

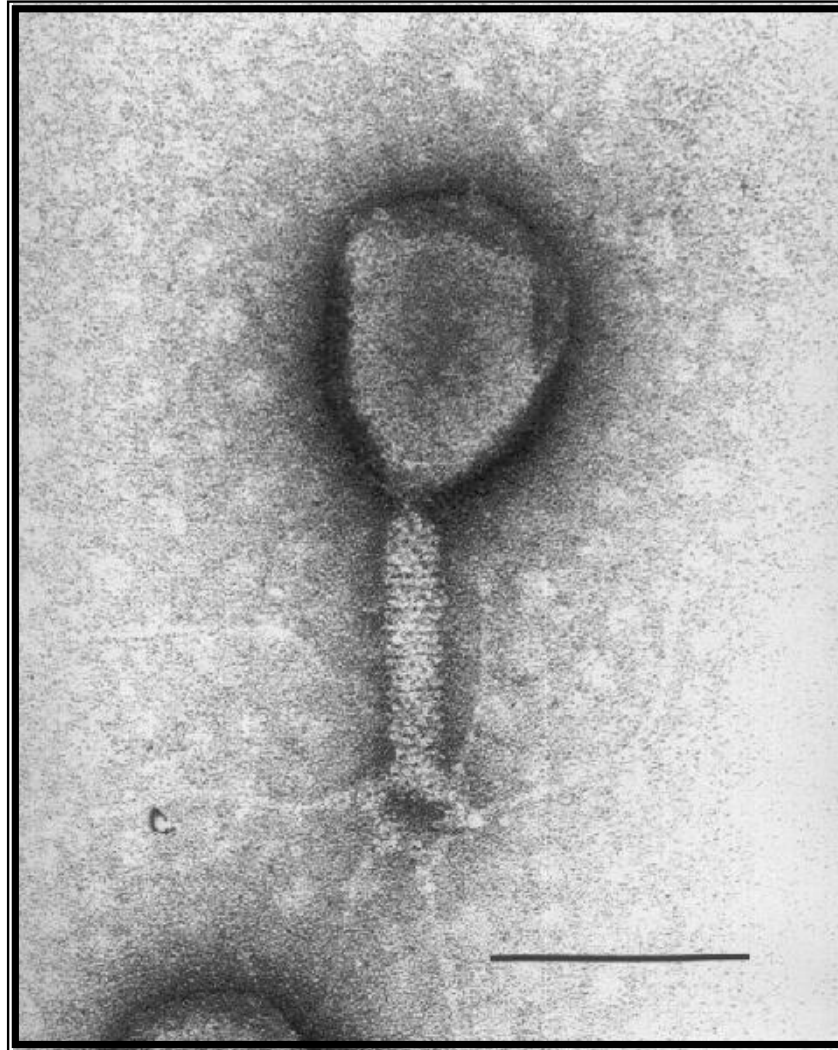
# **Travaux dirigés de Biologie Moléculaire**

## **5**

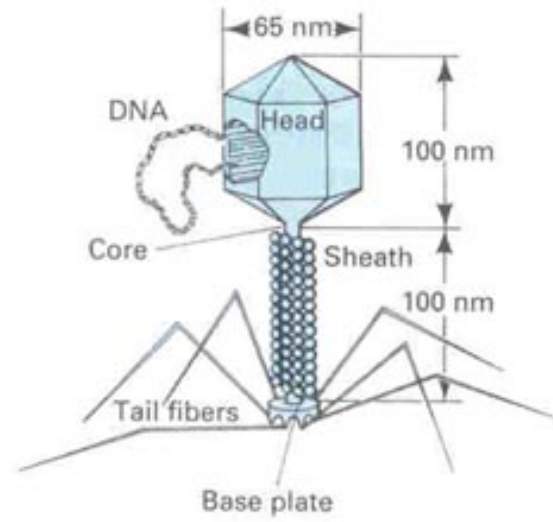
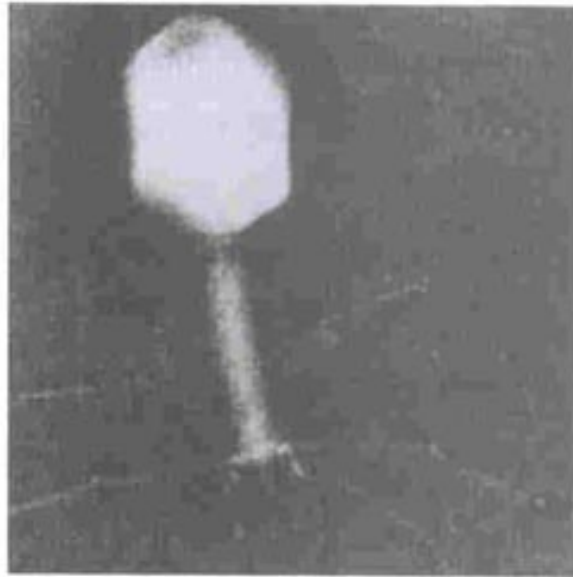
(semaine 7)

## Exercice 14 : Phage $\lambda$ : microscopie électronique

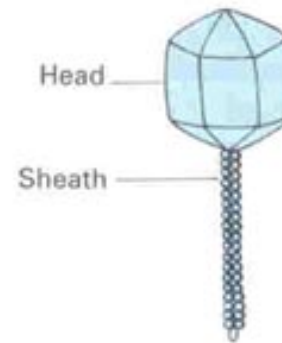
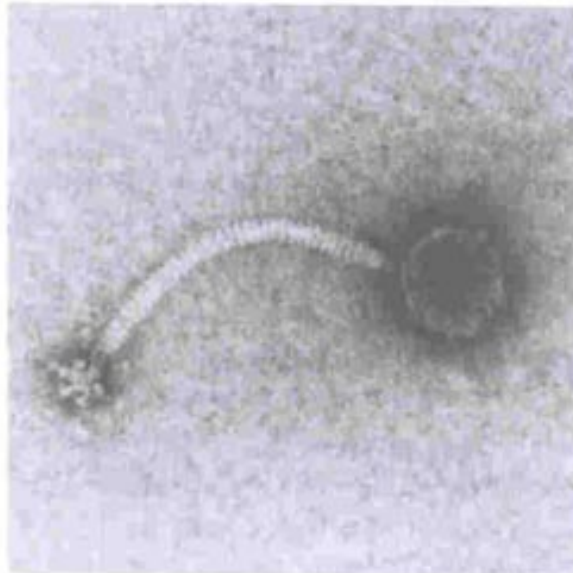
---



