

Université de M'sila
Faculté des Sciences
Département de Biochimie et Microbiologie
3^{ème} année BIOCHIMIE

Matière : de Biologie moléculaire

Responsable du module

Dr. Boubekour. H

REPLICATION DE L'ADN

I / DEFINITION :

La réplication de l'ADN est un mécanisme complexe au cours duquel la quantité du matériel génétique cellulaire double.

Elle se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire, l'ADN est alors en double exemplaire dans la cellule mère pour que chaque cellule fille reçoive une copie complète de l'ADN. Ce processus peut-être appelé duplication car on obtient deux molécules d'ADN à partir d'une seule.

II/ MECANISME DE LA REPLICATION :

La réplication de l'ADN dans les cellules eucaryotes et procaryotes se déroule selon un mécanisme identique. Elle est cependant beaucoup plus complexe chez les eucaryotes. On prend comme modèle : la réplication chez E.coli.

II.A. Chez les procaryotes :

Chaque brin de la double hélice parentale est copié en brin complémentaire. Il en résulte deux doubles hélices d'ADN à partir d'une seule. C'est pour cela qu'on parle de réplication semi-conservatrice (expérience de Meselson et Stahl).

Sachant que la partie servant de matrice est = ADN parentale et l'ADN copié en brin complémentaire = ADN néoformé.

On peut subdiviser la réplication en 3 temps :

II.A.1. Initiation

La réplication est dite orientée ; elle commence au niveau d'un site spécifique : le site Ori C. Ori C est une séquence de 246 paires de bases qui contient 4 sites spécifiques en quatre répétitions d'une séquence spécifique. Une protéine spécifique DnaA « concept fondamental » (reconnaissance spécifique entre une protéine et de l'ADN) initie l'assemblage des protéines et des enzymes nécessaires à la réplication.

. Puis fixation de s'associe à ces 4 sites et on aura donc les étapes successives suivantes :
 → Déroulement de l'hélice par la topoisomérase II, appelée aussi (*ADN gyrase*) introduit des supertours négatifs pour résoudre la crise topologique. Le brin torsadé et tiré aura tendance à former des nœuds, qui empêcheraient la réplication. Elle clive donc une chaîne nucléotidique et le resynthétise après l'avoir «détordu».

L'ADN gyrase est la cible de certains antibiotiques (quinolones) qui entraînent la mort de la bactérie en l'empêchant de répliquer leur ADN.

→ Ouverture de l'hélice d'ADN en une région riche en AT (moins de liaisons hydrogène donc plus facile à ouvrir) par l'hélicase ou DnaB (reconnaissance spécifique entre deux protéines), qui utilise de l'ATP

→ Stabilisation transitoire de la partie déroulée(maintient de l'hélice ouverte) par les protéines SSB (Single Strand Binding protéine : protéine se liant à un seul brin). Ceci correspond au début de la formation de l'œil de réplication dont les bords en "Y" sont appelés fourche de réplication.

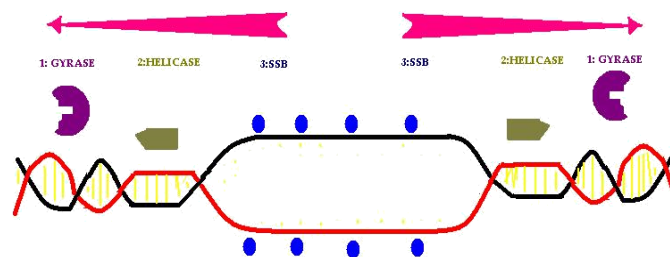


Figure 1 : récapitulatif de l'action des 2 enzymes lors de la formation de l'œil de réplication

II.A.2. Elongation :

La synthèse de l'ADN est bidirectionnelle à partir de l'ori C ; elle a lieu le long de la molécule d'ADN dans les deux sens opposés (deux fourches de réplication).

L'élongation nécessite l'action d'un type d'enzymes spécifiques : Les ADN polymérases qui utilisent comme substrat les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) car la polymérisation nécessite de l'énergie.

Chacun des deux brins d'ADN situé au niveau de la fourche de réplication sert de matrice pour la synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN.

