

**UNIVERSITE CONSTANTINE 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Animale**  
**B.P. 25000 - Constantine - ALGERIE**



**Filière : 3<sup>ème</sup> ANNEE LMD**

**TOXICOLOGIE (S6)**

**MODULE :**

**BIOLOGIE MOLECULAIRE**

**Mr: BOULDJADJ.R**

**E.mail : rbouldjadj@gmail.com**

**Année Universitaire 2019-2020**

# CHAPITRE II: LA RÉPLICATION D'ADN GENOMIQUE

## I. GENERALITES

La réplication de l'ADN correspond à un ensemble de phénomènes par lesquels sont réalisées des copies fidèles des molécules de DNA, permettant une conservation stable de l'information génétique dans une espèce donnée et d'une génération à une autre.

La réplication est un processus commun chez les eucaryotes et les procaryotes, et elle est catalysée par un groupe d'enzymes et un groupe de protéine hautement spécifique.

## II. LOIS FONDAMENTALES DE LA REPLICATION DU DNA

La réplication est gouvernée par un ensemble de lois fondamentales:

- Semi-conservative.
- Bidirectionnelle.
- Complémentaire et dans le sens 5→' 3'.
- Discontinue.
- Nécessite la présence d'une amorce.

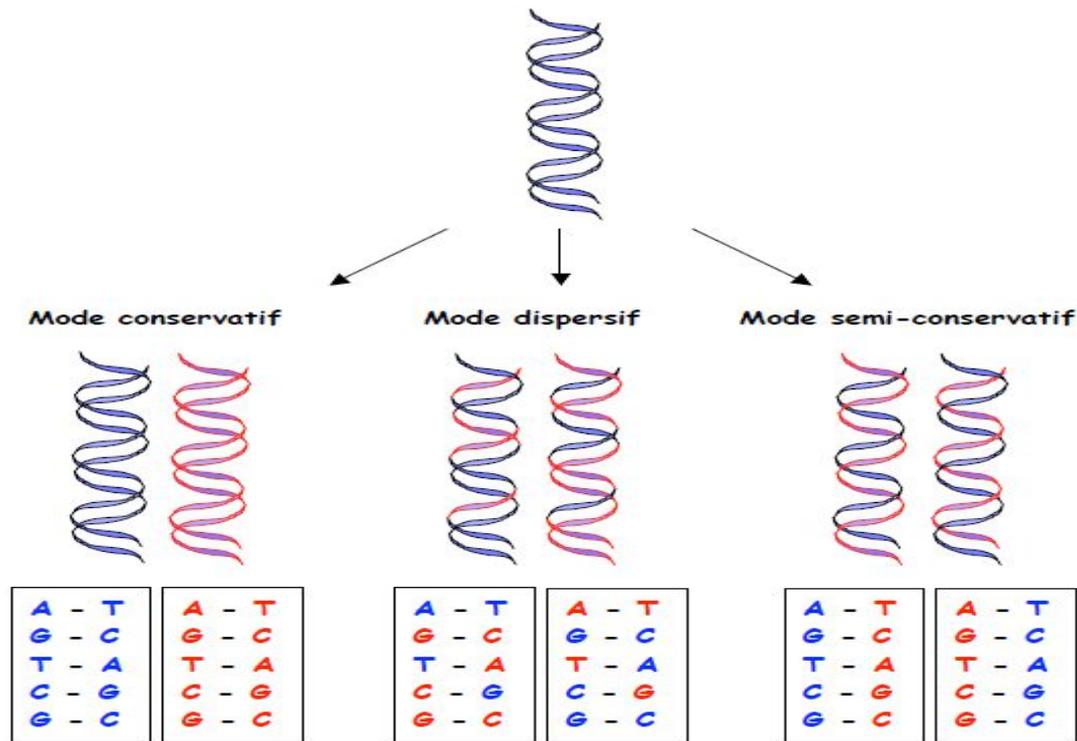
### II.1. La réplication de l'ADN est Semi-conservatrice:

C'est une réplication où chaque brin d'ADN parental sert de matrice à la synthèse d'un nouveau brin fils complémentaire: **Chaque cellule-fille reçoit un brin de la mère et un brin néo-synthétisé.**

L'hypothèse de la réplication semi conservatrice fut proposé par WATSON et CRICK, elle fut vérifiée en 1957 par MATTHEW MESELSON et FRANKLIN STAHL.

Dans les années 1950, trois mécanismes différents ont été proposés pour la réplication d'ADN (**Fig:25**):

- Théorie conservatrice** : Les deux brins parentaux restent intacts après la réplication d'ADN.
- Théorie Semi conservatrice** : Chacune des molécules d'ADN filles se compose d'un brin parente et d'un nouveau brin.
- Théorie Dispersive** : Les molécules d'ADN parents et filles sont décomposées en fragments.



**Fig25 : Les hypothèses de la réplication d'ADN proposés par WATSON et CRICK:**

### - Expérience de MESELSON et STAHL

- ❑ Mise en culture des bactéries E. coli, pendant 14 générations, dans un milieu contenant comme seule source d'azote du chlorure d'ammonium ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) radioactif (le  $^{15}\text{N}$  est l'isotope lourd de l'azote et le  $^{14}\text{N}$  est l'isotope léger, normale). L'ADN récupéré contenant du  $^{15}\text{N}$  était plus lourd en comparaison avec l'ADN parentale contenant du  $^{14}\text{N}$ .
- ❑ Transfert des bactéries E. coli contenant du  $^{15}\text{N}$  dans un nouveau milieu contenant uniquement le  $^{14}\text{N}$  léger et récupération de ces bactéries après dédoublement de la population (30min).
- ❑ Le mélange d'ADN lourd  $^{15}\text{N}$  et d'ADN léger  $^{14}\text{N}$  peut être séparé par centrifugation par une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl). Ces deux types d'ADN forment dans le CsCl deux bandes. Une pour l'ADN ayant du  $^{15}\text{N}$  et une autre pour l'ADN ayant uniquement du  $^{14}\text{N}$ .
- ❑ Après une génération, la bande d'ADN isolée de ces bactéries de 1<sup>ère</sup> génération était juste au milieu des deux bandes en un emplacement indique que les ADN en double

hélice des cellules filles étaient hybrides et comprenaient un brin nouveau  $^{14}\text{N}$  et un brin parental  $^{15}\text{N}$  (Fig:26).

- L'étape suivante de l'expérience de Meselson et Stahl fut de laisser les cellules se diviser encore une fois dans le milieu  $^{14}\text{N}$  (60min). L'ADN produit au cours de ce second cycle de réplication présentait après isolement deux bandes, l'une avec une densité égale à celle de l'ADN léger et l'autre ayant la densité de l'ADN hybride observé après dédoublement cellulaire (Fig:26).



**Fig26 : résultats du mode de réplication d'ADN**

### Interprétation:

L'ADN cellulaire d'E.coli issus des deux générations suivantes fut étudié de façon précise et centrifugé à l'équilibre dans un gradient de densité de CsCl. L'ADN  $^{15}\text{N}$  à une position plus basse dans le gradient de CsCl que celle de l'ADN  $^{14}\text{N}$ , la position de l'ADN hybride était intermédiaire.

