



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DE MEDECINE
Dr Benzerdjeb Benaouda

جامعة أبو بكر بلقايد
UNIVERSITÉ DE TLEMCEM




1ère année
Module: Génétique

La Réplication de l'ADN



Dr H. BOULENOUAR

La réplication



- Lors de la division cellulaire, quand une cellule-mère donne deux cellules-filles
 - Il est essentiel que l'ADN présent dans les cellules-filles soit la copie identique de l'ADN présent dans la cellule-mère.
- Avant la division cellulaire, la quantité d'ADN est multipliée par deux
- Cette duplication de l'ADN est assurée par la réplication.

La réplication



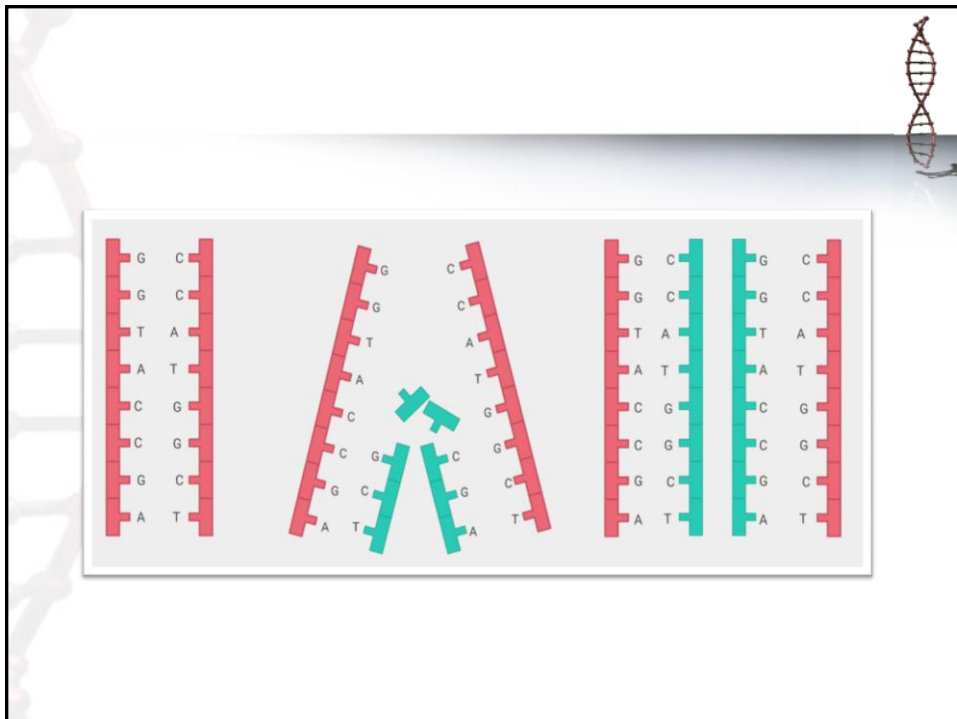
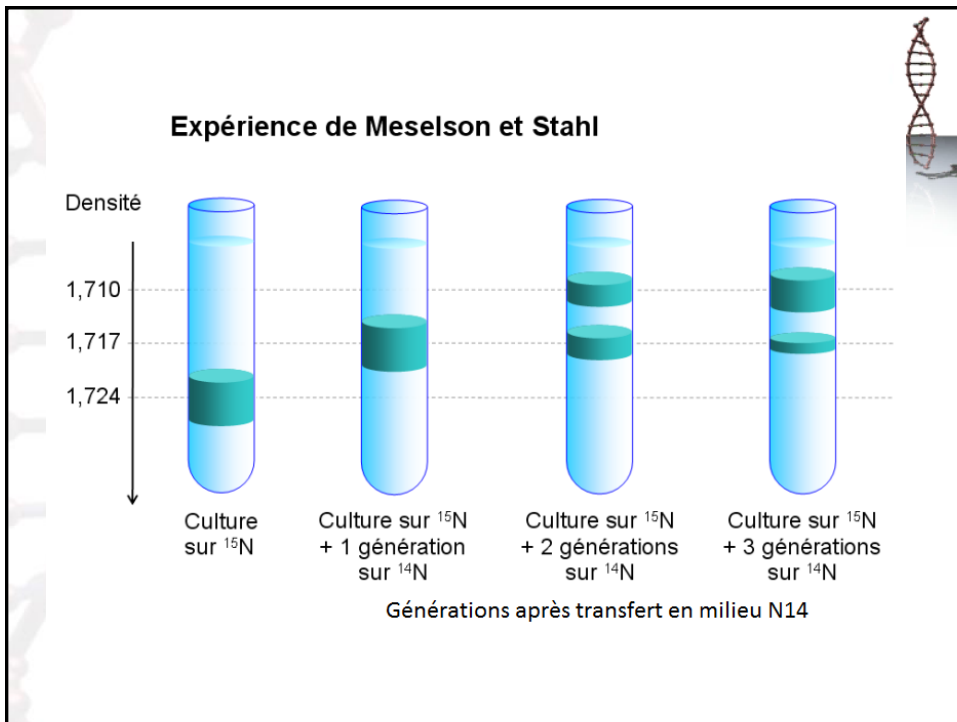
La réplication est un processus au cours duquel une molécule d'ADN engendre deux molécules filles identiques à la molécule de départ (Mère)

- Elle se déroule pendant l'interphase de la division cellulaire.
- Chaque brin de l'hélice bicaténaire sert de matrice à la synthèse d'un brin fils.
 - ▬ Chaque molécule fille d'ADN contient un brin parental et un brin fils nouvellement synthétisé.
- La réplication s'effectue selon le mode **semi conservatif**

Expérience de Meselson et Sthal

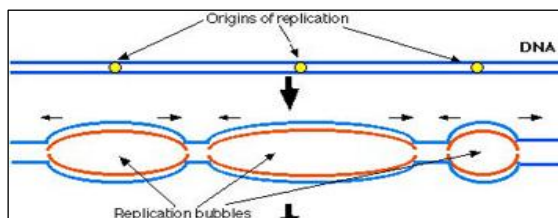


- ✓ Le marqueur choisi est un isotope lourd de l'azote: l'azote 15 (**^{15}N**),
- ✓ La séparation des deux types de molécules d'azote se fait par une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité de chlorure de césium CICs
- ✓ Au fur et à mesure de la centrifugation, les molécules flottent et s'équilibrent dans une zone correspondant à leur densité.
- ✓ Les bactéries E. Coli sont cultivées sur un milieu contenant l'isotope lourd de l'azote, après un délai correspondant à plusieurs cycles cellulaires, ces dernières sont ensuite transférées et cultivées sur un milieu où toute synthèse se fera à partir d'azote 14,
- ✓ des prélèvements sont effectués de génération en génération et les ADN analysés.
- ✓ Le résultat montre qu'en première génération, un ADN de densité hybride est caractérisé. La suite de l'expérience montre que l'hypothèse de réplication semi conservative était juste !

