

La réplication de l'ADN

I. Introduction

Pendant le cycle Cellulaire, la cellule duplique son contenu puis se divise en deux donnant :

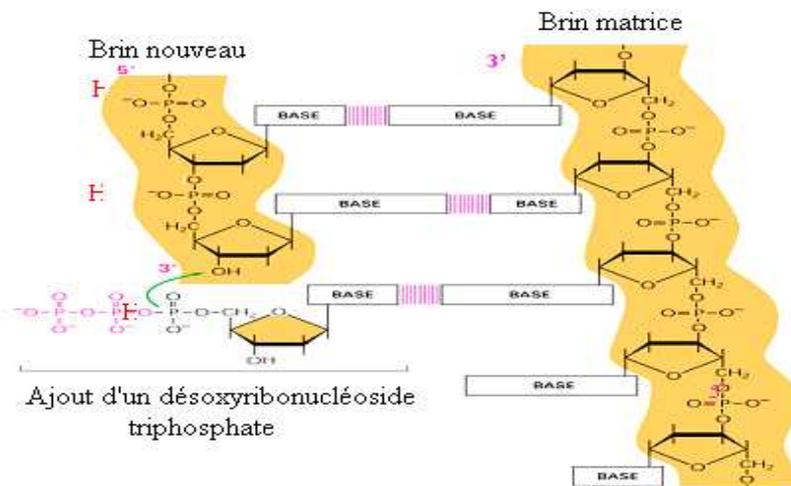
- Nouvel organisme chez les êtres unicellulaires
- Maintien de l'intégrité de l'organisme chez les êtres multicellulaires (croissance, renouvellement de ses cellules perdues par mort naturelle ou programmée (apoptose)).

La duplication de l'ADN aboutit à la formation de **deux molécules-filles identiques** entre-elles et à **la molécule-mère**.

Le mécanisme précis de cette duplication est appelé “ **Réplication de l'ADN**”

II. Caractéristiques générales de la réplication

- Ces **caractéristiques** sont identiques chez les procaryotes et les eucaryotes.
- La réplication se fait dans le sens **5' => 3'**, de façon **complémentaire**, selon les règles d'appariement des bases : A=T / G ≡ C.
- Elle se fait selon un mode **antiparallèle** (le brin matrice complémentaire est copié dans le sens 3' => 5').

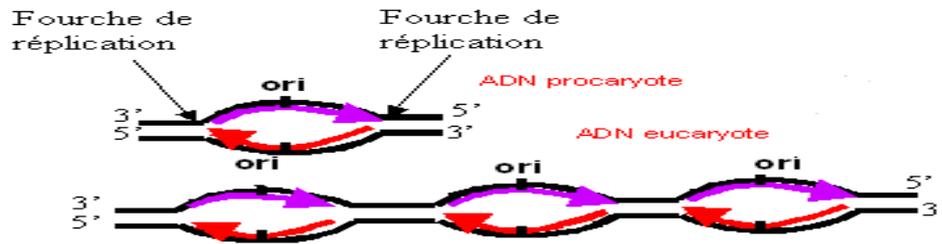


▪ La réplication est semi-conservative

La molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complétée par une chaîne nouvellement synthétisée.

- La réplication de l'ADN commence en un ou plusieurs site(s) appelé (s)origine(s) de réplication (ORI) puis s'étend sous la forme de bulle (s) de réplication. Chaque bulle comporte deux fourches de

réplication qui s'éloignent l'une de l'autre. Il y a ainsi deux systèmes de réplication qui évoluent en sens opposés. La réplication est dite **bidirectionnelle**.



NB : Il existe une seule origine de réplication chez les procaryotes, tandis qu'il en existe plusieurs chez les eucaryotes.