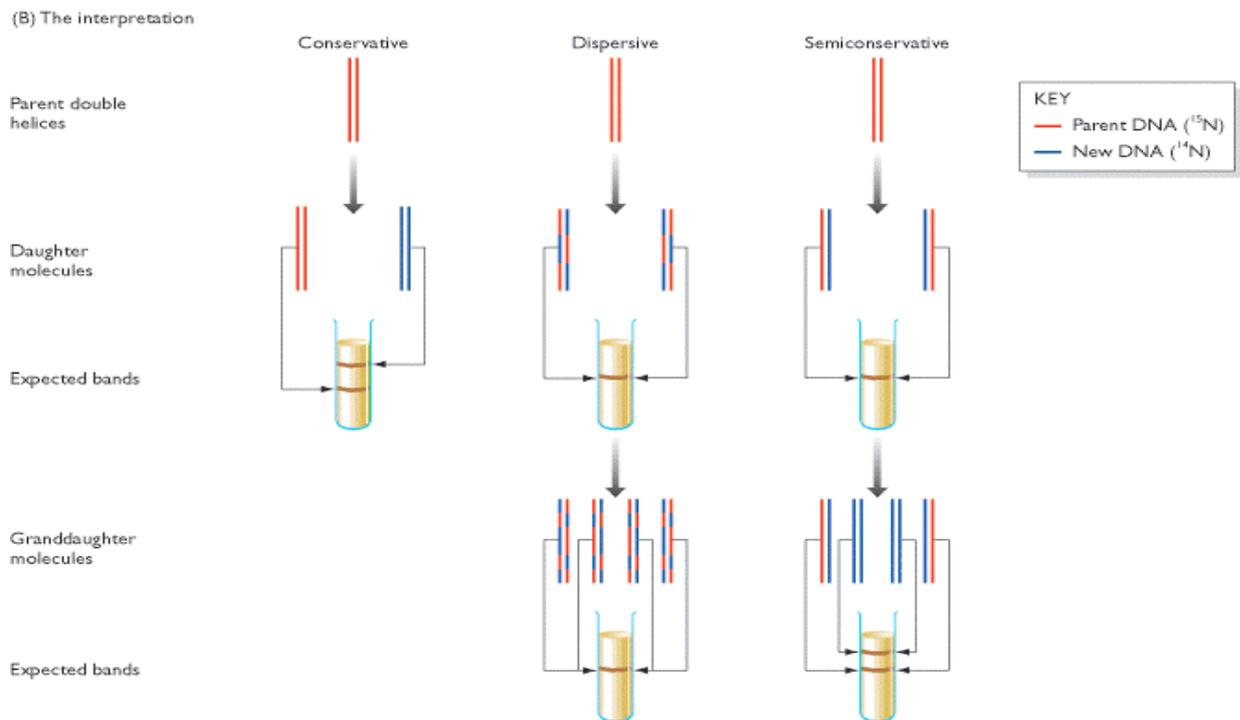
Si la réplication avait été conservatrice, chacun des brins lourds de l'ADN parental se serait répliqué pour donner le duplex d'ADN initial lourd, et un duplex d'ADN contenant deux nouveaux brins légers.

A la génération suivante, cette réplication conservatrice aurait aboutie à un ADN lourd et 3 ADN légers mais pas d'hybride.

Si la réplication avait été dispersive, chacun des brins lourds de l'ADN se serait répliqué pour donner 2 molécules d'ADN filles ou chaque brin de chaque molécule serait formé de 50% de fragments d'ADN parental ( $^{15}\text{N}$ ) et 50% de fragments néosynthétisés ( $^{14}\text{N}$ ).

A la 2<sup>ème</sup> génération, cette réplication dispersive aurait aboutie également à un ADN d'hybride mais avec un taux de radioactivité moins important.

Au contraire, l'expérience de MESELSON et STAHL montre que la réplication est semi-conservatrice, aboutissant à deux duplex fils chacun contenant un brin parental lourd et un brin léger nouveau. La génération suivante fournit deux ADN hybrides et deux ADN légers (Fig:27).



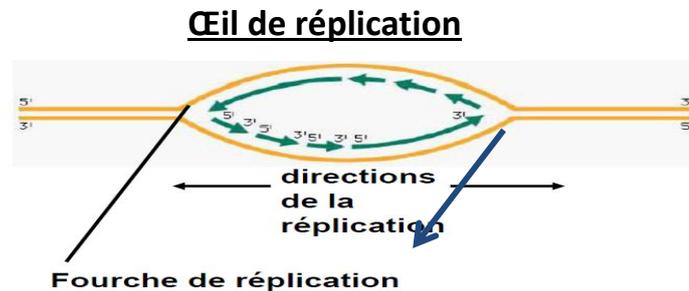
**Fig 27: résultats de la réplication semi-conservatrice, conservatrice et dispersive de l'ADN**

## **II.2. La réplication de l'ADN est bidirectionnelle:**

La réplication commence à partir d'une origine de réplication et progresse dans les deux sens à partir de ce point créant ainsi deux fourches de réplication on dit que la réplication est bidirectionnelle (Fig:28). Les boucles de réplication débutent toujours en un point unique appelé origine est symbolisé par ORIC chez les procaryotes. Ce point de départ renferme des séquences nucléotidiques bien déterminées.

Les procaryotes possèdent une origine unique (ORIC) sur chaque chromosome. Les eucaryotes ont des origines multiples sur chaque chromosome (chez la levure ARS= les séquences de réplication autonomes).

La réplication s'effectue simultanément et à la même vitesse à partir de l'origine dans des directions opposées, délimitant ainsi deux fourche de réplication au niveau de chaque origine (**Fig:28**).



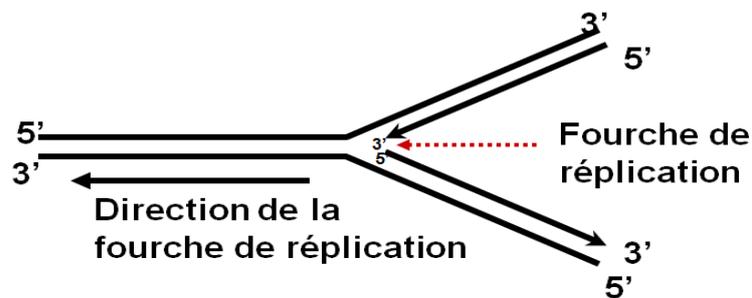
**Fig 28 : l'unité de réplication**

**II.3. orientation :**

Chez tous les organismes vivants, la réplication (La synthèse du nouveau brin de l'ADN) se fait toujours dans la direction 5'→3':Le brin fils est allongé par l'addition de nouveaux nucléotides à son bout 3'(**Fig:29a**).

La synthèse de l'ADN s'effectue toujours dans le sens 5'→3'. Les deux brins sont antiparallèles, en suivant la direction de la fourche de réplication un brin est synthétisé dans le sens 5'→3' mais l'autre brin devrait être synthétisé dans le sens 3'→5' ce qui est impossible.

**Comment ce brin est-il donc synthétisé?**



**Fig 29a : La direction de la fourche et des brins nouvellement synthétisés**

La découverte de cette synthèse revient à **REIJ OKAZAKI**. Ce brin est synthétisé par étapes ou par morceaux. Ce sont de petits fragments appelés maintenant fragment d'Okazaki qui sont synthétisés en discontinu dans le sens 5'→3'sur le deuxième de l'ADN. Ces fragments peuvent aller de quelques centaines à des milliers de nucléotides.

Le premier brin est donc synthétisé dans le sens 5'→3' en continu alors que le deuxième brin est synthétisé toujours dans le sens5'→3'mais en discontinu (en petits morceaux) (**Fig :29b**).

On appelle le brin continu, le brin directeur ou précoce ou le brin avancé et le brin discontinu, le brin retardé ou tardif (sens inverse du mouvement de la fourche de réplique).

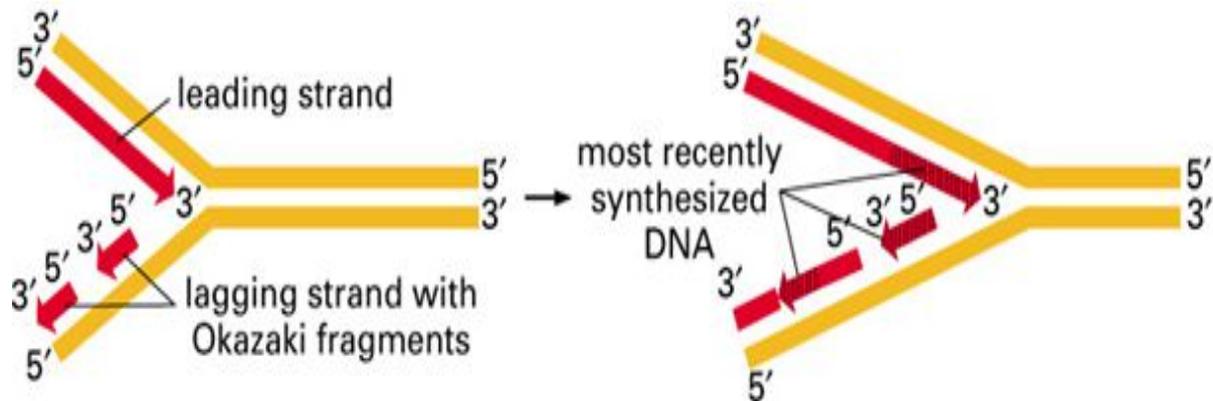


Fig29b : La direction de la fourche de réplique et des brins nouvellement synthétisés

#### II.4. La réplique nécessite la présence d'une amorce :

C'est une courte séquence nucléotidique de nature ARN de 5 à 10 nucléotides et obligatoire à l'initiation de la réplique. Cette séquence est synthétisée par une enzyme appelée primase à partir duquel l'ADN polymérase se lie au bout 3' et entamera par la suite la synthèse du nouveau brin.

