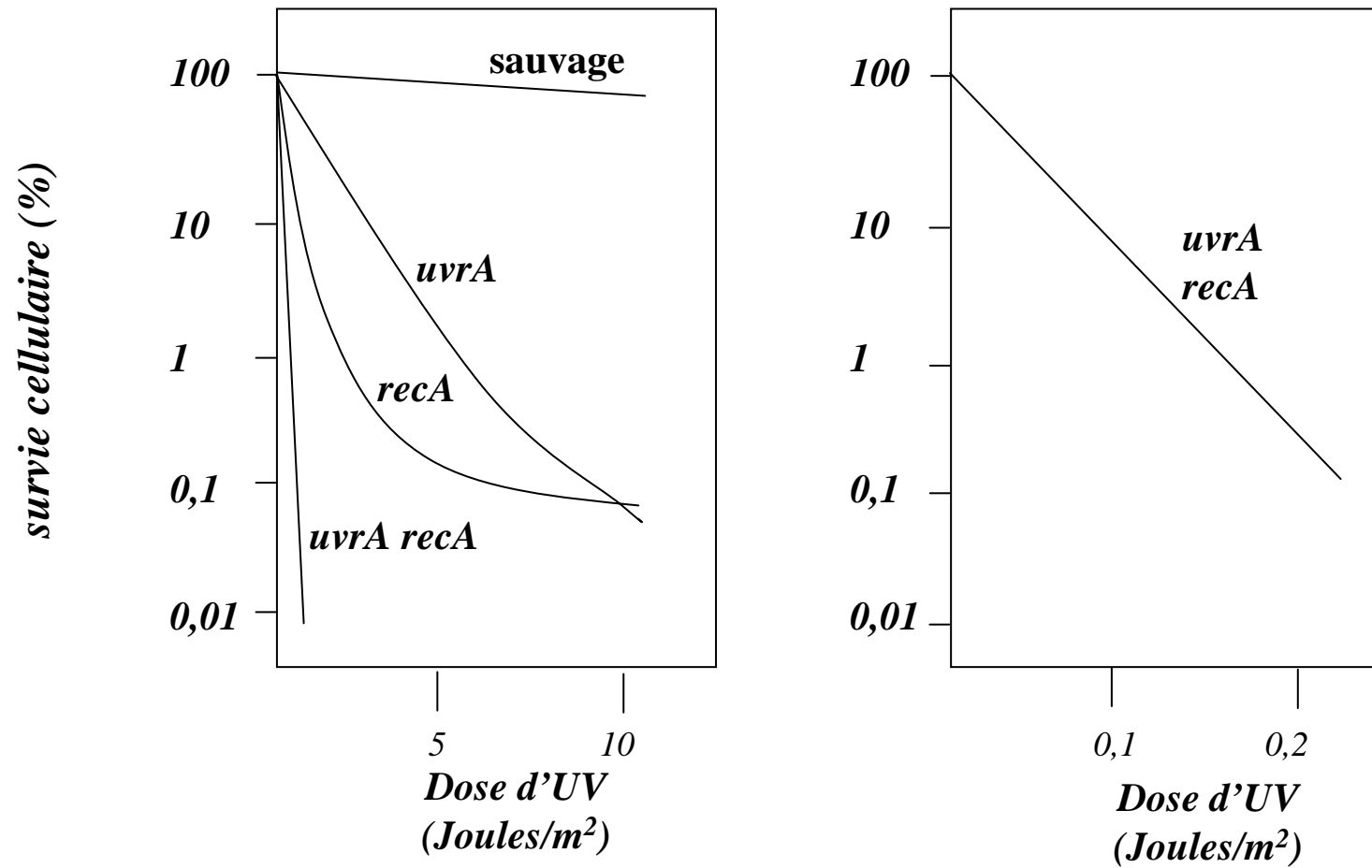


**Travaux dirigés de
Biologie Moléculaire**

N°6

semaine 8

Exercice n° 19 : figure 1

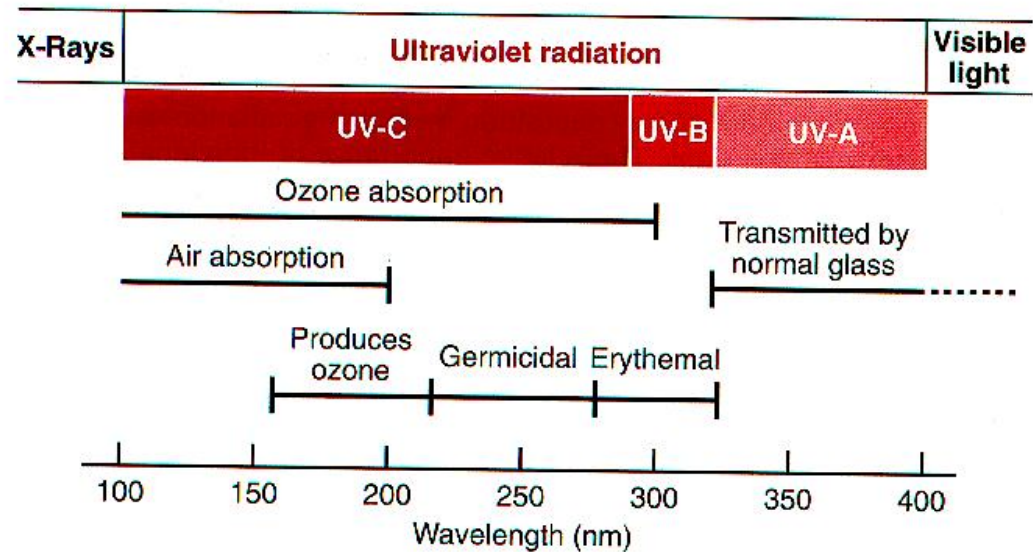


Exercice n°19

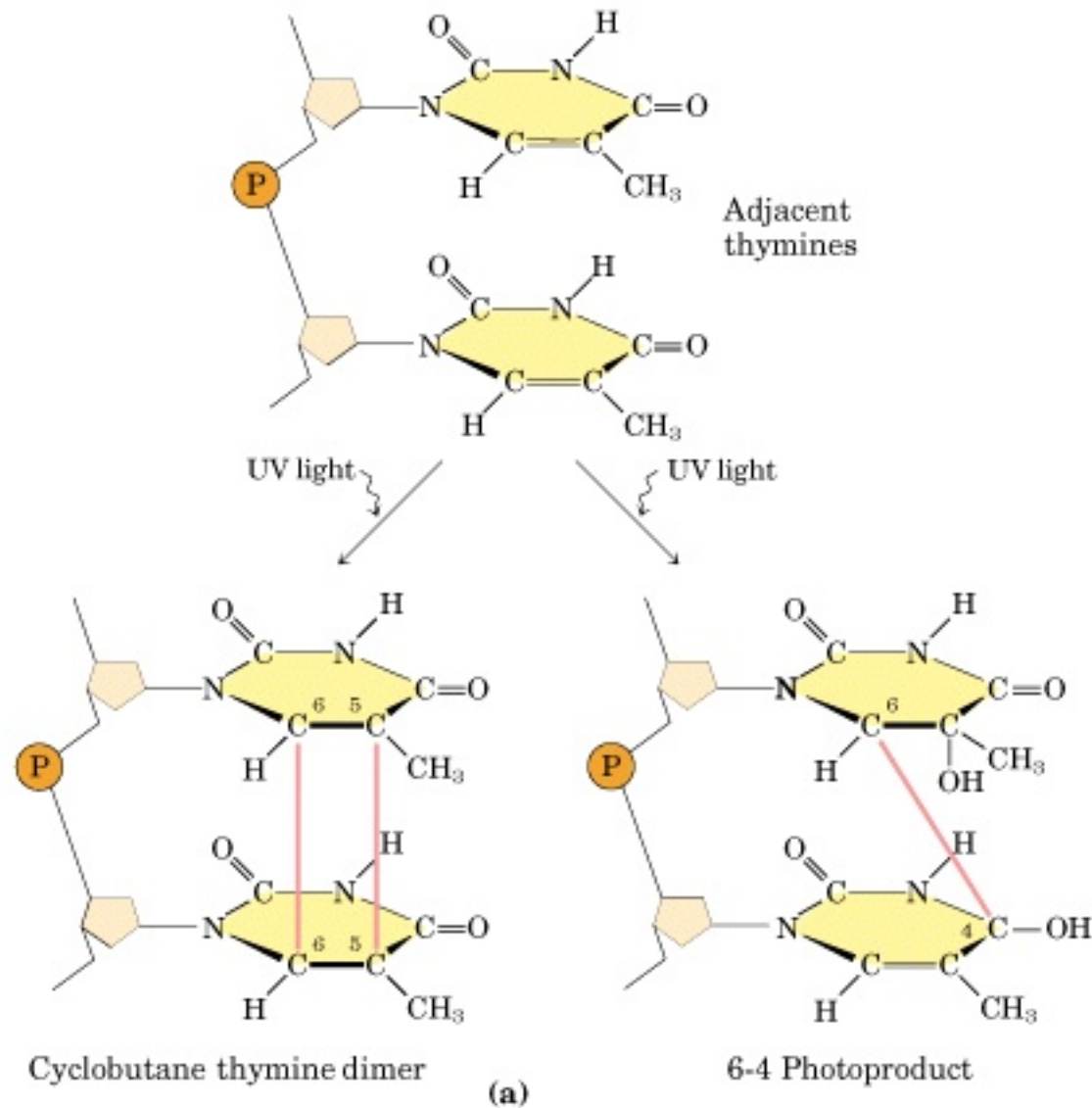
protéines **Uvr ABC** sont impliquées dans l'excision de nucléotides

protéine **RecA** est impliquée dans 2 voies de réparation des lésions :