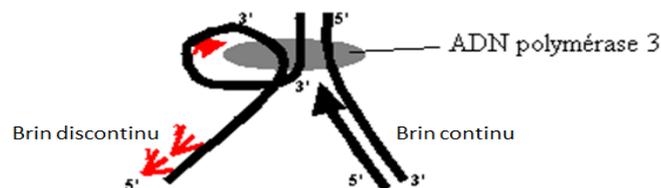
▪ **La réplication est semi-discontinue**

La synthèse du nouveau brin d'ADN se fait toujours dans le sens 5' vers 3' :

-le brin lu dans le sens de la fourche de réplication donne naissance au **brin continu (brin précoce ou avancé)**

-le brin lu dans le sens inverse de la fourche donne naissance au **brin discontinu (brin tardif ou secondaire)** synthétisé sous forme de petits fragments.

Chaque fourche de réplication est donc **asymétrique**



▪ Plusieurs enzymes sont nécessaires pour la réplication (hélicase, primase, ADN polymérase ...)

III. La réplication chez les procaryotes (E. coli)

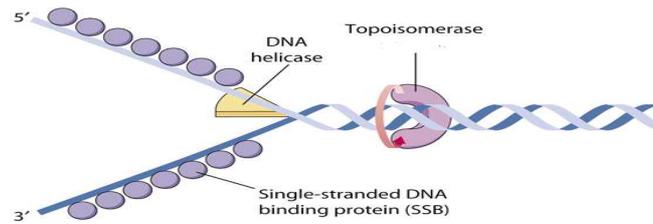
1. **Les différentes protéines mises en jeu**

• la **protéine Dna A (facteur d'initiation de la réplication)**: se fixe à l'origine de la réplication et permet l'initiation de la réplication

• Les **hélicases** (ou DNA B) : déroulent la double hélice par rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les bases azotés des deux brins de l'ADN, avec consommation d'**ATP**.

• Les **protéines SSB** (pour *single stranded binding protein*) : ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches réplcatives.

• La **primase** : est une ARN polymérase ADN dépendante qui synthétise l'**amorçe** (ou **primer**). les amorces d'ARN sont constituées d'une 10aine de nucléotides.



▪ Les **topo-isomérases** : Diminuent considérablement le taux d'enroulement de l'ADN.

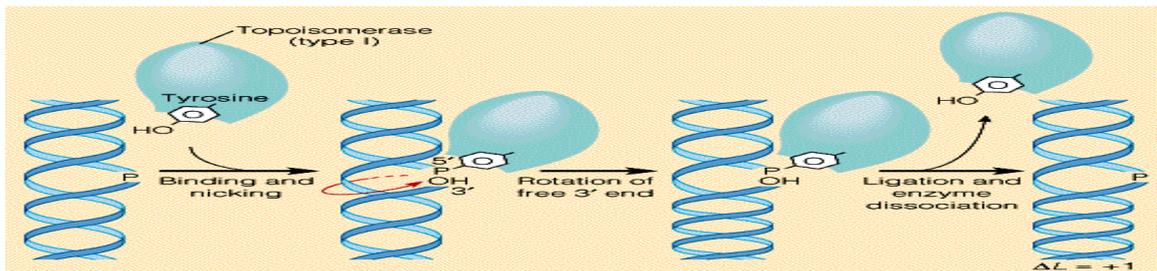
Elles sont de 2 types :

-Topoisomérases de type I

Se fixent sur l'ADN → coupent 1 seul des brins → déroulement de l'ADN → réparation

-Topoisomérases de type II

coupent les 2 brins



La topo-isomérase de type II d'E-Coli s'appelle l'ADN-gyrase.

▪ Les **ADN ligases** : catalyse la formation de la liaison phosphodiester, mais est incapable de placer les nucléotides. Elle assure la liaison des fragments d'Okasaki

▪ La **protéine Tus** (Terminus utilisation substance) : reconnaît le site de terminaison et met fin à la réplication

▪ Les **ADN polymérases**

- L'enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre le groupe **3'-OH** libre du dernier nucléotide de la chaîne en croissance et le groupe 5' phosphate du nucléotide à incorporer: le choix du nucléotide à intégrer respecte les règles d'appariement des bases avec le brin matrice (A apparié à T et G apparié à C).