Les deux brins parentaux sont anti-parallèles ; l'un vers le sens 5'→3' et l'autre dans le sens 3'→5'.

L'élongation de l'ADN progresse toujours dans le sens 5'→3' et produit un brin complémentaire et anti-parallèle au simple brin d'ADN matrice.

- Pour commencer la synthèse de l'ADN, les ADN polymérase III ont besoin d'une petite région double brin formée d'une amorce d'ARN d'une dizaine de bases appariées aux brins matrices. Cette amorce (primer) est synthétisée par une ARN polymérase **appelée primase**. Ces amorces d'ARN sont indispensables car l'ADN polymérase III a besoin d'une extrémité 3'-OH libre pour lier le premier dNTP.

L'élongation se fait grâce à l'ADN polymérase III. Chez E.coli, la dissymétrie de fonctionnement de l'ADN-pol III (réplicase, holoenzyme) correspond à une dissymétrie de composition en 2 complexes enzymatiques formés d'une dizaine de sous-unités différentes. l'un assure la synthèse du brin continu et l'autre la synthèse du brin discontinu.

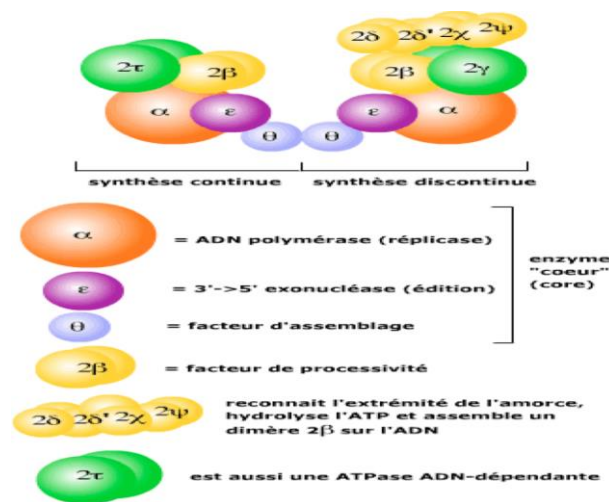


Figure2 : Structure de l'ADN polymérase III

Comme l'action de l'ADN polymérase III se fait que dans le sens 5'-3' et que les brins matrices sont anti-parallèles, il existe sur la fourche de répliation 2 mécanismes de répliation différents :

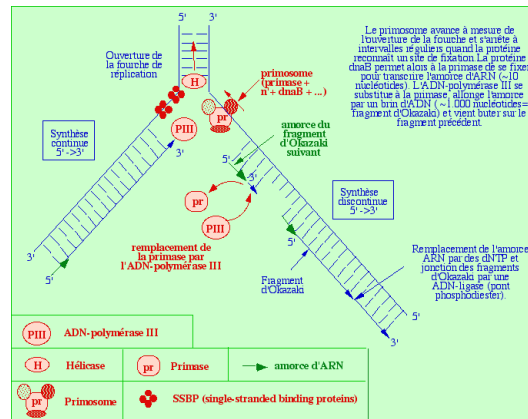
► **Synthèse d'un brin direct (précoce) :**

C'est le brin synthétisé, complémentaire du brin parental orienté 3'→5'. La progression de la copie a le même sens de progression de la fourche de répliation l'ADN polymérase III doit synthétiser sur une longue distance. L'ADN POL III est donc maintenue au brin d'ADN parental par un collier coulissant (clamp). Pour E. Coli, c'est la sous-unité β du complexe holoenzyme qui joue le rôle de clamp. Cela permet à l'ADN POL III de rester associer au brin parental.

► **Synthèse d'un brin retardé (tardif) :**

C'est le brin complémentaire du brin parental orienté 5'→3'. Le sens de la progression de la copie est opposé au sens de progression de la fourche de répliation. Ce brin ne peut-être synthétisé que de façon discontinue sous la forme d'une série de petits fragments appelés : fragments d'Okasaki.