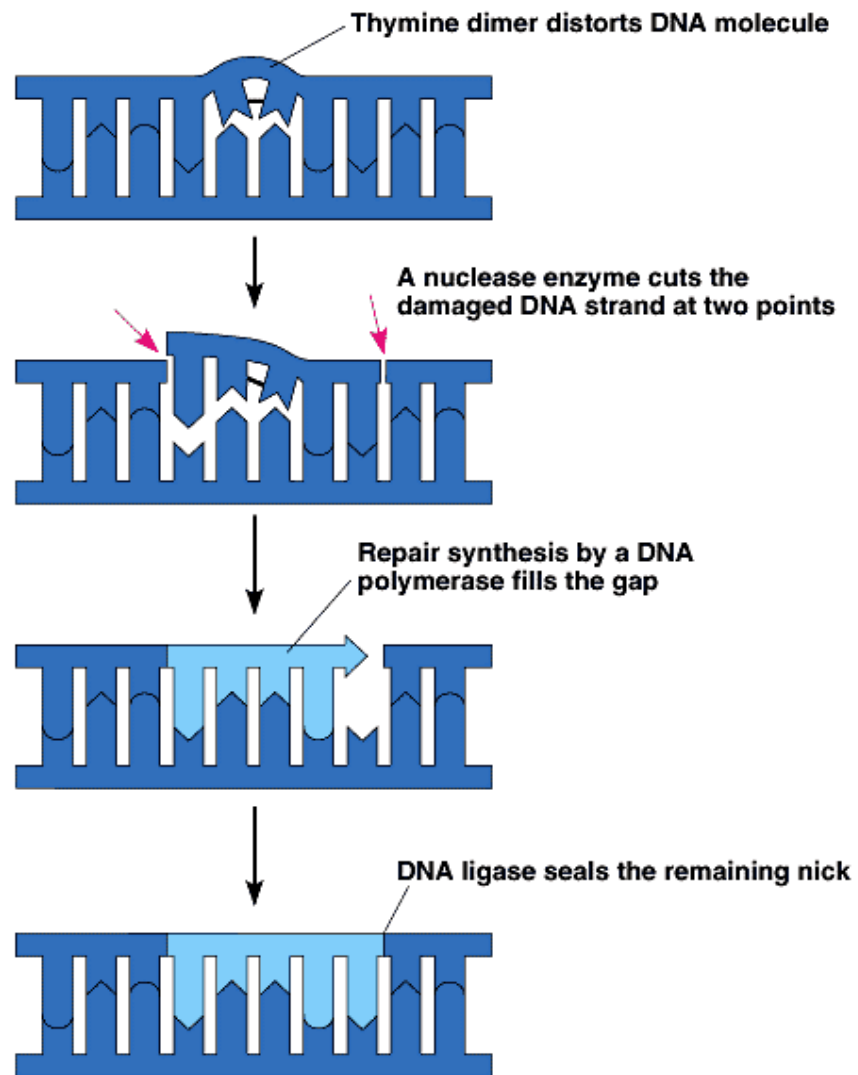
- 1- réponse SOS
- 2- réparation par recombinaison.



Altérations dues aux UV : dimères de thymidines



Réparation par excision de nucléotides



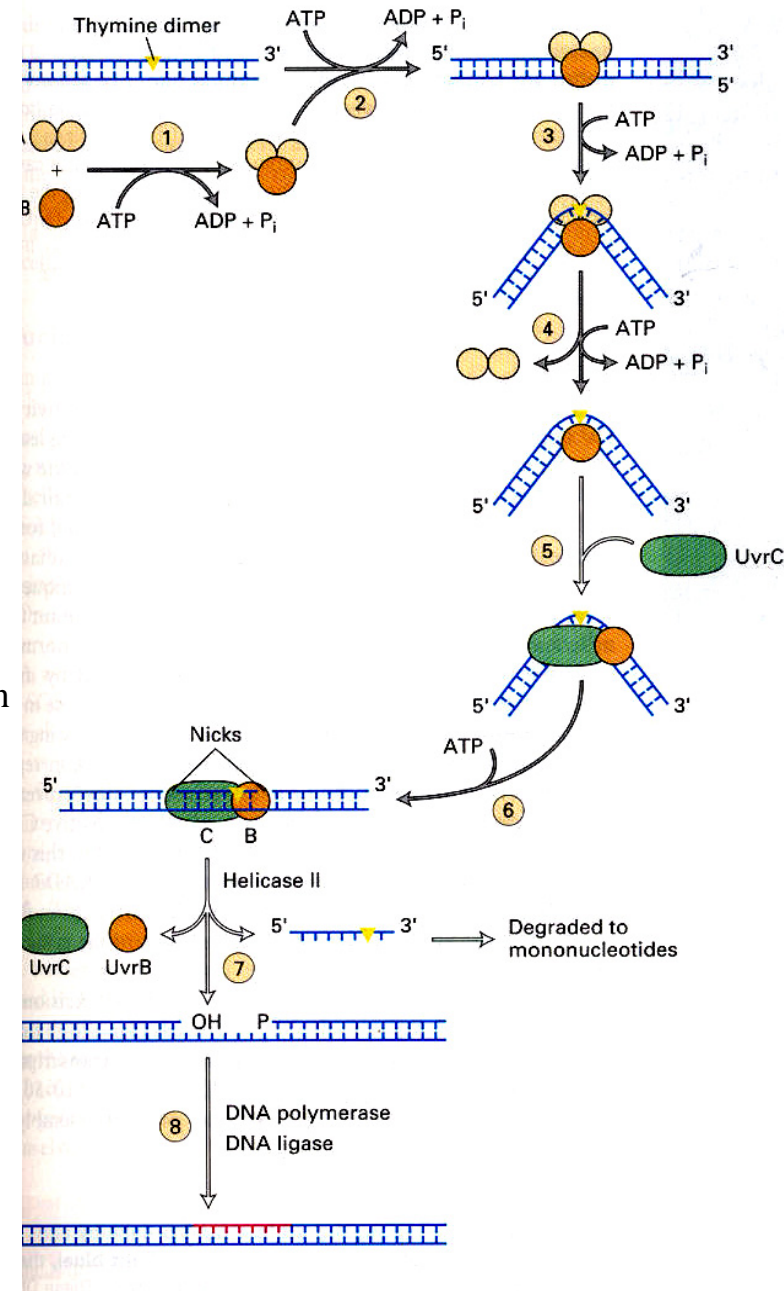
Réparation par excision de nucléotides : Système UvrABC chez *E. coli*

2 molécules de UvrA et 1 molécule de UvrB forment un complexe.
Ce complexe se déplace au hasard le long de l'ADN.

Quand le complexe rencontre une lésion, un changement de conformation se produit qui entraîne une dénaturation locale de l'hélice d'ADN et une pliure de 130°.

Le dimère d'UvrA se dissocie de UvrB et l'endonucléase UvrC (*excinuclease*) se fixe et coupe le brin d'ADN en deux sites séparés de 12 à 13 bases.

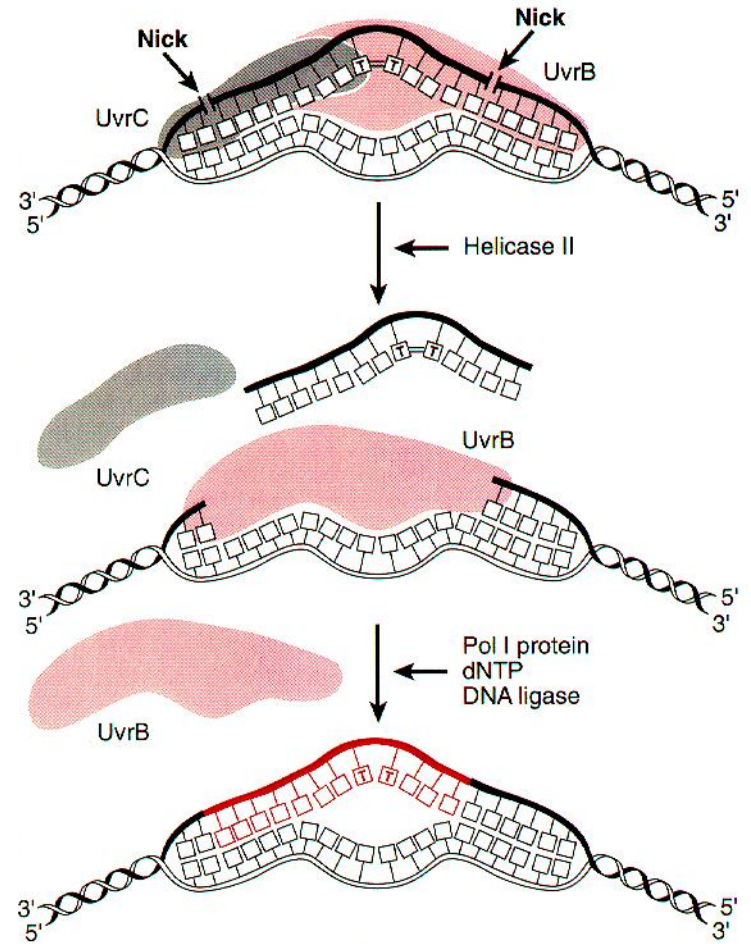
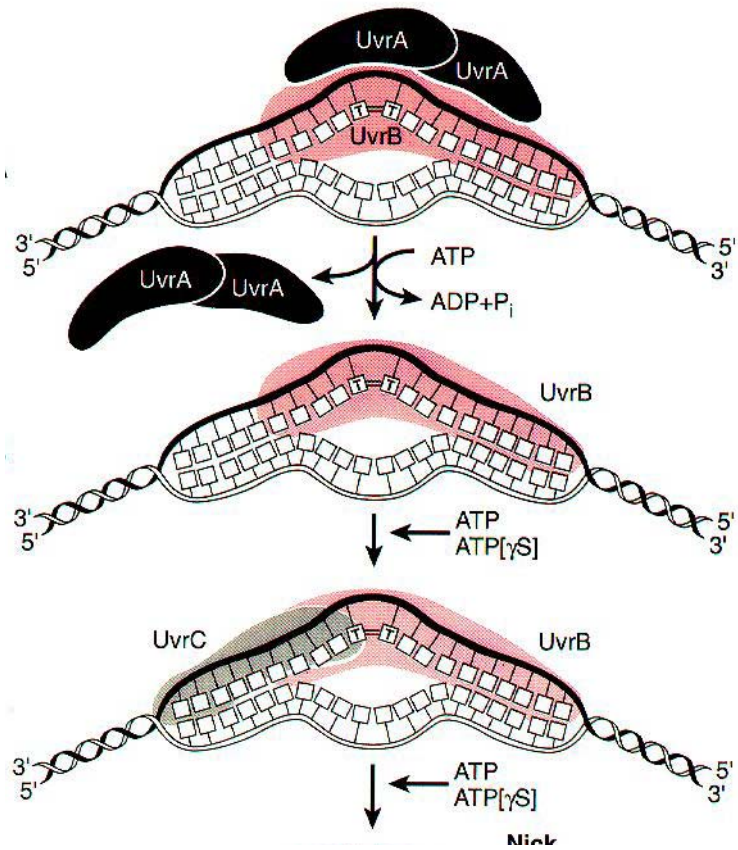
UvrB et UvrC se dissocient et une hélicase déroule la région endommagée et relâche le brin de 12 nucléotides qui est dégradé. Le trou est comblé par l'ADN polymérase I et recollé par la ligase.