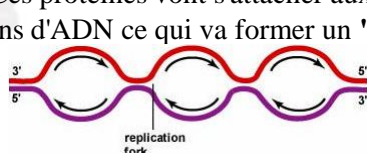


La réplication

- La réplication de l'ADN débute à partir **d'une origine de réplication** :
Une séquence de nucléotides spécifique reconnue par des protéines de réplication



- Ces protéines vont s'attacher aux origines de réplication et séparer les deux brins d'ADN ce qui va former un **"œil" de réplication**.



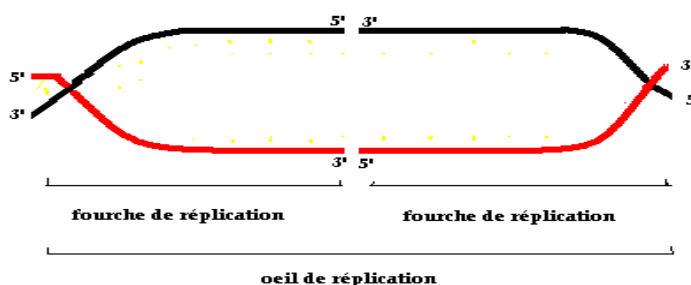
Eucaryote



Procaryote

La réplication

- A partir d'un œil de réplication, la réplication progresse dans les deux sens à partir de ce point créant ainsi des bords en "Y" : **deux fourches de réplication**. On dit que la réplication de l'ADN est **bidirectionnelle**.



La réplication

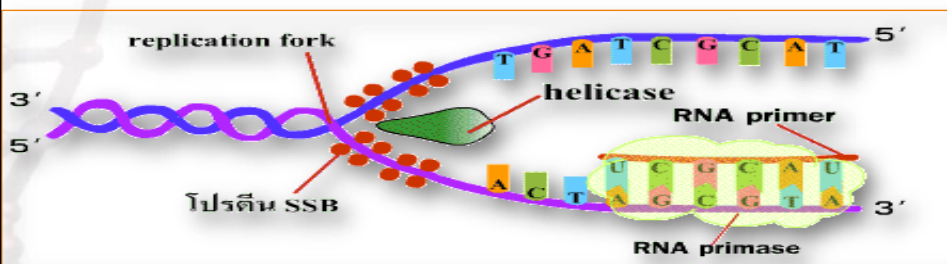
❖ La réplication peut être divisée en trois étapes principales :

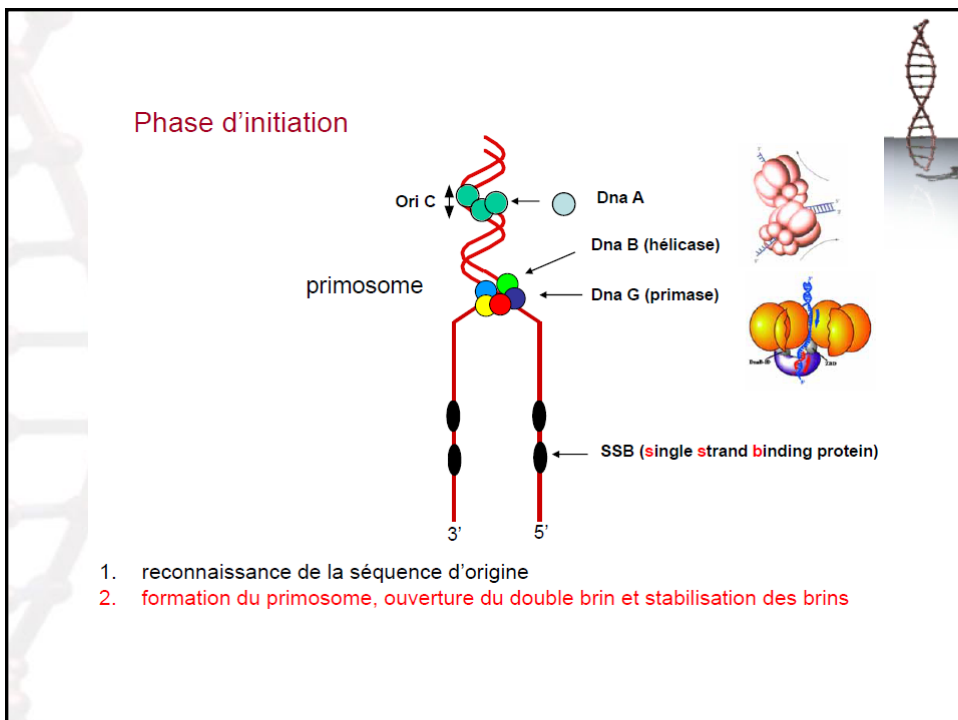
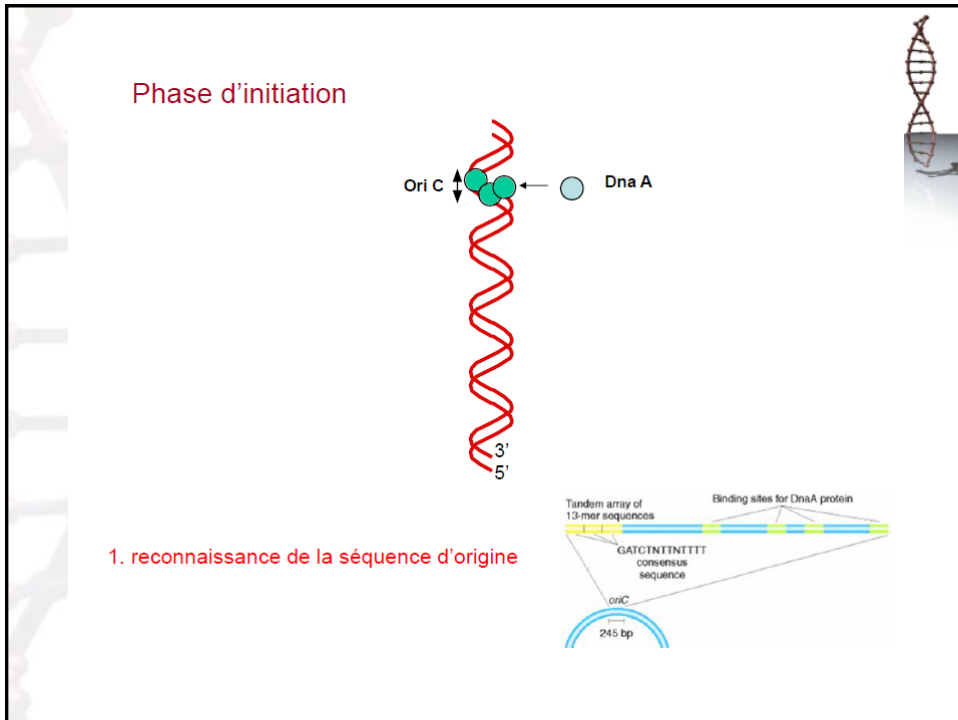
- **Initiation**
- **Elongation**
- **Terminaison**