Chaque fragment commence par une amorce d'ARN puis il y a élongation par l'ADN polymérase III dont la Vitesse de polymérisation est de 250-1000 bases / sec, ce qui permet à la réplication du chromosome bactérien de se faire en 40min. Ensuite. L'amorce d'ARN est hydrolysée par une exonucléase 5' ->3', activité portée par le domaine additionnel de l'ADN pol I, puis les trous entre les fragments d'Okazaki sont comblés par l'ADN polymérase I dont la Vitesse de polymérisation est 16-20 bases / sec et enfin une ADN ligase relie les fragments entre eux.



primase + hélicase = primosome

Figure 3 : Les étapes de la réplication.

II.A.3. Terminaison

Au niveau d'une séquence TER située à l'opposé de l'origine de réplication reconnu par la protéine Tus qui met fin à la réplication, ce mécanisme fait intervenir d'autres protéines encore mal connus

Lorsque la réplication d'un chromosome circulaire est terminée, les 2 molécules obtenues sont reliées ensemble, comme les maillons d'une chaîne on remarque la formation de la forme théta :θ. La séparation se fait par une topoisomérase lors de la rencontre de 2 fourches de réplication, la topoisomérase type IV assure la ligation et la topologie (les supers enrôlements positifs) de la molécule est réalisée par la topoisomérase II.

Remarque

ADN polymérase II intervienne dans la réparation de l'ADN, dont la vitesse de polymérisation est de 5-10 bases / sec.

Modification et restriction

Chez la bactérie, l'ADN peut être méthylé au niveau de 2 bases : sur la cytosine ou sur l'adénine. L'enzyme qui produit ces méthylations est la méthylase. Elle catalyse l'ajout d'un groupement

méthyle (-CH₃) sur un A ou un C du brin fils. La méthylation du brin fils se fait toujours avec un temps de retard.

La méthylation du brin fils néosynthétisé s'effectue également au niveau des séquences palindromiques (qui se lit pareil dans les deux sens). Seule l'adénine est méthylée sur ces séquences. La méthylase méthyle le brin fils si le brin matrice est méthylé lui-même. Cette méthylation s'effectue avec un temps de retard, après la réplication. Pendant un court instant les deux patrimoines génétiques, prêts à être transmis aux cellules filles, ont un des deux brins méthylé, et l'autre brin pas encore méthylé. Au bout de quelques minutes, on ne peut plus distinguer les deux brins car il y a eu méthylation du brin fils.

Importance de la méthylation :

Le chromosome bactérien possède des séquences répétées : plusieurs séquences GATC, donc la méthylation est un mécanisme de régulation, qui contrôle l'initiation de la réplication suivante. Si cette OriC n'a pas une méthylation qui est exactement en miroir sur les 2 brins, aucune nouvelle initiation de la réplication ne peut démarrer.

Le fait que le brin fils soit méthylé avec un temps de retard cela permet de distinguer les deux brins.

La méthylation est importante aussi pour les défenses de la bactérie, en effet elles ont leur propre virus (bactériophage= virus des bactéries). Une fois que ces virus ont infectés la bactérie, elle ne peut se défendre qu'en synthétisant des enzymes de restriction qui sont des endonucléases. Ces endonucléases clivent une liaison phosphodiester à l'intérieur d'une chaîne d'ADN. Les enzymes bactériennes clivent le génome viral, **c'est le phénomène de restriction**. Chaque enzyme reconnaît une séquence particulière : le palindrome. La bactérie doit protéger son propre génome de l'action de ces enzymes, ce qui est permis par les méthylations.

II.B. Chez les eucaryotes :

La réplication est également semi conservatrice, bidirectionnelle et orientée. C'est le même principe avec cependant certaines différences :

- Chez les eucaryotes, le site : origine de réplication est appelé "Séquence autonome de réplication" (ARS = autonomous replication sequence).

Il existe sur l'ADN linéaire un très grand nombre d'ARS.

Au moment de la réplication, il se forme alors plusieurs yeux de réplication sur un même chromosome. Chaque unité de réplication est appelée replicon.

- L'ADN étant associé aux histones, il faut que les nucléosomes se dissocient pour permettre le déroulement de l'ADN et sa réplication.

