

II-Réplication, réparation et recombinaison de l'ADN

Objectifs spécifiques :

- Connaître le mécanisme de la réplication et de la recombinaison
- Préciser les caractéristiques générales de la réplication
- Décrire le mécanisme de la réplication chez les procaryotes et les eucaryotes
- Montrer l'utilité de la réparation des lésions de l'ADN.
- Décrire les mécanismes de réparation de l'ADN chez les procaryotes et eucaryotes
- Décrire le mécanisme de recombinaison de l'ADN .

1. Présentation

La réplication permet, de former, à partir d'une molécule d'ADN, deux molécules d'ADN identiques. Ce mécanisme explique comment l'information génétique est conservée dans toutes les cellules de l'organisme, lesquelles vont permettre la transmission de cette information à la descendance (c'est l'hérédité). La réplication est à l'origine de la permanence des propriétés globales de chaque espèce animale, végétale, virale ou bactérienne. Elle comporte un certain nombre de caractéristiques, communes à tous les organismes.

La réplication de l'ADN est le processus par lequel deux molécules d'ADN identiques sont produites à partir d'une seule molécule d'ADN d'origine.

2. 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.

3. La Réplication de l'ADN

3.1. Réplication semi-conservative

A chaque réplication, il se produit une séparation des deux brins d'ADN parental. Chaque brin servira de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire. On obtient deux molécules d'ADN identiques, chacune des deux contenant un brin parental et un brin fils.

3.2. Éléments nécessaires à la réplication

Les ADN polymérases nécessitent des conditions pour leur activité :

- Les quatre désoxyribonucléotides 5'-triphosphate (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Ces derniers apporteront également l'énergie nécessaire à la réaction
- Des ions magnésium (Mg^{+2}) qui stabilisent l'ADN et les protéines
- Une matrice d'ADN qui correspond à un brin parental et qui sert de modèle
- Une amorce ayant une extrémité 3'-OH libre
- Des enzymes spécifiques.

3.3. Origines de réplication

-Point d'initiation ou origine de réplication 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). L'ADN répliqué à partir d'une unique origine est appelé réplicon. Le chromosome bactérien est considéré comme un seul réplicon.

-Multiples points d'initiation chez les eucaryotes

En raison de la grande longueur de l'ADN, la réplication chez les eucaryotes débute simultanément en plusieurs points d'un même chromosome. La fusion de tous les réplicons produit deux molécules d'ADN identiques.

3.4. Le mécanisme de la réplication

-La réplication débute par la séparation des deux brins de l'ADN. L'ADN est déroulé en un point précis appelé : origine de la réplication.

A partir de l'origine de réplication apparait : Une fourche mobile ayant la forme de Y. La réplication débute dans les deux sens à partir d'un point commun. Au niveau de chaque origine de réplication, **un réplicon** se développe.

-La double hélice de l'ADN est déroulée par une enzyme l'hélicase. Les protéines SSB (single strand binding protein) s'attachent à chacun des 02 brins pour garder les 02 brins séparés et empêcher la reformation de la double hélice.

-Chacun des 2 brins d'ADN joue le rôle de modèle pour former à son contact un brin **complémentaire**. Les fourches de réplication sont activées de façon bidirectionnelle.

- Au fur et à mesure que la réplication progresse, l'ADN est déroulé de ses nucléosomes. Après le passage du réplicon les nucléosomes se reforment.

- La synthèse des 02 brins d'ADN se déroule de façon simultanée, ils sont déroulés dans des sens opposés.

- Le mécanisme de réplication est différent pour chacun des brins, car les 02 brins sont **antiparallèles**. La réplication est continue pour un brin dit : **brin précoce** (de 5' à 3'), et pour l'autre brin dit : **brin tardif** (de 3' à 5') le nouvel ADN est synthétisé sous forme de petits fragments appelés : **fragments d'Okasaki**.

Brin précoce : dans la réplication de l'ADN, le brin précoce est le brin d'ADN le long duquel le nouveau brin est synthétisé en continu, dans la même direction que la fourche.

