

LA REPLICATION DE L'ADN

Nicolas DUBOIS – PRAG UPEC – Faculté des Sciences et Technologies
nicolas.dubois@u-pec.fr

Fonctions associées à l'ADN et aux gènes

L'ADN / les gènes doivent...

...se perpétuer de façon
précise.

REPLICATION DE L'ADN

Contrôle quantité / qualité de la copie
Conservation de l'information
Stabilité du patrimoine génétique

...diriger la production des
ARN et des protéines.

EXPRESSION DES GENES

Transcription + traduction
Information encodée dans l'ADN
Production d'ARN fonctionnels ou d'intermédiaires ARN
Correspondance ARN > protéine via le code génétique

...avoir la possibilité de se
modifier.

MUTATIONS

Moteur de l'évolution
Mutation / Sélection
Variabilité du patrimoine génétique

Objet de cette UA

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Le dogme central de la biologie moléculaire

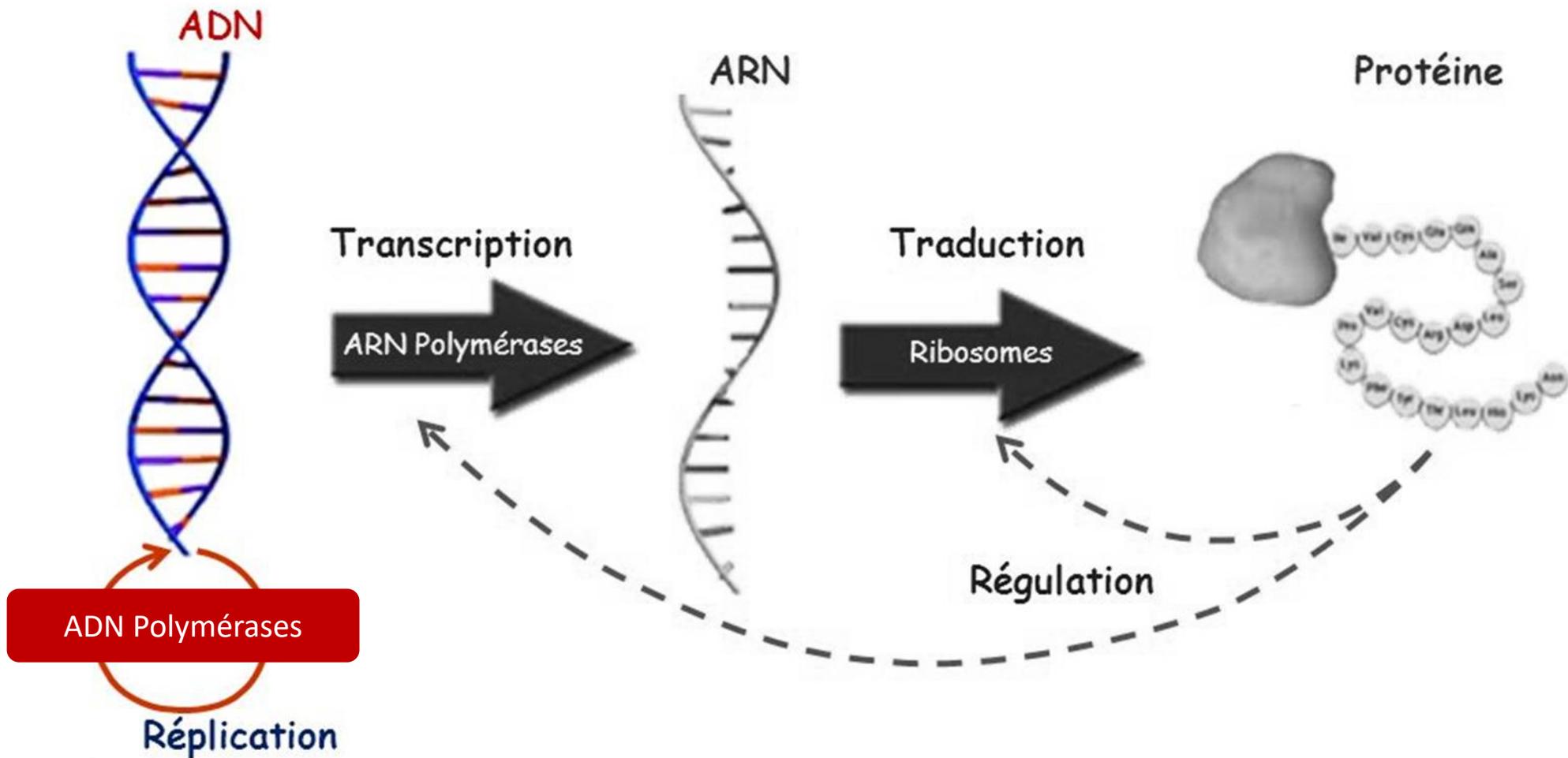
INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION



Réplication de l'ADN et cycle cellulaire

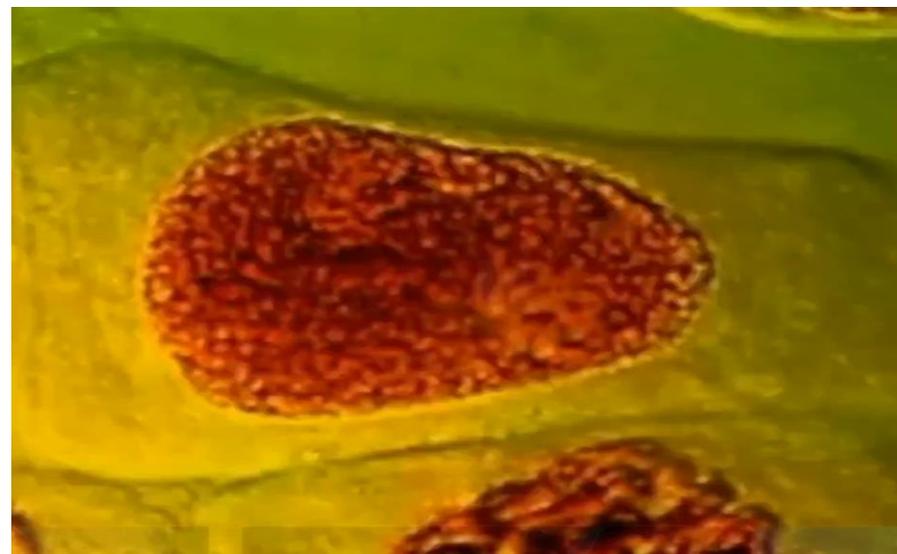
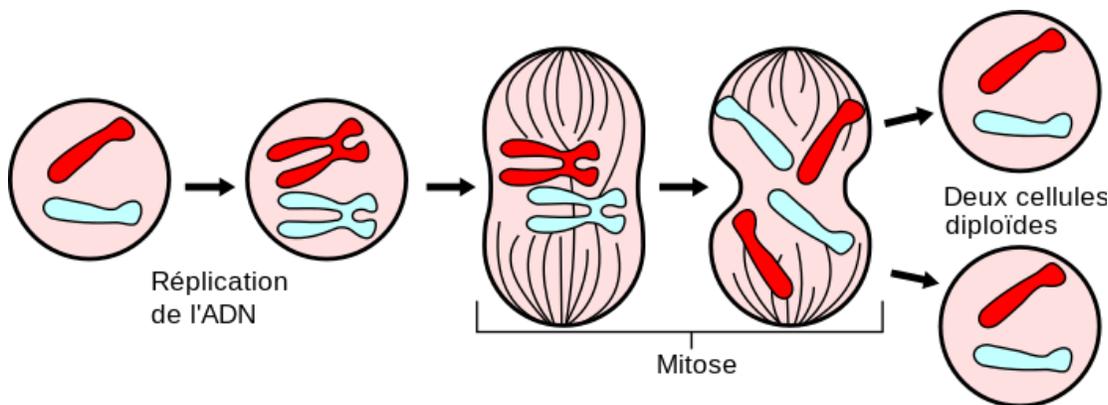
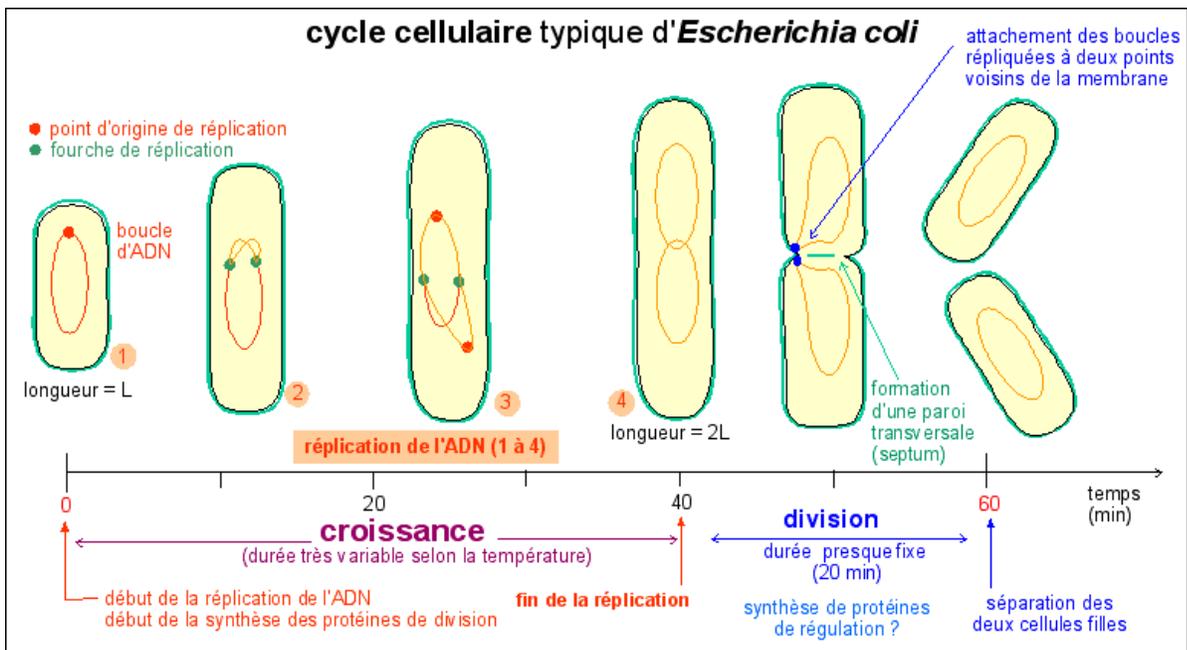
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



Réplication de l'ADN et cycle cellulaire

La réplication Intervient dans la phase **S** du cycle cellulaire

M : Mitose, ségrégation des chromosomes, division nucléaire.

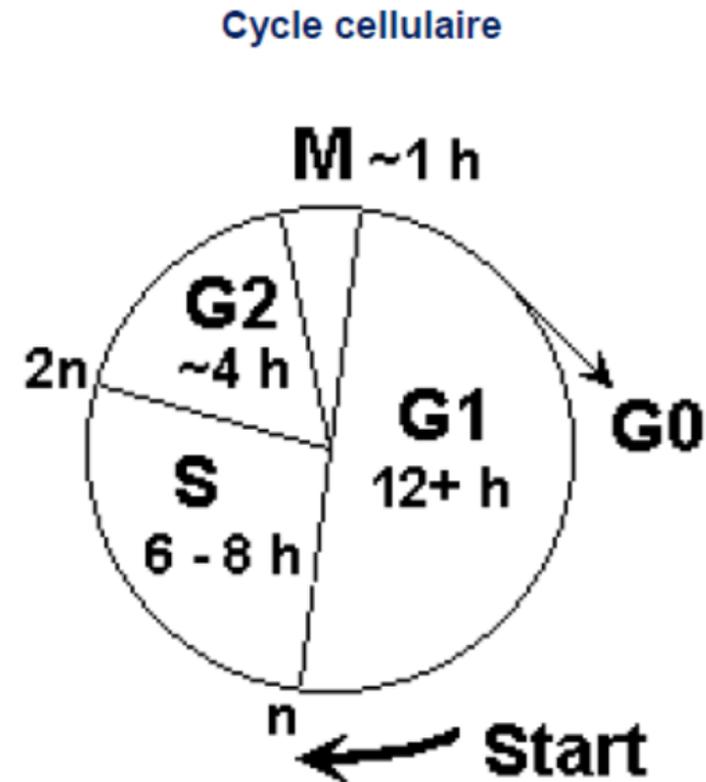
G1 : First gap phase, durée variable

S : **Synthèse d'ADN**; 2n symbolise la duplication des chromosomes,

G2 : Second gap phase

G0 : Etat des cellules qui ont arrêté de se diviser

Start : Point critique à la fin de G1;



INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

Duplication et stabilité de l'ADN

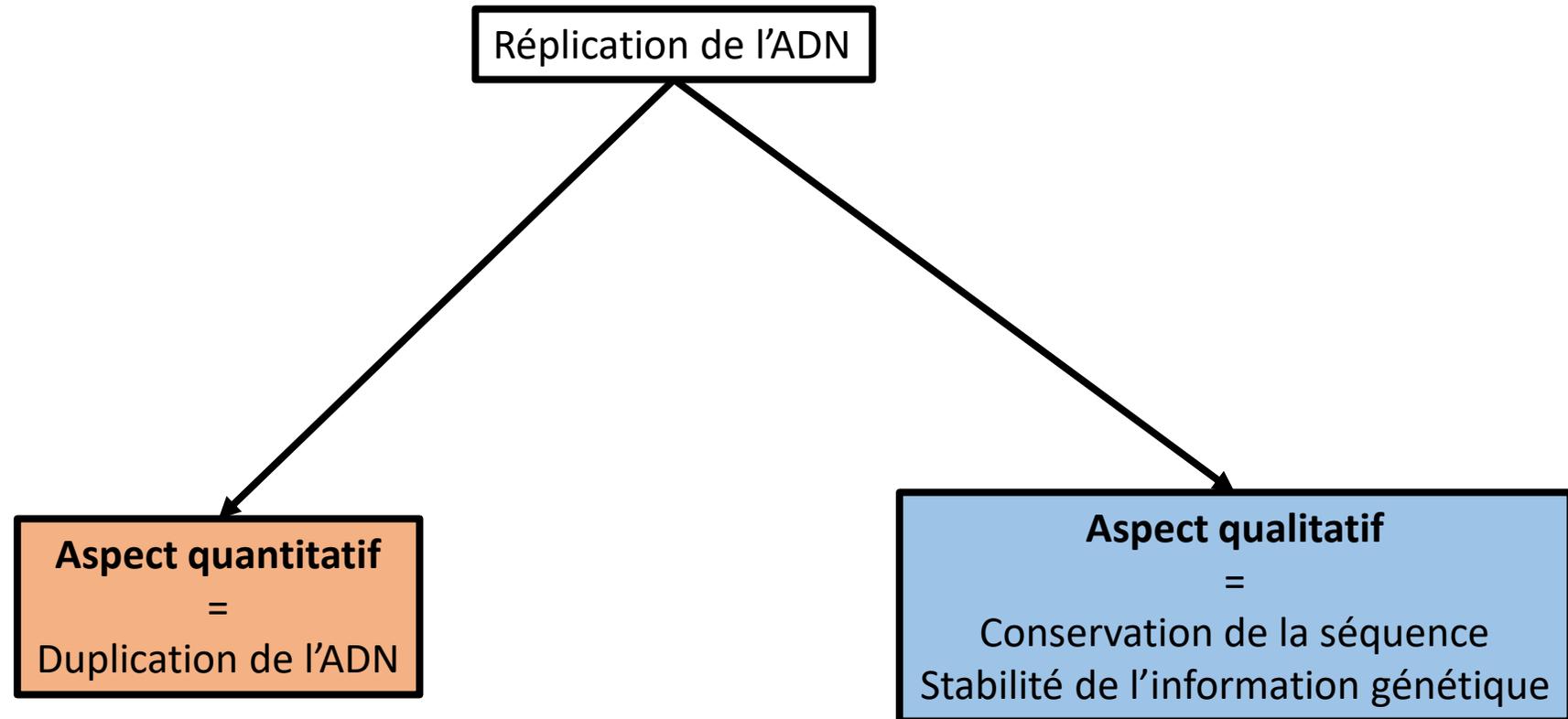
INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION



INTRODUCTION

**I. PRINCIPES
GENERAUX**

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

1. PRINCIPES GENERAUX

Le problème à résoudre

Depuis **Watson et Crick (1953)**, on sait que l'ADN est une molécule formée de **deux brins antiparallèles, formant une double hélice**. Dès leur publication originale sur la structure de l'ADN, Watson et Crick ont proposé que cette double hélice puisse s'ouvrir, permettant ainsi la synthèse de nouveaux brins, complémentaires des brins originaux.

L'ADN peut ainsi servir de matrice à sa propre réplication, étape essentielle du cycle cellulaire. Cette duplication de l'ADN (et donc des chromatides) permet de passer de chromosomes à une chromatide à des chromosomes possédant deux chromatides identiques, portant la même information génétique. Lors de la mitose, ces deux chromatides sont réparties, chaque cellule-fille héritant d'une chromatide de chaque chromosome. **On obtient ainsi deux cellules possédant la même information génétique que la cellule-mère.**

Le problème qui se posait était alors de comprendre comment se réalisait cette réplication : selon quelles modalités passe-t-on d'une molécule d'ADN formée de deux brins à deux molécules d'ADN bicaténares identiques ?

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MÉCANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

Nature du mécanisme

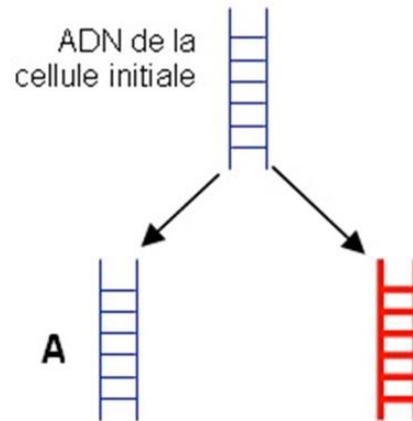
Les hypothèses

Plusieurs hypothèses sur le processus de doublement de la quantité d'ADN

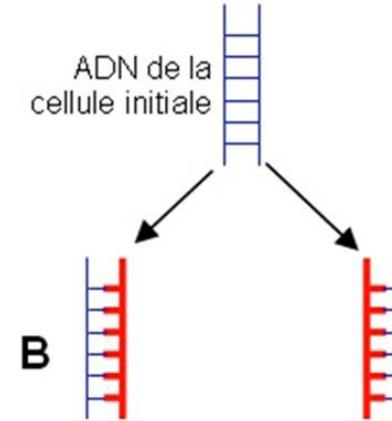
Dans les **années 1940-1950**, on s'est demandé comment fonctionnait la **réplication**. De manière évidente, la **production de deux molécules filles d'ADN identiques** supposait l'utilisation de la **molécule mère** comme **matrice** mais **trois modèles** pouvaient alors être envisagés

- Soit **la molécule mère est intégralement conservée et une molécule fille est complètement néosynthétisée** : c'est le **modèle conservatif**.
- Soit **chaque molécule fille comprend un brin hérité de la molécule mère et un brin néoformé** : c'est le **modèle semi-conservatif**.
- Soit **chaque molécule fille comprend aléatoirement des tronçons hérités de la molécule mère et des tronçons néoformés** : c'est le **modèle dispersif**.

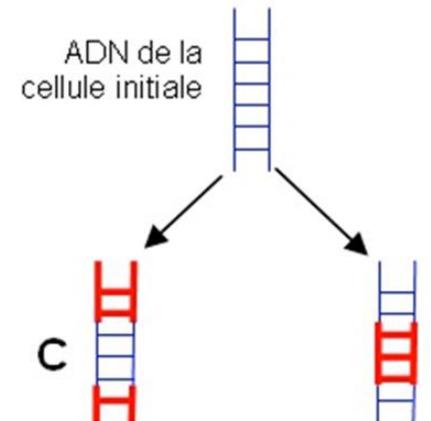
Modèle conservatif



Modèle semi-conservatif



Modèle dispersif



A, B, C : ADN des cellules filles

ADN parental

ADN néosynthétisé

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

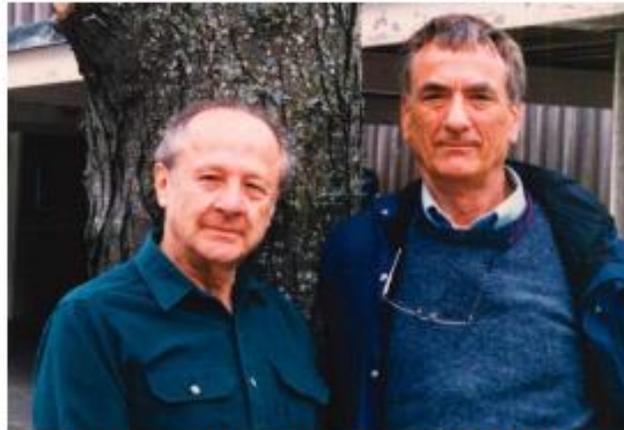
II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

Les Américains Matthew S. MESELSON (1930) et Franklin W. STAHL (1929) cherchent à trancher entre ces trois modèles en 1958.



Matthew MESELSON & Frank STAHL en 1957 et quelques décennies plus tard.

http://html.rincondelvago.com/replicacion-de-adn_1.html et
<https://densitymattersblog.wordpress.com/matthew-meselson-franklin-stahl/>
(consultation décembre 2016)

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

Cette expérience a pu être réalisée grâce à plusieurs mises au point techniques :

- 1 Meselson et Stahl mettent au point une technique d'obtention d'un gradient de densité par centrifugation.
En utilisant du chlorure de césium 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. Cette gamme englobe la densité de l'ADN (1,710).
- 2 Ils cultivent les bactéries dans un milieu dont 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).
- 3 Ils mettent au point une méthode qui permet de synchroniser pendant quelques générations la division des bactéries.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

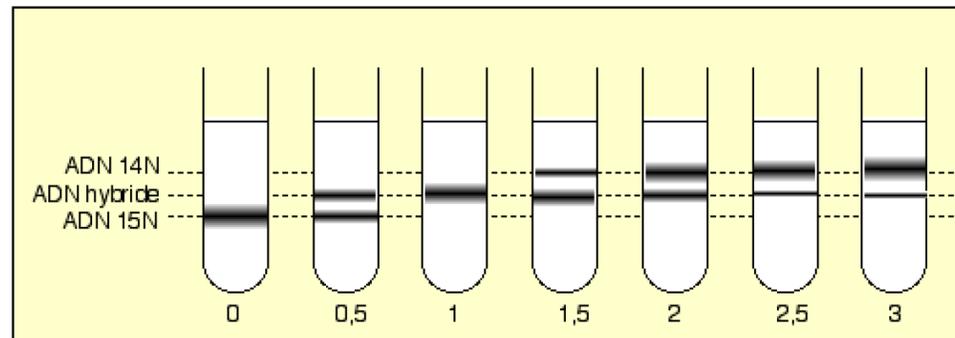
III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

Des bactéries cultivées depuis longtemps en présence de molécules azotées ^{15}N sont repiquées sur un milieu contenant des molécules azotées ^{14}N et permettant la synchronisation des divisions. Des fractions sont prélevées après différents temps correspondant à 1, 2, 3... divisions. L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de césium et centrifugé 24 h à 100 000 g. La position des ADN est repérée par une mesure de la densité optique.

