

Chapitre 02 :

Réplication, réparation et recombinaison de l'ADN

2.1. Mécanismes de réplication et de recombinaison de l'ADN :

Le génome correspond aux molécules d'ADN et est contenu dans les chromosomes localisés dans le noyau de la cellule. Lors de la division cellulaire, ce génome sera transmis aux deux cellules filles. Pour cela, les molécules d'ADN doivent se répliquer lors de la phase S du cycle cellulaire. Cette réplication correspond à un doublement des molécules d'ADN par synthèse ; deux molécules d'ADN « filles » doivent être les copies exactes de la molécule mère, pour conserver le patrimoine génétique.

Au cours de ce processus de réplication des modifications du génome peuvent apparaître :

- Des mutations, qui nécessiteront la mise en œuvre de systèmes de réparation ;
- Des phénomènes de recombinaison homologue.

A. Caractéristiques fondamentales de la réplication

On dit que la réplication est « semi- conservatrice ».

Cela veut dire que sur les deux brins de toute molécule d'ADN, il ya toujours :

- Un brin d'ADN ancien (qui provient d'un des deux brins d'ADN parental) ; En effet, à chaque réplication les deux brins de l'ADN parental se séparent.

B. Eléments nécessaires pour la réplication :

- **Nécessité d'un ADN parental** qui sert de modèle, et qui sera conservé dans la nouvelle molécule d'ADN. Ce modèle de copie, dit « semi- conservateur ».
- **Nécessité de nucléotides.** Ces nucléotides sont ceux de l'ADN qui sont : dATP, dTTP, dCTP, dGTP.
- **Nécessité d'enzymes** qui permettent aux deux brins parentaux d'ADN de s'écarter ; et d'accrocher les nucléotides les uns aux autres ; Et encore pour d'autres réactions que nous allons bientôt découvrir.
- **Nécessité de cations divalents** comme Mg^{2+} qui est indispensable à la synthèse d'ADN.

C. Mécanismes de la réplication :

- La réplication suit les règles de la polymérisation de l'ADN

La réplication se fait dans le sens 5' vers 3' ; de façon complémentaire, selon les règles classiques d'appariement : A-T et C- G et selon un mode antiparallèle.

- La propagation de la réplication est bidirectionnelle. Cela veut dire que la réplication se propage simultanément à droite et à gauche du point d'initiation. Alors que dans la transcription, on peut comparer la progression à un œil qui se déplace, ici on peut comparer la progression de la réplication à un œil qui s'agrandit jusqu'à ce que la réplication soit terminée.
- **La fourche de réplication**

La synthèse de l'ADN a lieu au niveau d'une fourche de réplication. Une enzyme appelée **hélicase** sépare les deux brins de la double hélice et des protéines **SSB** (Single Strand Binding) aident à garder les deux brins séparés (chaque protéine SSB se lie sur un seul brin) (figure 14). L'ADN est synthétisé de façon continue pour le brin **précoce** et discontinu ou par fragments d'**Okasaki** pour le brin **retardé**. Chez *E. Coli*, l'ADN est synthétisé par l'**ADN polymérase III** et la synthèse commence avec une petite amorce (courtes séquences d'ARN comportant de 12 à 14 ribonucléotides et à partir desquelles la synthèse de l'ADN débute) par une enzyme appelée **ARN polymérase** ou **Primase**, ces amorces seront enlevées à la fin de la réplication et remplacées par de l'ADN par la même enzyme qui est l'**ADN polymérase I**. Chez les eucaryotes une enzyme appelée **ADN polymérase α** initie la synthèse de l'ADN grâce à son activité **primase** et **polymérase** à la fois (c'est la même enzyme qui synthétise l'amorce d'ARN et qui la rallonge par de l'ADN). Le brin précoce est synthétisé de manière continue et le brin retardé est synthétisé par morceaux, une enzyme appelée **ADN ligase** relie ensuite les fragments d'Okasaki par de liaisons phosphodiester (figure 14).

