

II. MECANISMES MOLECULAIRES DE CONSERVATION DE L'INFORMATION GENETIQUE

Consignes de programme :

- Cycle cellulaire et division : Synthèse d'une copie de l'ADN préalable à division (conservation de l'info génét selon des mécanismes semi-conservateurs)
- L'étude de la réplication est orientée sur les mécanismes moléculaires d'action des ADNpolymérase. On discutera de la fidélité de la copie. On signale l'intervention d'autres enzymes dans la réplication. (Les mécanismes de réplication par cercle tournant ne sont pas au programme).

MUTATIONS : on ne traite que des processus de dimérisation de thymines, de désamination et de dépurination spontanées. On se limitera à un seul exemple de réparation.

A/ Conservation de l'information génétique lors de sa réplication.

Consignes de programme :

- Le rôle physiologique des enzymes de réplication qui sont utilisées pour l'ingénierie génétique est signalé mais l'enzymologie de la réplication n'est pas au programme

Rappel : double hélice d'ADN décrite par Watson et Crick 1953

Nota : Méthodes expérimentales d'étude permettant d'aborder la réplication (d'après Brun)

Mécanismes moléculaires enzymatiques et régulation complexes car les molécules sont grandes (de plus en plus des virus aux bactéries et aux eucaryotes).

Pb de la compaction : nécessité de débobiner.

La viscosité des telles superstructures nécessite des techniques d'études adaptées :

Microscopie électronique :

Difficulté principale : étaler au maximum la molécule d'ADN

a) Méthode de Kleinschmidt

- étalement : un mélange d'acides nucléiques et de cytochrome c (basiques, neutralise les charges acides de l'ADN) est déposé sur une hypophase (solution tampon + formamide) qui détruit les liaisons H, le tout dans un récipient en téflon
- récupération des échantillons : on pose une grille de microscopie électronique à la surface de récipient en téflon; on fixe (alcool) puis on colore (acétate/uranyl)
- ombrage : dépôts métalliques avec un angle de 30°, évaporés dans le vide
- inconvénients : on analyse le complexe ADN / cytochrome C et on dénature les associations nucléoprotéiques naturelle (par tensions superficielles)

b) Méthode de Dutrochet

L'étalement est favorisé par dépôt sur grille de microscopies électronique chargée (par vaporisation d'amides +) qui établissent liaisons ioniques avec ADN. Permet d'analyser les formes intermédiaires de réplication et les complexes multienzymatiques à la surface des molécules d'ADN

Méthodes biochimiques sur molécules radioactives

- Unité de mesure de la radioactivité : coups par minute cpm (dpm dot per minute), qui sont équivalents à des désintégrations par minute dpm : 1 microcurie (μCi) = $2.2 \cdot 10^6$ dpm

ex : 3000 Ci/mmol soit 3000 μCi / nmol soit 3 μCi /pmol

Il est facile de détecter 2000 cpm

- Base spécifique de l'ADN : Thymidine* marqués par ^3H (tritié)

- Techniques classiques : électrophorèse, ultracentrifugation (dans des gradients de vitesse on peut mesurer taille des molécules donc indirectement vitesse de réplication de l'ADN)

- On peut séparer des molécules qui se répliquent des autres : par intégration de bromodéoxyuridine (Br à la place de CH_3 sur thymidine); BrdU très dense, puis séparation sur gradient isopicnique (CsCl)

Mise au point sur système acellulaire

Sur milieu semi-solide contenant substrats (dNTPs, ATP) séparé par cellophane hémiperméable pore 4000 à 5000 laissant passer ATP, sur laquelle on dépose une goutte d'extrait bactériens + chromosomes enroulés + tout autre molécule

Utilisation de systèmes perméabilisés

permet d'imiter interactions naturelles chromosome / environnement cellulaire.

Pb : les TTP ne peuvent pénétrer dans le noyau; Seules les bases azotes ou les nucléosides le peuvent. Or la phosphorylation de ces bases ou nucléosides est longue, dans des temps non compatibles avec les phénomènes étudiés. On travaille donc sur des systèmes perméabilisés temporairement en traitant très peu de temps avec du toluène (solvant organique).

a permis de mettre en évidence les fragments d'Okasaki

Utilisation de mutants conditionnels de la réplication.

On peut, pendant de brèves périodes, arrêter ou mettre en route la réplication grâce à des mutants thermosensibles isolés presque exclusivement chez les bactéries : température permissive à 37° , non permissive à 41°C .

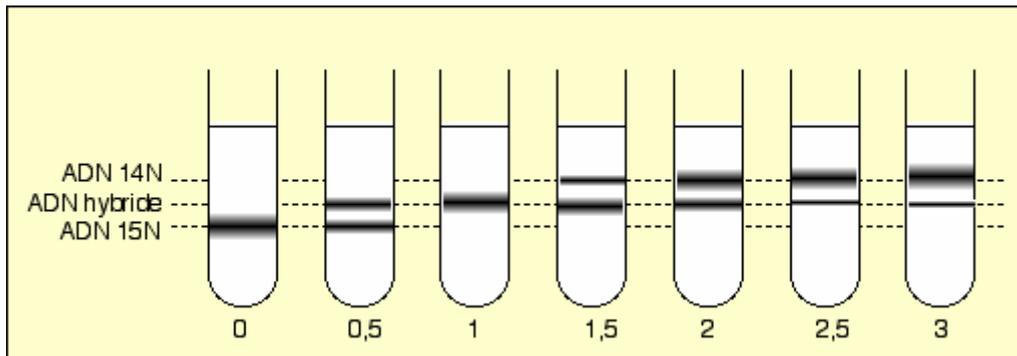
1- Rappel des Modalités de la réplication : semi conservatisme

a) Rappels succins sur le principe

- conservatisme (faire un petit schéma)
- semi-conservatisme

b) Démonstration avec ADN bactérien sur N lourd par Meselston et Stahl 1956

- croissance de bactéries sur $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4^+$, forme lourde de l'azote (2 dans bases pyrimidiques, 4 dans bases puriques). Une mole de nucléotide non marqué pèse 330 g, une mole de nucléotide marqué pèse 333 g (soit 1% de plus).
- On transplante au temps 0 les bactéries lourdes sur milieu à ^{14}N et on laisse pousser, en suivant la DO : séparation sur gradient de CsCl (20 h à 140 000g). La densité varie de 1 à 2 %. On peut suivre la DO absorption des UV (^{14}N à DO 1.710; ^{15}N à DO 1.724)
- Résultats :



Génération 0 : 100% lourd ($D_0 = 1.724$)
 génération 1 : 100% intermédiaire ($D_0 = 1.717$)
 génération 2 : 50% intermédiaire, 50% léger ($D_0 = 1.710$)
 génération 3 : 25% intermédiaire, 75% léger
 génération 4 : 12% intermédiaire, 88% lourd etc.

c) Critique par Cavalieri 1960

Possibilité d'artefact lors de la centrifugation : les molécules filles entièrement légères pourraient être associées avec molécules parentales entièrement lourdes en un agrégat

d) Confirmation par Baldwin et Shooter

- **Méthode** : Utilisent une méthode différente, sans centrifugation : travaillent en substituant BrdU à la place de thymidine. On obtient un brin d'ADN plus stable : se dénature moins facilement thermiquement. On peut suivre la dénaturation thermique en suivant la Densité Optique d'une solution d'ADN : la dénaturation provoque un effet hyperchromique : augmentation brutale de la DO pour une température critique, de 85°C pour l'ADN non substitué.