Fixation Uvr B + C

Fixation Uvr B





Le système SOS

- sollicité en réponse à un « **appel à l'aide** » de la cellule devant les dommages causés à son ADN.
- met en jeu des mécanismes de réparation de l'ADN : principale cause des mutations induites par les mutagènes qui produisent des lésions non codantes (rayons UV, aflatoxine B1, benzo-pyrène et la plupart des carcinogènes).
- effectue des **réparations imparfaites** des lésions provoquées par ces agents physiques et techniques.
- apparaît comme un **dernier recours** par lequel la cellule négocie sa survie au prix d'un certain niveau de mutagenèse.
- implique un ensemble de gènes qui sont activés par des lésions au niveau de l'ADN.

Exercice n°20

Fréquences de mutations

Souche sauvage	<i>recA</i>	<i>uvrA</i>
➤ les 2 systèmes fonctionnent	➤ seul le système Uvr fonctionne	➤ seul le système RecA fonctionne
4.10^{-8}	1.10^{-10} 400 x moins	4.10^{-6} 100 x plus

- La plus faible fréquence des mutations est retrouvée pour la souche *recA*
- La fréquence la plus élevée des mutations est retrouvée pour la souche *uvrA*

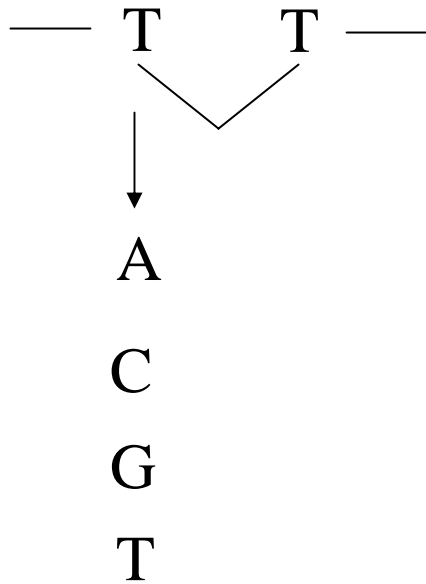
L'étape qui introduit le plus d'erreurs est celle faisant intervenir la protéine RecA.

La voie de réparation *uvr* doit l'emporter chez *E. coli* sauvage.

Exercice n°20

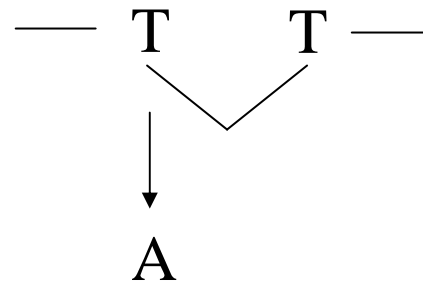
FACE à un dimère de T

Hypothèse (1)
Incorporation au hasard



Correcte dans 1 cas / 4
Soit 25%

Hypothèse (2)
Incorporation systématique d'un A



Correcte dans tous les cas
Soit 100%

Exercice n°20

Dimères de pyrimidines chez *E. coli*

dans 60 % des cas : TT
dans 30 % des cas : TC ou CT
dans 10 % des cas : CC

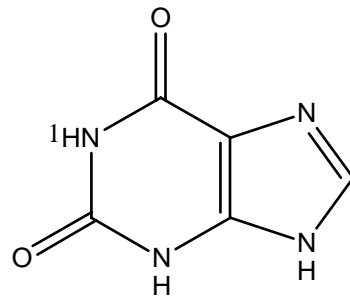
	Hypothèse 1 (Hasard)		Hypothèse 2 (A)	
si TT	25	15	100	60
si TC ou CT	25	7,5	50	15
si CC	25	2,5	0	0
		25%		75%

Correction
Contrôle continu n°2,
2005-2006

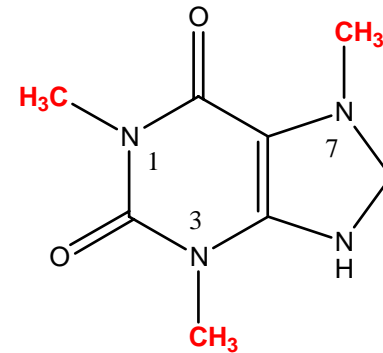
Exercice n°1

La xanthine est également appelée 2,6-dioxypurine ; deux composés naturels, produits de dégradation d'alcaloïdes végétaux, en dérivent : il s'agit de la **caféine**, appelée également 1,3,7-triméthyl xanthine et de la **théophylline** ou 1,3-diméthyl xanthine.

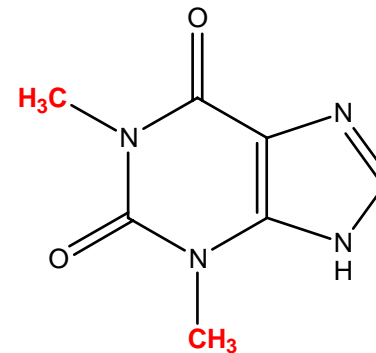
Écrire leurs formules développées.



2,6-dioxy-purine (ou xanthine)

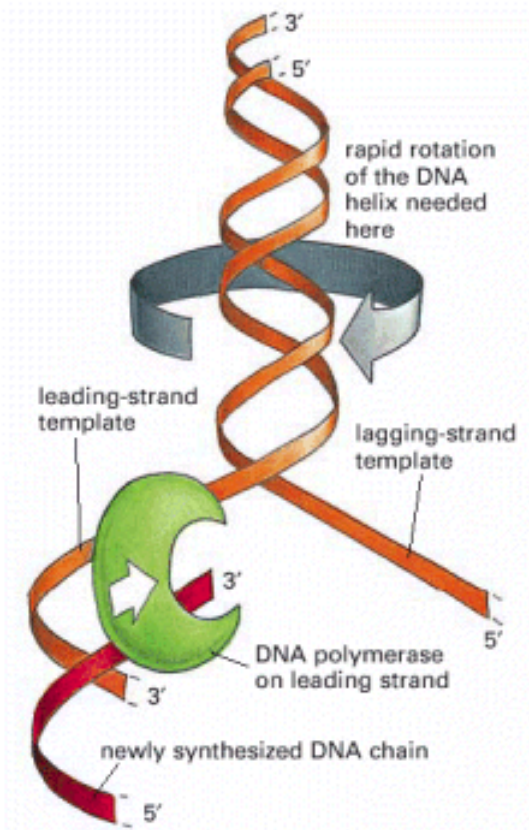


caféine ou 1,3,7-triméthyl xanthine



théophylline ou 1,3-triméthyl xanthine

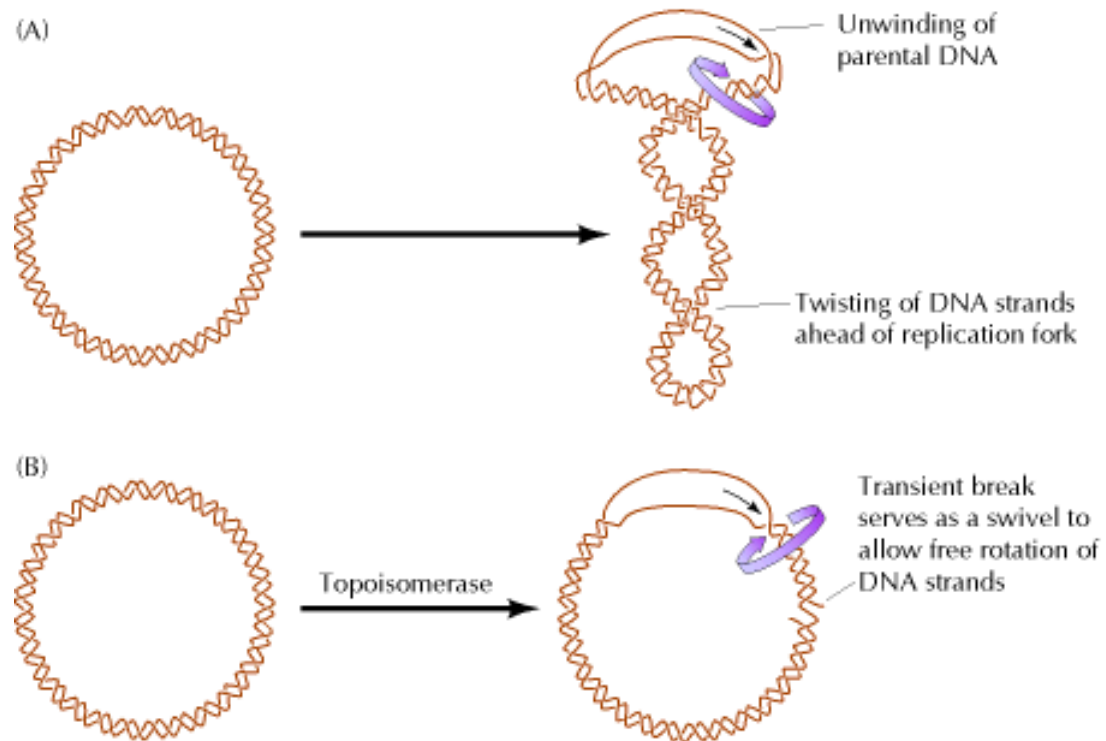
Exercice n°2



Problème d'enroulement se produisant pendant la réplication de l'ADN

Pour que la fourche de réplication se déplace à la vitesse de 500 nt sec, la double hélice parentale d'ADN doit effectuer des rotations de 50 révolutions par seconde.

