

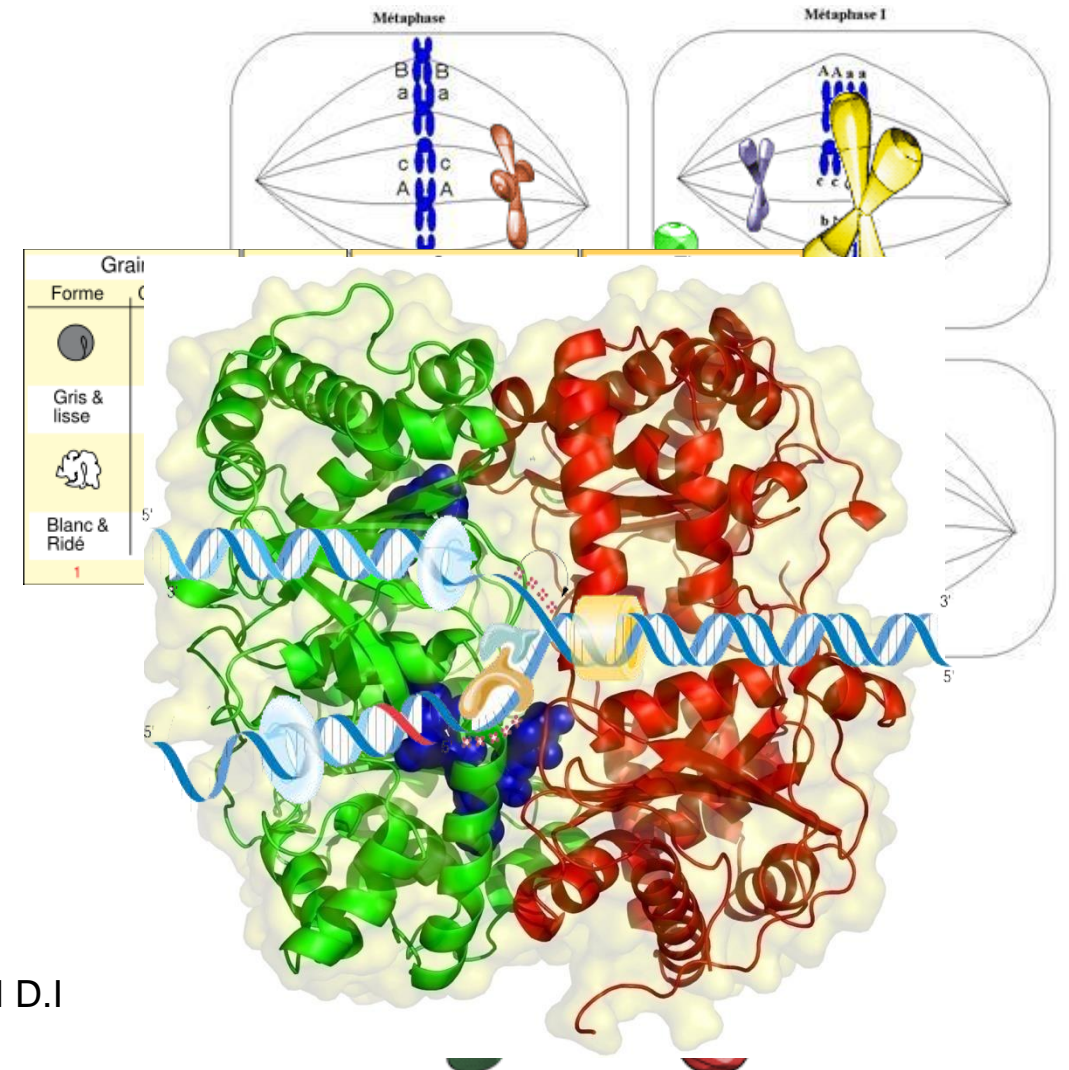
The background of the slide is a repeating pattern of blue DNA double helix structures. The helices are rendered in a 3D style with a metallic blue color and a slight gradient, giving them a sense of depth and volume. They are arranged in a grid-like pattern across the entire slide.

