
CHAPITRE 2 : LA REPLICATION DE L'ADN

Jusqu'à la découverte de la structure de l'ADN (1953), des doutes subsistent quant à la nature chimique du support de l'information génétique. Quand la structure bicaténaire de l'ADN fut élucidée (par Watson et Crick, en 1953 donc), les chercheurs du moment s'accordèrent pour lui conférer cette fonction de support. Dès lors, les scientifiques se sont attachés à découvrir comment ce support est transmis d'un individu à un autre (reproduction) et d'une cellule mère à ses cellules filles (division cellulaire). Il apparaît notamment évident que, pour que l'information soit transmise, l'intégralité de l'ADN doit être copié (on parle de réplication ou duplication de l'ADN).

Concepts clés à la base de la compréhension de ces phénomènes :

- La molécule d'ADN stocke dans la séquence de ses bases azotées l'information nécessaire à la cellule.
- Sa structure en double hélice associée à la complémentarité des bases indiquent que chaque brin d'ADN possède l'information pour constituer la séquence du brin complémentaire (brin 1 : A → brin 2 : T ; brin 1 : G → brin 2 : C ; etc...).

La formulation de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953 s'accompagnait d'une proposition concernant son « autoduplication ». Watson et Crick voyaient la réplication comme une séparation graduelle des brins de la double hélice, comparable à la séparation des deux moitiés d'une fermeture à glissière. Les deux brins étant complémentaires, chacun contient l'information nécessaire pour la construction de l'autre. Donc, dès que les brins sont séparés, chacun peut servir de modèle pour diriger la synthèse de son complément et reconstituer la double hélice.

La compréhension des mécanismes associés fut une longue aventure, qui n'est pas encore complètement terminée car certains points restent à élucider. En tout cas, la réplication est un processus beaucoup plus complexe qu'envisagé au départ et qui fait intervenir, même pour les molécules les plus simples, un grand nombre de protéines.

Au cours des processus de division cellulaire qui prennent différentes formes chez les bactéries, les protistes unicellulaires et les eucaryotes pluricellulaires, il y a duplication de l'ADN de la cellule initiale et répartition dans chaque cellule fille de la même quantité d'ADN que celle qui était présente au départ. Du point de vue qualitatif, les cellules filles possèdent les mêmes caractéristiques que la cellule d'origine. Cette duplication de l'ADN s'accompagne d'une fidélité de copiage.

Cette fidélité n'est toutefois pas absolue, et quelques erreurs sont commises pendant le processus. Certaines de ces erreurs sont silencieuses phénotypiquement. D'autres peuvent aboutir à des changements de phénotypes : ce sont des mutations. D'autres types de modifications peuvent survenir, comme :

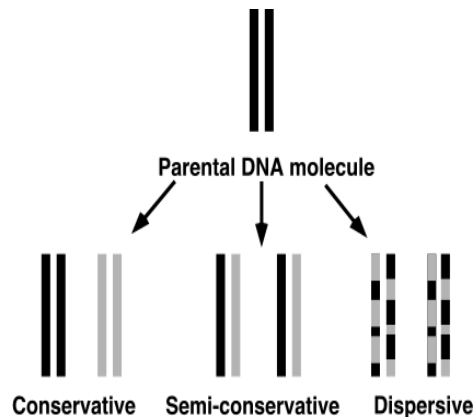
- Des mutations dues à des agents mutagènes.
- Des réarrangements de séquences dues à des recombinaisons, au déplacement d'éléments mobiles.

Toutes ces altérations sont à l'origine de l'évolution.

1. Principes généraux

1.1. Nature du mécanisme

Trois modèles théoriques ont été proposés pour rendre compte de la capacité de la molécule d'ADN à se dupliquer en donnant deux copies conformes à la molécule parentale.



- Le **modèle conservatif** suppose qu'une des cellules filles hérite de la double hélice parentale alors que l'autre hérite d'une molécules d'ADN constituée de deux brins nouvellement synthétisés.
- Le **modèle dispersif** postule que chaque brin est constitué à la fois d'ADN parental et d'ADN nouvellement synthétisé.
- Le **modèle semi-conservatif** proposé par Watson et Crick suppose que chaque molécule d'ADN rencontrée dans une cellule fille contient un brin d'ADN issu de la molécule d'ADN parental et un brin d'ADN nouvellement synthétisé.

Deux expériences décisives ont permis de trancher le débat : les expériences de Taylor (1957) sur des chromosomes eucaryotes, et les expériences de Meselson et Stahl (1958) sur l'ADN bactérien.

- Expérience de Taylor, Woods et Hughes (1957)

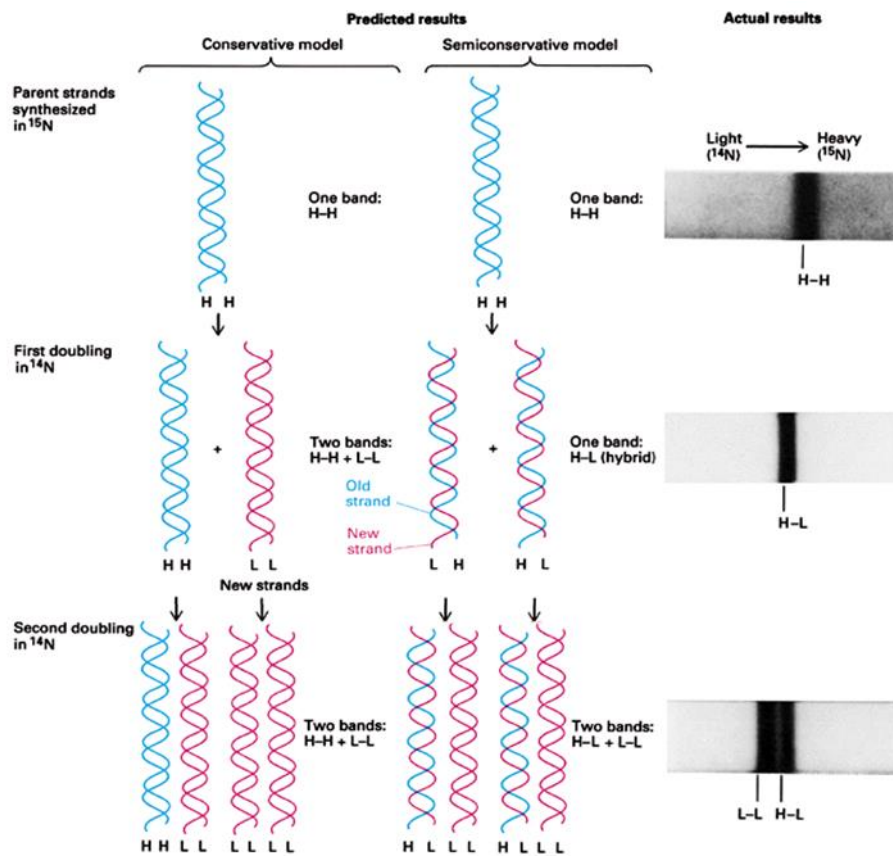
Protocole : Ces auteurs ont utilisé les racines d'une légumineuse (*Vicia faba*) qui se caractérisent par un faible nombre de chromosomes ($2n = 8$) différents morphologiquement. Les racines ont été cultivées pendant un cycle de division dans un milieu contenant de la thymidine tritiée. Puis, elles ont été placées dans un milieu non radioactif dans lequel les mitoses se sont poursuivies jusqu'à la métaphase où elles ont été bloquées par de la colchicine. Les résultats sont révélés par autoradiographie.