Exercise n°2



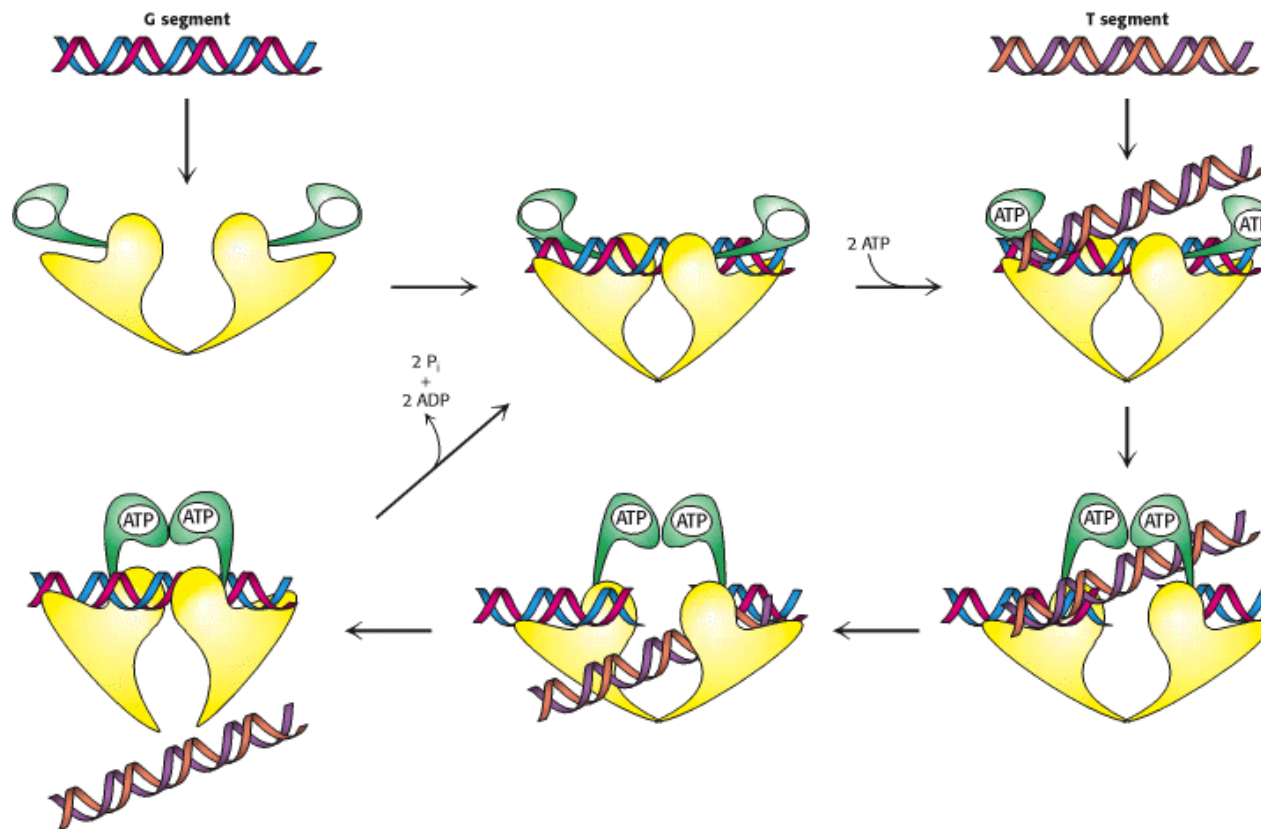
Exercice n°2



Structure of Topoisomerase II (from yeast). _ A composite structure of topoisomerase II formed from the amino-terminal ATP-binding domain of *E. coli* topoisomerase II (green) and the carboxyl-terminal fragment from yeast topoisomerase II (yellow). Both units form dimeric structures as shown.

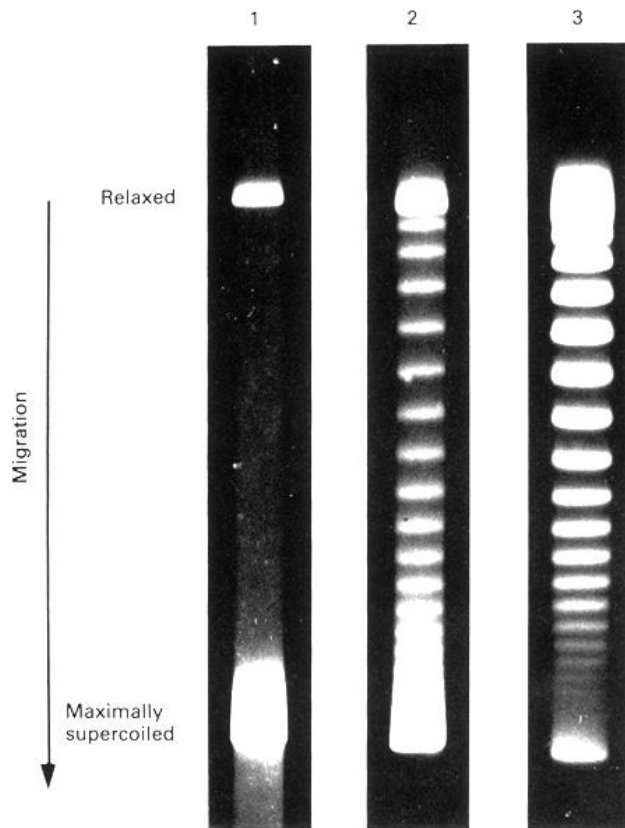
Exercice n°2

Mécanisme de fonctionnement des Topo isomérase de type II



Le dimère se fixe sur l'ADN double brin et la coupure se fait sur chaque brin laissant 2 extrémités 5'P. Un intermédiaire covalent se forme entre la tyrosine de chaque monomère et les groupements phosphate en 5' de chaque brin. Des interactions non covalentes se forment entre l'enzyme et le brin du côté 3'OH de la coupure, un segment d'ADN double brin peut alors passer par la brèche. Les liaisons phosphodiester sont reformées et l'enzyme libérée. Ce mécanisme est couplé à l'hydrolyse d'ATP et permet un changement allostérique de conformation de l'enzyme au cours de la catalyse. Le sens de la réaction est déterminé par l'énergie libre des segments impliqués.

Moyen d'étude des modifications topologiques de l'ADN : ELECTROPHORESE



Profil de l'ADN du SV40 après électrophorèse en gel d'agarose

Piste n°1 : ADN superenroulé négativement ;

Pistes 2 & 3 : ADN a été soumis pendant respectivement 5 et 30 min à la topo-isomérase I

Topoisomérases I : relâche les supertours négatifs, un par un.

2, 3 :

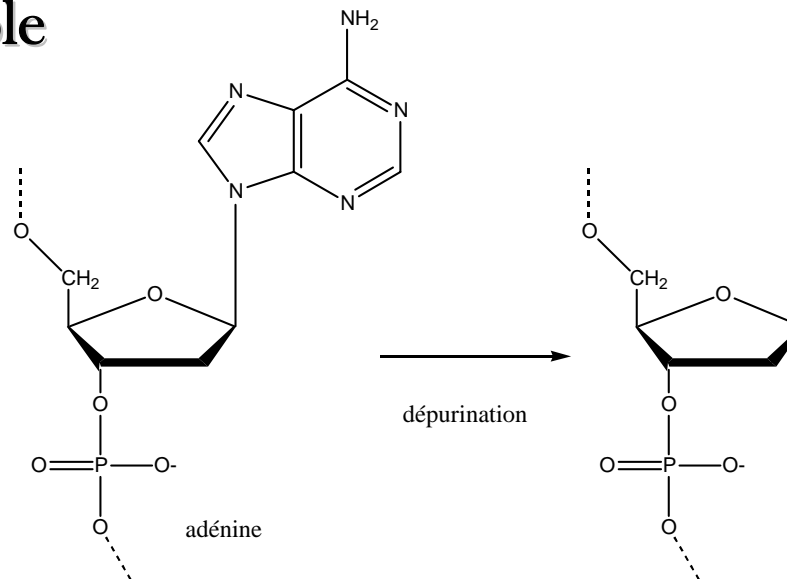
Nouvelles bandes observées entre les 2 formes précédemment décrites

