

# La réplication

---

## I. Les 3 modèles

La structure de l'ADN a été découverte en 1953 par Watson et Crick. Ils ont découverts les mécanismes de la réplication tels que l'ouverture de la double hélice d'ADN et la copie de chaque brin mère.

Mais lors de l'ouverture de la double hélice, il se crée des torsions. Les brins d'ADN sont donc obligés de tourner de 50 tours/s pour compenser la formation de super-enroulements positifs ou négatifs selon le sens. Et dans un génome circulaire, il y aurait formation d'un nœud.

Trois modèles ont été proposés pour éviter les distorsions :

- Semi- conservatif de Watson et Crick ;
- Dispersé : les 2 brins sont des chimères ou patchwork de morceaux d'ADN coupés par des enzymes ;
- Conservatif : la double hélice serait recopiée telle quelle sans être ouverte, un brin mère servirait de matrice à la synthèse d'un nouveau brin qui servirait à son tour de matrice pour la synthèse du deuxième brin de la double hélice.

### 1. Expérience de Meselson et Stahl

Les expériences de Meselson et Stahl ont permis de montrer que la réplication de l'ADN se faisait selon le mode semi-conservatif. Ils ont cultivés *E. coli* pendant plusieurs générations dans un milieu contenant de l'azote radioactif ( $^{15}\text{N}$ ), isotope lourd, comme seule source d'azote, de sorte que l'ADN synthétisé dans ce milieu soit lourd. A un moment donné, ils ont transféré la culture dans un milieu contenant du  $^{14}\text{N}$ . Ils ont ensuite prélevé des bactéries, à intervalles réguliers et ont analysés leur ADN par centrifugation en gradient de chlorure de césium, ce qui permet de séparer les molécules en fonction de leur densité, l'ADN le plus lourd migrant vers le fond du tube. Ils ont constaté qu'après une seule génération dans le milieu, il y avait formation d'une seule bande ayant une densité intermédiaire entre celle de l'ADN lourd et celle de l'ADN léger ; ce qui signifierait que les molécules d'ADN sont formées d'un brin lourd original et d'un brin léger néosynthétisé. Après 2 générations dans le milieu, il y a apparition de 2 bandes d'intensité égale, l'une correspondant aux hybrides et l'autre aux molécules formées de 2 brins légers. Ces résultats sont conformes à ce que l'on peut trouver dans le cas d'une réplication semi-conservative.

Dans le cas d'une réplication conservative, au bout de la première génération il y aurait déjà apparition de 2 bandes puisque la nouvelle molécule d'ADN serait formée de 2 brins légers alors que la molécule mère serait formée de 2 brins lourds.

Dans le cas d'une réplication dispersée, au bout de la première génération il y aurait apparition d'une seule bande avec le mélange d'ADN, mais au bout de la deuxième génération on ne pourrait pas observer 2 bandes puisque tous les brins auraient toujours la même densité.

## 2. Les topoisomérases

Ce sont des enzymes qui modifient la topologie (forme) de l'ADN en coupant l'ADN sans reconnaître une séquence donnée.

### a. Type I

Elles coupent un seul brin d'ADN, ce qui permet de relâcher les tensions créées lors de l'ouverture de la double hélice. Si l'ouverture de la double hélice crée des super-tours positifs, la topoisomérase de type I créera des super-tours négatifs ce qui permet un contre balancement.

Certaines topoisomérases de type I peuvent agir soit sur de l'ADN avec super-enroulement positif ou négatif, d'autres agissent uniquement sur l'ADN avec super-enroulement négatif.

### b. Type II

Elles coupent de manière transitoire les deux brins de l'ADN, puis les ressoude, c'est le cas de la gyrase bactérienne. Cette enzyme permet de désenrouler l'ADN.

## II. Initiation à la réplication

### 1. Le réplicon

C'est une molécule d'ADN qui ne se réplique qu'une seule fois par cycle cellulaire, elle est linéaire ou circulaire et possède une origine de réplication (Ori) et des signaux de terminaison.

Chez les bactéries, le réplicon constitue l'ensemble du chromosome ; chez les eucaryotes il y a plusieurs réplicons par chromosomes.

Lors de l'ouverture de la double hélice d'ADN, il y a formation d'un œil de réplication dans le réplicon, ce qui permet d'obtenir un deuxième brin.

