

• RÉPLICATION DE L'ADN

Introduction

Au cours de la vie de la cellule (cycle cellulaire), le DNA doit être dédoublé pour que chaque cellule fille reçoive un génome complet dans son noyau.

Cette synthèse se produit à la **phase S** (eucaryote) grâce à l'activité de la **DNA-polymérase**

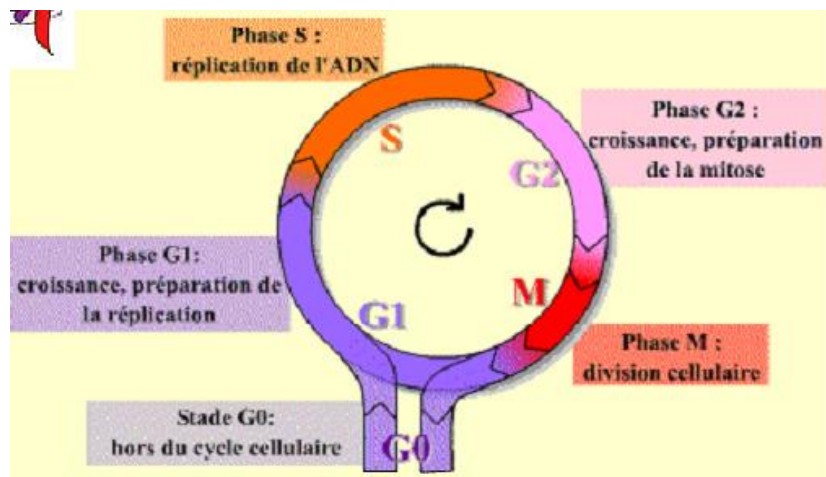
Définition:

La réplication est un processus selon lequel un nouveau brin d'ADN est synthétisé à partir d'un brin matrice d'ADN, dont il est complémentaire.

La réplication est processus extraordinaire, important et complexe, dont toute vie dépend. Nous présenterons d'abord le mode de synthèse de l'ADN dans sa globalité et examinerons ensuite plus en profondeur, le mécanisme de sa réplication

REPLICATION

- **Synthèse d'acide désoxyribonucléique qui reproduit exactement le génome d'une cellule au cours du cycle cellulaire afin de préparer la division de cette cellule.**

**.Les caractéristiques de la réplication**

La réplication est **semi-conservative**. Après ouverture de la double hélice d'ADN, chacun des deux brins est utilisé comme matrice pour la synthèse d'un nouveau brin. Les molécules d'ADN synthétisées sont alors constituées d'un **brin d'origine** et d'un **néoformé**.

La réplication, chez les procaryotes et les eucaryotes, est **bi-directionnelle**, la synthèse d'ADN se produisant de part et d'autre d'une même origine de réplication. Deux complexes protéiques se

mettent en place au niveau d'une origine de réplication, formant deux fourches de réplication progressant dans deux directions opposées.

La réplication est **asymétrique**. L'un des deux brins est synthétisé de **façon continue** (brin précoce ou avancé) tandis que l'autre est synthétisé sous forme de fragments connus sous le nom de fragments d'Okazaki (brin **tardif ou retardé**).

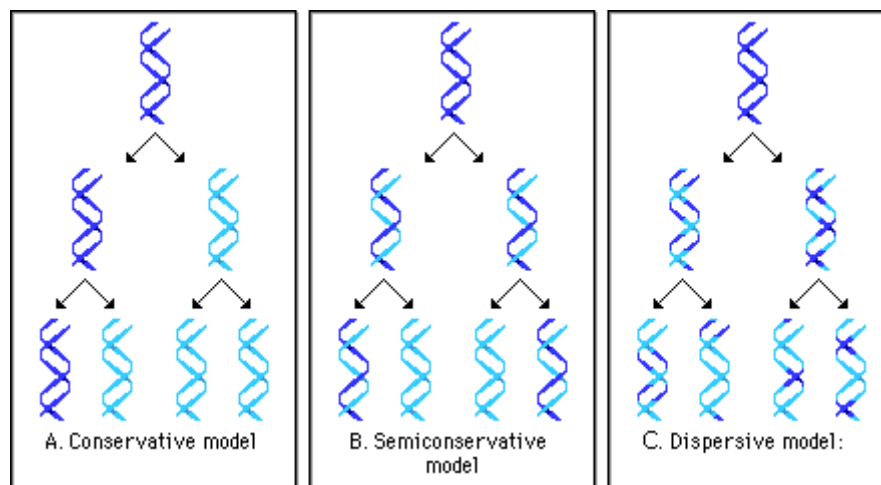
Mode de réplication ; conservative Semi conservative ou dispersive ?

- **Semi conservative** : chaque molécule d'ADN répliquée est constituée d'un **ancien** et d'un **nouveau** brin d'où le nom de réplication semi conservative.

Deux autres modes de réplication reposant sur l'utilisation des brins parentaux comme matrice sont possibles :

- Dans la **réplication conservative**, les **chaines** polynucléotidiques complémentaires sont synthétisées comme décrit précédemment. Après synthèse, néanmoins les deux nouveaux brins s'associent et les deux brins parentaux se réassocient. L'hélice originale est donc conservée.

- Dans le second mode alternatif, appelé **réplication dispersive**, les brins parentaux sont repartis entre les deux nouvelles doubles hélices après réplication. Par conséquent, chaque brin contient à la fois de l'ADN parental et de l'ADN nouvellement synthétisé. Ce mode impliquerait le clivage des brins parentaux pendant la réplication.



Mise en évidence expérimentale de la réplication semi conservative chez les bactéries par Meselson et Stahl (1957)

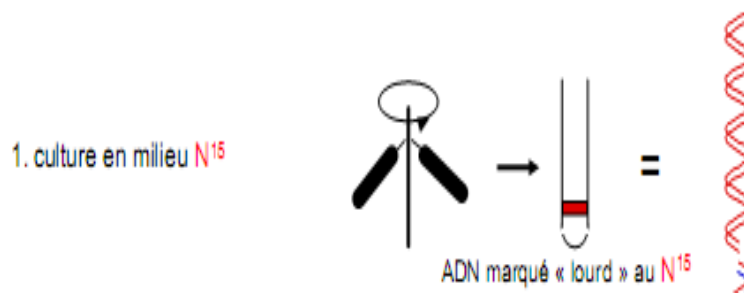
Ils cultivent *E. coli* pendant plusieurs générations dans un milieu ayant pour unique source azotée du $^{15}\text{NH}_4\text{CL}$, isotope lourd d'azote (les molécules contenant ^{15}N sont plus dense que celles contenant du ^{14}N). Après plusieurs générations, toutes les molécules azotées des bactéries, dont les bases azotées de l'ADN contenaient l'isotope lourd.

Un élément essentiel au succès de cette expérience est la possibilité de distinguer l'ADN contenant ^{15}N et de l'ADN contenant ^{14}N .

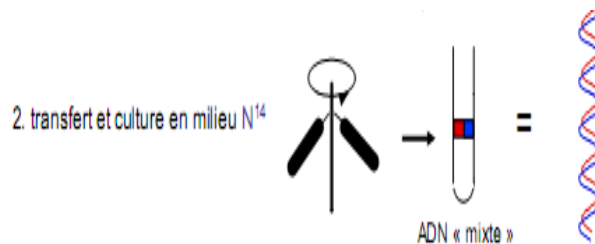
Le protocole expérimental implique l'utilisation de la technique de sédimentation à l'équilibre par centrifugation.

L'ADN ^{15}N atteindra le point d'équilibre plus près du fond du tube que l'ADN ^{14}N .

Dans cette expérience, les *E. coli* uniformément marquées au ^{15}N ont été transférées dans milieu ne contenant que du $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$. Par conséquent l'ADN néosynthétisé lors de la réplication ne contenait que l'isotope léger ^{14}N . Les bactéries s'y sont multipliées sur plusieurs générations au cours desquelles des échantillons ont été prélevés après chaque cycle réplcatif. L'ADN a été isolé pour chaque échantillon et soumis à une sédimentation à l'équilibre par centrifugation.

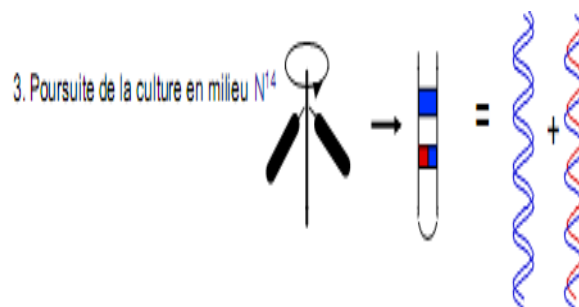


Après une génération, l'ADN isolé n'était présent qu'en une bande de densité intermédiaire, résultat attendu pour une réplication semi conservative au cours de laquelle chaque molécule répliquée est composée d'un nouveau brin ^{14}N et d'un ancien brin ^{15}N .

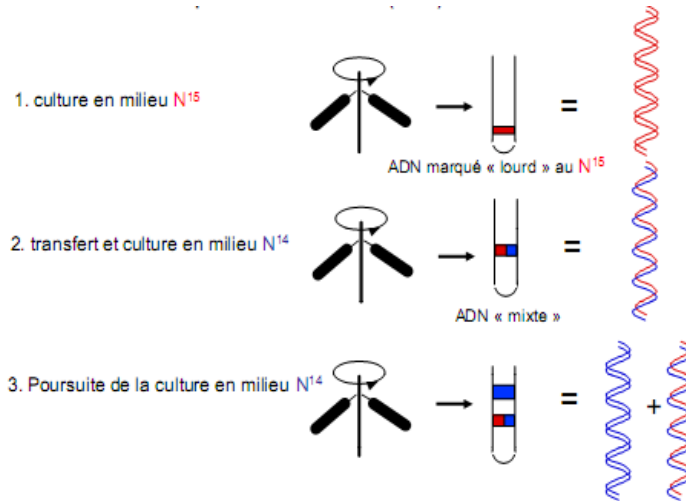
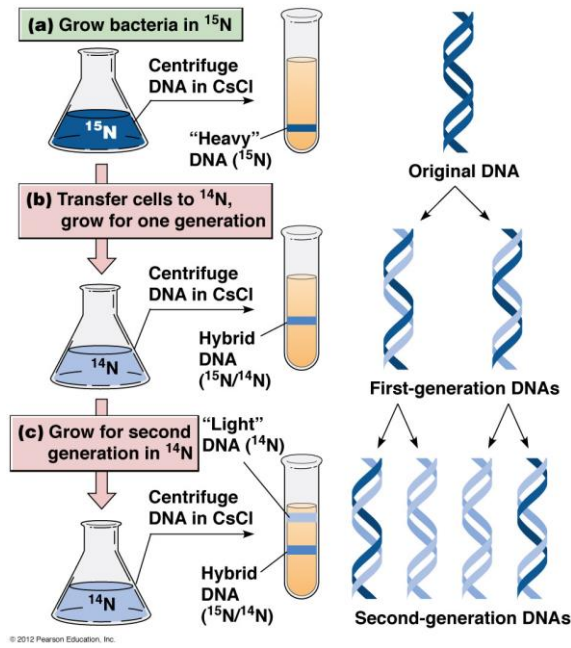


Ce résultat n'était pas compatible avec l'hypothèse de la réplication conservative pour laquelle deux bandes distinctes auraient dû apparaître. Ce modèle de réplication a donc pu rejeter.

