

Réplication de l'ADN

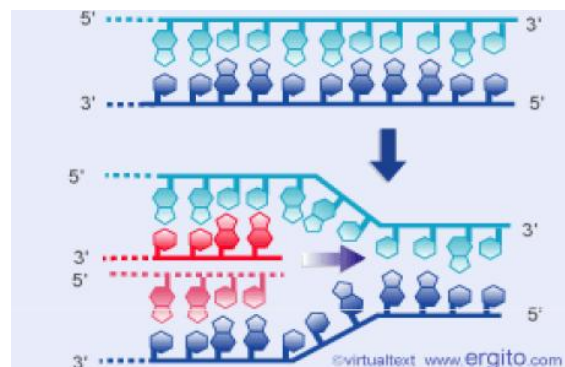
Généralités

Premières notions

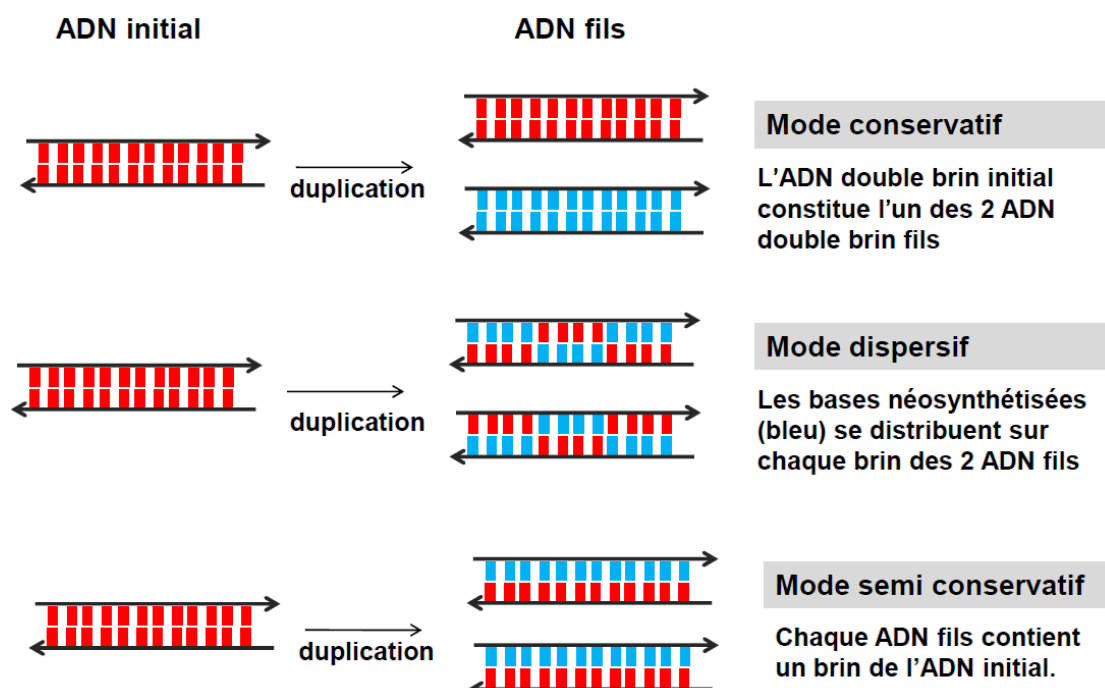
La réplication

C'est l'opération qui va permettre de perpétuer la molécule d'ADN, support de l'information génétique.

C'est une opération **très complexe** qui est intimement liée à la **réparation de l'ADN** afin de conserver le plus possible l'intégrité de cette immense molécule.



Mode semi conservatif de la réplication



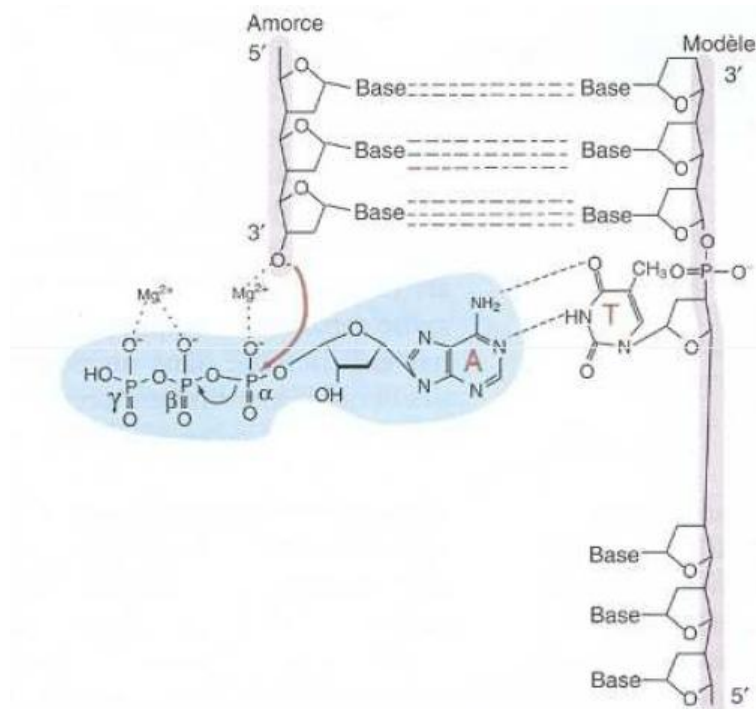
Modèle de croissance des brins

Polymérisation des nucléotides : **ADN-polymérase**

La croissance des brins se fait toujours dans le sens 5' vers 3'

