d'ADN en indiquant ses bouts 5' et 3'
- Liaisons entre phosphore et désoxyriboses
- Liaisons hydrogènes
- Brin antiparallèle

13

COMMENT UN BRIN D'ADN EST FAIT

- Monomères de nucléotides sont joints par condensation anabolique afin de former des longs brins (polymères)
- Nouveaux nucléotides toujours ajoutés dans le sens 5' à 3'

14

SUITE

- Forme «double hélice» de l'ADN
- Barreaux: bases azotées liées entre elles par liaisons d'hydrogène
- Montants: sucre et groupements phosphate en alternance, liées par liaisons covalentes

15

CONDENSATION DE L'ADN

- Cellules eucaryotes: on va retrouver l'ADN qui s'entoure sur des protéines nommées «histones»
- Dans un microscope électronique, ceci ressemble à des balles sur une ficelle
- Nucléosome = 8 «histones» entourées par l'ADN deux fois

16

CONDENSATION DE L'ADN

- Raisons de son compactage:
 1. Organisation de l'ADN: c'est une très longue molécule
 2. Régulation de l'expression des gènes: L'ADN qui est condensé n'est pas accessible aux enzymes de transcription, ces gènes ne sont pas lus et sont inactifs

17

CONDENSATION DE L'ADN

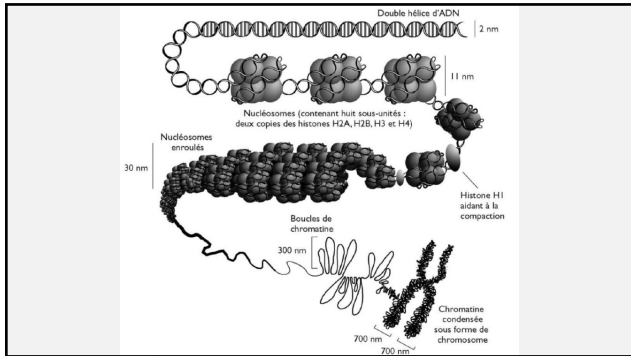
- Les ficelles de nucléosomes sont condensées davantage et s'entourent autour d'eux mêmes: le surenroulement de l'ADN
- Quand on dit que la chromatine se condense pour former des chromosomes lors de la prophase, ce qu'on veut dire est que les nucléosomes se sur-enroulent afin de former des chromosomes organisés et denses

18

CONDENSATION DE L'ADN

- Dessinons! Et légendons
- ADN, histones, nucléosomes, balles sur une ficelle, surenroulement, chromatine, chromosome/chromatide

19



20

TYPES DE SÉQUENCES D'ADN

- L'ADN entier d'un individu = génome
- Le génome humaine à plus de 3,000,000,000 paires de bases (A, T, G et C)
- Mais tous ces paires ne codent pas toutes pour des gènes
- Projet génome humain – trouvé seulement 2% de l'ADN code pour des protéines
- Et le reste?

21

ADN CODANT (EXOME)

- Définition: Séquences d'ADN qui sont transcrites et traduites en protéines
- Exome est constitué de d'exons
- Environ 2% du génome

22

ADN NON CODANT

- Introns
- Définition: parties d'un gène codant qui sont éliminés avant la traduction
- Ceci implique l'activité d'enzymes
- Fréquence: 24% du génome

23

ADN NON CODANT

- Séquences hautement répétées
- Définition: séquences d'ADN répétant un motif ou un patron
- N'a pas de fonction codante
- Fréquence: 45%

```

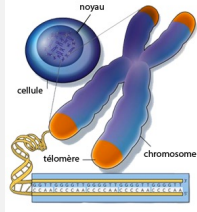
5'... CCGCTGGGCTCCGAGAGTCTGAGATTACAGGGGTGALACCACATGCTAGCGGTTAGCTCCCA
CTTATGAGTGGAGACAGGTTATTTTGGTTTTGCAATCTCGAGTACTTCTACCCAGATTTGTGT
CTCCATCTCTATCCGAGGCTCTCCGALTCGACATATTCATCTCTTTTATGGCTTAGTAGTATT
CCATCTGTATATATACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATGACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CACACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CATATATATATATATACACACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TATATACACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TATATATATATATACACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATACATATATATATATACACATATACATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TAGACATATATATATACACATATACACATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CACAGGCTGGAGTCCAGTGTGTGATCTTGGCTCACCGAACCTCTGTCTGCGGTTGAGCT
ATTCCTCTGCTTACGCTCTCGAGTACGCTGGGATTACAGGTCTCCACACACATCCGACCTATT
TTGTATTTTTACATGTTGGGAGATATATTCCTATCTCGAACCTCGGATGCTGCTGCTGCTG
GGTCCCAATGGGATTCGAGGATCGAGGATCGAGGATCGAGGATCGAGGATCGAGGATCGAGGAT
CCACTTGTATGATGGGATTTTGTGTGAAGAGATCATCTCTGTTTTTTCTCCCTGAAAG...3
    
```