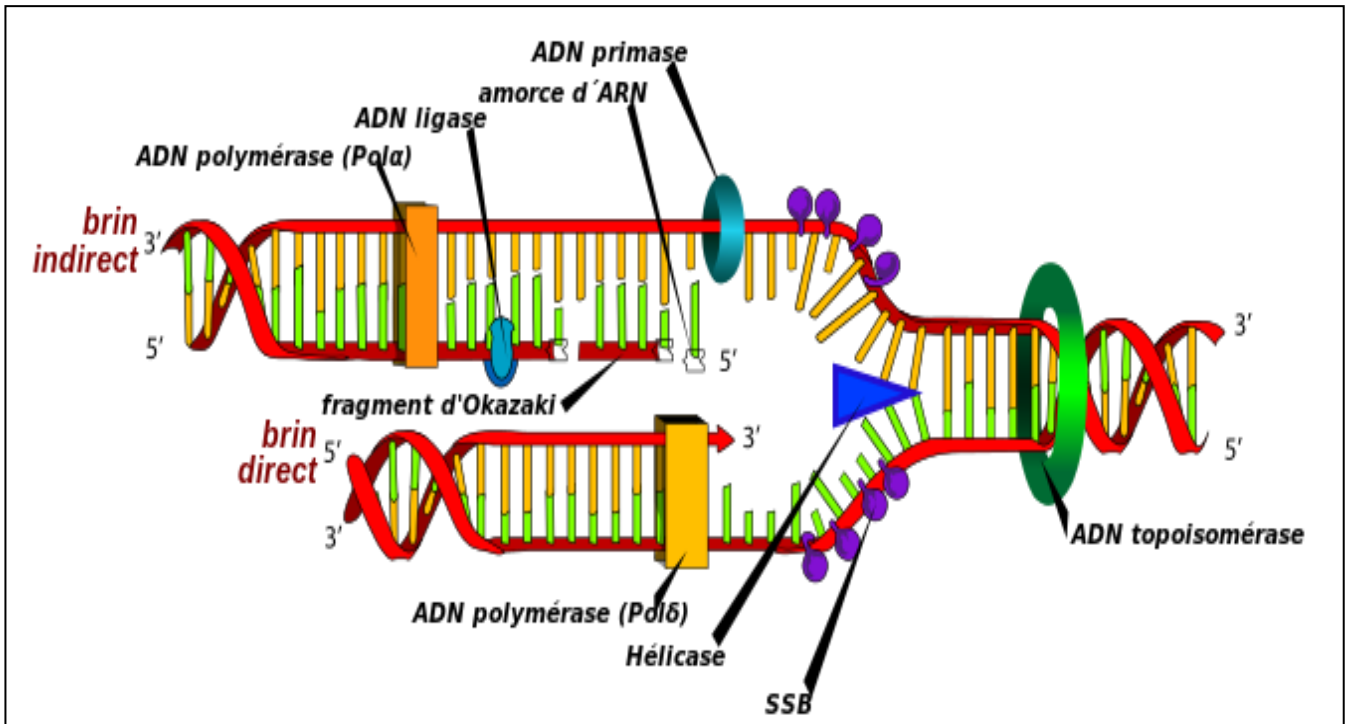


Figure 14 : La fourche de la réplication et système [enzymatique](#) de [réplication de l'ADN\(Site internet\)](#)

1. Point de départ et propagation de la réplication

➤ Origine de réplication

La réplication est initiée en un seul point chez les procaryotes, appelé **point d'origine** de la réplication. Elle se poursuit de façon bidirectionnelle (figure 15).

Il s'agit en général d'une séquence de plusieurs centaines de nucléotides contenant des sites de liaison des protéines de la réplication et dont les deux brins, riches en A-T sont faciles à dissocier. Il n'existe pas de séquence consensus pour ces origines de réplication.

Elle progresse à une vitesse de 1000 nucléotides à la seconde. Les procaryotes ont une seule origine sur chaque chromosome, alors que les eucaryotes ont des origines multiples sur chaque chromosome.