Résultats : L'autoradiographie de la première génération en milieu non marqué montre que chaque chromosome est radioactif. A la seconde génération, après blocage par la colchicine, l'autoradiographie révèle que les chromosomes à deux chromatides n'en possèdent qu'une seule radioactive. Ce résultat est compatible avec le modèle semi-conservatif.

➤ Expérience de Meselson et Stahl (1958)

Protocole : une souche d'*E.coli* est cultivée sur un milieu contenant du ^{15}N (azote lourd) jusqu'à ce que l'azote constituant l'ADN de ces bactéries soit uniquement du ^{15}N . Les brins d'ADN sont alors dits lourds (H). Ensuite, ces bactéries sont transférées sur un milieu contenant l'isotope normal (ou léger) ^{14}N . Par conséquent, les molécules d'ADN qui seront à présent synthétisées seront dites légères (L). Des échantillons sont prélevés à divers moments et le poids de l'ADN est étudié par ultracentrifugation sur gradient de densité.

Résultats : Une génération après le transfert des bactéries d'un milieu à l'autre (azote lourd → azote léger), leur ADN forme une seule bande de densité intermédiaire entre celles dont l'ADN contient de l'azote lourd et celle qui contient de l'azote léger. Après deux générations, l'ADN forme deux bandes, l'une située en position intermédiaire, l'autre à la même position que celle de la bande légère. Ce résultat n'est compatible qu'avec le modèle semi-conservatif.



1.2. La réplication débute à un site spécifique : l'origine de réplication

Le processus de réplication ne débute pas au hasard sur la molécule d'ADN, mais au niveau de régions bien déterminées appelées réplicateurs. Un réplicateur correspond à l'ensemble des séquences d'ADN (éléments cis) suffisantes pour permettre l'initiation de la réplication. L'origine de réplication est le site où se fait l'initiation de la réplication ; elle ne correspond parfois qu'à une partie des séquences concernées par le déclenchement du processus. Une fois la réplication initiée, les deux

fourches de réplication se mettent en place et progressent en direction opposée le long de l'ADN (réplication bidirectionnelle).

1.2.1. Technique pour mettre en évidence les séquences réplicateurs chez les procaryotes et la levure

On insère des fragments d'ADN génomique dans des plasmides dont le réplicateur a été éliminé et on transforme des bactéries avec la construction obtenue (sélection : les plasmides contiennent un gène de résistance à un antibiotique). Certaines bactéries se divisent - cela signifie qu'elles résistent à l'antibiotique grâce à leur plasmide qui se duplique. Si le plasmide se multiplie, cela signifie qu'il a intégré un réplicateur. L'ADN plasmidique des clones bactériens concernés est analysé, et les séquences des éléments réplicateurs sont déterminées et comparées. Par des approches de bio-informatique, une structure consensus (=structure la plus probable) est déduite de la comparaison.

1.2.2. Cas des procaryotes

Le réplicateur unique d'E. coli est appelé OriC. C'est une région de 245 pb qui comprend deux motifs répétés essentiels : un motif 9-mer répété 4 fois et un motif 13-mer riche en A/T répété 3 fois. La richesse en A/T des motifs 13-mer en font une région d'ADN plutôt instable (rappel stabilité paires A/T vs C/G).

Les répétitions du motif 9-mer constituent le site de liaison de la protéine DnaA qui est la protéine initiateur. En tout, 30 polypeptides DnaA viennent se fixer sur les 9-mers. Ceci ne survient que si l'ADN est dans sa conformation « normale », à savoir s'il contient des supertours négatifs. Cette fixation de protéines aboutit à la séparation des deux brins, qui survient au niveau des motifs 13-mers (conséquence de la contrainte de torsion imposée par la fixation des protéines DnaA).

Remarque : chez E. coli, ADN bactérien circulaire. L'œil de réplication s'ouvre au niveau de l'origine de réplication OriC. Les deux fourches de réplifications progressent en sens opposé et finissent par se rencontrer en un point appelé Ter situé à l'opposé d'OriC.

1.2.3. Cas des levures

Chez la levure, les origines de réplication sont appelées ARS (Autonomously Replicating Sequences). Trois éléments composent généralement les réplicateurs ARS (taille 100 pb environ) : les éléments A et B1. Un troisième élément, B2, facilite la séparation des brins. A et B1 sont reconnus par le complexe initiateur ORC (Origin of Replication Complex) qui comporte 6 protéines.

1.2.4. Cas des eucaryotes supérieurs

Les réplicateurs des eucaryotes supérieurs sont moins bien connus que les précédents car il est impossible d'utiliser la technique décrite plus tôt pour identifier les réplicateurs des procaryotes et des levures. Ils semblent être de taille plus importantes (500 pb à 50 kb) et sont composés d'éléments essentiels redondants. Malgré leur grand nombre (20 000), peu de choses sont connues à leur sujet.