La réplication d'ADN

Présenté par: Dr. DAHMANI D.I

Section génétique

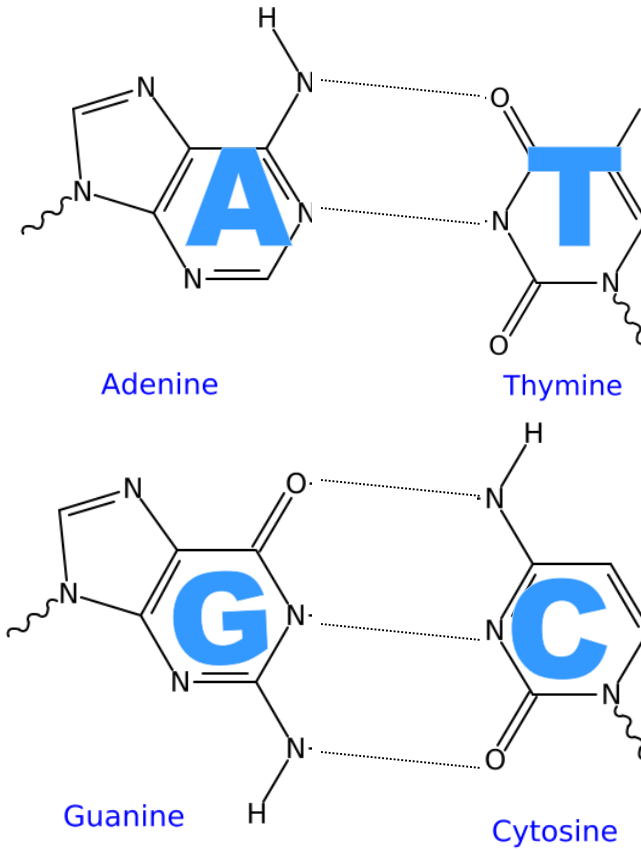
- Cycles cellulaires
 - Mitose et méiose
- Concept du gène
 - Loi Mendélienne
- L'hérédité
- Du gène à la protéine



Ce que l'on sait déjà !



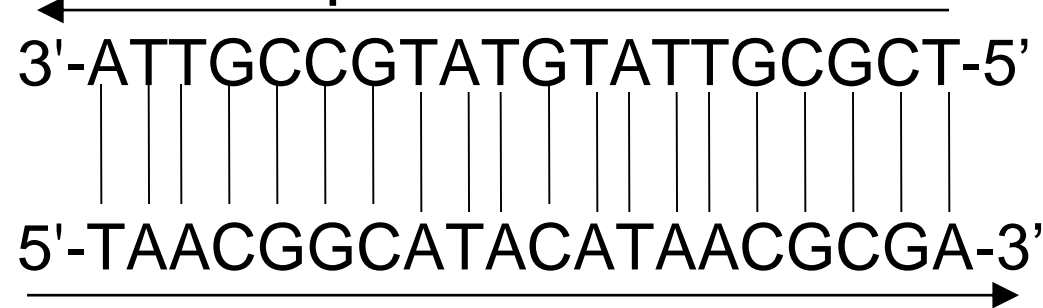
- Nucléotides
 - Adénine (A)
 - Thymine (T)
 - Guanine (G)
 - Cytosine (C)
- Liaison hydrogène
- Double hélice



