

LA RÉPLICATION DE L'ADN

I. GÉNÉRALITES.

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. Cette copie de l'ADN est indispensable à réaliser *avant la mitose* (ou division cellulaire) on parle de *réplication de l'ADN*. Préalablement à toute division cellulaire, la quantité d'ADN est multipliée par deux. Les mécanismes de réplication conditionnent donc le déroulement de la division cellulaire.

II. LA RÉPLICATION DE L'ADN CHEZ LES PROCARYOTES.

II.1. Les caractéristiques générales.

La réplication est tout d'abord dite *semi-conservatrice* (Meselson et Stahl, 1958). Ceci signifie que sur les deux brins d'ADN, on a toujours un brin d'ADN qui provient d'un des deux brins de l'ADN parental et un brin nouvellement formé. A chaque réplication, les deux brins d'ADN parental se séparent, chacun de ces deux brins sert de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire.

II.2. Les éléments nécessaires à la réplication de l'ADN.

La réplication de l'ADN nécessite (Kornberg, 1957):

- Tout d'abord, une matrice d'ADN constituée par un brin parental.
- La présence de nucléotides propres à l'ADN, c'est-à-dire contenant du 2'-désoxyribose, des bases A, T, G et C et sous forme de nucléosides triphosphates: dATP, dTTP, dCTP et dGTP (on écrit souvent pour les dénommer dNTP).
- La présence de nombreux enzymes que nous verrons plus loin.
- La présence de certains ions (cations bivalents: Mg^{2+} , ce cation est indispensable pour la réplication de l'ADN).

II.3. Les mécanismes de l'initiation de la réplication.

II.3.1. Notion de réplicon.

L'unité d'ADN où se produit la réplication est appelée *le réplicon*. Ce réplicon a une origine où est initiée la réplication et une terminaison où est arrêtée la réplication. L'ADN bactérien constitue à lui seul un réplicon. A partir d'un point d'initiation, la

réplication peut progresser soit de manière unidirectionnelle, soit de manière bidirectionnelle. Chez les procaryotes, à partir d'une origine de la réplication (ou oeil de réplication), la réplication progresse dans les deux sens. On compare souvent cette progression de la réplication dans le sens bidirectionnel à un oeil qui s'agrandit jusqu'à que la réplication s'achève.

II.3.2. Initiation de la réplication.

Chez *E. coli*, il existe au niveau de l'ADN bicaténaire une origine unique de la réplication appelée OriC. Le locus OriC est constitué d'une séquence de 245 paires de bases. Cette séquence contient *en tandem*

- *trois séquences nucléotidiques presque identiques constituées de 13 nucléotides* chacune (séquences de type GATCTNTTNTTTT).

- *quatre sites de liaison comportant un motif de 9 paires de bases (DNA-boxes)* pour une protéine appelée *dnaA* ou *protéine d'initiation de la réplication*, codée par le gène *dnaA*.

Ces séquences sont appelées 9mères et 13mères.

Des copies multiples de la protéine *dnaA* vont s'associer avec l'ADN à l'origine de la première étape de la réplication, qui est l'ouverture de l'hélice. Plusieurs sous-unités de *DnaA* se lient aux 9mères. *Cette étape est indispensable à la transformation localisée de l'ADN double brin en ADN simple brin.*

Cette étape facilite la liaison des protéines *DnaB* et *DnaC* qui ouvrent et déstabilisent l'hélice. *L'ADN hélicase* (ou protéine *dnaB*, ou hélicase réplivative) est codée par le gène *dnaB*. La protéine appelée *dnaC* est indispensable à cette étape, elle sera ensuite relâchée.

L'hélicase réplivative est chargée sur l'un des deux brins (qui deviendra le brin lagging). Elle forme un hexasomère en forme d'anneau constitué de 6 sous-unités identiques possédant chacune un site de liaison à l'ATP. L'ADN hélicase va catalyser le déroulement de la double hélice d'ADN en présence d'ATP, ce qui définira la future fourche de réplication. Elle s'assemble à un simple brin et se déplace de 5' vers 3' ouvrant un ADN double brin à la vitesse de 35 nucléotides/s. L'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP permet de rompre les liaisons H entre les bases.

