

# Réplication

## Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. LA REPLICATION EST SEMI-CONSERVATIVE .....</b>                | <b>2</b>  |
| 1.1. EXPERIENCE DE MESELSON ET STAHL.....                           | 2         |
| 1.2. EXPERIENCE DE CAIRNS.....                                      | 3         |
| 1.3. LES CHROMOSOMES ARLEQUINS.....                                 | 4         |
| <b>2. L'ENZYME CLE : L'ADN POLYMERASE.....</b>                      | <b>4</b>  |
| <b>3. LES ETAPES DE LA REPLICATION .....</b>                        | <b>6</b>  |
| 3.1. INITIATION .....   | 6         |
| 3.2. POLYMERISATION.....  | 9         |
| 3.3. TERMINAISON .....  | 9         |
| <b>4. CHEZ LES EUCARYOTES .....</b>                                 | <b>10</b> |
| 4.1. LES TELOMERES.....   | 10        |
| 4.2. LES NUCLEOSOMES.....   | 10        |
| 4.3. LES SEQUENCES NECESSAIRES A LA REPLICATION DU CHROMOSOME ..... | 11        |

## Introduction :

C'est synonyme de duplication de l'ADN = synthèse d'un brin d'ADN simple brin à partir d'un brin matrice simple brin.

L'ADN contient les instructions génétiques dans sa séquence mais aussi permet la reproduction de la molécule due à la structure (Watson et Crick en 1953)

Ils avaient proposés que chaque brin allait donner un nouveau brin.

Au début, on a très souvent utilisé de la microscopie électronique. Ils ont d'abord travaillés sur des petites structures puis sur des plus grosses. Ils ont aussi utilisés des méthodes biochimiques.

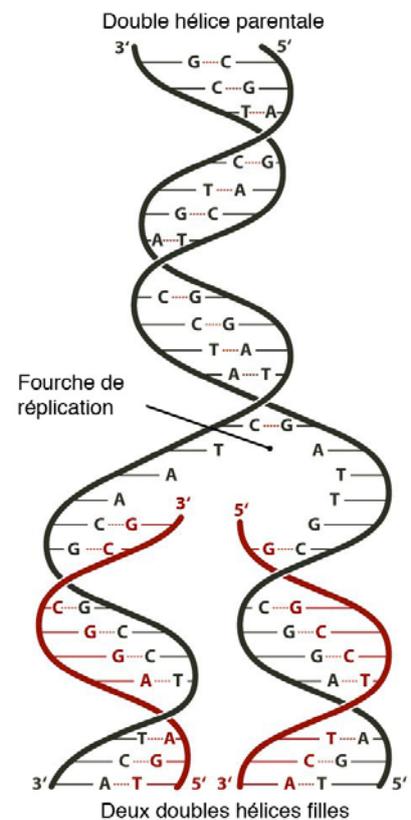
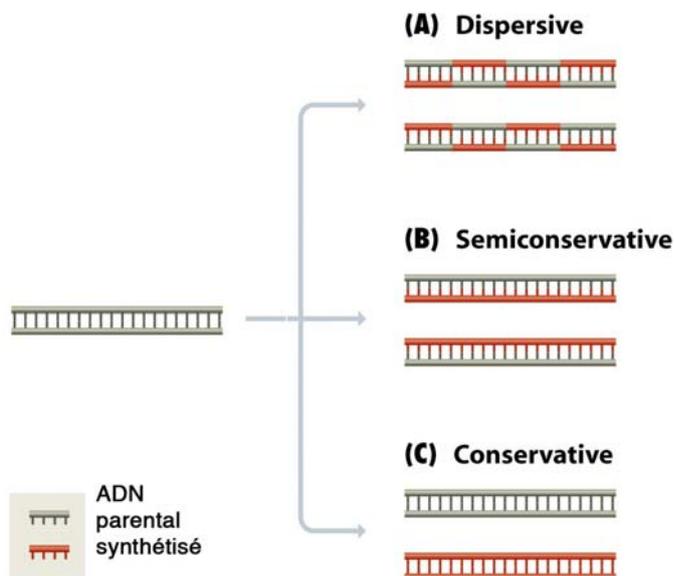
Cette réplication quelque soit la  $\epsilon$  représente un gros travail. Il faut éviter les erreurs et maintenir l'intégrité du génome. La duplication se fait dans la phase S.

## 1. La réplication est semi-conservative

A partir d'un brin initial, il y a un nouveau brin. Il y a eu d'autres hypothèses proposées. Des méthodes conservatives et dispersive

Conservative : 2 brins mère et 2 brins fille assemblés

Dispersive : Alternance l'un l'autre du brin fille et mère.

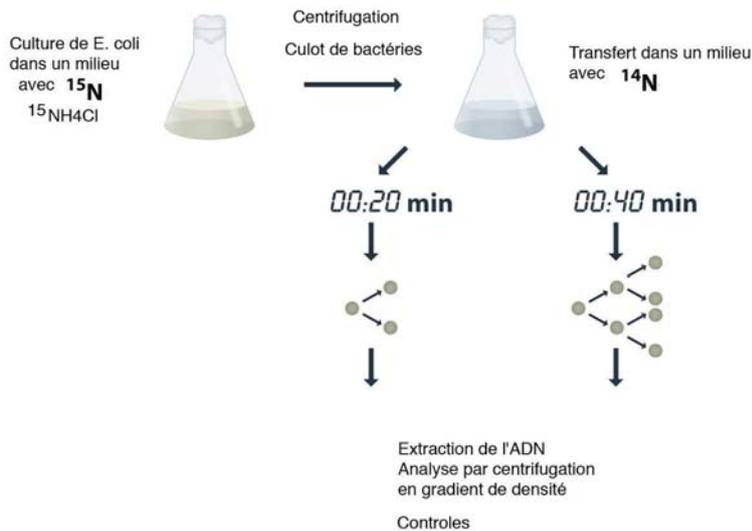


### 1.1. Expérience de Meselson et Stahl

Ils ont travaillés sur E.coli

On fait une culture dans un milieu avec de  $N^{15}$  => au bout d'un temps, on a un marquage avec cet isotope des bases de l'ADN. On fait une centrifugation pour récupérer les bactéries puis on les remet dans du  $N^{14}$ . On a un temps de génération de 20 min. Toutes les 20 min, ils ont prélevé et on fait une analyse par gradient de densité avec des contrôles.