-L'ADN polymérase a besoin des composés suivant pour synthétiser une chaîne d'ADN :

-Les quatre désoxyribonucléosides 5'-triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

- Une amorce (primer) comme accepteur des dNMP incorporés dans le nouveau brin.

-Une matrice d'ADN simple brin.

- Le Mg²⁺.

Chez E. coli il existe 3 ADN polymérases

***ADN polymérase I** a 3 fonctions :

- Une fonction de **polymérisation** 5' => 3' pour le remplacement des amorces d'ARN par un brin d'ADN et le remplissage des lacunes au cours de la réparation de l'ADN.

- Une fonction **exonucléasique** 5' => 3' qui va éliminer les amorces d'ARN

- Une fonction **exonucléasique** $3' \Rightarrow 5'$ qui va éliminer les nucléotides mal appariés et progresser en les remplaçant par des nucléotides corrects. Cette activité auto-correctrice permet de diminuer le taux d'erreur.

L'ADN polymérase I dépourvue de la fonction exonucléasique $5' \Rightarrow 3'$ est dite **fragment de Klenow**.

***ADN polymérase II** : impliquées essentiellement dans la réparation de l'ADN endommagé.

***ADN polymérase III** possède 2 fonctions :

- Une fonction polymérase d'addition de dNMP à l'extrémité 3'OH d'une chaîne nucléotidique. C'est cette enzyme qui fonctionne aux fourches de réplication, c'est la **réplicase**

- Une fonction exonucléase $3' \Rightarrow 5'$ comme pour l'ADN polymérase I

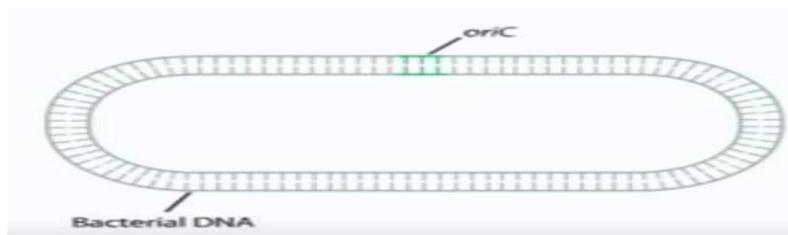
2. Les étapes de la réplication

La réplication se déroule en trois étapes :

- Initiation
- Elongation
- Terminaison

A .Initiation de la réplication

- La réplication débute au niveau d'une zone précise et unique du chromosome circulaire bactérien appelée **origine de réplication Ori C**
- Ori = Séquences de 300 Pb environ formées de séquences répétitives, Reconnues spécifiquement par des protéines d'initiation (DnaA).



- Ouverture de la double hélice faisant apparaître les ébauches des 2 fourches de réplication
- Fixation de la protéine Dna B (hélicase).
- formation de deux fourches de réplication qui se déplacent en sens inverse l'une de l'autre sur le chromosome.
- Fixation des protéines SSB (Single-Strand-binding protein) sur les simples brins d'ADN pour empêcher leur réassociation.
- Formation du primosome au niveau de chaque fourche après ajout de la Dna G=ARN polymérase ADN dépendante= primase) au complexe de pré-initiation (Dna A, DnaB, SSB)

- Synthèse des amorces d'ARN (primer) d'une trentaine de paire de nucléotides de long.

B. L'élongation

-La fourche de réplication se déplace le long du brin matrice qui est progressivement dénaturé par les hélicases et les brins fils sont synthétisés par la réplicase (ADN polymérase III)

-La fourche de réplication se déplace dans le sens 5'–3' sur un brin et 3'–5' sur l'autre

-Les ADN polymérases n'incorporent des nucléotides qu'à une extrémité 3'OH libre (synthèse dans le sens 5'–3')

- **Sur le brin précoce,**

– La synthèse se déroule de **façon continue par allongement de l'amorce** dans le Sens 5'-3' à mesure que le duplex parental est déroulé.

