

Chapitre 02 : La réplication de l'ADN

La division des cellules est à la base de la reproduction de tous les organismes, qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires. L'information génétique de chaque cellule, universellement constituée d'ADN, est contenue dans le noyau chez les Eucaryotes, ou le cytoplasme des Procaryotes. Chez les premiers, elle est dupliquée de façon conforme à chaque division cellulaire (mitose) ou bien génétiquement brassée, dans le cadre de la reproduction sexuée, lors de la méiose.

1. Définition

La réplication correspond à un ensemble de phénomènes par lesquels sont réalisés des copies fidèles des molécules d'ADN permettant une conservation stable de l'information génétique dans une espèce donnée et d'une génération à une autre.

2. Les modèles proposés de réplication d'ADN

Dans les années 1950, trois mécanismes différents ont été proposés pour la réplication d'ADN.

2.1. Modèle conservatif : à partir d'une molécule d'ADN, on forme une nouvelle molécule d'ADN sans "toucher" à la première. On garde donc ici une molécule "mère" non modifiée (elle est donc conservée).

2.2. Modèle semi-conservatif : chaque brin de la molécule à répliquer sert de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire, pour obtenir deux molécules d'ADN identiques. Chaque nouvelle molécule "fille" ne conserve donc que la moitié de la molécule "mère".

2.3. Modèle dispersif : aucun brin n'est conservé intact. Les deux molécules "filles" sont créées à partir de fragments de la molécule "mère" dispersés dans chacune des deux molécules et de copies de ces fragments.

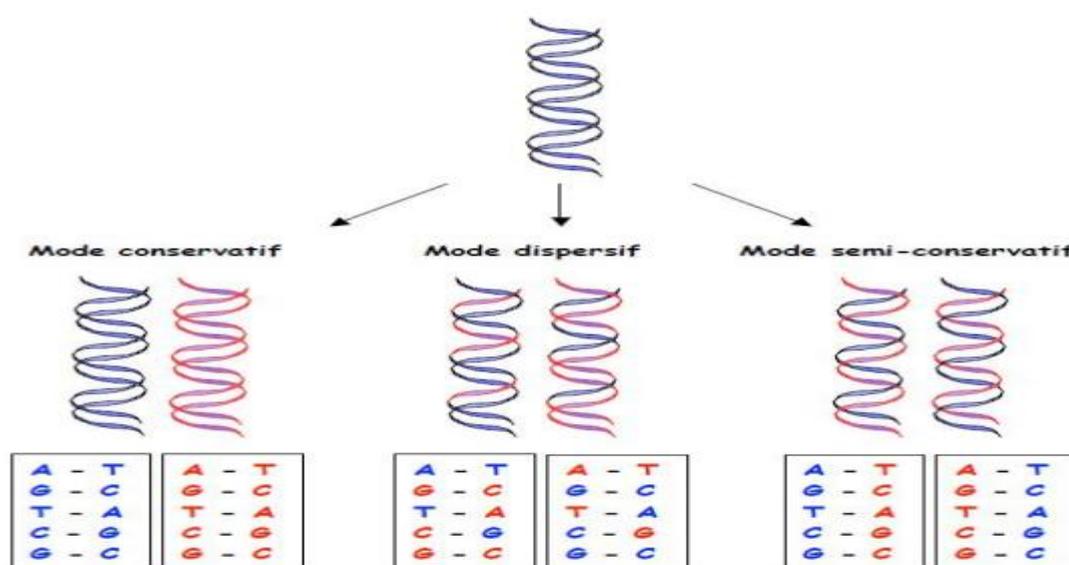


Figure 1. Les modèles proposés de réplication d'ADN

3. Expérience de Meselson et Stahl 1958 :

En utilisant les isotopes comme marqueurs, on peut suivre le devenir des molécules dans la cellule. L'ADN peut être marqué par plusieurs isotopes, en particulier ceux de l'azote (^{14}N et ^{15}N). Les molécules d'ADN qui contiennent une quantité appréciable d'azote 15 (azote lourd) sont plus denses que celles qui contiennent l'azote 14 (azote léger) et on peut déceler cette différence par centrifugation (figure 2).

En 1958, Meselson et Stahl mettent au point une technique d'obtention de gradient de densité par centrifugation. En utilisant du chlorure de césium (CsCl) de densité moyenne 1,72, ils obtiennent après 24 h de centrifugation à grande vitesse un gradient de densité (d'environ 1,70 à 1,75), gamme qui englobe la densité de l'ADN (1,710).