a) T4 phage

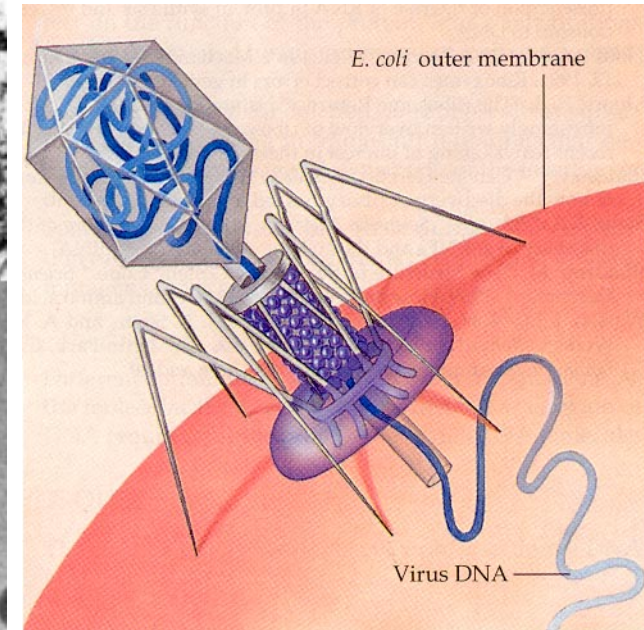
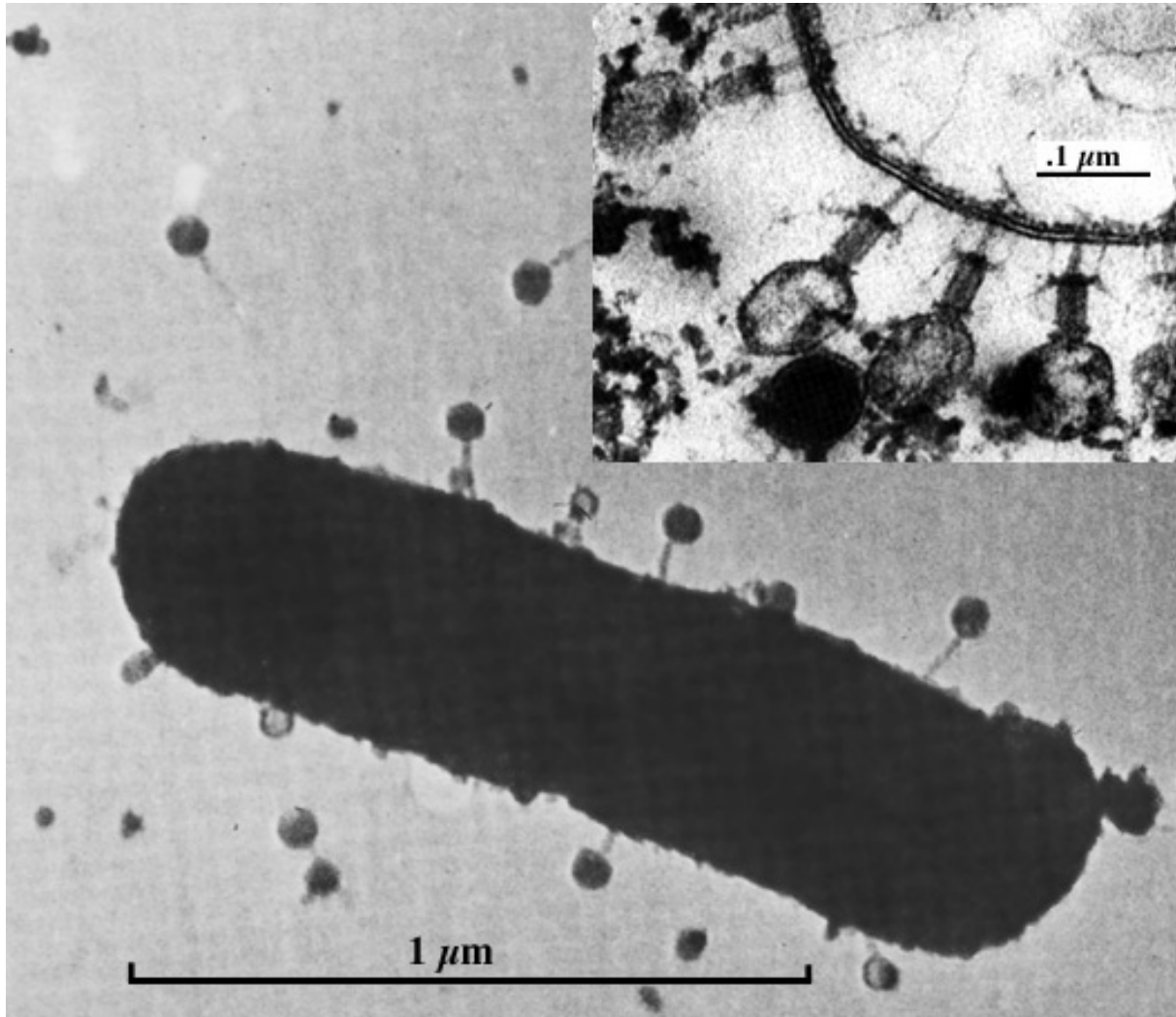


b)  $\lambda$  phage



Bactériophage T5 attaquant une bactérie *E. coli*.

En haut, à dte : bactériophage T4 injectant son ADN dans *E. coli*.



## Les ADN POLYMÉRASES

**nécessitent**

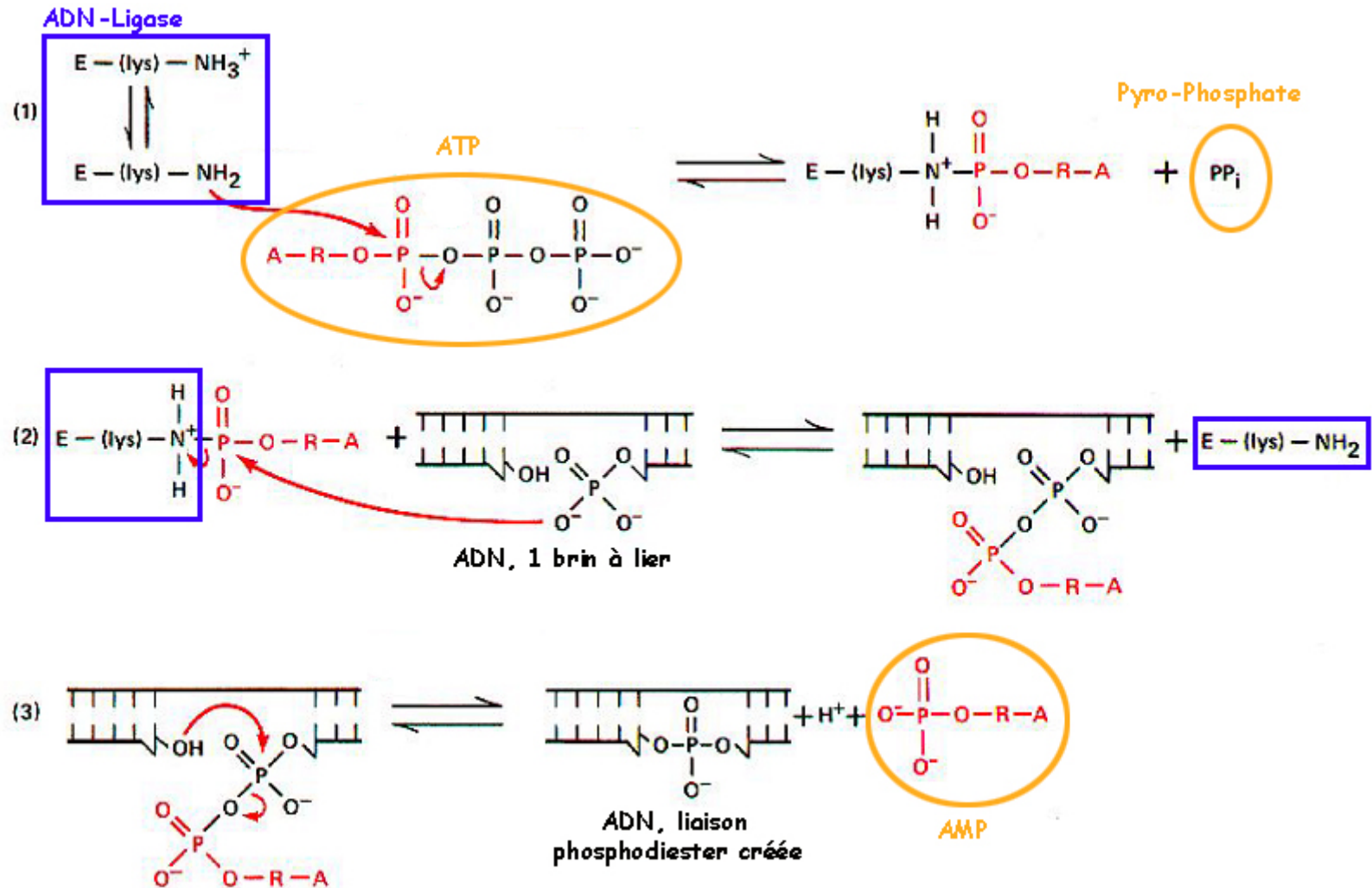
- un brin d'ADN matrice
- une amorce oligonucléotidique