Brin retardé (ou tardif) : dans la réplication de l'ADN, le brin retardé est le brin d'ADN le long duquel le nouveau brin est synthétisé de manière discontinue, en fragments.

Les fragments d'Okasaki sont les courts fragments d'ADN qui sont synthétisés de manière discontinue le long du brin retardé lors de la réplication de l'ADN.

- L'**initiation de la réplication** ne peut se faire qu'avec une amorce (primers) constituée par un petit fragment d'ARN (court fragment de 8 à 12 nucléotides complémentaires à une région spécifique) synthétisé par une ARN polymérase (ou primase).
- L'enzyme responsable de la synthèse de l'ADN est une **ADN polymérase III**.
- Les amorces doivent être supprimées avant la fin de la réplication, les lacunes temporairement créées sont comblées par l'ADN.
- La terminaison correspond à l'arrêt de la réplication lorsque deux fourches de réplication se rencontrent ou lorsqu'une fourche rencontre un signal de terminaison de la réplication. Les 02 molécules filles sont séparées grâce à l'action des topoisomérases.

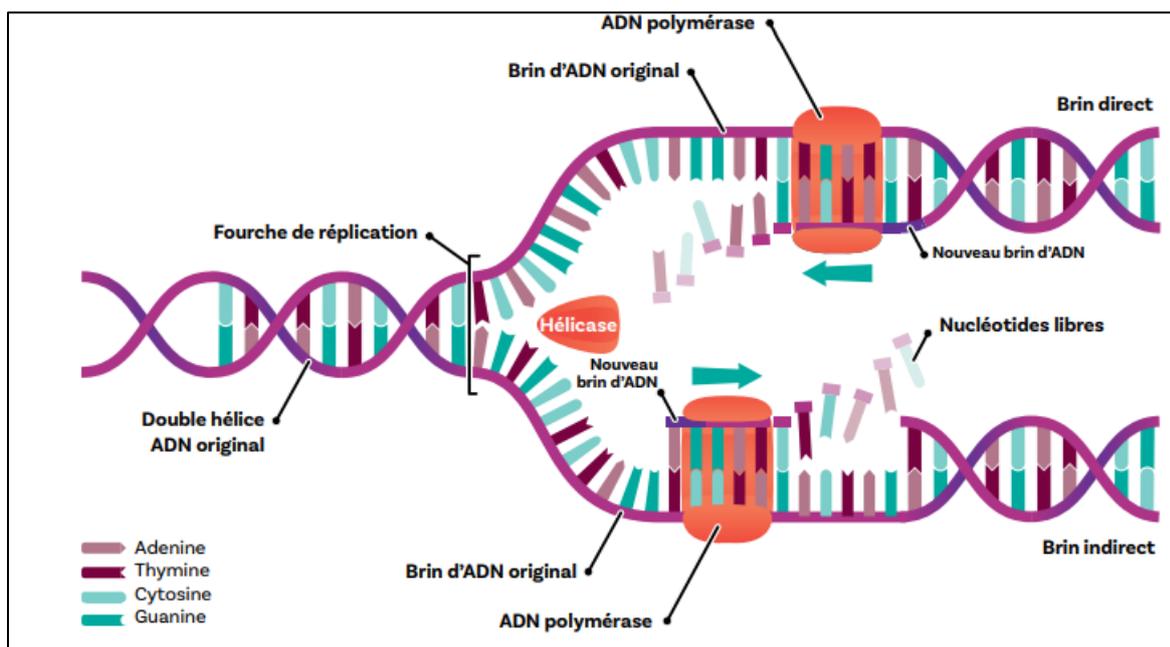


Figure 1 : le mécanisme de la réplication de l'ADN

3.5. Orientation :

La synthèse de l'ADN s'effectue toujours dans le sens 5'→ 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'→ 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'→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'→3' en continu alors que le deuxième brin est synthétisé toujours dans le sens 5'→3' mais en discontinu (en petits morceaux). 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).