Ils cultivent les bactéries dans un milieu dans lequel les substances organiques utilisées comme source d'azote contiennent de l'azote lourd (^{15}N). Au cours de la culture, toutes les molécules azotées et en particulier l'ADN contiennent une forte proportion d'azote ^{15}N . L'ADN « lourd » a une densité de 1,724 et peut être distingué de l'ADN « léger » (1,710).

Ils mettent au point une méthode qui permet de synchroniser pendant quelques générations la division des bactéries.

Meselson et Stahl ont donc cultivé des bactéries d'*Escherichia coli* pendant plusieurs générations dans un milieu ne contenant que de l'azote 15. L'ADN est marqué par l'azote 15. Ils ont transféré ensuite ces bactéries après lavage dans un milieu où l'azote est uniquement léger (Azote 14). Ils ont prélevé à des intervalles de temps variés, des échantillons de bactéries et ils ont mesuré la densité d'ADN que ces bactéries contiennent. L'intervalle de temps correspond à un dédoublement du nombre de cellules dans la culture.

Le premier dédoublement correspond à la première synthèse d'ADN sans l'azote 15 c'est-à-dire en présence de l'azote 14. Le premier prélèvement correspond à la première génération qui contient des ADN hybrides (contenant ^{14}N et ^{15}N), ce qui rejette l'hypothèse du modèle conservatif de la réplication.

Le deuxième prélèvement correspond à la deuxième génération. On trouve des ADN hybrides et de « l'ADN ^{14}N ». Cette configuration ne peut correspondre qu'à l'hypothèse du modèle semi-conservatif.

Le troisième prélèvement correspond à la génération 3, contient la même quantité d'ADN hybride mais trois fois plus d'ADN légers (Azote 14). A chaque génération, la moitié de la molécule de la génération précédente est conservée.

L'expérience de Meselson et Stahl démontre donc que la réplication de l'ADN se fait selon un modèle semi-conservatif. Cela veut dire que sur les deux brins de toute molécule d'ADN, il y a toujours :

- Un brin d'ADN ancien qui provient de l'un des 2 brins d'ADN parental.
- Un brin d'ADN jeune, nouvellement formé.



Figure 2. Expérience de Meselson et Stahl

4. Le principe de la réplication de l'ADN :

La réplication est le processus au cours duquel l'ADN est synthétisé grâce à l'ADN polymérase. Ce mécanisme permet d'obtenir, à partir d'une molécule d'ADN, deux molécules identiques à la molécule initiale. La réplication de l'ADN doit respecter deux principes : l'ensemble du génome doit être répliqué à chaque division cellulaire; chaque molécule d'ADN n'est répliquée qu'une seule fois par cycle cellulaire.

5. Mécanisme de réplication:

Le processus nécessite:

L'ADN parental (matrice);

Les dNTP (dATP, dCTP, dTTP et dGTP) rentrent dans la réaction sous forme triphosphate, et sont intégrés dans le brin sous forme monophosphate;

Les enzymes suivantes :

- Les hélicases, à l'initiation de la réplication,
- Les primases,
- Les ADN polymérase,
- Les topoisomérases,

et les protéines SSB (pour single *stranded binding protein*) qui ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches répliquatives.

5.1 Chez les procaryotes:

Chez les procaryotes (bactéries), la réplication débute en un point précis du chromosome dit point d'initiation ou origine de la réplication (ORI). Chez *E.coli*, la réplication débute à un site spécifique, l'origine (*OriC*) et se termine à un autre site spécifique, le terminus. La séquence (*OriC*) se compose de nucléotides répétées qui s'unissent à une protéine iniatrice et d'une séquence riche en A-T capable de s'ouvrir facilement lors de l'initiation de la réplication.

Après l'initiation, la réplication se poursuit dans les deux sens à partir de cette origine unique jusqu'à l'unique terminus, on dit que la réplication est bidirectionnelle. On parle de réplicon pour désigner l'ADN contrôlé par une région.

La région où la double hélice est déroulée et le nouvel ADN synthétisé est appelée fourche de réplication du fait de sa structure en forme d'Y.