=> **topoisomères de l'ADN viral**

Exercice n°3

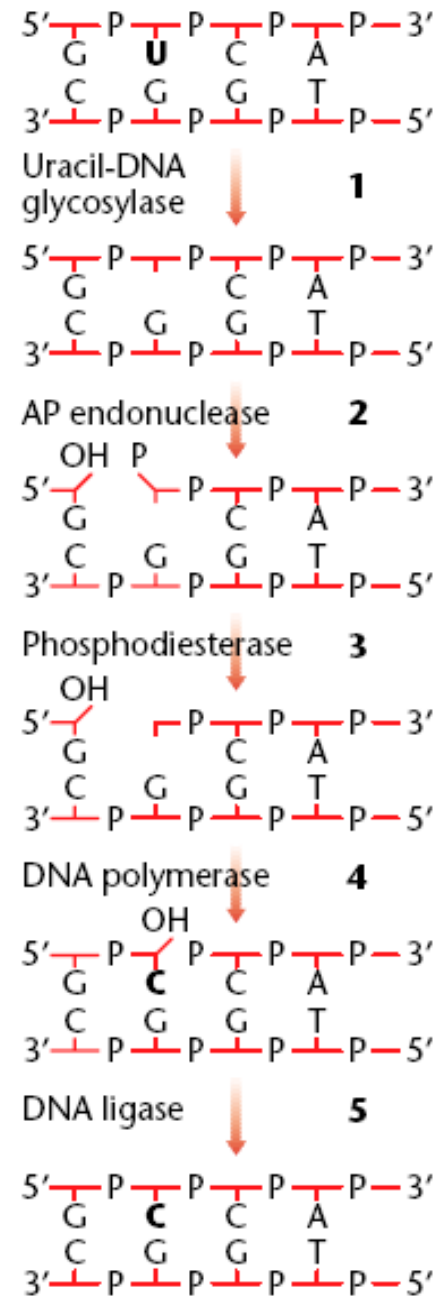
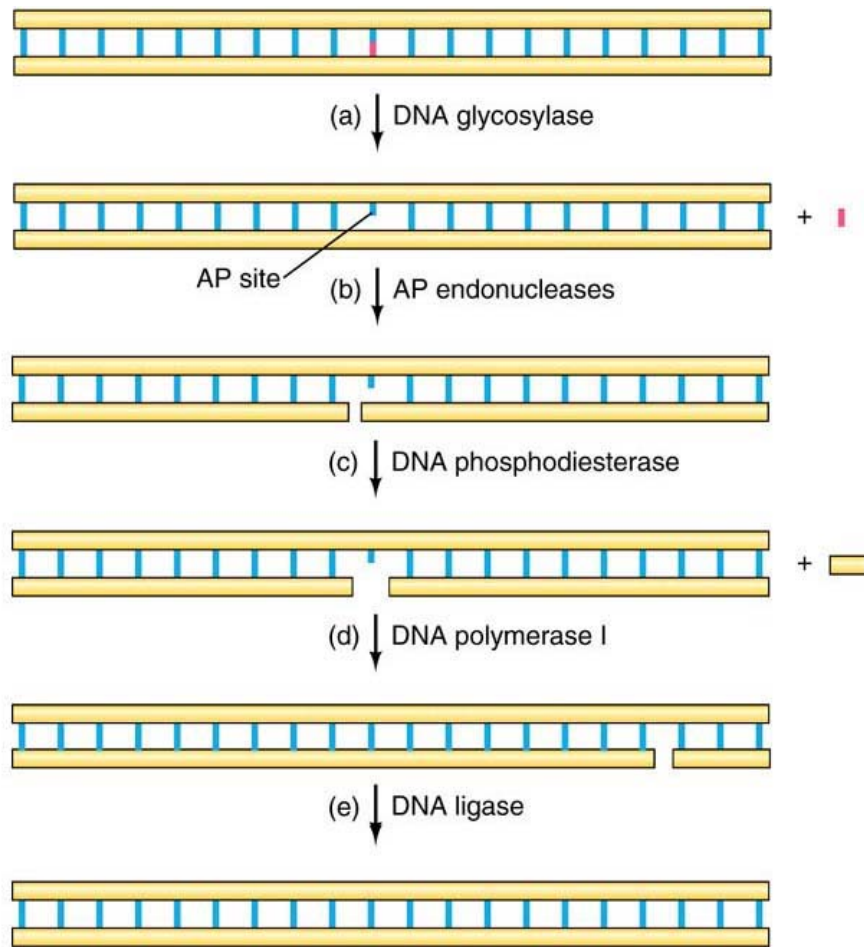
Il existe deux types de modifications spontanées courantes de l'ADN ;
il s'agit de la transformation de la cytosine en uracile et de la dépurination
qui résulte de la rupture des liaisons *N*-glycosidiques de l'adénine ou de la guanine au désoxyribose.
Le sucre dépourvu de base est rapidement reconnu par une enzyme.
Comment s'appelle cette enzyme ? Écrire l'équation qu'elle catalyse.

Dépurination : un exemple



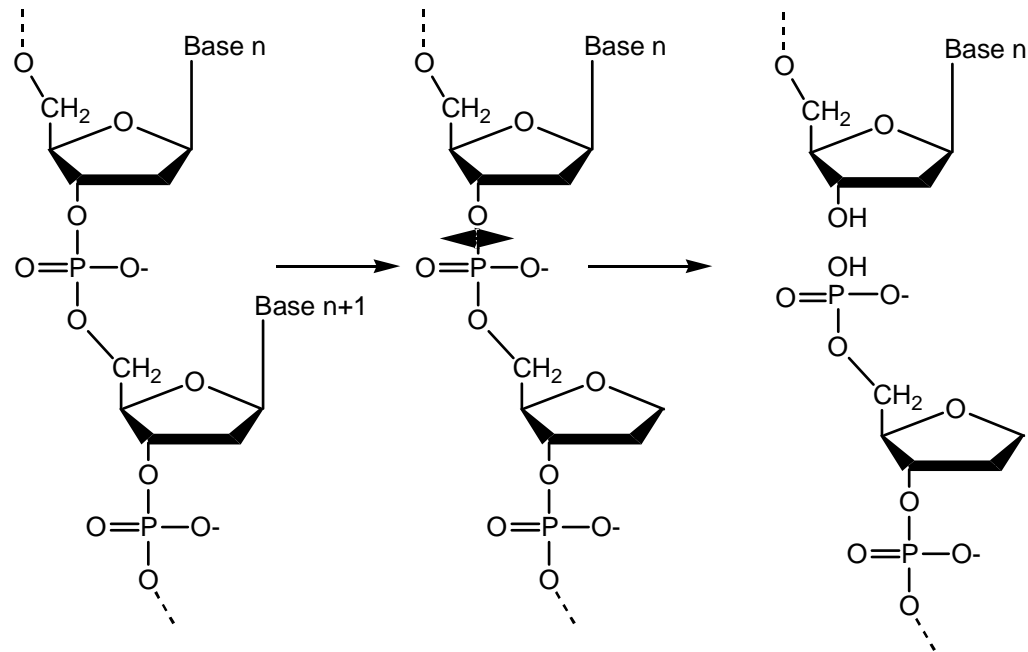
Exercice n°3

Base Excision Repair : vue générale



Exercice n°3

Réaction catalysée par les **endonucléases AP**



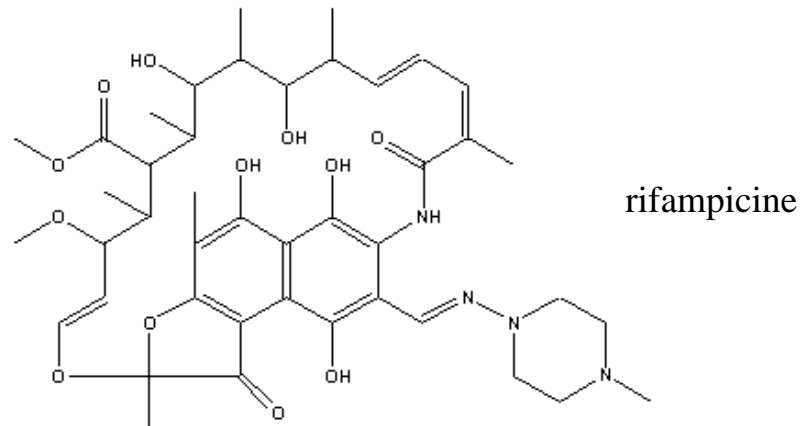
Exercice n°4

Une étude de l'effet de différents inhibiteurs de la synthèse d'ADN est réalisée *in vitro*.
Le système de réplication étudié est celui du phage M13.

Il a été ainsi montré que la synthèse de l'ADN du M13 est affectée par la rifampicine
(un inhibiteur de l'ARN polymérase de l'hôte).

Par contre la synthèse de l'ADN d'*E. coli* n'est pas affectée par cet antibiotique.

Expliquer.



*Pour le phage M13, la synthèse de l'ARN amorce est réalisée
par l'ARN polymérase de l'hôte d'E. coli.*

*Chez E. coli, la synthèse des amorces ARN est catalysée par une primase
et non pas l'ARN polymérase.*

**Contrôle continu n°2,
2004-2005**

Question n°1

En considérant que 2 fourches de réplication partent d'une origine unique, quelle est la durée (en minute) de la réplication du chromosome d'*E. coli* ? (1 pt)

données : vitesse de réplication par l'ADN pol. III : env. 1000 nt/sec ;
taille du génome : env. $5 \cdot 10^6$ pb

$$1 \text{ génome} = 5 \cdot 10^6 \text{ pb} = 2 \times 5 \cdot 10^6 \text{ nt} = 10 \cdot 10^6 \text{ nt}$$

Il y 2 fourches, et 2 brins par fourche = 4 ADN Pol. III travaillent de concert

Chaque ADN Pol III aura à répliquer $10 \cdot 10^6 / 4 \text{ nt} = 2,5 \cdot 10^6 \text{ nt}$

Or chaque ADN Pol III réplique à 1000 nt/s

Il faut $2,5 \cdot 10^6 / 1000$ soit **2500 sec** soit **41,67 min.** pour dupliquer le chromosome d'*E. coli*.