Chez les eucaryotes, les amorces peuvent être des molécules mixtes ARN/ADN de 25 à 30 nucléotides (5 à 12 ARN et le reste ADN) et sont synthétisées par l'ADN polymérase  $\alpha$ .

### III. LES ENZYMES DE LA REPLICATION

La réplique est catalysée par un complexe multienzymatique appelé réplique de l'ADN ou replisome (E.Coli).

Ces enzymes présentent de grandes similitudes chez les procaryotes et les eucaryotes, parfois même sont communes. On distingue:

#### III.1. Les hélicases ou déroulases:

Ce sont des enzymes dont le rôle est le **déroulement de la double hélice d'ADN** (elles séparent progressivement les deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes). Elle commence la catalyse au niveau de la fourche de réplique, et se déplace le long de l'ADN tout en séparant les brins utilisant l'énergie chimique de l'ATP.

### III.2. Les topoisomérases

#### A- la conformation des ADN les topoisomères.

Les topoisomères sont deux molécules d'ADN qui ont la même séquence et diffèrent uniquement par le nombre d'enlacements (superenroulement ou le nombre de tours que fait l'un des brins autour de l'autre brin). Il existe Différents états des topoisomères.

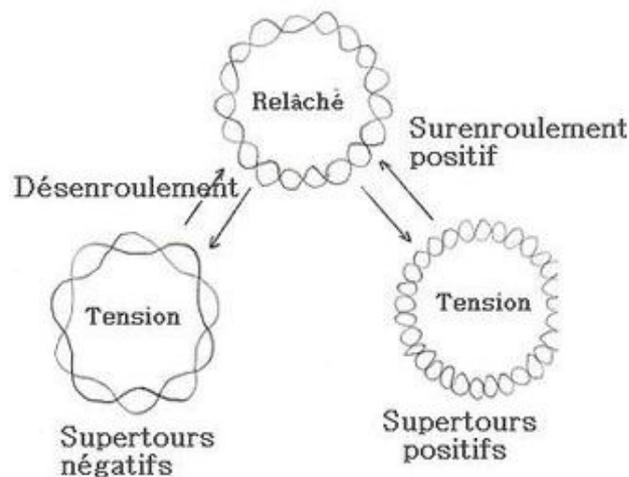
L'ADN peut exister:

- état relâché: avec une contrainte minimale dans la molécule. C'est la forme la plus stable de la molécule.
- état sur enroulé: l'axe de la double hélice d'ADN peut s'enrouler sur lui-même en formant un super enroulement.

Deux formes de superenroulement sont alors possibles:

-Un superenroulement qui correspond à: une augmentation du nombre d'enroulements dans la même direction que la rotation de l'hélice B (rotation droite). On parle de **superenroulement positif (Fig :30)**.

-Un superenroulement de l'ADN autour de son axe dans la direction opposée au sens des aiguilles d'une montre. Il y a donc au niveau de l'ADN relâchement de la pression de torsion. On parle de **superenroulement négatif (Fig :30)**.



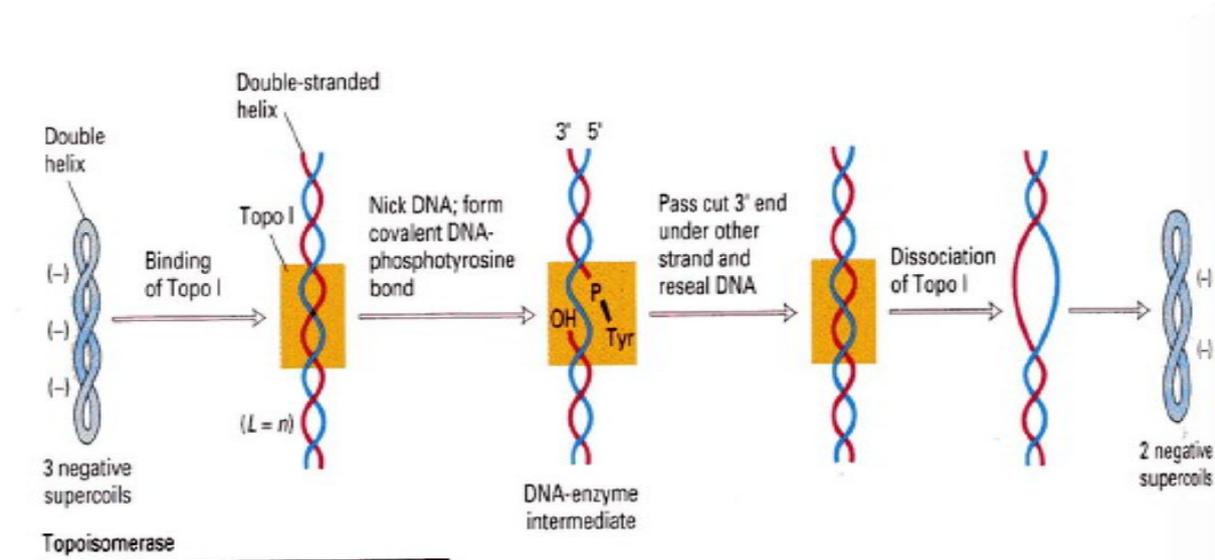
**Fig 30: Les superenroulements de l'ADN**

#### B- Rôle des TOPOISOMÉRASES

Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le nombre d'enlacements. Elles augmentent ou diminuent le nombre de supertours dans les molécules d'ADN double brin.

**-Les topoisomérases de type I:**

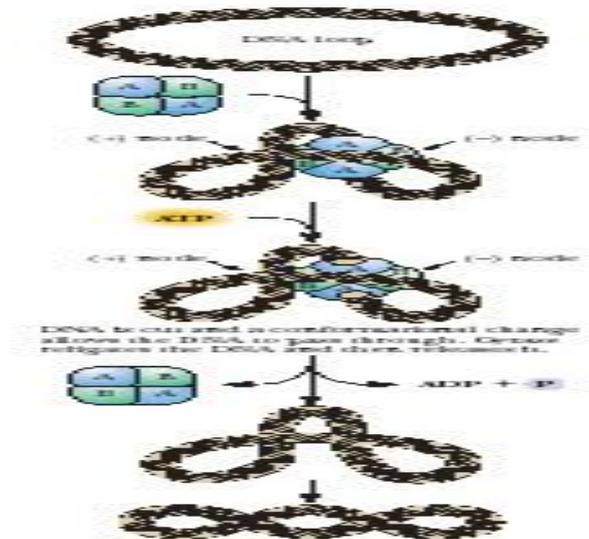
Agissent sur un seul brin d'ADN provoquant sa cassure, et faisant tourner le brin cassé autour du brin intact, puis joignent les deux bouts, leurs rôle principal est de catalyser le relâchement de l'ADN. Ils peuvent agir sur de l'ADN superenroulé positif ou négatif(**Fig:31**).



**Fig 31 : Rôle des topoisomérases I**

**-Les topoisomérases II :**

Couper de manière transitoire les deux brins de l'ADN, puis les ressoudent et agissent sur l'ADN superenroulé négatif ou positif (exemple: gyrase bactérienne). Elles nécessitent l'énergie de l'ATP(**Fig:32**).



**Fig 32: Rôle des topoisomérases II**

**III.3. La primase:**

Les ADN polymérases des procaryotes et des eucaryotes ne peuvent fonctionner que si une extrémité 3'OH est disponible pour catalyser la formation d'un lien phosphodiester;

Ce bout 3'OH est fourni par une enzyme appelée ADN primase. C'est une enzyme a activité ARN polymérase qui catalyse la synthèse d'un court segment d'ARN (une

amorce de 5 à 10 nucléotides) complémentaire au brin matrice d'ADN indispensable à l'initiation de la réplication et à l'action de l'ADN polymérase.

### III.4. Les DNA polymérases

Ce sont des enzymes qui catalysent la synthèse d'ADN on distingue:

#### Chez les procaryotes:

- L'ADN polymérase III: qui poursuit la synthèse de l'ADN sur l'amorce. (Réplication du brin avancé et synthèse des fragments d'Okazaki).
- L'ADN polymérase II: Réparation de l'ADN endommagé grâce à une activité exonucléase 3' vers 5'.
- L'ADN polymérase I: hydrolyse les amorces et les remplace par de l'ADN et réparation de l'ADN.