- **Résultats** : Pour des molécules filles obtenues par réplication semi-conservative, on a une courbe de dénaturation thermique intermédiaire (alors que pour la réplication conservative, on aurait la moitié de la courbe de dénaturation à basse température, et l'autre moitié dénaturée à haute température).

Conclusion :

Dans la réplication de l'ADN :

i) chaque brin de la double hélice guide la synthèse d'un brin nouveau (brins matrices) à partir de matériaux (dntTP) du milieu.

Pb : les brins complémentaires doivent être séparés au préalable...

ii) le brin nouveau est complémentaire de sa propre matrice et égal à l'autre matrice (puisque les liaisons de type Watson et Crick se font entre bases complémentaires).

iii) La multiplication de l'ADN est semi-conservative : chaque nouvelle double hélice formée est hybride

iiii) Par contre, la transmission de l'information est conservative : les deux hélices d'ADN nouvellement formées sont identiques du point de vue de la nature et de l'ordre des bases à l'hélice initiale.

2- Mécanismes de la réplication

2-1- Synthèse d'ADN in-vitro

par Kornberg 1958

- Extraction et purification d'une ADNpolyméraseI (.5 g d'enzyme à partir de 100 kg de colibacilles)
- Mise en contact sur milieu contenant ADNpolyméraseI, les 4 sortes de nucléotides triphosphatés en 5' et un brin simple d'ADN d'E. Coli obtenu par dénaturation douce à 80°C pendant 15 min.
- Résultats :
 - il se forme un double brin
 - la synthèse libère des pyrophosphates
 - diverses méthodes permettent de démontrer que l'ADN obtenu est complémentaire de celui d'amorçage : rapports (A+T)/(C+G) égaux, le nouveau brin peut servir de matrice de réplication ou transcription etc.

2-3- Vitesse de réplication

- Méthode : mesure de l'allongement par unité de temps
- Procaryotes et Virus : 10 000 pb/min soit un chromosome en 30 min environ
- Eucaryotes : 2 à 3 kb/min. mais avec nombreux réplicons soit réplication en quelques heures (cf. cellules HeLa en 3 heures)

2-4- Sens d'élongation du nouveau brin : de 5' vers 3'

(à partir matrice DB présentant une amorce avec 3'OH libre, les complexes enzymatiques progressant sur la matrice vers 5'P du brin codant; le brin néosynthétisé s'allonge vers 3')

a) Rappels

- antiparallélisme des deux chaînes.
- Nécessité de 5'PdNTP possédant une extrémité 3'OH pour la synthèse in vitro
- En théorie, les deux sens de polymérisation sont donc possibles :
 - soit le dNTP se fixe par son extrémité 3'OH sur l'extrémité 5'PPP de la chaîne;
 - soit le dNTP se fixe par son extrémité 5'PPP sur l'extrémité 3'OH de la chaîne

b) Mee expérimentale par phosphodiesterases de venin et de rate

- Matériel d'étude : utilisation de 2 types de phosphodiesterases (enzymes dégradant l'ADN en rompant les liaisons phosphodiester entre les riboses de la chaînes d'ADN) :
 - phosphodiesterase de venin : a une polarité de dégradation ne lui permettant de dégrader l'ADN, que de l'extrémité 3' vers 5'
 - de rate : polarité inverse de 5' vers 3'
- Méthode d'étude :
 - On réalise un marquage bref suivi d'une chasse sur de l'ADN en synthèse in-vitro
 - Puis on fait agir la phosphodiesterase de venin ou de rate et on récupère les nt dissociés (solubles, tandis que le reste de la macromolécules est acidoprécipitable dans du TCA, acide trichloroacétique).
- Résultats :
 - Si on fait agir la phosphodiesterase de venin, les nt récupérés ne sont pas radioactifs
 - Si on fait agir la phosphodiesterase de rate, les nt récupérés sont radioactifs.
- Modélisation de la polymérisation :
Faire schéma

2-5- semi discontinuité de la réplication: fragments d'Okasaki

a) Pb

- antiparallélisme des 2 chaînes. On ne peut avoir 2 types d'enzymes différentes allant dans 2 sens différents, sinon on aurait à un moment un brin seul. Or on n'observe jamais plus de 100 nt simple brin au cours de la réplication.

b) Expérience d'Okasaki :

- Hypothèse d'Okasaki : synthèse sur le brin rétro de petits fragments d'ADN au cours de la réplication, proche de la fourche de réplication
- Pb technique : un fragment si court est synthétisé en moins d'un dixième de seconde. Il faut pouvoir ralentir la synthèse pour pouvoir travailler sur ces fragments.
- Méthode d'étude :
 - On travaille donc sur la synthèse bactérienne à 14°C au lieu de 37°, ce qui donne le temps d'analyser le phénomène.
 - On fait un marquage radioactif à la thymidine tritiée et on prélève à 2s, 7s, 15s, 30 s et 50 s.
- Résultats : courbe de radioactivité en cpm en fonction de la taille des fragments, (séparés du brin matrice à la soude, le brin mère est trop long pour être analysé), taille exprimée par la vitesse de sédimentation en Svedberg au fond du tube de centrifugation dans un gradient de saccharose)

c) Taille des fragments d'Okasaki

- Chez les Procaryotes :

- 2s = 10 S = 1500 nt
- 7s = 12 S
- 15 s = 15 à 20 S
- 30 s = 30 S

Interprétation : plus on laisse de temps, plus les fragments d'Okasaki ont le loisir d'être reliés entre eux (par une ligase)

- Chez les Eucaryotes :

- On fait les mêmes expériences. Le phénomène est plus lent donc c'est plus faciles.
- Résultats : les fragments sont 10 fois plus courts : 200 nt
- Interprétation : lié aux histones tous les 200 nt.

- Critique des conditions non physiologiques de la synthèse : il se pourrait qu'en fait ce ne soit qu'une rupture due à la température qui ferait apparaître ces fragments.

- Réponse : on cherche un mutant thermosensible de l'ADN ligase. Mutant connu chez Phage T4 n° tsA80 où l'ADN ligase est active à 37° mais inactive à 44.