RESULTATS



INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

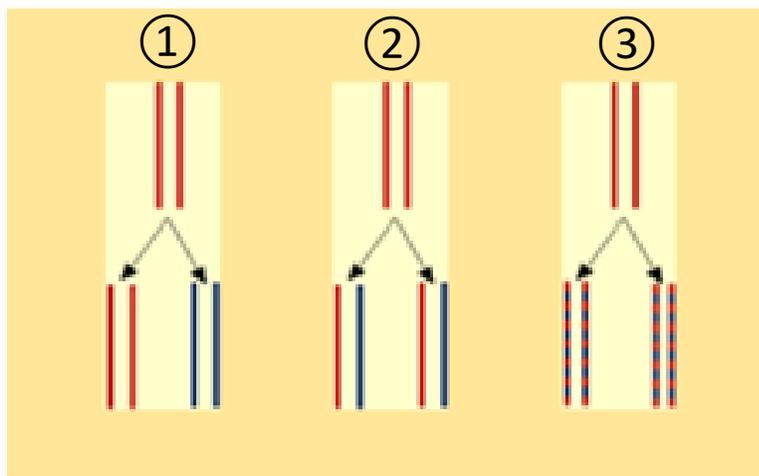
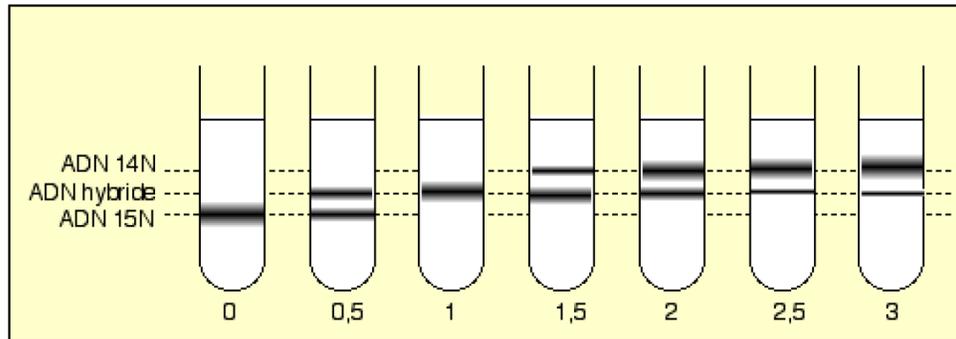
II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

RESULTATS



Interprétation après une génération cellulaire

Modèle	Résultat attendu	Validité du modèle
Conservatif (①)	50% ADN lourd 50% ADN léger	×
Semi-conservatif (②)	100% ADN hybride	✓
Dispersif (③)	100% ADN hybride	✓

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

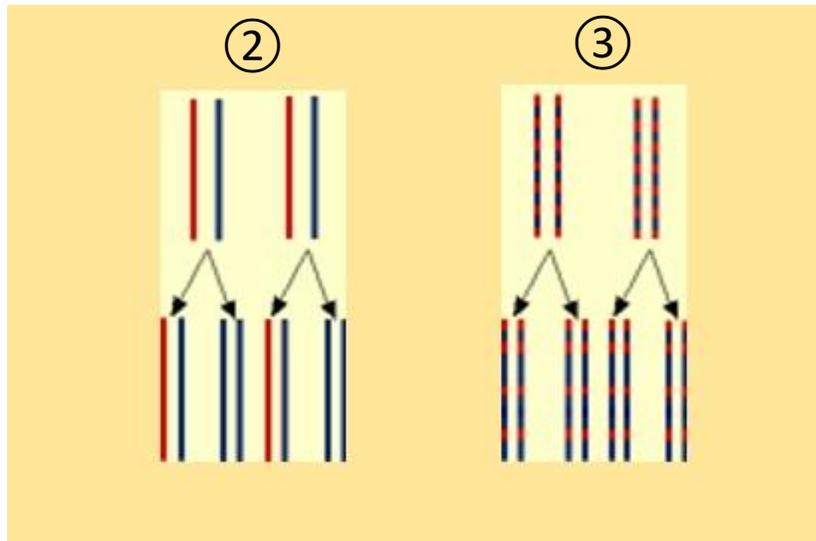
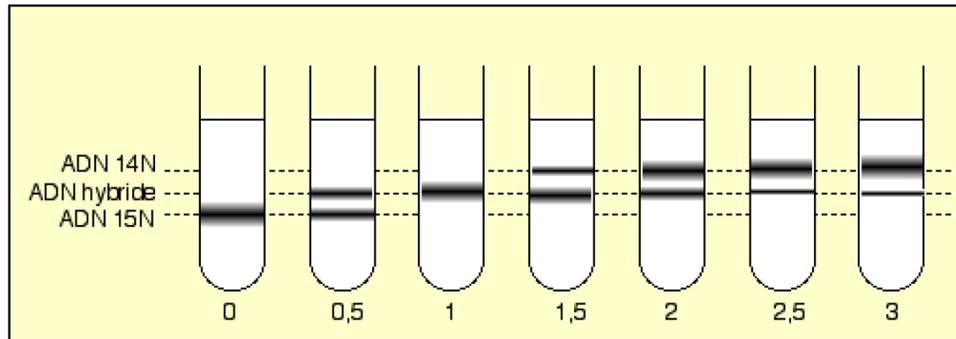
III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Nature du mécanisme

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

RESULTATS



Interprétation après deux générations cellulaires

Modèle	Résultat attendu	Validité du modèle
Semi-conservatif (②)	50% ADN hybride 50% ADN lourd	✓
Dispersif (③)	100% ADN hybride	✗

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Expérience de Meselson et Stahl (1958)

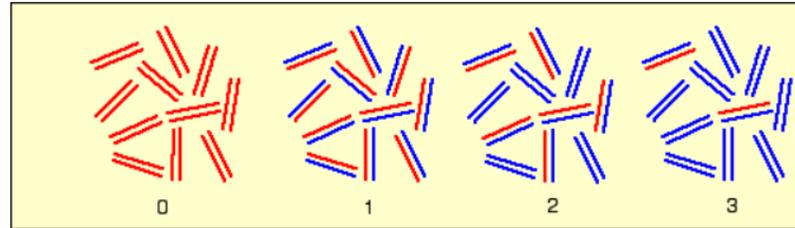


Figure 5 - Représentation schématique de la population de fragments d'ADN au cours des générations

Au début de l'expérience tout l'ADN des bactéries est formé de deux brins d'ADN lourd (rouge).

A la première génération, après une réplication en milieu contenant ^{14}N , tout l'ADN est « hybride » et constitué d'un ancien brin « lourd » (^{15}N , ici en rouge) et d'un nouveau brin « léger » (^{14}N , ici en bleu).

A la deuxième génération la moitié des fragments d'ADN est hybride (un ancien brin rouge et un nouveau brin bleu) et l'autre moitié de l'ADN est constitué de deux nouveaux brins légers (deux brins bleus).

En conclusion, seul le modèle semi-conservatif permet d'aboutir à une concordance entre résultats attendus et résultats observés. **L'expérience de Meselson et Stahl permet donc de mettre en évidence le fait que la réplication de l'ADN se réalise selon un mode semi-conservatif.**

Cette conclusion a été depuis confirmée par des études plus précises, pour aboutir au modèle actuel de fonctionnement de la réplication.

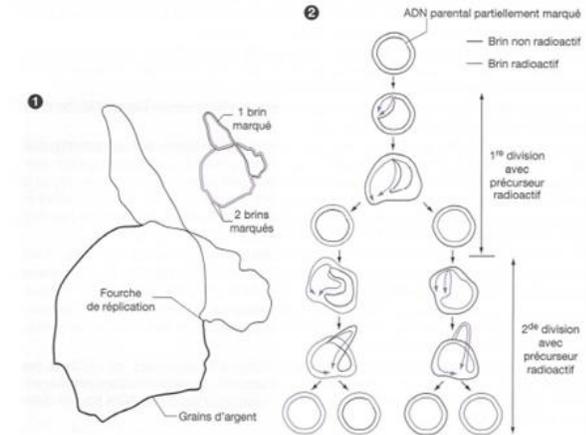
La réplication est un mécanisme bidirectionnel

Le britannique John F. Cairns confirme le modèle semi-conservatif en 1963.



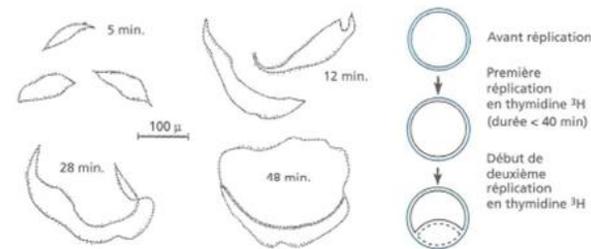
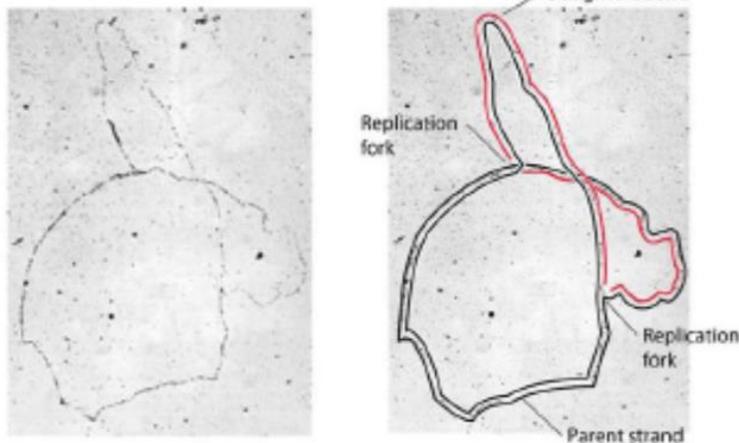
John CAIRNS. <http://library.cshl.edu/oralhistory/topic/cshl/john-cairns/> (consultation décembre 2016)

Pour visualiser au microscope électronique à transmission le déroulement de la **réplication de l'ADN**, CAIRNS (1963) cultive des **Bactéries** sur un milieu contenant de la **thymidine tritiée** pendant le temps de deux **réplications**. Il observe, après **éclatement des cellules**, les **chromosomes bactériens** par **autoradiographie**. Les **brins d'ADN** sont nettement **noircis** lorsqu'ils sont **radioactifs**, c'est-à-dire lorsqu'ils sont **néosynthétisés** avec les nucléotides radioactifs.



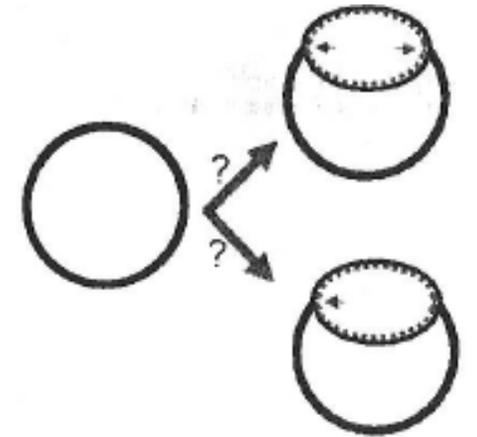
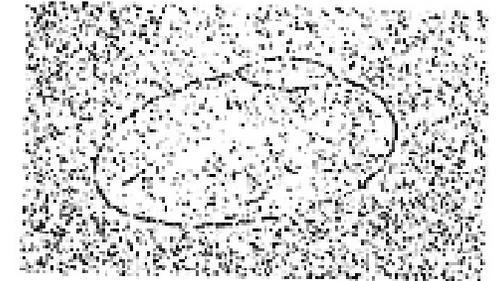
Réplication du chromosome bactérien
1. Autoradiographie de la réplication de l'ADN d'E. coli. L'ADN bicaténaire du chromosome est observable car pendant deux générations, il a incorporé de la thymidine tritiée, autrement dit ses deux brins sont radioactifs en accord avec le modèle de la réplication semi-conservative. L'interprétation de la photographie se fonde sur les différences de densité dans la répartition des grains d'argent issus de la désintégration de la thymidine tritiée. Les portions denses correspondent à de l'ADN dont les deux brins sont marqués et les segments plus clairs à de l'ADN dont une seule chaîne est marquée. 2. Interprétation de l'évolution de la radioactivité en fonction du temps.

FIGURE 8. **Expérience de CAIRNS : première vision**. D'après BREUIL (2007)



Résultats et interprétation de l'expérience de Cairns.
Chez E. coli, la durée maximale d'une réplication est de 40 minutes. Elle est ici suivie par utilisation de ³H-thymidine et autoradiographie. Les stades à 5, 12 et 28 minutes correspondent donc à une première réplication en cours. Le stade à 48 minutes correspond à la réplication suivante. Les schémas d'interprétation sont représentés à droite.

FIGURE 9. **Expérience de CAIRNS : deuxième vision**. D'après PEYCRU et al. (2010a) Sur cette figure, seuls les brins radioactifs apparaissent.



Mécanisme unidirectionnel
OU
Mécanisme bidirectionnel ?

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

Expériences de Prescott et Kuempel (1972)

Raffinement du protocole de Cairns

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MÉCANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

(i) Cells were incubated for 150 min in the absence of required amino acids. This allowed termination of replication cycles, but did not allow initiation of new cycles (7, 10).

(ii) Cells were next transferred to medium containing the required amino acids and [³H]thymine (1.8 μg/ml). New replication cycles are initiated under these conditions, and the newly synthesized DNA at the replication origin becomes labeled with [³H]thymine (7).

(iii) After 13, 16, and 19 min of incubation, 1 ml was removed from the main culture and incubated with [³H]thymidine (0.5 μg/ml) for 2.5 min. This procedure labeled the DNA near the replication forks with a higher specific activity than the DNA already labeled with [³H]thymine alone.

(iv) DNA synthesis was stopped by addition of 10 volumes of ice-cold Tris-EDTA-NaCN. Spheroplasts were prepared and lysed, the chromosomes were spread, and autoradiographs were prepared.

If replication were unidirectional, the autoradiographs should show grain tracks with a much higher grain density at one end. If replication were bidirectional, the grain tracks should have a much higher density at both ends.

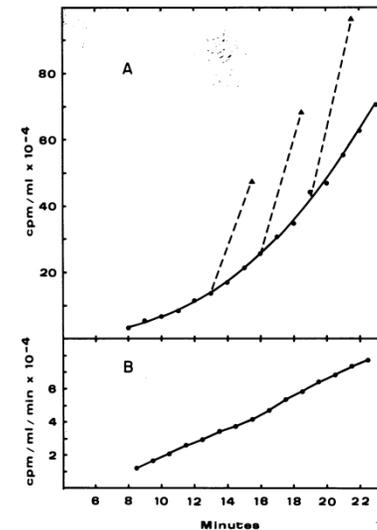


Fig. 1. (A) Incorporation of [³H]thymine and [³H]thymidine into acid-insoluble material. Cells (about 10⁹/ml) incubated 150 min in the absence of the required amino acids arginine, proline, and tryptophan were transferred to complete medium containing [³H]thymine (1.8 μg/ml, 10 Ci/mmol). The abscissa shows the minutes of incubation in this medium. At 13, 16, and 19 min, 1-ml samples were removed and incubated with [³H]thymidine (0.5 μg/ml, 52 Ci/mmol) for 2.5 min. Autoradiographs were prepared from these samples. (●—●) [³H]thymine incorporated. (▲—▲) [³H]thymidine and [³H]thymidine incorporated. (B) Rate of incorporation of [³H]thymine. The rate of incorporation over 1-min intervals was determined from the curve in Fig. 1A.

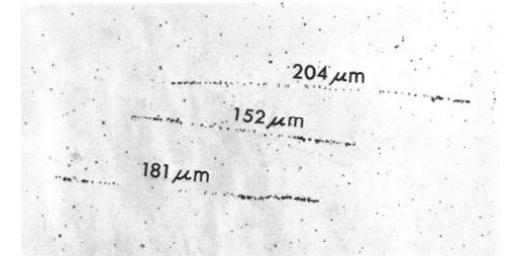


Fig. 3. Three grain tracks produced by *E. coli* chromosomes from cells labeled for 16 min with [³H]thymine, followed by labeling for 2.5 min with [³H]thymine and [³H]thymidine.

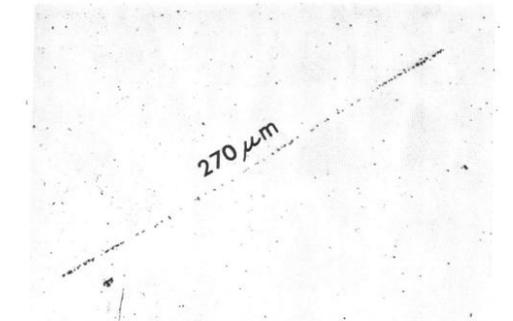


Fig. 4. A grain track produced by an *E. coli* chromosome from cells labeled for 19 min with [³H]thymine, followed by labeling for 2.5 min with [³H]thymine and [³H]thymidine.

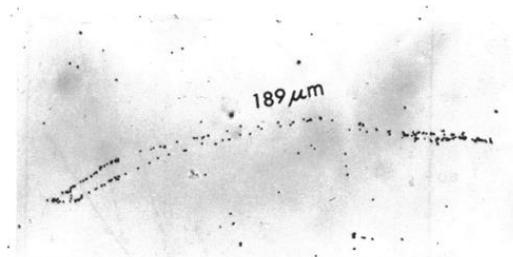


Fig. 6. A grain pattern produced by *E. coli* chromosomes from cells labeled with [³H]thymidine for 16 min after release from amino-acid starvation. The two daughter duplexes are separated throughout most of their lengths.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

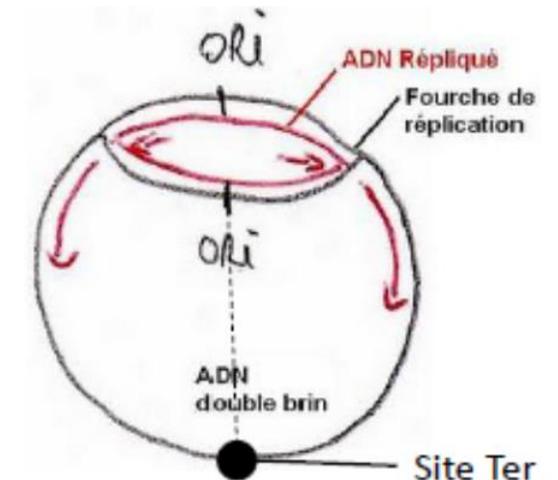
Résultats et interprétation : confirmation de la semi-conservativité de la réplication et illustration de l'origine unique de réplication chez les Bactéries

La présence d'un **brin en cours de formation** et marqué radioactivement tranche avec le **brin hérité non radioactif**, confirmant la **semi-conservativité** du processus répliatif

L'observation du chromosome au cours des quelque 30 minutes que dure la réplication révèle

- l'existence d'une seule origine de réplication appelée *OriC* sur laquelle se fixent les protéines à l'origine du démarrage de la réplication ;
- l'ouverture progressive d'un œil de réplication qui grandit progressivement par ses deux fourches ;
- la présence de deux fourches de réplication qui incorporent chacune la thymidine tritiée ;
- la progression de ces fourches en deux sens opposés ;
- la rencontre de ces deux fourches en un point appelé *ter* situé à l'opposé d'*OriC*.

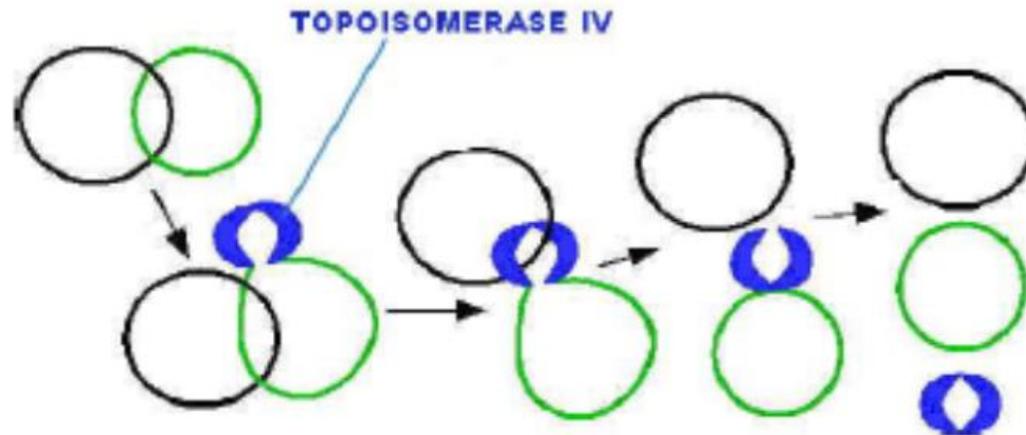
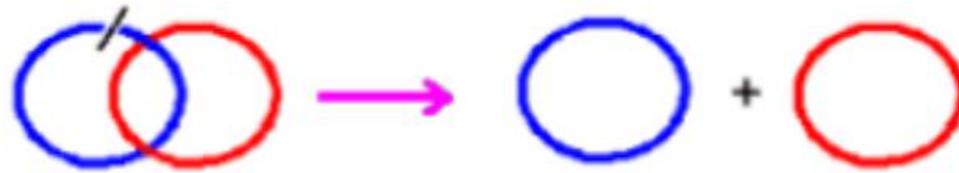
D'après BREUIL (2007)



La réplication est un mécanisme bidirectionnel

Un problème constaté pour la réplication des ADN circulaires...