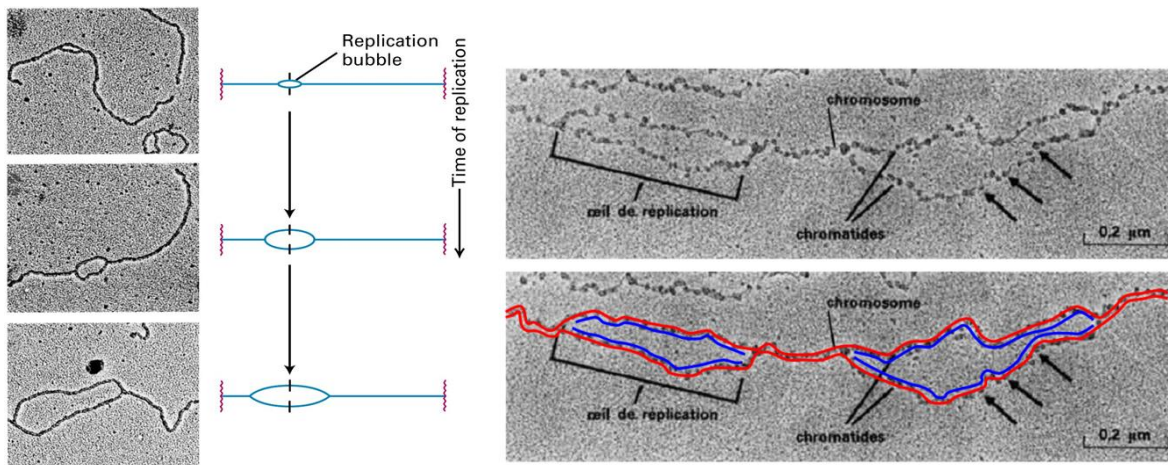
Remarque : On définit un réplicon comme un fragment d'ADN dont la duplication est sous le contrôle d'une même origine de réplication. Le chromosome bactérien est un unique réplicon. Chez les eucaryotes, il y a de nombreux réplicons.

1.3. Un mécanisme bidirectionnel

Mise en évidence

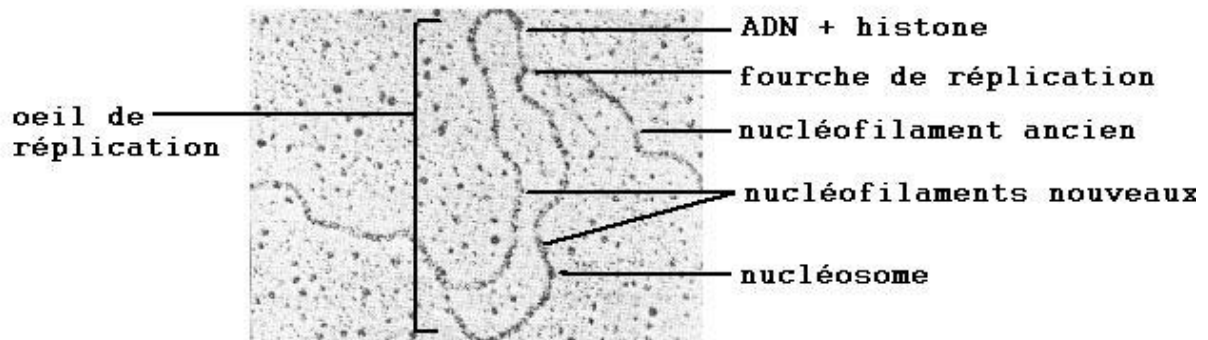
On incube des cellules en présence de nucléotides tritiés (marquage radioactif des nucléotides nouvellement insérés) :

- si on observe une fourche : processus unidirectionnel
- si on observe 2 fourches : processus bidirectionnel



Après l’ouverture de la double hélice d’ADN et démarrage de la réplication, on observe un marquage radioactif symétrique dans l’œil de réplication. La réplication commence donc en un point, et des nucléotides sont insérés de chaque côté (deux fourches de réplication situées de part et d’autre de l’œil de réplication).

Œil de réplication / fourches de réplication

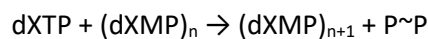


1.4. La réplication est semi-discontinue

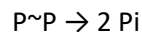
Etude de la synthèse d'ADN avec des nucléotides radioactifs et isolement de l'ADN répliqué : Au niveau de chaque fourche de réplication, on constate que deux mécanismes différents co-existent. Un brin est néosynthétisé en croissance continue (brin précoce), l'autre brin est néosynthétisé de manière discontinue (synthèse de courts fragments d'ADN – brin retardé ou tardif).

1.5. Equation-bilan de la réplication de l'ADN

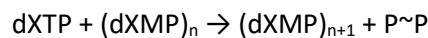
L'addition d'un nucléotide à une chaîne en croissance, de longueur n , est représentée par la réaction suivante :



L'énergie libre de cette réaction est assez faible ($\Delta rG = -3,5$ kcal/mole). De l'énergie libre supplémentaire est fournie par l'hydrolyse rapide du pyrophosphate (PPi noté ici $P\sim P$) en deux phosphates inorganiques ($2 \times Pi$) par une enzyme appelée pyrophosphatase :



La synthèse de l'ADN est donc un processus couplé dont l'équation globale est :



Ainsi, cette réaction est thermodynamiquement favorisée ($\Delta rG = -7$ kcal/mole), ce qui correspond à une constante d'équilibre K_{éq} $\approx 10^5$. Une constante d'équilibre aussi élevée signifie que la réaction de synthèse d'ADN est irréversible.

Dans le contexte cellulaire, cette réaction est catalysée par un enzyme : une **ADN polymérase ADN dépendante**.

1.6. Un mécanisme fidèle

Mise en évidence

La polymérase a un taux d'erreur de 10^{-5} , c'est-à-dire que statistiquement, la polymérase incorpore un mauvais nucléotide tous les 100 000 nucléotides.

- Comme le génome humain fait 10^9 paires de base, on estime que chez l'homme, une réplication produit 10 000 erreurs par réplication.
- Cependant, on observe que la réplication est beaucoup plus fiable (taux d'erreur 10^{-8}).

Ce taux d'erreur plus faible qu'attendu est lié aux propriétés des ADN polymérases ADN dépendantes (cf. partie 2).

2. Les acteurs de la réplication

2.1. Des enzymes permettent de dérouler et d'ouvrir l'ADN

Pour que la réplication puisse s'effectuer, il faut impérativement que l'ADN soit décompacté puis déroulé et enfin que la double hélice soit dénaturée (ouverte). Sans cela, l'enzyme en charge de la copie (l'ADN polymérase) ne peut pas faire son travail.

Or, comme vu précédemment, l'ADN est assez fortement compacté dans les cellules. De plus, la molécule d'ADN présente un certain nombre de contraintes topologiques. L'ADN des bactéries, des mitochondries, des chloroplastes et de certains virus est sous forme fermée (circulaire). Bien que linéaire, les molécules d'ADN des eucaryotes ne sont pas libres à leurs extrémités, elles sont associées à la face interne de l'enveloppe nucléaire. Ces contraintes structurales s'ajoutent à celles de la double hélice, le tout provoquant l'apparition de surenroulements : l'axe de la double hélice s'enroule sur lui-même et forme une **superhélice**. Le surenroulement est soit positif, soit négatif :

- Surenroulement + : l'enroulement se fait dans le même sens que la double hélice (superhélice droite)
- Surenroulement - : l'enroulement se fait dans le sens contraire de la double hélice.