**Tableau5 : Rôles des ADN polymérases des procaryotes**

ADN polymérase	Nombre de sous unités	Activités	Rôle
I	1	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5' - Une activité exonucléasique 5'→3'	hydrolyse les amorces et les remplace par de l'ADN
II	≥ 4	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5'	activité surtout de réparation
III	≥ 10	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5'	poursuit la synthèse de l'ADN sur l'amorce. Synthétise le Brin avancé et brin retardé

#### Chez les eucaryotes:

- L'ADN polymérase  $\alpha$  : Synthèse les amorces mixtes ARN/ADN de 25 à 30 nucléotides à l'origine de la réplication sur le brin avancé et pour les fragments d'Okazaki du brin retardé.
- L'ADN polymérase  $\beta$  : impliquée dans la réparation d'ADN dans des cellules en cours de division que dans des cellules quiescentes
- L'ADN polymérase  $\delta$  : Principale polymérase eucaryotique intervenant dans la réplication de l'ADN:
  - Synthèse du brin avancé.
  - Synthèse du brin retardé.
  - Réparation grâce à son activité exonucléase dans le sens 3' vers 5'.

- **L'ADN polymérase $\gamma$** : responsable de la réplication de l'ADN mitochondriale dont la réplication est indépendante de l'ADN nucléaire.
- **L'ADN polymérase $\epsilon$**  : Peut remplacer la DNA polymérase dans certains cas tel que la réparation et la synthèse du brin retardé.

**Tableau6 : Rôles des ADN polymérases des eucaryotes.**

ADN polymérase	Nombre de sous unités	Activités	rôle
Alpha $\alpha$	4	- Une activité polymérase 5'→3' - une activité primase 5'→3' - alpha n'a pas d'activité exonucléasique 3'→5'	Synthèse les amorces mixtes ARN/ADN de 25 à 30 nucléotides à l'origine de la réplication sur le brin avancé et pour les fragments d'Okazaki du brin retardé.
Delta $\delta$	2	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5'' - pas d'activité primase,	Principale polymérase eucaryotique intervenant dans la réplication de l'ADN. · Synthèse du brin avancé. · Synthèse du brin retardé. · Réparation grâce à son activité exonucléase dans le sens 3' vers 5'.
Epsilon $\epsilon$	2	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5' - Pas d'activité primase	Peut remplacer la DNA polymérase dans certains cas tel que la réparation et la synthèse du brin retardé
Béta $\beta$	1>	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5' - Pas d'activité primase	- impliquée dans la réparation d'ADN dans des cellules en cours de division que dans des cellules quiescentes
Gamma $\gamma$	1	- Une activité polymérase 5'→3' - Une activité exonucléasique 3'→5'' - Pas d'activité primase	responsable de la réplication de l'ADN mitochondriale dont la réplication est indépendante de l'ADN nucléaire

**Les caractéristiques des DNA polymérases:**

La synthèse de nouveaux brins est réalisée uniquement en présence d'une matrice. Selon la loi de complémentarité, une cytosine est placée en face d'une guanine et une thymine en face d'une adénine. La matrice ici est présentée par les deux brins d'ADN.

Les ADN polymérase initient la synthèse d'ADN uniquement en présence d'une amorce. Une amorce est un ensemble de nucléotides qui est déjà appariés.

A l'extrémité OH libre de cette amorce (Terminaison de l'amorce) débute l'action de la polymérase en ajoutant les désoxynucléotides tout en respectant la loi de complémentarité.

La synthèse de l'ADN nécessite comme précurseur **les dNTP** (dATP, dGTP, dCTP et dTTP).

Elle ajoute les dNTP aux extrémités 3'OH libre de l'amorce puis aux extrémités des brins d'ADN en croissance.

La présence de certains ions (cations bivalents:  $Mg^{2+}$ , ce cation est indispensable pour la réplication de l'ADN).

**La fidélité** des polymérase est très élevée. Pour environ 1000000 nucléotides ajoutés la polymérase peut faire une seul erreur cependant cette erreur est réparée grâce à l'activité exonucléasique 3' vers 5' de la polymérase.

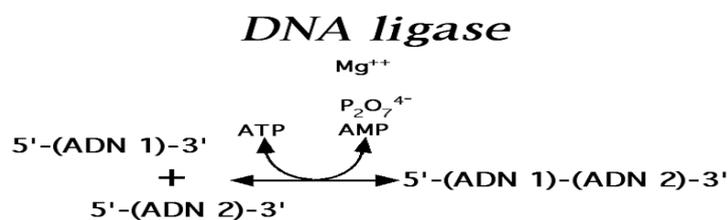
### III.5. les DNA lygases:

Les DNA ligases sont des enzymes qui sont capables de reconstituer la liaison phosphoester entre le carbone 3'-OH et le phosphate-5' de deux nucléotides voisins sur un brin de DNA.

Elles interviennent dans la réplication pour lier ensemble les brins de DNA ou les fragments d'Okazaki synthétisés par les DNA polymérase.

Elles interviennent aussi dans de nombreux processus de réparation du DNA génomique (**Fig:33**).

6.5.1.2



**Fig33 : Rôle de la ligase**

## IV. LES PROTEINES DE LA REPLICATION

### Chez les procaryotes

- La protéine Dna A: ouvre la double hélice.
- La protéine Dna C: nécessaire à la liaison de l'hélicase (Dna B) à l'origine.
- La protéine HU: stimule l'initiation de la réplication.
- Les protéines SSB: stabilisent les ADN simple brin.

## V. LE MECANISME DE LA REPLICATION

### V. 1. Le mécanisme de la réplication chez les procaryotes.

La synthèse de l'ADN peut être divisée en 3 étapes: **L'initiation, l'élongation et la terminaison.**

#### A. l'initiation:

Chez l'E.Coli l'origine de la réplication est appelée oriC, et se compose de 245 paires de bases. Les séquences clés sont formées de deux séries de courtes répétitions (**Fig :34**).

- 3 répétitions d'une séquence de 13 paires de bases: **GATCTNTTNTTTT**

- 4 répétitions d'une séquence de 9 paires de bases: **TTATCCACA**

**N: n'importe quel nucléotide.**

Le processus d'initiation débute par l'ouverture de l'hélice d'ADN grâce à des protéines et des enzymes. Cette ouverture se fait au niveau de l'origine et nécessite l'intervention de plusieurs protéines :

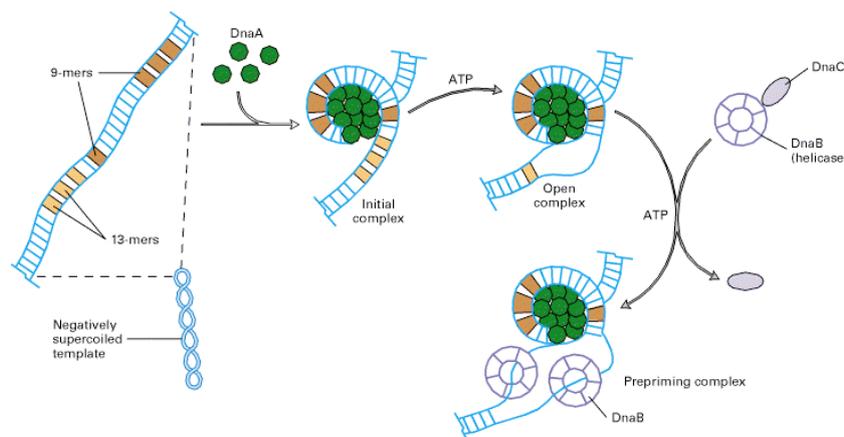
#### A.1. La protéine Dna A

Est un complexe d'environ 20 molécule de Dna A se lie aux 4 répétitions de 9 paires de bases à l'origine, nécessite de l'ATP et activée par une protéine HU (proche des histones).

Sa fonction est de dénaturer successivement le DNA dans la région des 13 paires de bases qui est riche en paire A=T (**Fig :34**).