La réplication (chez les Procaryotes)

1- Initiation

- Déroulement de l'hélice par la **topoisomérase**, appelée aussi gyrase.
- Ouverture de l'hélice par l'**hélicase**.
- Stabilisation transitoire de la partie déroulée par les **protéines SSB (Single Strand Binding)**
- Une amorce ARN est produite par une ARN polymérase (primase.)





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**

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**

La réplication (chez les Procaryotes)

2- Elongation



✓ L'élongation nécessite l'action d'un type d'enzyme spécifique :

L'ADN polymérase

✓ L'élongation se fait grâce à l'ADN polymérase III.

✓ Comme l'action de l'ADN polymérase se fait que dans le sens 5'-3' et que les brins matriciels sont anti-parallèles, il existe sur la fourche de réplication 2 mécanismes de réplication différentes :

La réplication (chez les Procaryotes)

2- Elongation



a)- Synthèse d'un brin direct (précoce)

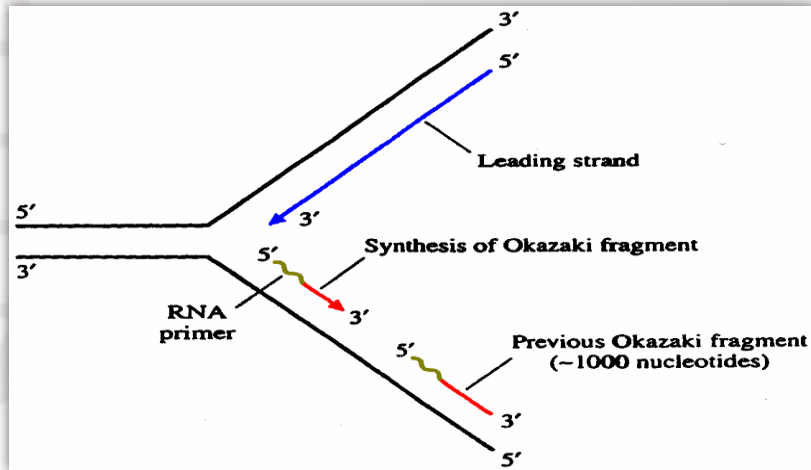
- C'est le brin synthétisé complémentaire du brin parental orienté 3'-5'.
- La progression de la copie a le même sens que la progression de la fourche de réplication ce qui permet une synthèse continue dans le sens 5'-3' jusqu'au point de terminaison.

b)- Synthèse d'un brin retardé (tardif)

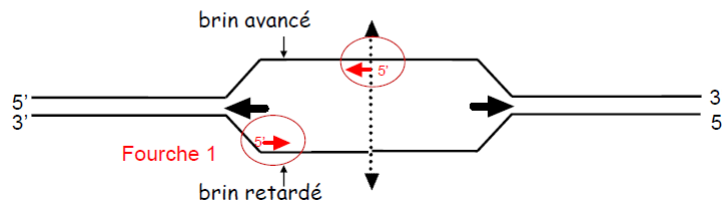
- Brin complémentaire du brin parental orienté 5'-3'.
- Le sens de la progression de la copie est opposé au sens de la progression de la fourche de réplication.
- Ce brin est synthétisé de façon discontinue sous la forme:
des fragment d'Okazaki. E: 100 à 200 pdb, P: 1000 à 2000 pdb.
- Chaque fragment commence par une amorce d'ARN, il y a après élongation par l'ADN polymérase III,