- Résultats obtenus à ces 2 températures : tous les fragments ont la même taille à 44°!

d)- Amorce d'ARN obligatoire sur le brin

Rappels

- Les ADN polymérases ne savent pas fonctionner sans amorce (les ARN polymérases n'ont pas besoin d'amorce)
- Or les chromosomes eucaryotes sont constitués de plusieurs milliard de nt avec un très grand nombre d'ori donc il faudrait un très grand nombre d'amorces.

d1) Approche de Lark, 1968/1970

- Montre que les inhibiteurs de la synthèse protéique (Chloramphénicol) n'ont pas d'effet à court terme sur la synthèse d'ADN
- Par contre, l'inhibition de la synthèse d'ARN (Rifampycine) bloque rapidement mais de façon réversible la synthèse d'ADN
- Hypothèse : des ARN pourraient servir d'amorces!

d2) Approche d'Okasaki

- Matériel et méthode d'étude :

- bactéries perméabilisées (pour ne pas perdre de temps au moment de l'intégration et la phosphorylation des nucléosides), à 14°C (pour ralentir les phénomènes).

N.B. : Système perméabilisé permet d'imiter interactions naturelles chromosome / environnement cellulaire.

Pb : les TTP ne peuvent pénétrer dans le noyau; Seules les bases azotes ou les nucléosides le peuvent. Or la phosphorylation de ces bases ou nucléosides est longue, dans des temps non compatibles avec les phénomènes étudiés. On travaille donc sur des systèmes perméabilisés temporairement en traitant très peu de temps avec du toluène (solvant organique).

a permis de mettre en évidence les fragments d'Okasaki

- On utilise des précurseurs spécifiques de la synthèse de l'ARN et de la synthèse de l'ADN :

UTP tritié ³H spécifique des ARN

TTP au ¹⁴C spécifiques des ADN

- On marque 15 s puis on extrait l'ADN uniquement. Centrifugation sur gradient de vélocité de saccharose

- Résultat :

- On obtient 1% de la radioactivité totale incorporée dans l'ARN
- Les fragments d'ADN obtenus sont divisés en 6 sous-fractions (de A à F) puis soumis séparément à un gradient isopichnique de densité sur CsSO₄ avec du glyoxal (qui sépare les brins filles sans détruire l'ARN, contrairement à la soude!)
- On observe des molécules de densité intermédiaire entre ADN (léger) et ARN (lourd)

- Interprétation :

Il existe des molécules hybrides ADN/ ARN avec liaisons covalentes, dans les sous-fractions A et B

Dans les autres fractions, les liaisons sont rompues : dès que les fragments d'Okasaki sont liés aux fragments suivants.

Donc, l'ARN semble amorcer la synthèse sur le brin rétro

d3) Démonstration de l'existence d'un lien covalent entre ARN et ADN

- Hypothèse de travail : on veut montrer que l'amorce ARN est liée de façon covalente à l'ADN qu'elle amorce; et que cette amorce est en position 5' par rapport au nouveau brin d'ADN i.e présente une extrémité 3'OH comme ancrage avec l'ADN. Donc, on cherche à me le lien 3'OH de l'ARN avec 5'P de l'ADN

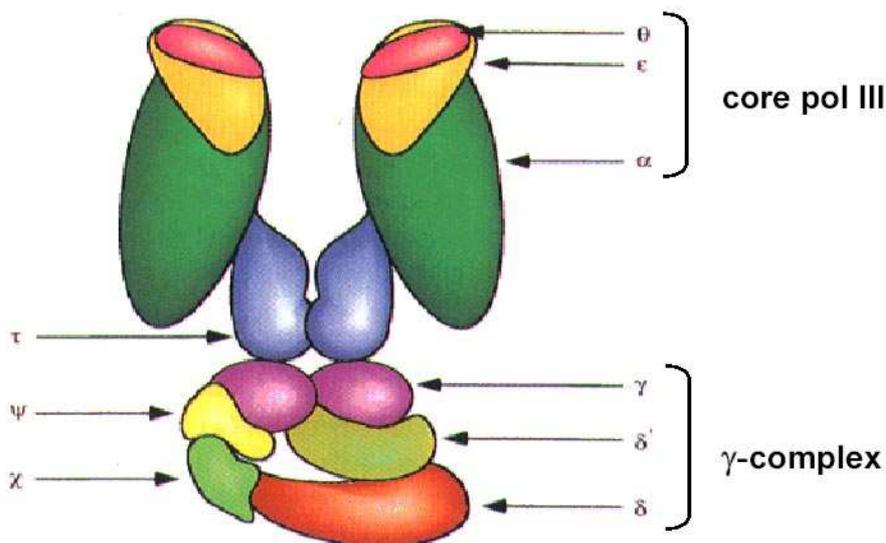
- Matériel d'étude : à 14°C, on fournit les 4 types de désoxyNTP marqués au ³²P, mais pas les précurseurs des ARN donc seul l'ADN est marqué.
- Méthode d'étude : on fait une hydrolyse alcaline des fragments d'Okasaki synthétisés avec de la soude à 0.2 Normale pendant 30 min.
Seul l'ARN est détruit (la soude ne détruit pas l'ADN)
Ce type d'hydrolyse alcaline permet de couper entre le P et le 5', ce qui libère des extrémités 3'P !
- Résultats : on récupère un unique ARN radioactif : celui qui fait la liaison covalente ADN/ARN!!!!

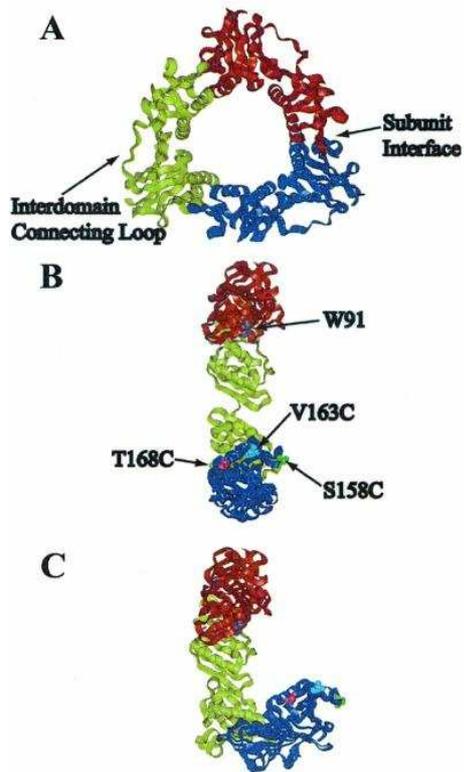
d5) Taille des amorces ARN

- Chez Procaryotes : 5 nt (sur 1500nt du fragment d'Okasaki), avec dans 80% des cas une base Adénosine en position 5'
- Chez Eucaryotes : 12nt (sur 200 nt du fragment d'Okasaki), avec dans 80% des cas une base Adénosine en position 5'