#### A.2. La protéine Dna B

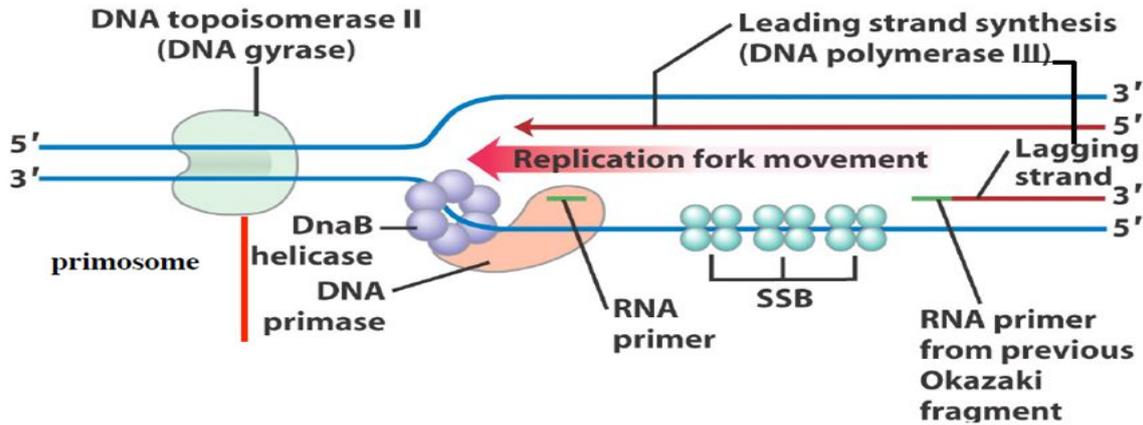
Il s'agit d'une hélicase, qui ne se lie à l'origine qu'en présence d'une **Dna C** et dont le rôle c'est de dérouler le DNA dans les deux directions créant 2 fourches de réplication (**Fig :34**).



**Fig34 : Schéma général de l'initiation chez les procaryotes**

**A.3. La protéine SSB (Single Strand Binding Proteine)**

Ce sont des protéines qui se lient au DNA simple brin, et le stabilisent empêchant sa renaturation (Fig35).



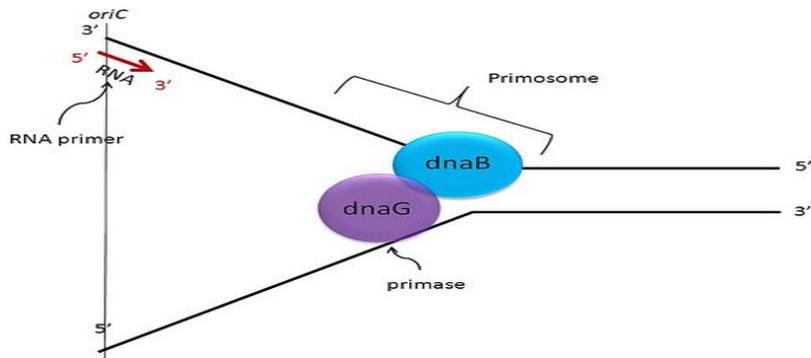
**Fig35 : Mécanisme de la réplication chez les procarvotes**

**A.4. DNA gyrase**

Atténue la contrainte topologique créée par l'action de l'hélicase (Fig :35).

**A.5. La primase (Dna G)**

Qui synthétise un court segment d'ARN (5 à 10 nucléotides) servant d'amorce. Elle constitue avec l'hélicase le primosome (Fig :36).



**Fig36 : Schéma général du primosome**

**B. L'élongation:**

Elle consiste à deux opérations:

- la synthèse du brin avancé.
- La synthèse du brin retardé.

Pour toutes les étapes de l'élongation, les enzymes et protéines agissant au niveau des fourches de réplication sont présentes: hélicase, topoisomérases, protéines SSB.

**B.1. La synthèse de l'amorce**

C'est le rôle de la primase, qui synthétise un court segment d'ARN (5 à 10 nucléotides) servant d'amorce,

La primase est une ARN polymérase capable d'initier toute seule la synthèse de l'ARN, celui-ci est complémentaire de l'ADN matrice dans le sens 5'→3'.

L'ARN amorce est retiré à la fois de la réplique par l'ADN polymérase I à activité exonucléasique 5'→3' et est remplacé par des désoxyribonucléotides

**B.2. La synthèse du brin directeur**

Au niveau du brin matrice 3'→5' la synthèse du nouveau brin est continue, il s'agit du brin avancé ou précoce.

L'ADN polymérase III assure l'élongation de la chaîne polynucléotidique à partir de l'extrémité 3'OH libre de l'amorce du sens 5' vers 3' de façon continue (sens de la fourche de réplique).

Le brin qui servira de matrice au brin continue est lu par l'ADN polymérase III dans le même sens que l'avancée de la fourche, c'est-à-dire de 3' vers 5'.

**B.3. La synthèse du brin retardé**

Au niveau du brin matrice 5' vers 3' la synthèse se fait également de 5' en 3'. Il s'agit du brin retardé.

La synthèse **du brin retardé** s'effectue dans le sens opposé à la fourche de réplique sous forme de fragment d'OKAZAKI (1000 à 2000 pnb).

Cette synthèse est donc plus complexe que la précédente.

Chaque fragment d'OKAZAKI doit avoir sa propre amorce d'ARN.

Le primosome se déplace dans le sens 5'→3', même sens de la fourche de réplique. Au fur et à mesure du déroulement de l'ADN, et à intervalle régulier, la primase synthétise une amorce d'ARN nouveau dans le sens opposé à celui de la fourche de réplique pour un nouveau fragment d'OKAZAKI.

L'action de l'ADN polymérase III se fait dans le sens opposé à celui du primosome.

Le brin qui servira de matrice au brin retardé est lu par l'ADN polymérase III dans le sens opposé que l'avancée de la fourche, c'est-à-dire de 3' vers 5' (**Fig:38**).

L'ADN polymérase I retire l'amorce ARN par son action 5'→3' exonucléasique et les remplace par des segments d'ADN. Chez les eucaryotes, l'amorce est retirée par l'ARNase H et remplacée par l'ADN polymérase.

### **B.4. Rôle de la ligase**

Est de catalyser la formation des liaisons phosphodiester entre une extrémité 3'OH d'un brin d'ADN et le 5'P de l'autre brin, son mécanisme est différent d'un organisme à l'autre

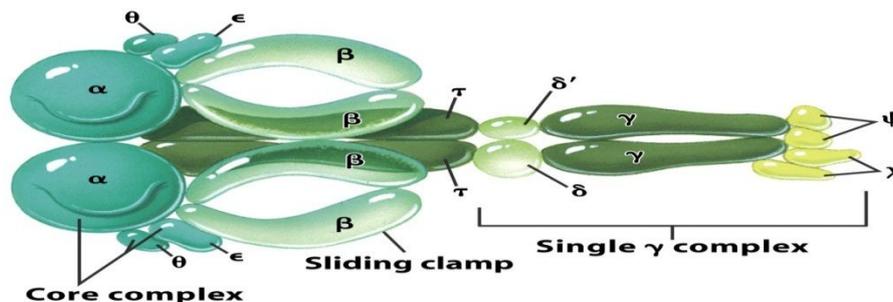
#### **Exemple:**

- E.Coli utilise le NAD<sup>+</sup> comme activateur du groupe P
- D'autres bactéries utilisent l'ATP comme activateur du groupe P

L'attaque nucléophile du groupement 3'OH sur le groupement P favorisant la formation d'une liaison phosphodiester avec fermeture de la cassure et régénération de l'AMP

### **REMARQUE**

Les DNA polymérase nécessite des cofacteurs protéique pour agir (complexe protéique  $\gamma$ , protéine  $\beta$  et les protéines SSB).

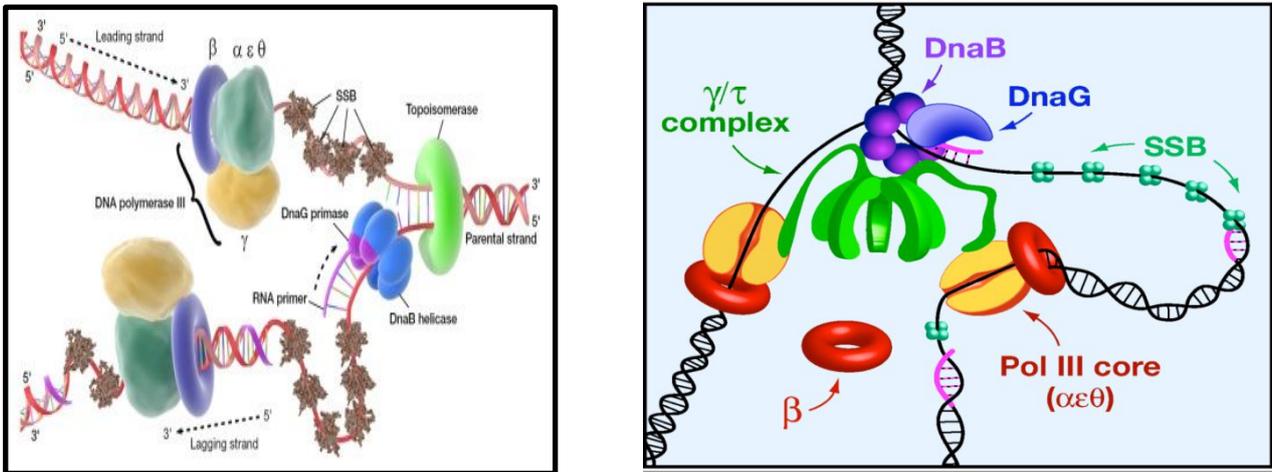


**Fig 37 : Schéma général de l'holoenzyme DNA polymérase III (core-enzyme DNA polymérase III+ les protéines auxiliaires : complexe protéique  $\gamma$  et la protéine  $\beta$**

Les protéines SSB « single strand binding » sont des cofacteurs protéiques qui se fixent sur le DNA monocaténaire déroulé préalablement par l'hélicase ; leurs rôles c'est de stabiliser le DNA monocaténaire en évitant la renaturation et la formation des boucles en se repliant sur lui-même.