Les contrôles sont des bactéries avec de  $N^{15}$  tout le temps => une barre pour sa densité. Un autre contrôle pour des bactéries  $N^{14}$  => une barre plus haute. A la 1<sup>e</sup> génération on a une

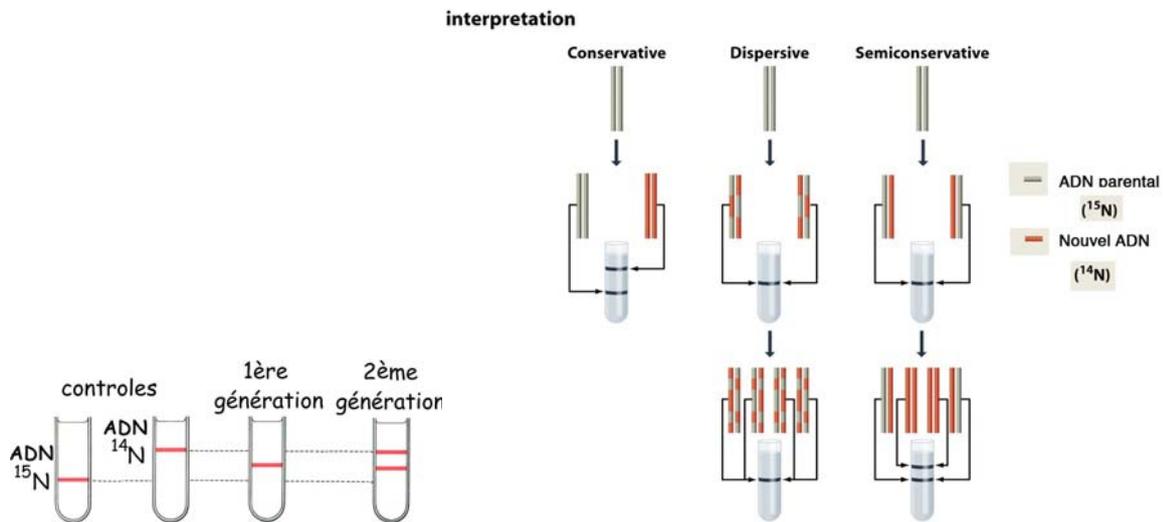


bande entre  $\text{N}^{14}$  et  $\text{N}^{15}$  et à la 2<sup>e</sup> génération, on a 2 bandes,  $\text{N}^{14}$  et celle de la 1<sup>e</sup> génération.

Dans une hypothèse conservative, on devrait avoir 2 bandes :  $\text{N}^{14}$  et  $\text{N}^{15}$ .

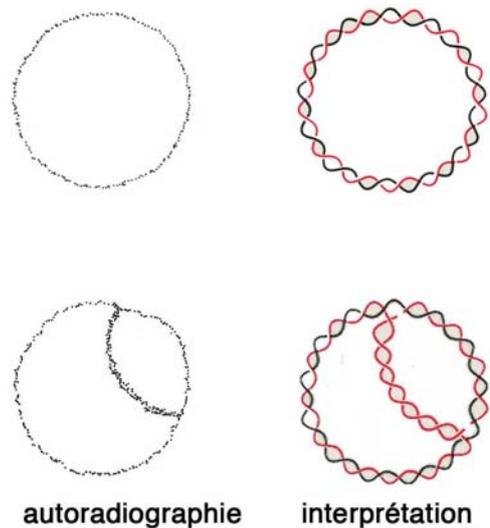
Si c'est dispersif: après x générations, on aura toujours 1 bande car on aurait un mélange homogène.

Dans l'hypothèse semi-conservative, on a 1 bande à la 1<sup>e</sup> génération et une 2<sup>e</sup> apparaît à la 2<sup>e</sup> génération à  $\text{N}^{14}$ . C'est donc la bonne hypothèse.