← CCTTTTATGCTAAGTATGATTCATCT →
Amorces

24

ADN NON CODANT

- ADN structurale
- Définition: Section non codant de l'ADN retrouvé au centrosome et aux télomères du chromosome.
- Fréquence: 20%



25

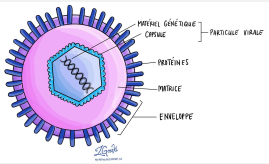
ADN NON CODANT

- Gènes inactifs
- Définition: section de l'ADN qui était codant (transcription et traduction), mais qui ont été mutées au point qu'elles ne sont plus fonctionnelles
- Aussi appelées pseudogènes
- Fréquence: 2%
- Ex) gène codant pour la Vitamine C présent chez plusieurs mammifères, mais absent chez les primates

26

AUTRE

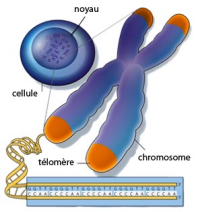
- Définition: ADN dont on ne connaît pas la fonction
- Pourrait être de l'ADN virale
- Fréquence 7-8%



27

TÉLOMÈRE

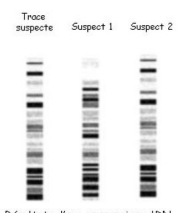
- Les bouts des chromosomes sont faits de télomères
- Ils protègent les chromosomes lors de la mitose
- Nous sommes en mesure d'estimer l'âge d'un individu en étudiant la taille des télomères de leur ADN. Les télomères se raccourcissent après multiples réplifications.



28

EMPREINTE GÉNÉTIQUE

- Avoir la séquence l'ADN spécifique d'un individu
- Répétitions en tandem courtes (Microsatellites):
 - Par exemple :ATTGATTCGATTCG contient trois répétitions en tandem du motif de cinq nucléotides ATTCG.
- Utile pour l'identification d'un suspect, test de paternité, généalogie, etc.



Résultats d'une comparaison ADN

29

SUITE

- La plupart de l'ADN des humains sont identiques
- Cependant, il y a certaines régions de l'ADN qui ont beaucoup de variation
- Les régions du génome avec ces grandes variation d'une personne à l'autre se nomment polymorphismes

30

RÉPÉTITIONS EN TANDEM ET L'EMPREINTE GÉNÉTIQUE

- Comment est-ce qu'on utilise ces parties du génome?
- 1. dans les régions polymorphiques, on ajoute des enzymes qui coupent les séquences répétitives (microsatellites)
- 2. certaines personnes ont plus de répétitions que d'autres, alors les sections sont coupées à différentes longueurs
- 3. Les segments sont envoyés dans un gel d'électrophorèse et analysés

Répétition en tandem

Gène 10 Gène 12 Gène

Gène 14 Gène 7 Gène

Gène 5 Gène 10 Gène

Trace suspecte Suspect 1 Suspect 2

Résultats d'une comparaison ADN

31

LA RÉPLICATION DE L'ADN

- Elle est semi conservatrice: Il y a une enzyme qui coupe le double brin original, une autre enzyme va répliquer la copie de l'ADN original et maintenant on a deux brins d'ADN avec chacune une partie du brin original

32

RÉPLICATION D'ADN

- Expérience de Meselson et Stahl avec Bactérie E. coli
- 1. Croire des bactéries dans l'azote dans un isotope lourd (N15)
- 2. Ils ont ensuite fait reproduire ces bactéries dans une solution d'isotopes d'Azote léger (N14)
- 3. Analyser l'ADN qui en résulte dans une solution pour voir ce qui ira dans le fond de la solution et ce qui flottera sur le dessus
- 4. Les bases azotées sont attirées ensemble car les purines et pyrimidines ont des charges opposées

33

Question: Selon quel modèle (conservatif, semi-conservatif, dispersif) se fait la réplication ?