- Les protéines SSB sont chassées au fur et à mesure du brin matrice

- **Sur le brin retardé**

–Une séquence d'ADN simple brin doit être exposée

–un segment est synthétisé dans le sens inverse (par rapport au déplacement de la fourche).

Une série de ces fragments (fragments **d'Okasaki**) de 1000 à 2000 Pb est synthétisée chacun de 5' vers 3' (synthèse discontinue).

–Ils sont ensuite reliés les uns aux autres pour donner naissance à un brin retardé intact.

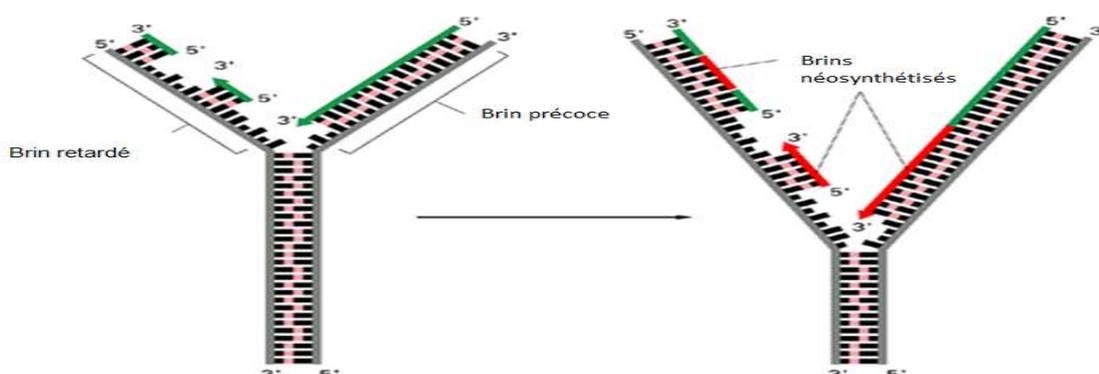
- Le brin matrice du brin discontinu doit s'enrouler pour permettre à l'ADN polymérase de le répliquer et de progresser dans le même sens que la fourche.

- **Sur le brin précoce:**

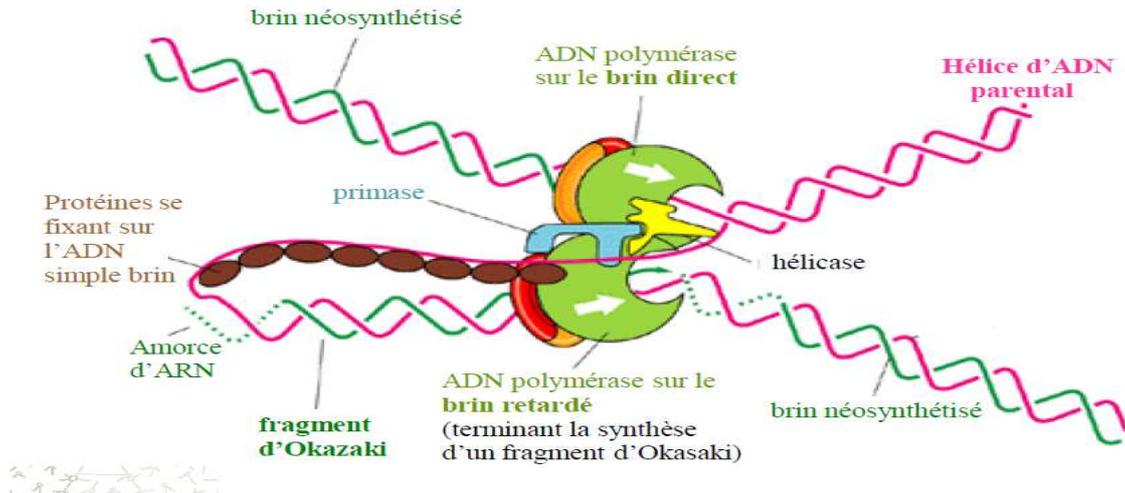
–1 seul événement d'initiation au niveau de l'origine