**réalisent**

- une synthèse du brin nouveau 5' vers 3'

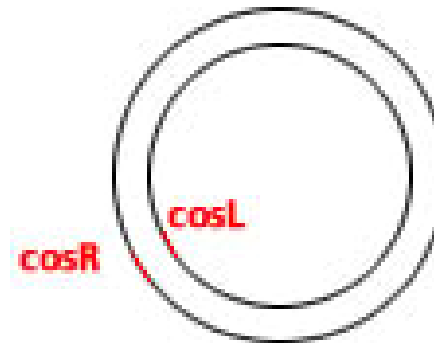
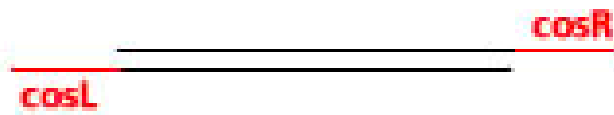


# ADN ligase

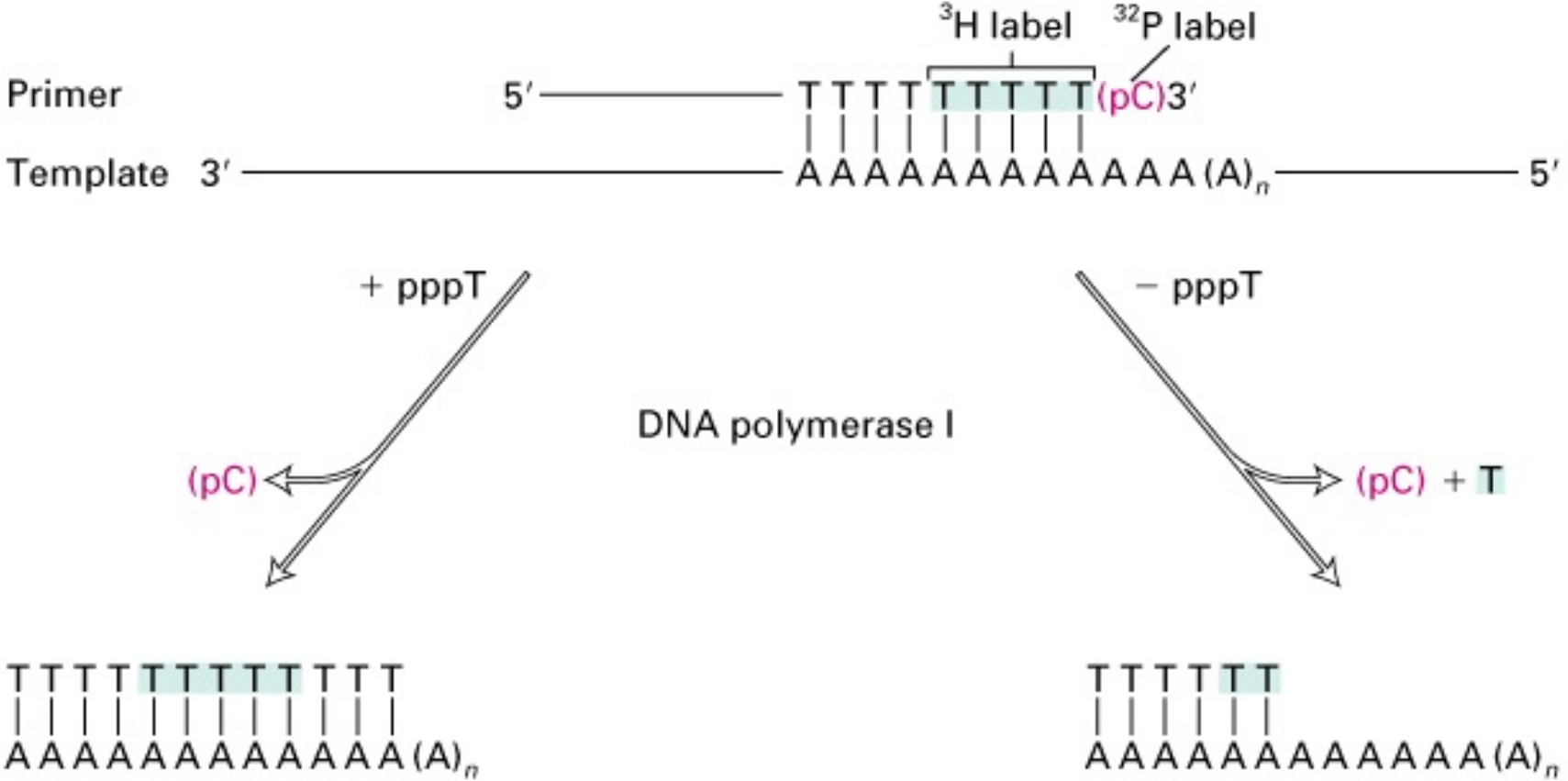


# Phage $\lambda$ : organisation du génome

---

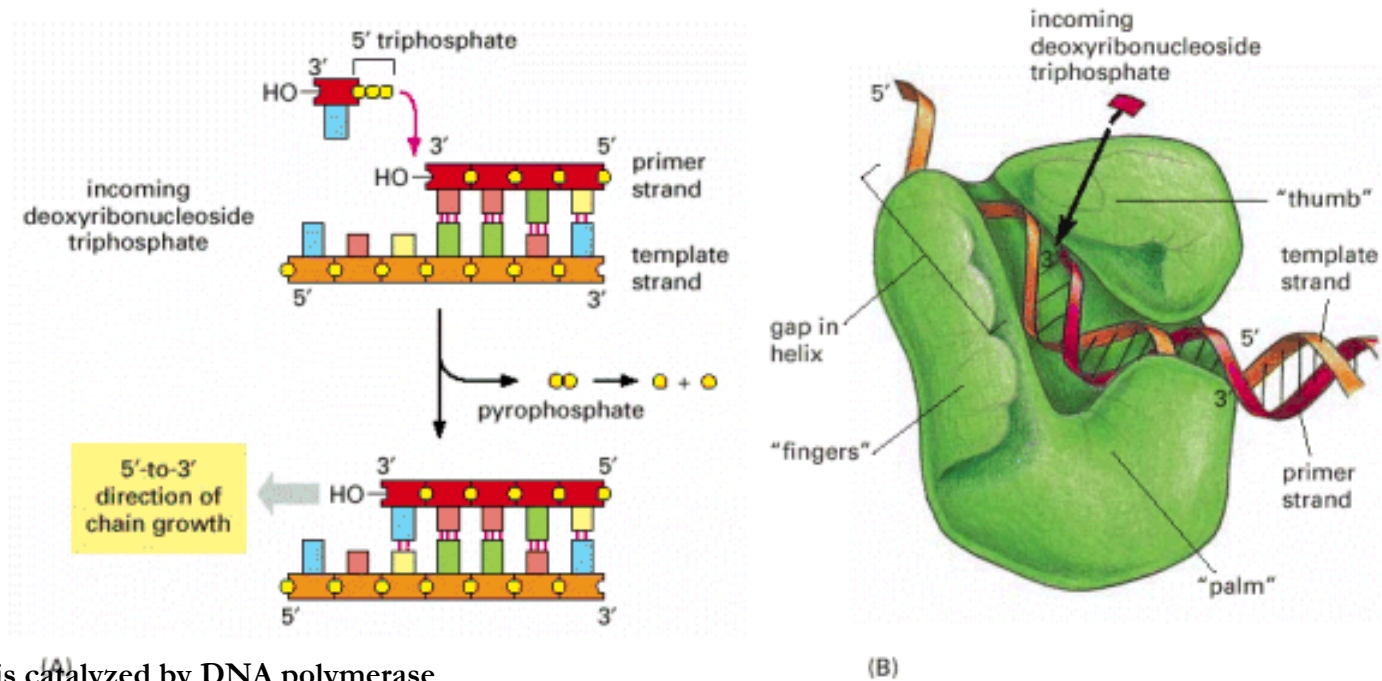


# Exercise 15





## lier type de réaction catalysée par l'ADN pol I : synthèse d'ADN



### DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase.

(A) As indicated, DNA polymerase catalyzes the stepwise addition of a deoxyribonucleotide to the 3'-OH end of a polynucleotide chain, the *primer strand*, that is paired to a second *template strand*. The newly synthesized DNA strand therefore **polymerizes in the 5'-to-3' direction**.