A partir d'expériences sur *B. subtilis*, on a pu établir que la réplication était bidirectionnelle. Le principe de ces expériences est simple : il a suffi, tout d'abord, de cultiver ces bactéries sur un milieu contenant une forte concentration de thymidine tritiée puis de les refaire germer les spores sur un milieu contenant de la thymidine tritiée faiblement radioactive. Sur une autoradiographie, l'ADN fortement marqué donnera une image de grains plus gros que l'ADN faiblement marqué. Les résultats ont pu montrer qu'il y a bien 2 fourches de réplifications car on observe 2 points de croissance faiblement marqués entourant l'ADN fortement marqué (Ori).

### 2. L'origine de réplication

**Chez les bactéries** il n'y a qu'une seule origine de réplication connue de 245pb. Chez les mammifères il y a plusieurs réplicons, et la réplication commence à différents moments de la phase S.

L'origine de réplication d'*E. coli* est connue sous le nom d'*oriC* et s'étend sur 245 pb. Elle est constituée de 3 séquences répétées de 13 pb suivies de 4 séquences répétées de 9 pb.

Des protéines, appelées DnaA, vont se lier aux séquences répétées de 9 pb. L'ADN va ensuite s'enrouler autour du complexe protéique de DnaA. Ce changement de conformation de l'ADN entraîne l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau des séquences répétées de 13 pb riches en Adénine et Thymine (liées par 2 liaisons hydrogènes donc plus facile à rompre que les liaisons C-G) ce qui permet aux enzymes et autres facteurs de se lier sur les brins dissociés et de démarrer la réplication.

Lorsque l'ADN est ouvert/dénaturé, les DnaB hélicases sont transportées par les DnaC au niveau des simples brins de l'ADN en présence d'ATP. Ce complexe n'a pas d'activité hélicase mais une fois que les DnaB hélicases sont fixées au niveau des simples brins, les molécules de DnaC quittent le complexe, ce qui permet à DnaB d'agir. Il y aura une hélicase par fourche de réplication qui se déplacera de 5' en 3'. Une hélicase est une enzyme qui sépare les 2 brins de l'ADN. L'hélicase DnaB va donc séparer les 2 brins sur une plus grande distance, dans le sens de la progression de la fourche de réplication de 5' en 3'. Le SSB fixé sur les simples brins d'ADN inhibe la réassociation de ceux-ci en double hélice.

**Chez les eucaryotes** il y a 4 motifs de 20pb. Il y a 6 ORC (complexe de reconnaissance des origines) qui se fixent sur les motifs A et B1 qui constituent l'origine de réplication ; puis l'ABF1 se fixe au niveau du motif B3 pour induire l'ouverture de la double hélice au niveau du motif B2.

### III. La fourche de réplication

#### 1. Synthèse du brin continu et attardé

Il y a synthèse d'un brin de façon continue de 5' en 3' dans le même sens que la fourche de réplication, et synthèse du deuxième brin de façon discontinue en sens contraire de la fourche de réplication avec formation de fragments d'Okazaki.

#### 2. Les enzymes intervenant au niveau de la fourche de réplication

Devant la fourche de réplication, la topoisomérase forme des super-tours négatifs pour compenser les super-tours positifs engendrés par le déroulement de la double hélice d'ADN. Ensuite une hélicase DnaB est associée à une DNA primase sur le brin attardé, cette primase va synthétiser l'amorce ARN de 10-12 nucléotides qui permet la mise en place des fragments d'Okazaki. Les protéines SSB sont fixées sur les simples brins pour éviter que ceux-ci ne se ré-enroulent. Enfin, l'ADN polymérase III ADN dépendante est l'enzyme répliquative impliquée dans la synthèse des 2 nouveaux brins.

A noter que chez les bactéries les fragments d'Okazaki sont beaucoup plus grands que chez les eucaryotes.

### 3. Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase ADN dépendante

La formation des liaisons phosphodiesters entre les nucléosides est catalysée par la DNA polymérase III.

La synthèse d'un brin d'ADN s'effectue par l'enchaînement de désoxyribonucléotides (dNTP). Les ADN polymérases ne peuvent réaliser une synthèse d'ADN en absence d'ADN servant de matrice (ADN parental). Ces enzymes catalysent la formation de liaisons phosphodiesters qui impliquent le phosphate 5' (alpha) d'un dNTP libre et l'hydroxyle 3' libre d'un brin d'ADN en formation. Cet enchaînement s'effectue en respectant la règle de complémentarité des bases. Cette règle veut que le dNTP additionné soit le complémentaire du dNTP en vis-à-vis sur le brin matrice. Cela sous-entend que la polymérase est une enzyme de réplication qui a pour substrat un fragment d'ADN et catalyse la polymérisation de l'ADN monocaténaire complémentaire en formant des liaisons phosphodiester dans le respect de la règle de complémentarité des bases (A-T ; G-C).