Les molécules d'ADN nouvellement formées s'organisent très rapidement en nucléosomes en s'associant aux histones.

Chez les eucaryotes, 5 ADN polymérases sont décrites actuellement :

- ▶ L'ADN polymérase α : qui a aussi une fonction primase en s'associant à d'autres enzymes.
- ▶ L'ADN polymérase β et ADN polymérase ϵ : sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN car elles ont une activité exonucléasique dans le sens 3'→5'.
- ▶ L'ADN polymérase δ (delta) : qui est responsable de l'élongation de l'ADN nucléaire. Elle a aussi une activité exonucléasique 3'→5'.
- ▶ L'ADN polymérase γ (gamma) : responsable de l'élongation de l'ADN mitochondrial.
- ▶ L'amorce d'ARN qui sert pour l'élongation est éliminée par une RNase H et l'exonucléase FEN1
- ▶ Pas d'équivalent de séquence Ter et de protéine TUS des procaryotes
- ▶ Intervention de cohésines pour stabiliser les chromatides jusqu'à l'anaphase
- ▶ Répartition aléatoire des nucléosomes entre les deux nouveaux doubles brins
- ▶ Intervention de topo-isomérases de type I (A, B) et II
- ▶ Les topo-isomérases humaines sont la cible de certains agents de chimiothérapie anti-tumorale
Exemple : irinotecan® (inhibiteur de la topo I humaine)

Réplication des télomères

La réplication des brins d'ADN 5' → 3' au sein des réplicons est plus complexe que celle des brins 3' → 5'. De plus, sur ces brins 5' → 3', du fait de la nécessité de la présence d'une amorce, la réplication des extrémités 3' terminales n'est pas possible.

Les ADN polymérase sont incapables de répliquer les extrémités 3' de chacun des 2 brins d'un chromosome : ces extrémités sont donc terminées par un simple brin d'ADN qui est finalement dégradé, les chromosomes sont raccourcis à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement donc est dû à l'incapacité de l'ADN polymérase de remplacer l'amorce éliminée par la RNase H. Il subsiste un monobrin à l'extrémité 3' qui est alors dégradé

Les cellules eucaryotes disposent de télomères : séquence 5'-- TTAGGG --3' aux 2 extrémités des chromosomes, répétitives, non codantes, consommées progressivement, à chaque division

cellulaire, rôles de protection des chromosomes évitant aux régions internes, fonctionnellement importantes, d'être supprimées.

On peut donc en conclure la possibilité pour les cellules de se diviser un certain nombre de fois, nombre limité par la longueur des télomères.

Ainsi, les cellules jeunes, qui se sont divisées un petit nombre de fois, possèdent de long télomères. Les cellules âgées, qui se sont divisées un grand nombre de fois, possèdent des télomères plus courts. Cependant, certaines cellules de notre organisme sont capables de se diviser un grand nombre de fois : elles disposent d'une enzyme active, la télomérase. Son rôle est d'allonger les télomères.

La télomérase ajoute des copies de télomères 5'-- TTAGGG --3' aux extrémités 3' simple brin des chromosomes, possède une courte séquence d'ARN incorporée dans sa protéine.

Cette séquence d'ARN s'apparie, par l'une de ses extrémités, à la séquence 3' d'ADN télomérique, sert de matrice, par l'autre extrémité, pour la synthèse d'ADN télomérique.

Dans les cellules embryonnaires, les cellules souches, les cellules germinales et cancéreuses, les télomères sont rallongés grâce à une enzyme de type transcriptase réverse. Cette enzyme TERT (télomérase retrotranscriptase) n'a pas besoin d'une matrice de l'ADN chromosomique, car elle possède elle-même une matrice ARN appelée TERC (télomérase RNA component) (fig.8) La télomérase est une transcriptase inverse. La télomérase agit plusieurs fois en se translocant. Une primase fixe une amorce en 3' du brin allongé. Une ADNpol Delta synthétise le brin complémentaire. Une ligase lie les 2 brins (d'ADN fils).