Importance du Mg dans le positionnement des nucléotides à incorporer :

- Un 1^{er} Mg : augmentation de la nucléophilie de l'O en 3'
- Un 2^{ème} Mg : lié aux 2 O du pyrophosphate (PP), aide au départ du PP qui est clivé ensuite par une pyrophosphatase



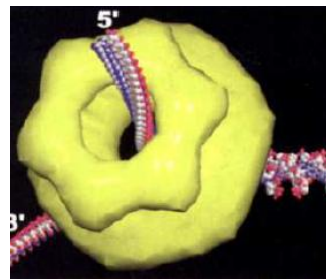
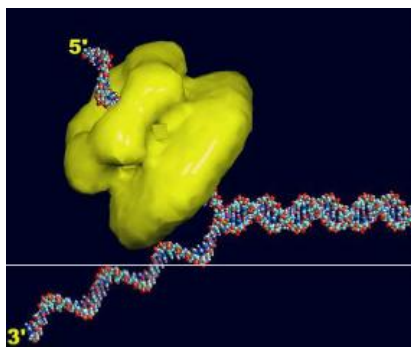
Les acteurs de la réplication

Hélicase

Nécessité de séparer les brins d'ADN afin que chacun d'eux puisse servir de matrice pour la synthèse des brins fils.

C'est une protéine hexamérique qui entoure l'un des brins d'ADN. Elle progresse le long du brin de 5' vers 3' et sépare l'autre brin par un mécanisme complexe. Cette action nécessite de l'ATP.

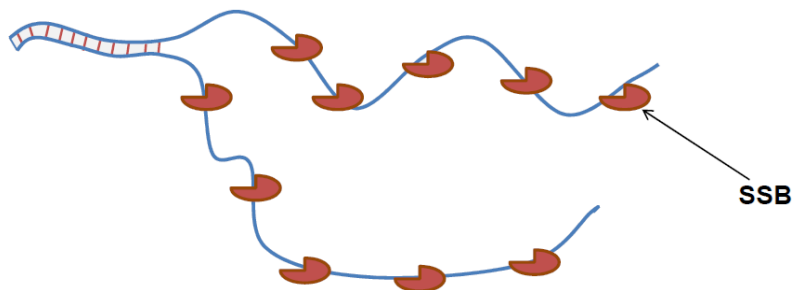
Elle transforme l'énergie de l'ATP en travail mécanique (mécano-enzyme).



Protéines auxiliaires SSB

Une fois séparés, nécessité de stabiliser les simples brins afin qu'ils ne se réassocient pas et ne forment pas de structures en épingle à cheveux.

C'est le rôle des protéines SSB qui s'associent aux simples brins.

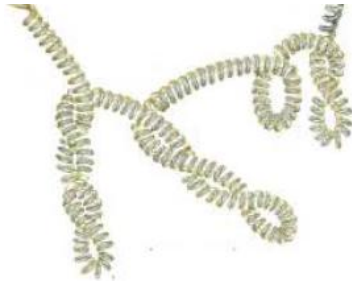


Le vrillage de l'ADN

L'ADN se comporte comme une ficelle qui possède déjà un certain vrillage.



On peut augmenter ou diminuer le vrillage, par exemple en tournant dans un sens ou dans l'autre. Cela provoque l'apparition de super-enroulements.



Les topoisomérases



L'ADN peut former des nœuds et des entrelacements.

Tout comme pour une ficelle, la séparation rapide des brins provoque des entortillements en aval du point de séparation.

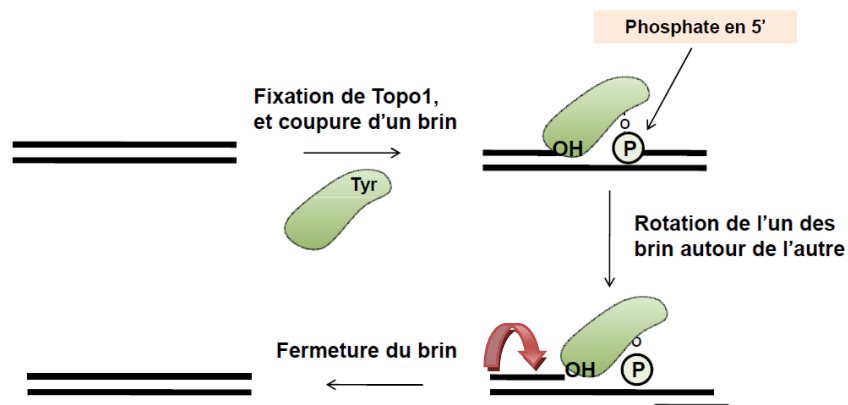


Les topoisomérases sont les enzymes capables de résoudre ces problèmes de topologie de l'ADN (vitaux pour la cellule).

Des inhibiteurs de topoisomérases peuvent être utilisés en chimiothérapie.