Les protéines auxiliaires de la polymérase, le complexe protéique  $\gamma$  (la protéine tenon) et la protéine  $\beta$  (la protéine anneau ou protéine à pince coulissante), avec l'AND polymérase III forment un modèle à pince coulissante dont le rôle c'est d'attirer l'ADN polymérase sur l'amorce et l'empêchent par la suite de quitter la matrice (**Fig:38**). Le complexe protéique  $\gamma$  choisit de se fixer à l'ADN entre l'amorce et la matrice. La protéine  $\beta$  se fixe au voisinage de la protéine tenon, en formant un anneau autour de la matrice d'ADN. La protéine tenon et la protéine à pince coulissante arriment alors l'ADN polymérase à l'ADN, à la jonction de l'amorce avec la matrice. L'anneau formé par la pince coulissante tient la polymérase ancrée à

la matrice aussi longtemps que la réplication se poursuit, en garantissant une incorporation sans interruptions (continue) des milliers de nucléotides dans l'ADN (Fig :38).

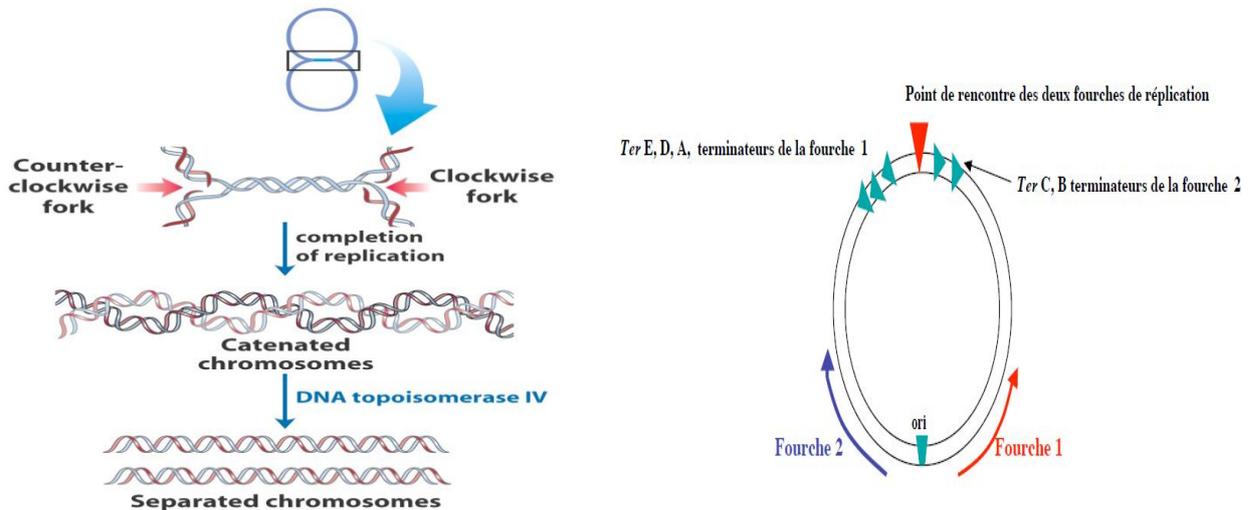


**Fig38 : Le modèle à pince coulissante**

**C. Phase de Terminaison**

Il s'agit d'un mécanisme encore mal connu, les deux fourche de réplifications se rencontre de l'autre côté du chromosome circulaire d'E.Coli, l'intervention des protéines TUS et d'une topoisomérase 4 semble être nécessaire à la séparation finale des deux molécules d'ADN circulaire terminées (Fig:39).

Le terminateur est le site de fixation de protéines « Tus » qui reconnaît les régions Ter. Chez E-Coli, la partie entre les deux terminateurs n'est d'abord pas répliqué, les deux ADN circulaires sont ainsi associés, on utilise alors la topo-isomérase 4 pour les dissociés.



**Fig 39 : Terminaison de la réplication chez les procarvotés**

## V.2. LE MECANISME DE LA REPLICATION CHEZ LES EUCARYOTES:

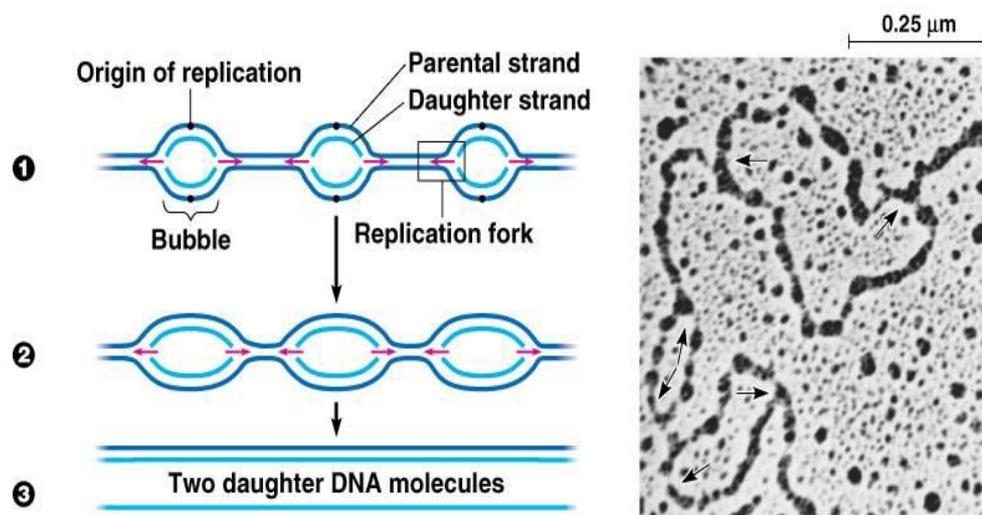
L'ADN des eucaryote est beaucoup plus grand que celui des procaryotes et organisé en chromatine.

Les caractéristiques essentielles de la réplication sont identiques chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Quelques variations cependant, permettent d'envisager des éléments nouveaux concernant la régulation de la réplication et de la relation avec le cycle cellulaire.

### A. Au niveau de la fourche de réplication :

Chez les eucaryotes environ 50 nucléotides sont synthétisés /S. ceci correspond au  $1/10^{\text{ème}}$  de ce observé chez E.Coli, à cette vitesse si la réplication se faisait à partir d'une origine unique, elle prendrait environ 500 heures pour chaque chromosome humain.

En réalité chez l'homme la réplication démarre à partir de plusieurs origines et se fait de façon bidirectionnelle. Ces origines sont espacées de 30000 à 300000 paire de bases (Fig:34).



**Fig40 : Origines multiples de la réplication chez les eucaryotes**

### B. Structure des origines

Chez les levures les origines sont appelées ARS (Autonomous Replicating Sequence) comprenant environ 300 paires de bases qui sont reconnues par des protéines spécifique appelées ORC « Complexe de Reconnaissance de l'Origine ».

A l'exception de la levure, les structures des origines chez les autres eucaryotes ne sont pas identifiées.

**C. Les DNA polymérases**

La réplication chez les eucaryotes fait intervenir un nombre d'ADN polymérases plus important que chez les procaryotes. De nombreuses protéines interviennent comme facteurs de réplication.

Il existe 5 DNA polymérases présentant chacune une fonction différente.

Les ADN polymérases  $\alpha$  et  $\delta$  sont les principales polymérases impliquées dans la réplication des chromosomes.