Les télomères humains sont prévus pour se raccourcir d'environ 100 paires de bases par division cellulaire . Ils passent de 12000 nucléotides chez un nouveau-né à 4000 nucléotides chez une personne de 80 ans. Le raccourcissement conduit la cellule vers la sénescence. Au bout d'une certaine limite, la cellule cesse de se diviser, elle est orientée vers l'Apoptose et meure.

Au contraire, la télomérase est active dans les cellules souches embryonnaires. Ces cellules se divisent très activement au début de la vie de l'individu lors de la formation des organes ; dans les cellules souches (moelle osseuse...) : ces cellules se divisent indéfiniment toute la vie de l'individu. Dans les cellules tumorales : mécanisme pathologique de prolifération anarchique.

Les télomères ont également un rôle dans la stabilité des chromosomes : le vieillissement cellulaire favorise l'instabilité génétique.

En effet, en l'absence de télomérase, les télomères se raccourcissent irréversiblement à chaque passage de la fourche de réplication, provoquant un arrêt progressif de prolifération (figure 2). Ainsi, en régulant l'activité de la télomérase, les eucaryotes régulent le potentiel prolifératif de

leurs cellules, une propriété clé de la multicellularité dans ce règne du vivant. Chez l'homme, la sénescence télomères-dépendante constitue une voie majeure de suppression de tumeurs. Ainsi, la recherche dans le domaine de la biologie des télomères a contribué considérablement à des avancées conceptuelles, non seulement dans des matières fondamentales comme la génétique moléculaire, mais aussi dans la compréhension du vieillissement cellulaire et la transformation cancéreuse.

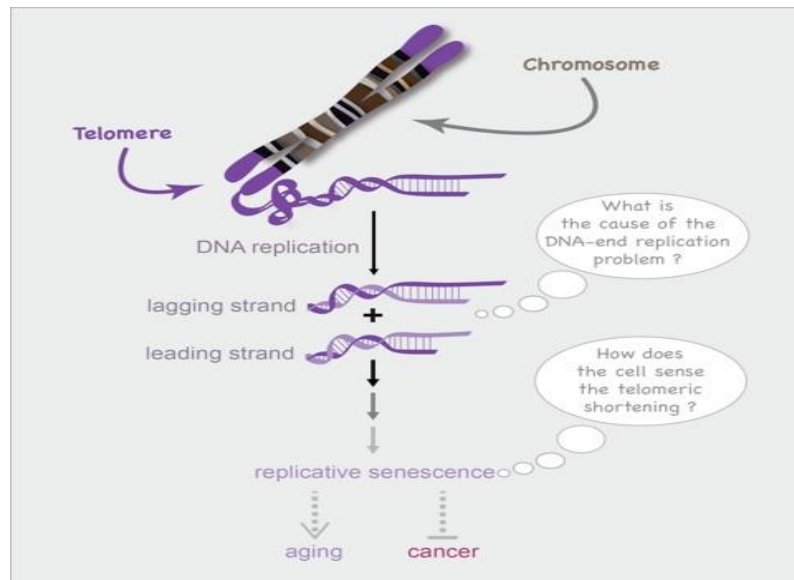


Figure4 : l'effet de l'absence de télomérase sur la réplication des chromosomes

Réplication de l'ADN mitochondrial (l'ADNmit)

La réplication de l'ADNmit circulaire utilise 2 origines de réplication (du brin « lourd » O_H , du brin « léger » O_L), une ADN pol γ et fait intervenir une structure intermédiaire à 3 brins.

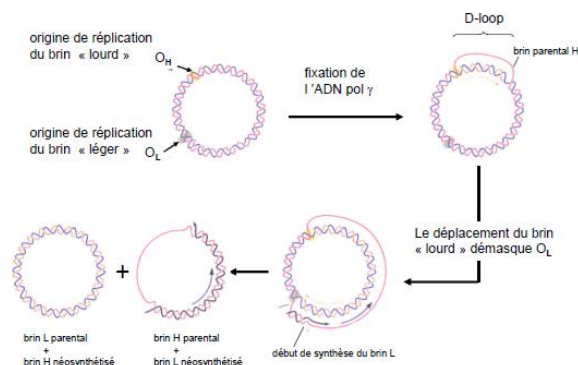


Figure5 : Représentation schématique du génome mitochondrial au cours de la réplication.