Question n°2

Quelles sont les réactions catalysées par l'ADN polymérase I d'*E. coli* ? (3 pts)

Activité polymérase 5'-3'

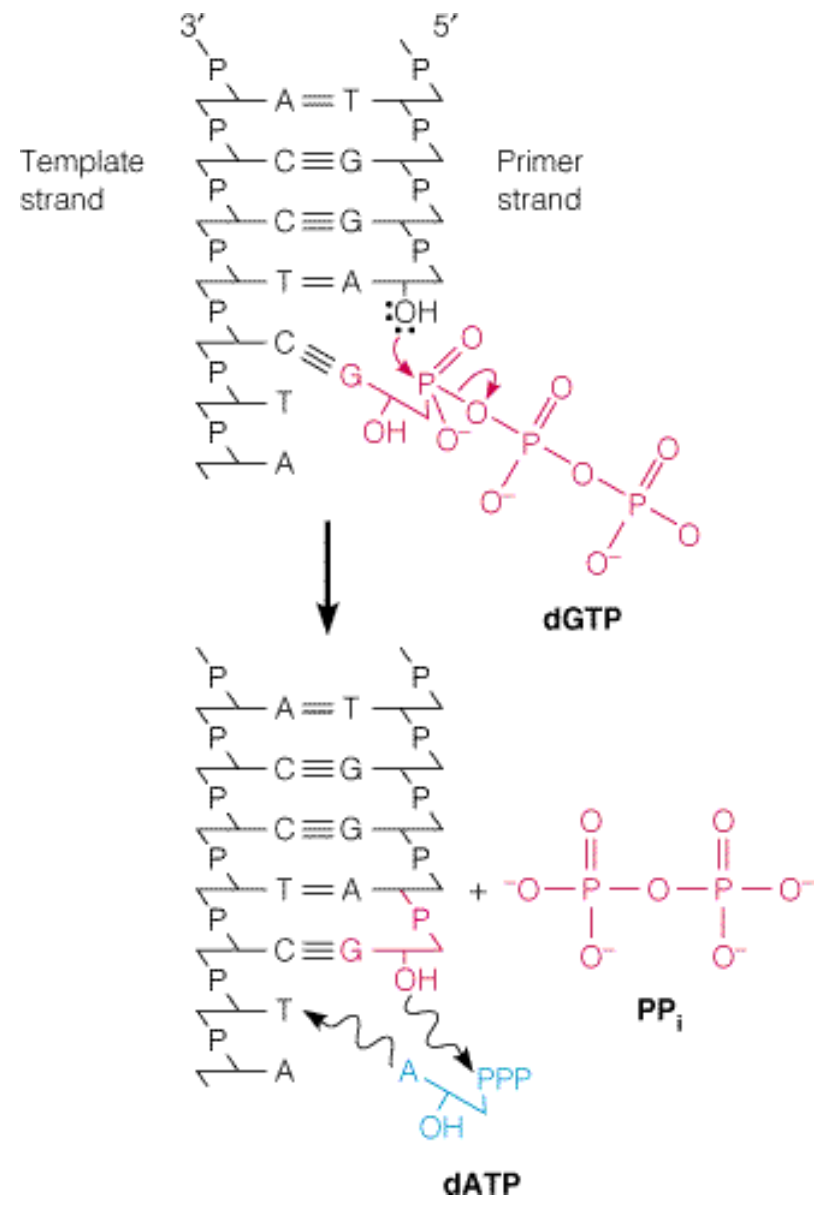
Elle associe les **dNTP** sur une **matrice d'ADN** :

=> **attaque de type nucléophile** du groupement **3'-OH** du brin croissant d'ADN réagissant alors avec le groupement **phosphoryle α** du dNTP qui s'est présenté.

Réaction **thermodynamiquement possible** du fait de l'**élimination corrélative de P_{PPi}** qui sera hydrolysé par la pyrophosphatase en 2 Pi.

Spécificité de ADN Pol I : Mise en place d'une **base appariée selon Watson-Crick** avec la matrice.

dNTP : désoxyribonucléosides triphosphates

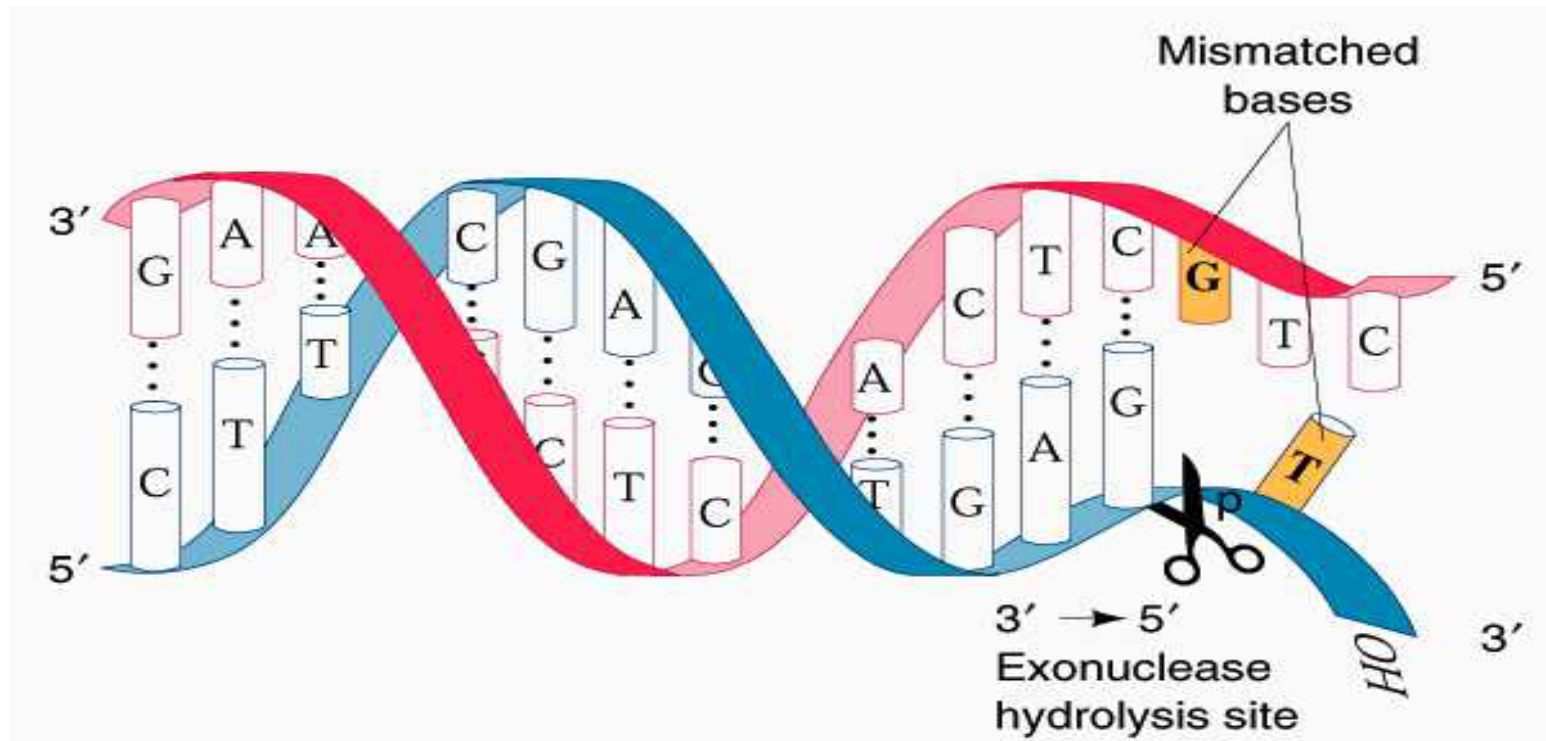


Activité exonucléasique 3'-5' : Correction sur épreuve

=> Capacité de relire le brin d'ADN en cours de synthèse et de corriger ses fautes.

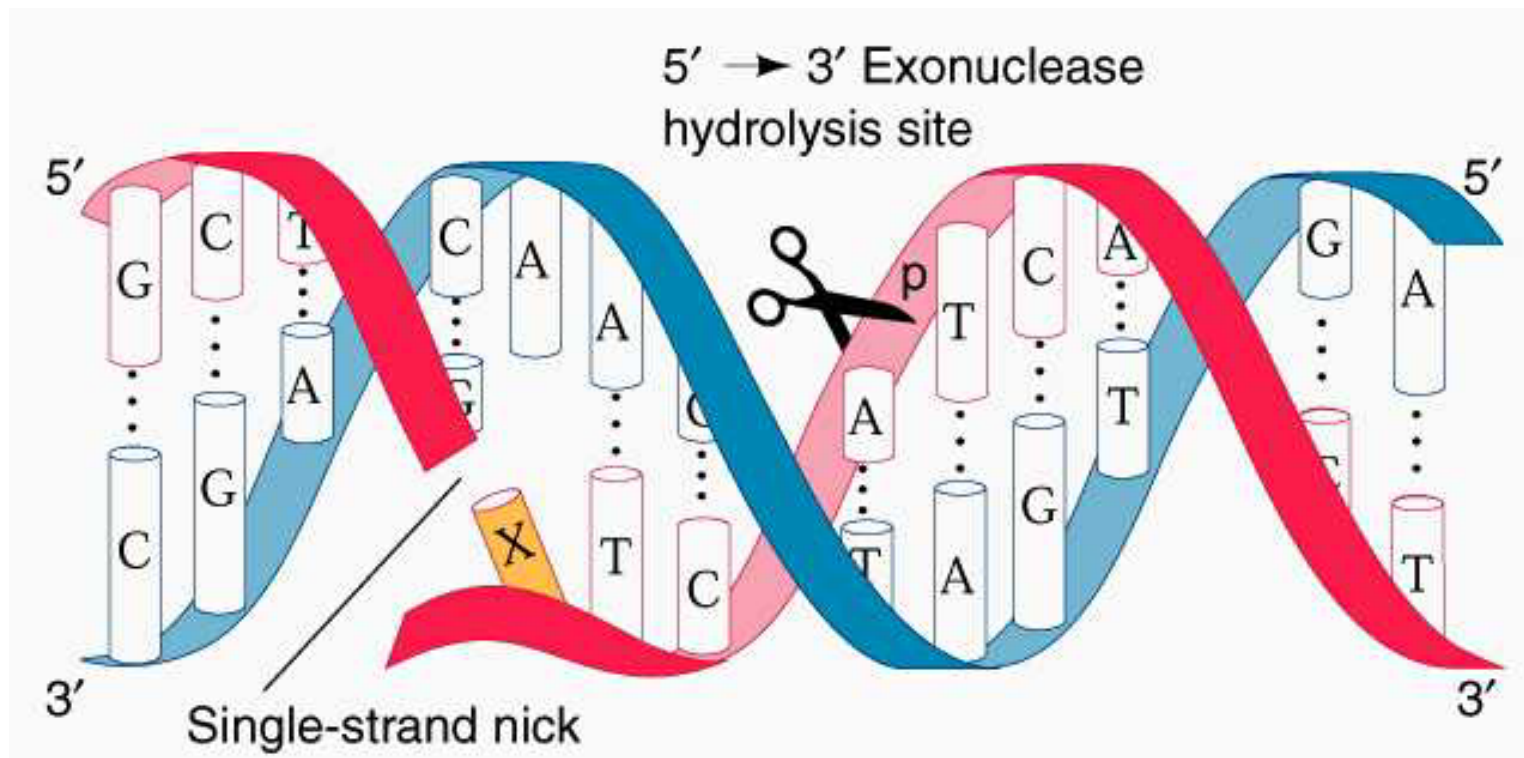
Fonction activée par un **nucléotide 3'-terminal mal apparié**, ayant son groupe 3'-OH libre.