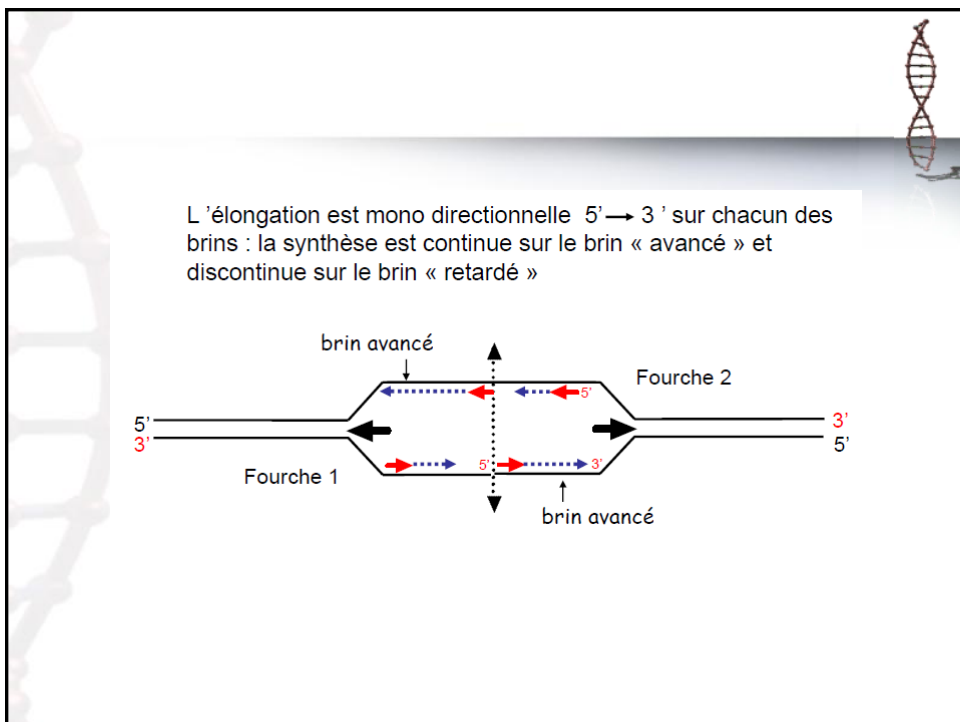
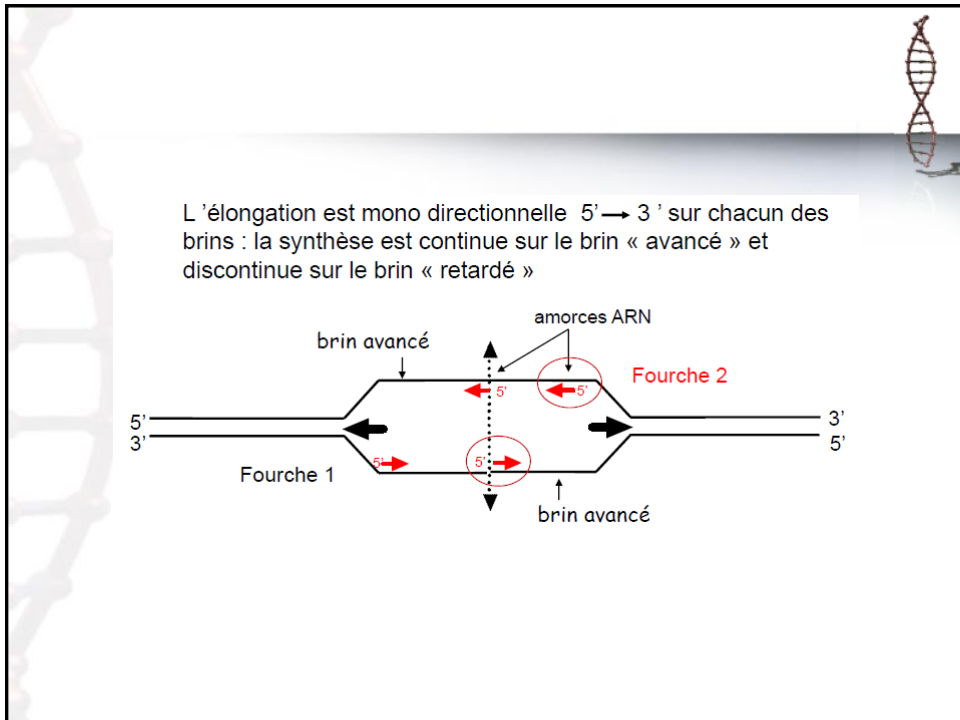
La réplication (chez les Procaryotes)

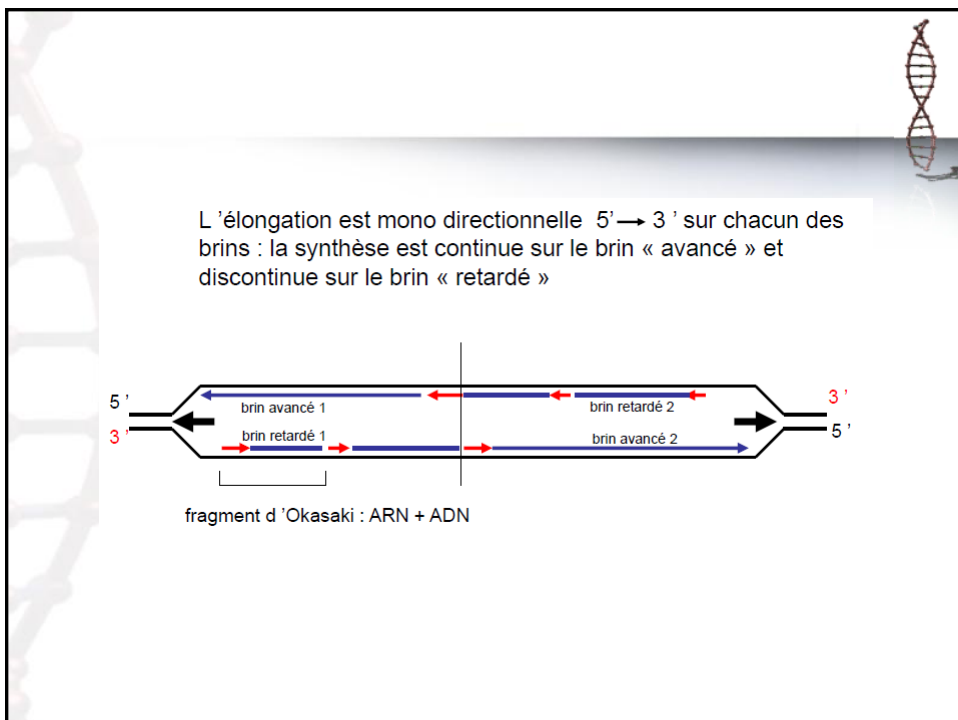
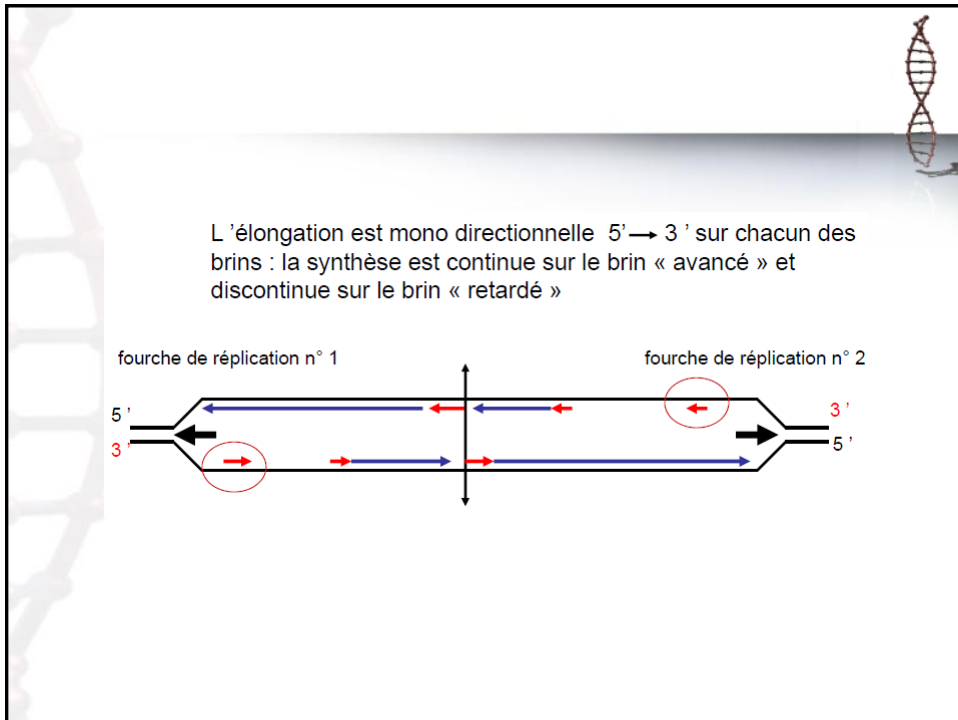
2- Elongation