La synthèse débute au niveau de l'origine de réplication du brin lourd (O_H), l'ADN polymérase γ synthétise jusqu'à l'origine de réplication du brin léger (O_L) au deux tiers du génome. Une fois les brins ouverts au niveau de l' O_L , la réplication du second brin démarre dans

le sens inverse jusqu'à rencontrer la fourche de réplication du premier brin puis nous obtenons 2 molécules d'ADN mitochondrial double circulaire.

La réplication de l'ADNmit est contrôlée par des gènes nucléaires et fait intervenir de nombreux facteurs protéiques

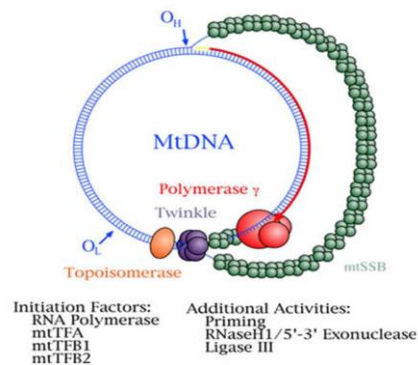


Figure. 6 : facteurs protéiques de la réplication

L'ADN mitochondrial (ADNmt) de plusieurs espèces a été entièrement séquencé. Celui des mammifères a une longueur d'environ 16 kb, celui de l'homme est de 16 569 pb. Cet ADN est double brin et circulaire. La chaîne lourde code pour 12 polypeptides, sous-unités d'enzymes respiratoires, deux ARN ribosomiaux et 14 ARN de transfert. La chaîne légère code pour un seul polypeptide et huit ARN de transfert. Les autres polypeptides de la chaîne respiratoire, ainsi que les protéines impliquées dans la réplication, la transcription et la traduction du génome mitochondrial, sont codés par l'ADN nucléaire, synthétisés dans le cytosol et importés dans la mitochondrie par l'intermédiaire ou non de transporteurs membranaires.

L'ADN mt des mammifères est très compact, il est codant sur toute sa longueur, à l'exception d'une région appelée boucle D qui contient l'origine de réplication de la chaîne lourde, ainsi que les deux promoteurs de transcription, et d'une région très courte qui contient l'origine de réplication de la chaîne légère, qui n'entre en jeu que lorsque les deux tiers de la chaîne lourde sont répliqués. Chaque chaîne est transcrite en une seule molécule polycistronique contenant la copie de chaque gène codé par la chaîne. Les ARN sont ensuite découpés au niveau des ARN de transfert, les ARN messagers sont polyadénylés. On notera l'absence d'intron chez les mammifères.

Les ARN messagers sont ensuite traduits en polypeptides en utilisant les 22 ARN de transfert et les ribosomes présents dans les mitochondries, qui ont une structure différente de celle des ribosomes cytoplasmiques. Il est également à noter que le code génétique utilisé par les mitochondries n'est pas identique au code génétique « universel » utilisé pour la traduction des gènes nucléaires. La compaction de l'ADNmt est particulière aux mammifères. Chez la levure, sa

longueur est cinq fois plus grande, presque tous les gènes sont portés par un même brin, il existe des introns, ainsi que des régions non codantes entre les gènes. Par ailleurs, les gènes mitochondriaux présentent un grand polymorphisme, plus grand même que le polymorphisme nucléaire, si bien que chaque individu d'une espèce peut se caractériser par son « empreinte », mitochondriale comme par son empreinte nucléaire. A ce polymorphisme se superpose parfois une hétéroplasmie mitochondriale, c'est-à-dire la présence dans un même tissu, et peut-être même dans une même cellule, de molécules d'ADN mt de structures différentes avec répétition ou délétion de certaines séquences. Une hétéroplasmie constitutionnelle a été mise en évidence chez le lapin et dans certaines souches de drosophile.

Il n'est pas surprenant que l'ADNmt soit la cible privilégiée des cancérogènes chimiques et que les lésions provoquées par ces composés soient persistantes.