Because each incoming deoxyribonucleoside triphosphate must pair with the template strand to be recognized by the DNA polymerase, this strand determines which of the four possible deoxyribonucleotides (A, C, G, or T) will be added. The reaction is driven by a large, favorable free-energy change, caused by the release of pyrophosphate and its subsequent hydrolysis to two molecules of inorganic phosphate.

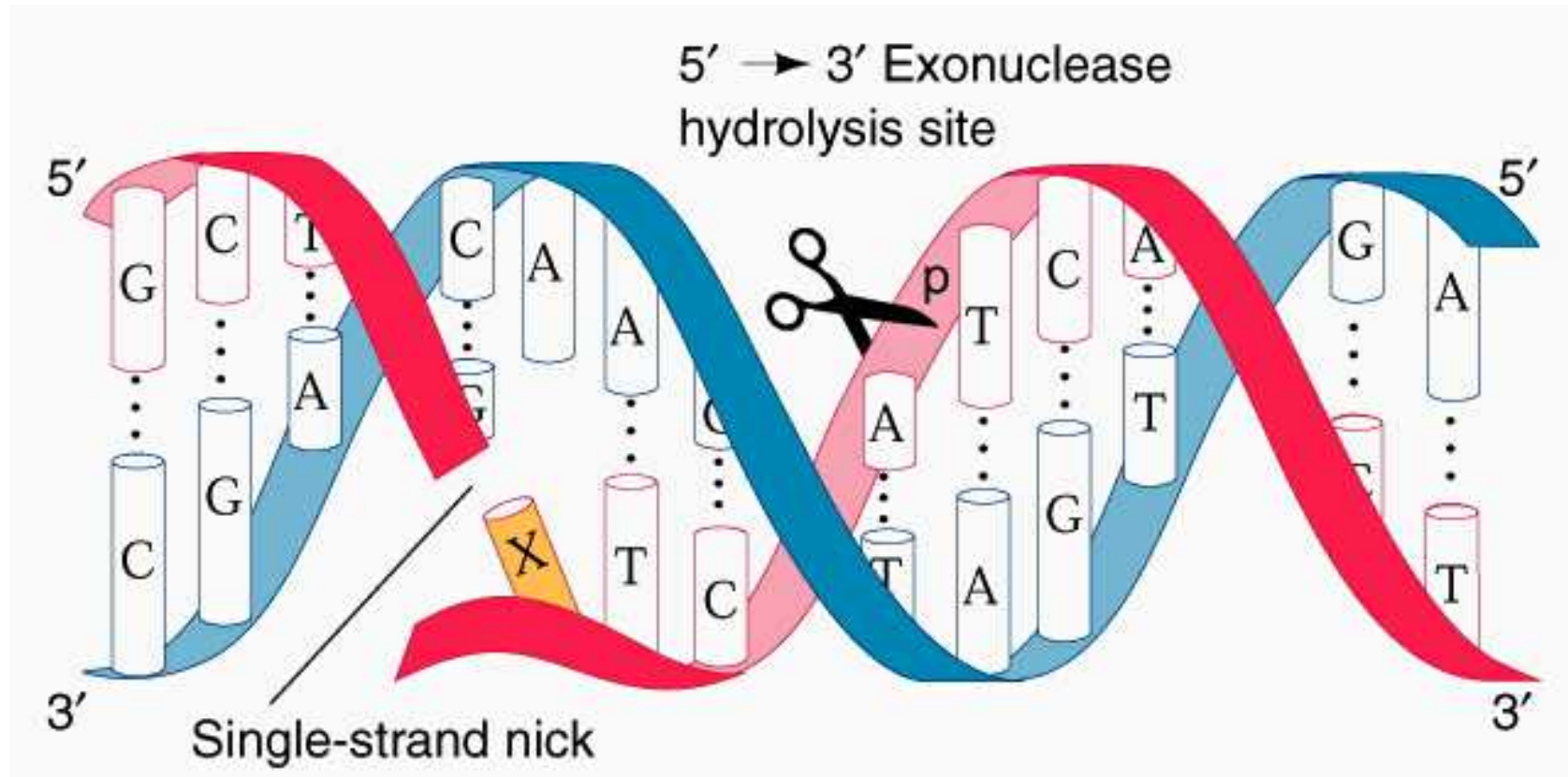
(B) The structure of an *E. coli* DNA polymerase molecule, as determined by x-ray crystallography. Roughly speaking, it resembles a right hand in which the palm, fingers, and thumb grasp the DNA.

This drawing illustrates a DNA polymerase that functions during DNA repair, but the enzymes that replicate DNA have similar features.

(L.S. Beese, V. Derbyshire, and T.A. Steitz, *Science* 260:352–355, 1993.)

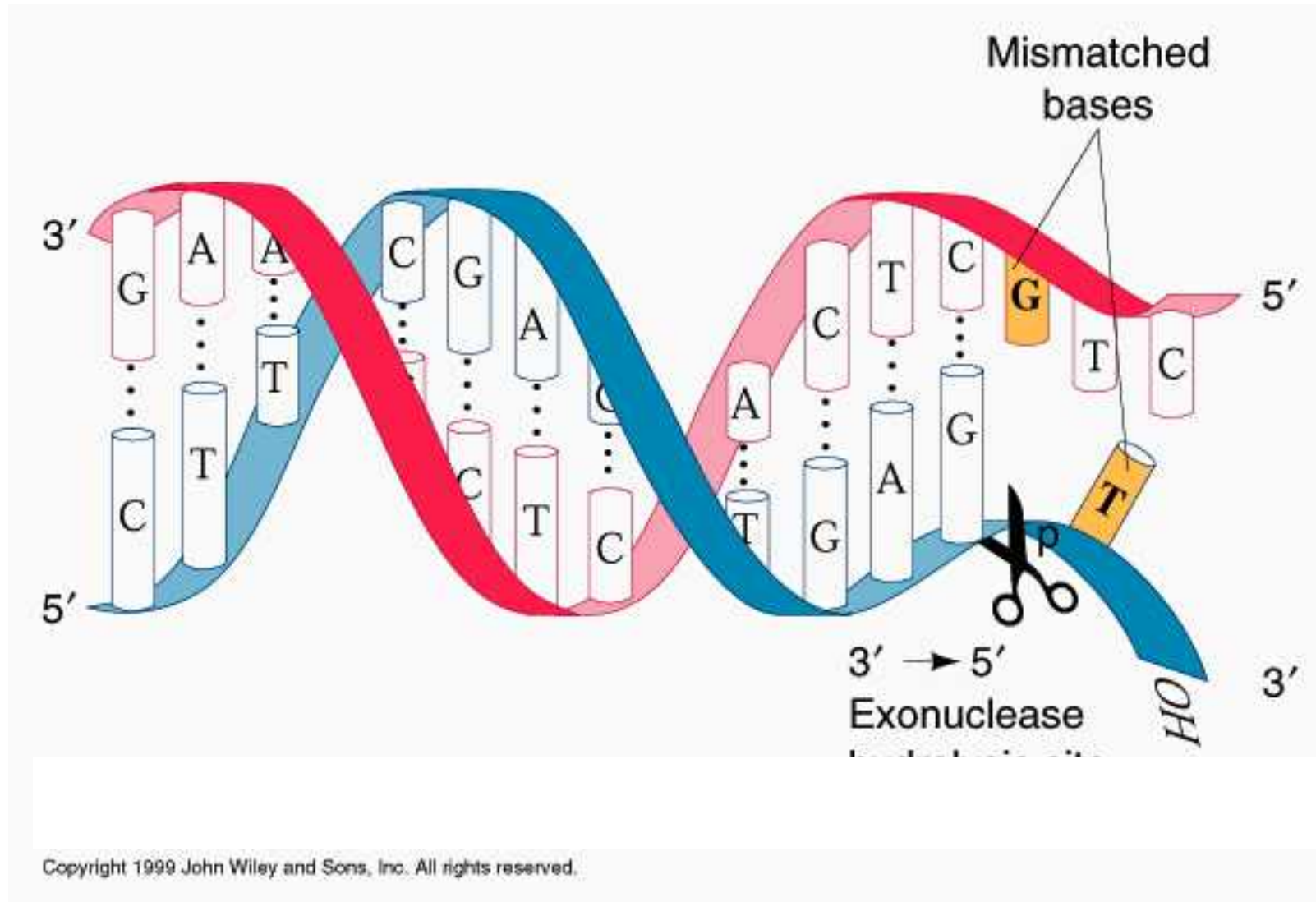
## 2ème type de réaction catalysée par l'ADN pol I : Exonucléase