**L'ADN polymérase  $\alpha$**  : Synthèse les amorces mixte ARN/ADN de 25 à 30 nucléotides à l'origine de la réplication sur le brin avancé et pour les fragments d'Okazaki du brin retardé.

**Les DNA polymérases  $\alpha$**  sont formées de 4 sous unités

- 2 à activité primase
- 2 à activité polymérase

**La DNA polymérase  $\delta$**  est impliquée dans la synthèse du brin directeur et du brin retardé.

**L'ADN polymérase  $\epsilon$**  Peut remplacer la DNA polymérase dans certains cas tel que la réparation et la synthèse du brin retardé.

Chez les eucaryotes, l'amorce est retirée par l'**ARNase H** et remplacée par l'ADN polymérase.

Les DNA polymérase nécessite des cofacteurs protéique pour agir (RFA facteur de réplication A », RFC facteur de réplication C » et PCNA antigène nucléaire de prolifération cellulaire).

**REMARQUE**

- La RFA protéine analogue de la SSB d'E.Coli.
- La RFC protéine analogue du complexe protéique  $\gamma$  d'E.Coli.
- La PCNA protéine analogue de la protéine  $\beta$  d'E.Coli.

**D. La réplication des télomères**

Le problème majeur lors de la réplication de l'ADN linéaire des eucaryotes est l'élimination potentielle de l'amorce d'ARN la plus externe de l'extrémité 5' du brin retardataire ce qui pourrait entraîner un raccourcissement de l'ADN à chaque cycle de réplication d'où une perte d'information génétique. Le problème est résolu par l'intervention d'une structure spécialisée à l'extrémité du chromosome, appelée télomère, et par une enzyme spécifique: appelée la télomérase.

-

### - Les Télomères

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

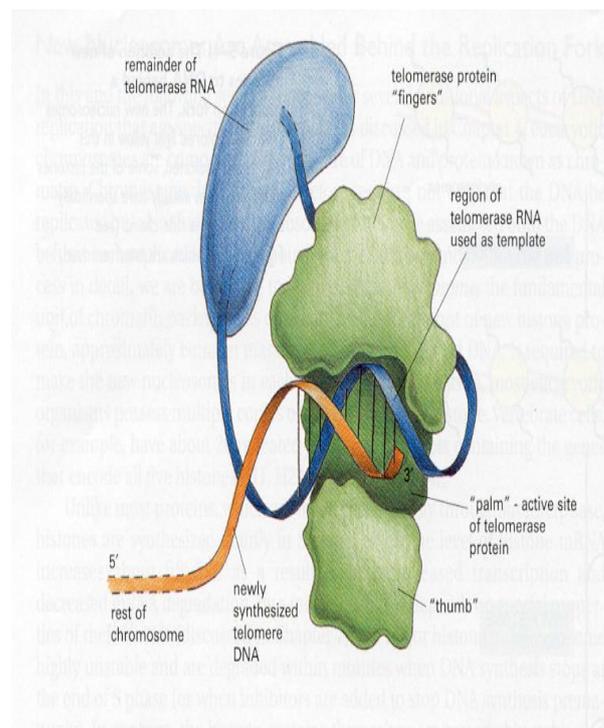
Les télomères ont différents rôles : maintenir l'intégrité des informations génétiques, protéger les ADN vis-à-vis des exo-nucléases, éviter les fusions des chromosomes au niveau des extrémités, rôle dans l'organisation de la chromatine durant l'interphase par interaction avec la membrane nucléaire.

En absence de télomères les extrémités chromosomiques fusionnent provoquant des cassures des chromosomes et déstabilisation du génome aboutissant à la mort cellulaire.

### - La télomérase

La télomérase est une transcriptase inverse appartenant à une classe d'ADN polymérase qui synthétise une molécule d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Elle se compose de deux sous-unités:

- La sous-unité protéique ou TERT (*Telomerase reverse transcriptase*); C'est une enzyme à activité transcriptase inverse qui assure la synthèse de la séquence télomérique en utilisant l'autre sous-unité ARN comme matrice.
- La sous-unité ARN ou TERC; C'est une séquence d'ARN comportant plusieurs régions en tige et boucles et un pseudonœud. Une des boucles de ce pseudonœud contient la séquence qui sert de matrice à la synthèse de la répétition télomérique. La région modèle de TERC est 3'-CAAUCCCAAUC-5'. (Fig:41)

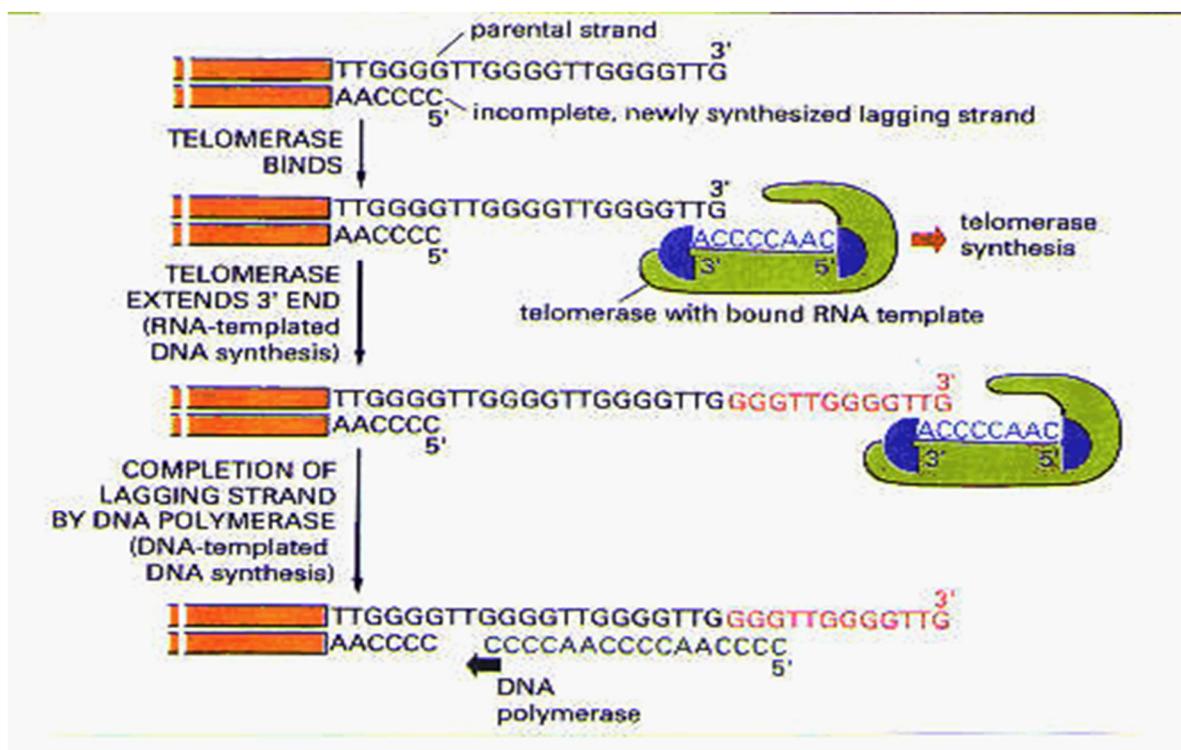


**Fig 41 : Structure de la télomérase**

### - Mode d'action de la télomérase

- En utilisant le pseudo-nœud du TERC comme modèle, le TERT ajoute une séquence répétée de six nucléotides: 5'-TTAGGG (chez tous les vertébrés, la séquence est différente chez d'autres organismes) à l'extrémité 3' des chromosomes. La région modèle de TERC est 3'-CAAUCCCAAUC-5'(Fig:42).
- Après cette synthèse l'enzyme glisse le long du brin de DNA et recommence de nouvelles unités télomériques.
- L'extrémité 3' du brin modèle ainsi allongée peut servir à la pose d'une amorce nouvelle : l'extrémité 3'-OH de cette amorce sert alors de point de départ pour la DNA polymérase  $\delta$  pour synthétiser l'autre brin.
- Après l'hydrolyse de l'amorce d'ARN, on aura toujours un brin fils plus court vers son extrémité 5' que le brin parental à son extrémité 3', mais cela n'a pas d'importance car on dispose maintenant d'un très grand nombre de séquences répétées. la perte à chaque réplication de quelques nucléotides ne sera pas grave puisqu'elle aura lieu dans une zone où il n'y a pas d'information génétique (le télomère).