### 4. Synthèse du brin attardé

L'ADN polymérase III synthétise le brin attardé d'ADN jusqu'à ce qu'elle rencontre un fragment d'Okazaki. Comme elle ne possède pas d'exonucléase 5'-3', une ADN polymérase I rentre en jeu. L'ADN polymérase I reconnaît l'extrémité 3'OH du nouveau fragment d'Okazaki et peut « digérer » l'amorce ARN du fragment précédent car elle possède une exonucléase 5'-3'. Elle est très peu processive mais distributive, c'est-à-dire qu'elle exerce son action sur très peu de nucléotides. L'ADN polymérase I assure simultanément la polymérisation du fragment d'ADN manquant en utilisant l'extrémité 3' du fragment d'Okazaki suivant.

Il est ensuite nécessaire de lier tous ces fragments d'ADN entre eux de façon covalente. L'ADN ligase est capable de former une liaison phosphodiester entre un 3'OH et un 5'P, à condition que ces groupements soient maintenus proches l'un de l'autre grâce aux liaisons hydrogène échangées entre le brin d'ADN néosynthétisé et le brin parental complémentaire. L'ADN ligase ne peut pas assurer la fermeture si le 5'P appartient à un ribonucléotide, ce qui implique obligatoirement l'enlèvement des amorces d'ARN des fragments d'Okazaki.

La ligature est réalisée en présence d'ATP :

- Adénylation de l'enzyme AMP ;
- AMP reconnaît les points de coupure de l'ADN ;
- AMP se fixe au niveau du P de l'extrémité 5' du fragment d'Okazaki ;
- Catalyse/formation de la liaison.

Les ADN polymérases dépendantes

- nécessitent la présence d'une matrice à copier ;
- ont besoin d'une amorce présentant une extrémité 3'OH ;
- synthétisent le brin d'ADN de 5' en 3' ;
- sont multifonctionnelles.

L'ADN polymérase I possède :

- une activité 5'-3' polymérase ;
- une activité 3'-5' exonucléase ;
- une activité 5'-3' exonucléase (qui ne compose pas le fragment Klenow).

L'ADN polymérase III possède :

- une activité 5'-3' polymérase ;
- une activité 3'-5' exonucléase.

### 5. ADN polymérase III

Elle possède une sous-unité  $\alpha$  qui porte l'activité polymérase et une sous-unité  $\epsilon$  qui porte l'activité 3'-5' exonucléase. Ces deux sous-unités associées à une troisième sous-unité  $\theta$  constituent le core enzyme. Le complexe  $\gamma$  joue un rôle important dans la synthèse de l'ADN, il permet de positionner la pince  $\beta$  (homodimère) au niveau de la fourche de réplication. Le complexe  $\tau$  permet le maintien de l'intégrité de la polymérase III, c'est-à-dire des deux cores associés entre eux.

En présence de l'homodimère, le core enzyme passe de la forme distributive à la forme processive ( $510^5$  nucléotides).

La pince  $\beta$  se fixe au niveau de l'amorce ARN de la fourche en présence du complexe  $\gamma$ , ensuite le core enzyme se fixe à la pince  $\beta$  et les 2 noyaux de l'enzyme sont assemblés en dimère par la protéine  $\tau$ . Cette protéine  $\tau$  interagit avec les 2 cores enzymes dans le même sens.

Les deux brins d'ADN sont synthétisés en même temps : le brin continu est synthétisé de 5' en 3' grâce au complexe core- $\beta$  qui reste fortement associé à l'ADN ; la synthèse du brin discontinu entraîne la formation d'une boucle pour garder une certaine polarité à cause de la position du core enzyme. Mais sur certains schémas il se peut que les cores enzymes soient inversés, cela est dû au fait qu'on ne sait pas encore réellement comme les cores enzymes se positionnent lors de la réplication.