In vivo, l'ADN circulaire est présent sous forme surenroulée négativement (présence de supertours négatifs). Par ailleurs, l'ouverture de la fourche de réplication s'accompagne d'une modification locale de la topologie de l'ADN : introduction de supertours négatifs en amont de l'œil de réplication, introduction de supertours négatifs en aval.

L'intuition d'un mécanisme permettant de gérer ce problème en provoquant des coupures de l'ADN a germé très tôt dans les esprits (1954), mais ce n'est que dans les années 1990 que les enzymes responsables de tels processus ont été découvertes : les topoisomérases.

Il existe deux types principaux de topoisomérases :

- **Type I (IA et IB)** : Elles catalysent la coupure transitoire d'un seul des brins de la double hélice, passent le brin non coupé à travers la brèche et referment derrière la coupure. Elles ne nécessitent pas d'ATP. Leur action incrémente le nombre d'enlacement de +1 (ex. passage de deux supertours négatifs (-2) à un supertour négatif (-1)). Elles permettent donc le relâchement des supertours négatifs en introduisant des supertours positifs.
- **Type II (gyrase)** : Les enzymes coupent transitoirement les deux brins de l'ADN, passent la partie intacte de la molécule d'ADN à travers la brèche créée et referment la coupure derrière en reformant les deux liaisons phosphodiester. Elles utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour catalyser leur réaction. Les gyrases (procaryotes) introduisent des supertours négatifs (relâchement des contraintes de torsion de la double hélice).

Ces enzymes peuvent donc : 1) relâcher l'ADN superenroulé ; 2) défaire les nœuds et démêler l'ADN. Par exemple, les molécules filles d'ADN circulaire sont souvent associées en chaîne à la fin de la réplication. Les topoisomérases catalysent les réactions de caténation/décaténation dans ce cas. De même, les molécules filles d'ADN linéaire se retrouvent souvent emmêlées après la réplication, ce qui

empêche les chromosomes fils de se séparer. Les topoisomérases jouent donc des rôles essentiels dans les cellules. On retrouve ce type de protéines chez les eucaryotes et les procaryotes

2.2. Les ADN polymérases ADN dépendantes, enzymes de réplication et réparation de l'ADN

Il existe de nombreuses ADN polymérases ADN dépendantes, mais toutes n'interviennent pas dans la réplication.

2.2.1. Éléments nécessaires au fonctionnement des ADN polymérases de la réplication (réplicases)

Les ADN polymérases intervenant dans la réplication nécessitent :

- Matrice ADN
- dNTP ajoutés par complémentarité / brin matrice
- Mg^{2+} (cofacteur)
- Amorce (le plus souvent ARN) présentant une extrémité 3'OH libre (grande différence avec les ADN polymérases ADN dépendantes que vous verrez dans le chapitre sur la transcription)

L'amorce ARN est associée à la matrice ADN de façon à former une jonction amorce / matrice.

Deux éléments clés constituent une jonction amorce-matrice :

- La matrice d'ADN simple brin qui dirige l'addition des désoxyribonucléotides (dNTP) complémentaires, c'est le modèle lu pendant la réplication.
- L'amorce (ARN ou ADN) complémentaire de la matrice mais plus courte que celle-ci. Elle doit IMPÉRATIVEMENT avoir une extrémité 3'-OH libre adjacente à la région monocaténaire de la matrice. C'est cette extrémité 3'-OH qui est allongée.

Conséquences (à retenir absolument) : la matrice est lue dans le sens 3'-OH vers 5'-P et l'allongement se fait dans le sens 5'-P vers 3'-OH. De la sorte, on obtient bien deux brins complémentaires orientés antiparallèlement. Moyen mnémotechnique : une extrémité « P » est encombrée et chargée, il serait donc difficile pour une polymérase de lire l'ADN à partir de l'extrémité 5'-P.

Rappel : Les nucléotides ont trois groupements phosphates attachés au carbone 5' du 2'-désoxyribose. Le groupement le plus interne est appelé α , le deuxième β et le troisième γ . La synthèse d'ADN commence quand le 3'-OH de l'amorce déclenche une attaque nucléophile sur le phosphate α du dNTP entrant.

2.2.2. Caractéristiques générales des ADN polymérases

- Les ADN pol ne savent pas amorcer une synthèse

Elles ne savent qu'allonger une amorce (ARN voire ADN) déjà en place et présentant une extrémité 3'OH libre adjacente à la région monocaténaire de la matrice. Preuve expérimentale : si on mélange in vitro un ADN monocaténaire, des dNTP et l'enzyme, il ne se passe rien ; si on ajoute une amorce complémentaire d'une région de l'ADN matrice, il y a synthèse d'ADN.

➤ Spécificité de substrat

Les ADN polymérase catalysent la synthèse d'ADN. Contrairement à la plupart des enzymes qui ont un site actif catalysant une réaction unique, les ADN pol utilisent un site actif unique pour catalyser l'addition de chacun des 4 dNTP. C'est l'identité géométrique presque parfaite entre les paires de bases (A, T, G et C) qui permet cela.

➤ Une sélectivité stérique permet à l'enzyme de discriminer rNTPs et dNTPs

Les rNTP sont présents dans les cellules à des concentrations environ 10 fois plus élevées que celles des dNTP. Malgré cela, on ne note qu'en seul évènement d'incorporation d'un rNTP par un ADN polymérase de la réplication pour 1000 évènements de polymérisation. Cette bonne discrimination est due à une **sélectivité stérique** : les rNTPs sont exclus stériquement du site actif de l'enzyme. Dans ce site actif, la poche de liaison du nucléotide est trop petite pour permettre la présence d'un 2'-OH sur le ribose du nucléotide entrant. L'entrée d'un rNTP entraîne un conflit stérique avec les acides aminés de la poche, qui se traduit par un déplacement du phosphate α du dNTP qui n'est alors plus aligné correctement avec le 3'-OH de l'amorce, et la vitesse de catalyse est très fortement réduite.

➤ Une sélectivité cinétique favorise la reconnaissance enzyme / substrat

Ce n'est la nature exacte du précurseur qui est détectée par le site actif de l'enzyme, mais plutôt l'aptitude du nucléotide entrant à former un appariement correct A:T ou G:C. C'est seulement quand une paire de bases correcte se forme que la catalyse peut avoir lieu. Un mésappariement aboutit à une diminution spectaculaire de la vitesse de polymérisation du nucléotide entrant, étant donné que les substrats sont mal alignés. C'est un exemple de **sélectivité cinétique** : la formation des liaisons est rapide seulement si c'est le bon nucléotide qui est présent (facteur 10 000 entre la vitesse avec le bon nucléotide et la vitesse avec un mauvais nucléotide).