- **Sur le brin retardé:**

– Une série d'événements d'initiation (1 par fragment d'Okasaki) initié chacun par une amorce

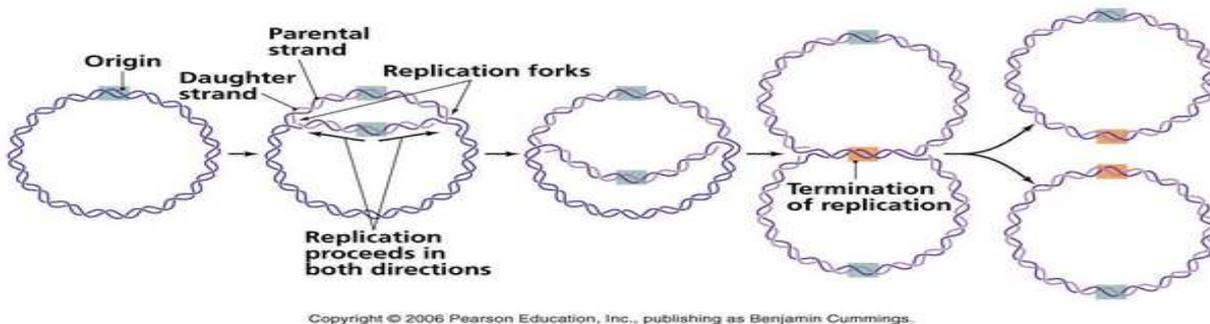


- Elimination et remplacement des amorces ARN par l'ADN polymérase I.
- Les fragments d'ADN formés sont liés par une ADN ligase



C. Terminaison

- La terminaison a lieu lors de la rencontre des deux fourches.
- Elle se fait au niveau d'une séquence TER située à l'opposé de l'origine de réplication reconnue par la protéine Tus, Le complexe Ter-Tus bloque les fourches, mettant fin à la réplication
- Lorsque la réplication d'un chromosome circulaire est terminée, les 2 molécules obtenues sont reliées ensemble, comme les maillons d'une chaîne (concaténées).
- La séparation et la ligation se font par une topoisomérase IV (topoisomérase de type 2)



IV. Différences entre eucaryotes et procaryotes

	Eucaryotes	Procaryotes
	Limitée à la phase S du cycle	Continue durant la vie
Origine de réplication	multiple	Unique
Reconnaissance de l'origine de réplication	Antigène T	Dna A
Séparation de l'ADN double brin en ADN simple brin (activité hélicase)	Antigène T	Dna B
Protéines stabilisatrices de l'ADN simple brin	RP-A (Replication protein A)	SSB