Correction de l'ADN pol I : activité 5'-3' exonucléase



## 2ème type de réaction catalysée par l'ADN pol I : Exonucléase

Correction de l'ADN pol I : activité 3'-5' exonucléase



## Exercice 16

---

Un grand nombre de mutants **thermosensibles** ont été isolés chez *E. coli*. La réplication de l'ADN chez ces bactéries mutantes est **défectueuse à 42°C mais pas à 30°C**.

Ces mutants présentent 2 types de comportements caractéristiques aboutissant chacun à la cessation de la synthèse d'ADN, quand la température du milieu est élevée de 30 à 42°C. Les mutants '**quick stop**' cessent immédiatement toute synthèse d'ADN, alors que les mutants '**slow stop**' ne cessent la synthèse qu'après plusieurs minutes.

*déterminer, parmi les protéines suivantes, dans le cas où elles seraient thermosensibles, celles qui donneraient un phénotype 'quick stop' et celles qui donneraient un phénotype 'slow stop' ; expliquez dans chaque cas le choix effectué .*

*topo I*

*dnaA*

*SSB*

*Hélicase*

*Primase*

*Ligase*

## Exercice 16

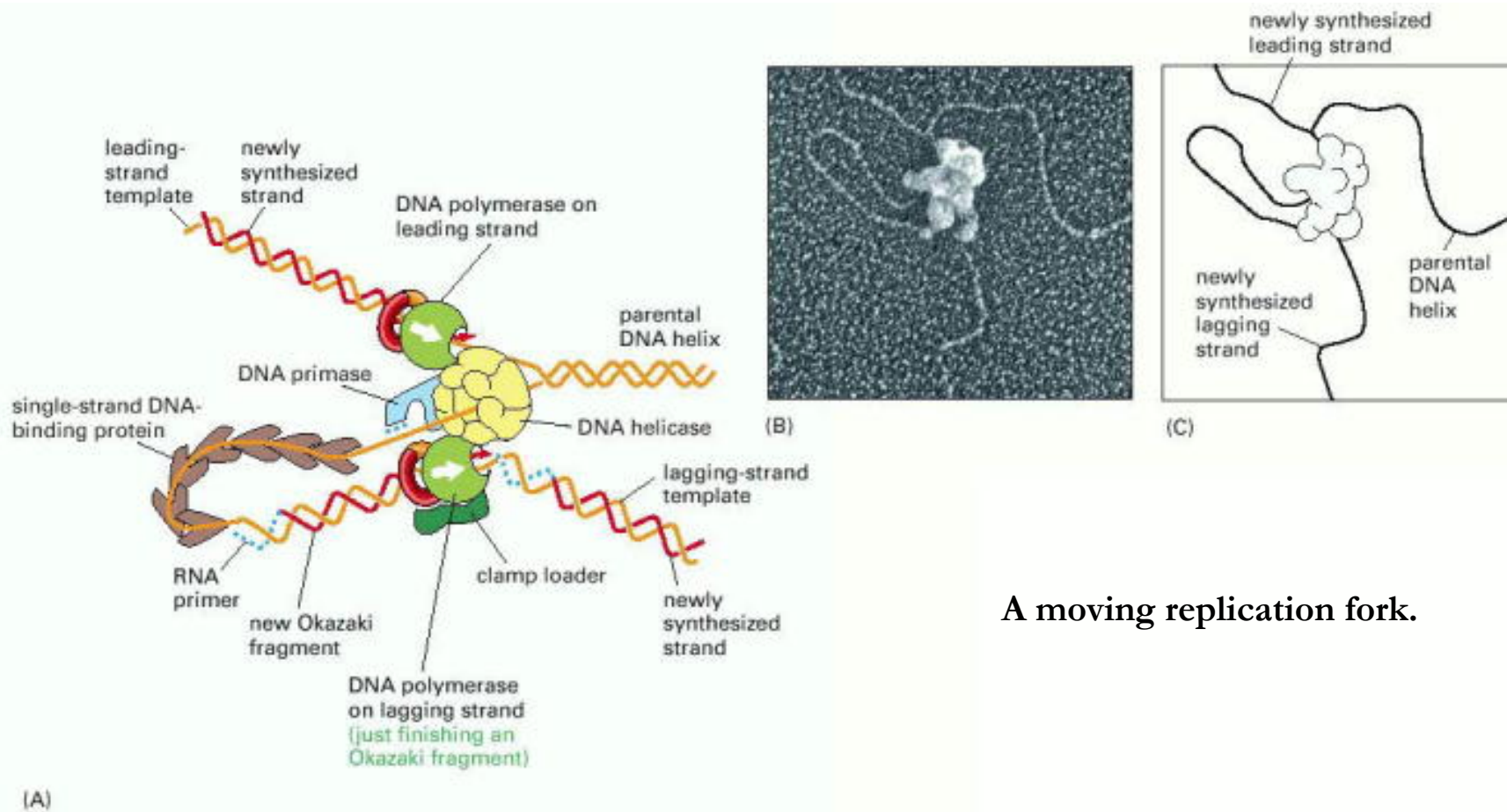
---

*phénotype 'quick stop' :*

mutants thermosensibles de la topo I, des SSB, de l'hélicase et de la primase

*phénotype 'slow stop' :*

ADN ligase, DnaA



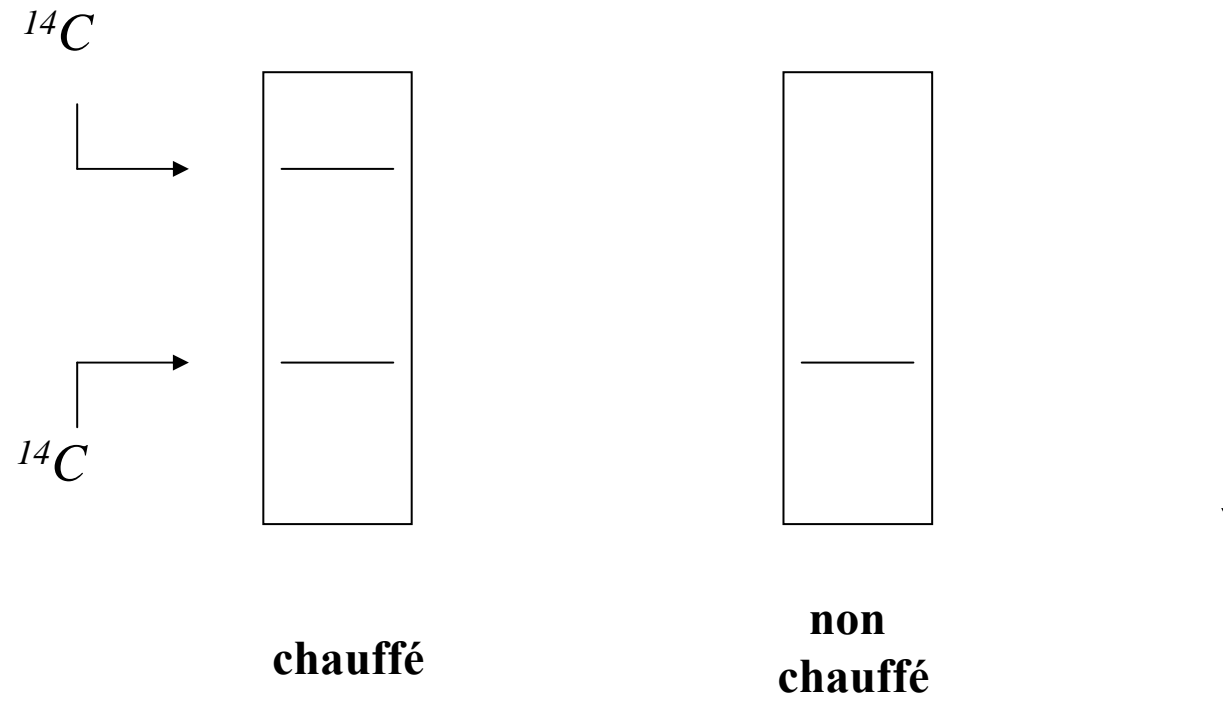
### A moving replication fork.