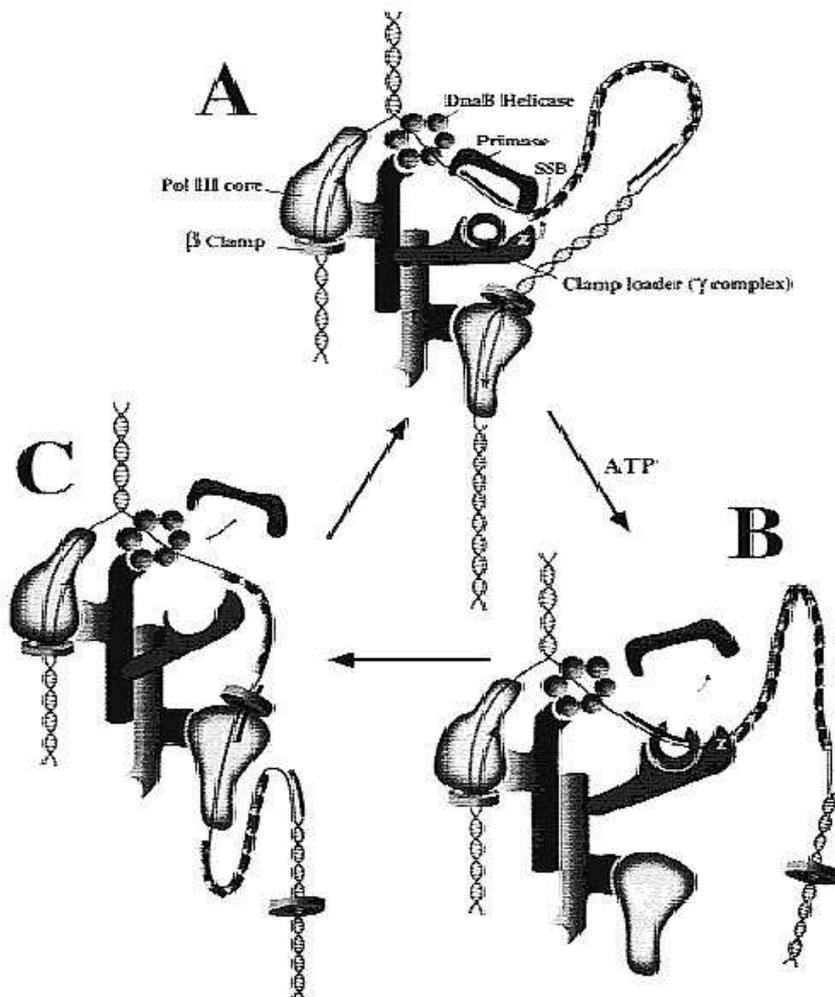
2-6- Modèle moléculaire de la réplication

	<u>prokaryotes</u>	<u>eukaryotes</u>
Pol core	$\alpha, \epsilon, \text{ and } \theta$	pol δ
Clamp loader	γ -complex ($\gamma\delta.\delta'\chi\psi$)	RF-C (5 subunits)
Sliding clamp	β -dimer	PCNA-trimer

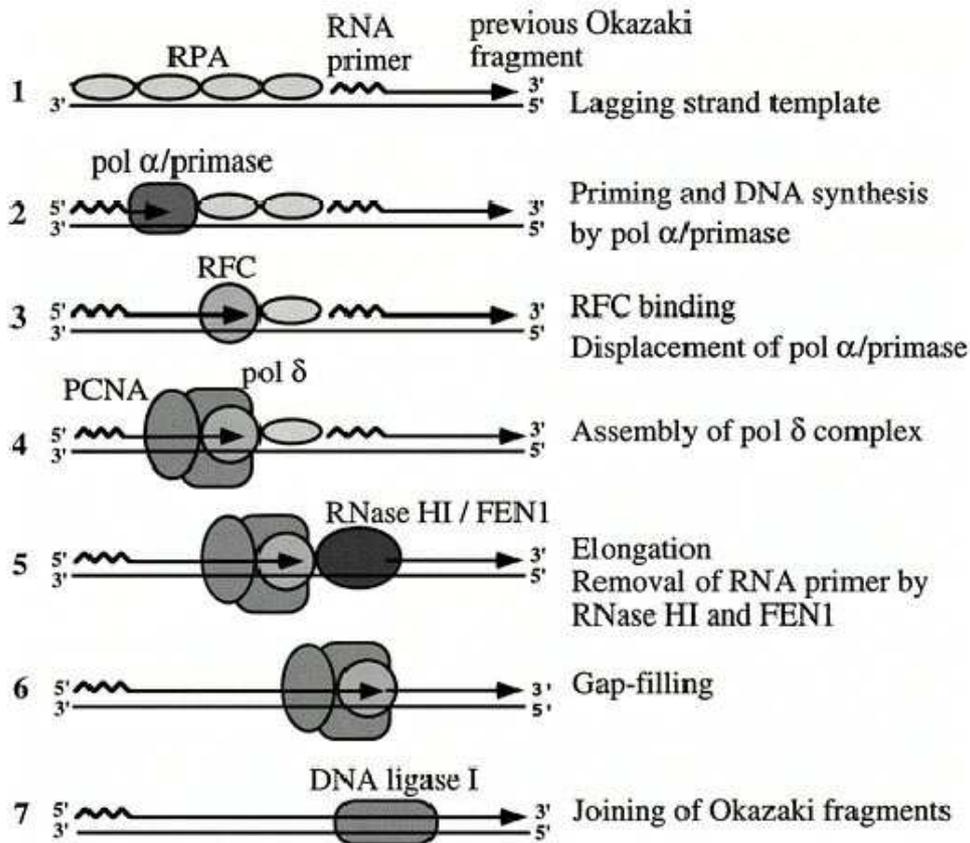




PCNA trimère



Mécanismes à la fourche de réplication



Mécanismes de maturation du brin retard chez les eucaryotes

3- Régulation de la réplication et modifications de séquences lors de la réplication

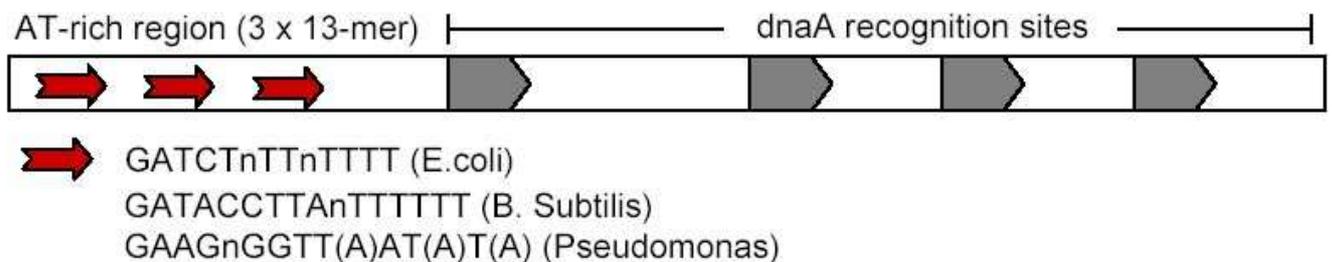
3-1. Contrôle de l'initiation et de la terminaison de la réplication

a) Contrôle de l'initiation par structure de Ori

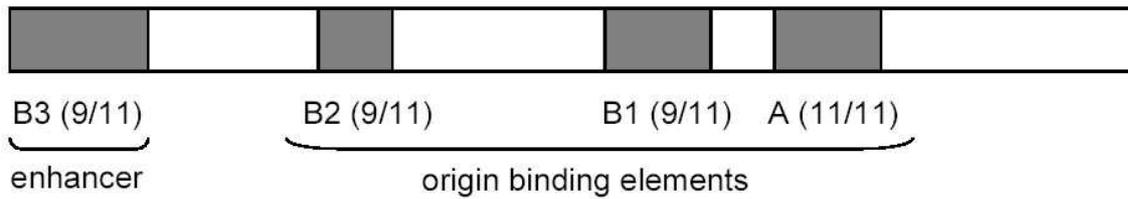
- Nu.