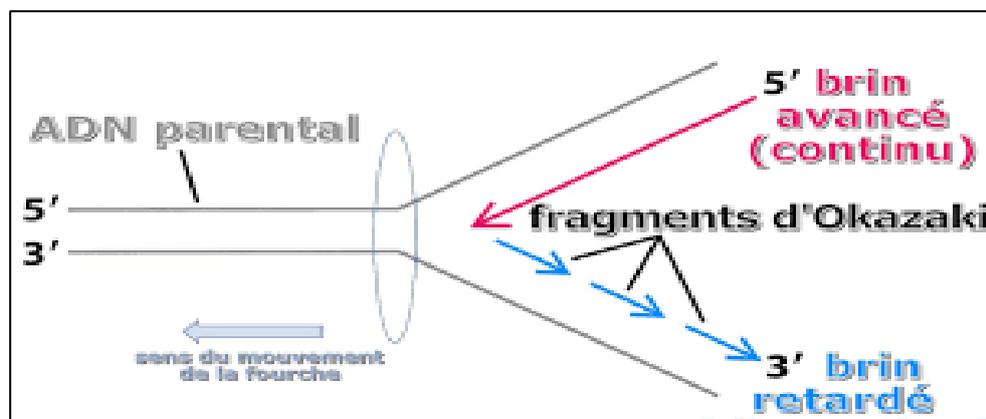


Figure 2 : La réplication est discontinue pour l'un des deux brins

3.6. Réplication chez les procaryotes

L'ADN procaryote est circulaire et présente une seule origine de réplication. 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 superenroulement 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.

3.7. Réplication chez les eucaryotes :

-Chez les eucaryotes, la réplication est plus complexe. On compte environ 10^4 réplicons pour une cellule eucaryote.

-Chez les eucaryotes, la réplication a plusieurs points de départ et il y a simultanément 10 000 à 100 000 renflements signalant la fourche de séparation sur une cellule somatique humaine en cours de division, ce qui pose un problème majeur de synchronisation, cette synchronisation est assurée par les « **replication licensing factor** ».

Chez l'homme, la vitesse de la réplication est environ 40 à 50 nucléotides /seconde. La vitesse de la réplication est beaucoup plus lente chez eucaryotes par rapport aux procaryotes.

-Contrairement au chromosome bactérien circulaire, les chromosomes eucaryotes sont linéaires. Ils font face à un problème des extrémités ou télomères. Il s'agit de séquences répétées d'ADN liées à des protéines, problème résolu par une enzyme la télomérase qui permet un allongement des chromosomes.

4. Les mutations et les lésions de l'ADN

4.1. Mutation par substitution

Cela correspond à une mauvaise incorporation de nucléotide sur le brin fils. Une base est alors remplacée par une autre. On distingue deux types de mutation par substitution :

- **Substitution par transition** : base pyrimidique substituée par une base pyrimidique ou base purique substituée par une base purique.
- **Substitution par transversion** : base purique substituée par une base pyrimidique ou base pyrimidique substituée par une base purique

Chaque base de l'ADN peut exister sous différentes formes alternatives : les formes tautomères. La plus fréquente est la forme céto (présente à pH physiologique), mais les bases peuvent aussi adopter aussi une forme énol (C=O pour G et T) ou imino rare (N=H pour A et C), qui établissent des liaisons particulières en dehors de AT et GC, ce qui crée un mésappariement après deux réplifications :

- La forme imino de la cytosine réagit avec l'adénine
- La forme imino de l'adénine réagit avec la cytosine
- La forme énoï de la thymine réagit avec la guanine
- La forme énoï de la guanine réagit avec la thymine

Le nombre de liaisons hydrogène entre les mauvaises bases appariées est différent du nombre normal.