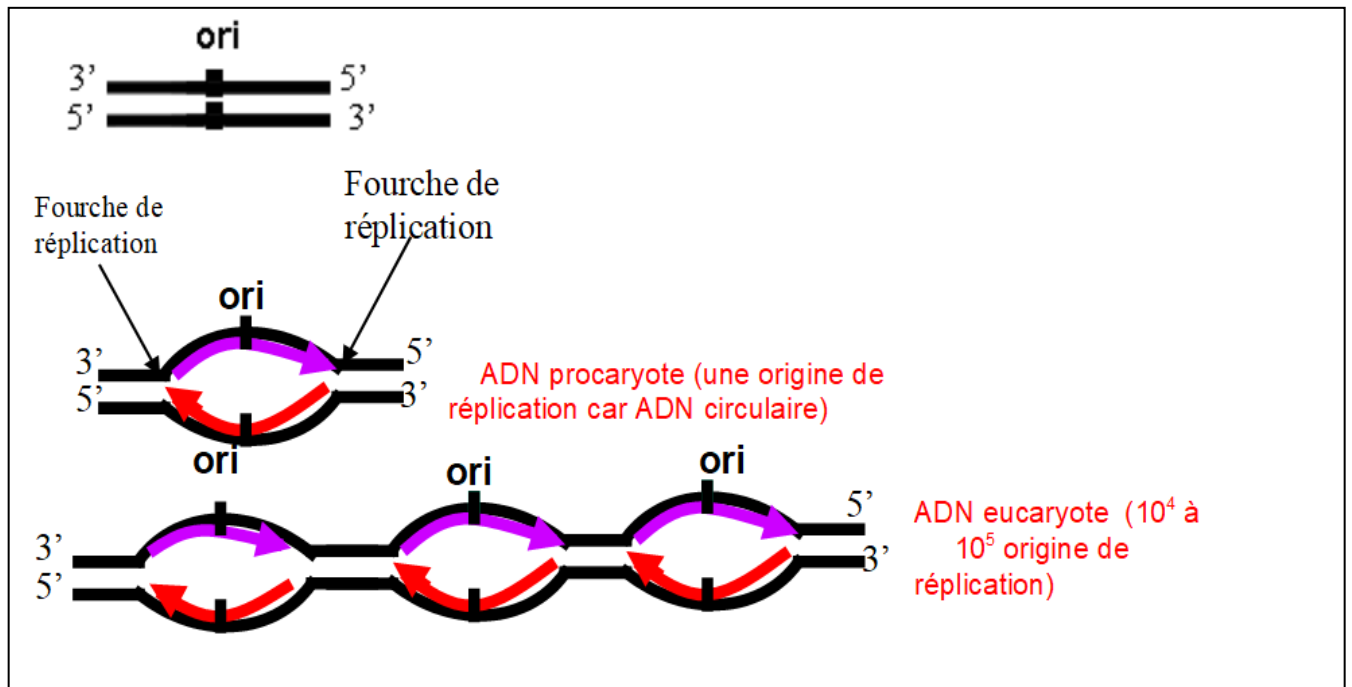


Figure 15 : la réplication est bidirectionnelle (site internet)

3. Orientation :

La synthèse de l'ADN s'effectue toujours dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Les deux brins étant antiparallèles et en suivant la direction de la fourche. Un problème dès lors se pose pour l'un des deux brins (cas du brin $3' \rightarrow 5'$) : comment la synthèse de ce brin peut-elle à la fois se produire de $5'$ vers $3'$, sens de la polymérisation de l'ADN, tout en respectant le sens de la propagation de la réplication sur ce brin retardé.

La solution à ce problème a été trouvée lorsque l'on a compris que la synthèse de ce brin était discontinue :

a. Brin retardé et brin avancé.

La découverte de cette synthèse revient à Reiji Okasaki. Ce brin est synthétisé par étape ou par morceaux. Ce sont de petits fragments appelés maintenant fragments d'Okasaki qui sont synthétisés en discontinu dans le sens $5' \rightarrow 3'$ sur le deuxième brin de l'ADN. Ces fragments peuvent aller de quelques centaines à quelques milliers de nucléotides. Le premier brin est synthétisé donc dans le sens $5' \rightarrow 3'$ en continu alors que le deuxième brin est synthétisé toujours dans le sens $5' \rightarrow 3'$ mais en discontinu (en petits morceaux) (voir figure 16). On appelle le brin continu le brin précoce ou avancé et le brin discontinu le brin retardé (sens inverse de la progression de la fourche).

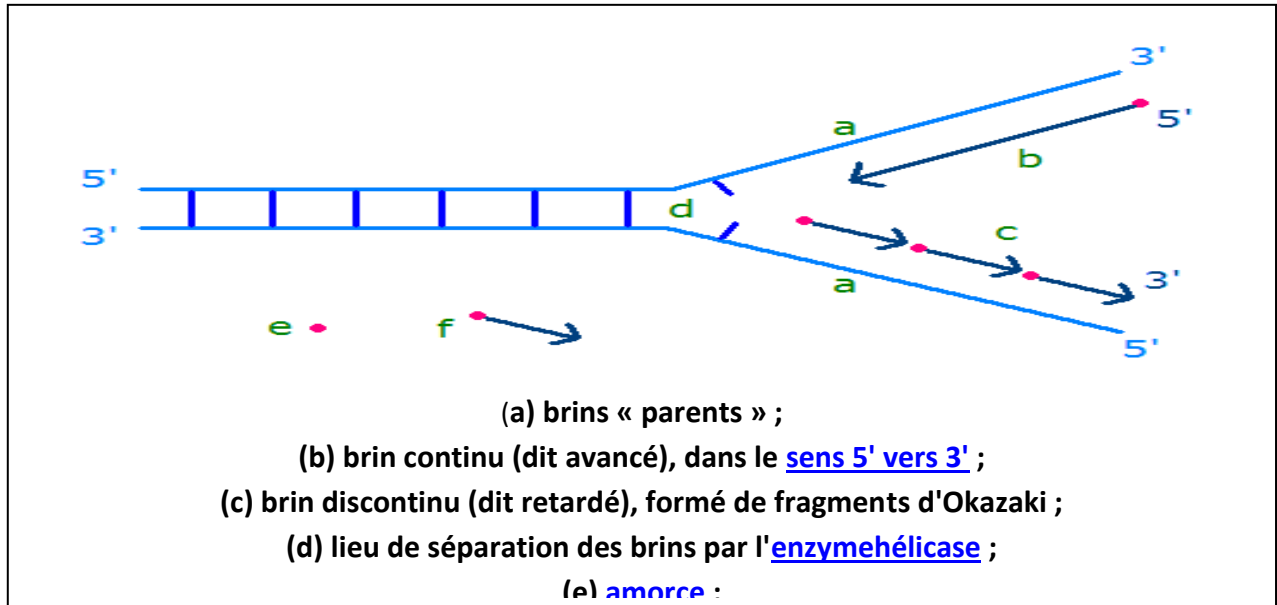


Figure 16 : La réplication est discontinue pour l'un des deux brins (Site internet)

En effet, de petits fragments d'ADN (1000 à 2000 nucléotides) sont synthétisés successivement dans le sens de la propagation de la réplication ; Mais ces petits fragments sont eux- mêmes synthétisés « à reculons » « en tournant le dos » à la direction générale de propagation), et donc bien dans le sens 5 vers 3 et de façon antiparallèle et complémentaire du brin modèle d'ADN (figure 17). Cette synthèse discontinue est légèrement en retard par rapport à la synthèse continue de l'autre brin, d'où les appellations de brins « retardé » et « avancé ».