52 nt chez virus SV40 (dont la longueur totale est de 5000 nt) : 27 nt centraux formant palindrome parfait encadré par deux séquences de 10 et 17 nt partiellement symétriques et riches en A/T

- ori chez E. coli : 245 nt contenant 9 séquences très conservées de 9 nt se fixant à l'ADN et 3 séquences de 13 nt riches en A/T à gauche de ori



In *S. cerevisiae*, ARS element of 140 bps consists of 4 separate domains (A, B1, B2, and B3) that functions as the replication origin.

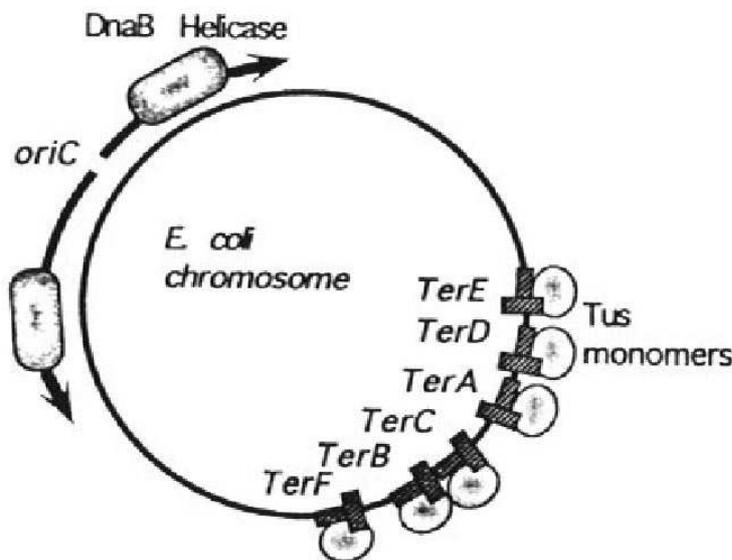


Consensus sequence: 5'-TTTTATATTTT-3'
 A CG A

<u>Construct</u>	<u>In vivo ARS activity</u>
WT	41.5%
—B3—B2—B1—A (15bp)—	32.2%
—B3—B2—B1—A (11bp)—	1.6%
—B1—B1—B1—A—	<0.2%
—B2—B2—B2—A—	<0.2%
—B3—B3—B3—A—	-

10

b) Contrôle de la terminaison



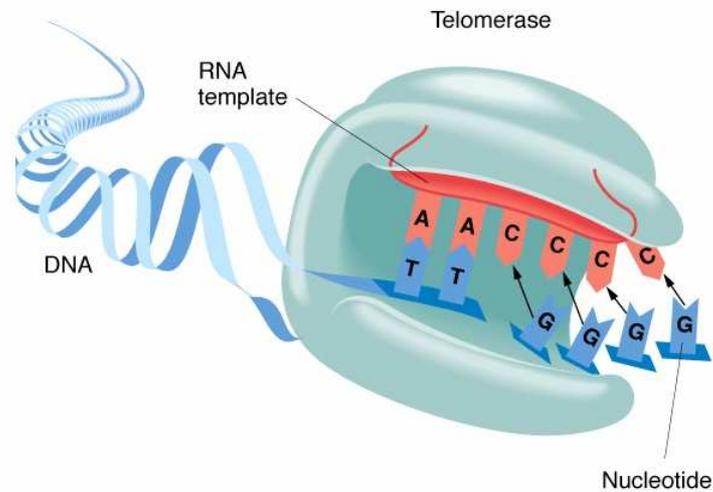
c) Contrôle de l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire

Des protéines dont la plupart ont des propriétés de phosphorylation /déphosphorylation permettent de bloquer le cycle cellulaire à différentes étapes clef, permettant ou non l'entrée dans la phase de réplication

3-2- Réplication de novo sans brin matrice : télomérase (cas des eucaryotes)

- Séquence télomérique TTAGGG chez humain

- La télomérase travaille avec un petit ARN de 160 nt présentant dans sa séquence médiane une portion complémentaire AAUCCC capable de se fixer en bout de portion simple brin d'ADN partiellement dégradé par exonucléases
- catalyse synthèse de TTTTGGGG sur extrémité manquante



3-3- Erreurs de lecture (lors de réplication) et systèmes de correction

a) Erreurs de réplication : mésappariement des formes tautomériques

a1) Erreurs spontanées

- Mésappariements :

- du à une Méthylation atypique :

- ${}^6\text{mC}$ s'associe à T au lieu de G

- du à des Formes tautomériques rares :

- bases imino A s'associe à G au lieu de A-T
- base énole G s'associe à T au lieu de G-C
- fugace et peu fréquent 10^{-4} à 10^{-5}

- du à une Désamination :

- Désamination de **C** (normalement apparié à G) : donne **U**. Devenir : soit réparation, soit mauvais appariement à la prochaine réplication (U-A au lieu de C-G), qui deviendra transmissible à la réplication suivante (T-A au lieu de C-G). Il faut donc deux cycles réplicatifs avant transmission définitive de la mutation.
- Désamination de **A** (normalement associé à T) : donne **hypoxanthine** qui s'associe à C à la première réplication. Devenir : à la prochaine réplication, donnera G-C, avec transmission définitive de la mutation.

- du à une Dépurination

- Principe : rupture de la liaison Désoxyribose - Base purique. On obtient un oseP sans base (l'OH), nommé **motif AP (apurique)**. Certaines liaisons sont plus fragiles que d'autres d'où mutations plus fréquentes sur ces bases là.
- Conséquence : la base en regard n'est plus appariée.
- Devenir de la lésion :
 - Réparation ultérieure, pendant la réplication
 - Ajout au hasard d'une autre base (en général, A).
 - Fréquence : chez l'Homme, 5.000 à **10 000 dépurinations par jour** alors que taux de mutation exprimé est de 10^{-4} donc 99,9% sont corrigées
 - (on verra comment plus loin : endonucléase AP coupe en 5', phosphodiesterase enlève nt, ADNpol I complète et ligase lie)

- Du à une séquence répétée dans l'ADN et un glissement de l'ADNpol :

Insertions et délétions

a2) Erreurs induites par agents mutagènes:

- Remplacements de bases induit par **analogues de bases** : 5BromoUracile forme cétonique rare s'associe à T /forme énole normale s'associe à G. Provoque au bout de deux réplications une réversion
- **Agent intercalant** : acridine orange
 - sur brin matrice : insertion
 - sur brin néosynthétisé : délétion.

b) Systèmes de réparation de l'ADN au cours de la réplication

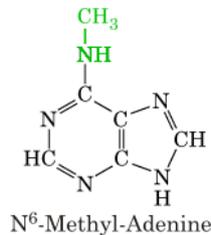
b1) Propriétés exonucléasique des ADNpol

Pol I exonucléase 5' 3' (progressive sur un double brin en hydrolysant les bases "en avant" puis en positionnant à nouveau dans ces emplacements libres des nt) lui permet de réparer un nt erroné (en "repassant" sur plusieurs autres)

Possède également, comme PolIII, activité 3'-> 5' **exonuclease** qui permet de détacher un (des) nt inadéquats (mésappariements) qu'elle vient de positionner ("relecture") et replace à sa place un nt adéquat

b2) Système de correction généralisée :

- Le brin matrice est reconnaissable, par rapport au brin néosynthétisé, du fait d'une méthylation sur Adénines par une méthylase (Dam) qui reconnaît les séquences GATC et méthyle le A. Les enzymes de réparation fixent préférentiellement le brin non méthylé!