=> Si la pol I incorpore un nucléotide erroné à l'extrémité croissante d'un brin d'ADN, **l'activité pol est inhibée** et **l'exonucléase 3'-5' excise ce nucléotide**. L'activité pol reprend ensuite.



Activité exonucléasique 5'-3' : excision des amorces ARN (fragments d'Okasaki)

Liaison à un **ADN duplex**, à un site de **coupure simple brin** sans spécificité pour le nucléotide 5'. Elle coupe l'ADN dans une région où les bases sont appariées, voisine de la cassure, de telle façon que l'**ADN se trouve excisé** et libère soit des mononucléotides ou des oligonucléotides d'une longueur allant jusqu'à 10 résidus.



Activité polymérase 5'-3' de Pol I indépendante des activités exonucléases 3'-5' et 5'-3'
=> Pol. I contient donc 3 sites actifs dans une seule chaîne polypeptidique.

Les différentes ADN polymérase

Comparison of DNA Polymerases of *E. coli*

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	≥4	≥10
M_r	103,000	88,000 [†]	830,000
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/sec)	16–20	40	250–1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3–200	1,500	≥500,000

Question n°3

Une fibre d'ADN est transférée d'un environnement à forte humidité à un environnement à faible humidité (et passe donc de la forme B à la forme A (pour la forme A, il y a 11pb tous les 2,9nm)) ;

Rappelez les caractéristiques structurales de la forme B de l'ADN ;
En déduire le pourcentage de raccourcissement. (6 pts)

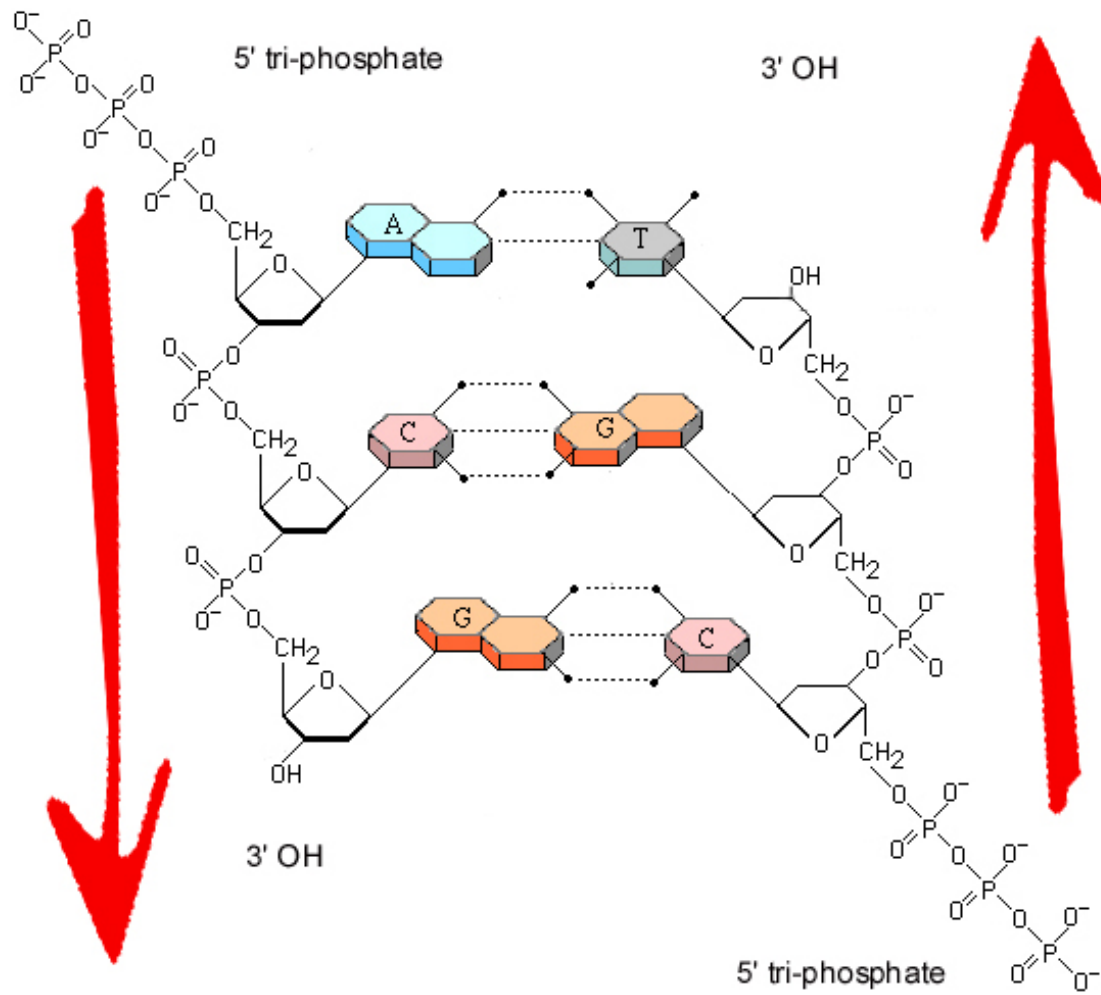
Principales caractéristiques de la forme B de l'ADN :

l'ADN forme B possède les 3 caractéristiques principales suivantes :

1/ il est constitué par **2 chaînes polynucléotidiques** tournant autour du même axe selon une **spirale de pas à droite** ce qui forme une **double hélice** d'un **diamètre d'env. 2nm** ; les deux chaînes tournent dans des sens opposés (elles sont **antiparallèles**) et s'enroulent l'une autour de l'autre ;
les **bases** sont à **l'intérieur** de l'hélice et les **liaisons sucre-phosphate** forment des spirales à **l'extérieur** de l'hélice.

2/ les plans constitués par les bases sont pratiquement perpendiculaires à l'axe de l'hélice ; chaque base est reliée par **2 ou 3 liaisons hydrogène** à une base de la chaîne opposée pour former une paire de bases.

3/ l'hélice d'ADN B a un **pas de 10 pb** (correspondant à 36° de rotation de l'hélice /pb) avec une longueur d'hélice par **tour de 3,4 nm** ;
elle présente **2 sillons extérieurs**, les 2 sillons ont des profondeurs inégales.



Structure de l'ADN

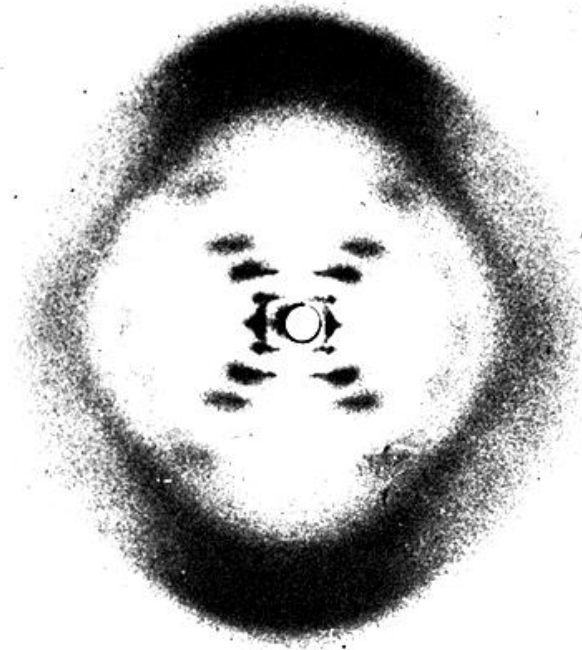
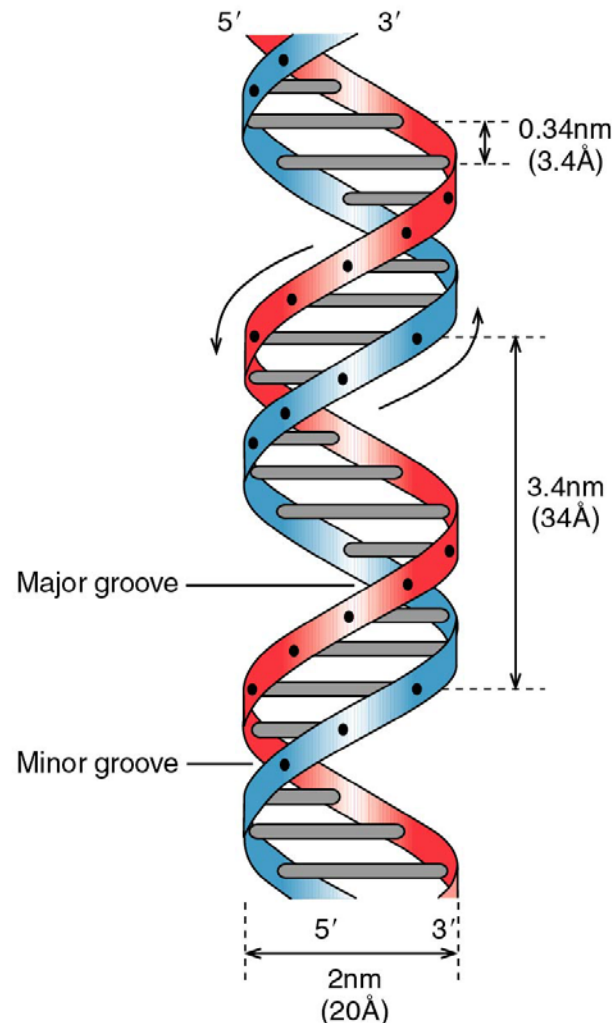


FIGURE 9-5 The key x-ray photograph involved in the elucidation of the DNA structure. This photograph, taken at Kings College, London, in the winter of 1952–1953, by Rosalind Franklin, experimentally confirmed the then current guesses that DNA was helical. The helical form is indicated by the crossways pattern of x-ray reflections (photographically measured by darkening of the x-ray film) in the center of the photograph. The very heavy black regions at the top and bottom tell that the 3.4-Å thick purine and pyrimidine bases are regularly stacked next to each other, perpendicular to the helical axis. [Reproduced from R. E. Franklin and R. Gosling, *Nature*, 171, 740 (1953), with permission.]