Les brins séparés de l'ADN sont stabilisés sous forme simple brin grâce à la fixation de protéines appelées *SSB* (pour « *single strand binding* »). Ces protéines *SSB* empêchent les deux brins d'ADN de se réapparier.

Puis, il se formera rapidement un complexe appelé *primosome* entre l'hélicase et une enzyme appelée *primase* (ou protéine *dnaG*) qui synthétise une amorce d'ARN (une

amorce d'ARN est synthétisée tous les 1 à 3 kb, permettant la réinitiation sur le brin lagging). Après synthèse de l'amorce d'ARN (9-12 nucléotides), l'ADN polymérase III s'insère au niveau de la fourche de réplication, elle utilise l'amorce d'ARN pour commencer la synthèse de l'ADN. L'ADN polymérase III possède deux sites actifs qui seront capables de synthétiser les nouveaux brins d'ADN au niveau de la fourche de réplication. Le complexe de protéines qui se déplace le long de l'ADN pour catalyser la réplication est appelé *réplisome*.

II.4. La discontinuité de la réplication entre les deux brins d'ADN.

La réplication n'est pas identique entre les deux brins d'ADN. En effet, sur l'un des brins la réplication s'effectue de manière continue, on parle de *brin avancé*, alors que sur l'autre brin elle s'effectue de manière discontinue, on parle de *brin retardé*.

Sur le brin avancé, la progression de la réplication se fait dans le sens 5'→3' en utilisant comme modèle le brin d'ADN orienté dans le sens 5'→3'. Sur le brin retardé, des petits fragments d'ADN sont synthétisés, encore appelés fragments d'OKAZAKI. Chaque fragment est synthétisé dans le sens 5'→3', le brin modèle correspondant de l'ADN est orienté de manière anti-parallèle 3'→5'. On voit donc que l'allongement discontinu de ce brin retardé se fait dans le sens de la propagation de la réplication.

Il est important de comprendre que le brin qui sert de matrice de lecture pour la constitution du brin retardé doit former une boucle autour d'un des deux sites actifs de l'ADN polymérase III. Dans ces conditions, l'intervention de la primase et de l'ADN polymérase III permet la synthèse d'un brin nouveau d'ADN dans le sens 5'→3' par copie au niveau de cette boucle. Après la synthèse d'ADN sur le brin retardé, la boucle est défaite et une nouvelle est reformée au niveau de l'ouverture de la fourche de réplication. Finalement, des fragments d'ADN sont ainsi synthétisés sur le brin retardé; de manière discontinue.

Pour donner une idée plus concrète sur la réplication, les fragments d'Okazaki ont chez *E. coli* une longueur moyenne de une à deux kb. La fourche de réplication se déplace à une vitesse estimée à environ 1000 nucléotides par seconde à 37 degrés.

II.5. L'intervention de l'ADN-polymérase III.

L'ADN polymérase III synthétise un brin complémentaire à partir de l'extrémité 3'-OH libre de l'amorce d'ARN en utilisant l'ADN comme matrice (sens 5'→3'). L'holoenzyme d'ADN polymérase III comporte 10 polypeptides (2X5 sous unités protéiques). La

même enzyme synthétise le brin avancé et les fragments discontinus sur le brin retardé.

Ce complexe est organisé en trois modules fonctionnels comprenant :

- ✓ Le core enzyme :
 - o sous-unité α fait 130 000 Da (activité polymérase),
 - o sous-unité ϵ (activité exonucléase 3'-5')
 - o sous-unité θ (fonction inconnue)
- ✓ le complexe γ groupe 5 sous-unités (voir tableau ci-dessous). Ce complexe est impliqué dans la liaison de l'enzyme à sa matrice au niveau de la fourche de réplication.
- ✓ La sous-unité β sert de « collier de serrage » (clamp en anglais) et empêche que le cœur de l'enzyme ne se détache de la matrice lors de la réplication