- Modèle de réparation (proposé par Meselson) utilisant le système Mut des procaryotes : la protéine MutS reconnaît un mésappariement. Vient se fixer sur l'ADN; La protéine MutL vient alors s'associer au complexe, permettant aux protéines Mut U de se positionner, jouant le rôle d'une hélicase. Le brin nu est immédiatement protégé par des protéines SSB. La protéines Mut U reconnaît le brin néosynthétisé et vient le couper au niveau d'une séquence spécifique CTAG. Le fragment est détaché et le brin matrice complété par ADNpolII.

b3) Système de correction spécialisée :

- Correction des mésappariement G-T :
 - Cause : par désamination du ^{5m}C donne T
 - Le système VSP (Very Short Patch) reconnaît le mésappariement et coupe directement la liaison phosphodiester. C'est une ADNpol I qui vient ensuite reprendre la synthèse du brin sectionné, corrigeant le mésappariement.
- Correction des mésappariement G-A par le système MutY : reconnaît le mésappariement et coupe la base donc crée un site AP (apurique en général ou apyrimidique). C'est une endonucléase spécifique des sites AP qui vient couper la liaison phosphodiester, l'ADNpol I venant agir ensuite.

B/ Conservation de l'information génétique lors de son stockage.

1- Mise en évidence des mutations

Définition préalable d'une mutation

- Modification de l'information génétique (séquence d'ADN transmissible), qui peut être soit spontanée et donc exceptionnelle (10^{-6} à 10^{-15}) soit induite expérimentalement et donc beaucoup plus fréquente.

Mee de mutation préexistantes

- a) Matériel d'étude : Bactéries ex E; Coli souche K12 sensible à phage T1
 - Intérêts d'utilisation des bactéries : Grande population, exigence nutritionnelle simple, **haploïde** donc récessifs (donc la mutation du génotype se traduit directement par une modification du phénotype).

b) Mee d'une variabilité de la population bactérienne

- **innoculum** (petit nombre de bactéries dans un milieu très dilué) en culture (multiplication 10^7 en 24 h); isolement d'une souche; culture pure analysée par test de résistance à infection virale (phage T1 par ex).
- si de 10^3 à 10^6 cellules dans l'innoculum, toutes les cellules meurent suite à l'infection;
- si de 10^7 à 10^8 cellules, il apparaît clone résistant au phage T1; multiplication de la colonie

c) Hypothèse : 2 origines possibles de mutations

- Mutation **préexistante** spontanée
- Mutation **adaptative** = "immunité acquise" (un individu s'adapte à un nouvel environnement au temps t)

d) Distinction expérimentale entre origine spontanée et origine adaptative des mutations :

Expression des mutations et sélection phénotypique

- Rappels : La cellule bactérienne en culture **peut accumuler jusqu'à 4 chromoïdes** (deux cycles réplicatifs) avant de se diviser.
- Cas d'une mutation **dominante** : la cellule en croissance ayant plusieurs chromosomes dont un seul est muté, il faut attendre au moins 4 divisions avant que le nombre de mutant n'augmente. D'autre part, selon que la mutation est sur le brin sens ou anti, l'expression sera plus ou moins rapide (mini-latence jusqu'à ce que le brin anti serve de matrice au brin complémentaire, modifié, qui va être transcrits donc exprimé)
- Cas d'une mutation **récessive** : Le phénotype ne s'exprime pas tant qu'une molécule du phénotype dominant est présent dans le cytoplasme. Il faut attendre le turn over total des molécules cytoplasmiques.
- Notion de **temps de latence** dans l'expression d'une mutation : il faut réaliser des **cultures d'expression** augmentant le nombre de clone dans la colonie **en l'absence de facteur de sélection**.

- Test de fluctuation : à partir d'une population sensible (homogène) on ensemence 20 boîtes différentes. On soumet 10 de ces boîtes de culture au phage T1 : toutes les colonies meurent.

On laisse l'autre lot de 10 boîte en culture sans le phage puis on les réétable et on ne fait agir le phage T1 qu'après réétalement : il apparaît une grande variabilité (des clones résistants apparaissent)

Interprétation : invalide l'hypothèse de mutation adaptative pour ce type de facteur de sélection (les mutants existaient déjà avant étalement, en absence de pression de sélection puisque le phage n'était pas présent).

- Test de Newcombe : à partir d'une population homogène contenant 10^4 cellules, on fait une culture de multiplication que l'on divise en 2 lots dont un seul est réétalement (râteau). Puis on ajoute le phage sur les deux lots et on compte le nombre de colonies dérivées d'un clone résistant : 240 pour le lot non réétalement, 12.000 pour le lot réétalement.

Interprétation : le râteau sépare des clones indiscernables dans l'autre lot (qui sert de témoins négatif). Valide l'hypothèse de mutation préexistante (l'étalement donne d'avantage de place aux bactéries pour croître et donc la mutation devient

visible car un clone résistant donne une grosse colonie au lieu d'une petite non détectable!).

Limite de ce test : on met toujours en présence les bactéries avec le phage donc il y a toujours risque de mutation adaptative (!).

- Méthode des répliques : tampon de velours sur boîte de Pétri contenant la culture mère. Application du tampon imprégné de bactéries sur une nouvelle boîte de Pétri et culture des répliques. Exposition des répliques au phage T1 : on localise les colonies répliquées résistantes. A l'aide de repères sur les boîtes de Pétri, on récupère sur la colonie mère les souches qui ont donné les clones (sans faire subir à la colonie mère de contact avec le phage T1).

Technique classiquement utilisée actuellement pour travailler sur souches mutantes spontanées (**criblage de plusieurs facteurs de sélection** à partir d'une seule culture mère conservée; un facteur de sélection par réplique velours).

L'autre intérêt est de pouvoir détecter des **clones sensibles à un facteur de sélection** (et qui sont donc détruits quand on les expose à ce facteur!!!).

Mise en évidence de mutations adaptatives

a- Hypothèse de Cairns (1988) : origine **mixte** des mutations , préexistantes/adaptatives.