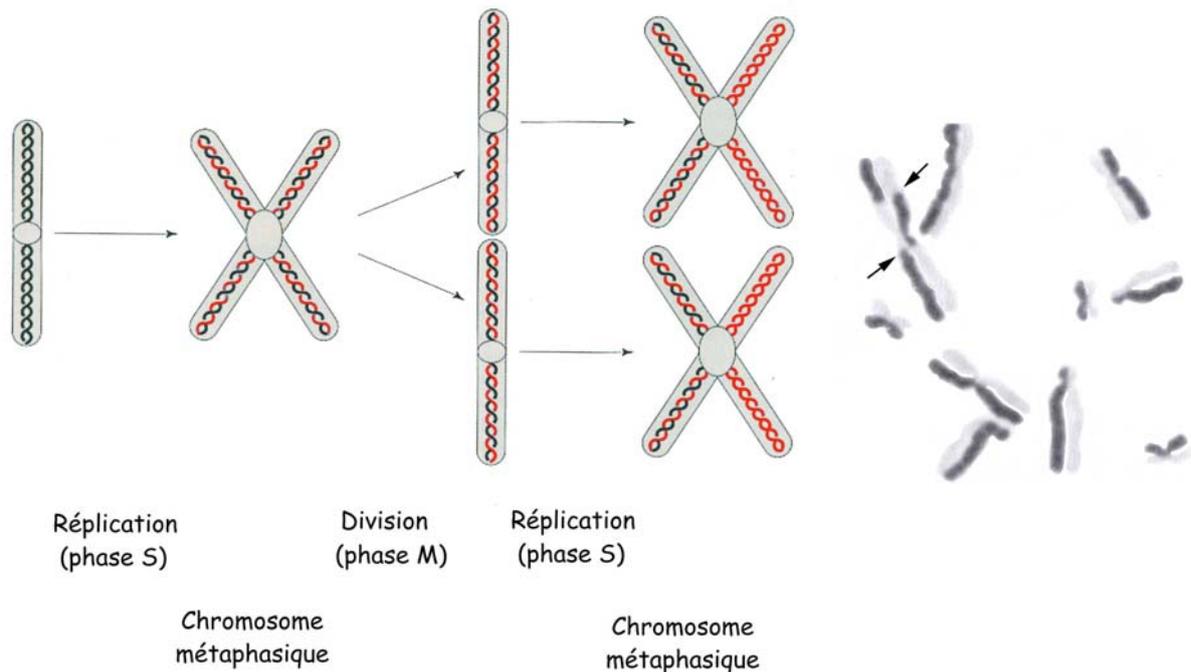


## 1.2. Expérience de Cairns

Faite sur E.coli avec un génome circulaire. Ils ont fait une culture avec de la thymidine tritiée et ils vont étudier la cinétique de la thymidine marquée. Il vont faire des étalement de chromosomes et une analyse par ME. Dans un 1<sup>e</sup> temps, il a 1 chromosome uniformément marqué (1 brin marqué). Dans la 2<sup>e</sup>, il a à l'int en plus une forme en œil un brin double synthétisé. Il met en évidence une fourche de réplication.



### 1.3. Les chromosomes arlequins



Fait sur des  $\phi$  eucaryotes. Les mêmes méca se retrouvent chez les organismes supérieurs.

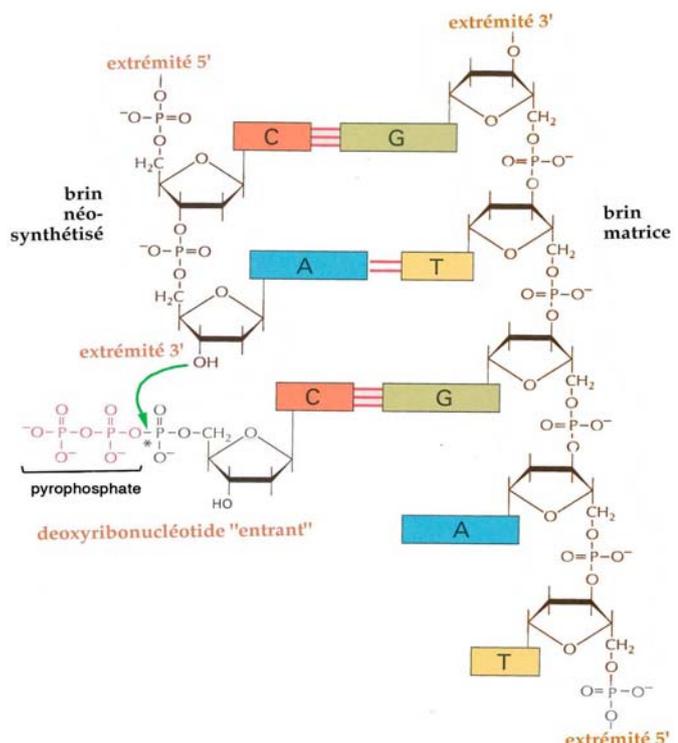
Des  $\phi$  eucaryotes sont cultivées avec un analogue de la thymidine : brhomodéoxyuridine => donne des propriétés différentes. S'incorpore au niv de l'ADN et au moment de la duplication, on a un brin ancien et un brin nouveau. A la fin de la 1<sup>e</sup> division, on a des  $\phi$  qui ont 1 brin ancien et 1 brin neuf. A la 2<sup>e</sup> génération, on va avoir une répartition encore différente. Le brhomodéoxyuridine permet une coloration et une bonne visualisation en MO.

On met facilement en évidence des crossing over => sans conséquence car on est en mitose.

### 2. L'enzyme clé: l'ADN polymérase.

Ce sont des enz capables de synthétiser un nouvel ADN sur un brin matrice.

Elle catalyse l'addition d'un dNTP à l'extrémité 3'OH du brin en cours de synthèse par la formation d'une liaison phosphodiester entre cet extrémité 3'OH et le groupement 5'P du nucléotide incorporé. Le choix du nt à incorporer dépend de la matrice. Il faut une amorce d'un



acide nucléique pour générer l'extrémité 3'OH libre. On va avoir une liaison covalente et libération de PPI. Cette synthèse est orientée de 5' vers 3'.

Toutes les ADN pol ont une activité 5'→3'. Elles ont aussi en général une activité exonucléasique.