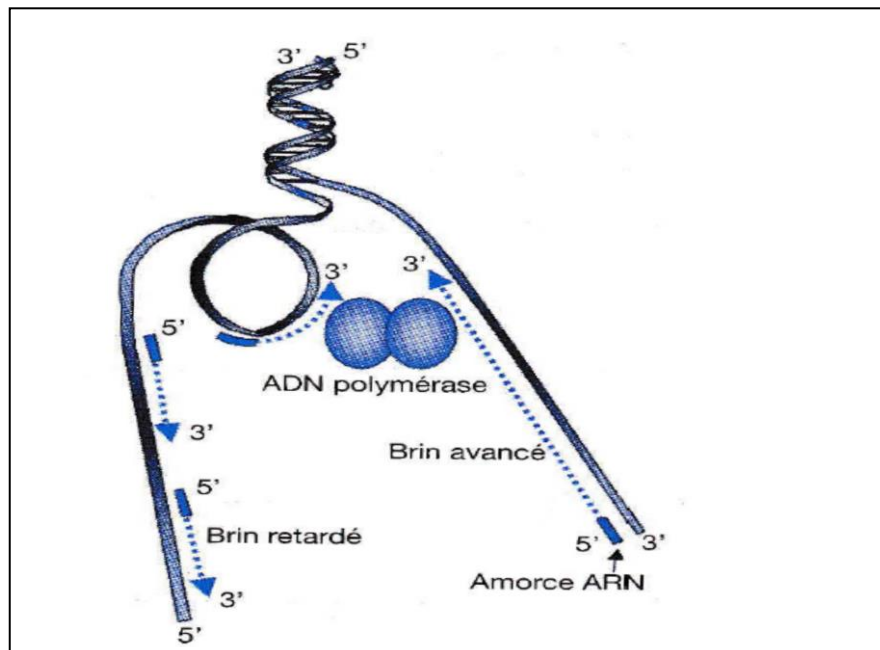


Figure 17 : Synthèse du brin et du brin avancé par l'ADN polymérase III (dimère) selon le modèle

de Kornberg (1988) (Étienne et al ; 1999)

b. Mécanisme proposé pour la synthèse simultanée des deux brins d'ADN

La synthèse des deux brins d'ADN est réalisée par l'ADN polymérase III. Cette enzyme est un dimère complexe contenant notamment deux sous-unités catalytiques. Il a été démontré que l'ADN polymérase III synthétisait les deux brins d'ADN en même temps en avançant dans un seul sens, qui est celui de la réplication. Ceci est apparemment incompatible avec la notion de synthèse discontinue et à reculs du brin retardé.

Pour expliquer cela, un modèle a été proposé en 1988 par Kornberg, selon lequel le brin parental matrice du brin retardé, formerait une boucle autour d'une sous-unité de l'ADN polymérase III (figure 17). Il se produirait ainsi une inversion de sens du brin retardé, si bien que l'addition de nucléotides en 3' dans le sens 5' vers 3' pourrait se faire simultanément et pareillement pour les deux brins, de cette manière, au brin retardé aura bien été synthétisé de manière antiparallèle au brin avancé, et cependant dans la même direction.

D. Réplication chez les procaryotes

L'ADN des bactéries qui est circulaire, et l'ADN des eucaryotes qui est linéaire sont répliqués de façon différente. Les molécules de l'ADN circulaires sont répliquées à partir d'une seule origine de réplication, cette origine est appelée **réplicon**. La fourche de réplication progresse dans les deux directions et se rencontrent et finissent par s'annuler. Le déroulement de la double hélice génère un ADN circulaire super-enroulé. Ce super-enroulement est diminué ou réduit par une enzyme appelée **Topoisomérase I**. Cette enzyme produit une coupure temporaire dans l'un des deux brins de l'ADN circulaire à un emplacement qui se trouve avant la fourche de réplication, ce qui permet au brin roulé de tourner librement autour de l'autre brin et d'annuler le super-enroulement. L'enzyme relie ensuite les deux bouts du brin coupé pour le refermer. Lorsque la réplication d'un chromosome bactérien est achevée on obtient deux molécules filles circulaires entrelacées. Elles sont séparées par l'action de la **Topoisomérase II** qui agit en coupant transitoirement les deux brins de l'une des deux molécules filles, permettant à l'autre molécule de se libérer séparant ainsi les deux molécules d'ADN produites.