Sous-unité	gène	Masse (kDa)	Fonction	Sous-assemblages			
α	<i>dnaE</i>	129,9	DNA polymérase	Pol III core	Pol III'	Pol III*	Pol III Holoenzyme
ϵ	<i>dnaQ/mutD</i>	27,5	Proofreading (3'→5' exo.)				
θ	<i>holE</i>	8,6	Fonction inconnue				
τ	<i>dnaX</i>	71,1	Rôle structural + nombreux rôles	γ -complexe			
γ	<i>dnaX</i>	47,5	Liaison ATP : moteur				
δ	<i>holA</i>	38,7	Clé (ouvrant β)				
δ'	<i>holB</i>	36,9	Stator				
χ	<i>holC</i>	16,6	Liaison à SSB				
ψ	<i>holD</i>	15,2	Lien entre χ et γ				
β	<i>dnaN</i>	40,6	Anneau de processivité				

Tableau 1 : Sous-unités et sous-assemblages de l'ADN Polymérase III (d'après Kelman and O'Donnell, 1995).

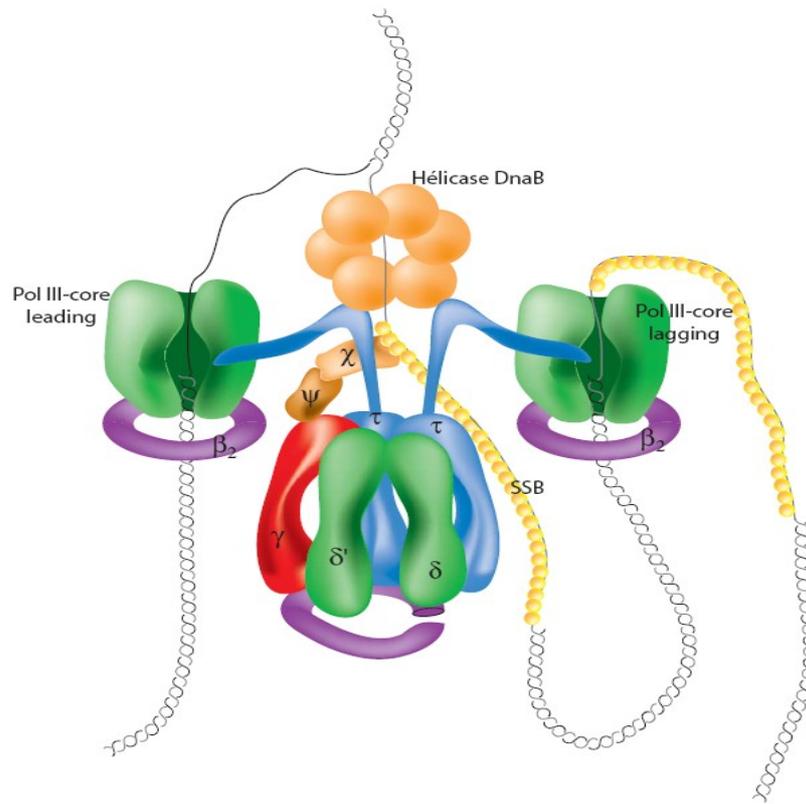


Figure 13 : Schéma récapitulatif des constituants de l'holoenzyme (inspiré de Leu et al., 2003).

Ce schéma rend compte de l'organisation structurale de l'holoenzyme.

II.6. Nécessité d'amorces d'ARN.

La copie du brin d'ADN parental nécessite l'intervention d'une amorce d'ARN synthétisée grâce à une *ARN polymérase* ou *primase*. Cette enzyme synthétise une amorce de 9 à 12 nucléotides. Puis, l'ADN polymérase III allonge cette amorce d'ARN mais pour synthétiser le brin complémentaire d'ADN. Cette complication apparente est liée au fait que les ADN polymérases sont incapables de commencer la synthèse d'une chaîne d'ADN sans amorce par contre, elles sont tout à fait capables allonger une chaîne de nucléotides.

II.7. Hydrolyse et remplacement des amorces d'ARN, intervention de l'ADN polymérase I.

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 par l'enzyme RNase H 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*.

Il faut remarquer que l'ADN polymérase I peut hydrolyser les amorces d'ARN à la place de l'enzyme RNase H.

II.8. Remarques générales sur les fonctions des ADN polymérases I et III.