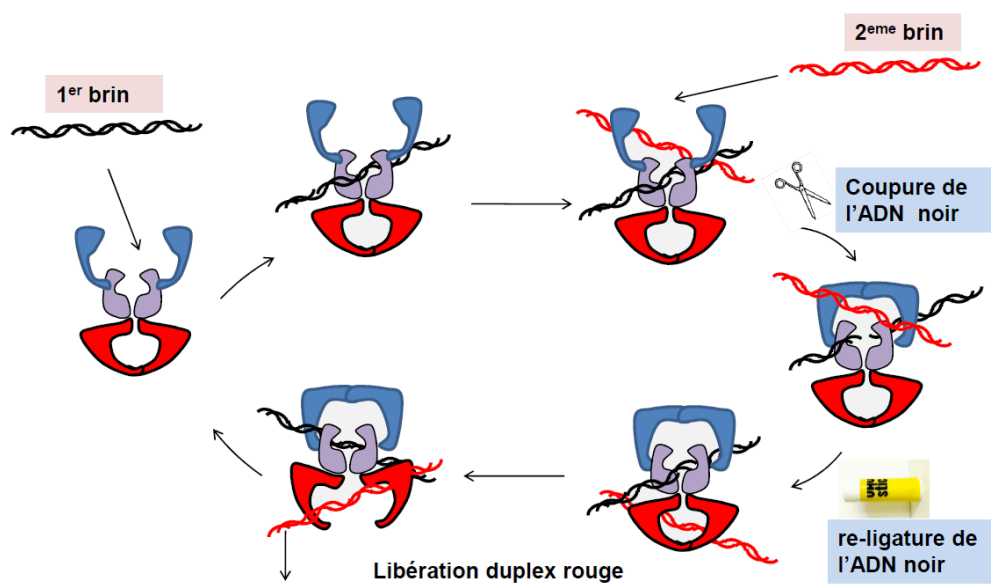
- **Topoisomérase de type I**

Incision de l'un des brins dont la moitié tourne autour de l'autre brin.



- **Topoisomérase de type II**

Les deux brins d'un duplex (noir) sont transitoirement coupés pour permettre le passage d'un autre duplex (rouge) (pouvant être une autre partie de la même molécule d'ADN).

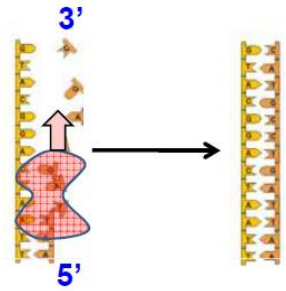


Les ADN polymérases

Elles peuvent polymériser de l'ADN

⇒ **Activité polymérase**

Cette activité va toujours dans le sens 5' vers 3' (du brin néoformé).

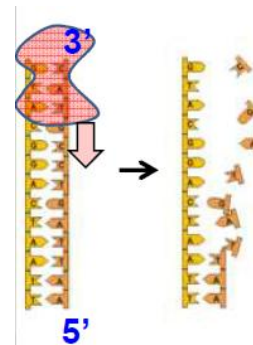
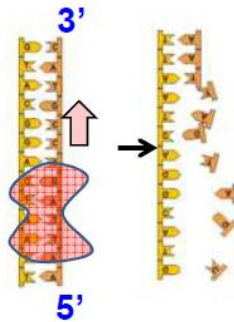


Elles peuvent « grignoter » un brin

⇒ **Activité exonucléase**

Suivant les polymérases, l'activité exonucléase peut « grignoter » un brin dans le sens (pour ce brin) :

- **5' vers 3'** : même sens de polymérisation, la polymérase avance
- **3' vers 5'** : sens inverse de polymérisation, la polymérase recule



Les principales polymérases procaryotes

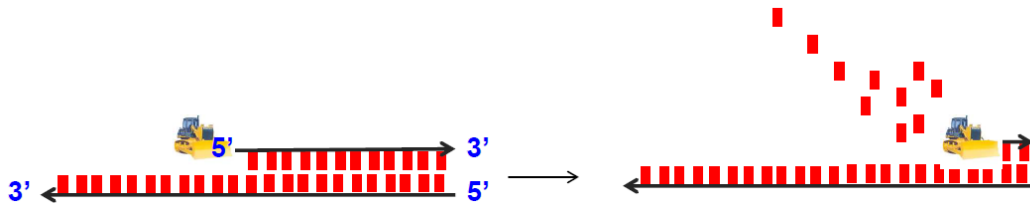
Polymérases	Activité Exo 3' vers 5' (Edition)	Activité Exo 5' vers 3'	Polymérase 5' vers 3'
I	Oui	Oui	Oui
II	Oui	Non	Oui
III	Oui	Non	Oui

Les ADN polymérases ne peuvent s'accrocher que sur un double brin.

L'activité exonucléase de 3' vers 5' (**recul**) correspond à une activité de correction (**Edition**) en cas d'incorporation d'un mauvais nucléotide.

L'ADN-polymérase I procaryote : enzyme simple un peu lente, mais qui dégage ce qui se trouve devant elle.