➤ Les ADN polymérase sont des enzymes processives

La catalyse effectuée par les ADN polymérase est rapide. Elles sont capables d'ajouter jusqu'à 1000 nucléotides par seconde à une amorce. Cette rapidité d'exécution est due à la nature processive des ADN pol. La processivité est une caractéristique des enzymes qui travaillent sur des substrats polymériques. On définit la processivité des ADN pol comme le nombre moyen de nucléotides ajoutés à chaque fois que l'enzyme se lie à une jonction amorce/matrice.

Parmi les nombreuses ADN polymérase, on trouve des niveaux de processivité allant de quelques nucléotides à 50 000 nucléotides. Grâce à cette possibilité d'addition multiple, la vitesse de synthèse d'ADN est très fortement augmentée. Le facteur limitant est en réalité l'évènement de liaison initiale de la polymérase à une jonction amorce/matrice. Dans une réaction typique, il faut environ une seconde pour que l'ADN pol localise et se lie à une jonction amorce/matrice. Une fois la liaison établie, l'addition d'un nucléotide est extrêmement rapide (de l'ordre de la milliseconde – négligeable par rapport à une seconde). Donc une ADN polymérase non processive n'ajouterait qu'environ un nucléotide par seconde, alors que les ADN polymérase les plus efficaces ajoutent jusqu'à 1000 nucléotides par seconde grâce au maintien de leur association avec la matrice pendant des milliers de cycles d'addition de dNTP. La processivité permet donc de multiplier d'un facteur 1000 la vitesse globale de polymérisation de certaines polymérase.

- Certaines ADN polymérases ont une fonction de correction intégrée

Le taux de fidélité de réplication de l'ADN est de 1 erreur pour 10^{10} bases ajoutées, ce qui est extrêmement faible. Une telle précision ne peut être le fait d'un système de polymérisation basé sur une géométrie des bases et leur complémentarité. Une fonction correctrice intégrée à certaines enzymes (proof-reading) permet en fait d'éliminer la plupart des erreurs.

Alors que la fonction de polymérisation consiste à avancer d'un nucléotide, la fonction correctrice permet de retirer un nucléotide. C'est une activité exonucléase 3'-5' correctrice : le brin d'ADN est attaqué à son extrémité 3' tout juste synthétisée (exonucléase versus endonucléase).

A l'origine, ce type d'activité a été identifié dans le même polypeptide que l'ADN polymérase chez *E. coli*. Les chercheurs n'ont tout d'abord pas compris la raison de la présence simultanée d'une fonction polymérase et exonucléase dans le même polypeptide. Il a ensuite été démontré qu'elle dégradait préférentiellement l'ADN contenant des paires de bases incorrectes (mésappariement). Ainsi, dans le rare cas où un nucléotide incorrect est ajouté à l'amorce, l'exonucléase correctrice enlève ce nucléotide. Ceci donne à la fonction polymérase une nouvelle chance pour ajouter le bon nucléotide. Ce système est en veille permanente, il ne s'active que si la vitesse de polymérisation diminue.

Cette fonction augmente de beaucoup la fidélité du processus de réplication : en moyenne, une ADN pol fait une erreur d'incorporation tous les 10^5 nucléotides polymérisés. Grâce à l'activité 3'-5'-exonucléase, ce taux d'erreur est ramené à une erreur pour 10^7 nucléotides polymérisés. C'est supérieur au taux de mutation réel constaté (pour rappel environ 1 erreur pour 10^{10} nucléotides polymérisés), ce qui signifie que des mécanismes complémentaires de correction existent. Ce sont des mécanismes post-réplicatifs de la réparation des mésappariements (faisant intervenir d'autres ADN polymérases ADN dépendantes que les répliques).

2.2.3. Les ADN polymérases procaryotes

- L'ADN polymérase I d'*E. coli*

Ce fut la toute première ADN polymérase caractérisée. Elle est codée par le locus *PolA*. Elle est constituée d'un polypeptide unique (pas de sous-unités) de 103 kDa. Cette enzyme est caractérisée par le fait que la chaîne polypeptidique peut être scindée en deux par une endoprotéase (clivage endoprotéolytique) pour donner deux fragments :

- Fragment 1 : c'est le fragment le plus long (68 kDa), il est appelé fragment de Klenow. Il possède une activité ADN polymérase à son extrémité C-terminale, et une activité 3'-5' exonucléasique (correctrice) à son extrémité N-terminale. Dans l'espace, les deux activités sont séparées de 30 Å, ce qui indique que les deux fonctions sont distinctes (séparées dans l'espace).
- Fragment 2 : c'est le plus court (35 kDa). Il présente une activité exonucléasique 5'-3' qui élimine les nucléotides par groupes de 10 environ. Cette activité fonctionne en coordination avec l'autre activité exonucléasique du fragment de Klenow.

L'ADN pol I présente une particularité : elle est capable de réaliser des « translations de coupure » ou « nick translation ». A l'endroit où une liaison phosphodiester a été rompue, l'enzyme élimine les nucléotides dans le sens 5'-3', ce qui crée une jonction amorce/matrice que son activité polymérase

est capable de combler (sur 20 à 100 nucléotides). En laboratoire, cette activité est utilisée pour marquer l'ADN par remplacement d'un NTP froid par un NTP marqué (sur le phosphate α bien entendu).

Cette enzyme est présente en grande quantité dans les cellules bactériennes. Son rôle est essentiellement un rôle de réparation.

➤ L'ADN polymérase III d'E. coli : la réplicase

Cette enzyme a été difficile à mettre en évidence tellement l'activité ADN pol I est importante et masque les autres. C'est la principale enzyme impliquée dans la réplication du chromosome. De ce fait, elle fait partie d'un énorme complexe qui lui confère une très grande processivité, lui permettant une rapidité d'exécution remarquable. Ce complexe est connu sous le nom d'ADN pol III holoenzyme. Remarque : le terme holoenzyme décrit un complexe multiprotéique dans lequel une enzyme noyau (core enzyme) est associée à des partenaires qui renforcent son activité.

L'ADN pol III holoenzyme comprend 9 sous-unités, dont l'une correspond à une 3'-5' exonucléase afin de lui conférer une fidélité élevée. Cette fonction de correction a été découverte suite à la caractérisation d'une souche bactérienne mutante présentant 1000 fois plus d'erreurs dans son ADN que les bactéries sauvages. Le gène responsable de ce phénotype s'est avéré être le gène codant l'activité 3'-5' exonucléase.