Les ADN polymérases I et III impliquées dans la réplication de l'ADN présentent *plusieurs fonctions enzymatiques*:

- Tout d'abord *une fonction polymérasique* qui permet la constitution de la chaîne polynucléotidique, l'enzyme ajoute un nucléotide à l'extrémité 3' OH d'un acide nucléique.

- *Une fonction exonucléasique 5' → 3'* (activité de réparation de l'ADN).

- *Une fonction exonucléasique 3' → 5'*. Cette dernière fonction est très intéressante. En effet, l'enzyme est capable de vérifier le dernier nucléotide mis en place. En présence d'un défaut d'appariement, elle enlève ce dernier nucléotide (propriété exonucléasique 3' → 5') et insère le nucléotide correct (propriétés polymérasiques). Ce mécanisme capital est appelé *fonction d'édition des ADN polymérases* et permet donc la correction d'erreurs au cours de la réplication.

PROPRIETES DES ADN POLYMERASES I , II, ET III BACTERIENNES

Propriétés	I	II	III
Initiation de la synthèse	—	—	—
Polymérisation 5'-3'	+	+	+
Activité exonucléasique 3'-5'	+	+	+
Activité exonucléasique 5'-3'	+	—	—
Nombre de copies par cellule	400	?	15

II.9. Terminaison de la réplication.

Il existe plusieurs sites de terminaison dans le génome bactérien (au moins 6 sites de terminaison ou sites ter). Une protéine spécifique appelée Tus peut se lier aux sites de terminaison. Cette liaison arrête la protéine dnaB (hélicase). Les sites de

III.2. Caractéristiques particulières.

La réplication se fait en de nombreux points d'initiation. Elle fait intervenir un nombre d'ADN polymérases plus important que chez les procaryotes. De nombreuses protéines interviennent comme facteurs de réplication. On connaît mal les changements subis par les nucléosomes au cours de la réplication de l'ADN eucaryote. Enfin, la réplication de l'ADN des extrémités chromosomiques (ou télomères) commence à être connue de manière plus approfondie.

III.3. Quelques caractéristiques des ADN polymérases des eucaryotes.

On connaît au moins 6 ADN polymérases chez les eucaryotes.

- La polymérase alpha/primase. Cette polymérase est impliquée dans l'initiation de la réplication ("priming").
- La polymérase bêta. Elle semble impliquée dans la réparation de l'ADN.
- La polymérase delta. Enzyme principale de la réplication, prend le relais de la polymérase alpha
- La polymérase gamma. Cette polymérase est à localisation mitochondriale, bien que codée par un gène du noyau cellulaire
- La polymérase epsilon.
- La polymérase zeta. Elle semble impliquée dans la réparation de l'ADN.

La polymérase alpha/primase synthétise les amorces d'ARN. Une protéine appelée PCNA ("proliferating cell nuclear antigen") intervient.

L'ADN simple brin au cours de la réplication est stabilisé par des protéines correspondant aux protéines SSB du colibacille.

Les amorces d'ARN sont détruites par la RNase H. Les lacunes formées sont comblées par les polymérases bêta ou alpha.

PROPRIETES DES ADN POLYMERASES EUCARYOTES

	Polymérase α	Polymérase β	Polymérase δ	Polymérase ϵ	Polymérase γ	Polymérase ζ
Localisation	Noyau	Noyau	Noyau	Noyau	Mitochondries	Noyau
Activité exonucléase 3'-5'	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Essentielle à la réplication nucléaire ?	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non