- L'ADNmt se réplique indépendamment de l'ADN nucléaire, tout au long de la vie cellulaire. Il est vraisemblable que l'ADN monocaténaire soit particulièrement sensible aux effets des cancérogènes.
- L'ADNmt est combiné à peu de protéines, alors que l'ADN nucléaire est protégé dans une certaine mesure par les protéines de la chromatine.
- Les systèmes de réparation de l'ADN dans les mitochondries sont peu efficaces, si bien que les lésions provoquées par les agents chimiques peuvent persister au cours des réplifications successives dans la mesure où les molécules lésées ont conservé leur capacité de répllication.

Il semble donc clairement établi que les carcinogènes chimiques, qui sont à l'origine d'un grand nombre de cancers humains, peuvent se lier à l'ADNmt et provoquer des mutations. On ne peut cependant affirmer actuellement que l'ADN mt est modifié dans toutes les cellules cancéreuses. Par ailleurs, les mitochondries sont également les cibles d'agents antitumoraux qui se fixent à l'ADNmt. Il en résulte un arrêt de la répllication et la dégradation de cet ADN. Ainsi le **déqualinium**, par ce mécanisme, inhibe la croissance du carcinome du côlon

Les maladies mitochondriales.

De nombreuses maladies ont pour origine un dysfonctionnement mitochondrial, pouvant être dû à des mutations au niveau de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. Ces mutations peuvent entraîner des répercussions sur les oxydations phosphorylantes qui sont donc à l'origine de nombreuses maladies neuromusculaires. Des dysfonctionnements mitochondriaux peuvent être également dues à des mutations au niveau des gènes de l'ADN mitochondrial.

II.1- Mutations de gènes nucléaires. Exemples de maladie : L'ataxie de Friedreich mutation du gène FXN (codant pour la frataxine) : Défaut d'assemblage de la machinerie Fe/S. L'ataxie de Friedreich est une maladie autosomale récessive entraînant une dégénérescence du système nerveux central et périphérique, souvent accompagnée de cardiomyopathie. Elle se manifeste par la dégénérescence des neurones à longs axones des ganglions de la racine postérieure des nerfs rachidiens. Cette maladie atteint 1 personne sur 50 000, elle est due à l'insertion de répétitions GAA (de 200 à 1300 répétitions) dans un intron du gène de la frataxine: FXN, alors qu'au niveau des allèles normaux on observe de 7 à 38 répétitions seulement. Cette insertion peut être due à un déplacement de brin lors de la réplication de l'ADN, le brin déplacé formant une structure secondaire. Il en découle que des régions ADN simples brins contenant des répétitions GAA sont capables de former différents types de structures secondaires, qui peuvent être impliquées dans **l'instabilité du génome** Ces structures secondaires entraîneraient le glissement des ADN polymérase répliquatives ainsi que l'insertion de nouveaux triplets GAA.

Il a été proposé que les nombreuses répétitions GAA interfèrent avec le processus de transcription en formant une structure aberrante de l'ADN ou en induisant la formation **d'hétérochromatine répressive. Il s'agit d'une structure chromatiniennne qui empêcherait la transcription.** Ainsi ces insertions entraîneraient un « silencing » du gène FXN. **Il en résulte la déficience de cette petite protéine** hautement conservée chez les animaux, les invertébrés, la levure et les plantes. La frataxine serait un composant de la machinerie d'assemblage des hèmes Fe/S et permettrait la maturation des protéines Fe/S mitochondriales et cytosoliques. L'absence de la frataxine **entraînerait une augmentation de fer libre dans la matrice mitochondriale,** avec pour conséquence **la production de ROS suite à la réaction entre l'oxygène et le fer (réaction de Fenton)** et conduire à l'obtention **d'ion superoxyde capable** d'engendrer des dégâts au niveau de l'ADN mitochondrial, des protéines, et des lipides.

Au niveau des patients, l'accumulation de fer dans les cellules du cœur a été observée et la modification des activités enzymatiques mitochondriales montrent bien l'implication de la mitochondrie dans cette pathologie. Il n'existe aucun mode de guérison de cette maladie, uniquement des médicaments pour traiter les symptômes.