Après deux divisions, les échantillons de l'ADN se séparaient en deux bandes de densité différente. Une bande intermédiaire et une plus légère correspond au position de ^{14}N dans le gradient.



Des résultats similaires ont été obtenus après la troisième génération, sauf que la proportion de la bande légère avait augmenté. Ceci était une fois de plus en accord avec l'interprétation que la réplication soit semi conservative.



Predicted results

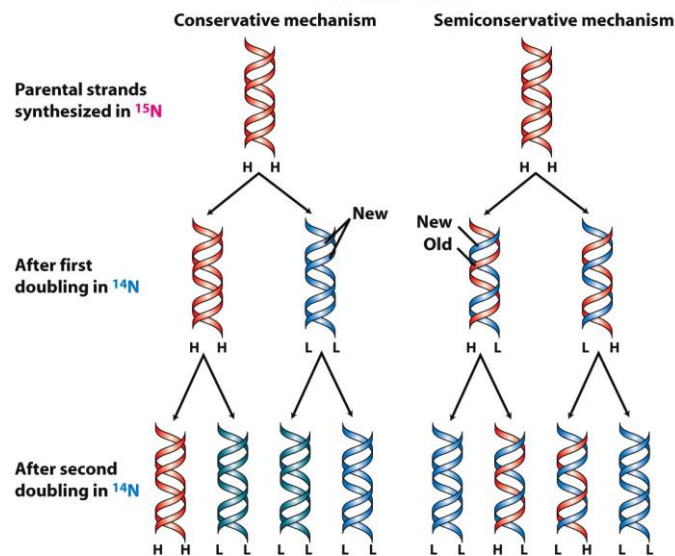
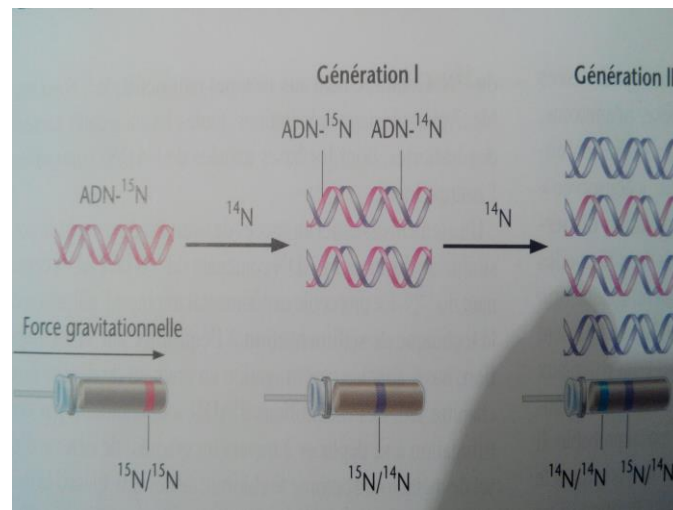


Figure 4-29a
 Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company



Les origines, les fourches et les unités de réplication

Pour mieux comprendre la réplication semi-conservative, considérons quelques points précis.

Le premier concerne l'origine de réplication. Où commence la réplication de l'ADN sur un chromosome ? Y a-t-il une seule origine, ou la synthèse d'ADN débute-t-elle en plus d'un site ?

La position de l'origine est-elle aléatoire ou est-elle localisée dans une région spécifique du chromosome ?

Le second concerne la direction de la synthèse. Quand la réplication commence, se propage-t-elle dans une seule direction ou dans les deux directions ? En d'autres termes, la réplication est-elle unidirectionnelle ou bidirectionnelle ?

Pour répondre à ces questions, il faut introduire deux termes.

Premièrement, quelle que soit la région du chromosome où la réplication se déroule, les brins de l'hélice sont déroulés, créant ce qu'on appelle **une fourche de réplication**. Une telle fourche apparaît au point de départ de la synthèse puis se déplace le long du double-brin d'ADN lors du processus de réplication. Si la réplication est bidirectionnelle, deux fourches seront présentes, qui migreront dans des directions opposées, s'éloignant de l'origine.

Deuxièmement, la longueur d'ADN répliquée à la suite d'une initiation à une origine unique est nommée **réplicon**. Chez *E. coli*, le réplicon correspond au génome entier de 4,2 Mb (4,2 millions de paires de bases).

Les réponses à ces questions sont désormais claires. John Cairns a suivi la réplication chez *E. coli*, en utilisant des précurseurs radioactifs de l'ADN et l'autoradiographie. Il a pu démontrer qu'il n'y a qu'**une origine de réplication** chez cette bactérie, appelée **ori C**. Puisque la synthèse d'ADN chez les bactériophages et les bactéries ne débute qu'en un seul point le chromosome entier constitue un réplicon.

La présence d'une origine unique caractérise les bactéries dont le génome n'est qu'un chromosome circulaire.

D'autres résultats faisant appel à l'autoradiographie ont démontré que la réplication est bidirectionnelle, s'éloignant de **oriC** dans les deux directions. Deux fourches qui migre en sens inverse sont donc créés. Ces deux fourches finissent par fusionner lorsque la réplication semi conservative arrive à sa fin au niveau d'une **région nommée ter**.

Chez les eucaryotes chaque chromosome contient **plusieurs origines de réplication**.

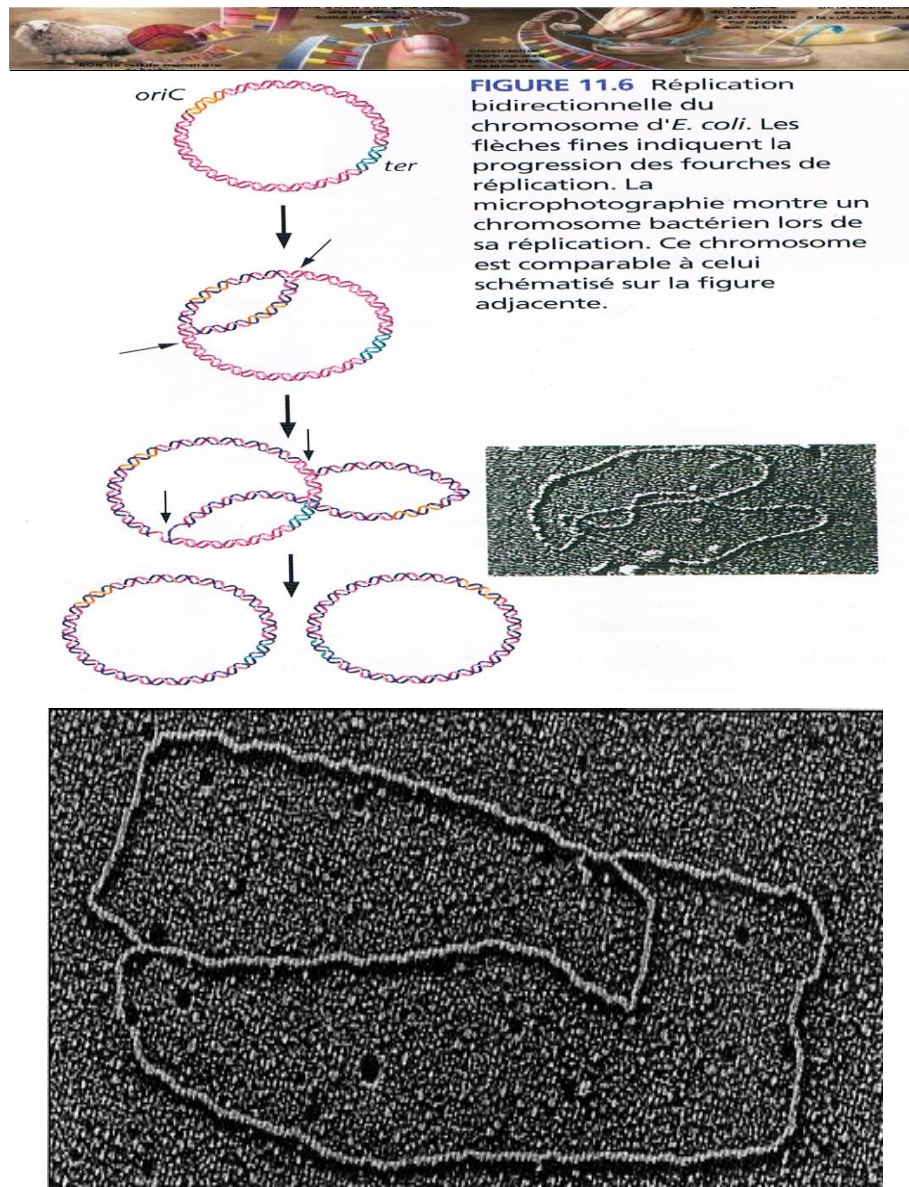


FIGURE 11.6 Réplication bidirectionnelle du chromosome d'*E. coli*. Les flèches fines indiquent la progression des fourches de réplication. La microphotographie montre un chromosome bactérien lors de sa réplication. Ce chromosome est comparable à celui schématisé sur la figure adjacente.

Un chromosome circulaire en cours de réplication

Le réplicon, unité de réplication

Le réplicon est une région du chromosome délimitée par une origine de réplication et une terminaison.

L'ADN bactérien constitue un seul réplicon, observable en microscopie électronique sous la forme d'œil de réplication, tandis que chaque chromosome eucaryote possède un grand nombre de réplicons.

Lorsque les fourches de réplication se déplacent autour du cercle, on obtient une structure qui a la forme de la lettre grecque thêta

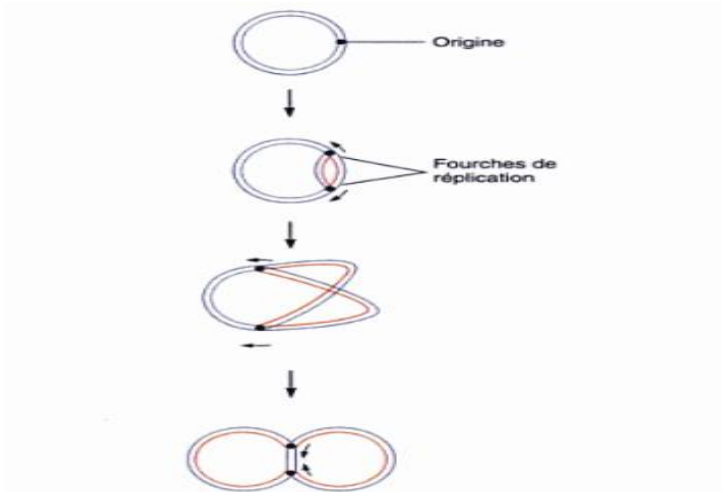


Figure 11.11 La réplication bidirectionnelle. La réplication du génome circulaire de la bactérie. Deux fourches de réplication se déplacent autour de l'ADN formant des intermédiaires en forme de thêta. Le brin d'ADN nouvellement synthétisé est en rouge.