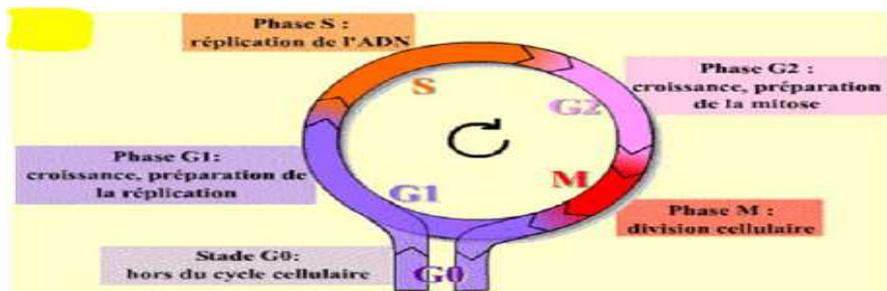
Amorce ARN	<p>oui</p> <ul style="list-style-type: none"> -synthétisée par alpha polymérase, suivit par alpha puis delta ou epsilon -dégradé par RNase H -1 et la FEN 1 -remplacée par la pol Delta 	<p>Oui</p> <ul style="list-style-type: none"> -synthétisée par une primase (Dna G) -suivit par ADN pol III -dégradée, remplacée par l'ADN pol I
ADN polymérases	<p>alpha:</p> <ul style="list-style-type: none"> -polymérase -primase -pas d'activité exonucléasique 3'->5' <p>delta:</p> <ul style="list-style-type: none"> -activité exonucléasique 3'->5' -pas de primase <p>epsilon:</p> <ul style="list-style-type: none"> -activité exonucléasique 3'->5' -pas de primase <p>béta:</p> <ul style="list-style-type: none"> -répare les courts fragments d'ADN <p>gamma:</p> <ul style="list-style-type: none"> -réplique l'ADN mitochondrial -activité exonucléasique 3'->5' 	<p>ADN pol III:</p> <ul style="list-style-type: none"> -polymérase -activité exonucléasique 3'->5' <p>ADN pol I:</p> <ul style="list-style-type: none"> -activité exonucléasique 5'->3' -polymérase -activité exonucléasique 3'->5' <p>ces 2 dernières activités forment le fragment de Klenow</p>
Fragments d'Okazaki	300 Pb	1000 à 2000 Pb
ADN ligase	I, II ou III	ADN ligase

NB

Il n'existe pas chez les eucaryotes d'équivalent de séquence *ter* et de protéine TUS des procaryotes .

V. La réplication chez les eucaryotes

La réplication de l'DNA chez les eucaryotes a lieu au cours de la phase S du cycle cellulaire.



A. Initiation

-La réplication débute au niveau des **origines de réplication**. L'**antigène T** reconnaît ce site d'initiation, s'y fixe et entraîne l'ouverture de la double hélice d'ADN par son activité **hélicase** ; la protéine **RP-A** se fixe aux régions d'ADN simple-brin pour prévenir leur réassociation.

- L'ADN polymérase α (Pol α) synthétise l'amorce ARN-ADN de chaque brin continu et de chaque brin discontinu, grâce à son activité **primase**, suivi d'un fragment d'ADN de 20 à 30 nucléotides grâce à son activité **ADN polymérase**.