Conséquences : lors du processus de réplication, il y aura des mésappariements. On obtient donc deux patrimoines : un identique et un avec un mésappariement. Après deux cycles réplicatifs, l'ADN possède 25% de phénotype mutant. Les mauvais nucléotides ne sont pas détectés par la fonction de correction

4.2. Mutations par délétion

Il s'agit d'un oubli d'incorporation d'un nucléotide par l'ADN polymérase. Au bout de deux cycles successifs, une séquence est totalement différente par rapport aux séquences parentales (25% ADN mutant). Lorsque le brin fils va servir d'ADN matrice, cela entraîne un décalage du cadre de lecture, (perte de fragment plus au moins important pour l'ADN).

4.3. Mutations par insertion

Il s'agit d'une introduction d'un nucléotide en trop par l'ADN polymérase. Cela entraîne également un décalage de cadre de lecture

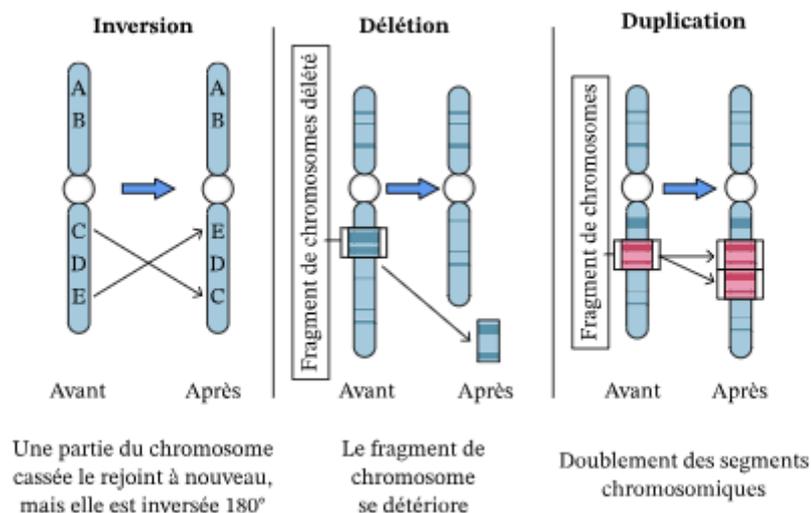


Figure 3 : Les trois types de mutation chromosomique : la duplication, la délétion et l'inversion chromosomiques.

5. Mécanisme de la réparation

5.1. Correction des erreurs d'appariement lors de la réplication

Les premières fonctions de correction sont celles qui s'exercent pendant la réplication :

- La fonction exonucléasique de l'ADN polymérase, en cas de reconnaissance d'un mésappariement.
- Le système MMR (MISMATCH REPAIR) : supprime les erreurs de réplication comme la substitution, glissement) ainsi que des protéines sont impliquées dans la correction par ce système (MutS, MutL, MutH, Helicase 2, exonucleases, SSB, ADN pol III, ADN ligase).

5.1.1. Correction immédiate : fonction d'édition de l'ADN polymérase

Elle corrige les mésappariements et diminue le taux d'erreurs de $2 \log(10^5 \text{ à } 10^7)$.

5.1.2. Système de réparation guidée par les CH₃ : SYSTEME MMR

Le système MMR (**Methyl Mismatch Repair**) est un système de réparation permettant la correction d'un mésappariement oublié par la fonction d'édition. Grâce à ce système, on aboutit à un taux d'erreur de 1 pour 10⁹ bases.

Lorsque le système détecte un mésappariement, il détecte aussi le brin qui doit être corrigé. Pour pouvoir savoir quel est le brin avec le mésappariement, il se base sur le temps où il n'y a pas encore eu de méthylation du brin fils. Le nucléotide du mésappariement du brin non méthylé est celui qui doit être corrigé.

Ce système existe aussi bien chez les cellules eucaryotes et que chez les cellules procaryotes.

- Chez les procaryotes, le système de réparation repère la méthylation des adénines des séquences GATC et fait intervenir les enzymes MUT.
- Chez les eucaryotes, le système repère la méthylation des cytosines des séquences CG et fait intervenir les enzymes hMSH, hMLH, hPMS.