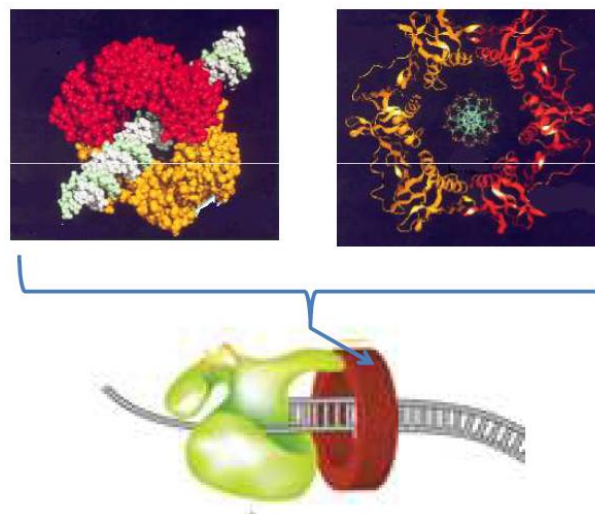
⇒ **Activité exonucléase 5' vers 3'** (dans le sens de la marche)



L'ADN polymérase III procaryote : enzyme complexe, beaucoup de sous-unités mais très rapide. Elle possède un collier (**clamp**) formé de 2 sous unités (rouge et jaune) qui encercle l'ADN (tore marron).

Ce collier aide la polymérase à ne pas se décrocher trop souvent même à pleine vitesse (notion de processivité).

Un analogue de ce collier existe aussi chez les eucaryotes (PCNA).



Les principales polymérases eucaryotes

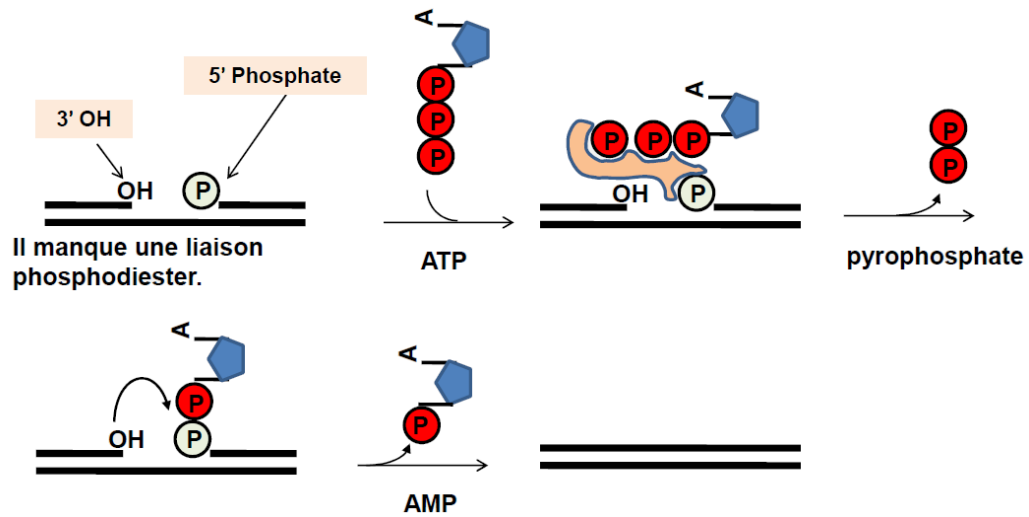
Polymérases	Activité Exo 3' vers 5' Edition	Activité Exo 5' vers 3'	Polymérase 5' vers 3'
Alpha (α)	non	non	oui
Béta (β)	non	non	oui
Gamma (γ)	oui	non	oui
Delta (δ)	oui	non	oui
Epsilon (ϵ)	oui	non	oui

(A bien connaître : polymérases α , δ et ϵ)

Les ligases

Activité de « soudure » des brins.

Un ATP est hydrolysé, un pyrophosphate est relâché, la liaison phosphodiester est reformée.