E. Réplication chez les eucaryotes

Le mécanisme de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes est comparable à celui des procaryotes. En effet, elle se fait de manière bidirectionnelle, antiparallèle, complémentaire,

dans le sens 5'→ 3', continue pour le brin précoce et discontinue pour le brin retardée et nécessite des amorces d'ARN. Sauf qu'au lieu de n'avoir qu'une seule origine de réplication, la réplication chez les eucaryotes débute simultanément en plusieurs points d'un même chromosome, il existe donc plusieurs milliers de points d'initiation.

2.2. Réparation de l'ADN

Introduction

Lors de la réplication de l'ADN et malgré la précision de l'ADN polymérase, quelques mésappariements se forment; Des lésions de l'ADN se produisent, sous l'action de divers agents: internes (radicaux libres) ou, environnementaux (chaleur, ultraviolets, substances mutagènes).

Plusieurs mécanismes de réparation existent. Chacun est spécialisé dans la correction d'un type de dommage quel que soit le mécanisme de réparation mis en jeu, la structure de l'ADN en deux brins complémentaires est mise à profit pour assurer une réparation correcte. En effet, le brin intact sert de matrice pour la réparation du brin endommagé, assurant une fidélité de la séquence réparée. Trois mécanismes seront mis en jeu lorsqu'un seul brin est touché, selon la nature, l'importance et le mécanisme de la lésion. En cas d'atteinte des deux brins localisés ou plus étendus, ce seront des mécanismes plus complexes ou n'assurant pas une réparation *ad intgrum* qui seront mis en jeu.

A- Les mécanismes de réparation des lésions d'un brin :

1. Correction des mésappariements produits lors de la réplication

Quand un mésappariement (mismatch) a échappé à la fonction d'édition de l'ADN polymérase III, d'autres enzymes interviennent (codées par les gènes Mut). Ces protéines vérifient le brin néosynthétisé et uniquement lui, car il n'est pas méthylé contrairement au brin parental. Ce mécanisme est mis en jeu après la réplication de l'ADN (figure 19).

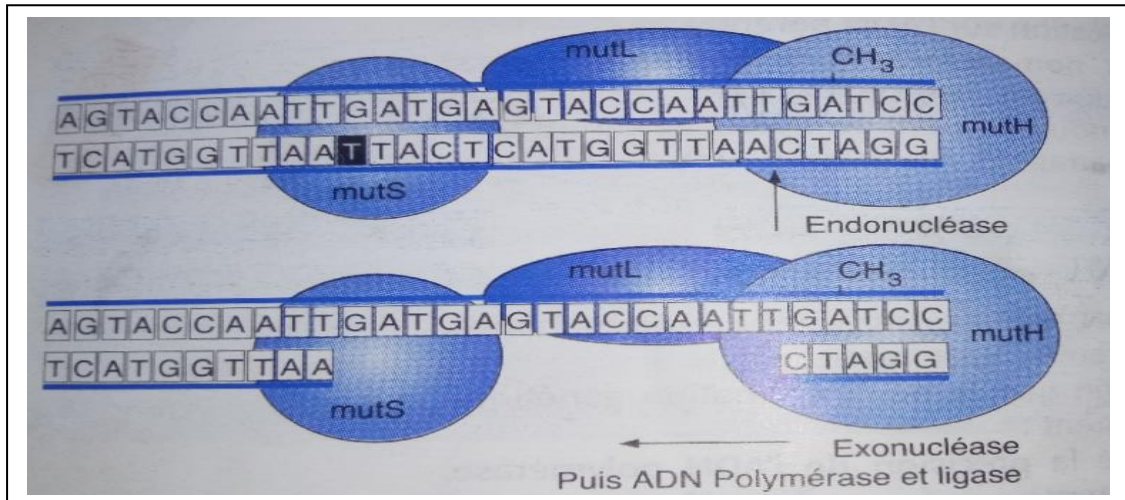


Figure 19: Correction des mésappariements produit lors de la réplication

2. Réparation par excision d'une base anormale

Alors que le mécanisme précédent était mis en jeu après la réplication de l'ADN, ce deuxième mécanisme est lui plutôt mis en jeu après altération d'une base par des agents physiques ou chimiques. Au cours de l'activité d'une cellule, des produits oxydants ou des mutagènes peuvent entraîner, par exemple, la désamination d'une base. Des enzymes vont alors cibler la réparation au niveau d'une seule base (**figure 20**).