Activité 3'→5' : dans le sens inverse de la synthèse => permet de reculer et de couper la liaison qu'elle vient de faire. Ça permet de corriger les erreurs d'appariement. C'est l'activité de correction d'épreuves (proof Reading)

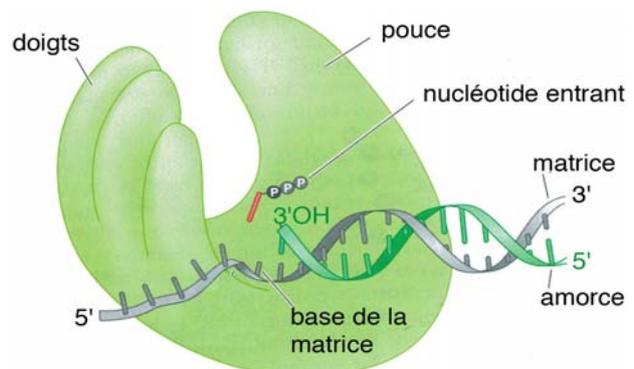
Activité 5'→3' : dans le même sens que l'activité polymérisique. C'est assez rare mais elle est présente chez une pol de E.coli Pol1 et aussi présente dans la Taq1.

Elles ont aussi une forte fidélité et le taux d'erreur est très faible. In vitro, les erreurs sont plus fréquentes car il y a moins de contrôles.

Processivité : mesure le nb moyen de nt qu'une polymérase peut recopier sur une matrice avant de s'en détacher.

Une ADN pol très processive peut polymériser des milliers de nt avant de se détacher tandis que celle qui est peu processive : distributive : tous les 20 nt environ.

Elles ont la forme d'une grande clé avec 3 domaines et ça ressemble à une main droite ouverte : pouce, doigts et paume. L'activité polymérisique se retrouve dans la paume. Les doigts maintiendraient le contact entre la matrice et le 3'OH.



Chez les bact, E.coli, il y a en a au moins 5

- ADN pol I: 1<sup>e</sup> isolée = ADN pol de Kornberg. C'est la plus importante en nb : 400 par  $\epsilon$  et elle intervient surtout dans la réparation de l'ADN. Dans la réplication elle intervient dans l'élimination de l'amorce. Elle est codée par 1 seul gène et c'est un polypeptide de 103 kDa et contient 2 régions fonctionnelles distinctes que l'on peut séparer par un traitement protéolytique simples

- \_ Fragment de Klenow  $\approx$  2/3 de la polymérase. Il a l'activité polymérisique et l'activité exonucléasique 3'→5' pour la correction des erreurs.

- \_ 1/3 de la polymérase qui contient une activité exonucléasique 5'→3'. C'est une capacité rare et on l'utilise in vitro

- ADN pol II : intervient dans la réparation de l'ADN

- ADN pol III : intervient dans la réplication du chromosome bactérien. Elle est composée d'un cœur (core) qui contient 3 sous unités :

- \_ polypeptide  $\alpha$  responsable de l'activité polymérisique 5'→3'

- \_ sous unité  $\epsilon$  qui contient activité exonucléasique 3'→5'

- \_ sous unité  $\theta$  pour l'assemblage des 2 sous unités

La réplication implique la DNA pol III holoenzyme. C'est un cplx avec une activité enzymatique et est associée à d'autres prot qui vont augmenter l'activité. Ces prot sont :

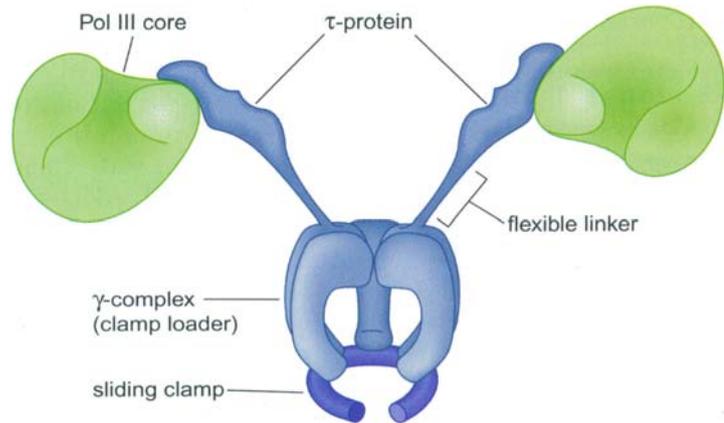
- \_ 2 noyaux catalytiques

- \_ se rajoute la prot tau qui permet la dimérisation

- \_ les 2 prot tau se fixent sur le cplx  $\gamma$

- cplx  $\gamma$  s'associe à un clamp (pince) qui va tenir l'ADN

- ADN pol IV et ADN pol V : impliqués dans la réparation.



Chez les eucaryotes, on a isolées au moins 15 ADN pol

- ADN pol  $\alpha$  => synthèse de l'amorce pour l'initiation de la réplication
- ADN pol  $\beta$  => intervient dans la réparation
- ADN pol  $\gamma$  => Intervient dans la réplication mitochondriale.
- ADN pol  $\delta, \epsilon$  => intervient dans la réplication des 2 brins de chromosomes eucaryotes.
- RT (Rétro Transcriptase)

### 3. Les étapes de la réplication

Il y a toujours 3 étapes

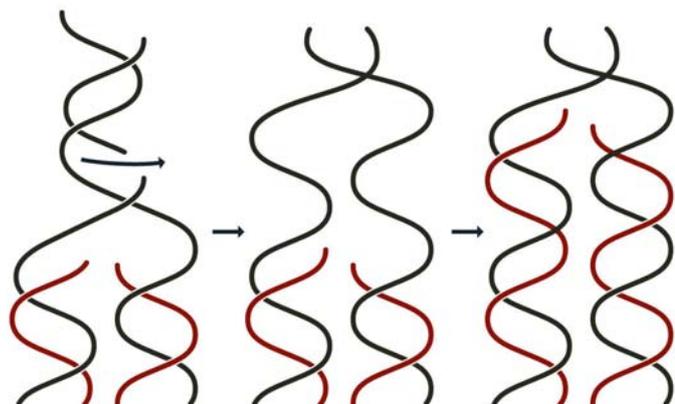
#### 3.1. Initiation

C'est une étape délicate car la  $\phi$  doit faire un ADN simple brin et il faut une amorce