!h6

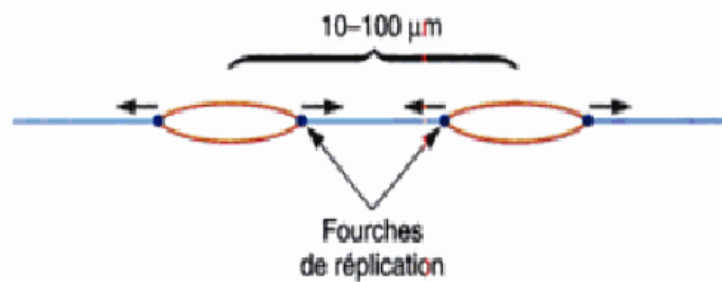
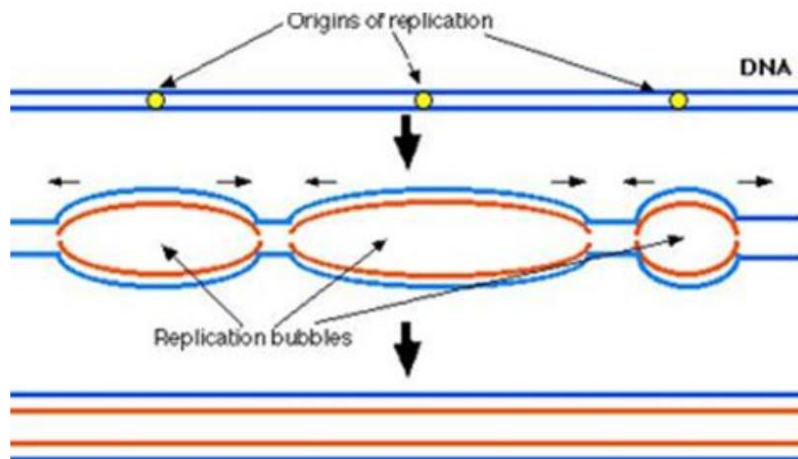


Figure 11.13 La réplication de l'ADN eucaryote. La réplication est initiée à intervalles de 10 à 100 μm et les fourches de réplication se déplacent en s'éloignant de l'origine. L'ADN nouvellement copié est en rouge.



• **Les L'ADN polymérase**

Les ADN polymérase sont les enzymes responsables de la polymérisation des nucléotides lors de la réplication de l'ADN.

Les ADN polymérase procaryotes sont de 3 types (I, II et III) et les ADN polymérase eucaryotes de 5 types (α , β , δ , ϵ et γ).

L'ADN polymérase I

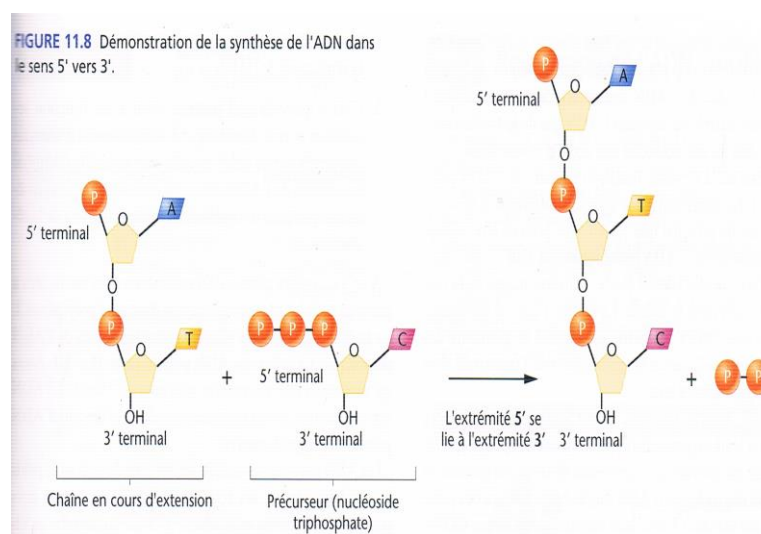
Les premières études enzymologiques portant sur la réplication de l'ADN sont celles de Komberg et de ses collègues. Ils isolèrent une enzyme d' *E. Coli* capable de diriger la synthèse d'ADN dans un système acellulaire (in vitro). L'enzyme est désormais appelée ADN polymérase I, puisqu' elle a été la première groupe d'enzymes similaires à être isolée.

Komberg a déterminé qu'il y avait deux conditions majeures pour la synthèse d'ADN in vitro par l'ADN polymérase I:

- (1) la présence des quatre désoxyribonucléosides triphosphate (dNTPs) et
- (2) la présence d'une matrice d'ADN.

- Si l'un des quatre désoxyribonucléosides triphosphates n'est pas dans le mélange réactionnel, aucune synthèse n'est détectée. Si des dérivés de ces précurseurs (nucléotides ou nucléosides diphosphates) sont utilisés, la synthèse n'intervient pas non plus.

- Le dNTP précurseur contient **trois groupements phosphate** attachés au **carbone 5'** du désoxyribose. Lorsque les **deux phosphates terminaux sont clivés** au cours de la synthèse, le phosphate restant attaché au carbone 5' se lie de façon covalente au groupement 3'-OH du désoxyribose auquel il est ajouté



Par conséquent, l'élongation de la chaîne se fait dans la direction 5' vers 3' par l'addition, à l'extrémité 3 d'un nucléotide à la fois. Chaque étape fournit un nouveau groupement 3'-OH

accessible pour participer à la prochaine addition d'un nucléotide tant que la synthèse d'ADN se poursuit.

A ce jours, d'autres ADN polymérase ont été isolées. Le tableau ci-après compare plusieurs caractéristiques.

Les ADN polymérase nécessitent un certain nombre de conditions d'activités :

- Les 4 désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate (dATP, dTTP, dCTP et dGTP)
- Des ions magnésiums (Mg²⁺) qui stabilisent l'ADN et les protéines.
- Une matrice d'ADN (mono ou bicaténaire).
- Une amorce d'ADN ou d'ARN ayant une extrémité 3'OH libre.

- ADN polymérase (activité de copie 5' → 3') : III > I, II

	ADN polymérase I	ADN polymérase II	ADN polymérase III
Structure	Monomérique	> 4 sous unités	> 10 sous unités (core + clamp + protéines associées)
Rôle	Elimine les amorces lors de la réplication + réparation	Réparation de l'ADN	Réplication de l'ADN génomique
Polymérisation 5' → 3'	Oui	Oui	Oui (sous-unité α)
Exonucléase 3' → 5'	Oui	Oui	Oui (sous-unité ε)
Exonucléase 5' → 3'	Oui	Non	Non
Vitesse de polymérisation	16-20 bases / sec	5-10 bases / sec	250-1000 bases / sec

Tableau récapitulatif des principales polymérase procaryotes (il existe d'autres polymérase : Pol IV et V)

Nous terminerons cette partie en insistant sur la complexité de l'ADN polymérase III. Sa forme active, appelée holoenzyme, est un dimère contenant 10 sous-unités polypeptidiques différentes dont le poids moléculaire est de 900 000 Da.

La plus grande **sous-unité, α**, fait 140 000 Da et, avec **les sous-unités ε et θ**, constitue le **cœur de l'enzyme** responsable de l'activité de polymérisation. La sous-unité α est responsable de la polymérisation nucléotidique sur chaque brin matrice, alors **que la sous-unité ε** possède l'activité **exonucléase 3'-5'**.

Un second groupe de **cinq sous-unités (γ, δ, δ', χ et ψ)** forme le **complexe dit γ**, qui est impliqué dans la liaison de l'enzyme à la matrice au niveau de la fourche de réplication. Cette fonction enzymatique requiert de l'énergie et dépend de l'hydrolyse d'ATP.

La sous-unité β sert de « collier de serrage » (clamp en anglais) et empêche que le cœur de l'enzyme ne se détache de la matrice lors de la réplication.

En fin, la **sous unité τ** entraîne la dimérisation du cœur de la polymérase facilitant la synthèse simultanée des deux brins de l'hélice au niveau de la fourche de réplication.

L'holoenzyme et plusieurs autres protéines au niveau de la fourche de réplication forment ensemble un énorme complexe (presque aussi grand qu'un ribosome) appelé **réplisome**.

TABLEAU 11.3		SOUS-UNITÉS DE L'HOLENZYME ADN POLYMERASE III	
Sous-unité	Fonction	Regroupements	
α	Polymérisation 5'-3' Exonucléase 3'-5' Assemblage du cœur	Cœur de l'enzyme : allonge la chaîne polynucléotidique et corrige les erreurs	
ϵ			
θ			
γ δ δ' χ ψ	Fixe l'enzyme sur la matrice (permet la fixation du clamp)	Complexe γ	
β			
τ	Clamp (facteur de processivité) Dimérise le complexe cœur		

RÉPLICATION DE L'ADN ; PROBLÈMES À RÉSOUDRE

Nous avons déjà vu que la réplication est semi-conservative est bidirectionnelle au sein d'un réplicon au cours de la réplication chez les bactéries. Nous savons également que la synthèse est catalysée par l'ADN polymérase III de 5' vers 3'.

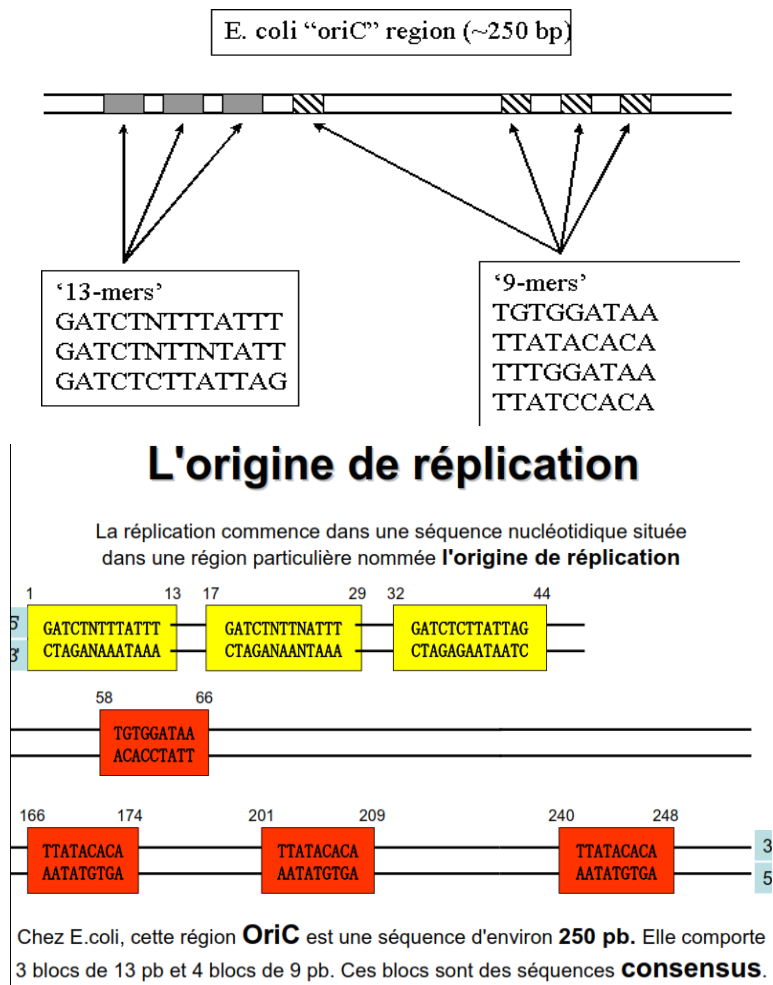
La synthèse bidirectionnelle crée deux fourches de réplication qui s'éloignent de l'origine de la synthèse selon des directions opposées. Comme nous allons le voir, il reste de nombreux points à éclaircir pour que notre compréhension de la réplication de l'ADN soit complète:

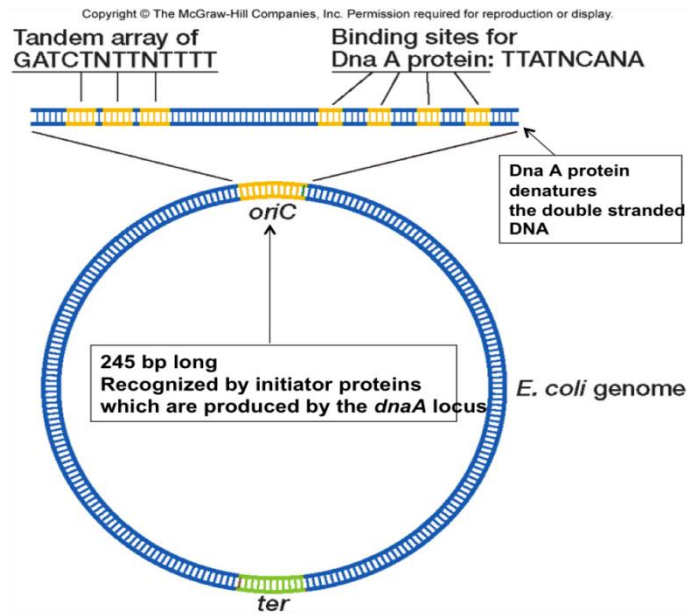
- 1° Un mécanisme déroulant localement l'hélice et la stabilisant dans une configuration « ouverte » doit exister pour que la synthèse puisse avoir lieu sur les deux brins.
- 2) Au cours de la synthèse de l'ADN, l'augmentation de l'enroulement crée des tensions au niveau de l'hélice, qui doivent être réduites.
- 3) Une amorce doit être synthétisée pour que la synthèse par la polymérase III puisse débuter. De manière surprenante, de l'ARN sert d'amorce, et non de l'ADN.
- 4) Une fois que les amorces d'ARN ont été synthétisées, l'ADN polymérase III débute la synthèse des ADN complémentaires de chaque brin de la molécule parentale. Comme les deux brins sont antiparallèles, la synthèse continue n'est possible que sur l'un des brins, dans la direction prise par la fourche de réplication. Sur l'autre, la synthèse est discontinue et dans la direction opposée.

- 5) Les amorces d'ARN doivent être supprimées avant la fin de la réplication. Les lacunes qui sont temporairement créées doivent être comblées par de l'ADN complémentaire à la matrice.
- 6) Le brin d'ADN néosynthétisé qui comble ces lacunes temporaires doit être relié au brin d'ADN adjacent.
- 7) Si les ADN polymérases insèrent fidèlement les bases complémentaires lors de la réplication, elles ne sont pas parfaites et des bases incorrectes sont parfois ajoutées au brin naissant. Un mécanisme de relecture sur épreuve, capable de corriger les erreurs, intervient lors de la synthèse de l'ADN.

• **I. DÉROULEMENT DE L'HÉLICE D'ADN**

Comme nous l'avons vu précédemment, il n'y a qu'un seul point de départ de la synthèse de l'ADN sur le chromosome circulaire de la plupart des bactéries. Cette région du chromosome d' *E. coli* a été particulièrement bien étudiée. Appelée *ori C*, elle est constituée de 250 paires de bases caractérisées par la répétition de séquences de 9 et 13 paires de bases (dits 9mères et 13mères).





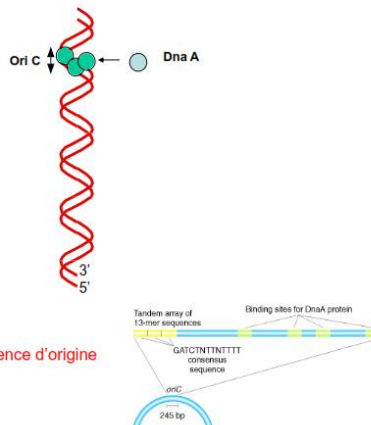
La protéine DnaA est responsable de l'étape initiale de l'ouverture de l'hélice, plusieurs sous-unités de DnaA se lient aux 9mères. Cette étape facilite la liaison des protéines DnaB et DnaC qui ouvrent et déstabilisent l'hélice. Ces protéines requièrent de l'énergie, habituellement fournie par l'hydrolyse de l'ATP, pour briser les liaisons hydrogènes et dénaturer la double-hélice sont appelées hélicases. D'autres protéines, les protéines de liaison au simple-brin (SSB pour Single-Stranded Binding), stabilisent cette conformation ouverte.

Bref:

La protéine Dna a se lie à oriC avec hydrolyse de l'ATP. Ceci amorce le déroulement de la double hélice au site d'initiation. Ce déroulement se poursuit sous d'autre protéine DnaB et DnaC.

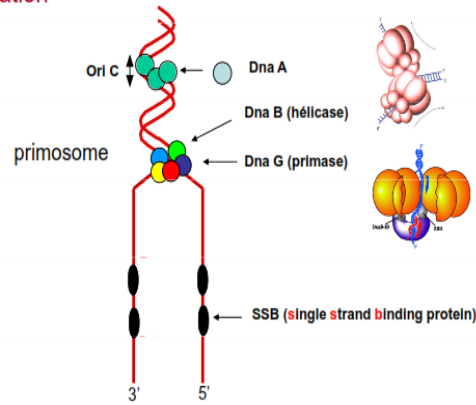
Les hélicases sont responsables du déroulement de l'ADN. Ces enzymes utilisent l'énergie de l'ATP pour défaire de petites portions de l'hélice juste devant la fourche de réplication.

2. Phase d'initiation



1. reconnaissance de la séquence d'origine

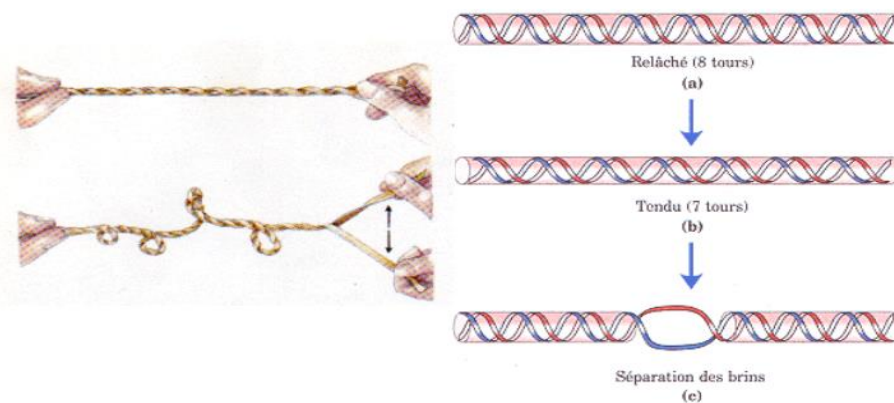
2. Phase d'initiation



1. reconnaissance de la séquence d'origine
2. formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins

Lors du déroulement de l'hélice, une tension d'enroulement est créée devant la fourche de réplication, produisant souvent un surenroulement. Pour les molécules circulaires, le surenroulement peut prendre la forme de torsions et de tours supplémentaires un peu comme l'enroulement que vous pouvez créer en étirant un élastique puis en faisant tourner une de ses extrémités. Un tel surenroulement peut être relaxé par une ADN gyrase, un membre du groupe d'enzymes appelées ADN topoisomérases. Les gyrases peuvent générer des coupures simple-brin ou double-brin de l'ADN et catalysent également des mouvements locaux ayant pour effet de supprimer le surenroulement. Les brins sont alors ressoudés. Ces différentes réactions tirent leur énergie de l'hydrolyse de l'ATP.

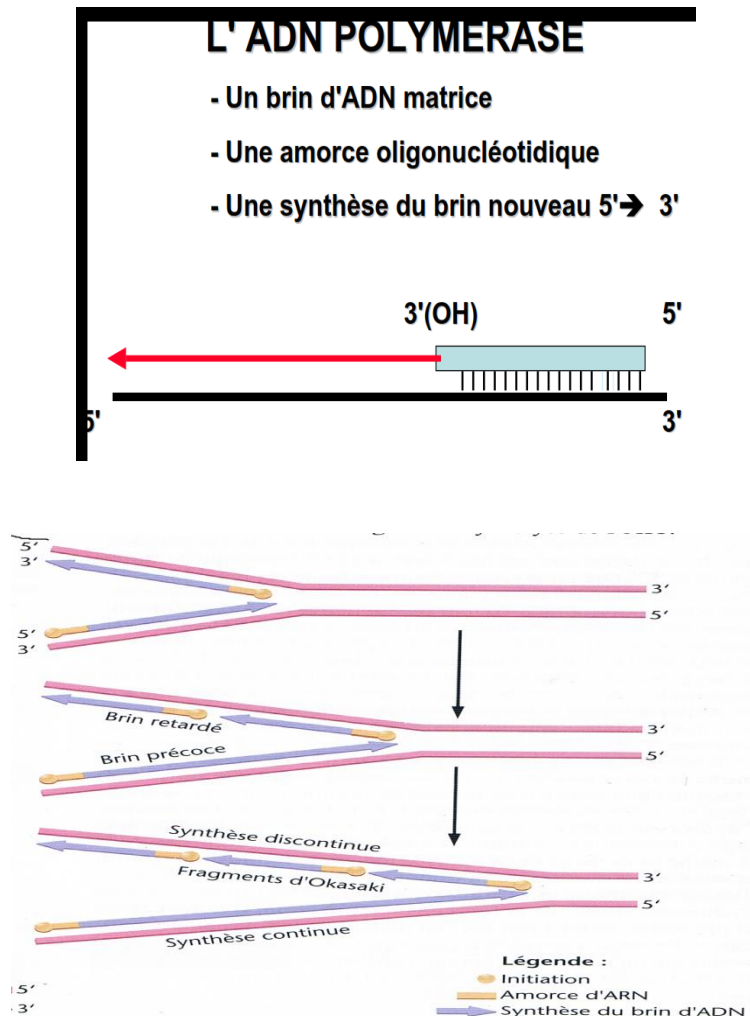
L'ADN doit être déroulé pour permettre la séparation des brins et initier la réplication et la transcription.