E. Coli présente trois autres ADN polymérases toutes impliquées exclusivement dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

2.2.4. Les ADN polymérases eucaryotes

Les cellules eucaryotes contiennent de nombreuses ADN polymérases. Une cellule typique en contient plus de 15 sortes différentes. Parmi celles-ci, voici celles qui sont essentielles pour la réplication :

- L'ADN pol α / primase : synthèse d'une amorce ADN permettant l'initiation (faible processivité)
- Les ADN pol δ et ADN pol ϵ : élongation des brins initiés par la Pol α
- L'ADN pol β : réparation de l'ADN (comme la plupart des autres ADN pol)
- L'ADN pol γ : réplication et réparation de l'ADN mitochondrial.

2.3. La fourche de réplication

Par soucis de simplification, on a évoqué jusque-là la notion de jonction amorce/matrice avec un seul brin matrice. Dans une cellule, les deux brins d'ADN sont répliqués simultanément. Cela nécessite que les deux brins soient séparés pour que chacun puisse constituer une matrice. La jointure entre les deux brins séparés et la double hélice parentale s'appelle la fourche de réplication.

2.3.1. Les deux brins sont synthétisés simultanément dans la fourche

L'antiparallélisme des deux brins pose problème. En effet, l'ADN n'est synthétisé que par allongement d'une extrémité 3'-OH et donc seule une des deux matrices peut être répliquée de façon continue quand la fourche de réplication progresse. La lecture de ce brin est faite dans le sens 3'-5' et

l'allongement du brin néoformé est fait dans le sens 5'-3'. Sur ce brin, la polymérase poursuit simplement la fourche de réplication. Ce brin d'ADN est appelé brin continu (avant, appelé brin précoce).

La synthèse du brin complémentaire est plus complexe. Cette matrice impose en effet à l'ADN polymérase de se déplacer dans la direction opposée à celle de la fourche de réplication. Le brin d'ADN synthétisé par copie de cette matrice est appelé le brin discontinu (avant, appelé brin retardé). La progression de la synthèse sur ce brin est rendue possible par la synthèse de petits fragments d'ADN successifs, ce qui permet la lecture 3'-5' et la synthèse 5'-3'.

Pour le brin continu, la réplication commence dès que la matrice est exposée. Pour l'autre, il faut attendre que le mouvement de la fourche de réplication ait permis l'exposition d'une longueur suffisante de la matrice. A chaque fois qu'une longueur suffisante de la matrice est exposée, la synthèse d'ADN commence et continue jusqu'à ce que l'extrémité 5' du segment précédent soit atteinte.

Les segments courts résultant du mode de synthèse du brin discontinu sont appelés fragments d'Okazaki et leur taille est de 1000 à 2000 nucléotides chez les bactéries et seulement de 100 à 400 nucléotides chez les eucaryotes.

Rappel : La synthèse d'ADN se fait à la fois de manière continue et de manière discontinue : on dit que la synthèse est semi-discontinue.

2.3.2. L'initiation de la synthèse d'un nouveau brin nécessite une amorce ARN

Rappel : Les ADN pol ne savent pas initier une synthèse. Conséquences : pour la synthèse des fragments d'Okazaki, des amorces sont nécessaires (autant d'amorces que de fragments d'Okazaki), alors qu'une seule amorce suffit pour permettre la synthèse du brin continu).

Ces amorces, d'une longueur d'environ 10 nucléotides, sont de nature ARN. Elles sont complémentaires (de l'ADN) de la région où démarre la réplication. Une ARN polymérase particulière, la primase, est responsable de leur synthèse.

Une fois qu'elles ont servi, les amorces ARN sont dégradées par une RNase H qui dégrade spécifiquement les ARN hybridés à de l'ADN. La RNase H enlève tous les ribonucléotides sauf le dernier car elle ne peut hydrolyser une liaison entre ribo- et désoxyribonucléotide. Le dernier ribonucléotide doit être éliminé par une exonucléase 5'-3', et la brèche laissée par l'élimination des amorces ARN doit être comblée. C'est le rôle assuré par l'ADN Pol I d'E. coli qui est une enzyme de réparation (les brèches sont considérées comme des trous à réparer). Après l'intervention de l'ADN pol I, il ne subsiste plus qu'une césure dans le squelette entre un 3'-OH et un 5'-P du brin discontinu. Cette césure est réparée par une ADN ligase.

2.3.3. Fourche de réplication et topologie de l'ADN

- Les hélicases séparent les deux brins de la double hélice d'ADN

Les ADN polymérases étant inefficaces pour ouvrir la double hélice, ce travail revient à des protéines appelées hélicases (DnaB chez E. coli / complexe Mcm chez l'homme). Elles se présentent sous forme

d'hexamères adoptant la forme d'anneaux qui encerclent un des deux brins de la fourche de réplication (= le brin discontinu), près de la jonction amorce / matrice.

- L'ADN monocaténaire est stabilisé par la liaison de protéines SSB

Après le passage de l'hélicase, l'ADN simple brin qui vient d'être créé doit rester libre de tout appariement jusqu'au moment où il sera utilisé comme matrice. Pour stabiliser les brins séparés, des protéines se liant à l'ADN monocaténaire, les SSB (Single Strand Binding proteins, 74 kDa) se fixent rapidement sur ces brins (procaryotes). La liaison d'une protéine SSB facilite la liaison d'une autre : c'est un mode de liaison dit coopératif. Les portions d'ADN se retrouvent couvertes de SSB. Chez l'homme, on trouve des protéines similaires, appelées RPA.

- Les topoisomérases suppriment le surenroulement en avant de la fourche de réplication

Les topoisomérases suppriment le surenroulement produit par la séparation des brins d'ADN dans la fourche de réplication. Elles maintiennent donc les matrices dans une topologie compatible avec le fonctionnement des fourches de réplication. Ces enzymes fonctionnent sans altérer de façon permanente la structure chimique de l'ADN ; elles agissent sur sa conformation.

E. coli : Topo I, gyrase

Eucaryotes : Topo I, Topo II

- Rappel sur les interactions protéine / ADN

Les protéines de la fourche interagissent fortement avec l'ADN, indépendamment de sa séquence. Ces interactions sont basées sur les propriétés de l'ADN indépendantes de l'enchaînement des paires de bases :

- Charges négatives et structure du squelette de l'ADN (sucre – P – sucre)
- Groupements du petit sillon formant des liaisons H
- Interactions hydrophobes (lien avec les empilements des bases)

2.3.4. Les anneaux coulissants augmentent fortement la processivité de l'ADN polymérase

On a déjà évoqué la processivité des ADN polymérases et l'importance qu'a cette propriété. En réalité, la processivité n'est pas une propriété des ADN polymérases par elles-mêmes, mais elle est apportée par des protéines appelées anneaux coulissants (sliding DNA clamps). Ce sont des homopolymères dont les sous unités sont assemblées en forme de beignet (doughnut). Le trou central est suffisamment grand pour encercler la double hélice tout en laissant suffisamment de place pour une couche ou deux de molécules d'eau entre l'ADN et la protéine. Les anneaux coulissants sont très fortement liés aux ADN polymérases (ratio 1 : 1) de sorte que lorsque la molécule d'enzyme se détache de la jonction amorce/matrice, sa liaison avec l'anneau garantit qu'elle s'y rattache rapidement (les anneaux sont comme des ancrs qui empêchent l'enzyme de s'éloigner). L'ensemble ADN polymérase / anneau coulissant glisse très facilement le long de la matrice ADN pendant la réplication.