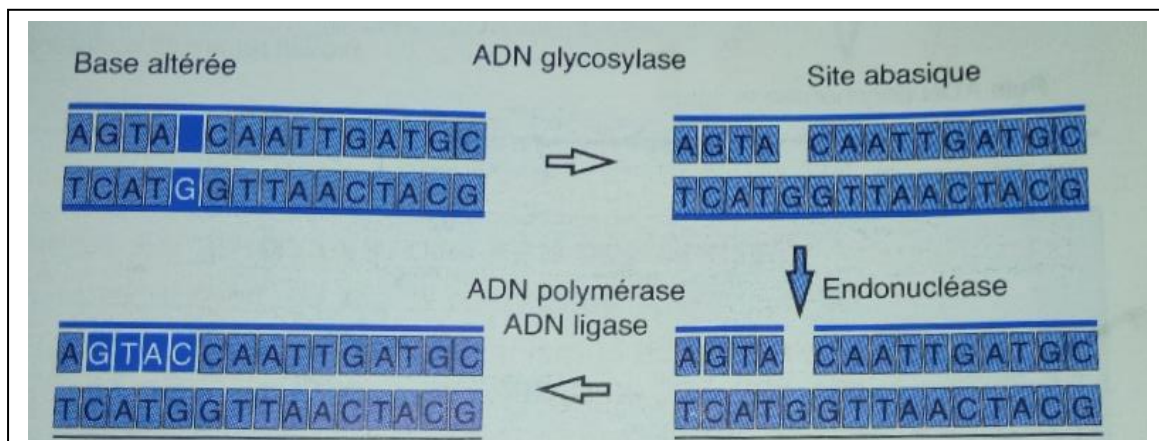


Figure 20: Mécanisme d'excision puis réparation d'une base anormale

3. Réparation par excision d'un oligonucléotide

Ce troisième mécanisme de réparation d'un brin lésé est mis en jeu lors de modifications plus importantes de l'ADN, lorsque se créent des liaisons covalentes entre bases (dimères de thymine, voir pour détails chapitre 8) Il existe des enzymes de réparation capables d'enlever la

zone défec tueuse produite par des agents physiques ou chimiques. Le mécanisme de réparation comprend plusieurs étapes: reconnaissance de la distorsion locale de l'hélice;

- Séparation des deux brins par une hélicase
- Coupure, par une exonucléase à quelques nucleotides de chaque côté de la lésion, avec départ du segment endommagé (d'une longueur d'environ 30 nt chez les eucaryotes);
- prolongement du brin d'ADN interrompu au bord de la lacune, par une ADN polymérase qui procède à une copie complémentaire grâce à l'information contenue dans le brin intact; soudure du prolongement à l'autre bord de la lacune par une ligase (**figure 21**).

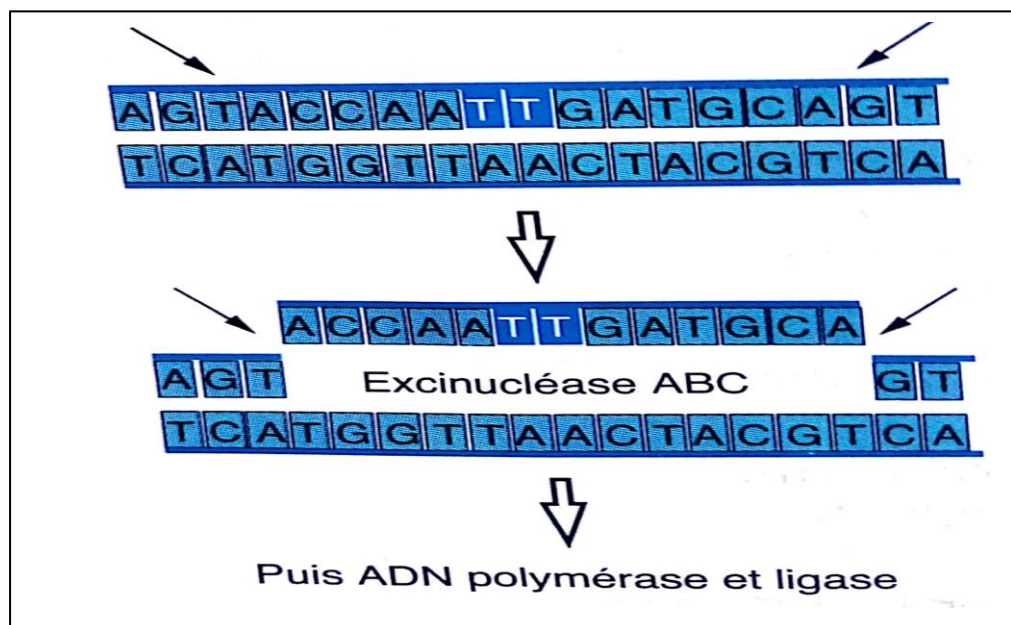


Figure 21 : Réparation par excision d'un oligonucléotide

B. Réparations des lésions simultanées des deux brins

Parfois la situation est critique:

- Le brin parental contient un dimère de thymine;
- Le brin fils contient une lacune.