- Application de l'hypothèse à un exemple : les mutants Lac⁻ (qui sont incapables de dégrader le lactose), mis en culture sur du lactose (sans glucose) ne se développent pas, sauf les mutants. S'il existe des mutations adaptatives, on s'attend à trouver des mutations plus nombreuses sur les cultures sur lactose que sur les cultures sur milieu minimum (glucose fourni).

b- Vérification expérimentale de l'hypothèse :

Matériel et Méthode : on travail sur des doubles mutants Lac⁻ Trp⁻ (incapables de synthétiser le tryptophane : il faut le fournir dans le milieu) en culture sur milieu minimum (qui exerce double pression de sélection).

Résultats : Les doubles mutations reverses sont extrêmement peu probables (10^{-14}) or on en retrouve un grand nombre.

c- Interprétation = modèle adaptatif de Cairns :

Confronté à un stress, la bactérie met en route un système de réparation de l'ADN qui va induire de nombreuses erreurs sur les ARN. La pression de sélection permet de sélectionner une protéine qui dégrade le lactose. Un signal (?) déclencherait alors une Reverse transcriptase modifiant l'ADN, le rendant capable de dégrader le lactose.

Techniques de sélection des mutants.

- **Croissance relative** : conditions ne permettant que le croissance des mutants.

- **Enrichissement** : conditions ne permettant que la croissance des souches parentales, les mutants ne se développant pas.

On tue alors les cellules en division :

- par antibiotique comme pénicilline qui empêche transamination et donc réticulation de la paroi et donc lyse cellulaire;
- analogues structuraux comme 5 Bromo-uracile; poison (s'intercalant dans l'ADN) analogue au lactose qui ne s'introduit que dans les cellules capables d'utiliser le lactose donc pas dans les mutants;
- suicide radioactif avec incorporation de lipoprotéines marquées à Arg* dont le taux croissant dans les membranes tue les cellules en croissance).

Limites de la technique :

- Les mutants auxotrophes possèdent un **pool** d'acides aminés qui peut permettre à un mutant de commencer sa croissance, ce qui provoque sa destruction.

- La **lyse** des cellules souches parentales libère des aa qui "réveillent" les mutants et provoque leur mort
- Lorsqu'une bactérie accumule trop d'aa (cas des mutants auxotrophes d'une voie métabolique bloquée au milieu), elle finit par les sécréter; par **syntrophie**, les mutants proches et complémentaires de la voie métabolique se "réveillent" et meurent!

- **Détection visuelle des mutants** : sur substrat chromogène

- ex. : dérivé nitrophénylé de β -gal qui devient jaune après hydrolyse.
- Sensibilité : on peut détecter de très faibles quantités : 1 molécule de β galactosidase par cellule! Mais trop précis : si forte expression, ça fait tâche!
- Pb des dérivés solubles qui font une tâche jaune sur plusieurs colonies. On travaille maintenant avec des dérivés insolubles comme X-gal, qui précipite après lyse cellulaire.

2- Diversité des types élémentaires de mutation

1- Mutations sans modification du cadre de lecture

a) Principe : un seul codon touché donc perturbation isolée sur la chaîne polypeptidique.

b) Mécanismes :

- Substitution d'une base par une base
- TRANSITION : purique donne purique (A en G ou inversement) ou pyrimidique donne pyrimidique (C donne T ou inversement)
- TRANSVERSION : Purique donne pyrimidique ou inversement (A en T ou C, par ex.)

c) Conséquences :

- Mutation **Non Sens** : Apparition d'un codon stop (ex. : UGC donne UGA, ce qui échange Cys avec stop)
- Mutation **faux sens** : échange de deux acides aminés aux propriétés différentes (ex. : AAG codant pour Lys donne GAG codant pour Glu)
- Mutation **conservatrice** : échange de deux acides aminés ayant des propriétés voisines (ex. : AAA codant pour Lys basique donne AGA codant pour Arg basique)
- Mutation **silencieuse** : touche le nt flottant du codon(en général le troisième) ex. : UUU en UUC, qui codent tous les deux pour Phe.

2- Mutations avec modification du cadre de lecture

a) Principe : toute la chaîne polypeptidique est perturbée, sauf si modifications modulo 3.

b) Mécanismes :

- Délétion simple
- Insertion simple
- Insertions ou délétions multiples.

3- Mutations reverses (par opposition à directes)

a) Principe : Retrouve le phénotype sauvage

b) Mécanisme :

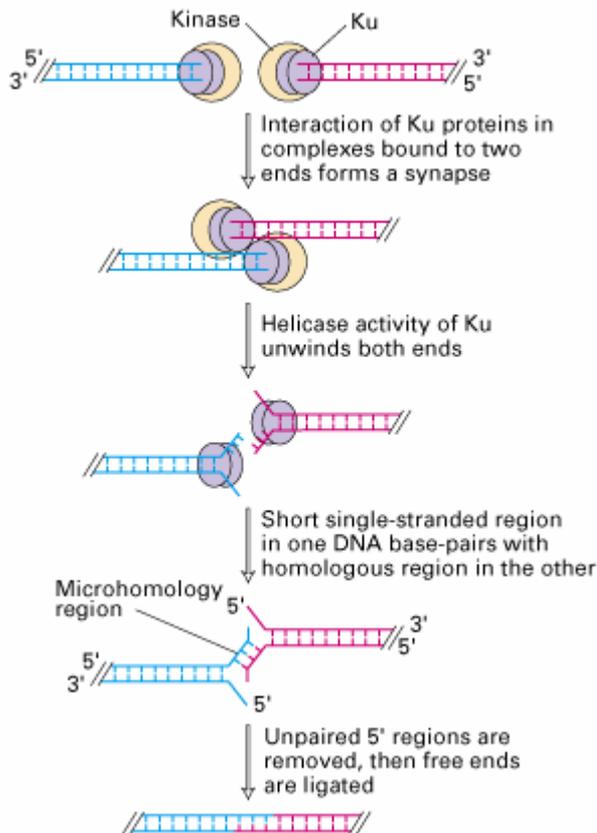
- Mutation reverses **vraies**
- Mutations reverses **suppressives** : on retrouve le phénotype mais pas le génotype

3- Effets de quelques mutagènes naturels

Altération provoquée de l'ADN

a) Par agents physiques :

- **Rayons X** provoquent **cassure** simple (comme ions métalliques ou peroxydes) de liaison phosphodiester. Devenir : action d'une ligase qui répare normalement. Si deux brins touchés en face, possibilité d'inversion des brins au cours de la réparation.



- **U.V.** provoquent **dimérisation** (des thymines en général T=T, les Adénines complémentaires sont non appariées) qui bloque la fourche de réplication (photoproduit T-Cen 6-4 également).