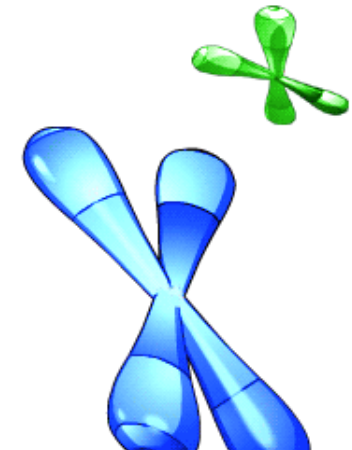
Caractéristiques de l'ADN



- Brins complémentaires



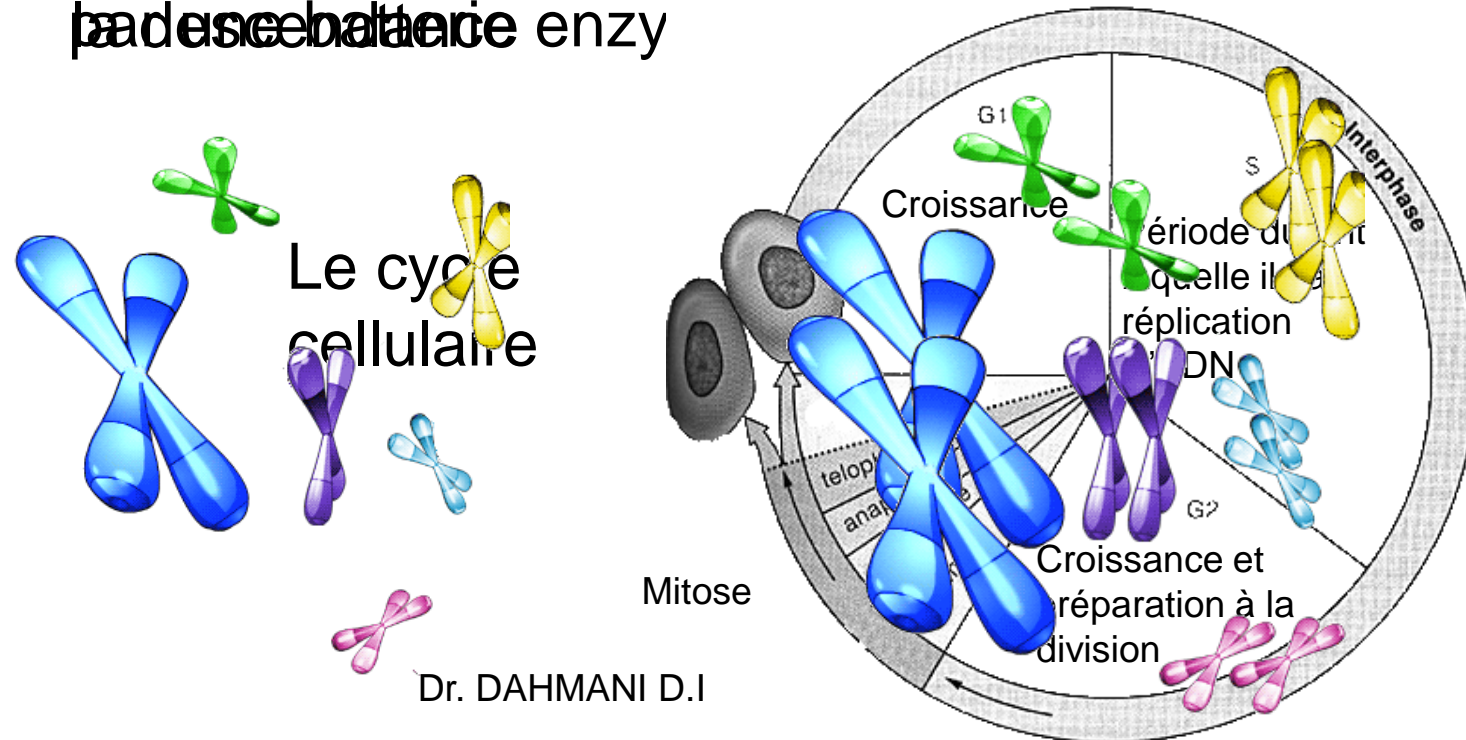
- Matériel héréditaire transmis à la descendance
- ADN → ARN → Protéines