3. Les mécanismes de la réplication

3.1. Initiation de la synthèse d'ADN chez les procaryotes: le modèle du réplicon

3.1.1. Les éléments composant le réplicon

Les évènements qui aboutissent au début de la réplication d'un chromosome sont regroupés sous le terme d'initiation. Pour expliquer ces évènements, un modèle (le réplicon) a été développé en 1963 par F. Jacob, S. Brenner et F. Cuzin. D'après ce modèle, un réplicon est l'ensemble de l'ADN répliqué à partir d'une origine de réplication. Chez E. coli, il existe un seul réplicon. Chez les eucaryotes, il en existe de nombreux. Le modèle du réplicon implique que l'initiation de la réplication soit contrôlée par deux éléments : le réplicateur et l'initiateur.

3.1.2. Sélection et activation d'une origine de réplication par une protéine activatrice

On a défini précédemment le réplicateur chez E. coli. L'initiateur correspond à un ensemble de protéines initiatrices ayant plusieurs rôles : 1) elles se lient à des séquences particulières du réplicateur ; 2) elles interagissent avec des protéines additionnelles et les recrutent vers le réplicateur ; 3) certaines peuvent aussi déformer ou dénaturer une région d'ADN adjacente à leur sites de liaison, ce qui facilite l'ouverture initiale de la double hélice. C'est le cas de la protéine DnaA.

Chez E. coli, la régulation de la réplication est liée au contrôle de l'activité de DnaA. C'est donc cette dernière qui est la véritable protéine initiatrice.

3.1.3. Interactions prot/prot et initiation de la réplication : formation du primosome

Une fois l'initiateur lié au réplicateur, une cascade d'évènements se met en route. Ils impliquent tous des interactions prot/prot ou prot/ADN non spécifiques de séquences.

L'installation du primosome débute par le déroulement de la matrice bicaténaire superenroulée. Elle se déroule en trois phases : la phase A ou préamorçage, la phase B ou déroulement/ouverture de la double hélice et la phase C ou amorçage.

- Phase A

Des molécules de DnaA se fixent sur la région OriC, au départ sur les séquences 9-mer. 20 à 40 monomères de DnaA se fixent et forment un noyau autour duquel l'ADN de la région OriC s'enroule. Les protéines DnaA interagissent ensuite avec les séquences 13-mer, qui s'ouvrent sous l'effet de la torsion (ouverture facile car ce sont des séquences riches en A/T).

- Phase B

Des protéines HU participent à l'écartement des deux brins (rappel : HU = protéines d'emballage les plus nombreuses chez les procaryotes ; elles sont capables de courber l'ADN pour lui donner une conformation spatiale adéquate pour la suite des opérations). Le déroulement de l'ADN et l'ouverture de la double hélice ont plusieurs conséquences :

- L'ADN hélicase (DnaB) et le poseur d'hélicase (DnaC) se fixent sur OriC. DnaC contrôle la mise en place de l'hélicase autour de l'ADN simple brin.
- Une fois l'installation terminée, DnaC quitte le complexe et l'hélicase est activée. Deux hélicases sont mises en place, une sur chacun des brins (elles appartiendront chacune à une des deux fourches de réplication mises en place).

Les protéines hélicases déroulent l'ADN avec l'aide d'une gyrase : la fourche de réplication est créée, les deux brins se déroulent sur 60 pb. Dans chaque fourche de réplication, l'hélicase se retrouve liée à la matrice du brin discontinu.

- Phase C

Cette hélicase va ensuite recruter d'autres protéines, ce qui aboutira à la mise en place d'un réplisome (il y en a un pour chaque fourche de réplication). La primase est ensuite la première protéine recrutée, ce qui aboutira à la synthèse de la première amorce ARN. Le processus d'amorçage est réalisé, l'élongation peut commencer.

Origine de réplication + DnaA = complexe d'initiation ouvert

Primosome = DnaC + DnaB + DnaG

Complexe d'initiation ouvert + primosome + SSB = complexe de pré-amorçage

Complexe de pré-amorçage + amorces = réplisome

Il est important de retenir que toutes ces étapes sont coûteuses en énergie et requièrent de l'ATP, consommé pendant le pré-amorçage, le déroulement de l'ADN (hélicase DnaB et gyrase) et pour le fonctionnement de la primase (DnaG).

3.1.4. Régulation du processus d'initiation chez les procaryotes

Il est nécessaire que tout organisme régule strictement la mise en place de complexes d'initiation de la réplication afin que le nombre de chromosomes et le nombre de cellules néo-formées correspondent. E. coli possède plusieurs mécanismes d'inhibition temporaire de la formation de primosomes.

- Changement de l'état de méthylation de l'ADN

Chez E. coli, une méthylase de l'ADN (la Dam-méthylase) ajoute un groupement méthyl sur toutes les adénines incluses dans une séquence GATC (séquence palindrome). Le génome est complètement méthylé sur ces séquences, sauf au moment de la réplication puisque les brins neufs d'ADN ne sont pas méthylés au départ. Les nouvelles hélices d'ADN sont dites hémiméthylées.

En particulier, le réplicateur d'E. coli comporte de nombreuses répétitions GATC. Juste après la réplication, la présence d'ADN hémiméthylé au niveau du réplicateur est détectée par la protéine SeqA qui se lie aux séquences GATC avant qu'elles ne puissent être méthylées par Dam. Ceci a deux

conséquences : 1) cela retarde la méthylation des régions GATC par Dam car celle-ci n'a pas facilement accès à ces motifs ; 2) les nombreuses protéines SeqA liées à OriC empêchent la liaison de DnaA à l'origine de réplication et donc l'initiation immédiate d'un nouveau cycle de réplication.

➤ Liaison de DnaA avec de l'ATP

DnaA initie un cycle de réplication en se liant au motif 9-mer du réplicateur seulement après liaison avec une molécule d'ATP (DnaA-ATP). Etant donné que l'ATP est converti en ADP pendant l'initiation, les protéines DnaA sont inactivées après avoir joué leur rôle. La régénération d'ADP en ATP est relativement lente, ce qui ralentit l'accumulation de DnaA-ATP et limite donc la possibilité d'un début de cycle de réplication à court terme.