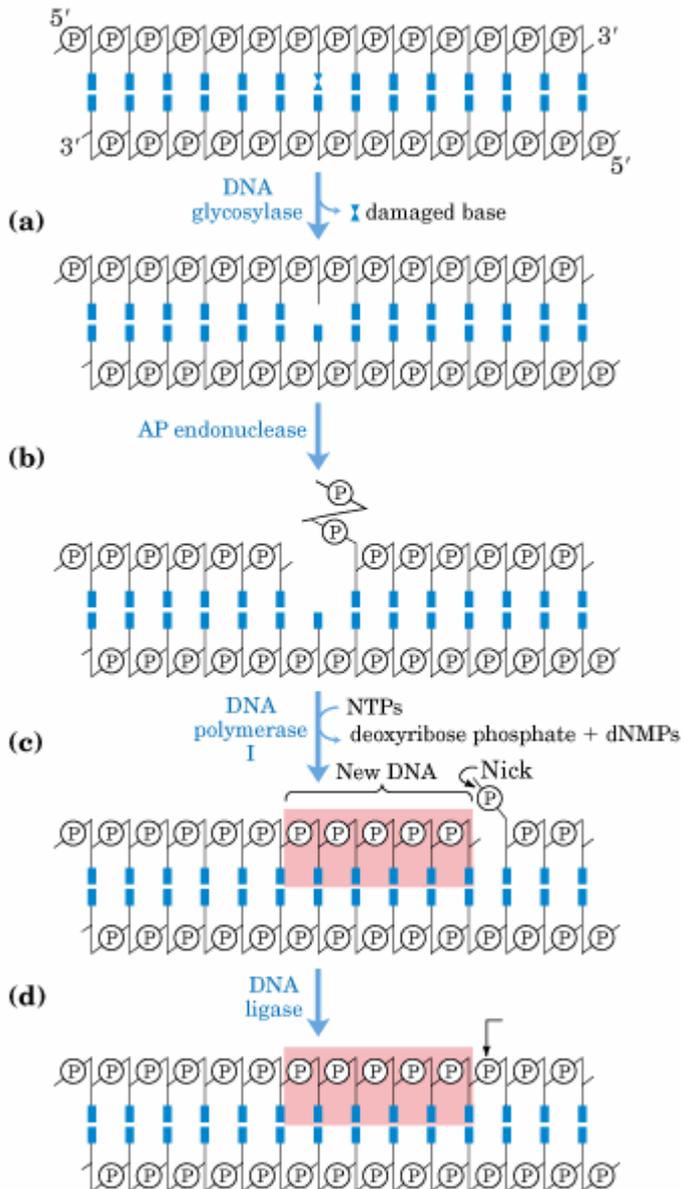
b) Par agents chimiques :

- acide nitreux : provoque désamination
- agents alkylants (ex: nitrosamine) : provoquent méthylations atypiques
- liaisons croisées par antibiotiques, ions nitrite : liaisons **covalentes** entre brins complémentaires.

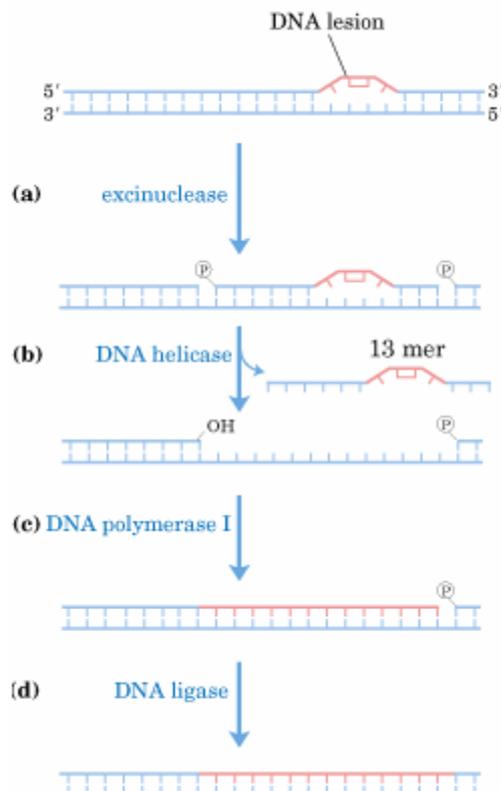
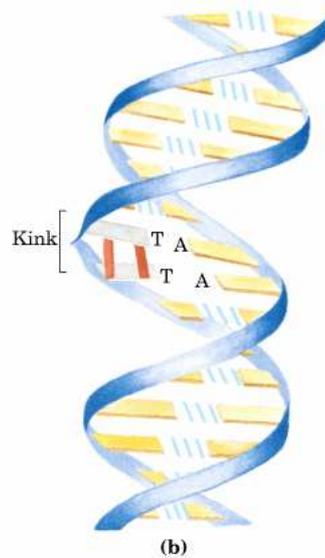
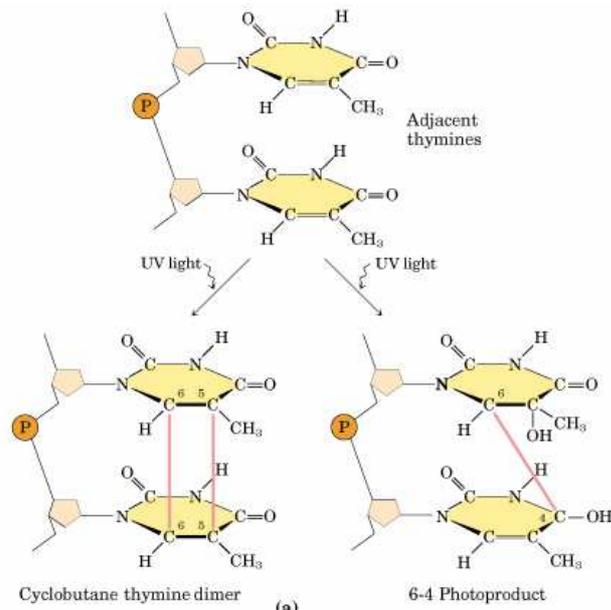
4- Mécanismes de réparation.

a) Remplacement des sites AP :

- Coupure en 5' par endonucléase AP
- Enlèvement du nucléoside par phosphodiesterase
- Ajout de nucléotide par ADNpol I
- Action d'une ligase



b) Réparation des dimères de thymine :



- **Excision/remplacement** en 4 étapes :

- exinucléase clive en 5' par rapport au dimère et en 3' plus loin (coupure double qui n'existe pas chez endonucléase)
- Exonucléase catalyse l'enlèvement du dimère et d'un segment contenant quelques nucléotides sur la même chaîne dans le sens 5' vers 3'
- ADNpol I comble le trou
- Ligase

- **Photoréactivation** induite par U.V. :

- Photolyase se fixe sur brin d'ADN déformé par dimère

- Absorption d'un photon de lumière violette qui active l'enzyme : le dimère est clivé et les 4 liaisons entre les deux couples AT se reforment
- L'enzyme se dissocie ensuite

c) Système By-Pass d'E. coli

- mee sur mutants du système by-pass : ne résistent pas aux fortes U.V : Mise en route d'un système de contournement dans le cas de fortes irradiations aux UV
- Ensemble de protéines mal connues qui seraient synthétisés suite à échecs répétés de réplication.

Les protéines du système SOS se fixeraient à l'ADNpol ou auraient une action ADNpol et permettraient de passer les dimères.

- Une séquence est ajoutée sans brin modèle : elle est aléatoire donc erronée
- Conséquence : système très mutagène
- Mais principe du moindre mal : permet la survie à court terme de la colonie