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 »







Elongation

→ L'élargissement nécessite:

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

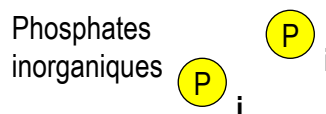
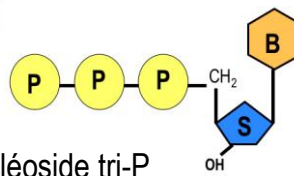
	ADN polymérase I	ADN polymérase II	ADN polymérase III
Structure	Monomérique	> 4 sous unités	> 10 sous unités (core + clamp + protéines associées)
Rôle	Élimine les amorces lors de la réplication + réparation	Réparation de l'ADN	Réplication de l'ADN génomique
Polymérisation 5' → 3'	Oui	Oui	Oui (sous-unité 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

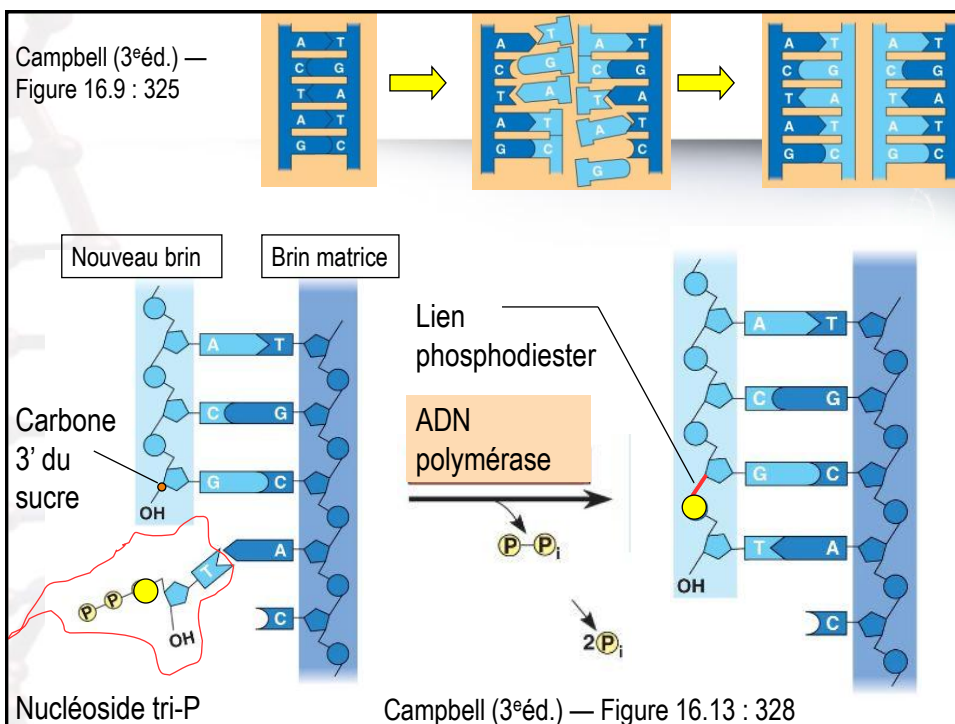
Tableau récapitulatif des principales polymérases procaryotes (il existe d'autres polymérases : Pol IV et V)

- matrice formée par 1 simple brin, dNTP, Mg⁺⁺
- amorce ARN avec OH libre en 3'
- hélicases, gyrases (topoisomérases) ...

L'unité de réplication est un nucléoside triphosphate.

- ✓ Le nucléoside tri-P est chimiquement actif à cause des charges négatives des 3 groupes phosphate.
- ✓ Il se lie à l'ADN en formation en perdant deux groupes P (pyrophosphate).
- ✓ L'hydrolyse du pyrophosphate (en deux molécules de phosphate inorganique) dégage l'énergie nécessaire à la liaison du nucléotide à la chaîne d'ADN.