Décaténation en fin de réplication d'un ADN circulaire



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

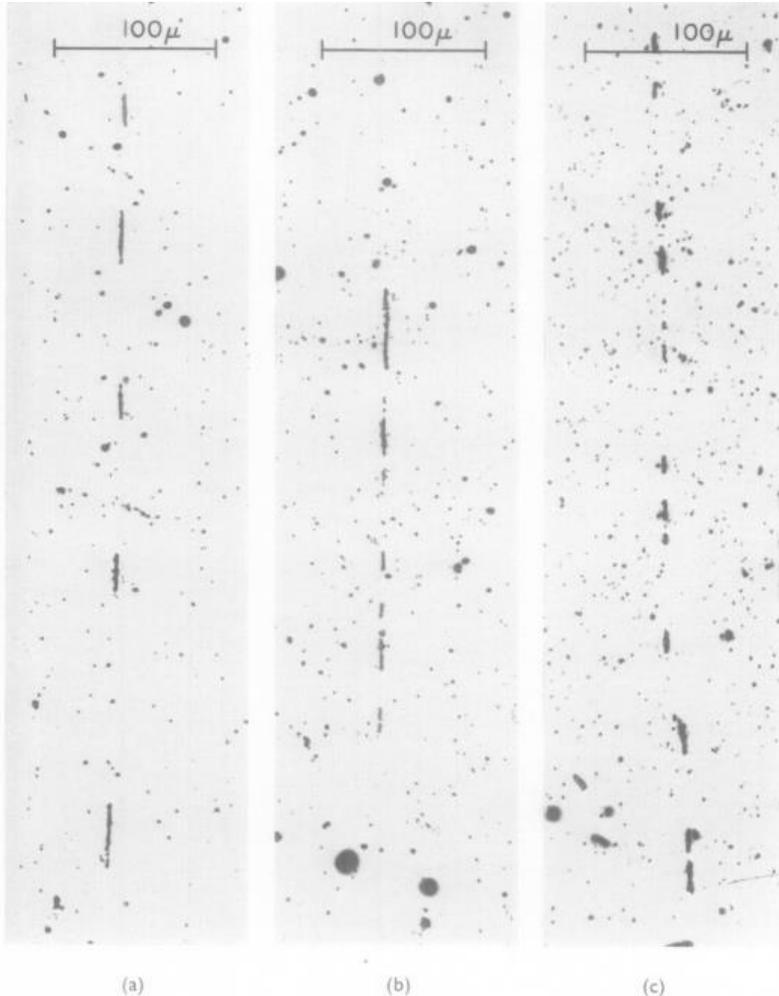
II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

La réplication est un mécanisme bidirectionnel

Expériences de Huberman et Riggs (1968)



When Chinese hamster cells were briefly exposed to [³H]thymidine, then immediately lysed and the released DNA subjected to autoradiography, tandem arrays of DNA autoradiograms, similar to those reported by Cairns (1966), were sometimes found (Plate I). In order to prove that these tandem arrays were the result of separate replication sections in single DNA fibers and not the result of side-by-side aggregation of several separate DNA fibers, each containing a single replication section, we performed the following experiments.

We reasoned that if all the DNA fibers were completely labeled by growing the cells in high specific activity [³H]thymidine for 24 hours, then side-by-side aggregates could be distinguished by their higher grain density; we also reasoned that if, during the 24-hour period, we exposed the cells to [³H]thymidine of a lower specific activity for a short interval, we could distinguish the autoradiograms of DNA replicated during that short interval by their lower grain density.

If each DNA fiber contained just one replication section, then after a cold pulse experiment of the type described here, one would expect to find no more than one low grain density (cold) region in any long DNA autoradiogram. On the other hand, if each DNA fiber could contain several replication sections, then after a cold pulse experiment one would expect to find some single long DNA autoradiograms containing several cold regions.

The actual labeling sequences used in these experiments are summarized in Fig. 1. When the stripping films were exposed for sufficient time to bring out the low specific activity regions (three months or more), long DNA autoradiograms containing several regions of low grain density were frequently found for cold-pulsed DNA but not for control DNA (Plate II). Thus Cairns' (1966) hypothesis that the long DNA fibers are composed of many tandemly joined replication sections is proved.

PLATE I. Tandem arrays of autoradiograms.

Cells of Chinese hamster fibroblast strain B14FAF28 (a gift from Dr T. C. Hsu) were grown as monolayer cultures on plastic Petri dishes in Eagle's medium supplemented with 10% calf serum. After a 12-hr pretreatment with FUdR (0.1 μg/ml.), [³H]thymidine (18 c/m-mole, Nuclear Chicago) was added to 0.5 μg/ml. 30 min later the cells were harvested by trypsinization and diluted to 1×10^4 cells/ml. in isotonic saline. The solutions used for trypsinization and dilution contained FUdR (0.1 μg/ml.). The cells were diluted tenfold into lysis medium (1.0 M-sucrose-0.05 M-NaCl-0.01 M-EDTA, pH 8.0), lysed by dialysis against 1% sodium dodecyl sulfate in lysis medium, then dialyzed further against dialysis medium (0.05 M-NaCl-0.005 M-EDTA, pH 8.0). The released DNA was trapped on Millipore VM filters which had served as dialysis membranes. It was then subjected to autoradiography.

Exposure time with Kodak AR10 autoradiographic stripping film (Eastman Kodak Co.) was 4 months. Picture taken by dark-field microscopy.

FUdR = 5-fluorouracyl deoxyriboside
Inhibiteur de la biosynthèse de la thymidine

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MÉCANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

La réplication est un mécanisme bidirectionnel

Expériences de Huberman et Riggs (1968)

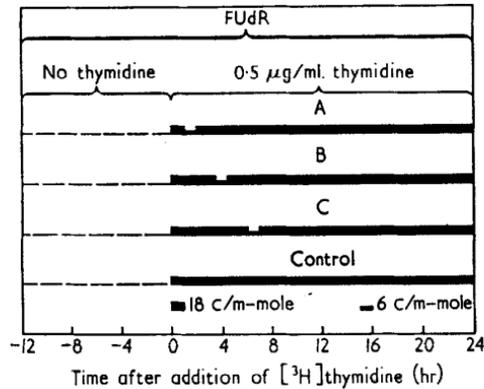


Fig. 1. Labeling schedule for cold pulse experiments.

Chinese hamster cells were grown as described in the legend to Plate I. After a 12-hr pretreatment with FUdR (0.1 µg/ml.), [³H]thymidine (18 c/m-mole; 0.5 µg/ml.) was added to 4 separate Petri plates (A, B, C and control). At various times after the initial addition of [³H]thymidine, as indicated in the Figure, the medium containing [³H]thymidine at 18 c/m-mole was removed from the plates and replaced, for 1 hr, by medium containing [³H]thymidine (0.5 µg/ml.) at 6 c/m-mole. After 24 hr the cells were harvested by trypsinization and diluted to 400 cells/ml. in isotonic saline. Lysis and autoradiography were performed as in the legend to Plate I.

(iii) Distribution of replicating DNA

In cold pulse experiments A and B, approximately 12% of the total length of autoradiograms was of low grain density; in experiment C, regions of low grain density contributed about 7% of the total length. However, in experiments A and B about two-thirds of the autoradiograms contained no regions of low grain density at all; in experiment C four-fifths of the autoradiograms contained no regions of low grain density.

Thus, during any one-hour period, regions of DNA synthesis are not distributed equidistantly along the DNA fibers in chromosomes. The non-uniform distribution of regions of DNA synthesis is apparent in Plate II.

PLATE II. Cold pulse autoradiograms.
Chinese hamster cells were labeled as described in Fig. 1 (A, B and control) and their DNA was subjected to autoradiography. Exposure time was 6 months. Dark field.

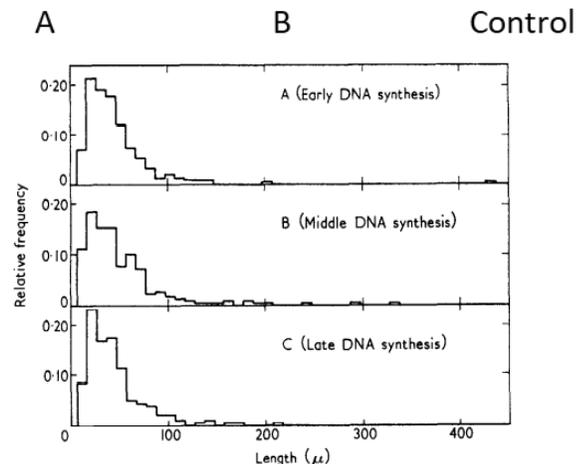
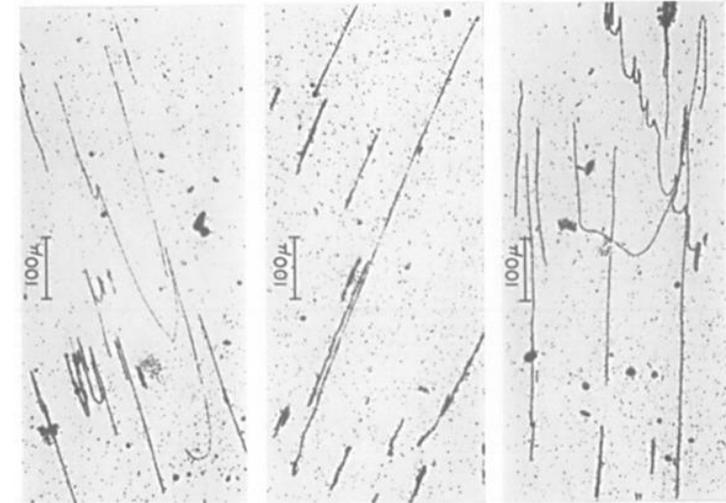


Fig. 2. Distribution of lengths of low grain density regions in cold pulse autoradiograms. Chinese hamster cells were labeled as described in Fig. 1 (A, B and C) and their DNA subjected to autoradiography. The autoradiograms were examined by dark-field microscopy at a magnification of 100. The contours of low grain density regions were traced with a camera lucida, and the lengths of the tracings were then measured and corrected for magnification.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

La réplication est un mécanisme bidirectionnel

L'élongation

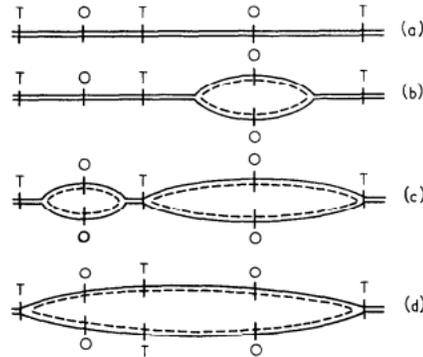
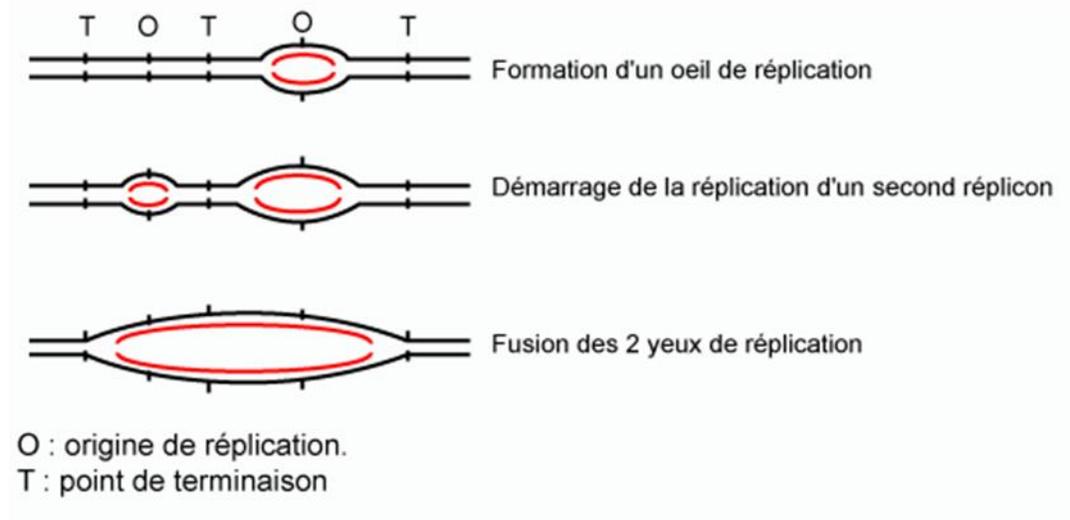


Fig. 7. Summary of the bidirectional model for DNA replication.

Each pair of horizontal lines represents a section of a double helical DNA molecule containing two polynucleotide chains (—, parental chain; ---, newly synthesized chain). The short vertical lines represent positions of origins (O) and termini (T). The diagrams represent different stages in the replication of two adjacent replication units:

(a) Prior to replication; (b) replication started in right-hand unit; (c) replication started in left-hand unit and completed at terminus of right-hand unit; (d) replication completed in both units; sister double helices separated at the common terminus.



La terminaison de la réplication

La terminaison de la réplication est réalisée par un complexe de protéines et d'enzymes dont la protéine Tus. Cette protéine s'associe à l'ADN, au niveau de région ter et inhibe l'activité de l'hélicase.

La fixation de Tus sur la séquence engendre également la dislocation du complexe enzymatique de réplication.

La topoisomérase II intervient alors pour séparer les molécules filles.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MÉCANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Notion de réplicon et origines de réplication

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

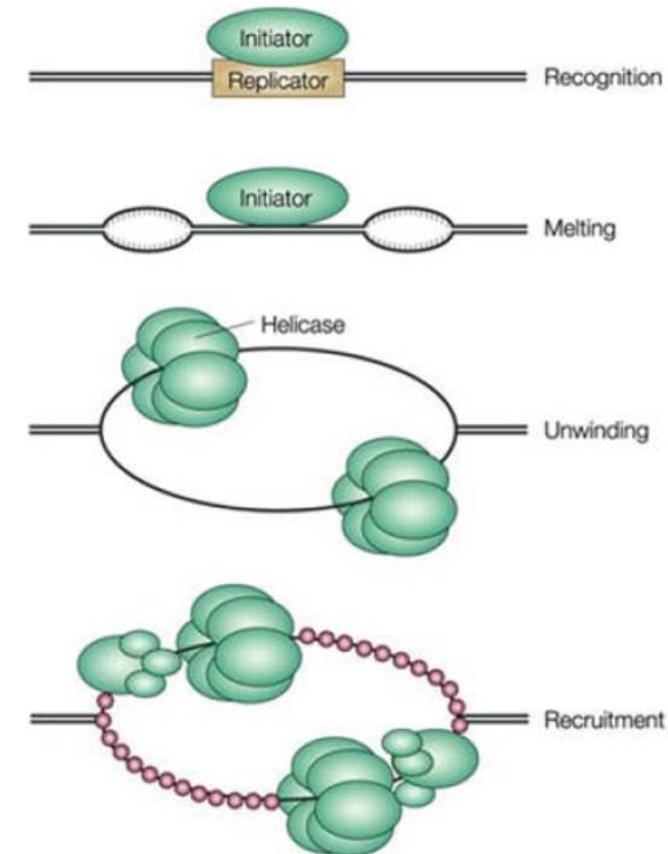
II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

- Unité de réplication: le réplicon
 - Origine
 - Terminus
- Eucaryotes: réplicons multiples. Procaryotes: un seul réplicon génomique + un réplicon par plasmide
- La réplication est bidirectionnelle
 - Génome mitochondrial: monodirectionnelle. Un origine pour chaque brin
- Etapes:
 - Initiation
 - Elongation
 - Terminaison

Le concept d'initiateur
(ou protéine initiatrice)



Notion de réplicon et origines de réplication

Le chromosome bactérien est un unique réplicon dont l'initiation de la réplication est sous le contrôle de la région OriC.

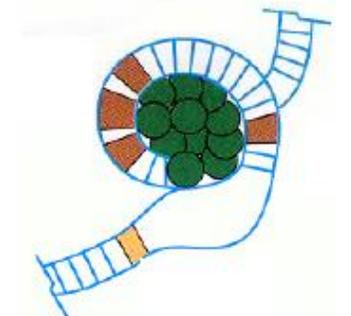
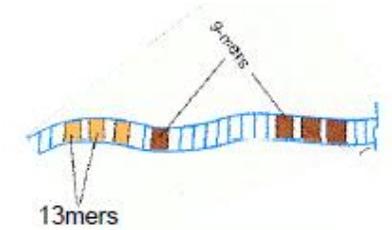
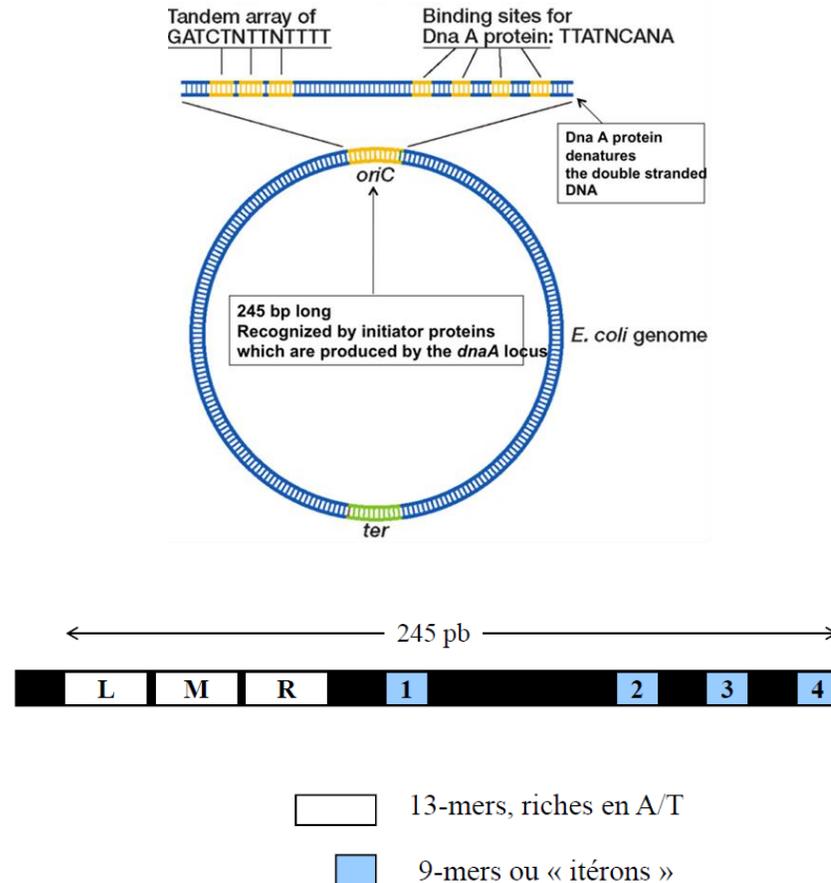
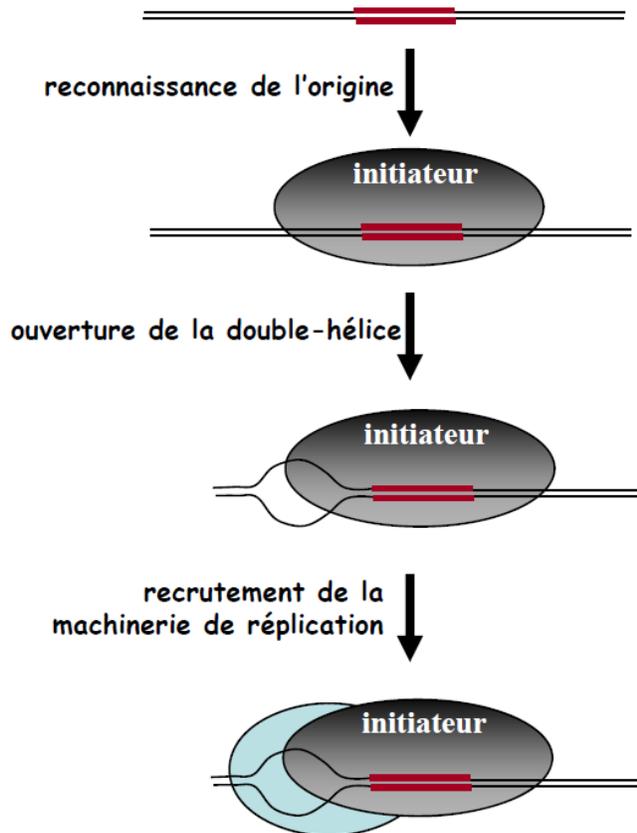
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

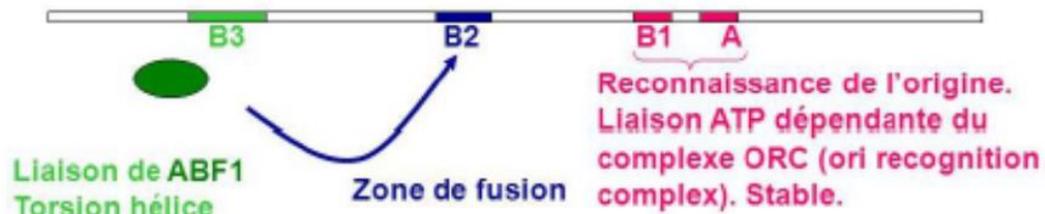


Initiateur = DnaA

Notion de réplicon et origines de réplication

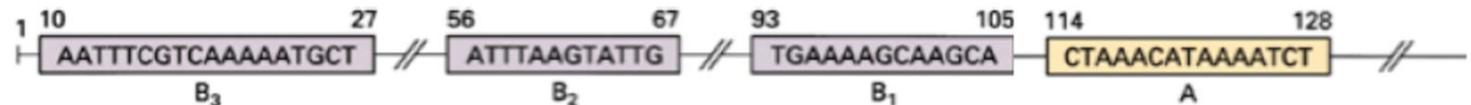
Levure :

Séquences ARS (séquences de replication autonome)
≤ 200pb, 4 sous domaines : A, B1, B2, B3



Les origines de réplication ou **ARS** (pour **Séquence à Réplication Autonome**) sont des séquences d'environ 150 nucléotides permettant une réplication autonome à partir de plusieurs sites sur les chromosomes eucaryotes. Elles sont constituées de plusieurs motifs riches en A et T (quatre pour l'origine de réplication chez la levure) sur lesquels vont se fixer les protéines formant le **complexe d'initiation de la réplication (ORC)** (plusieurs dizaines de milliers par chromosome)

Structure d'une origine de réplication chez la levure



Régions A et B, reconnues par le complexe ORC indispensable pour une réplication efficace

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

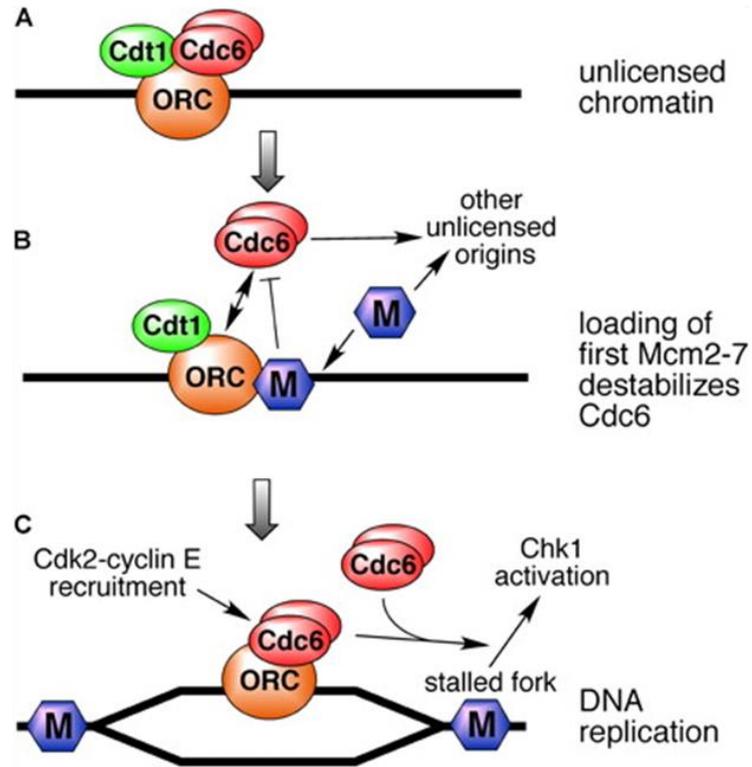
II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Notion de réplicon et origine de réplication

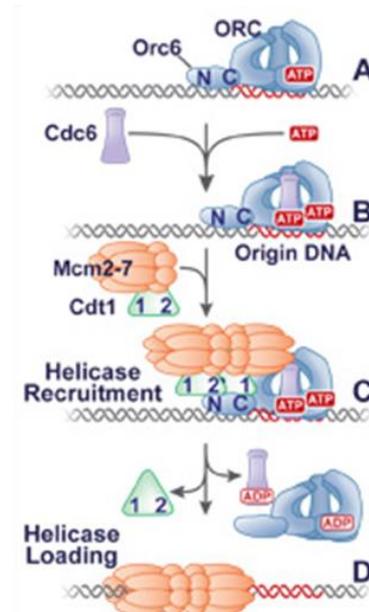
L'initiation de la réplication



Chez les eucaryotes, la réplication démarre en plusieurs sites.