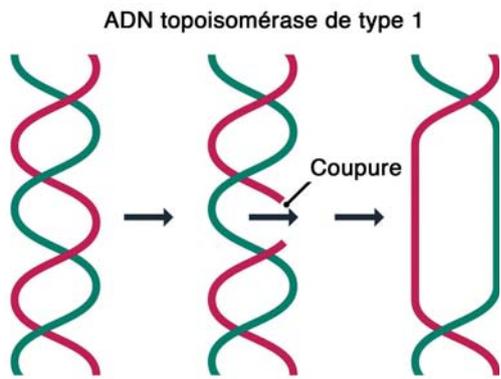
- Déroutement et dénaturation partielle de l'ADN

La molécule est déroulée pour être accessible : topoisomérases, hélicases, SSBP

Les topoisomérases sont des cplx enzymatiques qui sont capables de changer la topologie de l'ADN  
 Les hélicases vont séparer les 2 brins par rupture des liaisons H  
 SSBP : Single Strand Binding Prot => prot qui se lie aux simples brins. Elles vont maintenir l'ADN simple brin



Les topoisomérases sont capables de changer le nb d'enroulement de la double hélice. Elles peuvent les éliminer ou les réintroduire. 2 grands types de topoisomérases

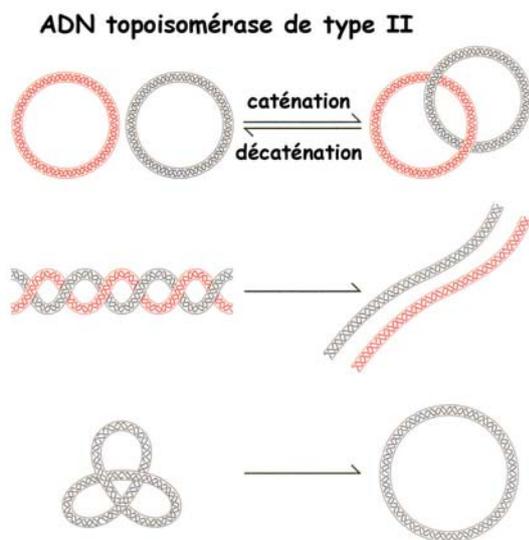


\_ Type I : Coupe 1 des 2 brin au niv de la liaison phosphodiester

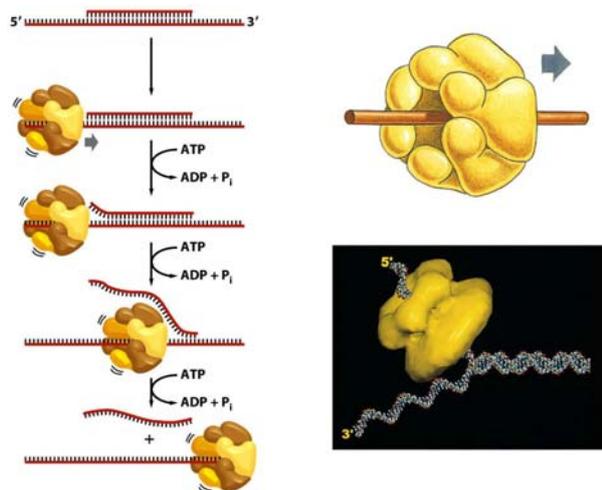
\_ Type II : Coupe les 2 brins de la double hélice

Type I : Il va y avoir une liaison d'une extrémité pdt que l'autre est déroulée puis le tout est réassemblé.

Les Type II interviennent dans la séparation des molécules filles à l'issu de la réplication. C'est le processus de caténation ou décaténation.



Hélicase

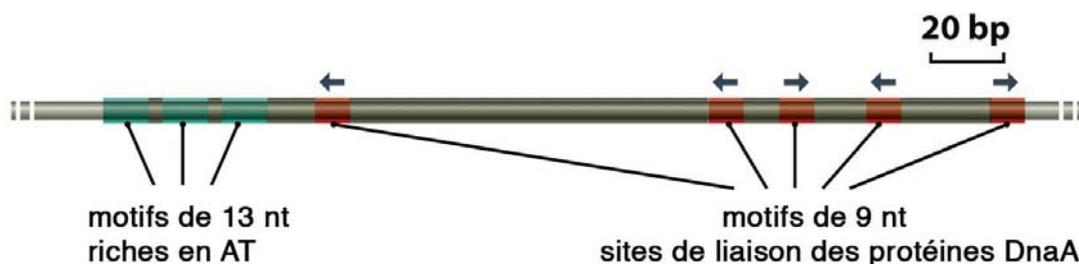


Les hélicases vont couper les liaisons H. Ce sont des prot hexamériques

Les SSBP : ce sont des prot qui se fixent sur le simple brin mais sans couvrir les bases pour que l'appariement soit possible.

On se retrouve avec un œil de réplication.