Activités des ADN polymérases:

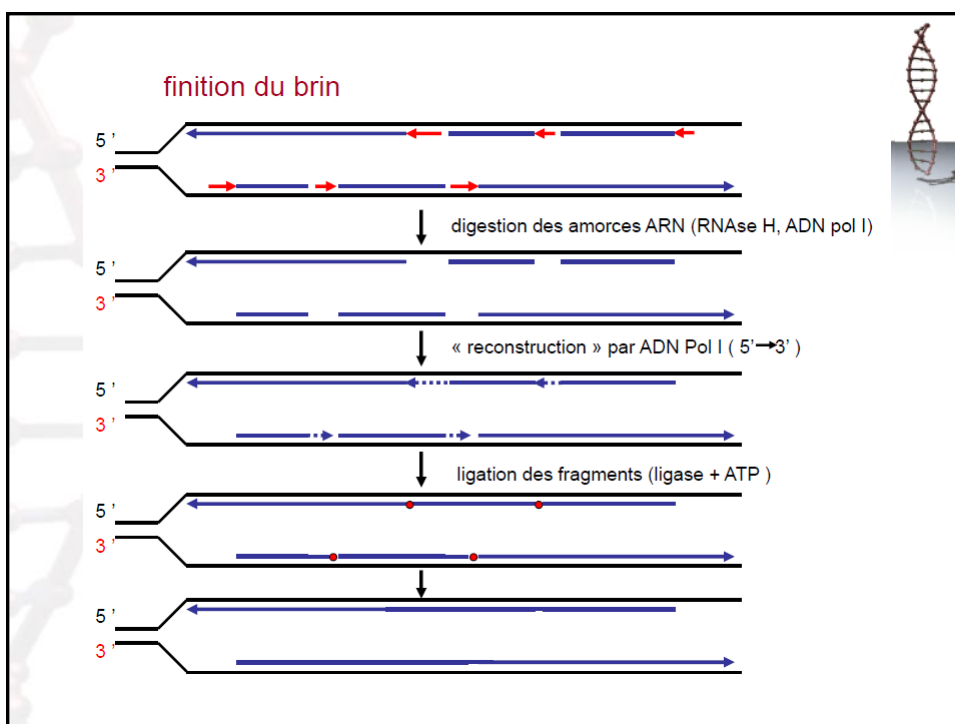
- Une activité polymérasique 5' vers 3' qui est leur activité principale.
- Une activité exo-nucléasique qui peut être de 2 types :
 - De 3' vers 5', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 3'OH. L'activité exo-nucléasique 3' vers 5' permet ce qu'on appelle le proofreading, qui correspond à la correction d'un mauvais appariement de base en cassant la liaison phosphodiester et en remplaçant le nucléotide mal apparié.
 - De 5' vers 3', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 5'phosphate, lors de la jonction des segments d'ADN synthétisé sur le brin retardé.

La réplication (chez les Procaryotes)

3- Terminaison

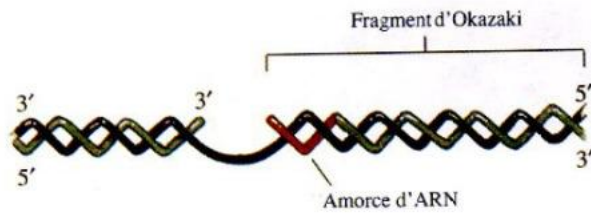


- Les amorces d'ARN seront ensuite détruites et hydrolysées par l'intervention d'une enzyme: la RNase H
- Elles seront remplacées par des fragments d'ADN.
- Les lacunes engendrées sont comblées par une ADN polymérase I.
- Finalement, les fragments d'ADN deviennent contigus et sont soudés les uns aux autres par l'intervention d'une enzyme qui est une *DNA-ligase*



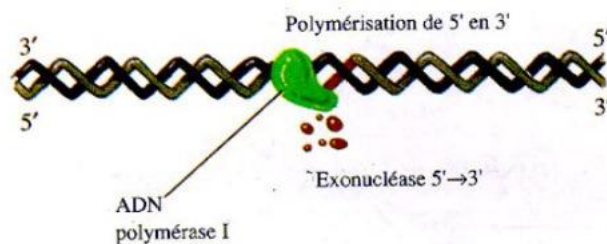
Synthèse du complément du brin retardé

- L'ADN polymérase I fut la première polymérase découverte par Arthur Kornberg
- Activité de POL I:
 - exonucléase 3' → 5'
 - exonucléase 5' → 3'
 - polymérase 5' → 3'



Synthèse du complément du brin retardé

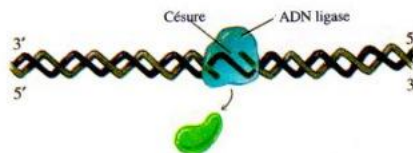
- L'ADN polymérase I fut la première polymérase découverte par Arthur Kornberg
- Activité de POL I:
 - exonucléase 3' → 5'
 - exonucléase 5' → 3'
 - polymérase 5' → 3'



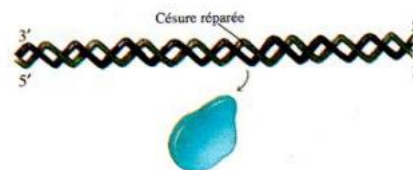
Synthèse du complément du brin retardé

- L'ADN ligase: formation d'une liaison d'un diester entre le 3'-OH et le 5'-phosphate de deux fragments Okazaki (utilise NAD comme co-substrat)

(c) Après avoir allongé le fragment d'Okazaki de 10 à 12 nucléotides, l'ADN polymérase I se détache de l'ADN et la ligase vient y occuper le site séparant deux fragments d'Okazaki.

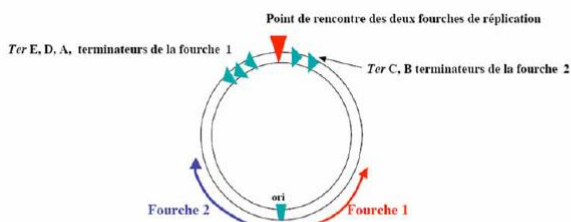


(d) L'ADN ligase catalyse la formation d'un phosphodiester qui scelle la césure et rétablit la continuité du brin retardé. L'enzyme se détache ensuite de l'ADN.