A. Chez E. Coli

Le système enzymatique de réparation est multi-protéique. Il est capable de reconnaître un mésappariement et une séquence GATC située dans l'environnement du mésappariement (jusqu'à 1000 pb), afin de vérifier le brin méthylé.

Ce complexe multi-enzymatique est codé par les gènes MUT et constitué des enzymes MUT. Il peut se positionner sur le mésappariement et détecter le brin méthylé. Il a une activité endonucléasique : il peut cliver les liaisons phosphodiester à l'intérieur d'une chaîne. Ce

complexe excise le fragment d'ADN simple brin qui contient le mésappariement (donc sur le brin non méthylé). Cela entraîne la formation d'une lacune qui doit être comblée.

L'ADN POL III se positionne alors en 3'OH et synthétise l'ADN complémentaire et antiparallèle. La dernière liaison phosphodiester est effectuée par l'ADN ligase. Ce système doit agir dans le laps de temps où la méthylation du brin fils n'est pas encore effectuée. Une fois ce laps de temps écoulé, les ADN méthylase rentrent en jeu et méthylent en miroir le brin fils. Le complexe ne peut alors plus reconnaître le brin fils.

B. Chez l'homme

Le complexe multienzymatique aux mêmes fonctions Le complexe multienzymatique a les mêmes fonctions, mais il est basé sur les méthylations des cytosines des séquences répétées GC. Les enzymes qui interviennent ne sont pas les enzymes MUT mais les enzymes hMSH, hMLH et hPMS (h pour humain).

Pathologie : Dans certaines formes familiales **du cancer du colon**, comme le syndrome du **cancer colique** familial (ou HNPCC ou syndrome de Lynch), il y a une inactivation ou altération de ce système au niveau génique. Dans ces cancers héréditaires du colon, il y a une **mutation constitutionnelle au niveau des gènes MSH1 et 2**. C'est un syndrome à transmission autosomique dominant, qui aboutit à un défaut de réparation de l'ADN. Cela représente environ 4% des cancers colorectaux diagnostiqués.

5.1.3. Réparation par excision-réparation (BER ou NER)

C'est un mécanisme de réparation simple brin. On peut distinguer deux types de mécanismes (NER ou BER) en fonction de l'excision de la partie altérée.

Ce mécanisme agit sur les lésions présentes sur un seul brin. C'est un mécanisme multi-étapes

1- Reconnaissance de la lésion

2- Excision de la partie altérée : soit sur une base (BER) soit sur plusieurs nucléotides (NER).

3- Réparation par réplication pour combler la lacune (ADN POL et ligase).

5.1.3.1. Réparation par excision-réparation de base (BER)

L'excision-réparation de bases (BER), est aussi appelé mécanisme de correction courte. Ce système de réparation est capable de réparer par exemple les désaminations, **les dépurinations** ou **les dépyrimidations** spontanées. Cette réparation aboutit à la réparation d'**un site AP** (dans le cas des désaminations spontanées, il y a au préalable création du site AP).