(A)

(A) This schematic diagram shows a current view of the **arrangement of replication proteins at a replication fork when the fork is moving**. The diagram has been altered by folding the DNA on the lagging strand to bring the lagging-strand DNA polymerase molecule into a complex with the leading-strand DNA polymerase molecule. This folding process also brings the 3' end of each completed Okazaki fragment close to the start site for the next Okazaki fragment. Because the lagging-strand DNA polymerase molecule remains bound to the rest of the replication proteins, it can be reused to synthesize successive Okazaki fragments. In this diagram, it is about to let go of its completed DNA fragment and move to the RNA primer that will be synthesized nearby, as required to start the next DNA fragment. Note that one daughter DNA helix extends toward the bottom right and the other toward the top left in this diagram. Additional proteins help to hold the different protein components of the fork together, enabling them to function as a well-coordinated protein machine. The actual protein complex is more compact than indicated, and the clamp loader is held in place by interactions not shown here. (B) **An electron micrograph** showing the **replication machine from the bacteriophage T4** as it moves along a template synthesizing DNA behind it. (C) An interpretation of the micrograph is given in the sketch: note especially the DNA loop on the lagging strand. Apparently, the replication proteins became partly detached from the very front of the replication fork during the preparation of this sample for electron microscopy.

## Exercice 17

---



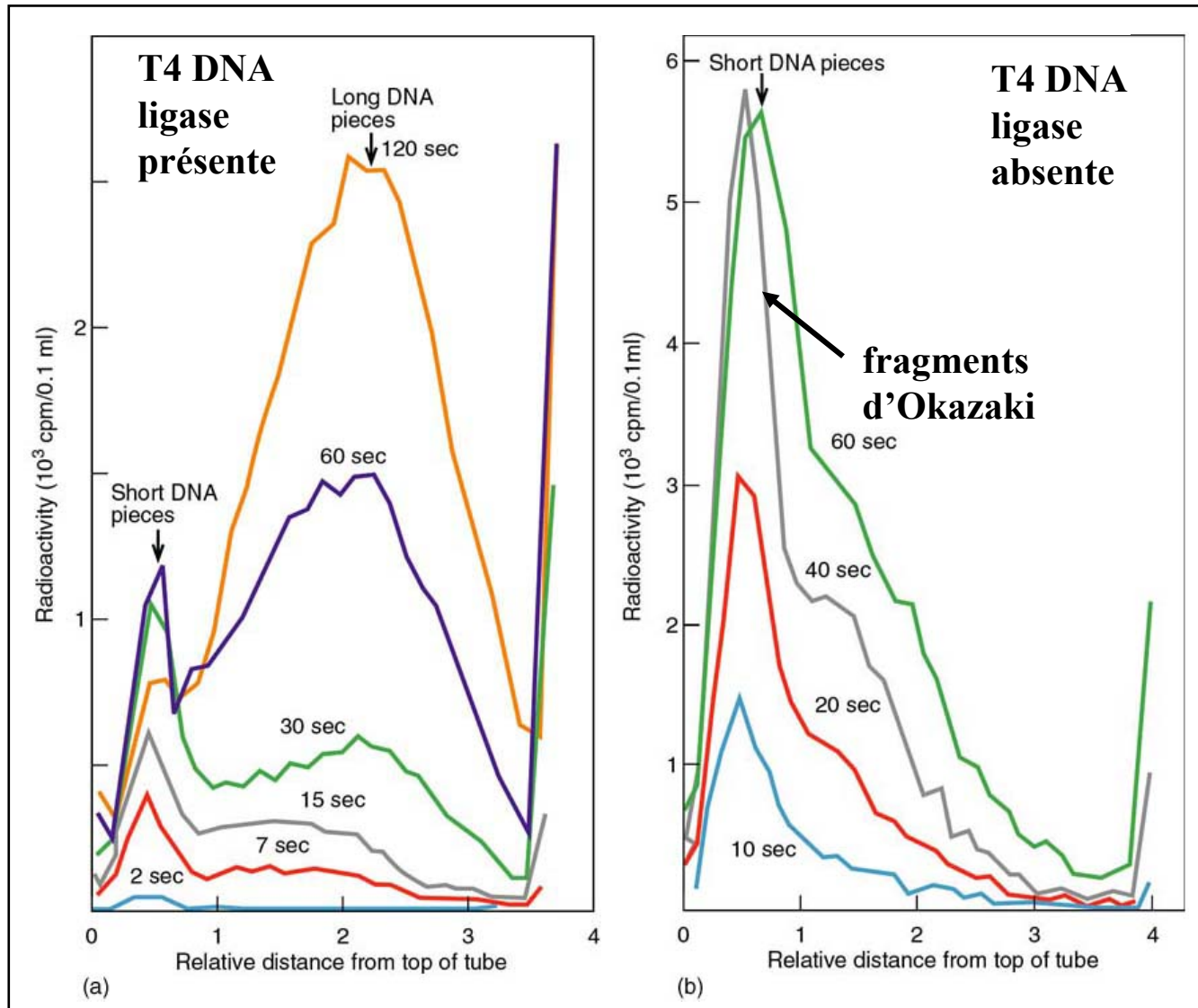
- \* En conditions physiologiques,
  - les fragments d'Okazaki sont de petites tailles; ils sont appariés au brin matrice.
- \* La chaleur dénature l'ADN.

**Quand il n'y a pas traitement par la chaleur,**  
les fragments d'Okazaki demeurent appariés au brin d'ADN parental; l'ensemble forme une structure dense et de grande taille, se positionnant au fond du tube.

**Quand il y a chauffage,**  
les brins sont séparés  
les fragments d'Okazaki, de petites tailles, ne sont plus hybridés à la matrice; la centrifugation fait apparaître une bande peu dense, plus haut dans le tube.



## Démonstration expérimentale des fragments d'Okazaki par marquage et ultracentrifugation



L'ADN du phage T4 est marqué brièvement puis séparé selon sa taille par ultracentrifugation.

L'absence d'ADN ligase fait s'accumuler de courts segments d'ADN.