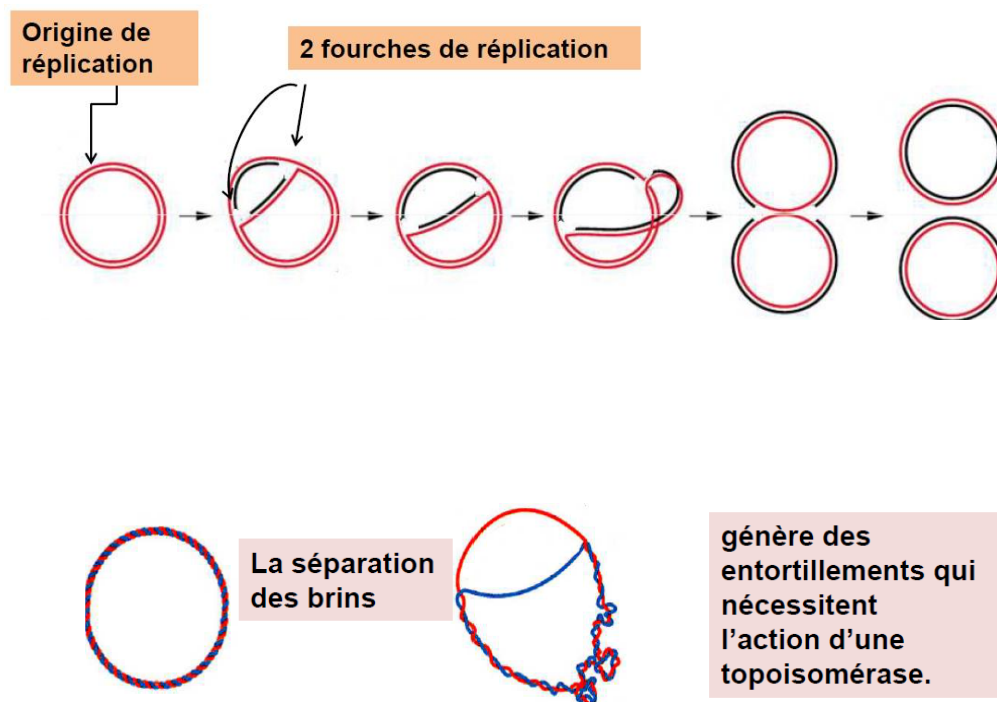


La réplication chez les procaryotes

Origine de réplication

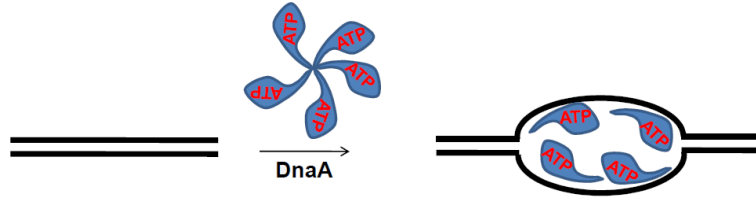
Réplication d'un ADN circulaire à partir d'une seule origine de réplication (ex Coli).

Une seule origine de réplication génère deux fourches qui progressent en sens inverse et se rejoignent à la fin de la réplication.



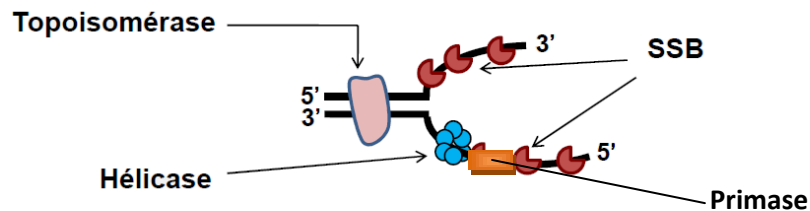
Initiation de la réplication

Plusieurs protéines DnaA liées à de l'ATP reconnaissent la séquence Ori (origine de réplication). Un œil de réplication se forme sur environ 13 nucléotides, l'ATP sera hydrolysé dans une étape ultérieure.

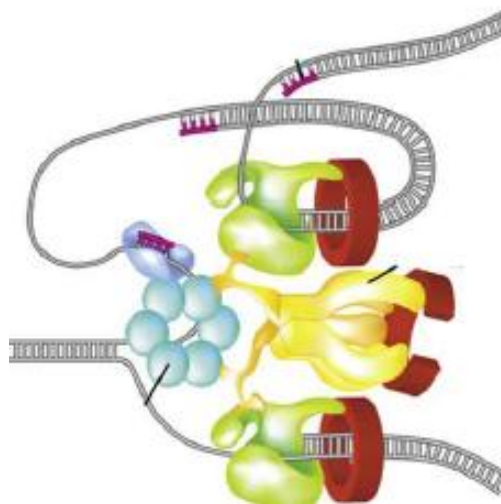


Les protéines liant les simples brins (SSB) et l'hélicase sont recrutées. Une primase se fixe sur le brin retardé pour former une amorce d'ARN.

⇒ **Formation du primosome**

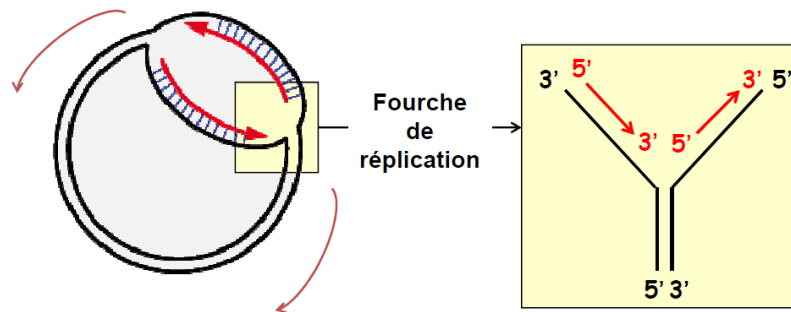


Le **réplisome** se forme (structure complexe voir après) au niveau de la fourche et va assurer la réplication coordonnée des deux brins.