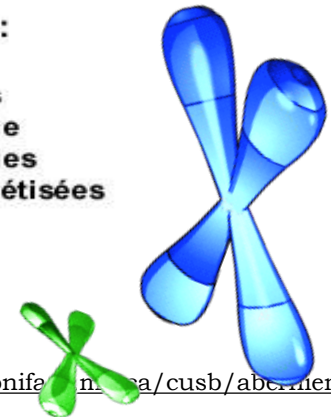
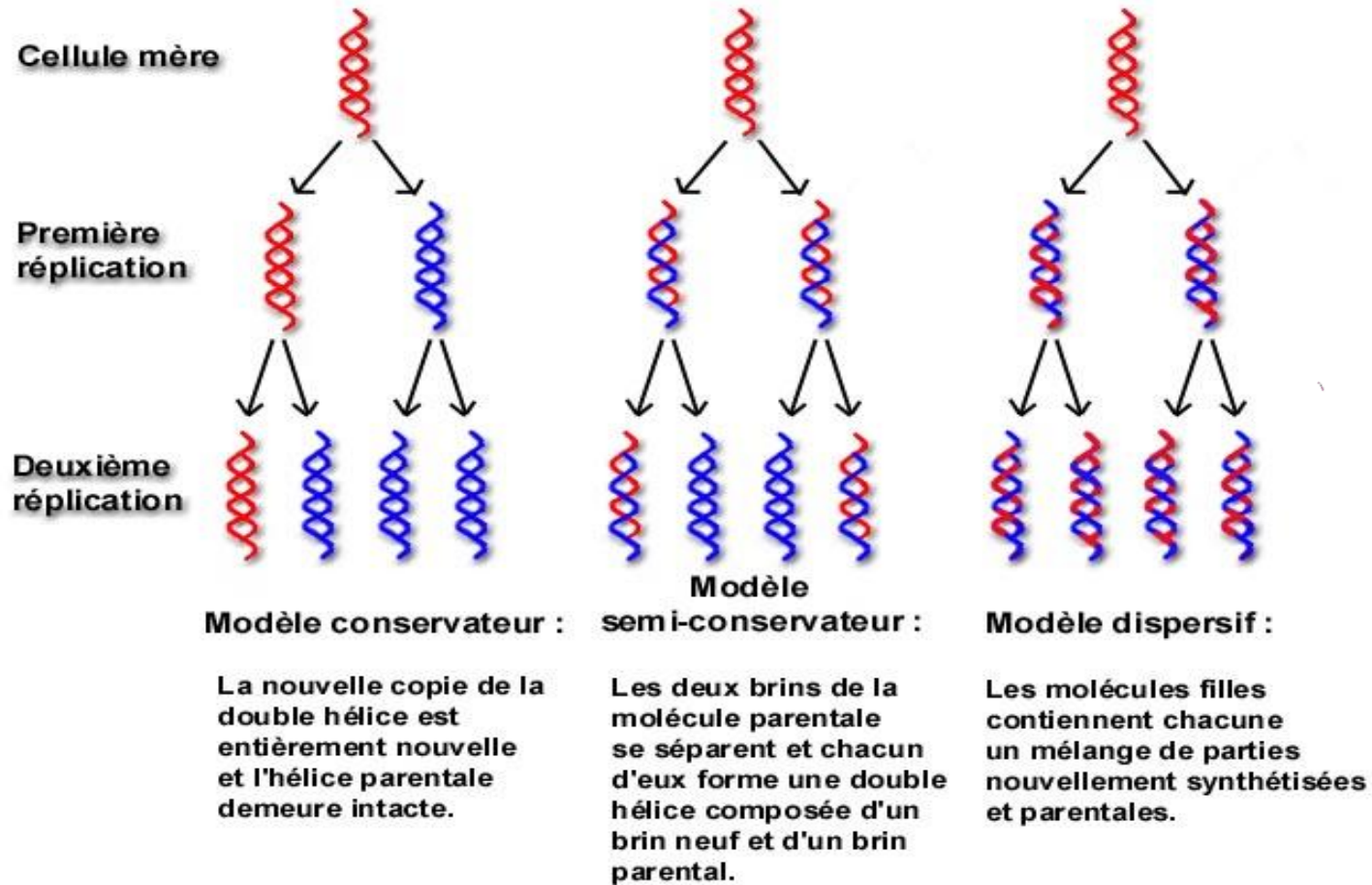
La réplication de l'ADN

Où ? Quand ? Comment ? Pourquoi ?