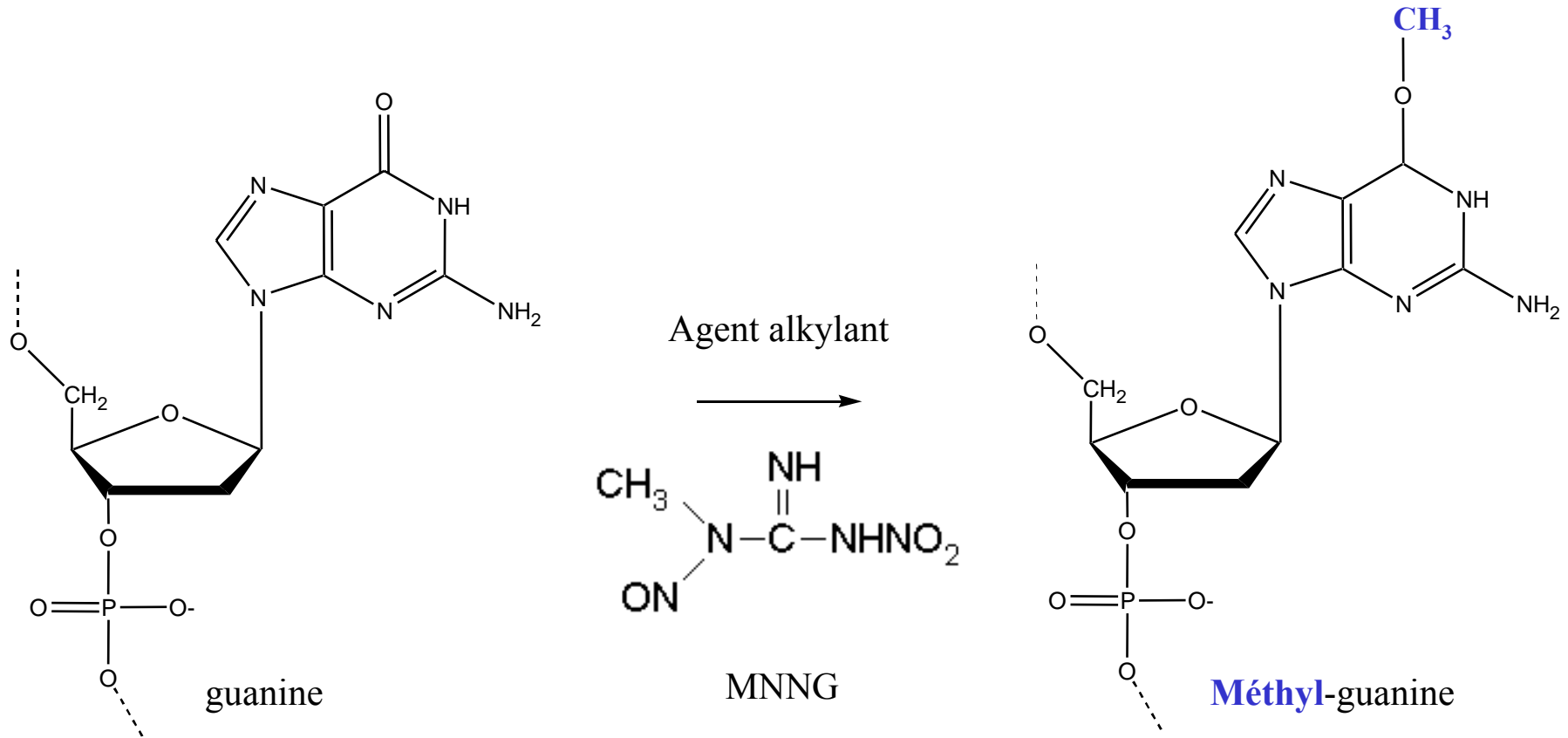
## Exercice n° 18 : Alkylation

**Table 1-6** Relative proportions of alkylated bases present in DNA after reaction with carcinogenic alkylating agents

Adduct	% of total alkylation after reaction with:		
	Dimethyl-nitrosamine, <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosoourea, 1,2-dimethylhydrazine	Methyl methane-sulfonate	Diethylnitrosamine, <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosoourea
<i>N</i> <sup>1</sup> -Alkyladenine	0.7	1.2	0.3
<i>N</i> <sup>3</sup> -Alkyladenine	8	11	4
<i>N</i> <sup>7</sup> -Alkyladenine	1.5	1.9	0.4
<i>N</i> <sup>3</sup> -Alkylguanine	0.8	0.7	0.6
<i>N</i> <sup>7</sup> -Alkylguanine	68	83	12
<i>O</i> <sup>6</sup> -Alkylguanine	7.5	0.3	8
<i>N</i> <sup>3</sup> -Alkylcytosine	0.5		0.2
<i>O</i> <sup>2</sup> -Alkylcytosine	0.1		3
<i>N</i> <sup>3</sup> -Alkylthymine	0.3		0.8
<i>O</i> <sup>2</sup> -Alkylthymine	0.1		7
<i>O</i> <sup>4</sup> -Alkylthymine	0.1-0.7		1-4
Alkylphosphates	12	1	53

Source: After Pegg (307).

# Exercice n° 18 : Alkylation



**conséquence**

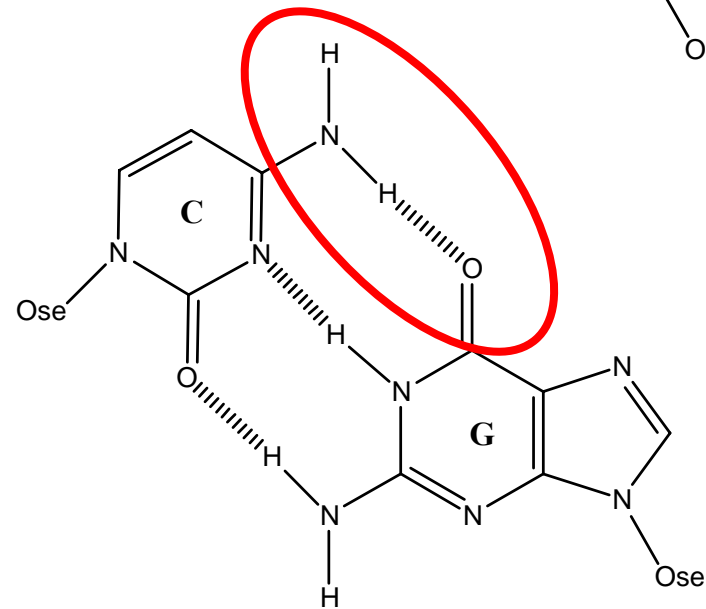
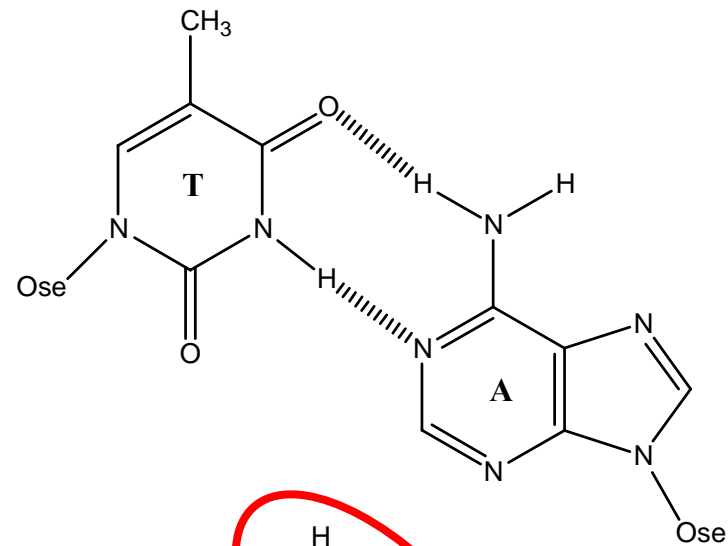
Le groupement méthyl déforme la double hélice