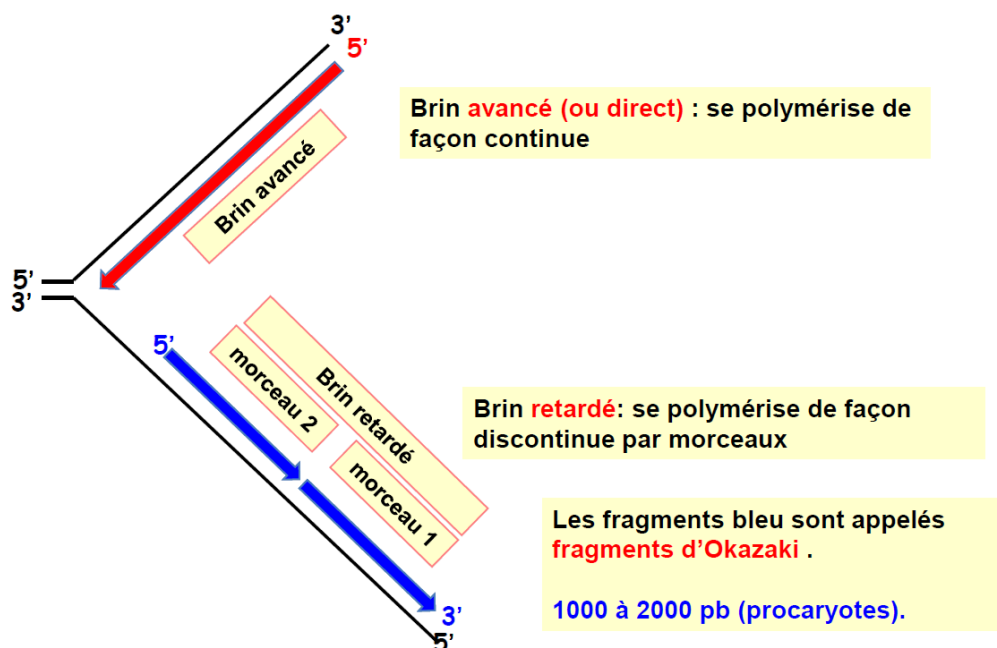
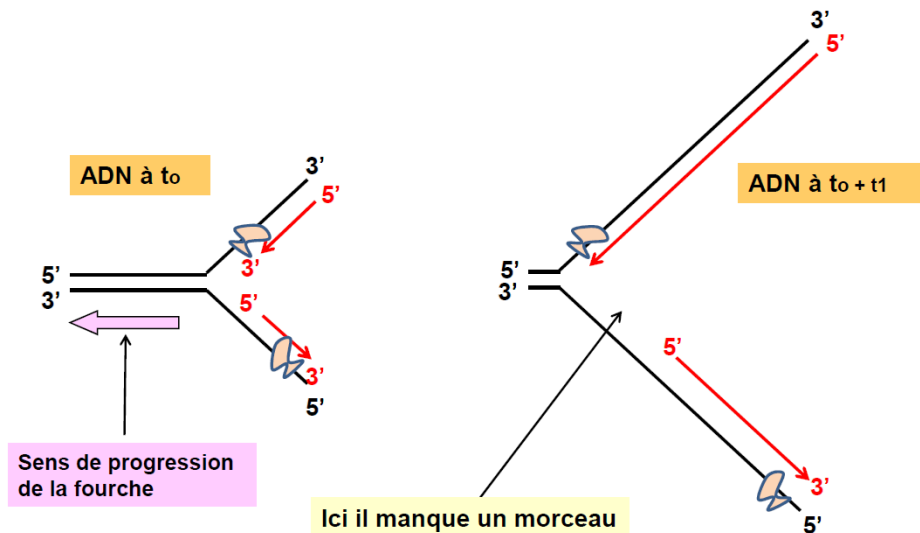


La fourche de réplication

Vitesse de polymérisation (procaryote) = **environ 500 nucléotide/seconde**.



Nécessité d'un brin qui se forme de façon continue et d'un brin qui se forme par fragments (de façon discontinue).



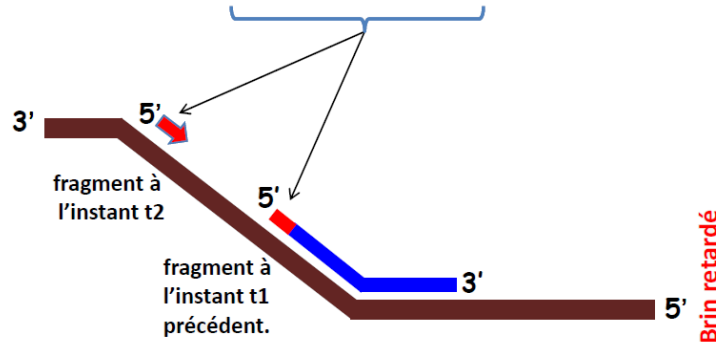
Synthèse d'amorces d'ARN et élongation du brin

Impossibilité pour les ADN polymérases de se fixer sur un simple brin.

Il faut donc créer localement un double brin, mais qui va le faire ?