La réplication commence au niv de l'origine de réplication. La plus connue est celle d'E.coli et cette région correspond à une séq de 245 pb localisée très précisément et qui contient des motifs très particuliers. Elle s'appelle ORI C et elle contient 2 types de motifs : 13 nt répétés riches en bases AT et des motifs de 9 nt aussi riches en AT et qui sont des sites de liaison à de prot



Chez la levure, les origines de réplication sont assez connues et on les appelle ARS (Autonomously Replicating Sequences) et c'est de l'ordre d'une 100<sup>aine</sup> de pb

Chez les eucaryotes sup, les origines de réplication sont bcp plus difficiles à repérer et elles sont bcp plus longues, de l'ordre de 1 000 pb

• Mise en place de l'amorce et début de la synthèse

Dans le chromosome bact, on a l'ORI + 13-mer et 9-mer. On a fixation des DNA-A sur le 9-mer. Une cinquantaine de ces prot vont se mettre ce qui entraine un changement de conformation => les régions riches en AT vont avoir tendance à se dénaturer => permet l'ouverture avec une région localement simple brin. Dans le même temps, une hélicase associée avec une prot accessoire codée par un autre gène. On a une affinité pour le simple brin => la DNA-C est activée, elle s'en va et DNA-B permet d'ouvrir les 2 brins.

L'ADN primase est une polymérase qui permet la synthèse de l'amorce et elle ne s'associe que si il y a l'hélicase. C'est une ARN pol car l'amorce est un petit ARN de 5 à 10 bases

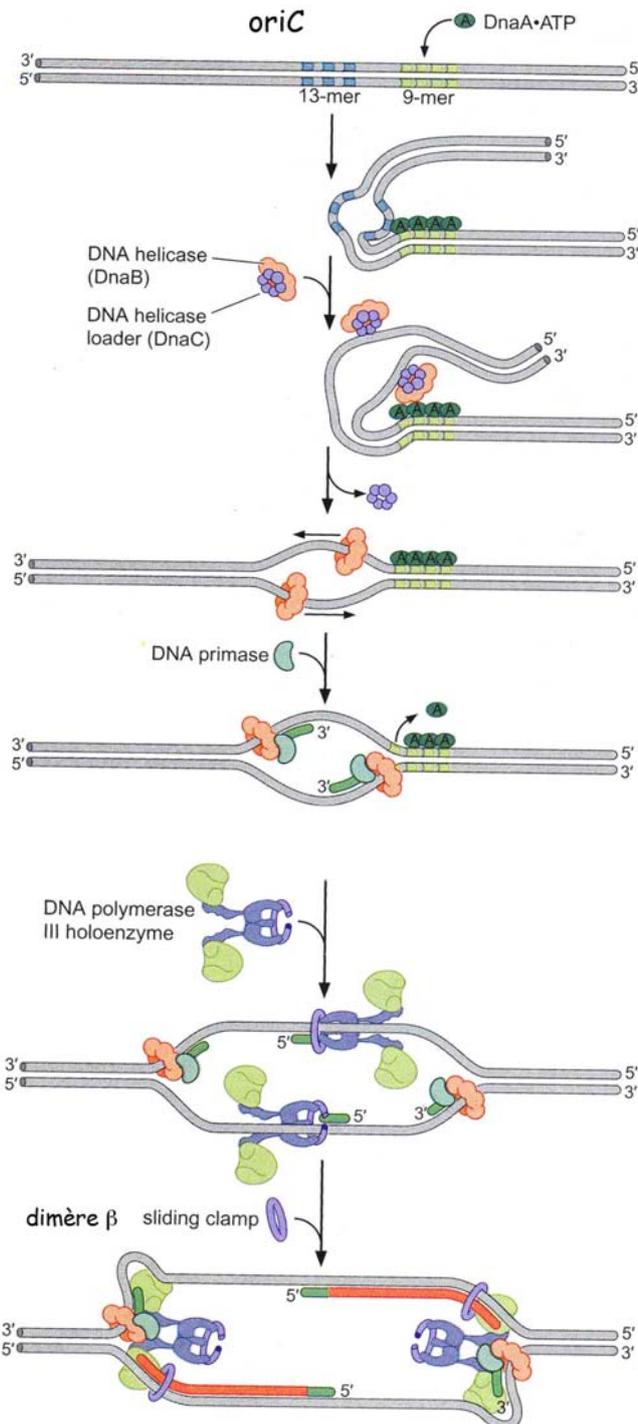
On est à la fin de l'initiation

On peut avoir le début de la synthèse. Elle va s'effectuer car c'est l'ensemble qui va recruter l'ADN pol III holoenzyme. Elle va donc synthétiser un brin d'ADN à partir de l'amorce.

• Le réplicon

C'est une unité d'ADN dans lequel s'effectue une réplication. Un réplicon peut être circulaire ou linéaire. Les organismes les plus simples comme les bact et les plasmides n'ont qu'un

Modèle de l'initiation chez E. coli



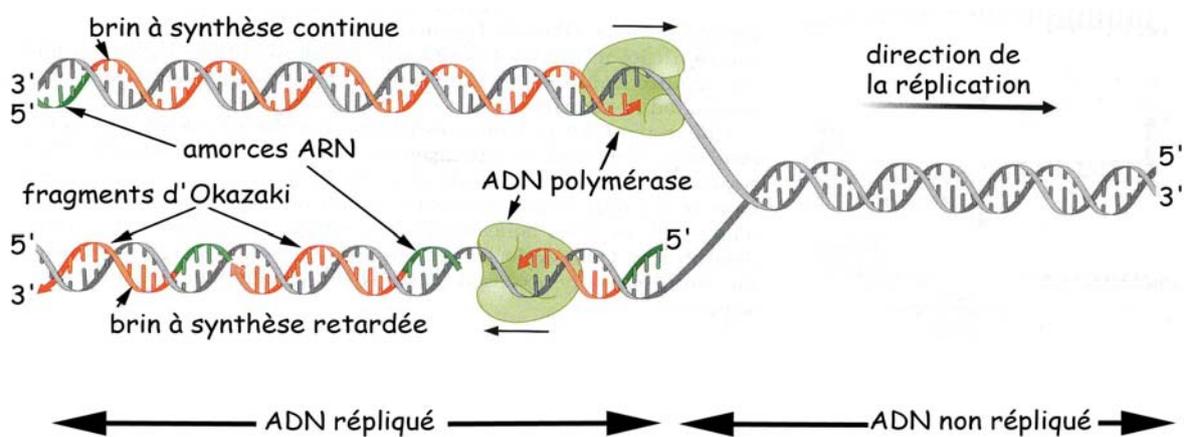
réplicon. Comme les mito et les chloroplastes. Les bactériophages ont aussi en général 1 seul réplikon.