L'information sur un court fragment d'ADN est donc totalement perdue pour chacun des deux brins. Cette situation est le plus souvent rencontrée après la réplication, lors d'une anomalie répllicative majeure qui va conduire le système de réparation avec les enzymes d'excision-

resynthèse à être débordé. Il se produira alors une brèche appelée lacune post-réplivative. Elle se rencontre aussi en dehors de la réplivative, après dommages induits par des radiations ionisantes ou des agents oxydants

1. La liaison non homologue des extrémités

L'existence d'une brèche sur les deux brins peut être réparée *a minima* par simple ligation entre les extrémités de chacun des brins. Cette réparation de fortune, qui ne restitue pas la séquence parentale *ad integrum*, est assez fréquente chez les eucaryotes supérieurs car le risque de changement du phénotype après une telle réparation est minime. En effet, un faible pourcentage du génome porte les informations quantitatives et qualitatives de l'expression des protéines

2. La réparation de la brèche par recombinaison homologue

Un autre mécanisme, appelé recombinaison homologue, a surtout été décrit chez les procaryotes, mais existe aussi chez les eucaryotes. Plus compliqué dans son mécanisme, il permet la restitution *ad integrum* de la séquence, malgré la perte d'information sur les deux brins

Ce mécanisme tire profit: de l'existence d'une deuxième molécule d'ADN identique lors de la réplivative ou; en dehors d'elle, de l'existence d'un deuxième chromosome contenant une molécule d'ADN intacte et identique à la séquence manquante, pour réparer l'altération.

Imaginons qu'une anomalie sur un brin parental (dimère de thymine sur le brin 1) ait produit une lacune post-réplivative sur le brin fils 1. Le mécanisme de recombinaison homologue permettra de prendre le fragment d'ADN du brin parental 2 homologue et combler la lacune du brin fils 1. Au cours de cette réparation, il y aura un échange entre deux segments homologues d'ADN (les 2 brins parentaux et le 1 brin fils dans cet exemple). Il ne s'agit donc pas d'une réparation au sens strict du terme, puisque cette recombinaison produit maintenant une nouvelle brèche sur le 2^{ème} brin parental de l'ADN.

Cette recombinaison homologue est assurée par des protéines spécifiques. Chez la bactérie, il s'agit la protéine RecA (Rec pour recombinaison) (fig. 3.11). Des équivalents existent chez les eucaryotes. Il faut ensuite l'intervention d'autres enzymes, les enzymes d'excision-resynthèse qui: Sur un brin élimineront le dimère de thymine; Et sur l'autre brin combleront la brèche.

A chaque fois la copie pourra se faire grâce à l'information contenue sur le brin opposé.

Finalement les ligases souderont les fragments d'ADN à lier.

3. Le système SOS

Lorsque les dommages de l'ADN sont trop grands, la réplication s'arrête et le risque est la mort cellulaire. Pour éviter cette mort, un ultime mécanisme est déclenché, c'est le système SOS. Ce mécanisme, qui implique les protéines **RecA** et **LexA** permet à la réplication de se poursuivre et aux réparations de se faire, mais souvent au prix d'erreurs répliquatives et donc d'un taux de mutations importantes.

2.3. Mécanisme de recombinaison homologue

On a longtemps cru que la recombinaison entre deux séquences homologues nécessitait la rupture d'un seul brin sur l'une des molécules d'ADN. On sait aujourd'hui qu'il faut la coupure des deux brins d'une des molécules d'ADN par une endonucléase pour initier cette recombinaison. Une exonucléase 5' vers 3' digère ensuite les deux extrémités 3' correspondantes sur les brins complémentaires à devenir simples brins (on dit extrémités 3' sortantes).

Ces extrémités 3' sortantes vont alors s'hybrider avec leurs séquences homologues sur la deuxième molécule d'ADN, créant ainsi une molécule d'ADN hybride.

Cette association entre les quatre brins des deux molécules d'ADN est coordonnée par la protéine RecA chez les procaryotes ou ses nombreux équivalents chez les eucaryotes, comme la protéine Rad51.

De nombreuses protéines accessoires à cette recombinaison existent chez les eucaryotes, comme les protéines Brca1 et Brca2, dont les altérations sont associées au cancer du sein.

Le point de jonction entre les quatre brins d'ADN est appelé jonction de Holliday (figure 18).

1.4. Mécanisme de recombinaison homologue

On a longtemps cru que la recombinaison entre deux séquences homologues nécessitait la rupture d'un seul brin sur l'une des molécules d'ADN. On sait aujourd'hui qu'il faut la coupure des deux brins d'une des molécules d'ADN par une endonucléase pour initier cette recombinaison. Une exonucléase 5' vers 3' digère ensuite les deux extrémités 3' correspondantes sur les brins complémentaires à devenir simples brins (on dit extrémités 3' sortantes).

Ces extrémités 3' sortantes vont alors s'hybrider avec leurs séquences homologues sur la deuxième molécule d'ADN, créant ainsi une molécule d'ADN hybride.

Cette association entre les quatre brins des deux molécules d'ADN est coordonnée par la protéine RecA chez les procaryotes ou ses nombreux équivalents chez les eucaryotes, comme la protéine Rad51.

De nombreuses protéines accessoires à cette recombinaison existent chez les eucaryotes, comme les protéines Brca1 et Brca2, dont les altérations sont associées au cancer du sein.

Le point de jonction entre les quatre brins d'ADN est appelé jonction de Holliday (figure 18).