Chez l'homme 30 000 origines de réplication.

L'initiation de la réplication chez les eucaryotes se fait de manière séquentielle.



INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

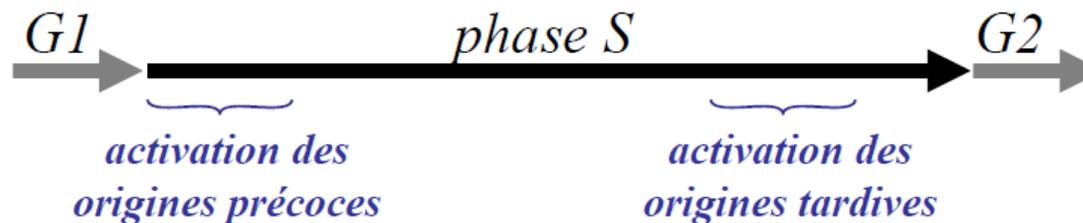
CONCLUSION

Notion de réplicon et origine de réplication

► Multiplicité

	Procaryotes	Mammifères
Taille de l'ADN génomique	10^6 pb	$3 \cdot 10^9$ pb
Nombre d'origines de réplication	une seule	plusieurs milliers

► Diversité



- Localisées plutôt :
- dans l'euchromatine
 - dans ou à proximité de gènes activement transcrits

Les origines de réplication ne sont pas toutes activées simultanément !

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Notion de réplicon et origine de réplication

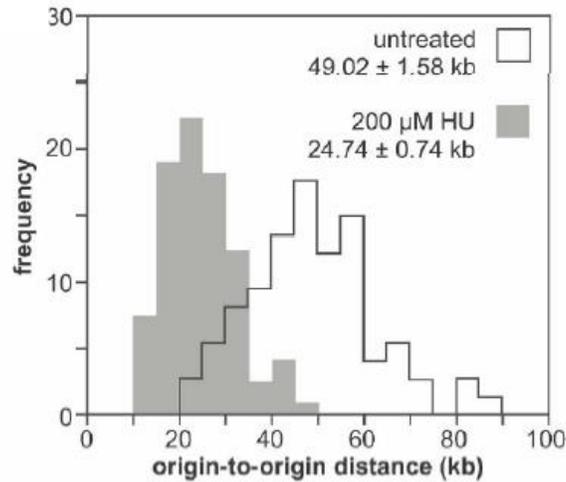
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

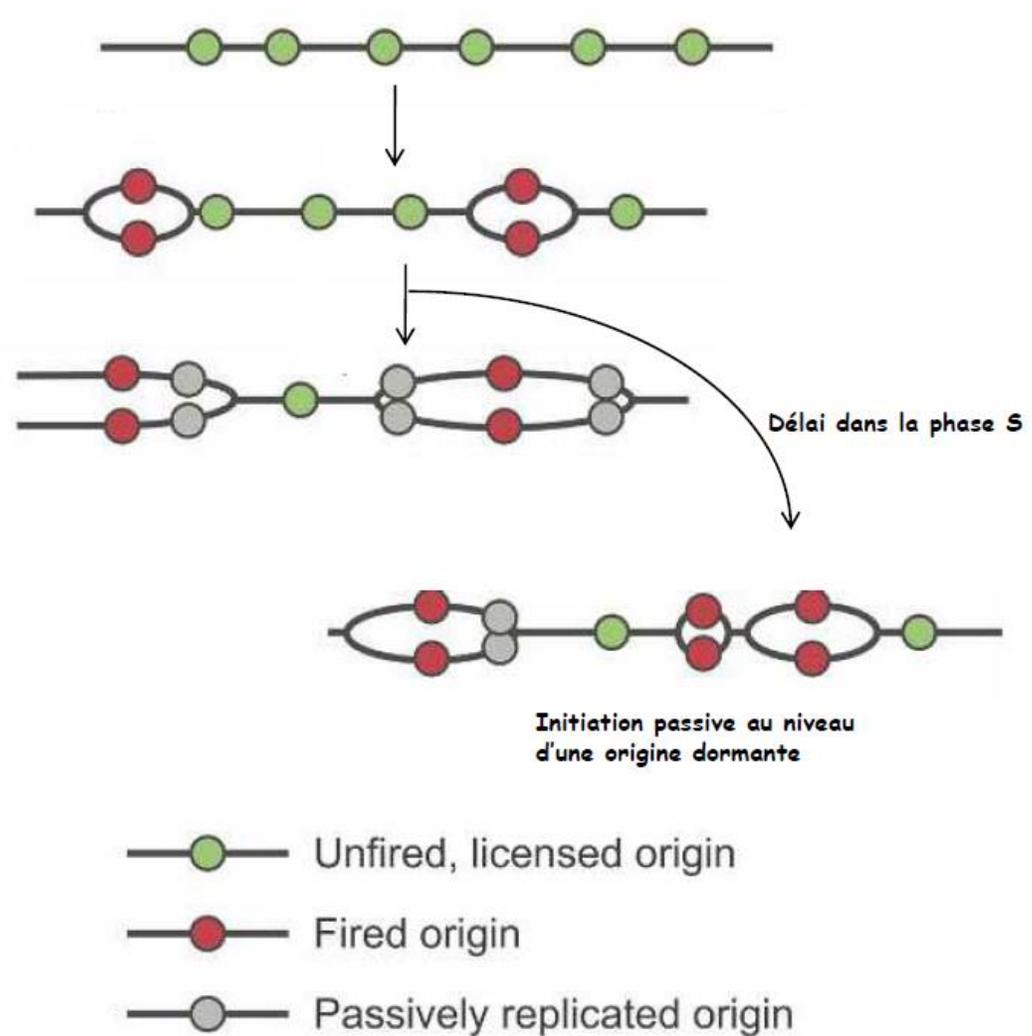
II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

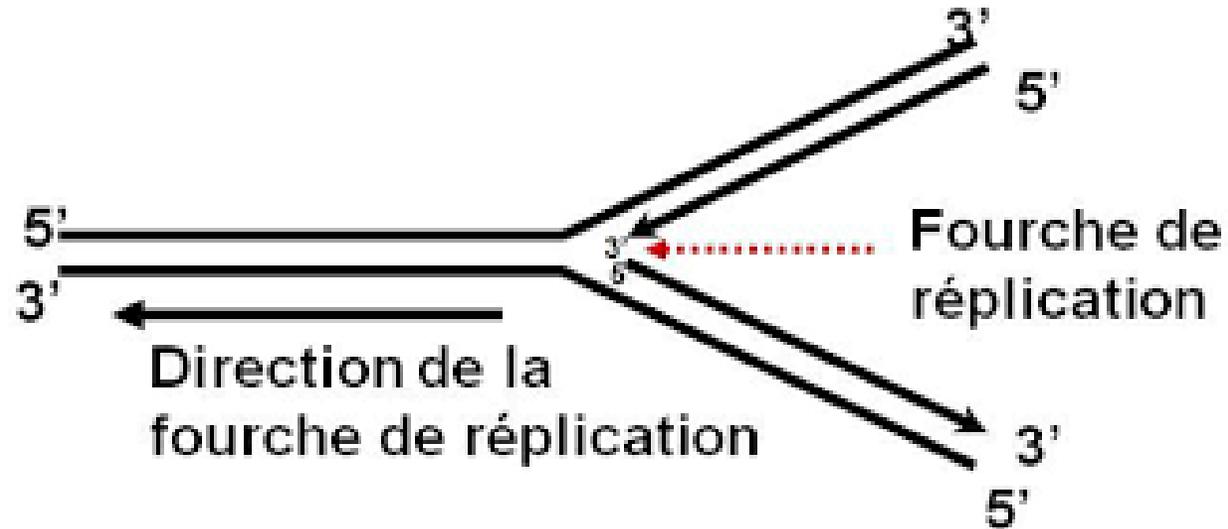


HU = hydroxyurée
Inhibe la ribonucléotide reductase
↓
Diminue le pool de dNTP pools
↓
Inhibe la synthèse d'ADN
(induit un stress répliatif)



Un processus semi-discontinu

Le problème...



La synthèse d'ADN se fait le long d'une matrice lue dans le sens 3'-OH → 5'-P



Le nouveau brin est synthétisé dans le sens 5'-3'

INTRODUCTION

**I. PRINCIPES
GÉNÉRAUX**

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

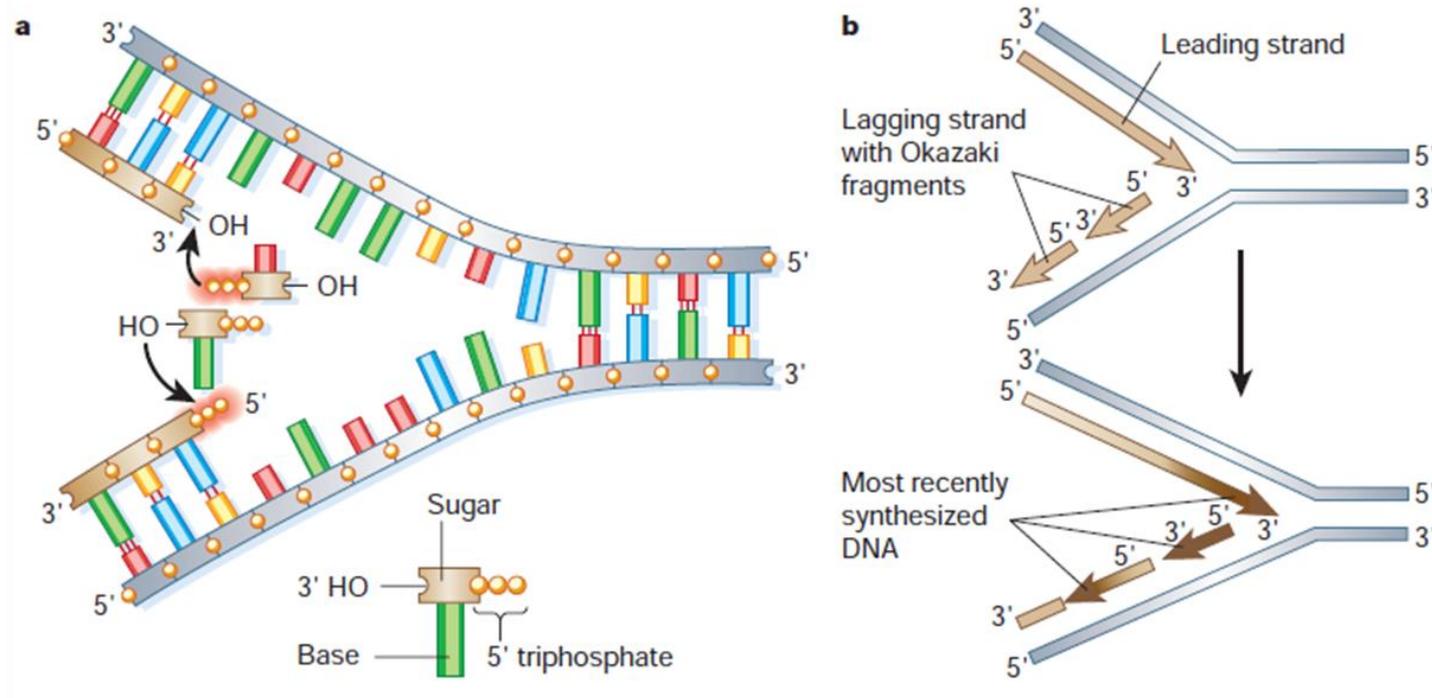
III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Un processus semi-discontinu

L'élongation

Synthèse simultanée du brin avancé et du brin retardé.



La fourche de réplication et la progression de la réplication sont dans le même sens sur le brin avancé, mais pas sur le brin retardé.

Réplication continu vs discontinu.

Les courts fragments sont appelés **fragments d'Okazaki**.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

Vue générale : La réplication de l'ADN se fait dans les deux directions à partir des origines de réplication.

Le complexe **DNA primase (RNA Pol primase + DNA Pol alpha)** synthétise les **amorces** aux origines de réplication pour les 2 brins.

Il constitue le **primosome** en s'associant à

- **l'hélicase,**
- **RPA (replication protein A)**
- **topoisomérase**

- **Sur le brin précoce (Bleu)** les amorces (**ARN/ADN**) sont allongées de 5' vers 3' par l'addition des nucléotides par **l'ADN Pol δ** jusqu'à l'origine de réplication suivante.

- **Sur le brin tardif (rouge)** l'ADN est synthétisé en plusieurs fragments (Okazaki) à partir de nombreuses amorces entre 2 origines de réplication.

INTRODUCTION

**I. PRINCIPES
GENERAUX**

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

UN PROCESSUS SEMI-DISCONTINU

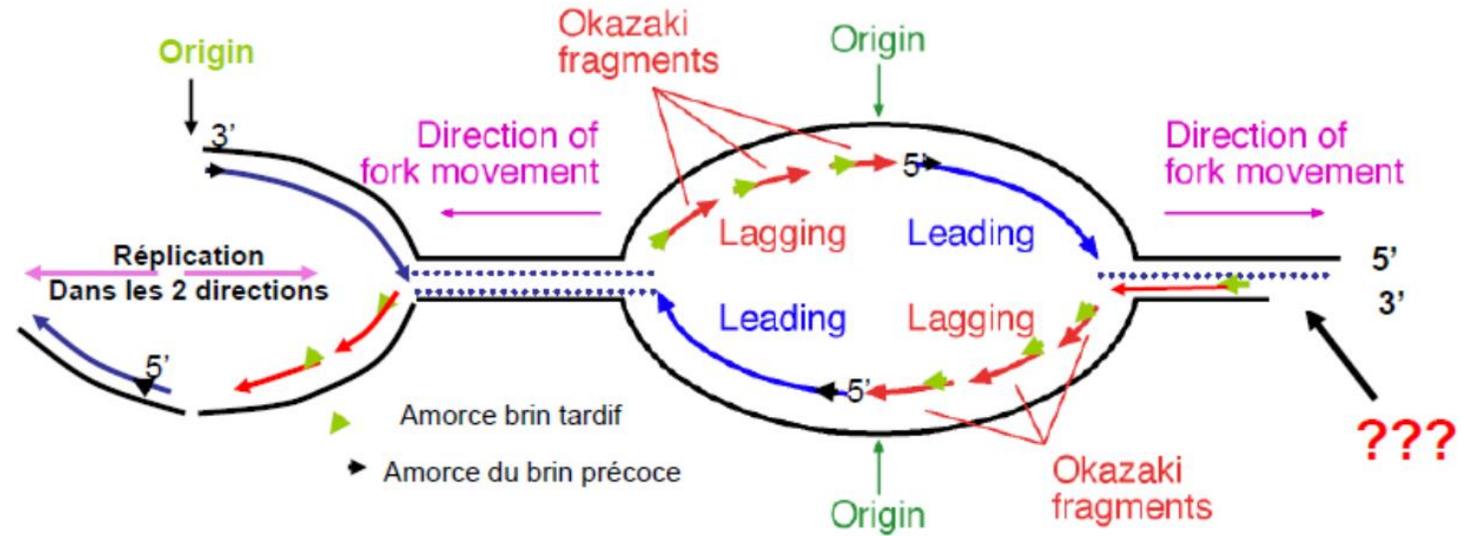
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



- **Sur le brin précoce (Bleu)** les amorces (ARN/ADN) sont allongées de 5' vers 3' par l'addition des nucléotides par l'ADN Pol δ jusqu'à l'origine de réplication suivante.
- **Sur le brin tardif (rouge)** l'ADN est synthétisé en plusieurs fragments (Okazaki) à partir de nombreuses amorces entre 2 origines de réplication.
- Les amorces seront détruites par des **endonucléases** (RNase H, FEN I) car les DNA Pol eucaryotes n'ont pas d'activité 5'-3' exonucléase. Les fragments d'Okazaki sont ensuite reliés entre eux par la **DNA ligase I**.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

**II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION**

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

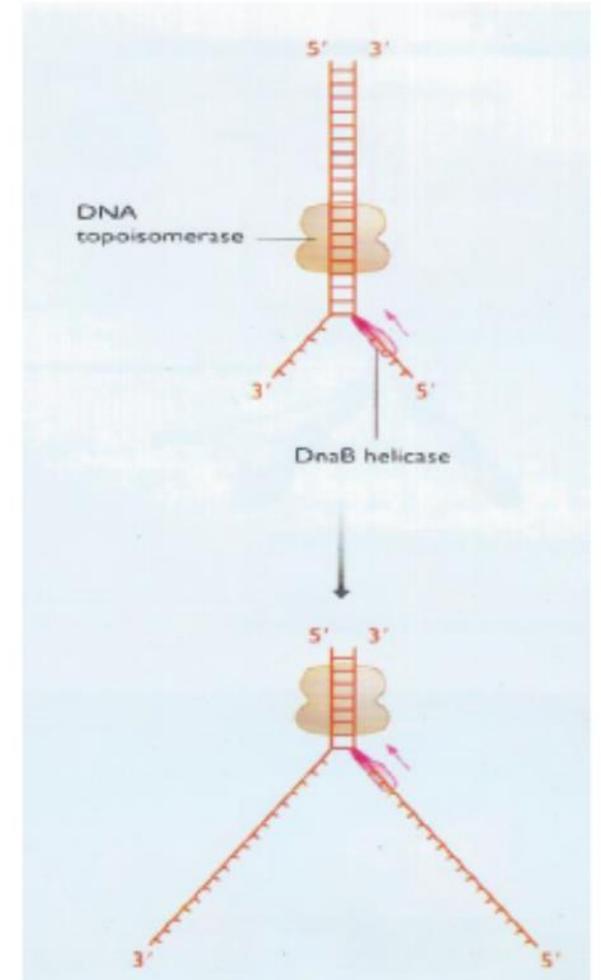
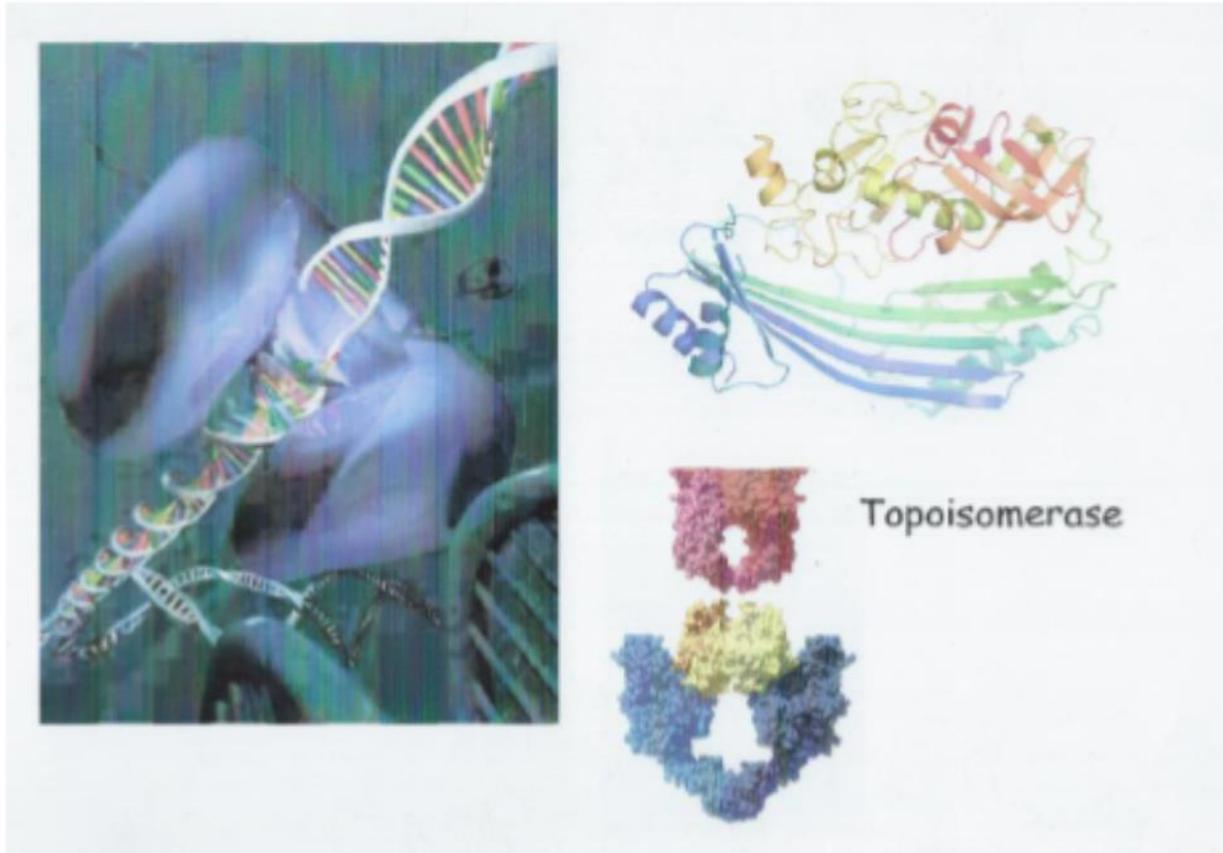
CONCLUSION

2. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

DEROULEMENT/OUVERTURE DE L'ADN

Ouverture de l'ADN : hélicases

Désenroulement : topoisomérase (gyrase chez *E. coli*)



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

LA REACTION DE POLYMERISATION

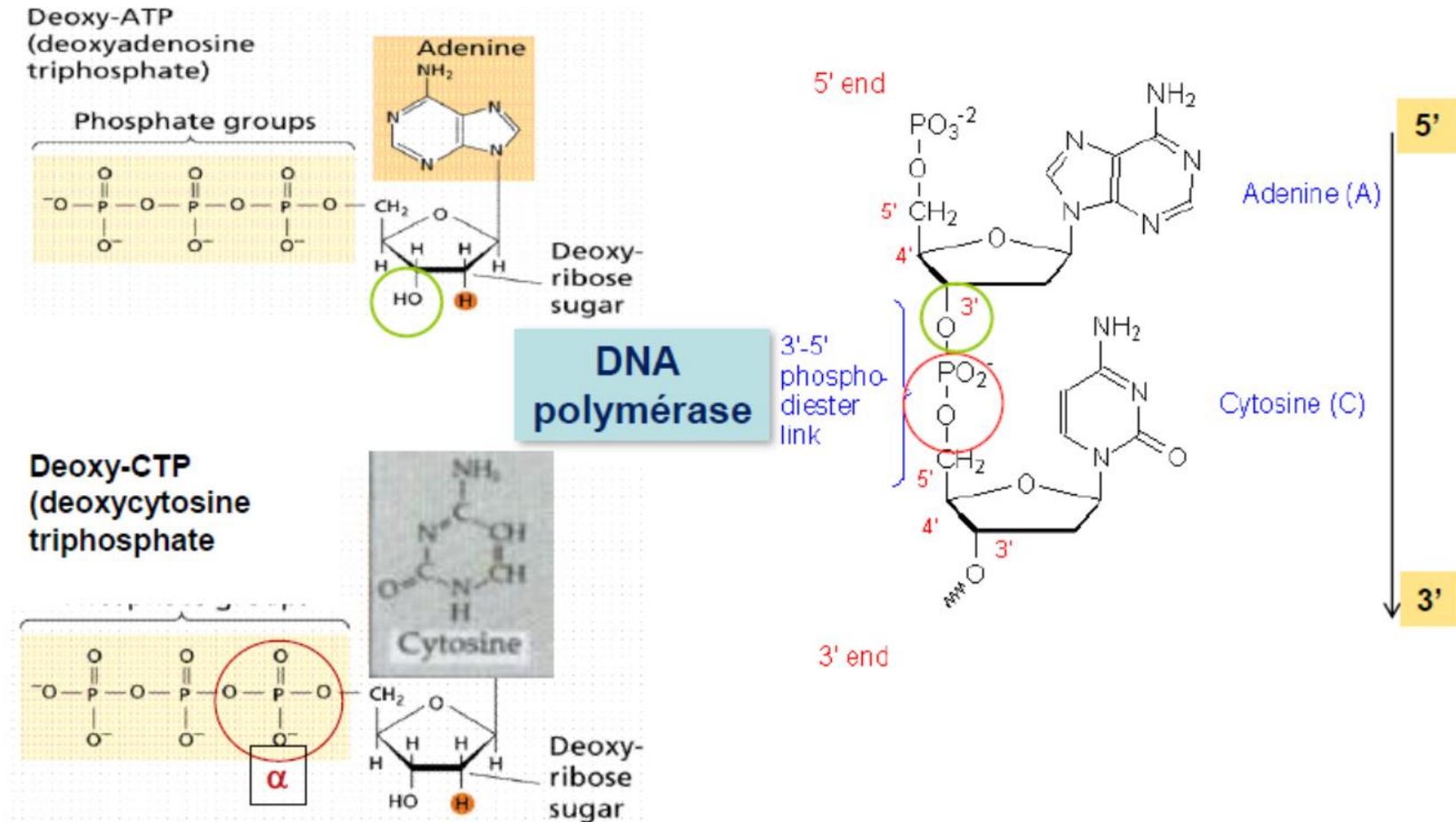
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



Activité DNA-polymérase:

- Liaison phosphodiester entre 3'-OH et 5'-P (direction 5' vers 3')
- Libération de pyrophosphate

AMORCAGE PAR UNE PRIMASE ET REACTION DE SYNTHÈSE

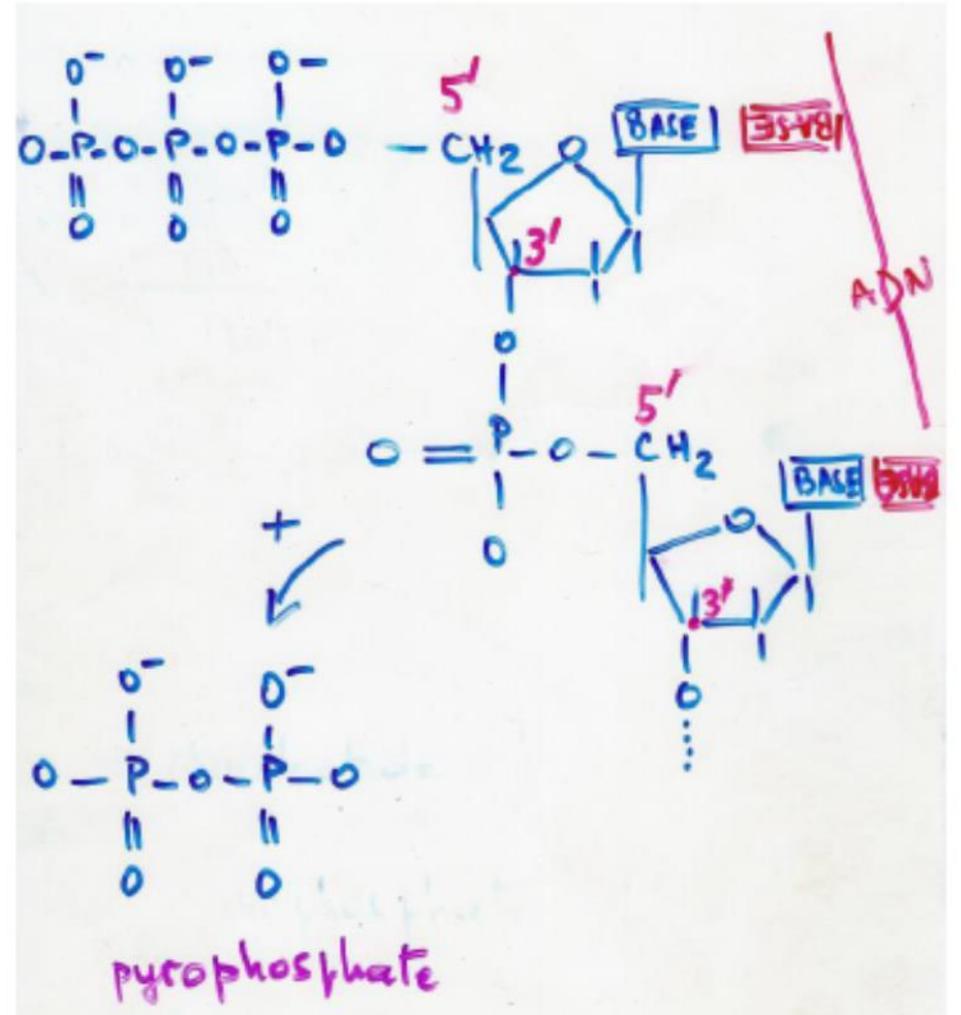
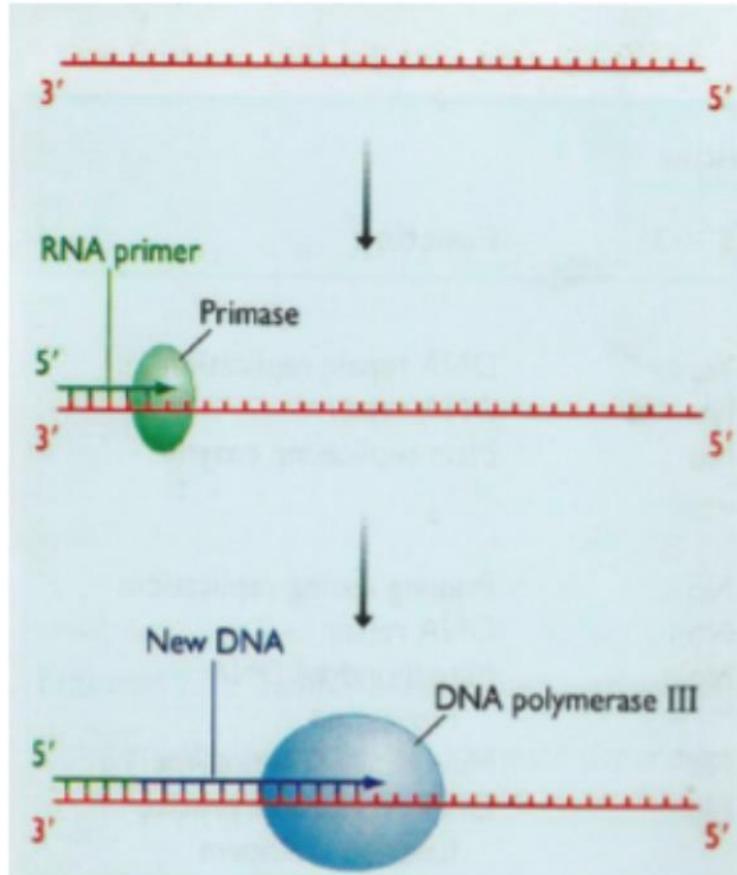
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MÉCANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



LA JONCTION AMORCE:MATRICE

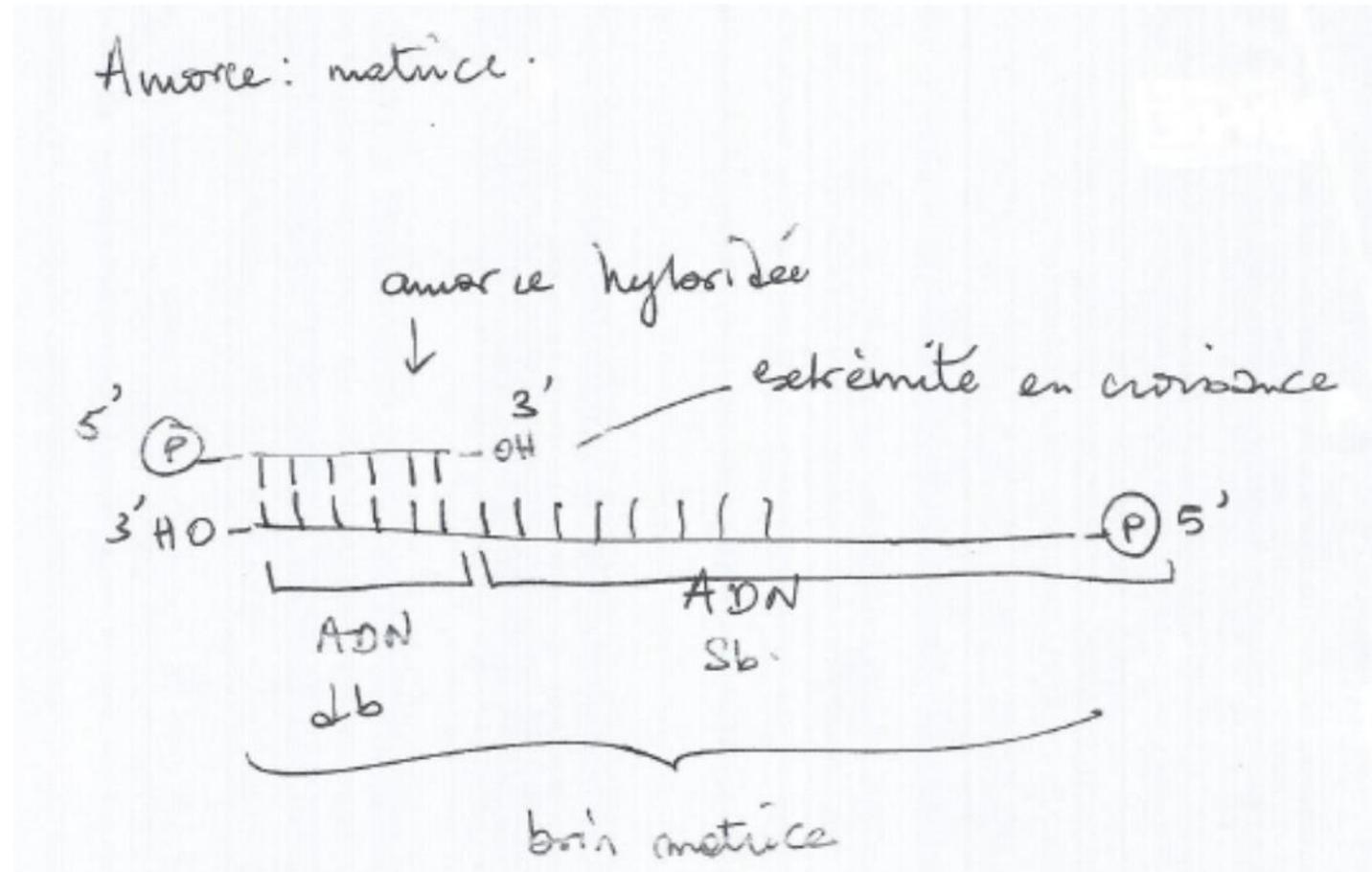
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



De manière générale, l'amorce est de nature ARN ou ADN.
L'ADN polymérase de la réplication (la réplicase) utilise des amorces ARN.

LES ENZYMES PROCARYOTES : L'ADN POL I (*E. coli*)

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

L'ADN polymérase de *E. coli* possède 3 activités enzymatiques

- 1) Polymérisation 5' → 3'
- 2) Exonucléase 3' → 5' (Proofreading = activité de relecture)
- 3) Exonucléase 5' → 3' (élimination des portions d'ADN endommagé)

Klenow Fragment

1	323	Klenow Fragment	A.A. 928
5' to 3' Exo.	5' to 3' Pol & 3' to 5' Exo		

Une protéolyse ménagée (subtilisine ou trypsin) coupe la polymérase I en deux fragments biologiquement actifs.

Fréquence des erreurs de Pol II de *E. coli* = 1/10⁹ bp

La translation de coupure (Nick translation)

ADN polymérase I

- coupure extrême 3' OH (et 5' P)
- donc synthèse d'ADN possible 3' OH → 5' P
- allongement du segment d'ADN
- dégradation par des nucléases de l'ancien brin

LES ENZYMES PROCARYOTES : L'ADN POL III (*E. coli*)

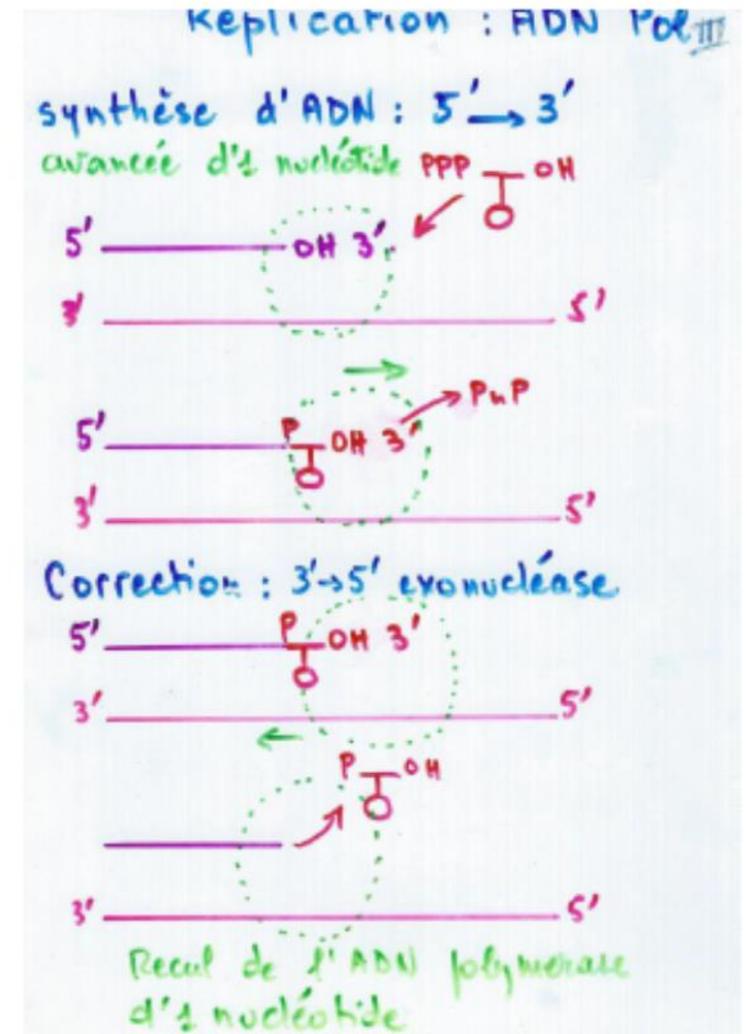
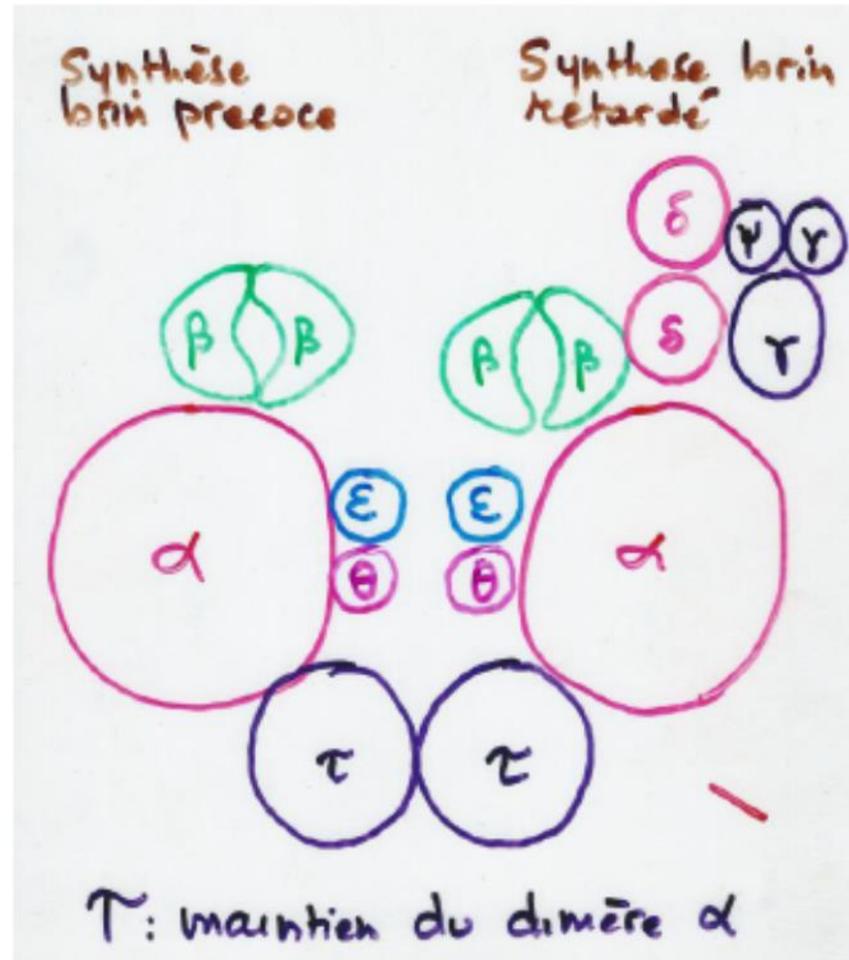
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



Enzymes : 3 ADN Polymérase « principales » chez les eucaryotes

Delta : enzyme principale de la réplication chez les eucaryotes

Alpha : enzyme qui allonge les amorces ARN synthétisées par la primase

Gamma : enzyme de la réplication de l'ADN mitochondrial

Beta: enzyme de la réparation de l'ADN

Epsilon: même fonction que Delta

Rappel : chez les bactéries ADN Pol I et Pol III (I à V)

Substrats : les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP)

-desoxy-adenosine triphosphate (dATP)

-desoxy-guanosine triphosphate (dGTP)

-desoxy-cytidine triphosphate (dCTP)

-desoxy-thymidine triphosphate (dTTP)