IV. LES TÉLOMÈRES.

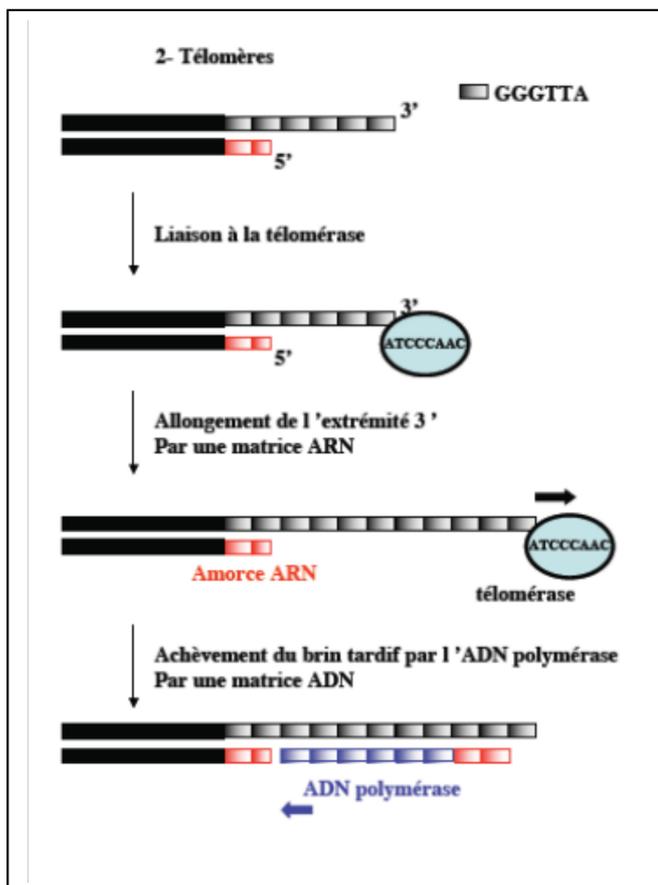
IV.1. Définition.

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes eucaryotes. Ils sont formés par des séquences répétitives d'ADN. A l'extrémité 3' des chromosomes, on retrouve des copies répétées de séquences de type TTGGGG (retrouvées chez un protozoaire cilié: *Tétrahymena*) ou TTAGGG (retrouvées chez l'Homme). A l'extrémité 5', on a les séquences complémentaires riches en cytosine.

Le problème majeur lors de la réplication de l'ADN est l'élimination potentielle de l'amorce d'ARN la plus externe ce qui pourrait entraîner un raccourcissement de l'ADN à chaque cycle de réplication. La protection des extrémités des chromosomes des eucaryotes est assurée par une enzyme spécifique: *la télomérase*.

IV.2. L'intervention d'une enzyme spécifique: la télomérase.

La réplication de l'ADN à l'extrémité des chromosomes eucaryotes fait donc intervenir une enzyme particulière appelée *télomérase*. Cette enzyme ajoute des séquences spécifiques en 3' d'un brin d'ADN.



La télomérase va se positionner à l'extrémité 3' du brin d'ADN.

La télomérase possède une matrice qui lui est propre et qui est *une matrice d'ARN*, elle va se fixer à l'extrémité 3': Il y a synthèse d'ADN face à la matrice d'ARN

Puis, *une translocation* conduit à un mouvement de la télomérase:

Une répétition de motifs: TTGGGG est synthétisée. Elle constitue *le télomère*. Pour synthétiser le brin télomère complémentaire riche en C, une primase interviendrait avec synthèse d'une amorce d'ARN par copie de l'extrémité 3'.

Puis l'ADN polymérase allongerait la chaîne à partir de l'amorce d'ARN. Finalement, une ligase assurerait la soudure finale.

Après hydrolyse de l'amorce d'ARN, les télomères riches en C sont légèrement plus courts que les télomères riches en G:

La synthèse du brin retardé du DNA ne peut pas se faire lorsque la DNA polymérase atteint l'extrémité 3' du brin modèle, faute de place pour une amorce complémentaire. S'il n'y avait pas de mécanisme particulier, à chaque réplication le DNA du chromosome serait raccourci.

Le télomère ou séquence du DNA à l'extrémité des chromosomes humains est une séquence 5'-TTAGGG-3' répétée quelques centaines de fois avant le 3'OH final.

La télomérase est une DNA polymérase qui peut continuer la synthèse d'un DNA simple brin. Cette enzyme comprend un RNA de 450 nucléotides dont l'extrémité 5' terminale est 5'-CUAACCCUAAC... Cette extrémité sert de modèle pour l'enzyme en vue de la synthèse de quelques unités de la répétition TTAGGG. Après cette synthèse l'enzyme glisse le long du brin de DNA et recommence de nouvelles unités.

L'extrémité 3' du brin modèle ainsi allongée peut servir à la pose d'une amorce nouvelle : l'extrémité 3'-OH de cette amorce sert alors de point de départ pour la DNA polymérase δ pour synthétiser l'autre brin.