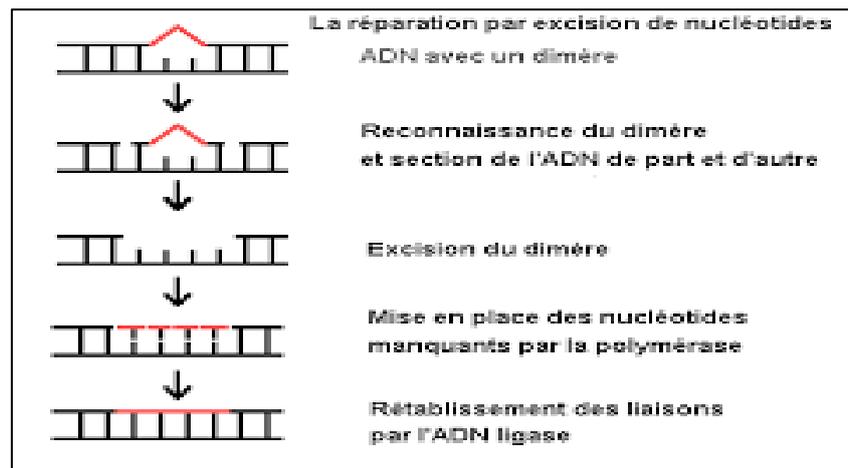


Figure 4 : Le mécanisme de réparation

- Dans une première étape, une DNA glycosylase spécifique reconnaît la base modifiée et coupe la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site **apurinique** ou **apyrimidique (AP)** dans la molécule d'ADN.
- Le site AP est ensuite clivé par l'**apurinique endonucléase 1** puis le nucléotide correct est inséré grâce aux actions successives d'une ADN polymérase et d'une ligase.

Le système NER a pour fonction de réparer des lésions étendues de l'ADN (suite à des radiations par exemple). Ce système fonctionne en trois étapes : la reconnaissance de la région lésée, l'excision des nucléotides lésés et la synthèse du nouveau brin d'ADN. Le système NER comprend deux voies, l'une spécifique des régions non codantes de l'ADN (Global Genome NER) et l'une spécifique des régions transcrites (transcription coupled-NER)

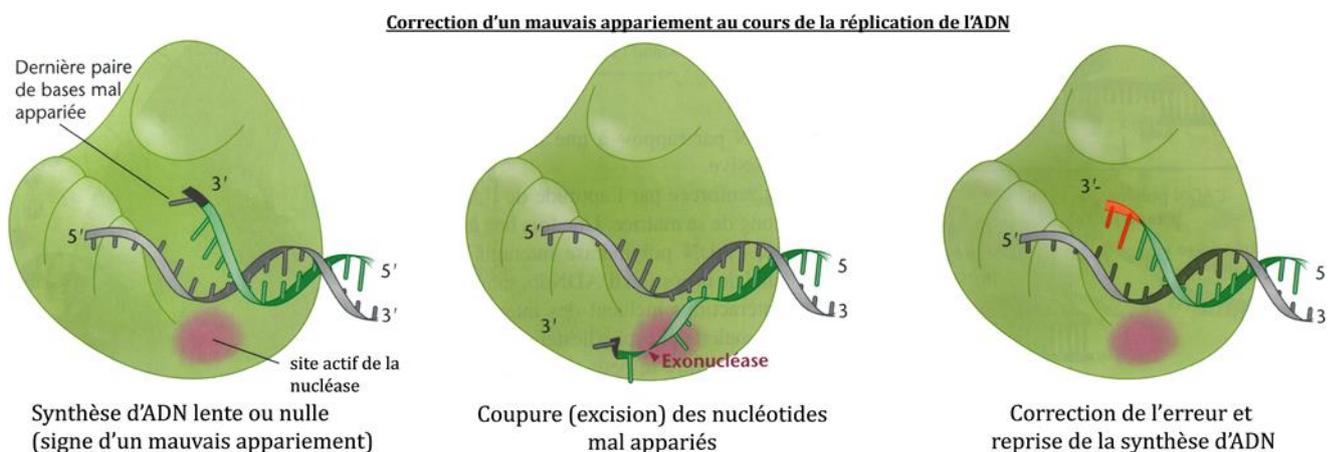


Figure 5 : Correction d'un mauvais appariement au cours de la réplication de l'ADN

5.1.4. 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-répllicative. Elle se rencontre aussi en dehors de la réplication, après dommages induits par des radiations ionisantes ou des agents oxydants.

5.1.5. La liaison non homologue des extrémités

L'existence d'une brèche sur les deux brins peut être réparée à **minima** par simple ligation (l'union covalente de deux molécules) 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 minimale. En effet, un faible pourcentage du génome porte les informations quantitatives et qualitatives de l'expression des protéines

5.1.6. 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* (*récupération totale*) 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 réplication 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-répllicative 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 2ème 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). 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.

5.1.7. 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.

6. 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.

6.1. 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.

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.