Calculs du % de raccourcissement :

ADN A : en 2,9 nm, on a 11 pb

distance entre 2 bases : $2,9 / 11$ soit 0,264 nm

ADN B : en 3,4 nm , on a 10 pb

distance entre 2 bases : $3,4 / 10$ soit 0,34 nm

Raccourcissement : $0,34 - 0,264 = 0,076$ nm

Passage de la forme B à la forme A : conséquence sur la distance entre 2 bases

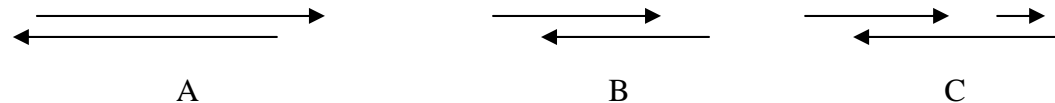
On perd 0,076 nm sur une taille initiale de 0,34 nm

soit $0,076 \times 100 / 0,34 = \text{env. } \underline{\underline{22\%}}$

Question n°4

Soit les ADN duplex suivants (structures A, B & C schématisées ci-dessous), indiquer les produits obtenus après réaction avec l'ADN pol I d'*E. coli* et le mélange des 4 désoxynucléotides.

Expliquez. (5 pts)



1/ il s'agit tout d'abord d'identifier les extrémités des substrats A, B et C

2/ il faut ensuite rappeler très brièvement les activités de l'ADN pol.I d'*E. coli* (cf. question n°2)

3/ noter ensuite les « exigences » des ADN pol : matrice / amorce / dNTP avec allongement de l'ext. 3'-OH d'une amorce.

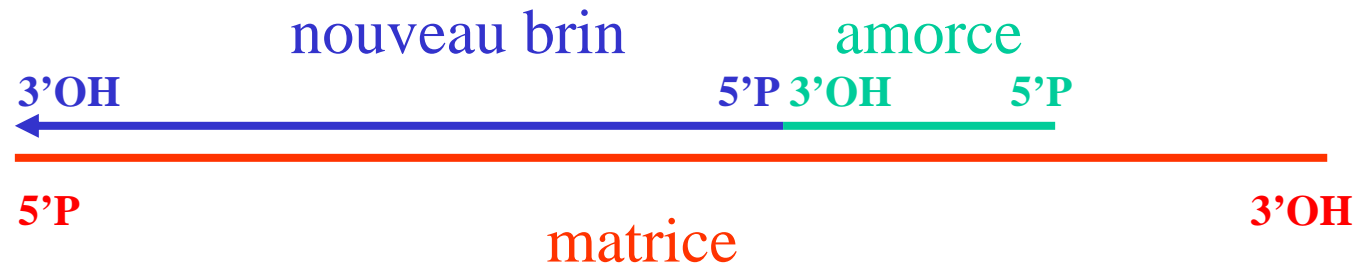
Les ADN POLYMÉRASES

* nécessitent

- un brin d'ADN **matrice**
- une **amorce** oligonucléotidique

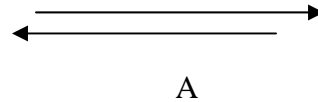
* réalisent

- une synthèse du **brin nouveau 5' vers 3'**

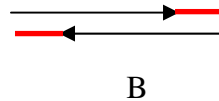


Question n°4

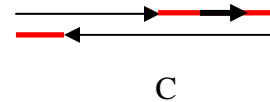
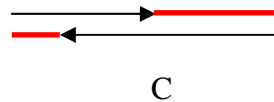
Structure **A** : pas d'extrémité 3'-OH en retrait par rapport au 5'-P donc pas de réaction possible



Structure **B** : 3'-OH en retrait par rapport au 5'-P : élongation possible du brin supérieur (le brin sup. est l'amorce, le brin inf. constitue la matrice) et de même, élongation possible du brin inférieur



Structure **C** : il y a possibilité de déplacement de brins ; donc sur le brin sup il y a élongation à partir des extrémités 3'-OH libres puis déplacement du brin le plus à droite : l'élongation se poursuit.



Question n°5

Donner la liste des précurseurs et des enzymes nécessaires pour synthétiser le brin retardé (discontinu) au cours de la réplication de l'ADN chez *E. coli*. Faire un schéma récapitulatif. (5pts)

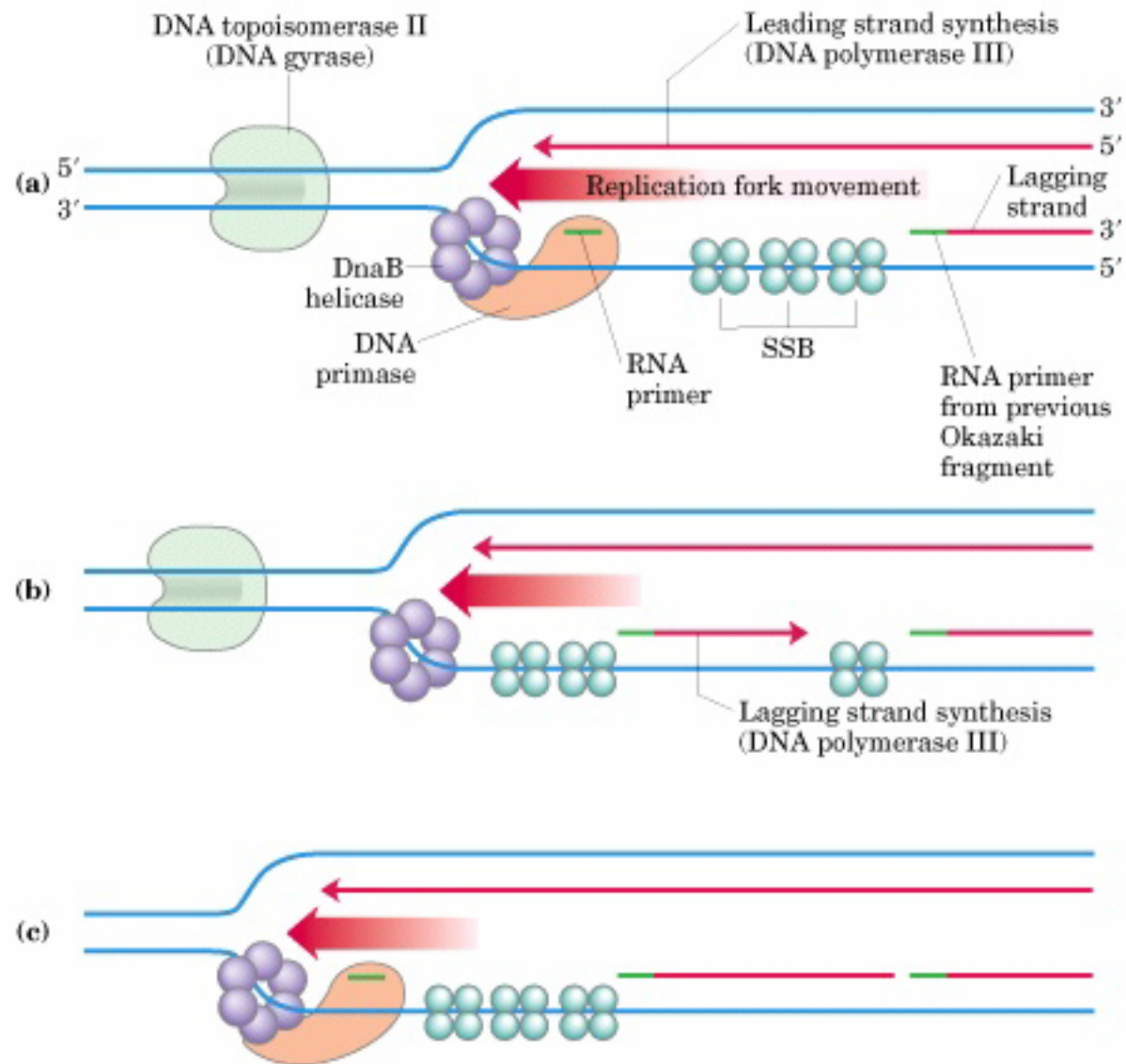
Attention !!!

Il n'est pas nécessaire de dresser la liste des acteurs intervenant dans l'initiation de la réplication chez *E. coli* => se concentrer sur le brin retardé

Précurseurs et enzymes nécessaires pour la synthèse du brin retardé :
hélicase (DnaB) primase,
SSB,

les 4 dNTP (dATP, dGTP, dCTP & dTTP),
et les 4 NTP (ATP, GTP, CTP & UTP),

ADN pol. III et pol. I, ligase,
gyrase et topoisomérase I.



Réplication