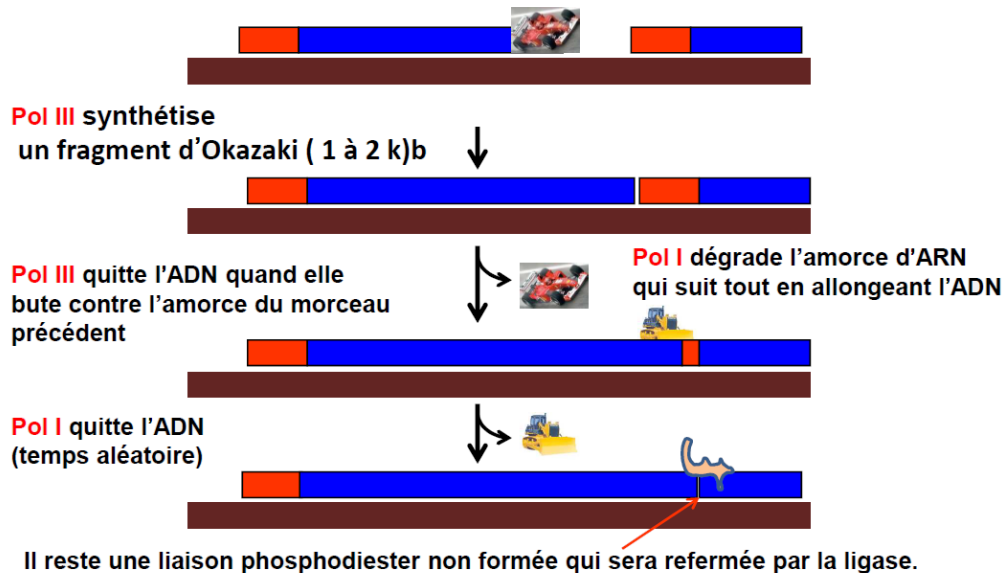
Pas une ADN polymérase !!

La primase (associée à l'hélicase dans un complexe nommé « primosome ») synthétise des fragments d'ARN de 10 à 60 Nt sur le brin retardé.



Elongation des brins

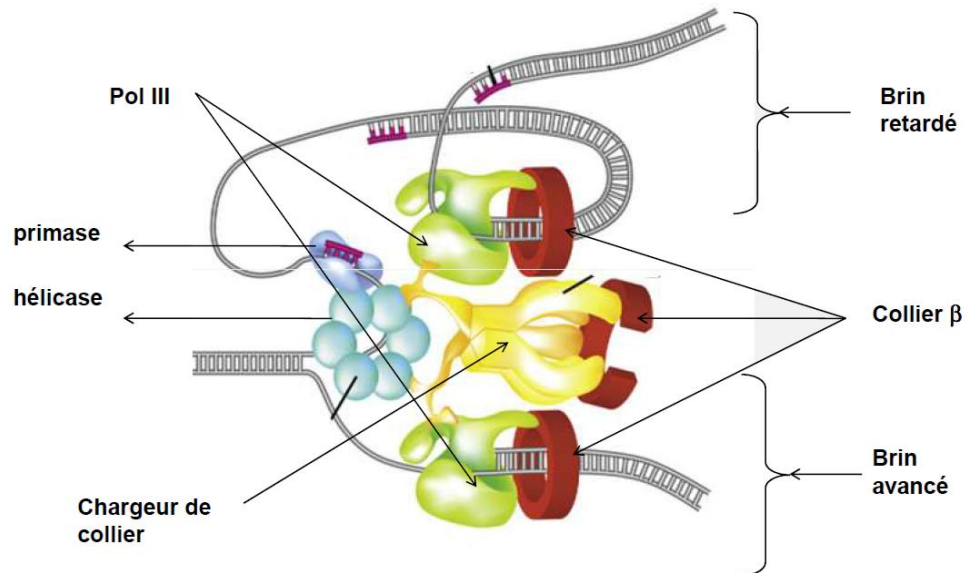
Le plus complexe à réaliser est celui du brin retardé



Le réplisome et la coordination des brins

La polymérase III lâche le brin retardé une fois le fragment d'Okazaki formé.

Le chargeur de collier est capable d'ouvrir le collier et de le placer à un endroit donné d'un brin.



Séquence d'évènements

Brin avancé

- Synthèse pratiquement continue

Brin retardé

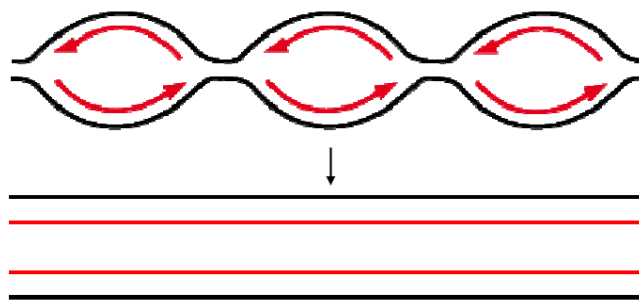
- Sa synthèse s'opère simultanément avec celle du brin avancé
- Le primosome fonctionne de façon coordonnée avec le chargeur de colliers
- Lorsque Pol III rencontre l'amorce ARN du fragment précédent, Pol III relâche le brin+collier et est dirigée sur un autre collier chargé par le chargeur sur une région plus proche de la fourche
- Le travail de Pol I sur l'endroit laissé libre par Pol III peut alors commencer

La réplication chez les eucaryotes : les différences

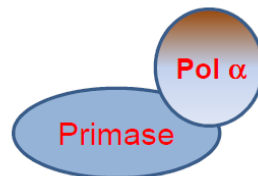
Origines de réplication : multiples

Chromosomes linéaires : génome haploïde de $3 \cdot 10^9$ pb soit environ 630 fois plus grand que le génome de Coli. Or la vitesse de polymérisation chez l'homme est environ 10 fois plus lente que chez Coli.