Méthode

(a) culture de bactéries pendant de nombreux cycles sur milieu avec ¹⁵N

(b) transfert sur milieu ¹⁴N pour une division cellulaire

(c) une division sur milieu ¹⁴N

centrifugation centrifugation centrifugation

Résultats

ADN des bactéries cultivées sur milieu ¹⁵N apparaissant selon 1 seule bande

Après 1 réplication, l'ADN correspond à une bande d'ADN de densité intermédiaire

Après la 2e réplication, apparaissent 2 bandes: une d'ADN intermédiaire et une d'ADN léger

ADN léger
ADN intermédiaire
ADN lourd

ADN initial → brin parental / brin néoformé

Conclusion: La réplication se fait selon un mode semi-conservatif. *N. Tchenier*

34

RÉPLICATION D'ADN

- ADN Topoisomérase = Enlève les supertours de l'ADN pour l'avoir en brins individuel (monocaténares)
- Protéine de liaison à l'ADN simple brin = Tiens les brins en place pour pas qu'ils s'enroulent à nouveau
- Hélicase = Brise les liaisons hydrogènes entre les deux brins
- Polymérase = places les bases azotées appropriées sur les brins

35

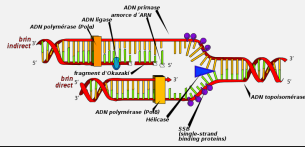
RÉPLICATION ADN

- Un des brins est appelé brin précoce (ou direct) et l'autre brin tardif (ou indirect)
- Polymérase 3: ajoute seulement nucléotides dans la direction 5'-3'; ce qui veut dire un brin vas être simple et l'autre attaché en parties discontinues

36

RÉPLICATION ADN

- sur le brin direct, polymérase 3 ajoute nucléotides dans la direction 5'-3' pour assemblé un nouveau brin complémentaire
- Brin principale vas dans direction 3' vers 5' donc comme le polymérase construit dans l'autre direction (5' vers 3'), elle construit le brin dans le sens opposé.

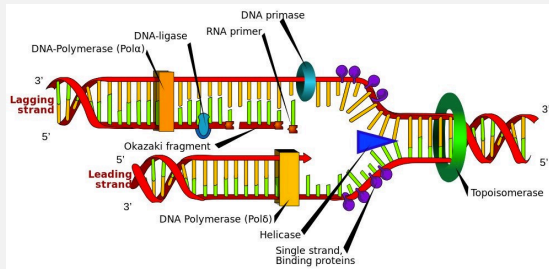


37

RÉPLICATION ADN

- brin tardif (ou brin indirect) : comme ce brin va dans la direction 5' vers 3', la synthèse est plus complexe
- L'ADN primase ajoute une amorce (RNA primer) au brin discontinue, pour dire à la polymérase 3 ou commencer la synthèse
- ADN polymérase 3 ajoute 5-10 nucléotide (fragments d'Okazaki) à partir de l'amorce. l'ADN polymérase 3 s'avance et ajoute un autre fragment Okazaki partout où il trouve des amorces.
- ADN polymérase 1 enlève amorce et remplace avec le nucléotide qui devrait y être.
- Ligase attache les fragments Okazaki ensemble, car elles sont séparées après le passage des deux polymérases.

38

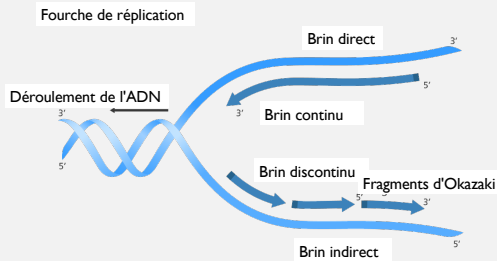


39

RÉPLICATION ADN (RÉSUMÉ JUSQU'À PRÉSENT)

- brin continue: la polymérase 3 ajoute simplement les nucléotides dans une façon continue
- brin discontinue: La réplication est discontinue et séparée en fragments d'Okazaki

40



41

RÉPLICATION D'ADN: ÉNERGIE

Pour examen BI: parler du besoin d'énergie et enzymes

- Quand les nucléotides sont ajoutés, la réaction de condensation (processus anabolique: construction d'une grande molécule à partir de plus petit) requiert de l'énergie
- les 'nucléotides' qui sont ajoutés ne sont pas vraiment des nucléotides: ils sont des dNTP (désoxyribonucléoside triphosphate). Ils sont différents des nucléotides réguliers car ils ont des phosphates extra.
- Quand le dNTP est ajouté par la polymérase 3, les 2 des phosphates sont séparés du groupement phosphate, ceci relâche assez d'énergie pour entamer la réaction anabolique (donc pas besoin d'ATP, c'est comme son propre ATP)

42

RÉPLICATION ADN: FONCTIONS

- ADN Topoisomérase: déroule le double hélix
- Hélicase: sépare les deux brins en brisant les liaisons d'hydrogène
- Primase: place l'amorce pour signaler ou débuté la synthèse de la polymérase
- Polymérase 3: construit les brins des nucléotides dans la direction 5'-3'
- Polymérase 1: remplace l'amorce avec nucléotides
- Ligase: lie les fragments Okazaki ensemble