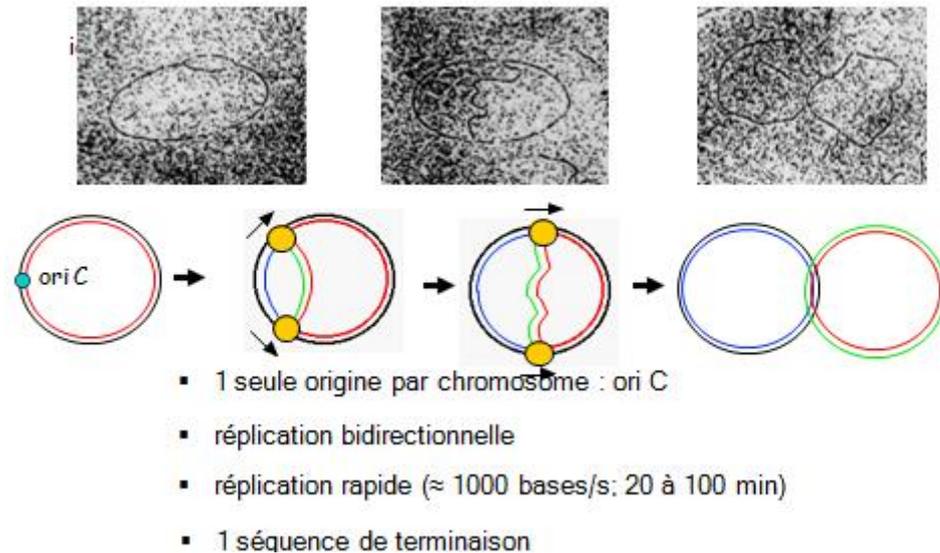


Figure 3. Origine de réplication d'ADN chez les procaryotes

a. Activation:

Une partie de la double hélice de l'ADN est déroulée pour exposer les bases azotées.

L'enzyme hélicase coupe et déroule de courtes segments d'ADN avant la fourche de réplication (elles coupent les liaisons hydrogène entre les bases). La synthèse d'un nouveau brin d'ADN commence donc, en fait par un petit fragment (de 4 à 12nt) d'ARN, « amorce » fabriquée par une ARN polymérase appelée primase. La synthèse d'ADN commence sur des amorces d'ARN constituées. Les ADN polymérases ne peuvent pas initier une chaîne d'ADN, elles ne peuvent qu'allonger une chaîne polynucléotidique existante à partir d'une fonction 3'-OH libre.

Les protéines SSB (pour single stranded binding protein) ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches réplcatives.

b. Elongation:

L'ADN Polymérase catalyse la formation de chaînes polynucléotidiques par l'addition successive de nucléotides dérivant de désoxyribonucléosides triphosphate (dNTP) pour créer un nouveau brin complémentaire (dans le sens 5' à 3').



Le caractère antiparallèle des deux brins d'ADN fait que la réplication se produit de manière asymétrique, avec un brin précoce (avancé), pour lequel la polymérase avance dans le même sens que l'hélicase et la fourche de réplication dans le sens 5'-3', et un brin lent (retarde), sur lequel la

polymérisation se fait en sens inverse. Sur le brin rapide, une seule amorce est nécessaire à l'origine de réplication, l'ADN polymérase synthétise ensuite le brin complémentaire de manière continue. Sur le brin lent, la polymérisation à reculons nécessite des démarrages de polymérisation et des amorces multiples au fur et à mesure que la fourche avance et dénoue l'ADN matrice.

Les segments d'ADN synthétisés sont discontinus et sont appelés fragments d'Okazaki. On parle ainsi de réplication semi-discontinue.

L'ADN polymérase hydrolyse en avançant l'amorce d'ARN du fragment précédent (activité exonucléasique). Les petits fragments seront ensuite reliés entre eux par une ligase.

Le déroulement de la double hélice par les hélicases provoque son surenroulement en aval du déplacement de la fourche de réplication. La topoisomérase I intervient pour supprimer ces surenroulements en coupant l'un des deux brins, ce qui permet à la double hélice de pivoter sur le deuxième brin dans le sens opposé du surenroulement. Cette même enzyme joue le rôle d'une ligase en reliant les deux bouts de la coupure. La topoisomérase II réalise des coupures double brin, permettant le passage d'un autre segment de l'ADN dans l'ouverture ainsi réalisée, puis restaure les liaisons coupées, permettant de détordre encore plus rapidement l'ADN. Chez les procaryotes assure la séparation des deux molécules d'ADN à la fin de la réplication.