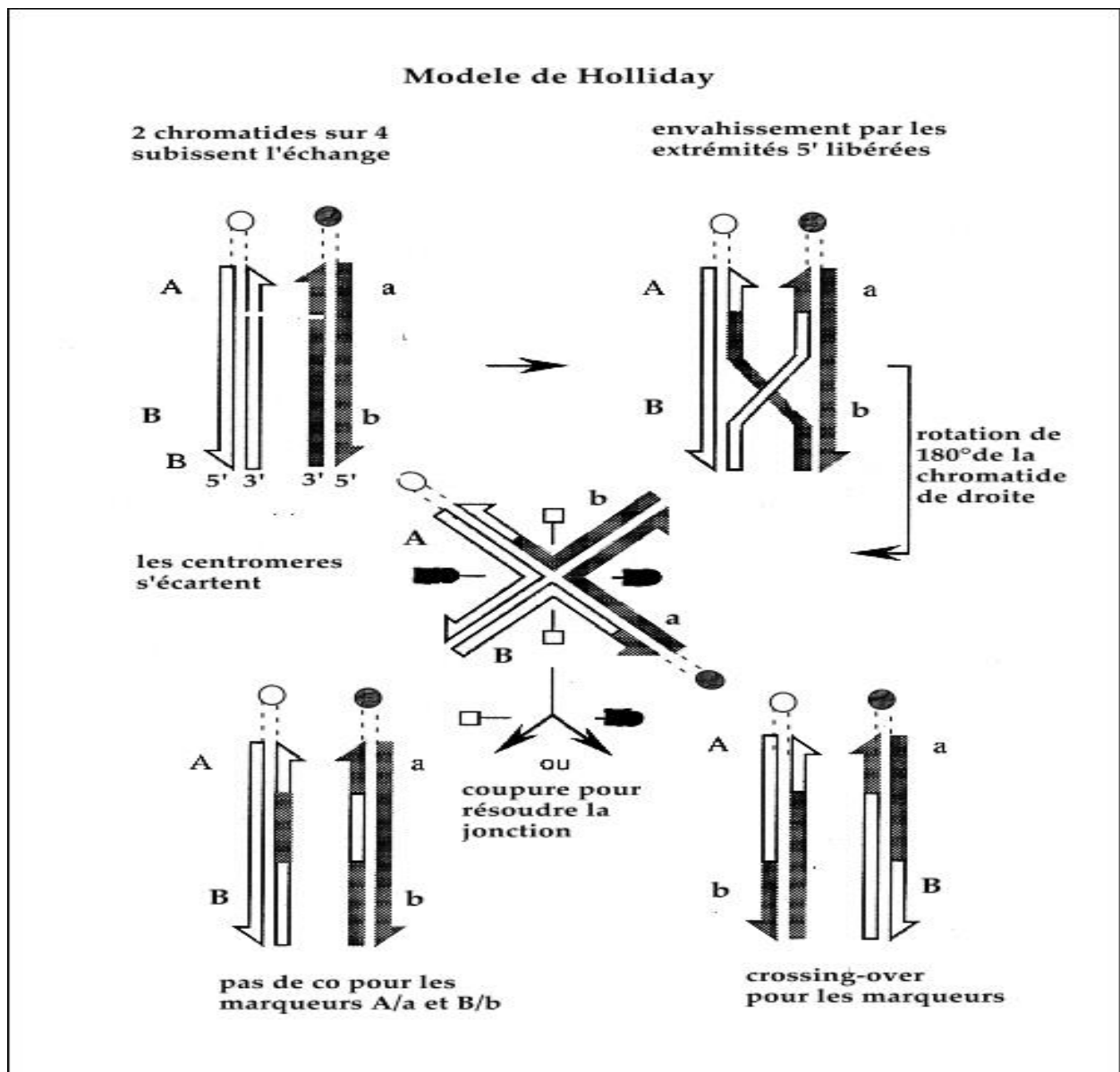


Figure 18 : Mécanisme de la recombinaison homologue

➤ **Crossing over et conversion génique**

L'étape suivante consiste en une courte synthèse d'ADN pour combler les séquences manquantes, puis la coupure et la relégation des brins d'ADN pour reformer deux molécules d'ADN intactes, sans insertion ni délétion du moindre nucléotide. Cependant et selon la nature de la coupure, on obtiendra :

- Soit un réarrangement simple ;
- Soit un réarrangement avec enjambement des deux molécules d'ADN (le classique crossing-over). En cas de réarrangement simple, la région digérée puis reconstruite peut conduire à une conversion génique, si elle intéresse un gène. Ainsi les deux chromosomes maternel et paternel auront une courte région, contenant un gène dont les deux allèles seront identiques et proviendront d'un seul des deux chromosomes (Figure 18).

En résumé, la recombinaison homologue est un mécanisme complexe d'échange de matériel entre deux molécules d'ADN homologues, qui peut conduire à des conversions géniques ou des crossing over entre chromosomes. Ce mécanisme cellulaire est mis à profit pour modifier les gènes dans le génome des cellules ou animaux de laboratoire.