Pour répliquer en un temps raisonnable : multiples origines de réplication (entre 30 000 et 50 000 chez l'homme). Ces origines ne sont pas toutes actives en même temps (seulement 10-15% le sont) avec un choix temporel d'activation précis.

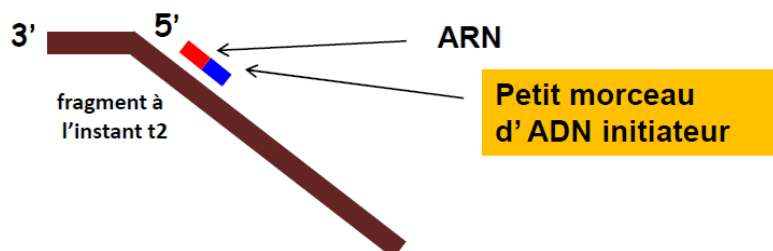


Initiation : le complexe primase Pol α



La primase eucaryote polymérise un petit morceau d'ARN mais qui est suivi par un petit morceau d'**ADN « initiateur »** synthétisé dans la foulée par Pol α .

La synthèse du fragment d'Okazaki prendra appui sur cette amorce hybride.



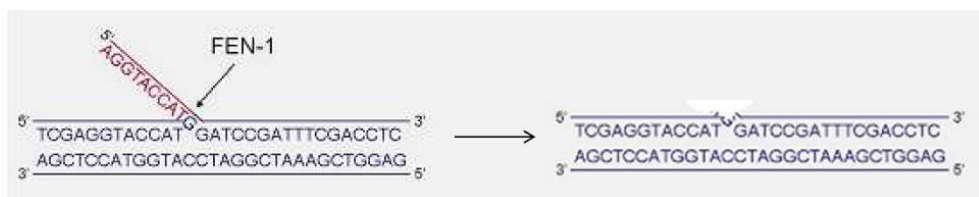
Elongation : FEN1 et l'élimination des amorces

La longueur des fragments d'Okazaki est plus courte **100-200 pb**.

Les deux ADN polymérases (**Pol δ** et **Pol ϵ**) semblent participer à la formation à la fois du brin avancé et des fragments d'Okazaki du brin retardé (mais avec des préférences : Pol δ pour le brin retardé et Pol ϵ pour le brin avancé).

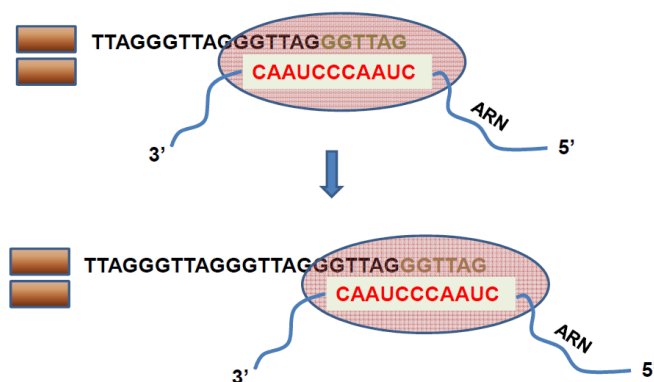
Lorsque ces polymérases butent sur l'amorce du morceau précédent, elles ne « grignotent » pas l'amorce hybride mais la **soulèvent** (donc pas d'utilité de posséder l'activité *exo 5' vers 3'*).

Une enzyme spéciale : **FEN 1** va inciser (couper) ce morceau qui dépasse avant l'action de la ligase.
FEN 1 = endonucléase



Terminaison : les télomères, extrémité des chromosomes

La télomérase : c'est une rétrotranscriptase qui synthétise de l'ADN sur une matrice d'ARN. Elle contient une petite molécule d'ARN, et synthétise de courts fragments d'ADN (TTAGGG) les uns à la suite des autres.

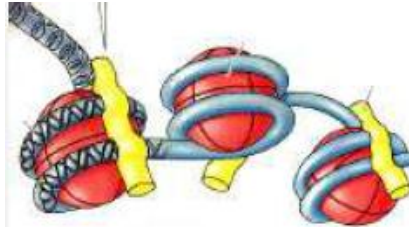


La télomérase est très active dans les cellules germinales mais peu dans les cellules somatiques voire pas active (le télomère raccourcit).

Le télomère a aussi un rôle dans la protection des extrémités des chromosomes contre l'action d'exonucléases.

La gestion des nucléosomes

Chez les eucaryotes, l'ADN nucléaire est régulièrement enroulé autour d'un octamère de protéines histones (nucléosome).



Ces histones portent des modifications qui peuvent influencer l'état de condensation ou l'aptitude à la transcription de la chromatine.

Le problème : comment ces histones (et les modifications) vont se répartir sur les deux duplex durant la réplication.

- L'ADN est doublé, donc il faut donc synthétiser de nouvelles histones
- Nouvelles et anciennes histones vont se partager sur les deux duplex selon plusieurs modèles possibles dont le choix définitif est encore en discussion.

Cette opération est complexe et ralentit sérieusement la progression de la fourche de réplication.