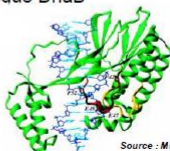


Terminaison

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

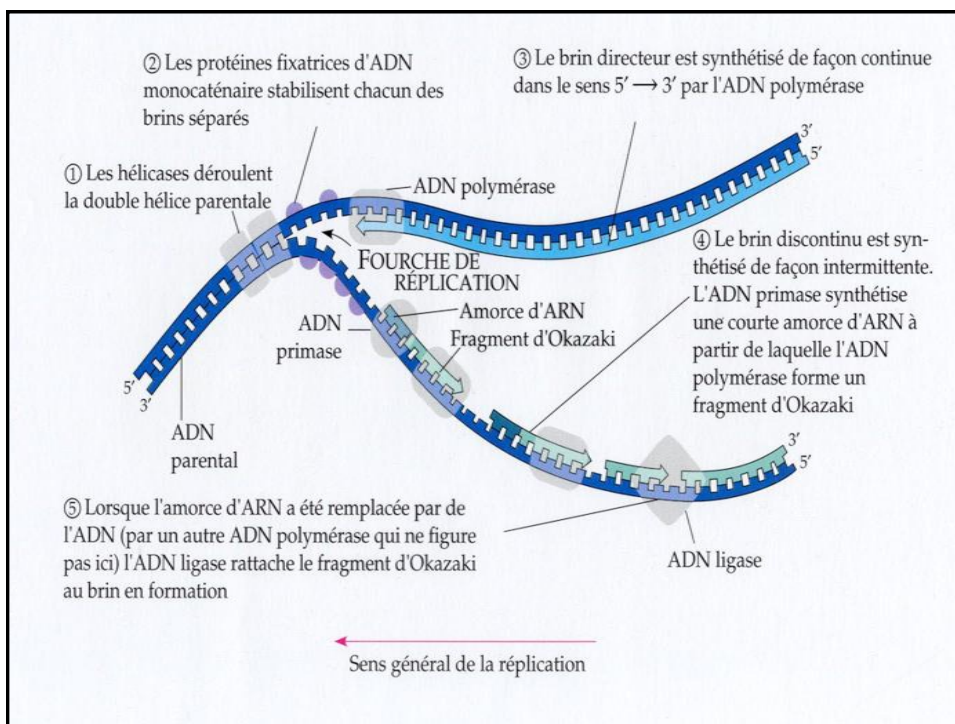


- ❖ La protéine Tus (terminator utilisation substance) reconnaît les séquences d'arrêt de réplication et bloque DnaB



Source : Malugu et coll., PNAS 2001

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



Chez les Eucaryotes

- Le mécanisme général est à peu près similaire à celui observé chez les procaryotes. Cependant, quelques différences existent

Les ADN polymérases

	localisation	équivalent procaryote	activité	activité 3'-5' exonucléase	facteurs associés
α = POLA	noyau	ADN Pol I	initiation	-	primase, RP-A
β = POLB	noyau		réparation, finition	-	
γ = POLG	mitochondrie		synthèse, réparation	+	
δ = POLD1	noyau	ADN Pol III	synthèse, finition	+	RF-C, PCNA
ϵ = POLE	noyau	ADN Pol II	synthèse, réparation	+	
κ = POLK	noyau		liaison des cohésines	?	
η, ι, ζ = POLH, I, Z	noyau		réparation "by-pass »	?	
θ, λ = POLQ, L	noyau		réparation	?	
σ = POLS	noyau		cohésion des chromatides	?	

- ❖ élimination des amorces ARN par 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
- ❖ intervention de topo-isomérases de type I (A, B) et II
- ❖ répartition aléatoire des nucléosomes entre les deux nouveaux double brins

Quelques particularités propres à la réplication chez les Eucaryotes

Pour un oeil de réplication on a 2 complexes multienzymatiques qui vont en sens inverse. Chez les Eucaryotes les fragments d'Okazaki sont plus petit (environ 100 à 200pb). Ces fragments ont à leur extrémité 5' des fragments d'ARN (10 nucléotides) synthétisés par une primase (ADN pol Alpha):

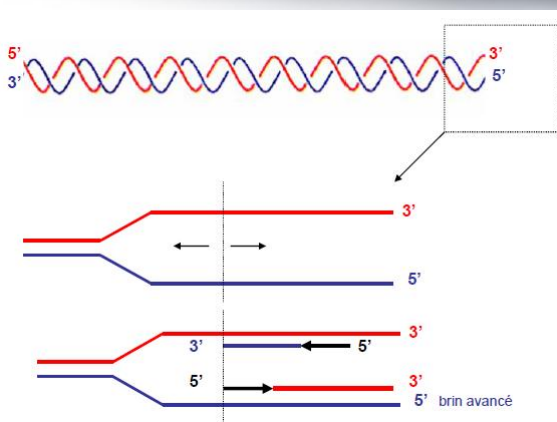
- Soit alpha synthétise les amorces ARN et les allonge sur le brin à synthèse discontinue de l'ADN naissant. Pour le brin à synthèse continue le complexe ADN polymérase delta/PCNA synthétise le brin d'ADN (PCNA est une protéine qui augmente fortement la processivité).
- Soit alpha est uniquement responsable de la synthèse des amorces et quelques désoxynucléotides. Le brin continu est répliqué par epsilon; delta/PCNA réplique le brin discontinu.

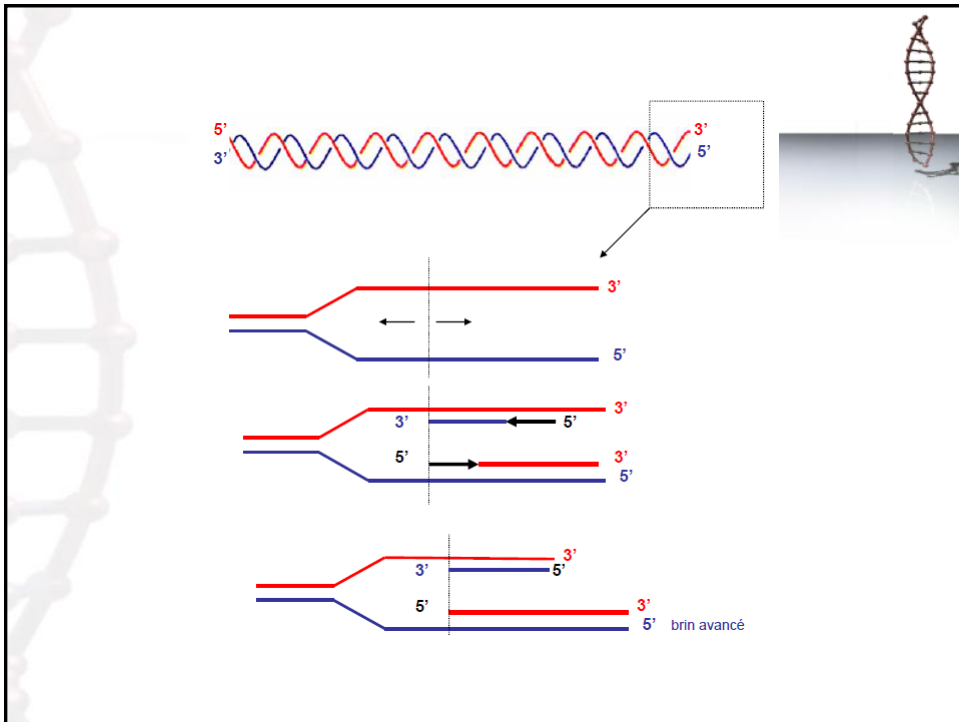
Dans tous les cas on a sur un brin une ADN polymérase très processive et sur l'autre brin la processivité est moindre.