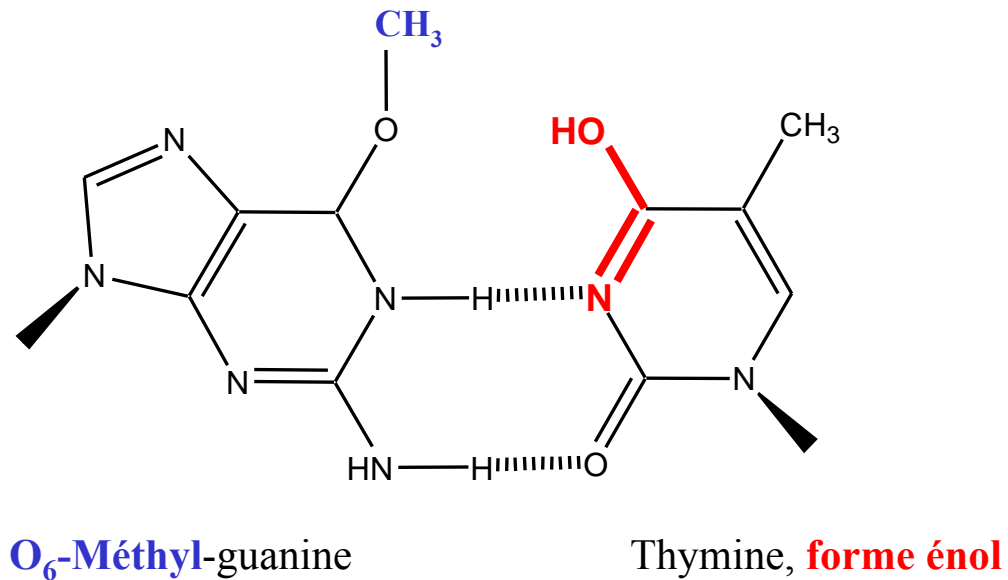
➤ corrigé par désalkylation

# Exercice n° 18 : liaisons hydrogène

---

Appariement des paires de bases  
selon Watson et Crick



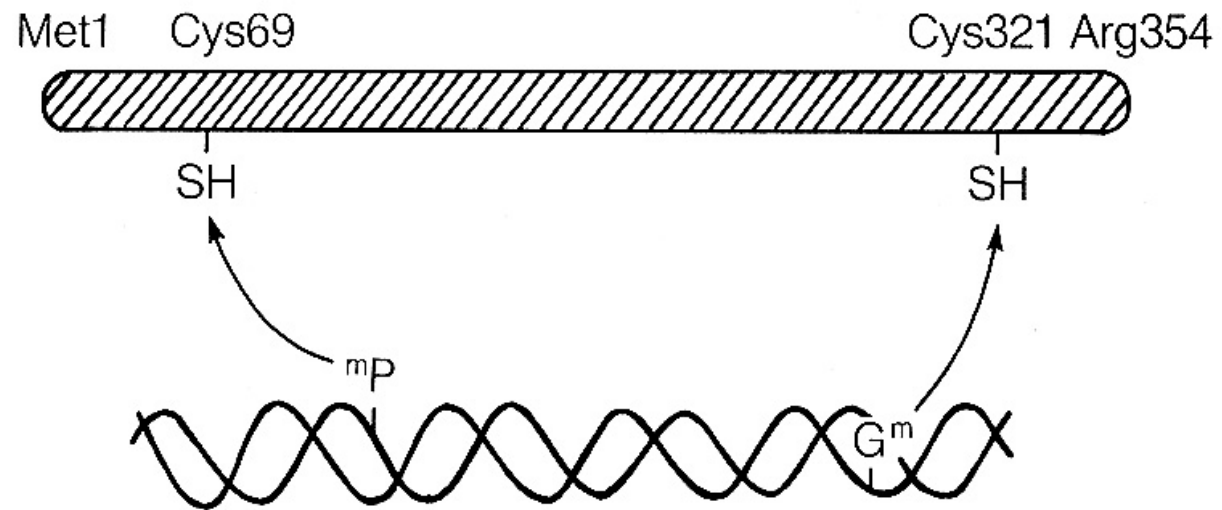


Ces dérivés de la guanine se forment en présence d'agents alkylants et constituent des lésions fréquentes et hautement mutagènes ;

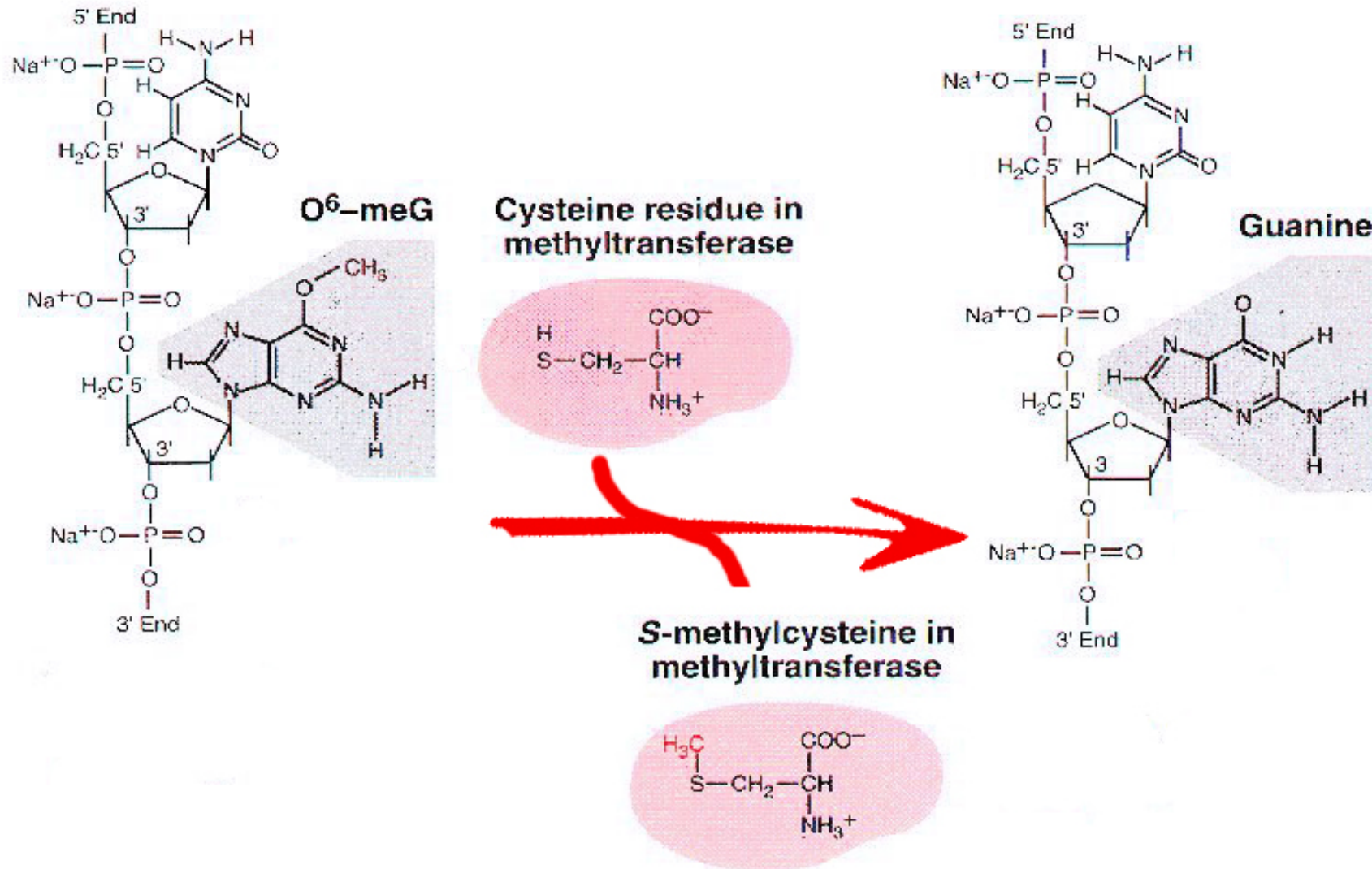
cette **base modifiée** a tendance à s'apparier avec la **thymine** plutôt qu'avec la cytosine au cours de la réplication et provoque de ce fait des mutation G-C vers A-T.

## Exercice n° 18 : Méthyl Transférase

---



# Exercice n° 18 : Réparation par Méthyl Transférase



Enzyme définitivement altérée