Chez les eucaryotes, il y a plusieurs réplicons. Chez la levure, il y a 500 réplicons répartis sur tout le chromosome. Chez la drosophile, estimé à 3 500. Chez les mammifères, sur tous les chromosomes, il serait de l'ordre de 20 000 à 25 000. Quand il y a plusieurs réplicons sur 1 chromosome, il peuvent aller dans les 2 sens (bidirectionnels) et sont asynchrones.

### 3.2. Polymérisation

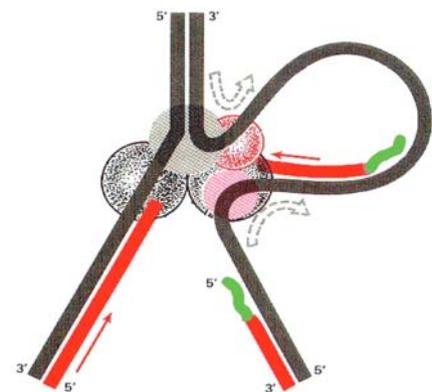
L'œil de réplication grandit au fur et à mesure que la polymérisation se fait. Sur le brin opposé, rien ne se passe (pas d'activité 3'→5'). Il faut donc de nouvelles amorces un peu plus loin et polymérisation, etc. On parle du fragment d'Okazaki. Il a une longueur variable selon les espèces : qq's 100 à 1 000 nt.

Le brin qui est synthétisé d'un coup est le brin à synthèse continue, de tête ou conducteur. L'autre est le brin à synthèse discontinu ou synthèse retardée.



Puis élimination de l'amorce par des RNase ou exonucléases. Il va donc y avoir un trou qui va être comblé par la synthèse d'ADN par la DNA pol

Comme les parties en cours de synthèse ne peuvent pas être à côté, on a l'hypothèse d'une boucle. C'est le modèle du trombone

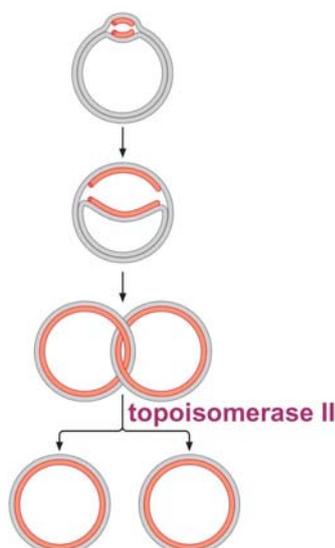


### 3.3. Terminaison

Nécessite des éléments différents si le chromosome est linéaire ou circulaire.

Le site de terminaison chez E.coli est précis et c'est un motif de 23 pb qui indique que la réplication doit se terminer.

Les 2 molécules filles vont se séparer via la topoisomérase II.



## 4. Chez les eucaryotes

### 4.1. Les télomères

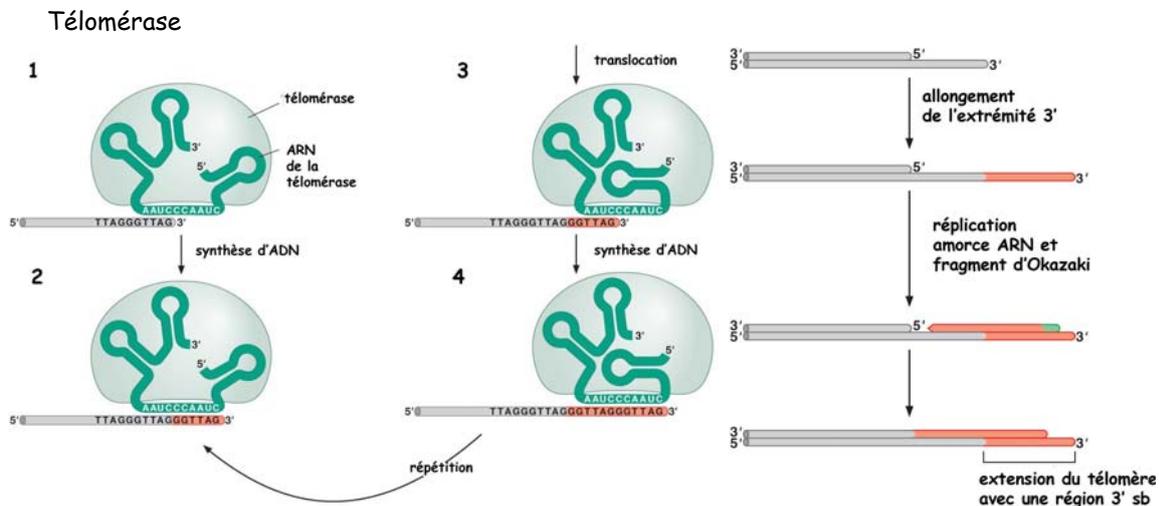
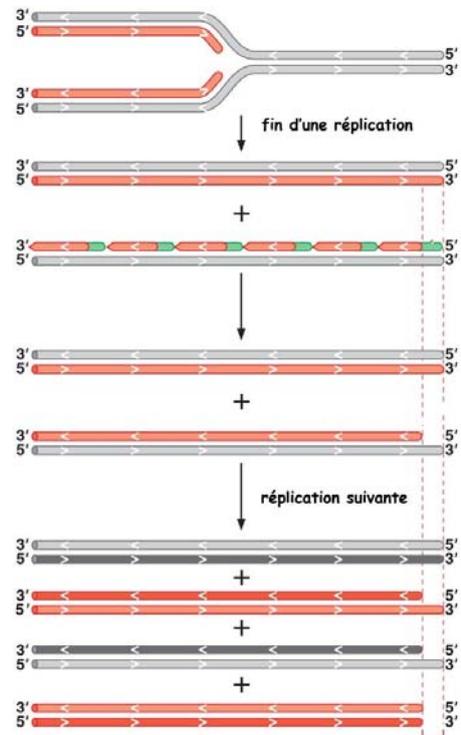
Chez les eucaryotes, les chromosomes sont linéaires et à l'extrémité des chromosomes, il y a les télomères. La réplication entraîne un raccourcissement progressif des télomères.