Lors de la réplication l'ADN simple brin est stabilisé grâce à des protéines : RP-A (replication protéine A) ou RF-A (replication factor A), équivalent aux SSB chez E.Coli (Single Stranded DNA Binding Protein). Les amorces ARN sont supprimées par la RNase H, les trous ainsi formés sont bouchés par bêta ou alpha. Les fragments sont reliés par une ADN ligase. Il existe 3 ADN ligase (I, II,III) dont la I est indispensable à la réplication du chromosome.

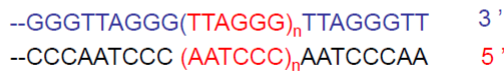
Quand aux topo-isomérase, il y en a 2 (I et II).

Réplication des extrémités télomériques

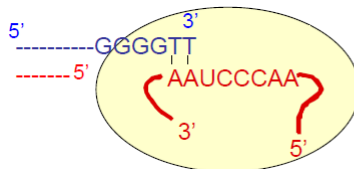
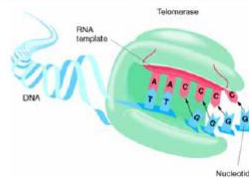




❖ l'ADN des télomères contient des séquences répétées



❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase

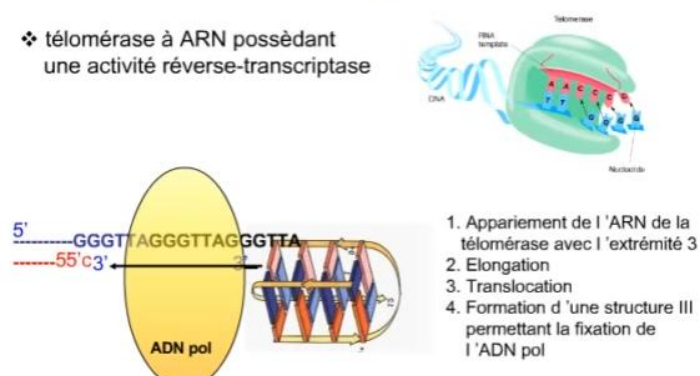


1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'
2. Elongation
3. Translocation

❖ l'ADN des télomères contient des séquences répétées

--GGGTTAGGG(TTAGGG)_nTTAGGGTT 3'
 --CCCAATCCC(AATCCC)_nAATCCCAA 5'

❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase



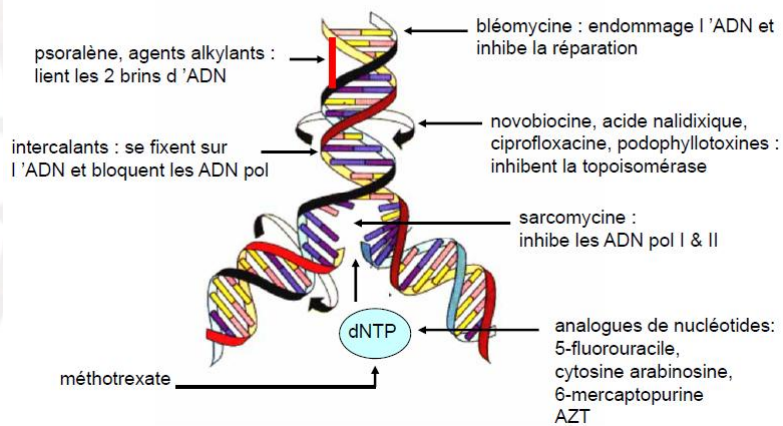
The diagram illustrates the mechanism of telomerase. On the left, a yellow oval labeled 'ADN pol' (DNA polymerase) is shown synthesizing a DNA strand. The sequence shown is 5'---GGGTAGGGTTAGGGTTA---3' with a red dashed line indicating the 5' to 3' direction. The telomerase complex, consisting of an RNA template (red) and a protein subunit (green), is shown binding to the 3' end of the DNA strand. The RNA template is complementary to the DNA sequence. The process is described in four steps: 1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3' (Pairing of telomerase RNA with the 3' end), 2. Elongation (Elongation), 3. Translocation (Translocation), and 4. Formation d'une structure III permettant la fixation de l'ADN pol (Formation of a structure III allowing the fixation of DNA polymerase).

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

La télomérase:

- ✓ La télomérase est une ribonucléoprotéine, indispensable pendant la vie embryonnaire, elle est normalement exprimée dans les cellules souches germinales, au cours de l'embryogenèse et au niveau des cellules souches originelles. Elle n'est pas (ou très peu) exprimée dans les cellules normales différenciées.
- ✓ Elle stabilise les télomères en ajoutant des séquences TTAGGG aux extrémités des chromosomes, compensant le raccourcissement télomérique lié aux mitoses.
- ✓ On observe une élongation du télomère à partir d'une matrice de RNA incluse dans la télomérase.
- ✓ On retrouve une activité télomérasique importante dans les cellules hautement malignes (cancéreuses), et la présence de télomérase serait un indice de mauvais pronostic.
- ✓ Une voie thérapeutique nouvelle peut également être recherchée par des substances à activité anti-télomérase qui serait très spécifiques des tumeurs malignes.

La réplication est une cible thérapeutique



Merci

Questions