Les télomères humains sont prévus pour se raccourcir d'environ 100 paires de bases par division cellulaire et lorsque la perte atteint plusieurs milliers de bases, les cellules cessent de se diviser et entrent en sénescence : c'est le vieillissement.



**Fig 42 : Mode d'action des télomérases**

**QCM ET EXERCICES****Exercice1**

L'ADN d'un bactériophage a la composition suivante en bases :

C : 19%                      A : 25%                      T : 33%                      G : 23%

- a- Qu'y a-t-il d'inhabituel dans cette composition ?  
 b- Cet ADN est utilisé comme matrice dans la réaction catalysée par un ADN polymérase ; le produit synthétisé *in-vitro* a la composition suivante :

C : 23%                      A : 33%                      T : 25%                      G : 19%

- Quelle relation existe-t-il entre cette composition et celle de l'ADN d'un phage ?
- Si la quantité d'ADN synthétisé dans la réaction précédente est égale à celle de l'ADN ajouté comme matrice quelle sera le pourcentage des diverses bases dans l'ADN total (ADN matrice + synthétisé *in-vitro*) ?
- Que peut-on dire de la structure de l'ADN d'un bactériophage ?

**Exercice2**

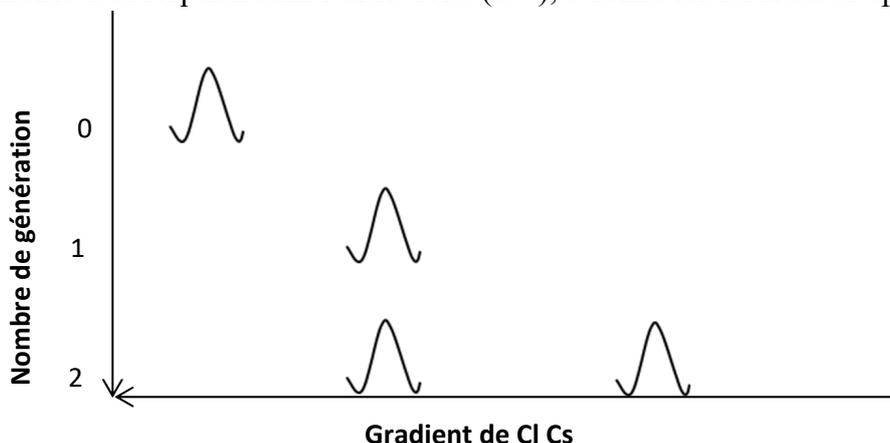
Un amis vous donne 3 échantillons d'acides nucléiques et vous demande de déterminer l'identité chimique de chaque échantillon (ADN ou ARN) et si les molécules sont double brin ou simple brin. Vous utilisez des nucléase puissantes pour dégrader complètement chaque échantillon afin d'isoler les nucléotides qui les constituent et ainsi déterminer les proportions relatives de ces nucléotides.

Que pouvez-vous répondre à votre ami quand la nature de ces échantillons (ADN ou ARN, simple brin ou double brin) ?

- Echantillon 1 : dGMP 13%      dCMP 13%      dAMP 37%      dTMP 37%
- Echantillon 2 : dGMP 12%      dCMP 36%      dAMP 47%      dTMP 5%
- Echantillon 3 : GMP 22%      CMP 47%

**Exercice3**

En s'inspirant de l'expérience de Meselson et Sthal, des jeunes chercheurs on fait d'abord croître des bactéries pendant quelques générations dans un milieu enrichi en azote ( $^{15}\text{N}$ ), ces bactéries ont été ensuite placées sur un milieu avec une source d'azote normal, puis prélevées pour l'analyse de l'ADN après centrifugation sur gradient de  $\text{Cl Cs}$ , par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet (UV), a donné les résultats ci-après :



- 1- A quelle longueur d'onde peut-on réaliser ce suivi ?
- 2- Commentez les résultats obtenus et tirez une conclusion par rapport au mode de réplication en vous appuyant sur les schémas.
- 3- Quels tracés aurait-on pu obtenir si avant centrifugation l'ADN avait été préalablement dénaturé ?
- 4- En admettant que la réplication se fasse selon un mode conservatif, indiquez les tracés observables avec ou sans dénaturation préalable de l'extrait d'ADN  
(Pour les questions 3 et 4 on ne se limitera qu'à la première génération)

#### Exercice 4

#### Répondre par vrai ou faux et justifier votre réponse

- a- Au cours de la réplication, une molécule d'ADN est copiée pour donner une molécule fille.
- b- Lors de la réplication, l'ADN polymérase commence par synthétiser de courtes amorces d'ARN.
- c- La synthèse du brin complémentaire d'ADN  $3' \rightarrow 5'$  est continue.
- d- Les DNA polymérases I des procaryotes ont une activité  $5' \rightarrow 3'$  exonucléasique.
- e- Les amorces des ADN polymérase eucaryotes peuvent être du DNA double brin.
- f- Les ADN polymérase eucaryotes nécessitent pour agir des cofacteurs protéiques.
- g- Chaque fragment d'Okasaki commence par la synthèse d'ARN
- h- La DNA ligase consomme de l'ATP.
- i- Les brèches produites lors du clivage de l'ARN sont comblées par la DNA ligase.
- j- La DNA ligase assure la liaison entre deux fragments contigus d'ADN simple brin.
- k- Toutes les DNA polymérases relient et corrigent le brin néo synthétisé par son activité exonucléasique  $3' \rightarrow 5'$

#### Exercice 5

##### 1- Indiquer si les assertions suivantes sont vraies ou fausses

- V** **F** **a** - Dire que la réplication est semi-conservatrice signifie que les brins d'ADN parentaux servent de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ADN, et qu'ainsi les molécules d'ADN filles se composent d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé.
- V** **F** **b** - quand on les lit dans le même sens ( $5'$  vers  $3'$ ), la séquence nucléotidique du brin d'ADN néosynthétisé est la même que celle du brin matrice parental.
- V** **F** **c** - Une synthèse d'ADN dans le sens  $5'-3'$  suppose que la croissance se fasse par l'addition de dNTP à un groupe  $3'-OH$  libre avec libération de résidus pyrophosphate inorganiques.
- V** **F** **d**. La synthèse de l'ADN s'effectue dans le sens  $5'-3'$  sur la chaîne précoce, et dans le sens  $3'-5'$  sur la chaîne tardive.

e - La perte de l'activité exonucléasique 3' - 5' de l'ADN polymérase d'E. coli doit ralentir le taux de synthèse de l'ADN sans toutefois affecter sa fidélité

## 2- Les principes et mécanismes généraux de la réplication :

a. Il est nécessaire d'ouvrir la molécule d'ADN en un point précis pour procéder enzymatiquement à sa réplication in vivo.

b. La synthèse d'un brin nouveau d'ADN nécessite toujours la fabrication préalable d'une amorce d'ARN.

c. Il existe au niveau d'une fourche de réplication, deux molécules d'ADN polymérases à fonctionnement simultané mais différent, l'une allongeant un brin d'ADN dans le sens 5' --->3' et l'autre allongeant l'autre brin dans le sens 3'--->5'.

d. Le brin dit "précoce" est celui à synthèse discontinue et le brin dit "tardif" est celui à synthèse continue.

e. Dans un oeil de réplication, les deux fourches progressent en direction opposée, à la même vitesse.

## 3- Quelle est l'activité enzymatique, retrouvée chez la plupart des ADN polymérases, qui leur permet d'assurer une très grande fidélité de la réplication?

a. Activité d'exonucléase 3' ----> 5'

b. Activité d'exonucléase 5' ----> 3'

c. Activité de polymérase

d. Activité d'endonucléase

e. Activité de synthèse d'amorce

## 4- La réplication de l'ADN des eucaryotes

a. utilise des désoxyribonucléotides triphosphates.

b. fait intervenir de l'ARN.

c. débute en un seul site.

d. met en jeu des ADN polymérases bidirectionnelles.

e. est semi-conservative.

## 5- L'enzymologie de la réplication

a. La primase est une catégorie d'ARN polymérase spécialisée dans la synthèse des amorces d'ARN sur le brin à synthèse discontinue.

b. La destruction des amorces d'ARN sur le brin retardé est effectuée par l'enzyme nommée ligase.

c. On appelle "ADN hélicase" la protéine séparant les deux brins appariés de la molécule d'ADN à répliquer, au niveau de la pointe de chaque fourche.

d. Les enzymes de relaxation, fonctionnant en amont des fourches, suppriment les contraintes mécaniques induites par la progression de la réplication le long de l'ADN.