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

**II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION**

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

SYNTHESE DES FRAGMENTS D'OKAZAKI ET LEUR ELIMINATION

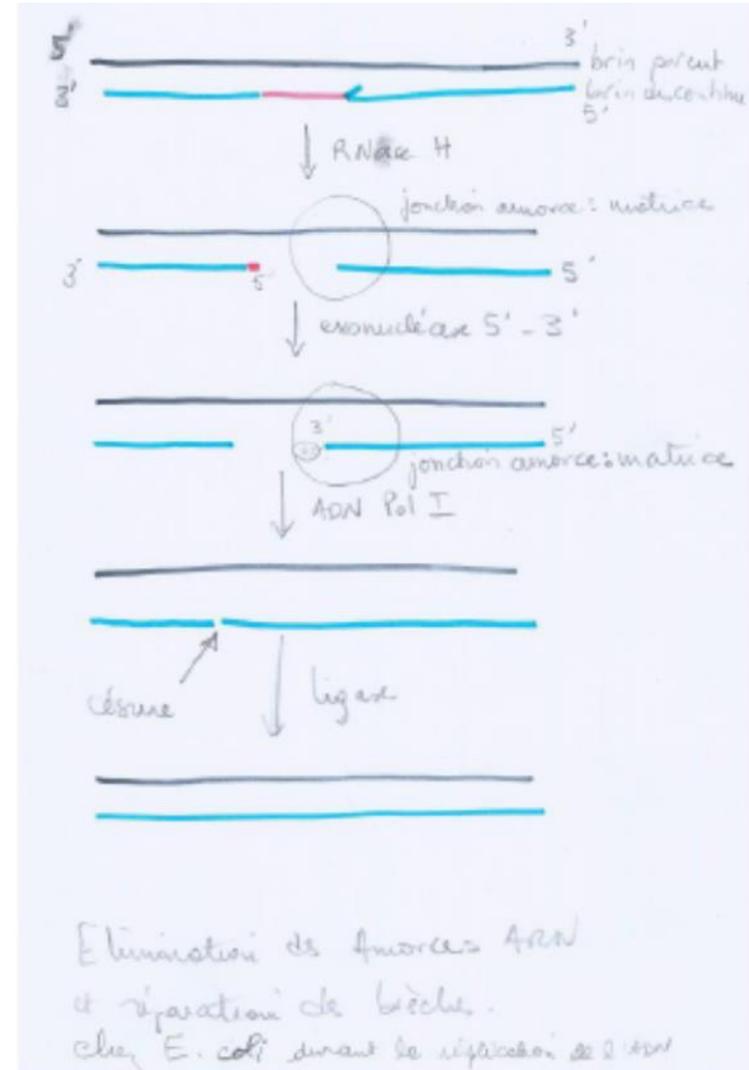
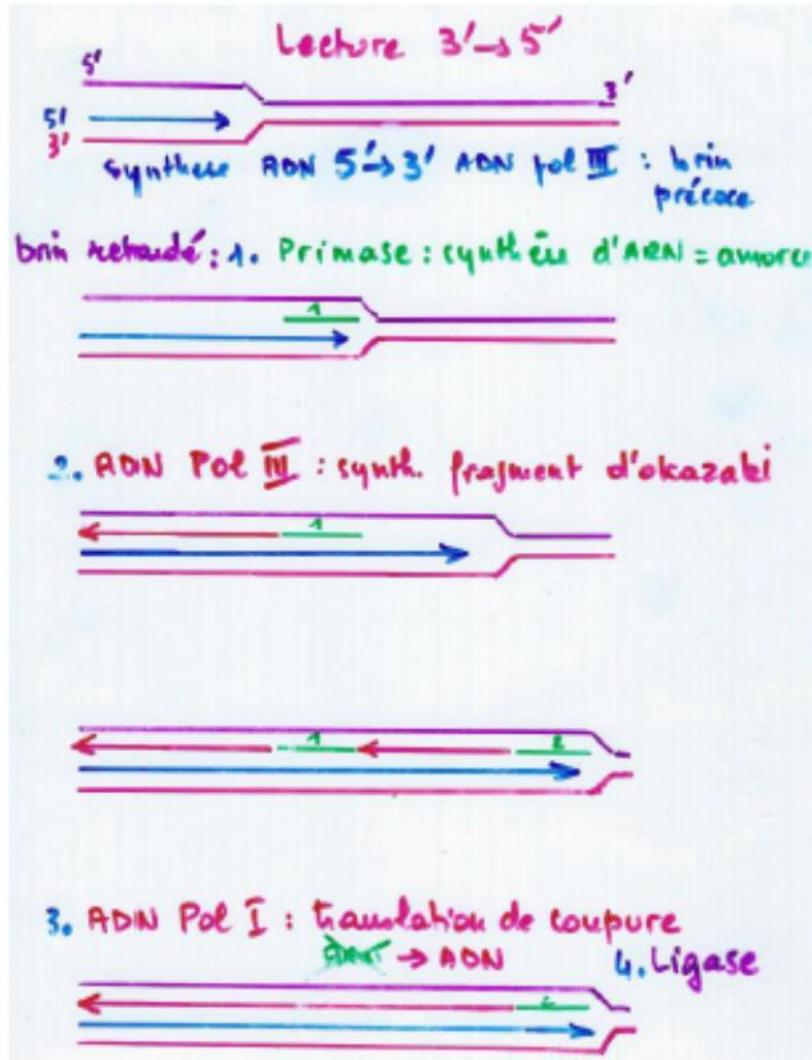
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



LES ANNEAUX COULISSANTS

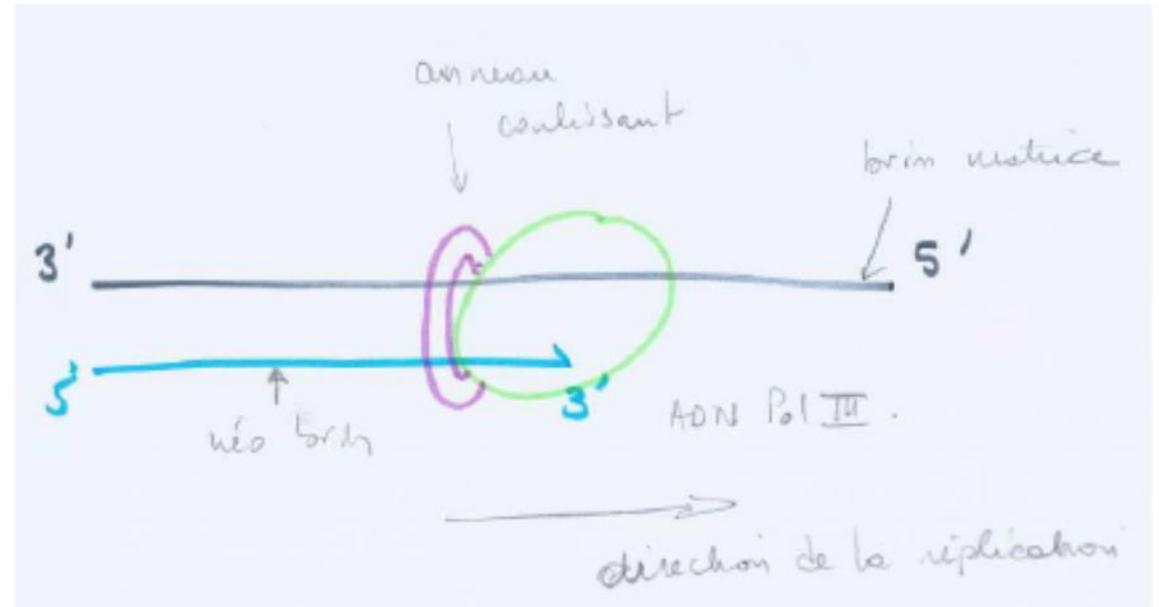
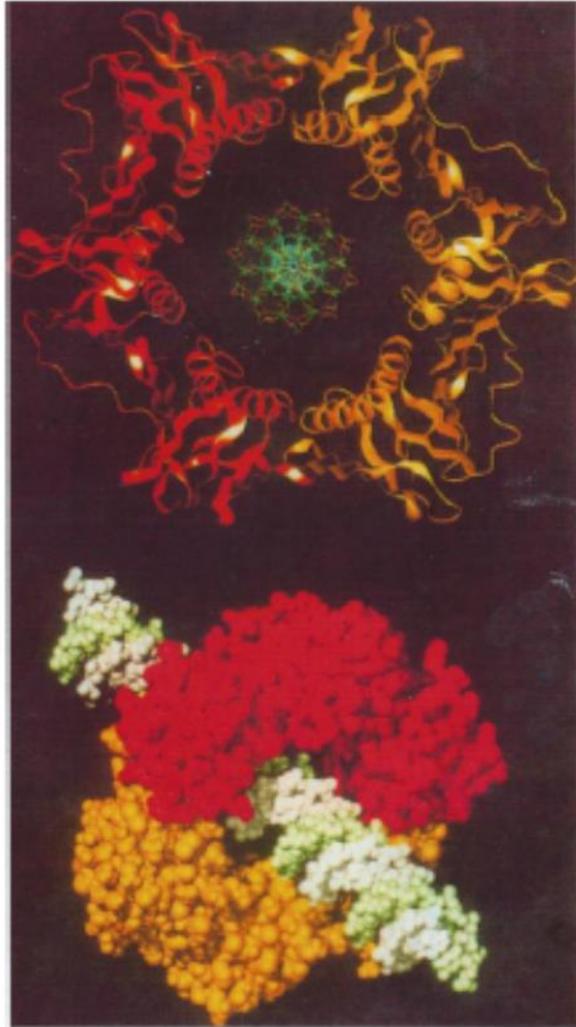
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

**III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION**

CONCLUSION

3. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

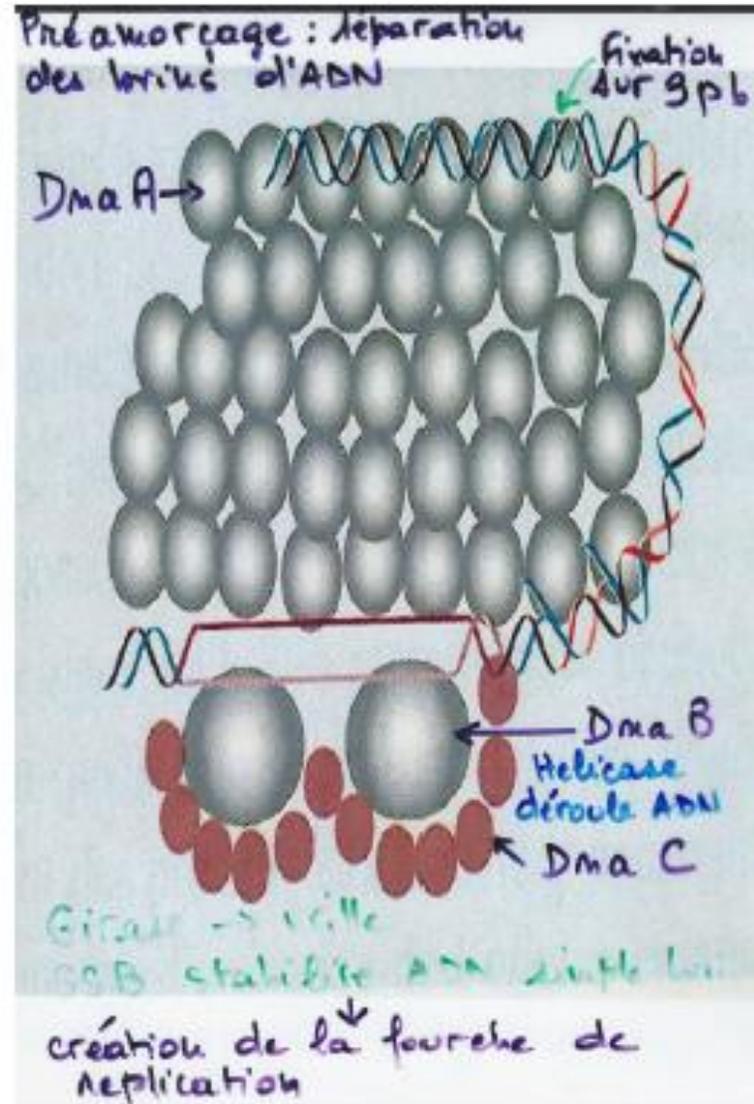
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



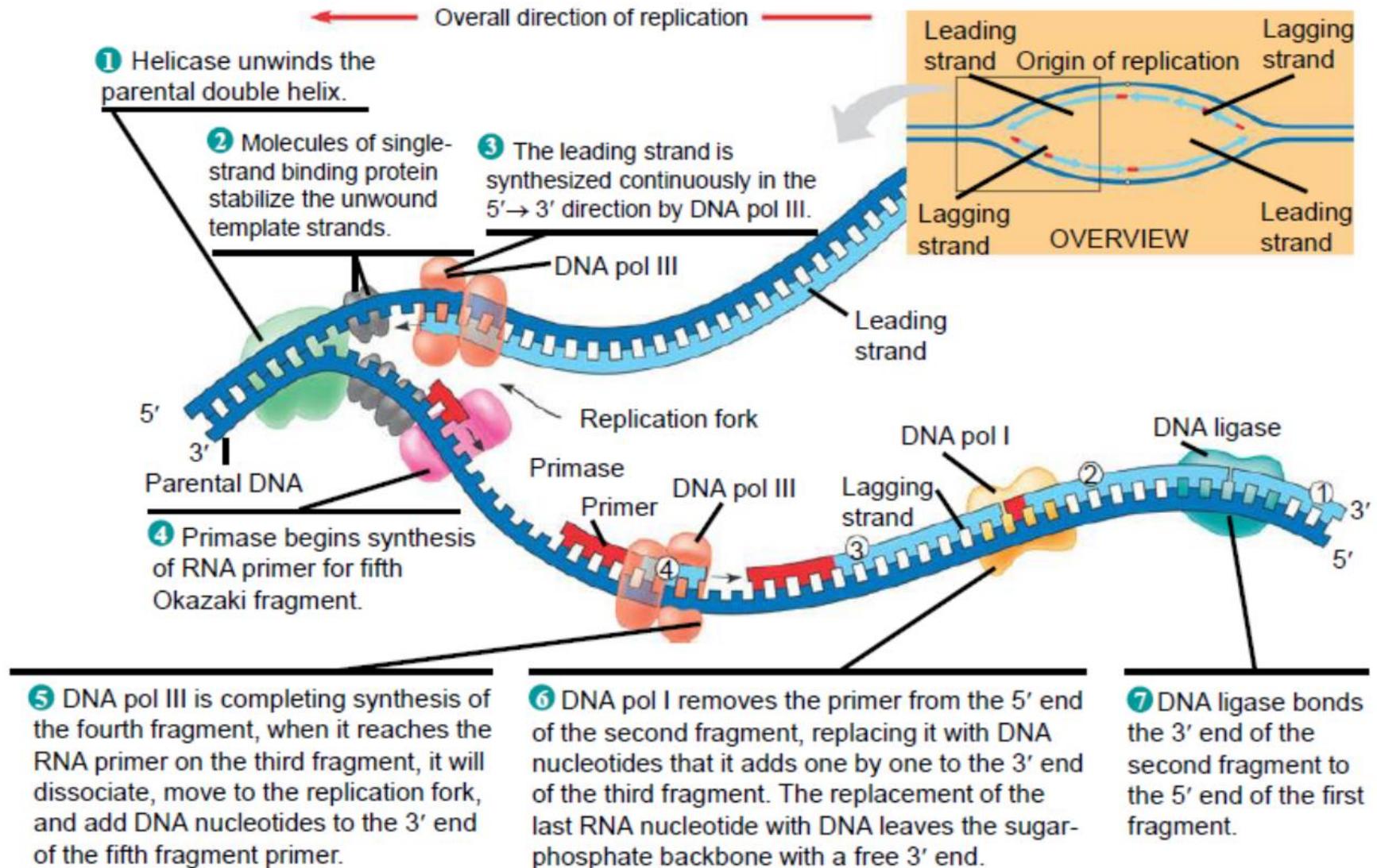
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MÉCANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



PROGRESSION DE LA FOURCHE DE REPLICATION

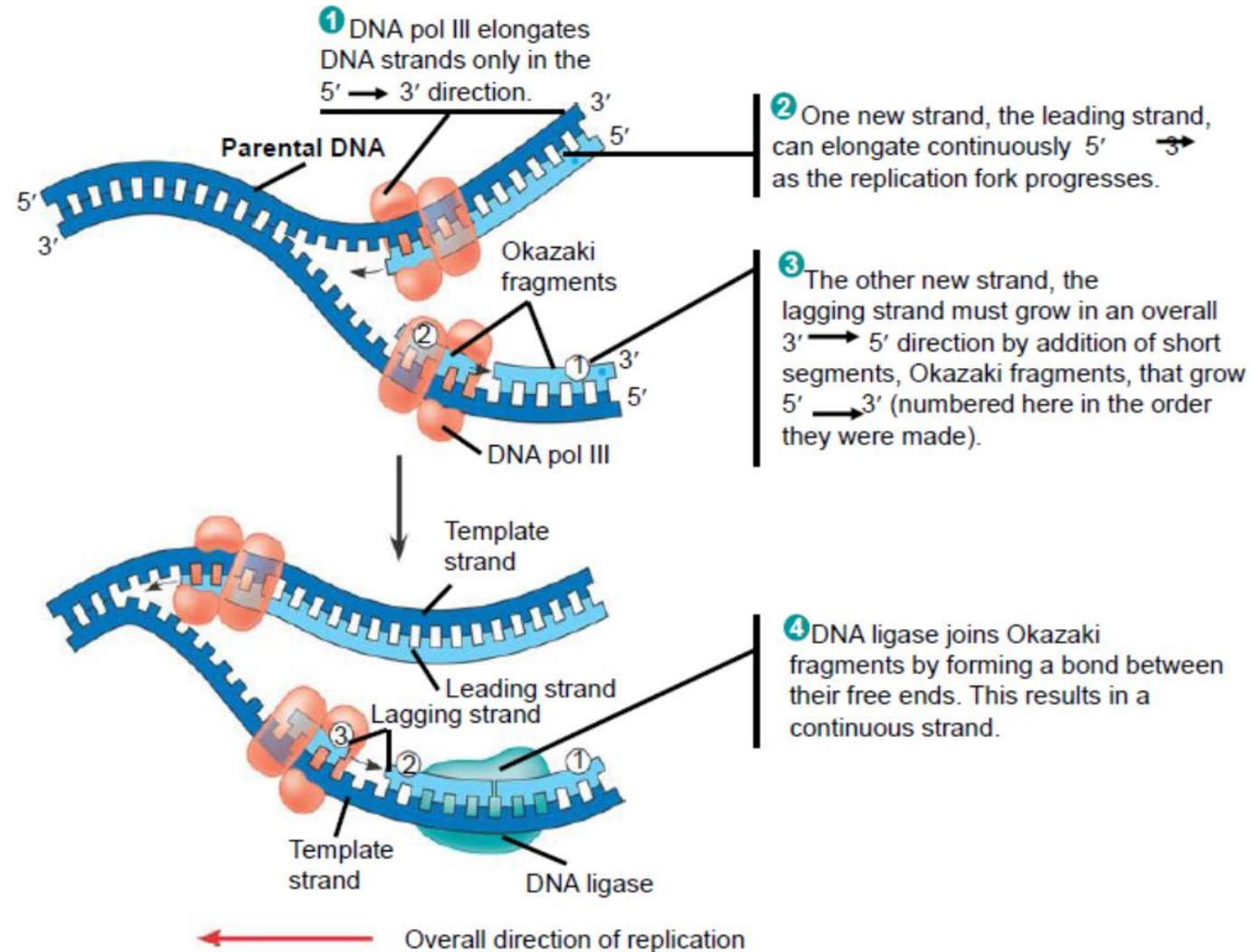
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



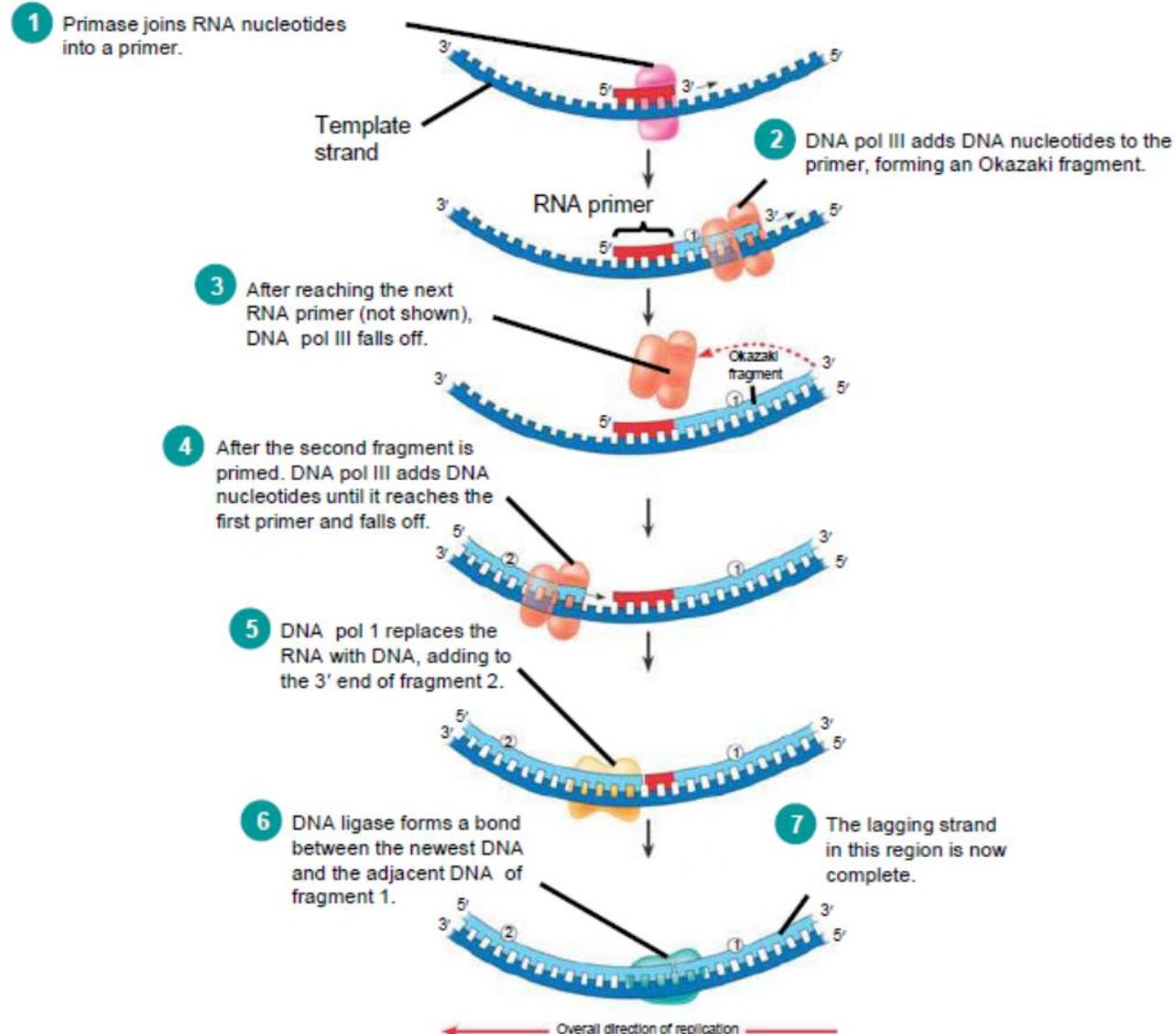
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