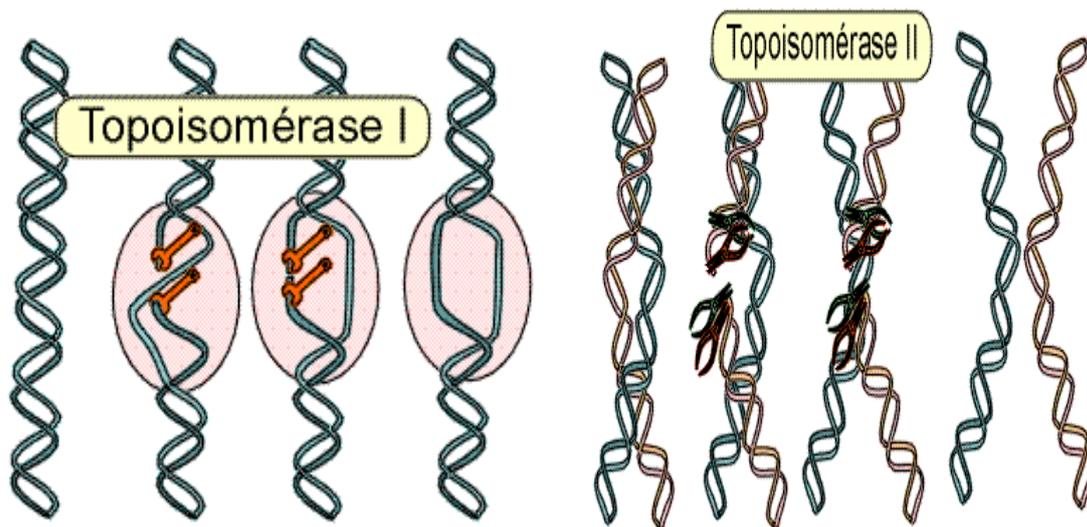


Figure 4. Schéma de l'action de la topoisomérase I et de la topoisomérase II.

Trois ARN polymérases participent dans la réplication de l'ADN chez les procaryotes:

- L'ADN Polymérase I permet : Réparation de l'ADN. Elle a une activité polymérase dans le sens 5' vers 3', exonucléase dans le sens 3' vers 5' et 5' vers 3'.

Intervention en fin de réplication pour éliminer l'amorce d'ARN grâce à son activité exonucléase dans le sens 5' vers 3'.

-L'ADN Polymérase II permet : Réplication de l'ADN endommagé grâce à une activité exonucléase 5' vers 3'.

L'ADN Polymérase III permet : Principale action polymérase bactérienne intervenant dans la réplication du brin avancé et synthèse des fragments d'Okazaki de l'ADN.

c. Terminaison:

Le terminateur est le site de fixation de protéines « Tus » qui reconnaît les régions Ter. Chez *E-coli*, la partie entre les deux terminateurs n'est d'abord pas répliquée, les deux ADN circulaires sont ainsi associés, on utilise alors la topo-isomérase II pour les dissocier. L'ADN polymérase I complètera ensuite les parties non répliquées.

Le processus de réplication est terminé et les nouvelles molécules d'ADN, composées chacune d'un brin d'ADN parental et d'un brin d'ADN fils, se reforment en hélices.