II. AMORCE ARN : NÉCESSAIRE À L'INITIATION DE LA SYNTHÈSE D'ADN

Une fois qu'une petite partie de l'hélice est ouverte, l'initiation de la synthèse peut commencer. Comme nous l'avons vu, l'ADN polymérase III requiert une amorce portant une extrémité 3'hydroxyle libre pour allonger la chaîne polynucléotidique (L'ADN polymérase ne peut pas commencer une nouvelle copie à partir du rien, elle doit disposer d'un brin préexistant).

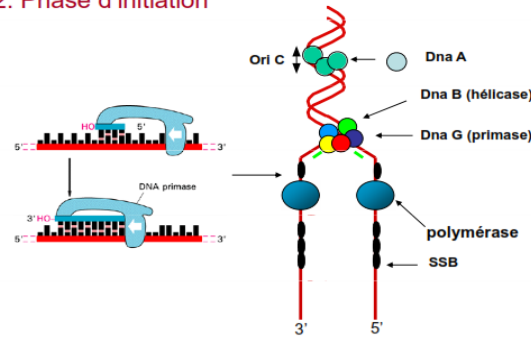
Puisqu'aucune n'est disponible dans un chromosome circulaire, les chercheurs ont essayé de comprendre comment le premier nucléotide est ajouté. Il est désormais établi qu'une molécule d'ARN sert d'amorce pour initier la synthèse de l'ADN.



Un petit segment d'ARN (long d'environ 5 à 15 nucléotides), complémentaire à la matrice d'ADN, est tout d'abord synthétisé sur cette matrice d'ADN. La synthèse de l'ARN est effectuée par une ARN polymérase appelée primase. Elle n'a pas besoin d'une extrémité 3' libre pour initier la synthèse. C'est à partir de ce court fragment d'ARN que l'ADN polymérase III commence à ajouter des 5'-désoxyribonucléotides

Plus tard, l'amorce ARN doit être éliminée et remplacée par de l'ADN. Cette étape serait contrôlée par l'ADN polymérase I. observée chez les virus, chez les bactéries et chez plusieurs eucaryotes, l'utilisation d'amorces d'ARN est un phénomène universel lors de l'initiation de la synthèse de l'ADN.

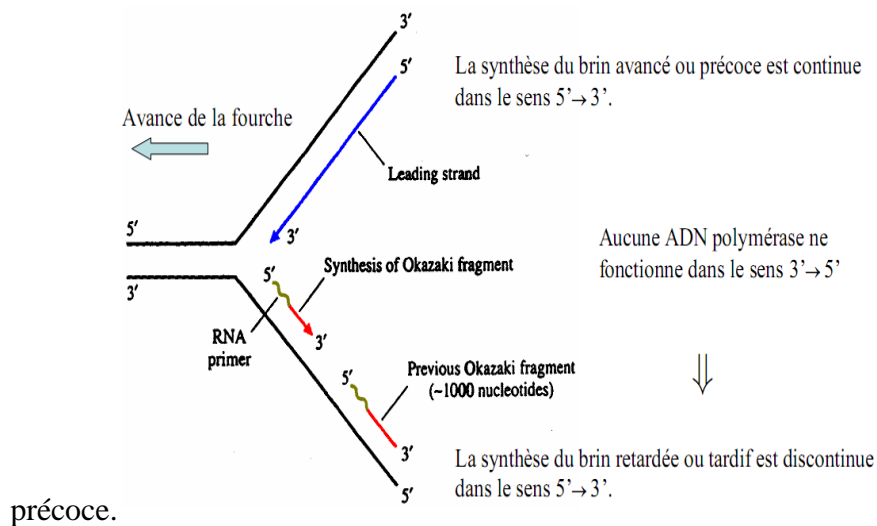
2. Phase d'initiation



1. reconnaissance de la séquence d'origine
2. formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins
3. accrochage de l'ADN polymérase
4. **synthèse d'une amorce ARN par la primase**

III. BRINS ANTIPARALLÈLES : NÉCESSITÉ D'UNE SYNTHÈSE D'ADN CONTINUE ET DISCONTINUE

Nous devons maintenant reconsidérer le fait que les deux brins de la double-hélice sont antiparallèles - c'est-à-dire que l'un va de 5' vers 3' alors que l'autre présente une polarité 3'-5' opposée. Comme l'ADN polymérase III synthétise l'ADN uniquement de 5' vers 3', la synthèse au sein d'une fourche de réplication se fait dans une direction sur un brin et dans la direction opposée sur l'autre. Par conséquent, seul un brin peut servir de matrice pour une synthèse d'ADN continue lors de la progression de la fourche. Ce brin d'ADN néosynthétisé est appelé brin



Alors que la fourche progresse, de nombreux points d'initiation sont nécessaires sur la matrice d'ADN opposée, entraînant une synthèse d'ADN discontinue du brin retardé (ou tardif).

BREF; le brin retardé ne peut pas être allongé dans la même direction parce que ceci demanderait une synthèse dans la direction 3'5', ce qui n'est pas possible. par conséquent, la copie du brins retardé est synthétisé de façon discontinue dans la direction 5'3', en une série de fragments, ceux-ci sont ensuite reliés pour former une copie complète.

Des arguments indiquant l'existence d'une synthèse discontinue de l'ADN ont tout d'abord été fournis par Reiji et Okazaki. Ils découvrirent que lorsque l'ADN d'un bactériophage est répliqué chez *E. coli*, une partie de l'ADN formé qui est fixée par des liaisons hydrogènes au brin matrice est faite de petits fragments de 1 000 à 2 000 nucléotides.

Des amorces d'ARN font partie de chacun de ces fragments, désormais nommés fragments d'Okazaki. Ceux-ci sont convertis en brins d'ADN de plus en plus longs, de poids moléculaire de plus en plus élevé, au fur et à mesure que la synthèse se poursuit.

La synthèse discontinue de l'ADN nécessite des enzymes capables à la fois de supprimer les amorces d'ARN et de relier les fragments d'Okazaki au niveau du brin retardé. Comme nous l'avons indiqué, l'ADN polymérase I supprime les amorces et remplace les nucléotides manquants. Relier les fragments semble être le travail d'une ADN ligase capable de catalyser la formation de liaisons phosphodiester pour relier les brins synthétisés de manière discontinue.

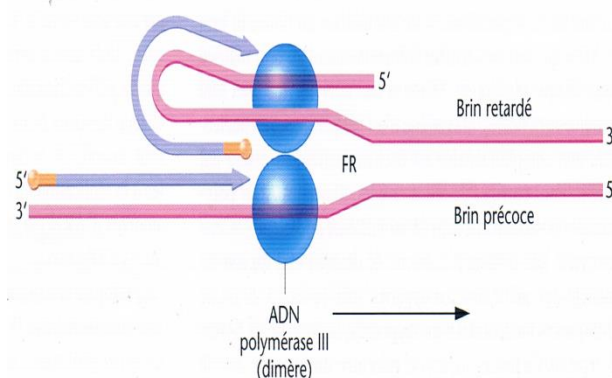
VI. SYNTHÈSE SIMULTANÉE SUR LES BRINS PRÉCOCE ET RETARDÉ

Comment l'ADN polymérase III synthétise-t-elle l'ADN à la fois sur les brins précoce et retardé ?

Les deux brins sont-ils répliqués simultanément sur une même fourche de réplication ou ces événements sont-ils distincts, impliquant deux copies séparées de l'enzyme ?

Des données suggèrent que les deux brins peuvent être répliqués simultanément. Si le brin retardé forme une boucle, la polymérisation nucléotidique peut se dérouler sur les deux brins matrice grâce à un dimère de l'enzyme.

Après la synthèse de 100 à 200 paires de bases, le monomère de l'enzyme sur le brin retardé rencontrera un fragment d'Okazaki complet, et relâchera le brin retardé. Une nouvelle boucle est alors formée avec le brin retardé, et ce processus est répété.



La formation de boucle inverse l'orientation de la matrice, mais pas le sens de la synthèse sur le brin retardé, qui va toujours de 5' vers 3'.

Une autre caractéristique importante de l'holoenzyme qui facilite la synthèse au niveau de la fourche de réplication est le dimère de sous-unités β qui forme comme un collier de serrage (clamp en anglais) autour du duplex d'ADN néoformé. Cette sous-unité β empêche le cœur de l'enzyme de

se détacher de la matrice au cours de la polymérisation. Comme l'holoenzyme complète se déplace le long du duplex parental, le dimère de sous-unités β est souvent appelé le clamp glissant.

V. RELECTURE SUR ÉPREUVÉ ET CORRECTION D'ERREURS

Le but de la réplication est de synthétiser un nouveau brin d'ADN qui soit exactement complémentaire au brin matrice pour chaque nucléotide. Même si les ADN polymérases sont extrêmement fidèles, la synthèse n'est pas parfaite et un nucléotide non complémentaire est occasionnellement inséré par erreur. Pour corriger de telles erreurs, toutes les ADN polymérases possèdent une activité exonucléase de 3' vers 5'. Cette propriété leur confère la capacité de détecter et d'exciser les nucléotides qui ne sont pas appariés (dans le sens 3'-5').

Une fois que ces nucléotides sont supprimés, la synthèse de 5' vers 3' reprend. Ce processus, appelé relecture sur épreuve, accroît la fidélité de la synthèse d'un facteur 100 environ. Dans le cas de la polymérase III, la sous-unité epsilon (ϵ) est directement impliquée dans l'étape de relecture.

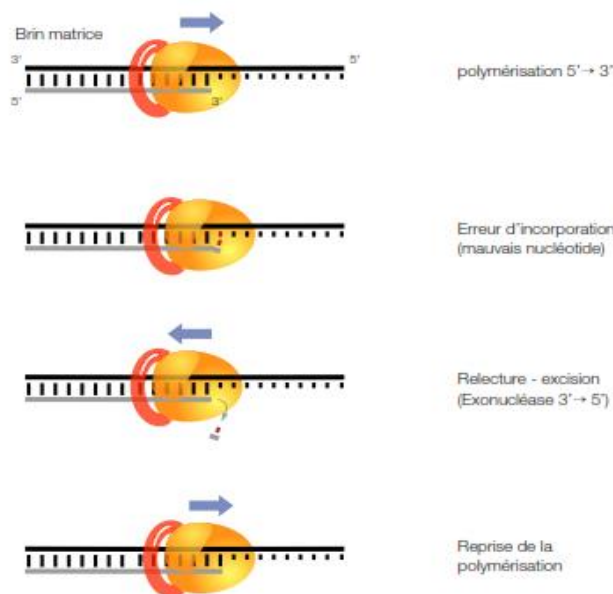


Figure 2.7 : Mécanisme de relecture (proofreading) par les ADN polymérases répliquatives. En cas d'incorporation d'un mauvais nucléotide, la polymérase est capable de corriger l'erreur : elle « recule » en excisant le nucléotide incorrect (activité exonucléase 3' → 5').