LE REPLISOME PROCARYOTE : MODELE DU TROMBONE

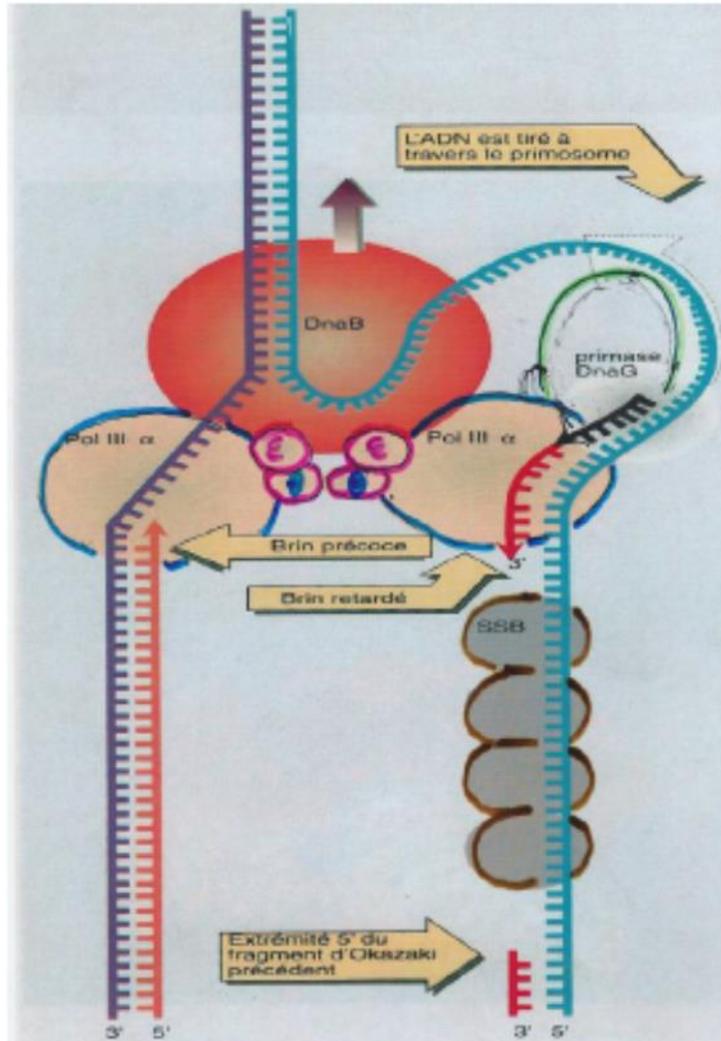
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



- 1) L'hélicase d'une fourche de réplication d'E. coli se déplace dans le sens 5'-3' sur la matrice du brin discontinu.
- 2) Une ADN pol III holoenzyme est mise en place sur le complexe hélicase / jonction amorce / matrice. Les protéines ADN pol III et hélicase sont en contact (par l'intermédiaire des deux protéines tau qui servent aussi à maintenir les deux noyaux de l'ADN pol III). Un des noyaux de Pol III est responsable de la synthèse du brin continu, et l'autre du brin discontinu.
- 3) Au fur et à mesure que l'ADNsb est formé par le déplacement de l'hélicase, celui-ci est recouvert de SSB.
- 4) Périodiquement, la primase rejoint l'hélicase et synthétise une amorce ARN complémentaire de la matrice du brin discontinu. Au fur et à mesure que le brin discontinu est copié, il se forme une boucle d'ADNsb qui grandit : l'ADN est tiré à travers le replisome.
- 5) Quand l'ADN pol III du brin discontinu a terminé la synthèse d'un fragment d'Okazaki, elle se sépare de l'anneau coulissant et de l'ADN mais reste liée au poseur d'anneaux coulissants.
- 6) La région constituée par la matrice du brin discontinu et l'amorce ARN la plus récente devient la cible du poseur d'anneaux coulissants qui dépose un nouvel anneau coulissant.
- 7) L'ADN pol III du brin discontinu prend contact avec ce nouvel anneau et commence la synthèse du nouveau fragment d'Okazaki. Pendant ce temps, la synthèse du brin à été rapidement réalisée.

REGULATION DE L'INITIATION DE LA REPLICATION PROCARYOTE

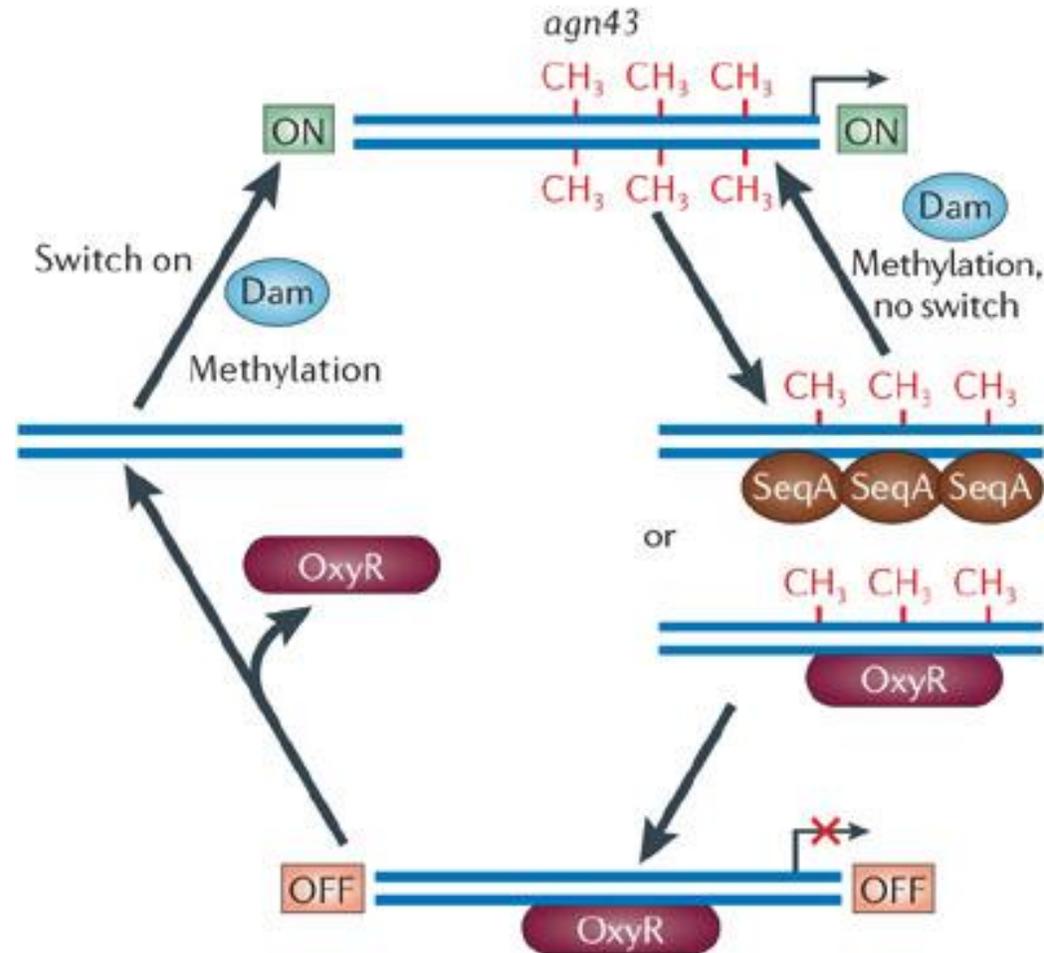
INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION



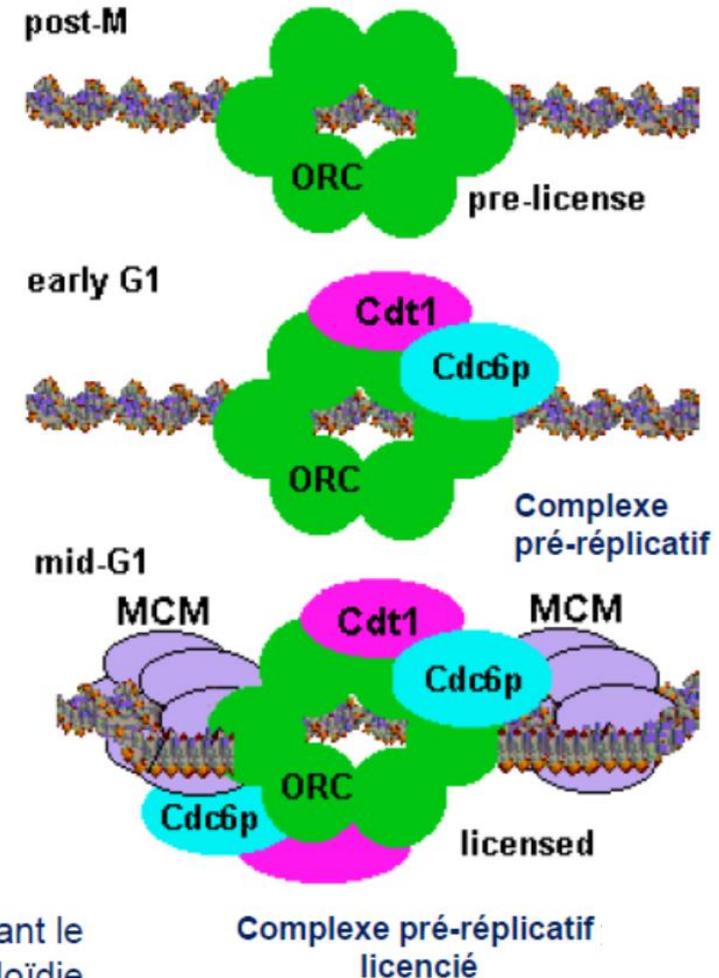
G1 : Formation du complexe pré-réplicatif et son activation sur les origines de réplication

G1

Le complexe **ORC** (complexe de reconnaissance de l'origine de réplication) est fixé sur **ARS** au niveau de A et B1 (ORC=DnaA chez bactéries)

Fixation de deux complexes : **Cdc6p** et **Cdt1** qui vont servir d'ancrage pour les protéines du complexe **MCM** (activité hélicase)

MCM « autorise » l'initiation de la réplication : le complexe pré-réplicatif est « licencié »



Pas de réinitiation possible avant le retour en G1. Contrôle de la ploïdie

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

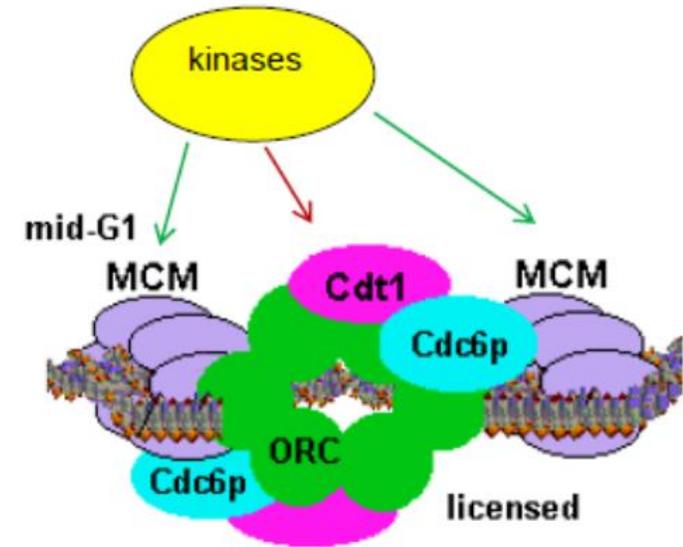
G1/S

Des Kinases

1) **activent** le complexe pré-réplicatif par phosphorylation de MCM (ouverture de la double hélice)

-initiation de la réplication : Recrutement des **DNA polymérase alpha** puis **delta** et la **RNA primase**: **Réplication**

2) **désactivent** le complexe ORC par phosphorylation de Cdt1 et Cdc6p qui entraîne leur dégradation



Complexe pré-réplicatif
licencié

LES AMORCES CHEZ LES EUCARYOTES

a) Synthèse des amorces en 2 temps

RNA polymérase :

synthèse d'une amorce ARN

DNA pol α : allongement des amorces RNA

activité 5'-3' DNA Pol

pas d'activité 3'-5' exonucléase (risque d'erreurs)

b) Allongement des amorces : **DNA pol δ**

(enzyme principale de la réplication)

activité 5'-3' DNA Pol

activité 3'-5' exonucléase

c) Digestion des amorces ARN et de leur

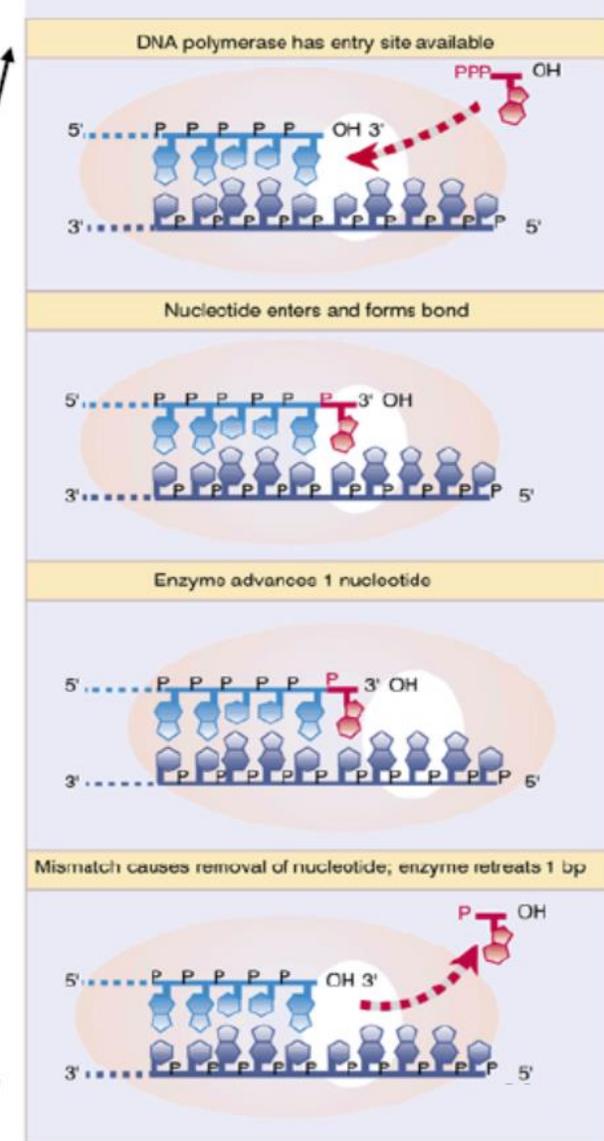
prolongement synthétisé par la DNA Pol α (qui a fait des erreurs) par des endonucléases (RNase H et/ou Flap endonucléase). DNA pol β ou δ remplit les espaces

d) Ligation des fragments (5'P-3'OH) par

DNA ligase.

Procaryotes : Pol III équivalent de pol delta eucaryote

Pol I détruit les amorces ARN et termine réplication



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

LE PROBLEME DES TELOMERES / TELOMERASE

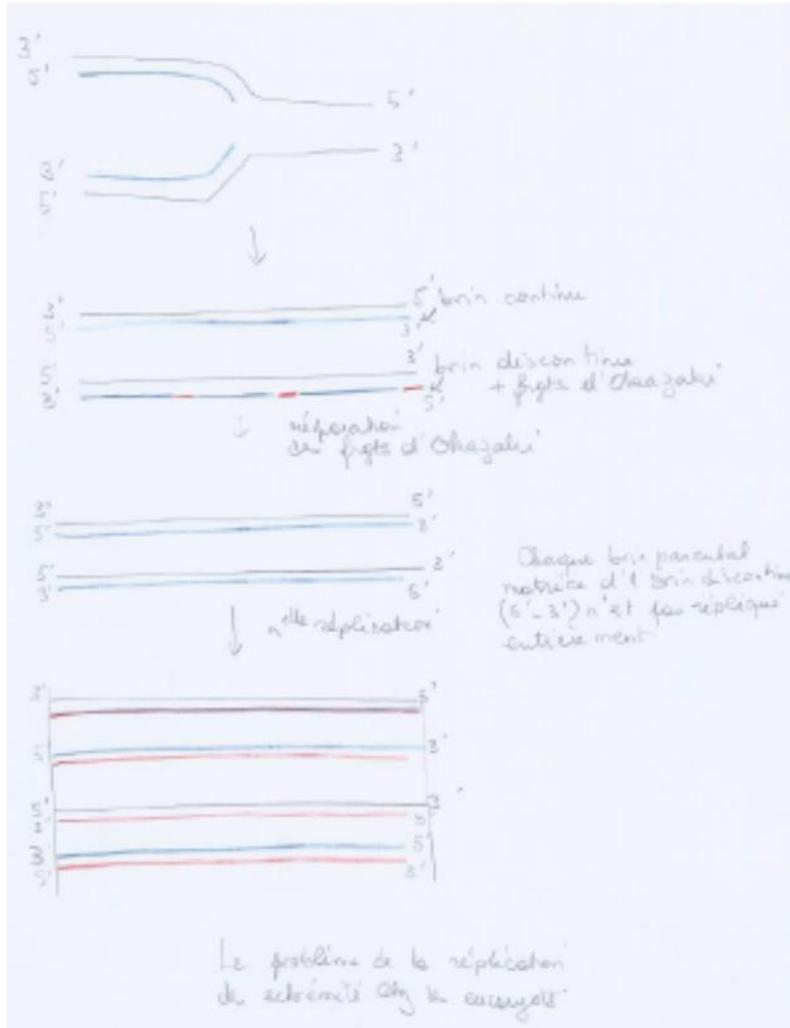
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION



Low telomerase activity
Without telomerase the chromosomes are shortened each time the cell divides.

Mutations in genes encoding telomerase or telomere-binding proteins are found in a group of rare inherited diseases with manifestations in bone marrow, lung and skin. These diseases are linked to the presence of short telomeres and to defects in stem cell maintenance. In the bone marrow insufficient cell divisions in the stem cell compartment lead to severe anemia.

High telomerase activity in cancer cells
Cancer cells can divide infinitely and therefore must preserve their telomeres. Telomerase activity is increased in 80-90% of cancers. Hope is raised that new cancer therapies can be developed by targeting telomerase. Clinical trials are underway including studies evaluating vaccines directed against cells with elevated telomerase.

Malignant melanoma



Photo: U. Montan
Elizabeth H. Blackburn
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Carol W. Greider
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Jack W. Szostak
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009 was awarded jointly to Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider and Jack W. Szostak "for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase".

Photos: Copyright © The Nobel Foundation

LE PROBLEME DES TELOMERES

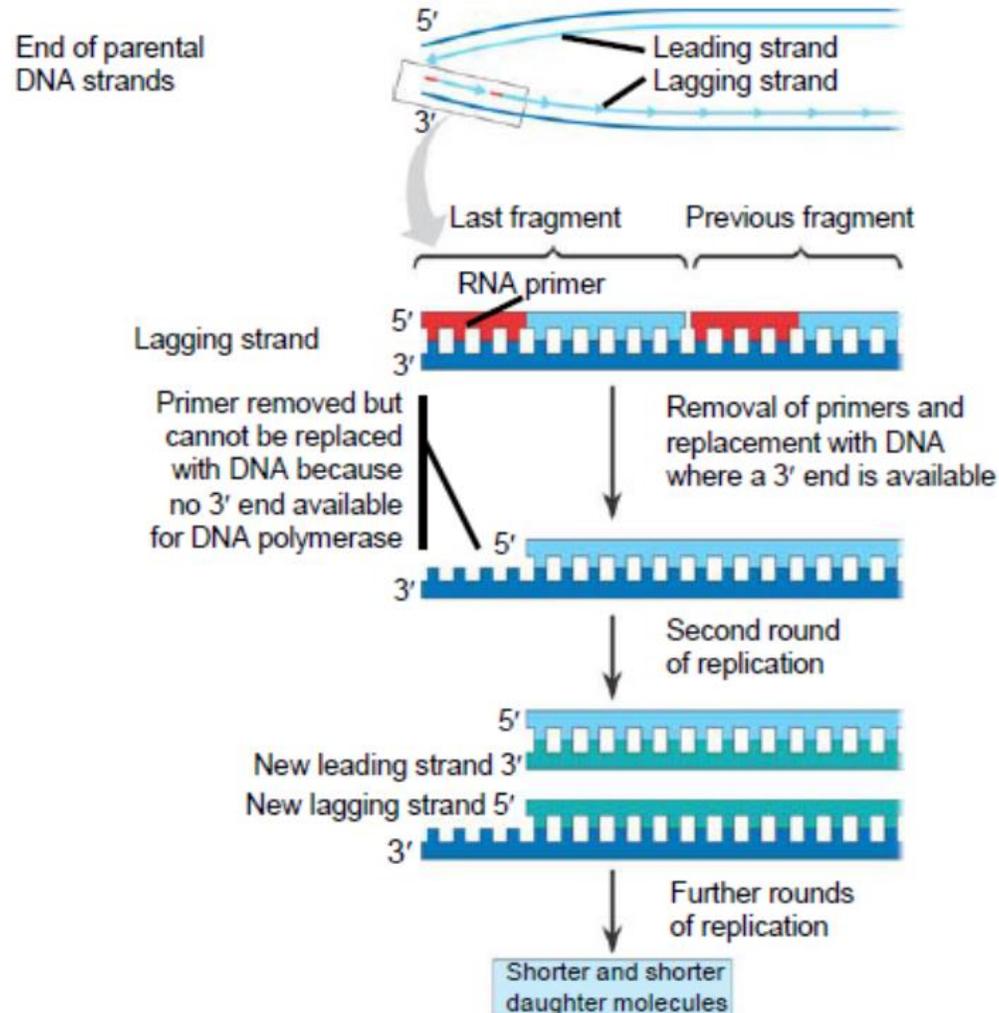
INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