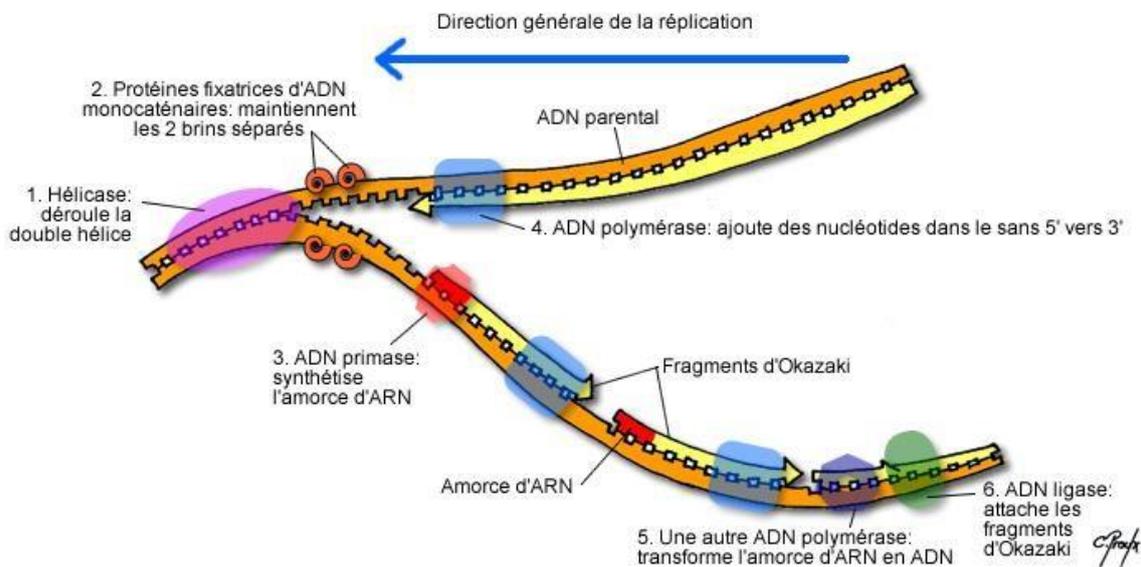


Figure 5. La réplication de la molécule d'ADN chez les procaryotes.

5.2. Chez les eucaryotes:

Le mécanisme de la réplication chez les eucaryotes est comparable à celui des procaryotes. Dans les cellules eucaryotes, la synthèse de l'ADN se produit pendant la phase S du cycle cellulaire. Cette synthèse serait trop longue si elle ne débutait qu'en un point. En effet, en raison de la grande longueur de l'ADN, la réplication chez les eucaryotes débute simultanément en plusieurs points (origines de réplication) d'un même chromosome appelés **réplicons** (figure 6). A partir de chaque réplicon, elle progresse de façon bidirectionnelle, jusqu'à ce que les deux réplicons adjacents entrent en contact et que l'ensemble de l'ADN soit dédoublé.

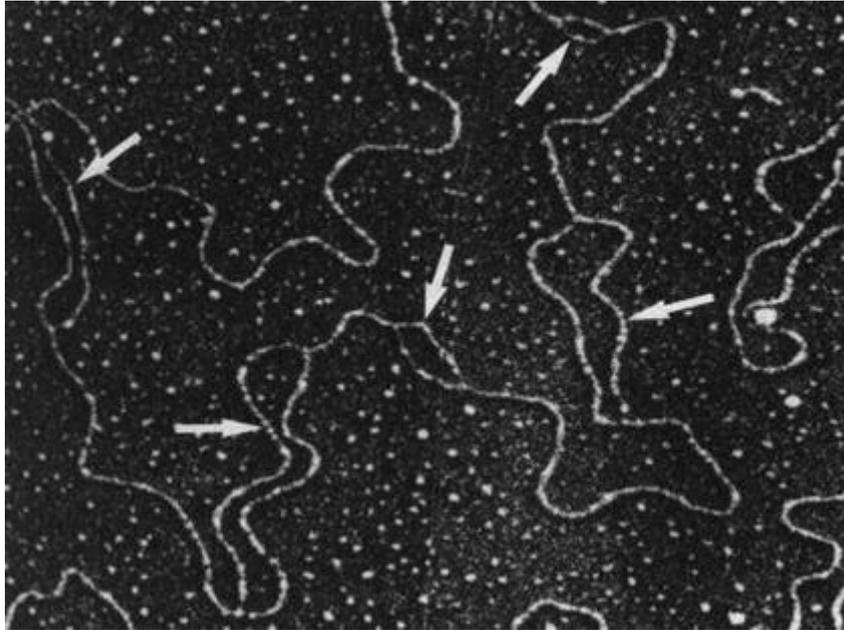


Figure 6. Les multiples origines de réplication des chromosomes Eucaryotes.

La réplication à le même principe que chez les procaryotes avec le brin avancé et le brin retarde, mais avec quelques différences:

L'ADN est beaucoup plus long,

La vitesse de réplication est de 50 nucléotides par secondes;

Ceci compensé par de multiples origines de réplication;

L'ADN est intégré dans la chromatine associée aux histones, au moment de la réplication il y a production d'histones;

L'ADN est répliqué par 5 ADN polymérase (α , β , γ , δ , ϵ).

L'ADN polymérase α qui dispose d'une activité primase complète, est responsable de l'initiation de la synthèse d'ADN. L'ADN est répliqué par les ADN polymérase α et δ :

- α synthétise le brin retardataire et δ synthétise le brin précoce (figure 7).

L'ADN polymérase ϵ est impliqué dans la réparation de l'ADN et l'ADN polymérase γ réplique l'ADN mitochondriale. β supprime l'ARN amorce et assure la synthèse et la réparation de l'ARN amorcé.