MODÈLE COHÉRENT POUR RÉSUMER LA RÉPLICATION DE L'ADN

Nous pouvons maintenant regrouper les différents aspects de ce qui se déroule au niveau d'une fourche de réplication en un modèle cohérent. L'initiation implique la reconnaissance de la séquence d'origine et l'ouverture de la double-hélice, dans une région généralement riche en AT.

Le complexe répliquatif « primosome » s'assemble séquentiellement, par type d'activité; hélicases DnaA (ouverture), DnaB (séparation des brins), topoisomérase (réduction des surenroulements) et primase (synthèse de l'amorce ribonucléotidique). sans oublier le rôle des protéines SSB (maintenir l'ADN sous forme monocaténaire)

Ensuite, la fourche progresse en répétant le cycle synthétique. Selon que le brin est antisens ou sens, la synthèse implique ou non la formation de fragments d'Okazaki.

La processivité du complexe varie de 500 à 1000 incorporations nucléotidiques par seconde.

Au niveau de la fourche en mouvement, une hélicase déroule la double-hélice. Une fois la double-hélice déroulée, les protéines se liant au simple-brin SSB s'associent avec l'ADN, empêchant la reformation de l'hélice.

A l'avant de la fourche de réplication, l'ADN gyrase diminue les tensions créées par le surenroulement de l'hélice. Chaque moitié de la polymérase dimérique est un coeur de l'enzyme lié à l'un des brins matrice par une sous-unité B.

La synthèse est continue sur le brin précoce, alors que le brin retardé doit former une boucle pour que la polymérisation puisse se dérouler simultanément sur chacun des deux brins.

L'ADN polymérase I et l'ADN ligase sont essentielles à la réplication du brin retardé. La première remplace les amorces d'ARN par de l'ADN ; la deuxième relie les fragments d'Okazaki.

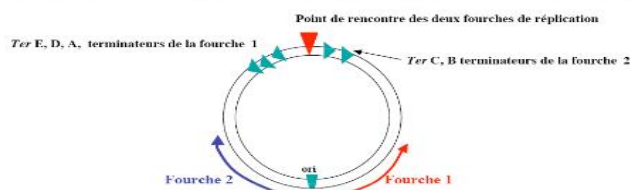
La terminaison survient lorsque les fourches se rejoignent. Une topoisomérase IV dotée d'une activité ligase connecte les brins néoformés en une molécule circulaire. Ce site de terminaison diamétralement opposé à ORI, couvre 450 kb et se caractérise par une séquence de reconnaissance et de fixation pour la protéine Tus qui inhibe la fixation de l'hélicase dnaB.

Les deux chromosomes sont ensuite ségrégués par la double action de topo IV et II.

Chez les Eucaryotes, la réplication s'arrête lorsque les fourches de réplication atteignent l'extrémité des chromosomes.

4. Terminaison

- ❖ Présence de séquences « terminator » pour chacune des deux fourches



- ❖ La protéine Tus (terminator utilisation substance) reconnaît les séquences d'arrêt de réplication et bloque DnaB



- ❖ Intervention d'une topoisomérase IV pour catalyser la séparation des 2 chromosomes

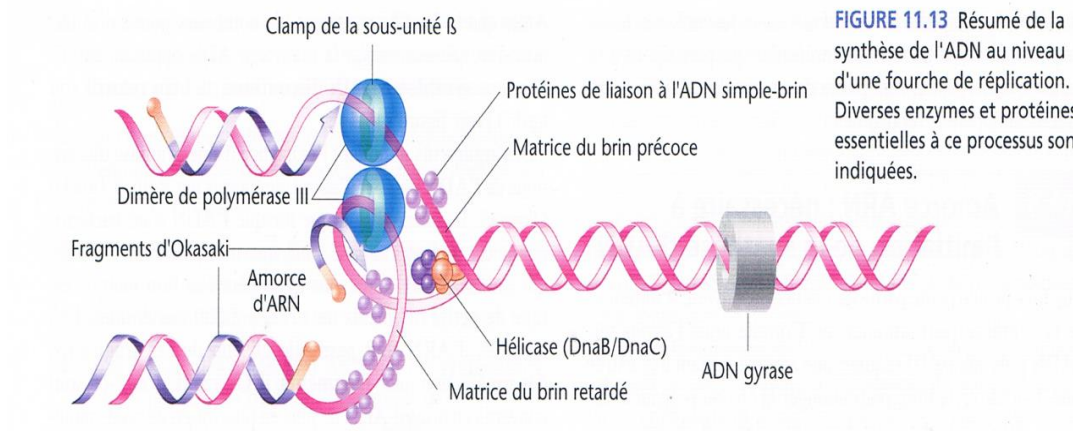
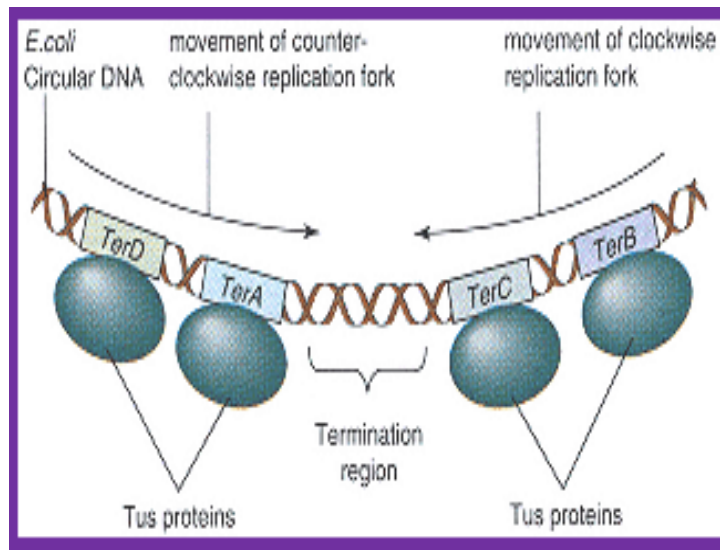
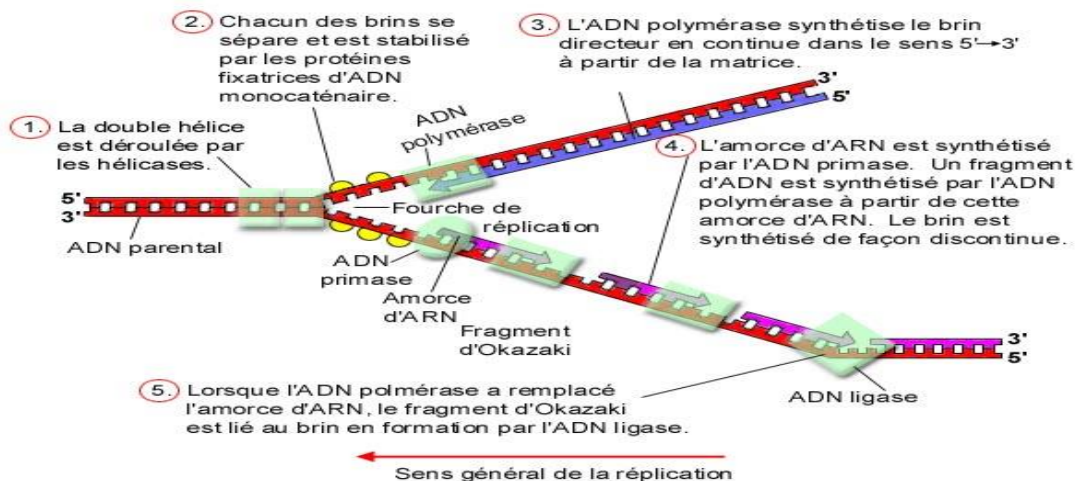
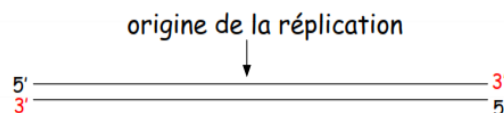


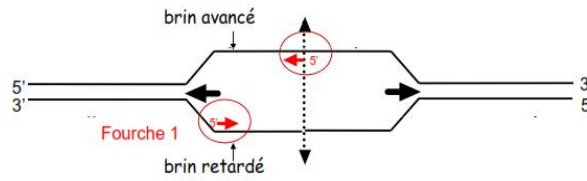
FIGURE 11.13 Résumé de la synthèse de l'ADN au niveau d'une fourche de réplication. Diverses enzymes et protéines essentielles à ce processus sont indiquées.



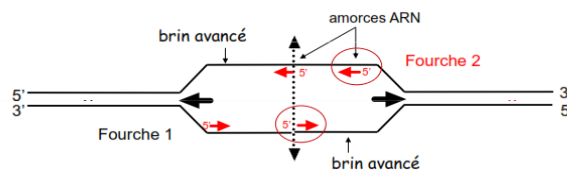
➡ L'élongation est mono directionnelle 5' → 3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »



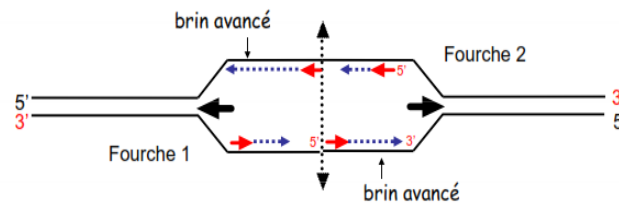
➡ L'élongation est mono directionnelle 5' → 3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »



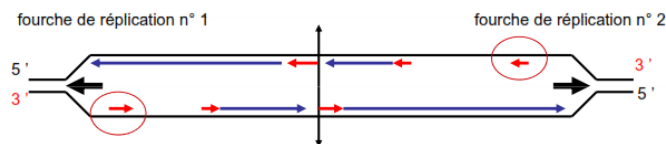
➡ L'élongation est mono directionnelle 5' → 3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »

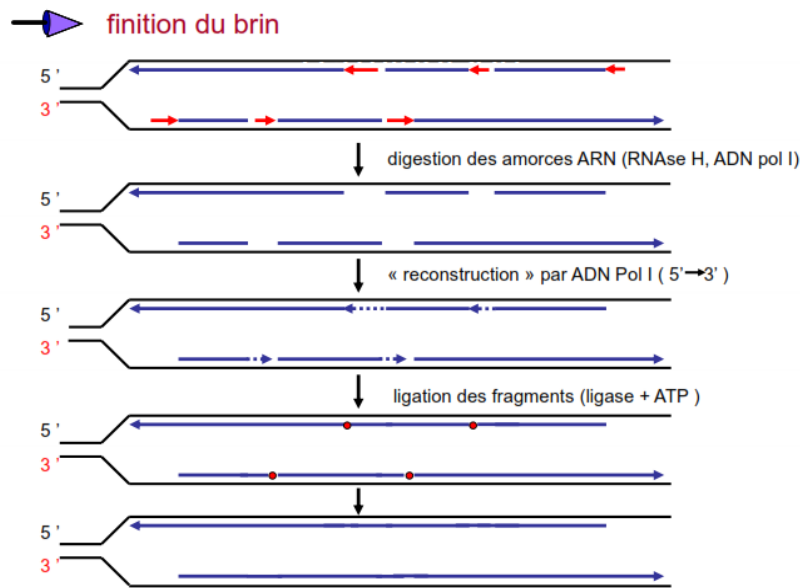


➡ L'élongation est mono directionnelle 5' → 3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »