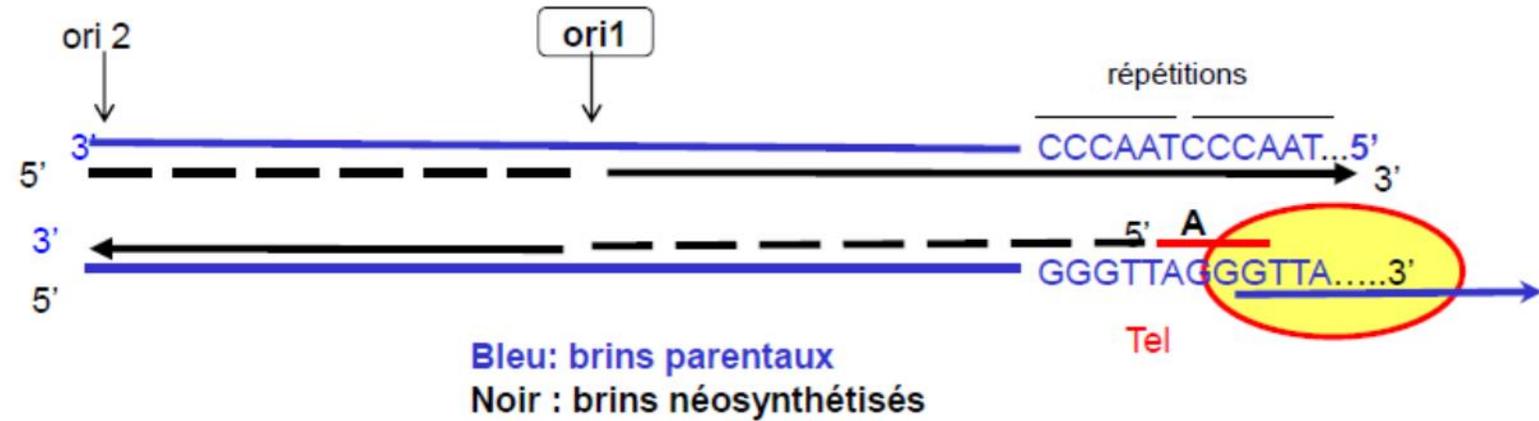
CONCLUSION



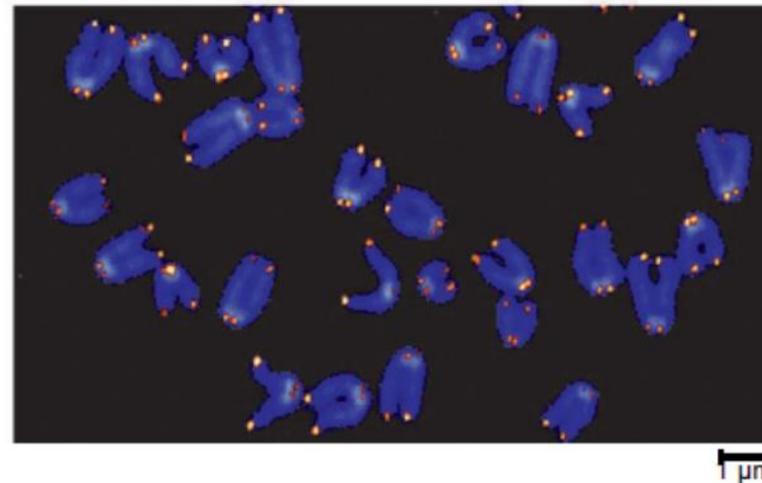
Les extrémités sont raccourcies à chaque cycle de réplication

Les télomères sont ajoutés pour limiter l'érosion

LE PROBLEME DES TELOMERES



Téломères: répétitions groupées du motif GGGTTA aux extrémités de la double hélice sur le brin parental



1 μm

INTRODUCTION

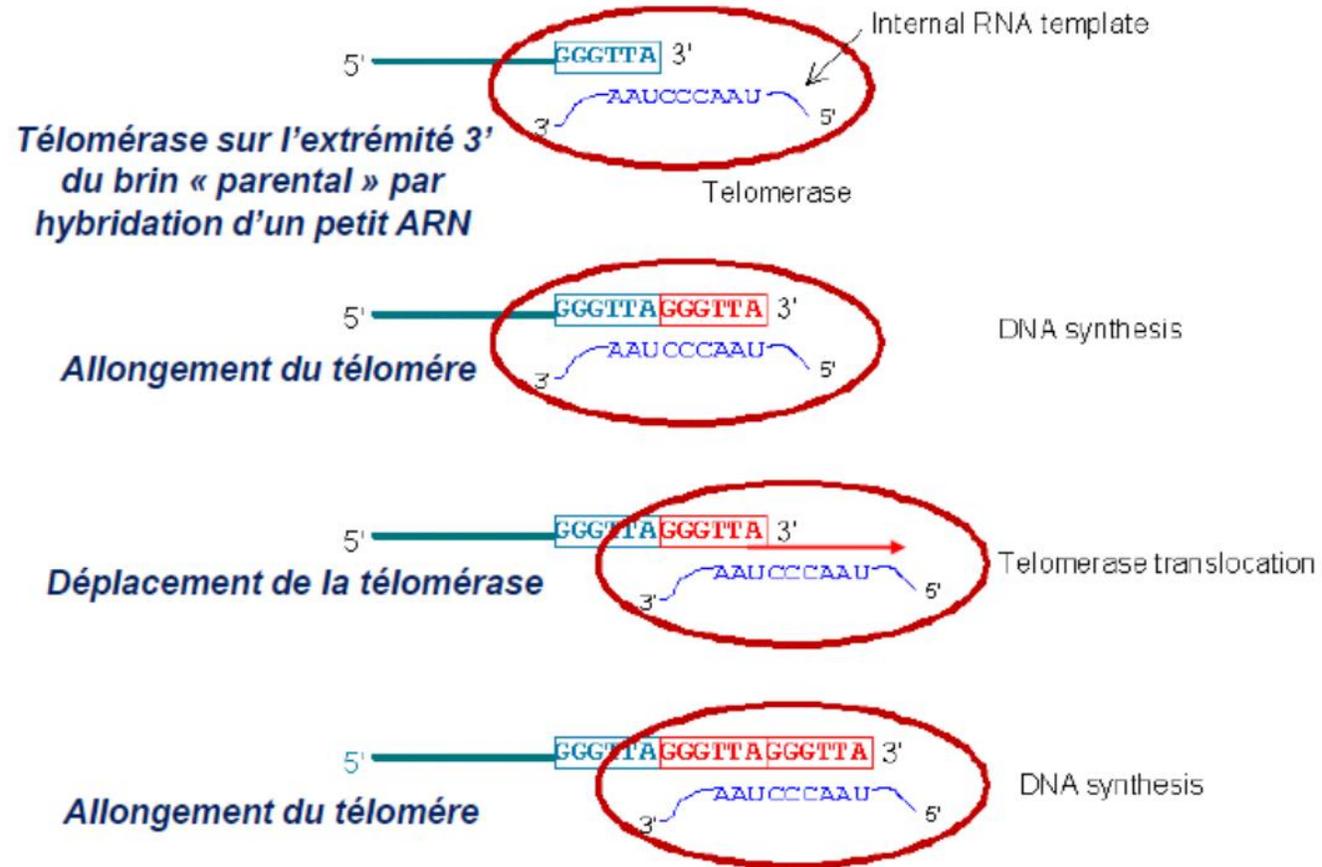
I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

Complexe Télomérase: transcriptase reverse (TERT) + petit ARN (TERC)



INTRODUCTION

I. PRINCIPES GÉNÉRAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

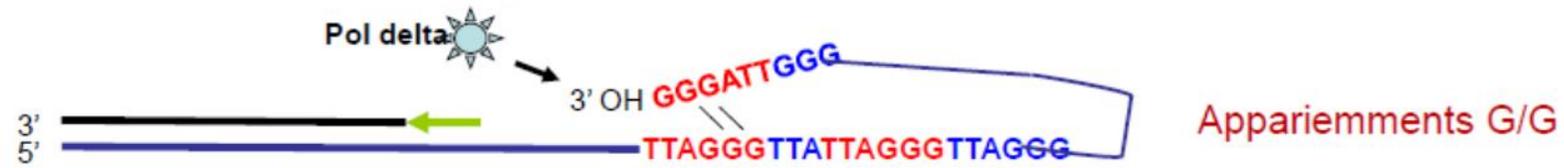
CONCLUSION

LA TELOMERASE

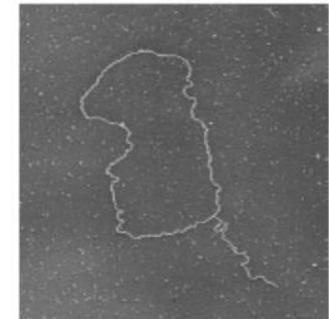
Formation d'une boucle sur l'extrémité 3' du brin parental



L'extrémité 3'OH du brin parental s'hybride sur elle-même et sert d'amorce à la polymérase delta



- L'amorce ARN/ADN (verte) est déplacée par la polymérase, digérée par des nucléases
- (RNase H / Flap_endonucléase)
- Les extrémités des 2 brins sont liées par une ligase
- Les nucléotides de la boucle sont digérés par la nucléase S1
- Les extrémités sont reconstituées



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

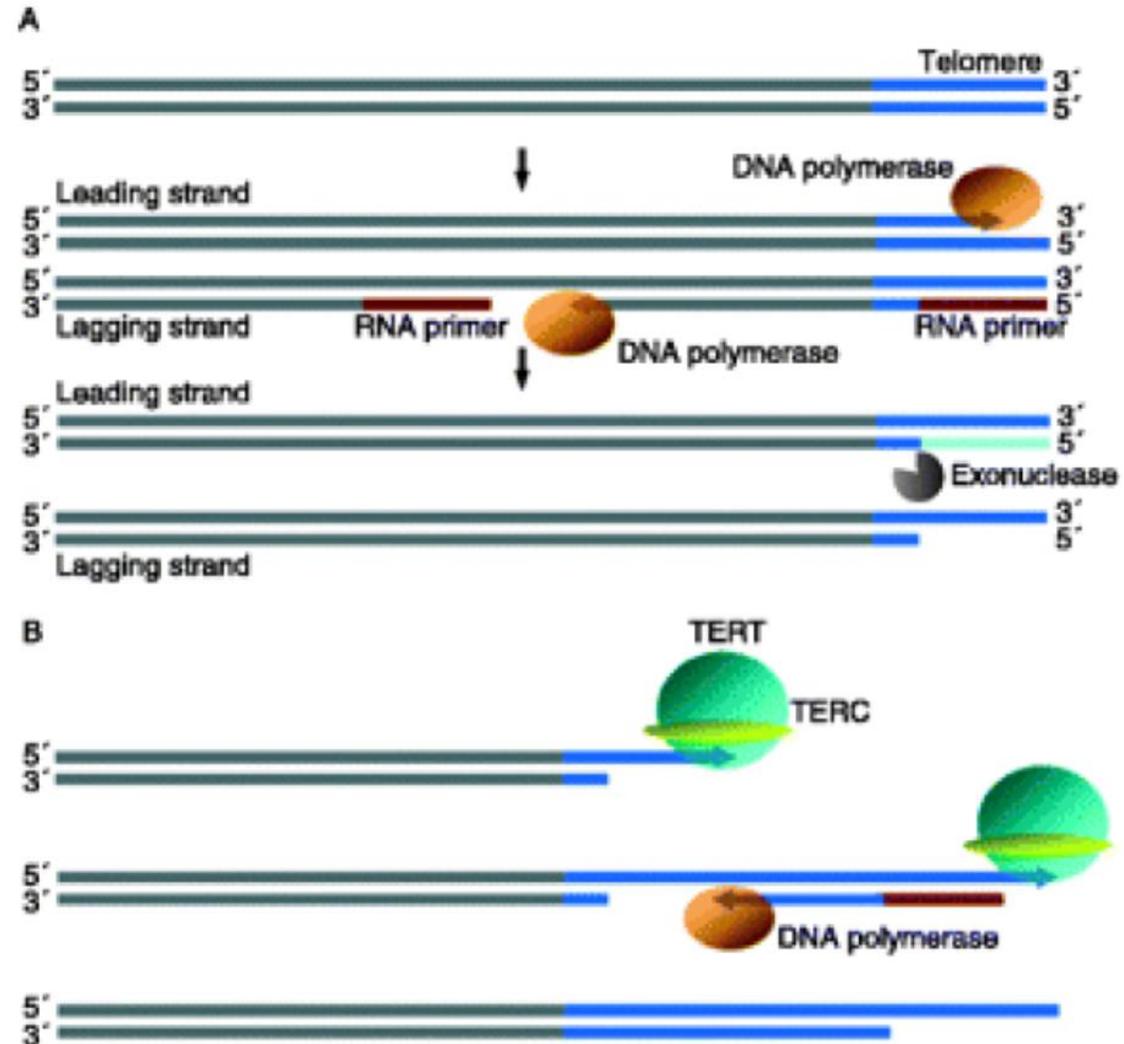
II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

MECANISME ALTERNATIF

Alternative: sans formation de boucle



INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

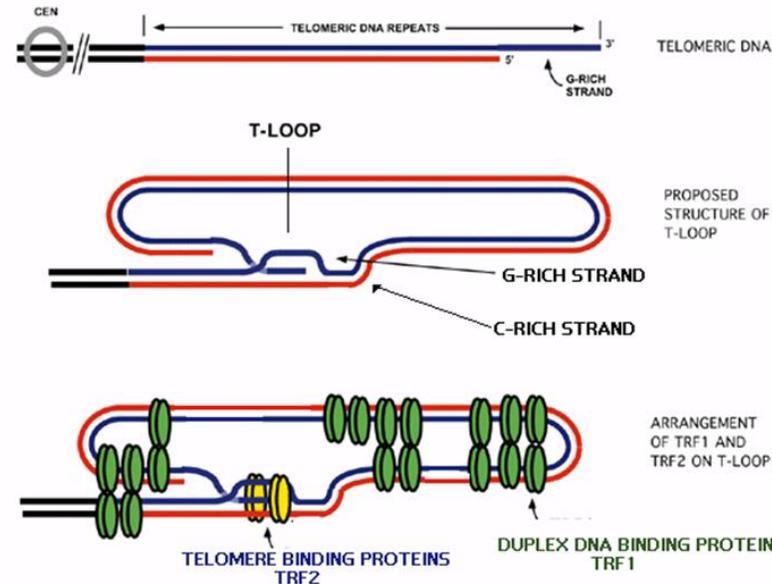
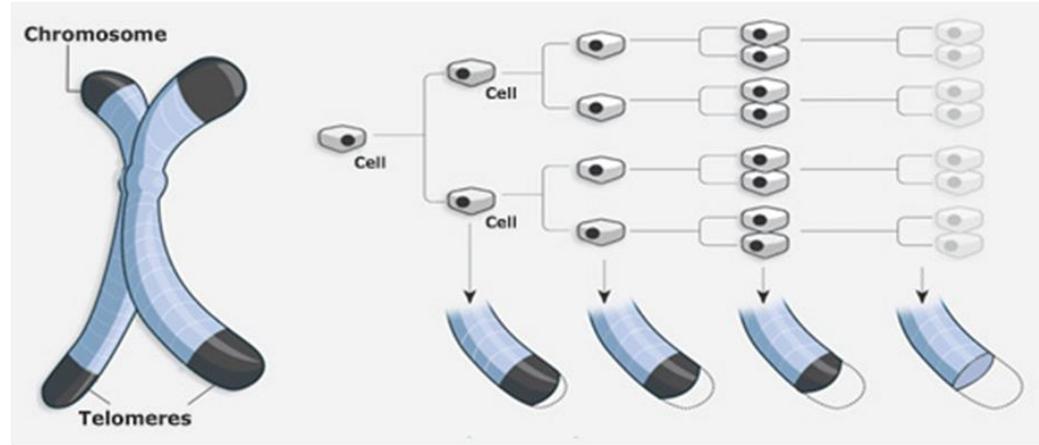
- Télomères et maladie
 - Vieillessement de la cellule: arrêt de la division et/ou apoptose
 - Perte d'information génétique
 - Recombinaison entre chromosomes (instabilité, aneuploïdie)
 - Phénotype cancéreux
 - Explique le "**Hayflick limit**" : nombre de divisions des cellules en culture
 - Télomérase: active dans certains types cellulaires: souches, syst. Immunitaire
 - Télomérase: très active en cellules cancéreuses (immortalité, aberrations chromosomiques). Inhibiteurs: agents thérapeutiques
 - **Mutations** de TERT et TERC: dyskératose congénitale, anémie aplasique, fibrose pulmonaire, cirrhose hépathique
 - **Mécanisme alternatif (ALT, alternative lengthening of telomeres)**: transfert de télomères entre chromatides



The Scientist. Mai 2012

LE PROBLEME DES TELOMERES

Les télomères se raccourcissent au cours des divisions car l'ADN n'est pas circulaire et l'ADN polymérase ne peut faire qu'une synthèse de 5'-3'



Les télomères protègent les extrémités des chromosomes en empêchant qu'ils soient reconnus comme une cassure double brin. Pour cela, il y a formation d'une D-loop.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

INTRODUCTION

I. PRINCIPES GENERAUX

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

CONCLUSION

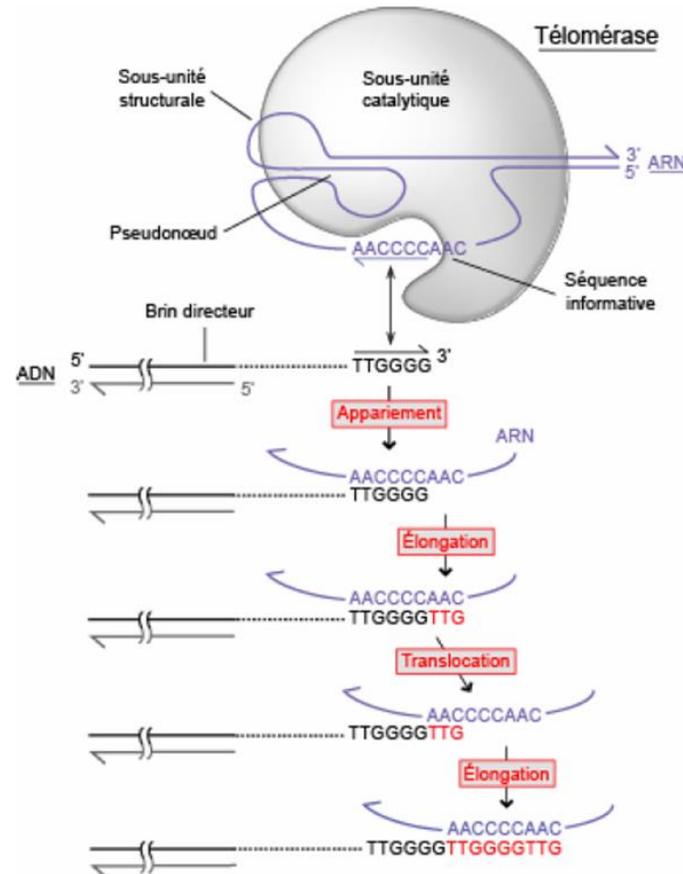


Fig. 2.13. Fonctionnement de la télomérase de *Tetrahymena*.

L'enzyme comporte une sous-unité structurale, constituée par une molécule d'ARN, et une sous-unité catalytique, possédant une activité de rétrotranscriptase. Trois régions de l'ARN s'associent par appariement de bases pour former un pseudonœud. Tout près de l'extrémité 5' de la molécule, se trouve une séquence de neuf bases (CAACCCCAA), que la sous-unité catalytique utilise pour ajouter des unités de répétition (TTGGGG) à l'extrémité 3' de l'ADN. Alternativement, l'enzyme apparie son ARN avec l'ADN chromosomique, y ajoute une série de bases, et se déplace en appariant son ARN avec la séquence qu'il vient d'ajouter.

(D'après Kelleher *C et al. Trends Biochem Sci* 2002 ; 27 : 572-9, modifié)

Les télomères sont riches en séquence répétées.

L'expression de la télomérase (fonctionne comme une reverse transcriptase) limite le raccourcissement des télomères en permettant une élongation de ces derniers. Elle est exprimée à partir du gène TERT fortement régulé.

C'est un complexe ribonucléoprotéique contenant des protéines et un ARN complémentaire des séquences répétées au niveau des télomères.

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

I. PRINCIPES
GENERAUX

II. LES ACTEURS
DE LA
REPLICATION

III. LES
MECANISMES DE
LA REPLICATION

CONCLUSION

1- Initiation de la réplication (phase G1)

- Plusieurs origines de réplication sur la fibre de chromatine chez les eucaryotes
- Formation d'un complexe de pré-initiation de la réplication et « licenciement » de ce complexe pendant la phase G1 de l'interphase
- Initiation de la réplication par des kinase (G1/S) : ouverture de la double hélice (entrée en phase S) et inactivation du complexe.

2- Réplication de l'ADN (phase S)

- En continu sur le brin précoce et en discontinu sur le brin « retardé »
- Fait appel à différents enzymes. Chez les eucaryotes:
 - Primase** associée à DNA polymérase α : synthèse d'une amorce ARN puis ADN
 - DNA polymérase δ** , enzyme principale de la réplication de l'ADN nucléaire avec une activité polymérase et 3'-5'exonucléase
 - Endonucléases** : RNase H et FEN (Flap endonucléase) : destruction des amorces
 - DNA ligase** : jonction des fragments d'Okazaki

3- Réplication de l'extrémité des double-hélices

- Téломérase** : addition des télomères en 3' des extrémités des **brins parentaux**

REPLICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL

INTRODUCTION

Génome circulaire dont la réplication est **indépendante** du cycle cellulaire. Deux origines de réplication (une pour les brins H et L). Réplication du brin H démarre sur la boucle D et nécessite une amorce ARN

I. PRINCIPES GENERAUX

-**synthèse de l'amorce ARN par transcription** d'un ARN complémentaire au brin L à partir du promoteur L juste en amont. Cet ARN va être ensuite maturé par une endonucléase

II. LES ACTEURS DE LA REPLICATION

-un fragment ARN sert d'amorce pour la synthèse du début du nouveau brin H, déplacement du brin H, formation de la boucle D et arrêt de l'élongation.

III. LES MECANISMES DE LA REPLICATION

-Déclenchement de la réplication et allongement du fragment ARN/ADN de la boucle D par **DNA Pol γ**)

CONCLUSION

-Déplacement du brin H et libération de l'origine de réplication (oL) sur le brin L. Une amorce ARN synthétisée par une DNA primase (ARN polymérase) se fixe.

-synthèse d'un nouveau brin L par allongement de l'amorce ARN par la DNA pol γ en copiant le brin H déplacé. -séparation des deux génomes, destruction des amorces ARN permet la **circularisation** des deux brins.