### IV.L'élongation

Une primase associée à l'hélicase DnaB synthétise une amorce d'ARN de 10 à 12 nucléotides. Lors du positionnement d'une nouvelle pince  $\beta$  au niveau de cette amorce la primase est chassée. Le core enzyme se met en place au niveau de cette pince  $\beta$  grâce au complexe  $\tau$ . Le brin discontinu est synthétisé par ADN polymérase III jusqu'à ce que celle-ci rencontre un autre fragment d'Okazaki. La pince  $\beta$  se détache alors de l'holoenzyme mais la nouvelle pince  $\beta$  prend sa place afin de synthétiser un nouveau fragment d'Okazaki jusqu'à ce qu'elle rencontre l'amorce ARN du précédent fragment. Elle se détache alors pour laisser place à une nouvelle pince etc...

Chez les eucaryotes le mécanisme de réplication est plus complexe mais analogue. C'est l'ADN polymérase  $\alpha$  qui synthétise l'amorce ARN ainsi qu'un petit fragment d'ADN de 10 à 12 nucléotides, elle est distributive. Ensuite elle se détache et sera remplacée par l'ADN polymérase  $\delta$  qui elle est processive et permet la synthèse du brin. Pour joindre les différents fragments d'Okazaki, il va falloir éliminer les amorces ARN par la RNase H et l'activité exonucléasique du facteur MF1. Après comblement des brèches ainsi créée par l'ADN polymérase  $\delta$ , l'intervention de l'ADN ligase permet de joindre les différents fragments d'Okazaki et d'obtenir une chaîne d'ADN continue.

## V. Terminaison de la réplication

Chez les bactéries, le réplicon circulaire possède 2 fourches de réplication. Il y a des signaux de terminaison de 23 pbs conservées au niveau de l'ADN qui constituent le site de fixation de la protéine TUS. Il y a 2 terminateurs : un utilisé par la fourche 1 et l'autre utilisé par la fourche 2 car les deux fourches ne progressent pas toujours de la même façon, une peut aller plus vite que l'autre qui pourrait être ralentie à cause d'une correction de base dans l'ADN.

Si le réplisome de la fourche 1 est le plus rapide, il arrive à la protéine TUS2 puis à son terminateur en déplaçant la protéine asymétrique TUS2 car il ne peut pas y avoir de reconnaissance. Mais lorsque le réplisome arrive à la protéine TUS1 de son terminateur, celui-ci est arrêté car il est reconnu par le site de reconnaissance.

Quand la réplication est terminée, les deux génomes sont entrelacés et la topoisomérase IV permet la séparation des 2 ADN fils et la répartition dans les 2 cellules.

Chez les eucaryotes, le brin attardé est raccourci à chaque cycle de réplication dû à un manque de place ou à une amorce ARN qui ne peut plus être dégradée à la fin de la réplication. Il y a donc une perte du matériel génétique.

C'est pourquoi les télomères sur les chromosomes ne portent pas d'information génétique et sont répétés 100 à 1000 fois (5'-TTAGGG-3' chez l'homme). Ces télomères sont synthétisés par la télomérase qui est une particule ribonucléoprotéique qui renferme de l'ARN associé à des protéines. Ces protéines sont des transcriptases inverses (ADN polymérase ARN dépendante). Le bout d'ARN sert de matrice pour la synthèse des télomères au niveau des chromosomes. Il y a donc une complémentarité de base entre l'extrémité 3' de l'ADN et une partie de l'ARN. La transcriptase permet la synthèse de l'ADN à partir de la matrice d'ARN de 5' en 3'. Dans les cellules somatiques la télomérase est inactive, mais celle-ci est très active dans les cellules cancéreuses.

## VI. Erreurs de la réplication et réparation

Il peut y avoir plusieurs mutations au niveau de l'ADN. Elles sont dues à des erreurs de réplication à cause d'agents mutagènes chimiques ou à des radiations. La réparation peut alors être liée ou indépendante de la réplication.

Une mutation au cours de la réplication entraîne un mésappariement qui est détecté par des enzymes MutL et MutS mais pour que la réparation est lieu il faut que ces enzymes fassent la différence entre le brin matrice et le brin néosynthétisé. Cete différence est possible grâce à leur degré de méthylation. En effet, la Dam méthylase reconnaît et méthyle en position N6 les adénines des séquences GATC. Cette méthylation se fait au moment de la réplication mais pas au niveau de la fourche ce qui fait que le brin néosynthétisé n'est pas entièrement méthylé tout de suite.