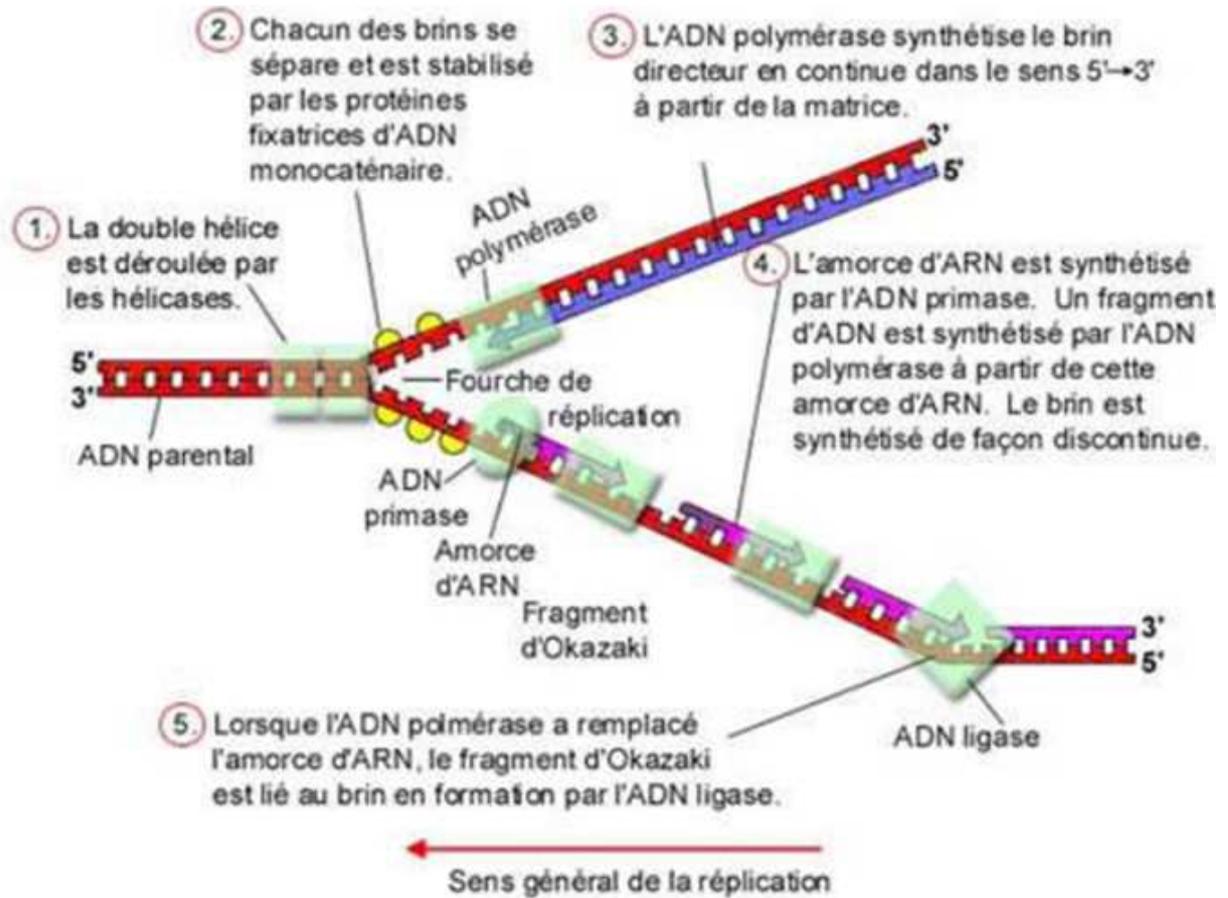
B. Elongation

-La protéine **RF-C (replication factor C)** reconnaît le complexe matrice-amorce et recrute la protéine **PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen)** qui provoque le remplacement de l'ADN polymérase α par l'ADN polymérase δ ou l'ADN polymérase ϵ , cette dernière reprend la synthèse pendant que l'antigène T continu à fonctionner comme hélicase et que la topoisomérase I relâche la tension devant la fourche de réplication.

- Le brin continu est synthétisé sans interruption par l'ADN polymérase δ ou l'ADN polymérase ϵ (ADN pol δ participe également à la réparation de l'ADN).
 - Lorsque sur le **brin discontinu** l'ADN polymérase δ (ou ϵ) s'approche de l'amorce d'ARN-ADN précédemment synthétisée, cette dernière est éliminée **par une RNase H1** (une endonucléase qui détache la séquence des ribonucléotides sauf celui lié au premier désoxynucléotide qui est éliminé par l'exonucléase **FEN-1**).
- l'ADN polymérase δ engagé dans la synthèse du fragment d'Okasaki "**bouche le trou**" laissé par le départ de l'amorce
- L'ADN ligase I ligature enfin l'extrémité 5'-P de la séquence de l'amorce du fragment d'Okasaki en amont à l'extrémité 3'OH du fragment d'Okasaki en aval et ainsi de suite.