➤ Dispersion spatiale de la protéine initiateur DnaA

DnaA est impliquée dans d'autres processus de fonctionnement du génome que l'initiation de la réplication mettant en jeu son affinité pour les séquences 9-mer. Or, ce nombre de séquences double au fur et à mesure que le chromosome est dédoublé. Etant donné que le nombre de protéines DnaA n'augmente pas en proportion, ces protéines se trouvent donc détournées des régions 9-mer du réplicateur.

Ces différents mécanismes concourent à générer ce qu'on appelle la période d'éclipse, qui explique en partie l'existence d'une période de temps incompressible entre deux divisions cellulaires successives (environ 20 minutes chez E. coli).

3.2. Réplication de l'ADN dans la fourche de réplication : le replisome d'E. coli

L'ADN polymérase III est en réalité un complexe enzymatique (holoenzyme) comportant de nombreuses sous-unités (9 types différents) dont les rôles sont précisément déterminés. De plus, elle est organisée en dimère asymétrique. Par ailleurs, ces dimères asymétriques sont présents en deux exemplaires sur un chromosome circulaire en cours de réplication.

Sous-unités	Rôle	Commentaire
α	Synthèse de l'ADN	2 copies / holoenzyme
ϵ	Correction	3'-5' exonucléase
θ	Nécessaire à l'assemblage	$\alpha + \epsilon + \theta =$ noyau
β	Anneau coulissant	Homodimères
γ	Poseur d'anneau	Pentamère lié aux 2 noyaux
τ	Maintien du dimère de noyaux	Lié à γ , domaine flexible
ψ		
δ		

ATTENTION à ne pas confondre les sous-unités de l'ADN pol III holoenzyme avec les ADN polymérases eucaryotes.

Fonctionnement du réplisome : le modèle du trombone

- 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 réplisome.
- 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 a été rapidement réalisée.

3.3. Terminaison de la réplication procaryote

Dans le cas des chromosomes circulaires, les réplisomes permettent de les dupliquer dans leur intégralité. Il n'est pas certain qu'il y ait besoin d'un site de terminaison de la réplication... Les séquences Ter mises en évidence in vitro ne seraient que des artefacts de biochimiste.

Hypothèse actuelle : lorsque les deux fourches se rencontrent et se percutent (chromosome circulaire), cela signe la fin de la réplication. De plus, à la fin de la réplication, on arrive statistiquement au bout de la processivité de la réplicase.

Les deux chromosomes frères sont le plus souvent liés entre eux, et il faut l'intervention d'une topoisomérase de type II pour libérer les deux molécules.

3.4. Cas des eucaryotes

- 3.4.1. Les chromosomes eucaryotes sont répliqués précisément une fois par cycle cellulaire**
- 3.4.2. La formation de complexes pré-répliatifs est la première étape de l'initiation de la réplication chez les eucaryotes**
- 3.4.3. La formation des complexes pré-répliatifs et leur activation sont régulées pour permettre la tenue d'un seul cycle de réplication par cycle cellulaire**

3.4.4. Comparaison des régulations de l'initiation de la réplication entre procaryotes et eucaryotes

Les mêmes principes généraux s'appliquent chez les procaryotes et les eucaryotes, à savoir : la première étape est la reconnaissance du réplicateur par la protéine initiatrice. Celle-ci, en coopération avec un ou plusieurs poseurs d'hélicase, assemble l'ADN hélicase sur le réplicateur au niveau de l'origine de réplication où s'est dénaturée la double hélice. L'ADN hélicase provoque la séparation des brins et l'apparition d'ADNsb qui sert de matrice pour la synthèse d'amorces ARN. Puis les autres composants du replisome s'assemblent en raison de leur affinité pour la jonction amorce : matrice.

Malgré cette similitude, la régulation est différente entre procaryotes et eucaryotes. Les procaryotes concentrent la régulation de l'initiation sur l'association de la protéine DnaA sur le réplicateur, alors que chez les eucaryotes, c'est l'étape d'association initiale de l'hélicase (Mcm) avec l'ADN qui constitue l'étape de régulation. De plus, les bactéries en phase exponentielle de croissance initient la réplication plus d'une fois par cycle cellulaire, ce qui n'est jamais le cas chez les cellules eucaryotes.

3.4.5. Terminer la réplication des chromosomes eucaryotes : le problème des télomères

Pour les chromosomes linéaires, la synthèse intégrale du brin discontinu est impossible selon le modèle décrit jusqu'ici (c'est le problème de la réplication des extrémités). Même si, lors de la synthèse du dernier fragment d'Okazaki, l'extrémité 5' de la dernière amorce ARN coïncide parfaitement avec l'extrémité 3' de la matrice, une fois cette amorce enlevée, il restera une courte région composée d'ADN simple brin à l'extrémité du chromosome. Les conséquences de ce constat sont potentiellement très graves car, de cycle en cycle, la taille des chromosomes est susceptible de diminuer et de l'information génétique pourrait être perdue.

Pour éviter cela, l'évolution a sélectionné un mécanisme particulier dans les cellules eucaryotes. Ce mécanisme met en jeu une ADN polymérase particulière, la télomérase (prix Nobel 2009). Cette ADN polymérase présente la particularité de ne pas nécessiter de matrice exogène. C'est une ribonucléoprotéine (incluant donc un ARN) qui est capable d'amorcer elle-même une synthèse d'ADN. Grâce à ce dispositif, les extrémités des chromosomes peuvent être reconstituées dans certaines conditions.

Le chercheur Hayflick a mis en évidence l'existence d'une sorte de minuterie interne qui limite le nombre de réplifications possibles pour une cellule en culture (environ 50 divisions). Quand la minuterie a atteint le zéro, la cellule ne peut plus se diviser. Avant, on pensait qu'en culture, une cellule pouvait se diviser un nombre de fois infini. Il semblerait que la longueur des régions télomériques des chromosomes joue ce rôle de minuterie. En effet, dans les cellules de tissus jeunes, les télomères sont plus longs que dans les cellules de tissus plus âgés. La longueur des régions télomériques limiterait donc le nombre de divisions cellulaires possibles. Cette hypothèse est étayée en outre par le fait que des cellules normales présentent une activité télomérase beaucoup plus importante. La recherche d'inhibiteurs de télomérase comme médicaments anti-cancéreux (chimio-thérapeutiques) est une des pistes de recherche actuelle pour lutter contre le cancer. Certains scientifiques fantasment également sur les possibilités ouvertes par ces découvertes en ce qui concerne le rajeunissement cellulaire (mythe de la fontaine de jouvence).