Le complexe MutL-MutS reconnaît le mésappariement et se fixe sur l'ADN qui forme une boucle jusqu'à ce que le site méthylé le plus proche rentre en contact avec le complexe. Ensuite l'endonucléase MutH coupe au niveau du 5' du brin néosynthétisé et plus précisément au niveau du 5' de la guanine qui appartient au motif GATC non méthylé du brin néosynthétisé. Ensuite selon la localisation de la coupure, c'est soit une exonucléase 5'-3' soit une 3'-5' qui intervient et coupe le fragment d'ADN entre la coupure par MutH et le mésappariement. Cette exonucléase peut éliminer jusqu'à 1000 nucléotides. Le morceau ainsi coupé sera resynthétisé par l'ADN polymérase III qui possède un système de correction et est très processive.

## VII. Les ADN polymérases en recherche

**Klenow polymerase** : c'est une ADN polymérase I qui a perdu son activité 5'-3' exonucléase. En coupant l'ADN, les enzymes de restriction peuvent laisser des extrémités protubérantes qui deviendront à bouts francs grâce à la Klenow polymérase.

**Sequenase** : permet le séquençage de l'ADN (remplace Klenow). L'ADN polymérase du bactériophage T7 a une forte processivité et des activités 5'-3' et 3'-5' exonucléases négligeables.

**Taq polymérase** : ADN polymérase I : *Thermus aquaticus* utilisée en PCR. Elle résiste à de haute température (94°C) et fonctionne jusqu'à 72°C.

**Transcriptase inverse** : ADN polymérase ARN dépendante qui synthétise de l'ADNc.

Séquençage par la méthode de Sanger : méthode enzymatique basée sur l'arrêt statistique de la synthèse d'un brin d'ADN.

L'amorce est un oligonucléotide (petit fragment d'ADN) s'hybridant au niveau du 5' du brin à synthétiser. L'ADN à séquencer doit être simple brin et porté par un vecteur de clonage tel qu'un plasmide qui possède un ADN bicaténaire, porte le gène de résistance à un antibiotique, possède une cassette de clonage et est capable de se répliquer.

On dénature l'ADN puis on hybride l'amorce. On fait 4 milieux réactionnels A, C, G, T dans lesquels on ajoute du dATP, dCTP, dGTP et dTTP pour que le nouveau brin puisse être synthétiser et dans chacun des 4 milieux des didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) qui n'ont plus de 3'OH et ne peuvent donc plus être synthétisés. Par exemple dans la réaction où on a ajouté du ddGTP, la synthèse s'arrête au niveau des G de manière statistique suivant le moment où l'ADN polymérase I (fragment Klenow) aura

incorporé ce ddGTP. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de taille croissante qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence. On teste ensuite le rapport ddNTP/dNTP.

Pour visualiser les fragments d'ADN, on introduit des dNTP marqués au  $^{35}\text{S}$ . On chauffe pour dénaturer la double hélice formée puis on réalise une électrophorèse pour séparer les fragments selon leur taille. On lit ensuite la séquence à partir du bas vers le haut.

Pour le séquençage automatisé, le marquage est réalisé à froid à l'aide d'un agent fluorescent différent pour chaque base ce qui permet de les différencier d'un seul coup dans un seul milieu réactionnel. Les fragments se déplacent dans un champ électrique et les fluorescences sont détectées avec une machine. On obtient alors un histogramme qui nous donne la séquence du brin.

Taq polymérase : Réaction PCR « Polymerase Chain Reaction » : permet l'amplification in vitro d'un fragment d'ADN donné.

On dénature l'ADN double brin à  $94^{\circ}\text{C}$  dans un tube pour hybrider des amorces reconnues par l'ADN polymérase et choisies pour que leur séquence soit complémentaire et antiparallèle à une partie de la séquence du fragment d'ADN à amplifier. La synthèse de l'ADN est catalysée par la Taq polymérase et grâce à la présence de dNTP dans le milieu réactionnel.

Mais dans le tube, il n'y a pas tout de suite le bon produit : à la fin du deuxième cycle il reste encore un mélange entre le fragment voulu et d'autre fragment d'ADN. Ce n'est qu'à la fin du 3<sup>ème</sup> cycle que l'on commence à obtenir uniquement le fragment d'ADN voulu. Mais il faudra environ 30 cycles pour que le fragment d'intérêt soit bien amplifié.

On peut aussi ajouter un site de restriction sur l'amorce qui se retrouvera alors dans le fragment amplifié. Cela servirait à recoupler le fragment d'ADN plus tard. Mais il faut faire attention que la séquence du site de restriction en soit pas déjà présente dans l'ADN pour éviter une coupure au milieu du brin.