C. Terminaison

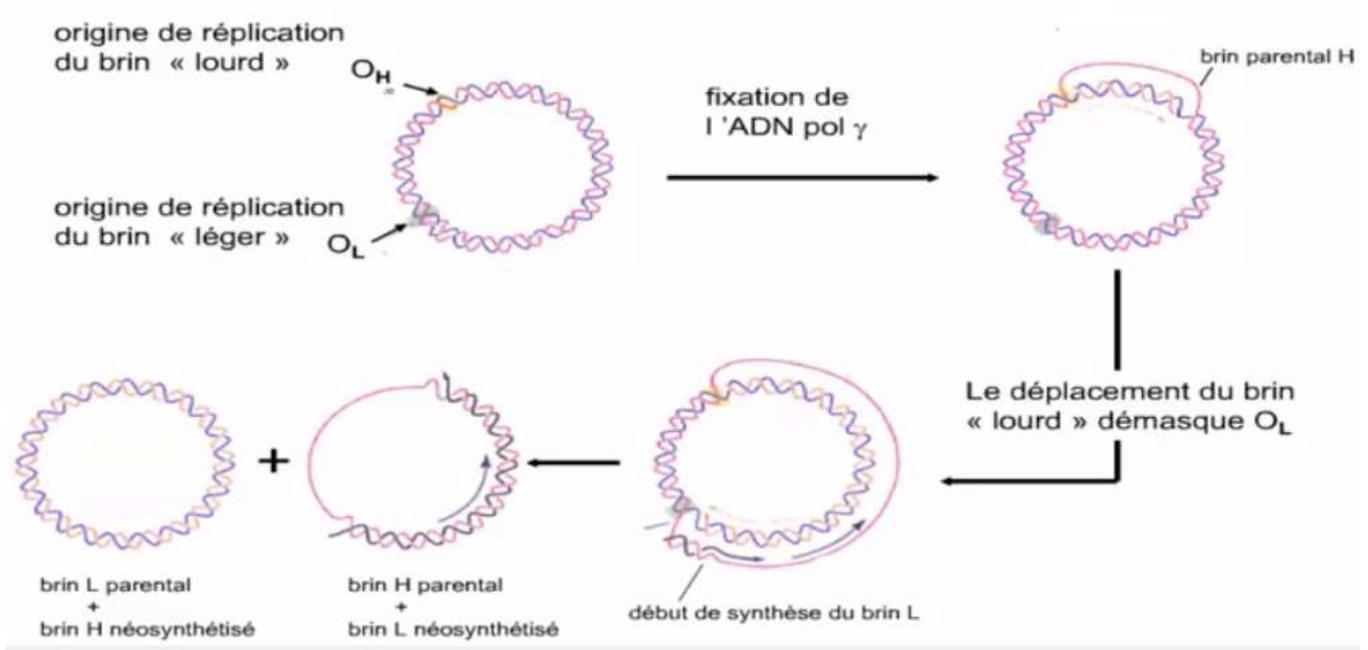
- Quand la synthèse des 2 copies est achevée, la **topoisomérase II** décatène les 2 chromosomes.



Mécanisme générale de la réplication

VI. La réplication de l'ADN mitochondrial

- la réplication de l'ADN mitochondrial circulaire n'est pas limitée à la phase S du cycle cellulaire.
- Elle utilise deux origines de réplication et fait intervenir une structure intermédiaire à 3 brins
- L'ADN polymérase Gamma est responsable de la réplication de l'ADN mitochondriale dont la réplication est indépendante de l'ADN nucléaire.
- la réplication de l'ADN mitochondriale est contrôlée par des gènes nucléaires et fait intervenir de nombreux facteurs protéiques.



Références bibliographiques

1. Christian Moussard. Biochimie et biologie moléculaire .de Boeck 2^{ème} tirage 2011, ISBN :978-2-8041-6229-0.
2. -Neddjma Ameziane ,Marc Bogard,Jerome Lamoril. Principe de biologie moléculaire en biologie clinique .Elsevier p50-60.ISBN 2-84299-685-2.
3. -Jack J.Pasternak. Génétique moléculaire humaine.de boeck p102-115.ISBN 2-7445-0147-6.
4. JOHNSON B.Nathalie ,MISSINOU Anani Amégan ,SONGUINE Nam-Pan ,TOKOU-LABITE Adjélevi. UE BCH 230 BIOLOGIE MOLECUAIRE DU GENE. Université de Lomé(UL) Faculté Des Sciences(FDS) Département de Biochimie. Année 2012-2013.
5. -Internet