➡ L'élongation est mono directionnelle 5' → 3' sur chacun des brins : la synthèse est continue sur le brin « avancé » et discontinue sur le brin « retardé »



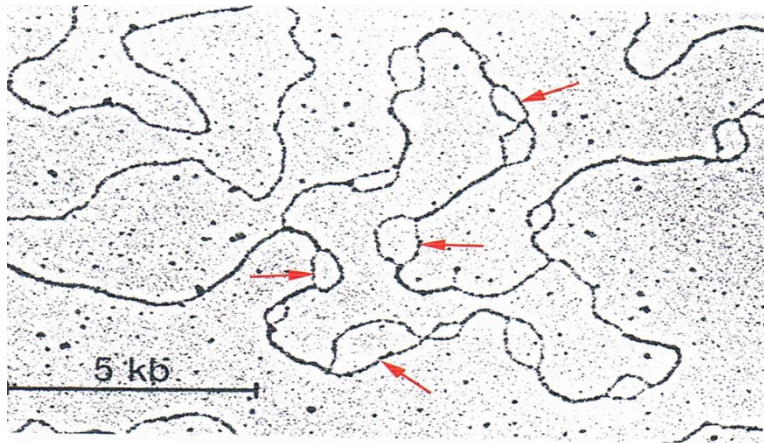


SYNTHÈSE D'ADN EUKARYOTE: SIMILAIRE À CELLE DES PROCARYOTES, MAIS PLUS COMPLEXE

L'ADN eucaryote est répliqué de manière similaire à l'ADN des bactéries. Dans les deux systèmes, l'ADN double-brin est déroulé aux origines de réplication, des fourches de réplication sont formées et une synthèse bidirectionnelle par une ADN polymérase crée des brins précoce et retardé à partir de brins matrice. Les polymérases eucaryotes ont les mêmes besoins pour la synthèse d'ADN que leurs homologues bactériens; quatre désoxyribonucléosides triphosphates, une matrice et une amorce. Néanmoins, comme les cellules eucaryotes contiennent plus d'ADN, que celui-ci est sous forme linéaire plutôt que circulaire et qu'il est associé et forme des complexes avec des protéines, les eucaryotes font face à une sophistication accrue par rapport aux bactéries. Par conséquent, le processus de synthèse d'ADN est plus complexe chez les eucaryotes et plus difficile à étudier. Néanmoins, les connaissances sur les mécanismes mis en jeu ont déjà fortement progressé.

I. DES ORIGINES DE RÉPLICATION MULTIPLES

La différence la plus frappante entre la réplication de l'ADN chez les procaryotes et chez les eucaryotes est l'existence d'origines de réplication multiples sur les chromosomes eucaryotes, par opposition au site unique du chromosome d'*E. Coli*. Les origines multiples, visibles au microscope électronique sous formes de « bulles de réplication » qui se forment lorsque l'hélice s'ouvre, peuvent chacune fournir deux fourches de réplication.



JRE 11.14 Démonstration des origines multiples de réplication le long d'un chromosome eucaryote. Chaque origine apparaît sous forme d'une boucle de réplication le long de l'axe chromosomique. Des flèches indiquent certaines de ces bulles de réplication.

La multiplicité des origines est essentielle dès lors que la réplication du génome d'un eucaryote typique doit être complète en un temps raisonnable. Rappelez-vous que;

(1) les eucaryotes contiennent plus d'ADN que les bactéries - par exemple, les levures ont quatre fois plus d'ADN qu'*E. Coli* et la drosophile 100 fois plus (2) la vitesse de synthèse de l'ADN chez les eucaryotes est bien plus lente - seulement de l'ordre de 75 nucléotides par seconde, soit 25 fois moins rapide que chez les bactéries. Dans ces conditions, la réplication d'un chromosome eucaryote typique à partir d'une seule origine prendrait des jours. Or, cette réplication est généralement accomplie en quelques heures.

La plupart des informations ont été obtenues à la suite de travaux chez la levure qui compte de 250 à 400 réplicons par génome. Par la suite, des études chez des cellules de mammifères ont permis de dénombrer jusqu'à 25 000 réplicons.

Chez la levure, les origines de réplication ont été isolées et nommées séquences de réplication autonome (ARS pour *Autonomously Replicating Sequences*).

La synthèse de l'ADN est restreinte à la phase S du cycle cellulaire eucaryote. Des études ont montré l'ensemble des origines n'étaient pas activées au même moment. Au contraire, des groupes de 20 à 80 réplicons adjacents sont activés séquentiellement au cours de la phase S jusqu'à ce que l'ADN entier soit répliqué.

II. LES ADN POLYMÉRASES EUCARYOTES

L'aspect le plus complexe de la réplication eucaryote est l'ensemble des ADN polymérases impliquées dans le déroulement de la synthèse de l'ADN. De nombreuses formes différentes de l'enzyme ont été isolées et étudiées. Néanmoins, seules quatre sont vraiment impliquées dans la réplication de l'ADN alors que les autres participent à des mécanismes de sa réparation.

Pour que les polymérases aient accès à l'ADN, la topologie de l'hélice doit d'abord être modifiée. Lorsque la synthèse est déclenchée, les doubles-brins sont ouverts, au niveau de chaque origine de

réplication, au sein des régions riche en A et T pour permettre l'entrée d'une hélicase qui déroulera encore plus les doubles-brins d'ADN. Avant que les polymérases puissent initier la synthèse, les histones complexées à l'ADN doivent être retirées ou modifiées. Au cours de la synthèse, les histones se réassocient avec les duplex néoformés, rétablissant le profil de répartition habituel des nucléosomes.

Chez les eucaryotes, la synthèse de nouvelles histones est finement couplée à la synthèse d'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire

La nomenclature et les caractéristiques des six polymérases sont résumées dans le tableau ci dessous

TABLEAU 11.5 PROPRIÉTÉS DES ADN POLYMÉRASES EUCARYOTES

	Polymérase α	Polymérase β	Polymérase δ	Polymérase ϵ	Polymérase γ	Polymérase ζ
Localisation	Noyau	Noyau	Noyau	Noyau	Mitochondries	Noyau
Activité exonucléase 3'-5'	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Essentielle à la réplication nucléaire ?	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non

Trois d'entre elles (Pol α , δ et ϵ) sont essentielles à la réplication de l'ADN nucléaire des cellules eucaryotes. Deux (Pol β et ζ) semblent impliquées dans la réparation de l'ADN.

La sixième forme (Pol γ) est impliquée dans la synthèse de l'ADN mitochondrial. Il semble que son activité répliquative soit restreinte à cet organe.

Cinq des six formes de l'enzyme (l'exception étant Pol β) sont constituées de plusieurs sous-unités qui assurent différentes fonctions lors de la réplication .

Nous nous concentrerons sur Pol α , et δ qui sont les formes majeures de l'enzyme impliquées dans l'initiation et l'élongation lors de la synthèse de l'ADN nucléaire.

En réalité, ici, l'amorce est créée au départ par une RNA polymérase particulière qui peut commencer sur environ 10 nucléotides la synthèse d'un RNA hybridé avec le DNA modèle.

Au bout de 10 ribonucléotides, une DNA polymérase α prend le relai et poursuit la condensation de 20 désoxyribonucléotides.

• L'amorce sera donc constituée d'un brin mixte comprenant RNA puis DNA sur 30 nucléotides environ. Le dernier désoxyribonucléotide de l'amorce, lié avec le brin de DNA qui sert de modèle, servira de point d'initiation à l'activité de la DNA polymérase δ .

En effet, Pol α a une faible processivité, un terme qui reflète essentiellement la longueur d'ADN synthétisée par une enzyme avant qu'elle se détache de la matrice. Une fois que l'amorce est en place, un événement connu sous le nom de remplacement de polymérase intervient lorsque Pol α se dissocie de l'amorce et est remplacée par Pol δ . Cette forme de l'enzyme est hautement processive et allonge les brins précocement et retardé. Elle possède également une activité exonucléase de 3' vers 5', qui fournit la capacité de relecture.

Pol ϵ , la troisième forme essentielle, possède les mêmes caractéristiques générales que la Pol δ , mais semble intervenir dans des conditions cellulaires différentes) ou être restreinte à la synthèse du brin retardé. Chez la levure, les mutations qui inactivent Pol ϵ sont létales, ce qui atteste de la fonction essentielle dans la réplication.

Le processus décrit est le même pour la synthèse des brins. Sur chaque brin, des amorces ARN doivent être remplacées par de l'ADN. Sur le brin retardé, les fragments 'Okazaki, qui sont 10 fois plus petits (100 à 150 nucléotides) que chez les procaryotes, doivent être liés entre eux.

Pour s'adapter au nombre accru de réplicons, les cellules eucaryotes contiennent bien plus de molécules d'ADN polymérase que les bactéries. Alors qu'E. Coli compte environ 15 copies de l'ADN polymérase III par cellule, on peut trouver jusqu'à 50000 copies d'ADN polymérase α dans les cellules animales. Comme on l'a déjà indiqué, le grand nombre réplicons trouvé chez les eucaryotes par rapport aux procaryotes compense la lenteur de la synthèse de l'ADN. E. Coli a besoin de 20 à 40 minutes pour répliquer son génome, alors que la drosophile, qui possède 40 fois plus d'ADN accomplit la même tâche en 3 minutes seulement.

Les amorces d'ARN sont progressivement dégradées par l'action combinée de la RNase H1 et de la nucléase Fen1.

L'ADN polymérase δ permet de combler les lacunes et l'ADN ligase I de relier les fragments entre eux.

Pas d'équivalent de séquence ter et de protéine tus des procaryotes.

EXTRÉMITÉS DES CHROMOSOMES LINÉAIRES ET RÉPLICATION

Une dernière différence entre procaryotes et eucaryotes concernant la synthèse de l'ADN implique la nature des chromosomes. Contrairement au chromosome circulaire fermé des bactéries, les chromosomes eucaryotes sont linéaires. Lors de la réplication, ils font face à un problème au niveau de leurs extrémités appelées télomère.

Il est nécessaire de présenter plusieurs caractéristiques de ces télomères. Ces structures sont de longues séries d'une courte séquence répétée d'ADN, liées à des protéines spécifiques, les protéines

associées aux télomères. Les télomères comportent des répétitions en tandem de motifs ({TTAGGG} chez l'homme).

Les télomères préservent l'intégrité et la stabilité des chromosomes, Ils sont essentiels car les extrémités doubles-brins des molécules d'ADN ressemblent à ce que l'on appelle des cassures double-brin (CDB) qui apparaissent lorsqu'un chromosome est fragmenté .

De telles extrémités doubles-brins peuvent fusionner avec d'autres extrémités, favorisant des réarrangements chromosomiques, mais sont susceptibles d'être dégradées si elles ne fusionnent pas.