43

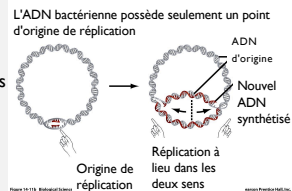
RÉPLICATION ADN: VITESSE ET EFFICACITÉ

- La réplication se fait rapidement: 4000 nucléotides par secondes
- avoir plus d'enzymes et d'NTP molécule accessible augmente rapidité
- Procaryotes fait encore plus rapidement (peuvent se diviser à chaque 20 minutes)

44

SUITE

Chez les procaryotes, leur ADN est circulaire.
Ainsi, la réplication peut avoir lieu des deux sens afin jusqu'à ce que le brin entier soit répliqué.
Le lieu de début de réplication est nommée fourche de réplication



45

SUITE

- Les erreurs dans la réplication ne sont pas toujours importantes
 - Cependant, une erreur peut être désastreuse
 - Comment est-ce qu'on assure la précision lors de la réplication (qui se fait très rapidement)?
1. Le brin parental (1/2 du brin original) possède des bases azotées, facilitant la tâche car ceci sert de matrice pour le nouveau brin formé (brin néoformé)
 2. Les cellules ont des enzymes réparatrices qui détectent et corrigent des erreurs de réplication

46

LA RÉPLICATION, LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN ET LE PROJET DU GÉNOME HUMAIN

- Projet de collaboration internationale: but de séquencer le génome entier de l'humaine
- Pour faire ceci, ils ont eu besoin de beaucoup d'ADN
- Comment faire ceci? L'ACP (PCR)

47

L'amplification en chaîne (ACP)

- Connue aussi sous le nom anglais *Polymerase Chain Reaction (PCR)*
- Permet de multiplier, *in vitro*, une séquence d'ADN en milliers de copies.
 - Très utile en identification judiciaire où l'échantillon d'ADN est souvent restreint.

48

- L'amplification consiste à répéter plusieurs fois un cycle de manipulation robotisé qui multiplie par deux le nombre de copies d'ADN.
- Est une solution de :
 - ADN à amplifier
 - Enzyme ADN polymérase supportant les hautes températures
 - Nucléotides (ATGC)
 - Amorces spécifiques

49

- Étapes du cycle :
 - Dénaturation de l'ADN
 - Séparation des brins en chauffant la solution

Le principe de l'amplification en chaîne repose sur la facilité de l'ADN de passer de l'état bicaténaire à l'état monocaténaire selon la température comme on peut le voir dans le graphique.

Proportion d'ADN monocaténaire dans une solution d'ADN à différentes températures

Température / °C	Proportion d'ADN monocaténaire / %
0	0
10	0
20	0
30	0
40	0
50	0
60	0
70	0
80	0
90	10
95	100
100	100
110	100

50

- Étapes du cycle :
 - Hybridation
 - Des amorces complémentaires s'associent aux brins monocaténaires.
 - Élongation
 - Les nouveaux brins d'ADN sont créés par l'ADN polymérase qui ajoute les nucléotides complémentaires.

51

LA MÉTHODE SANGER

- 3 milliards de paires de bases dans le génome humain, comment on a découvert ceci?
- La méthode Sanger
 1. Des brins d'ADN monocaténaires (produits de l'ACP) sont placés dans 4 différents tubes, chacun avec des dNTPs, des enzymes et des amorces.
 2. Dans chacune des tubes, on ajoute ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP)
 - Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation car ils ne possèdent pas d'extrémité 3'-OH (seulement un hydrogène à la place du groupement hydroxyle).

52

SUITE

3. La réplication de l'ADN débute, cependant n'importe qu'un ddNTP est inséré dans le nouveau brin (au lieu d'une dNTP normale), le processus de réplication termine et le brin est coupé court.

Incunable de former une liaison

Terminer la synthèse de la molécule d'ADN

53

SUITE

Longueur du fragment

- 4. Les brins de différentes longueurs sont placés dans une électrophorèse
- 5. Où migrent les bandes nous indique la longueur des fragments d'ADN, et si on ajoute tous les bandes de différents fragments d'ADN, on peut déduire la taille du génome (cette méthode est vieille et longue et est maintenant dépassée par d'autres méthodes plus efficaces)

54

NATURE DES SCIENCES

- Une fois que Watson et Crick ont publié leur modèle de l'ADN, plusieurs autres découvertes scientifiques ont suivi (grand accomplissement dans le monde scientifique)
- Cependant, ils ont aussi réalisé leurs découvertes à l'aide des découvertes d'autres scientifiques: Franklin et Wilkins
- Rosalind Franklin et Maurice Wilkins ont utilisé les rayons X afin de déterminer: la forme «double hélice» de l'ADN, comment loin des brins sont les uns des autres et le diamètre total de la molécule
- Watson et Crick n'ont pas donné le crédit à ces scientifiques