Chez les eucaryotes les fragments d'Okazaki ont une taille de 100 à 200 nucléotides alors que ceux des procaryotes, leur taille varie de 1000 à 2000 nucléotides.

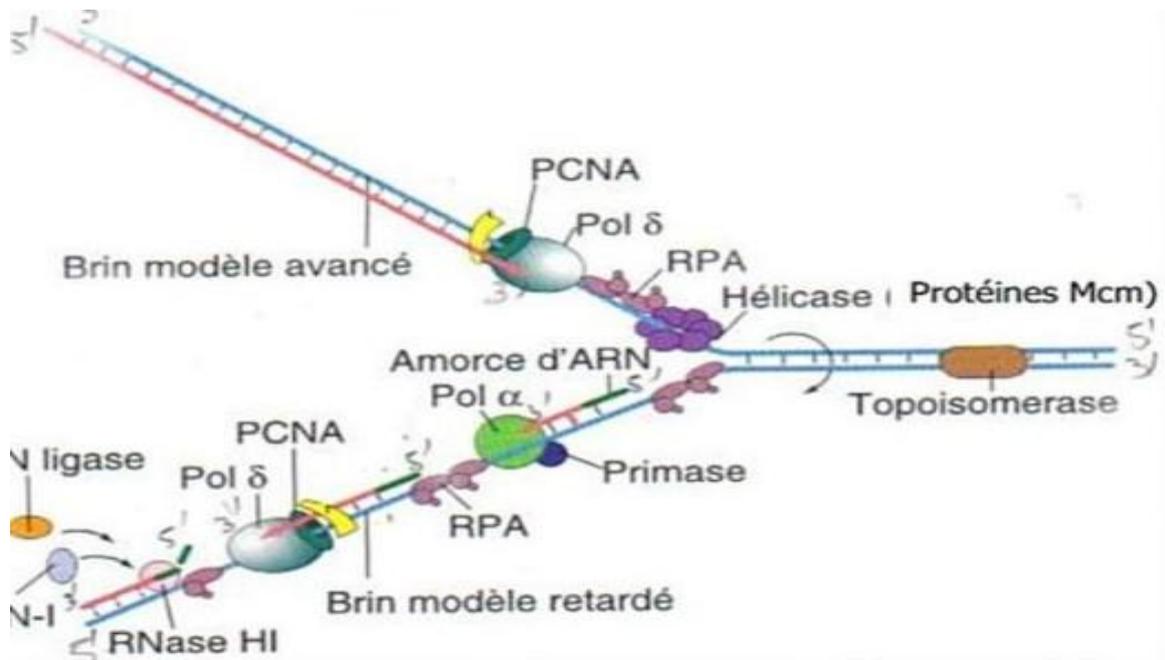


Figure 7. La réplication de la molécule d'ADN chez les eucaryotes.

5.2.1. Le problème des télomères

Toutes les amorces d'ARN seront éliminées, laissant des lacunes dans les brins d'ADN nouvellement synthétisés. L'ADN polymérase et la ligase remplacent toutes les amorces d'ARN par de l'ADN à l'exception de l'amorce ARN aux extrémités 5' de chaque nouveau brin synthétisé. Cela signifie que chaque brin d'ADN nouvellement synthétisé est plus court à son extrémité 5' que le brin équivalent dans l'ADN parental.

Pour éviter que le raccourcissement des chromosomes ne cause la perte d'information, les télomères contiennent une séquence ADN non codantes. Cette séquence est d'ailleurs toujours la même, il s'agit chez les vertébrés des 6 bases TTAGGG, répétées des milliers de fois. Quand il y a eu tellement de divisions les télomères deviennent plus court à l'extrémité 5' du brin nouvellement synthétisé, ce qui forme un risque de perdre de l'information codante à la division suivante. De ce fait, dans les cellules somatiques, lorsque les télomères atteignent une longueur « critique », il y a activation de voies de réponse afin de réparer d'éventuels dommages subis par l'ADN. Ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire, pouvant aller jusqu'à la sénescence ou l'apoptose de la cellule.

Il y a une exception au phénomène de raccourcissement des télomères, et elle concerne les cellules germinales. Pour qu'une descendance commence sa vie avec des télomères de taille normale, il existe une enzyme appelée télomérase, qui se charge de reconstituer les télomères pour les remettre à leur niveau initial. Cette enzyme est active dans les cellules germinales, mais aussi dans certaines cellules souches (matopoïétiques, neuronales et épidermiques) qui sont principalement impliquées dans les processus de renouvellement des tissus.