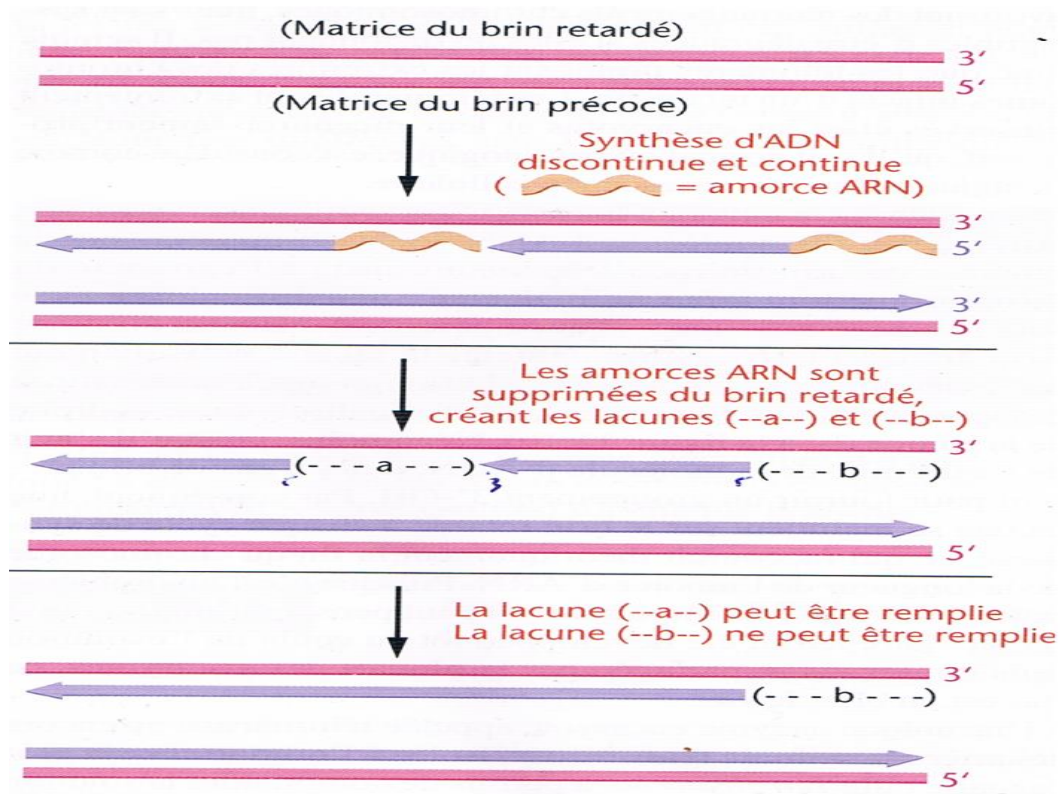
Il semble donc que les télomères protègent les extrémités des chromosomes intacts d'un tel destin.

Les télomères sont extrêmement conservés chez les eucaryotes et leur raccourcissement progressif, qu'il soit normal ou pathologique, est considéré comme un signe majeur de sénescence cellulaire.

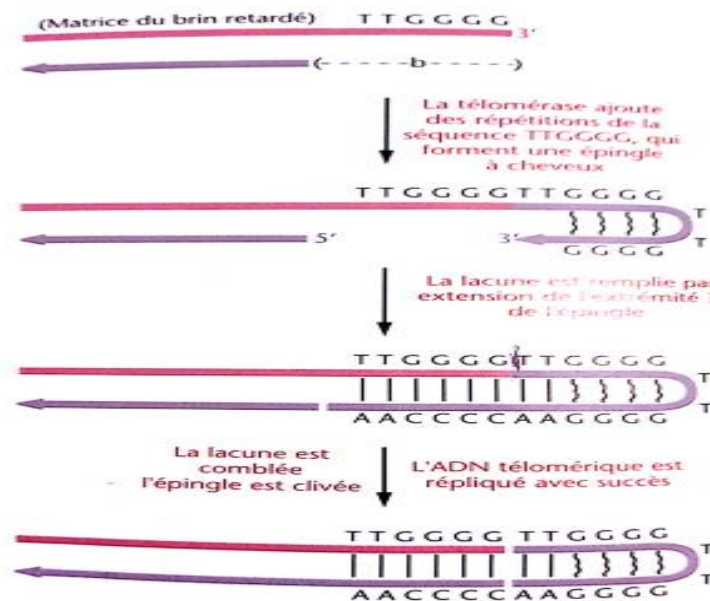
Considérons maintenant la réplication semi-conservative aux extrémités d'une molécule d'ADN double-brin. Alors que la synthèse du brin précoce se poursuit jusqu'à l'extrémité du chromosome tout à fait normalement, une difficulté se pose pour le brin retardé une fois que l'amorce d'ARN est éliminée.

Normalement, la lacune nouvellement créée devrait être comblée par addition de nucléotides sur le groupement 3'-OH fourni par la synthèse discontinue. Néanmoins, puisqu'il s'agit de l'extrémité de la molécule d'ADN, il n'y a pas de brin présent pour fournir un groupement 3'-OH.

Par conséquent, une lacune se maintient sur le brin retardé à chaque cycle de synthèse, ce qui raccourcit théoriquement la fin du chromosome de la longueur de l'amorce d'ARN.



Une unique enzyme eucaryote appelée télomérase ou encore télomère terminale transférase, a permis de comprendre la solution à ce problème. Avant de regarder comment cette enzyme fonctionne en réalité, regardons ce qu'elle accomplit. Comme cela a été indiqué précédemment, l'ADN télomérique des eucaryotes est toujours constitué de nombreuses répétitions d'une courte séquence nucléotidique. Par exemple, la matrice produisant le brin retardé à l'extrémité des chromosomes de *Tetrahymena* contient de nombreuses répétitions de la séquence 5'-TTGGGG-3'. La figure illustre la capacité de la télomérase à ajouter plusieurs répétitions de la séquence de six nucléotides à l'extrémité 3' du brin retardé (par synthèse de 5' vers 3'), ce qui empêche le raccourcissement du chromosome. Ces répétitions se replient sur elles-mêmes pour former une «boucle en épingle à cheveux» stabilisée par des liaisons hydrogène non orthodoxes entre guanines opposées (G=G), créant ainsi un groupement 3'-OH à l'extrémité de l'épingle à cheveux qui peut servir de substrat à l'ADN polymérase. Cela rend ensuite possible le remplissage de la lacune. La boucle en épingle à cheveux peut alors être clivée à son extrémité et la perte potentielle d'ADN à chaque cycle réplicatif est évitée.



Une étude détaillée, sur la manière dont la télomérase de *Tetrahymena* accomplit cette synthèse, conduisit à une découverte extraordinaire. L'enzyme est tout à fait inhabituelle puisque c'est une ribonucléoprotéine, contenant un petit morceau d'ARN essentiel à son activité catalytique.

Le composant ARN sert de matrice pour la synthèse de son ADN complémentaire, un processus nommé transcription inverse. Chez *Tetrahymena*, l'ARN contient plusieurs répétitions de la séquence 5'-CCCCAA-3', complémentaire de la séquence d'ADN télomérique qui doit être synthétisée (5'-TTGGGG-3').

Chez la levure, des protéines spécifiques sont responsables de la terminaison de la synthèse, déterminant ainsi le nombre de répétitions d'unités ajoutées à l'extrémité d brin retardé.

Des fonctions enzymatiques analogues ont maintenant été décrites chez tous les eucaryotes étudiés. Chez l'homme Le télomère est une séquence 5'-TTAGGG-3' répétée quelques centaines de fois avant le 3'OH final (ne diffère donc de la séquence trouvée chez Tetrahymena que d'un nucléotide).

La télomérase peut continuer la synthèse d'un DNA simple brin.

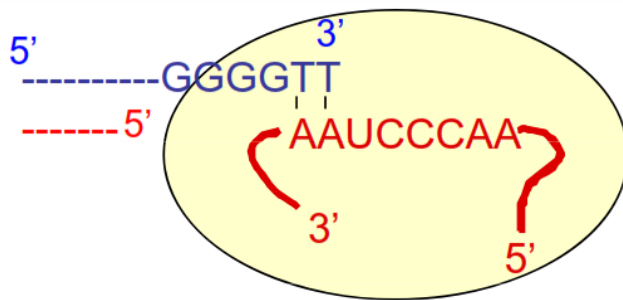
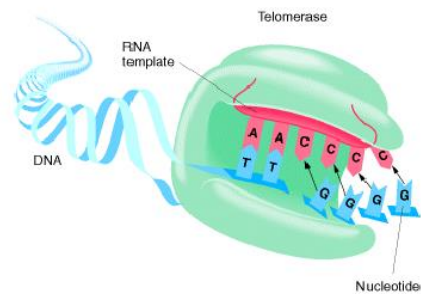
Cette enzyme comprend un RNA de 450 nucléotides dont l'extrémité 5' terminale est 5'-CUAACCCUAAC... Cette extrémité sert de modèle pour l'enzyme en vue de la synthèse de quelques unités de la répétition TTAGGG.

L'extrémité 3' du brin modèle ainsi allongée peut servir à la pose d'une amorce nouvelle.

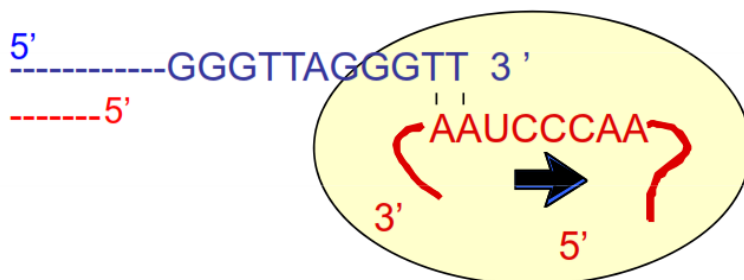
L'extrémité 3'-OH de cette amorce sert alors de point de départ pour la DNA polymérase δ pour synthétiser l'autre brin.



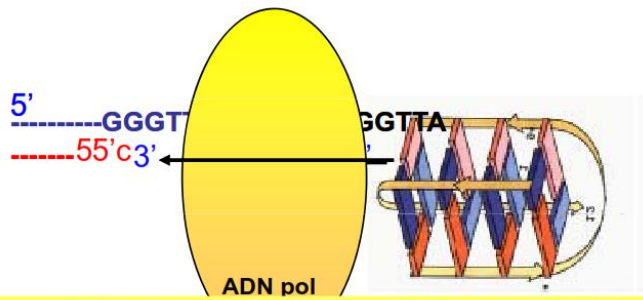
❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase



1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'



1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'
2. Elongation
3. Translocation



Nucléotide

1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'
2. Elongation
3. Translocation
4. Formation d'une structure III permettant la fixation de l'ADN pol

Le prix Nobel de Médecine et Physiologie 2009 est décerné à Elizabeth H Blackburn, Carol W Greider, Jack W Szostak pour « la découverte du mécanisme de protection des chromosomes par les télomères et la télomérase »