Il existe des mécanismes pour compenser ça. On a donc une télomérase qui peut rallonger les télomères. C'est une RT modifiée et qui peut fabriquer de l'ADN à partir d'ARN. Elle contient l'ARN. Chez l'homme, le télomère a une séq: TTAGGG. La télomérase contient de l'ARN dont la séquence est complémentaire de cet ADN.

La télomérase est une ADN pol et va donc rallonger le télomère. Il va y avoir une translocation puis une nouvelle synthèse.

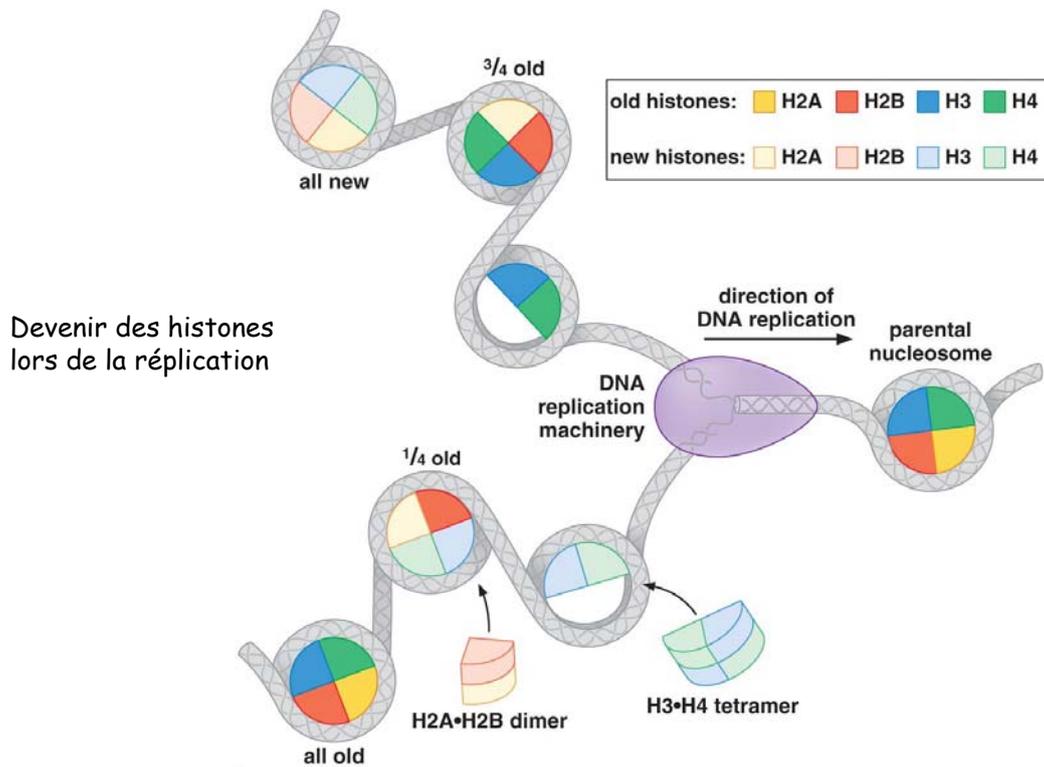
On a toujours une extrémité 3' sortante du à la réplication.

Plus on vieillit, plus les télomères sont courts. Les télomérases ne sont actives que dans les ç de la lignée germinale ainsi que dans les ç souches. On les trouve aussi dans la majorité des ç cancéreuses.



### 4.2. Les nucléosomes

Quand l'ADN polymérase arrive sur les nucléosomes, ils vont gêner et il faut donc les dissocier partiellement pour pouvoir polymériser. Très vite ils vont se réassocier mais comme on a 2 nouveaux brins, il faut plus d'histones. Ces molécules sont donc synthétisées pdt la phase S du cycle et elle est très finement régulée. L'association avec l'ADN ne se fait pas au hasard. Les nouveaux nucléosomes sont constitués de nouvelles histones et d'anciennes.



### 4.3. Les séquences nécessaires à la réplication du chromosome

In vitro, on peut faire des chromosomes mais pour qu'il soit viable, il lui faut quelques séquences :

- \_ Origine de réplication pour qu'il puisse se répliquer.
- \_ Il faut des séquences répétées télomériques
- \_ L'ADN centromérique. C'est un ADN répété qui permet la fixation de prot et la fixation aux kinétochores. Si il n'y est pas, il ne pourra pas être séparé pdt la mitose.