Dans les cellules eucaryotes (à noyau) et dans les bactéries (procaryotes)
par des enzymes



Les hypothèses de modèles de réplication



EXPERIMENT

Hypothèse: La réplication de l'ADN est semi-conservatrice

Protocol:

1. Croissance bactérienne dans un milieu N 15 (lourd)



2. Transfère des bactéries dans un milieu N 14 (léger)



3. Avant la première réplication l'ADN parent est 100% N 15 (lourd)

Sample at 0 minutes

Sample after 20 minutes

Sample after 40 minutes

4. Échantillonnage à 0 minutes, 20 minutes (une réplication complète) et 40 minutes (2 réplications complètes)

$^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ (light) DNA

$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ (intermediate) DNA

$^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ (heavy) DNA

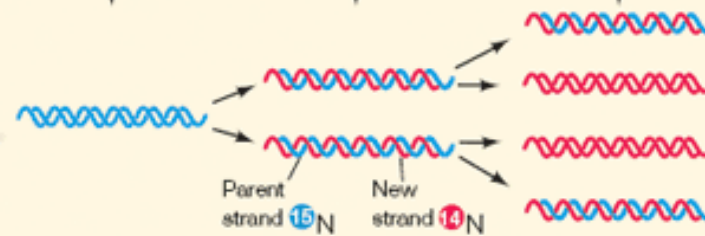
Parent (all heavy)

First generation (all intermediate)

Second generation (half intermediate, half light)

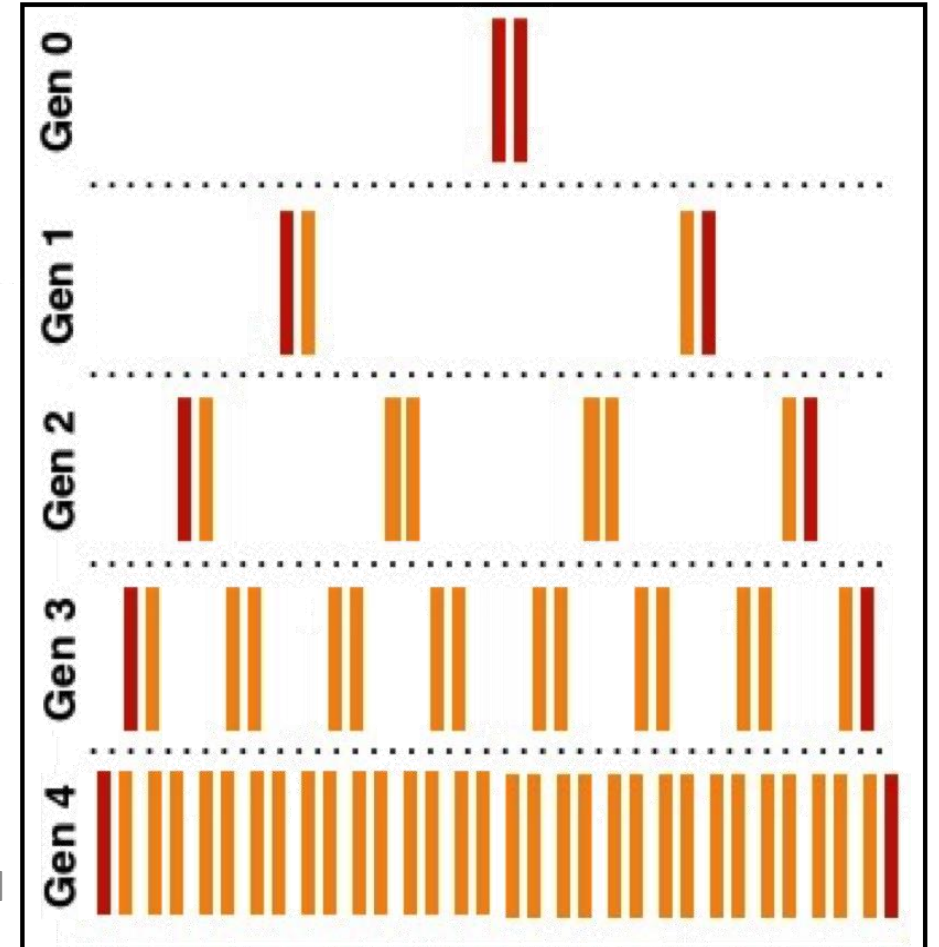
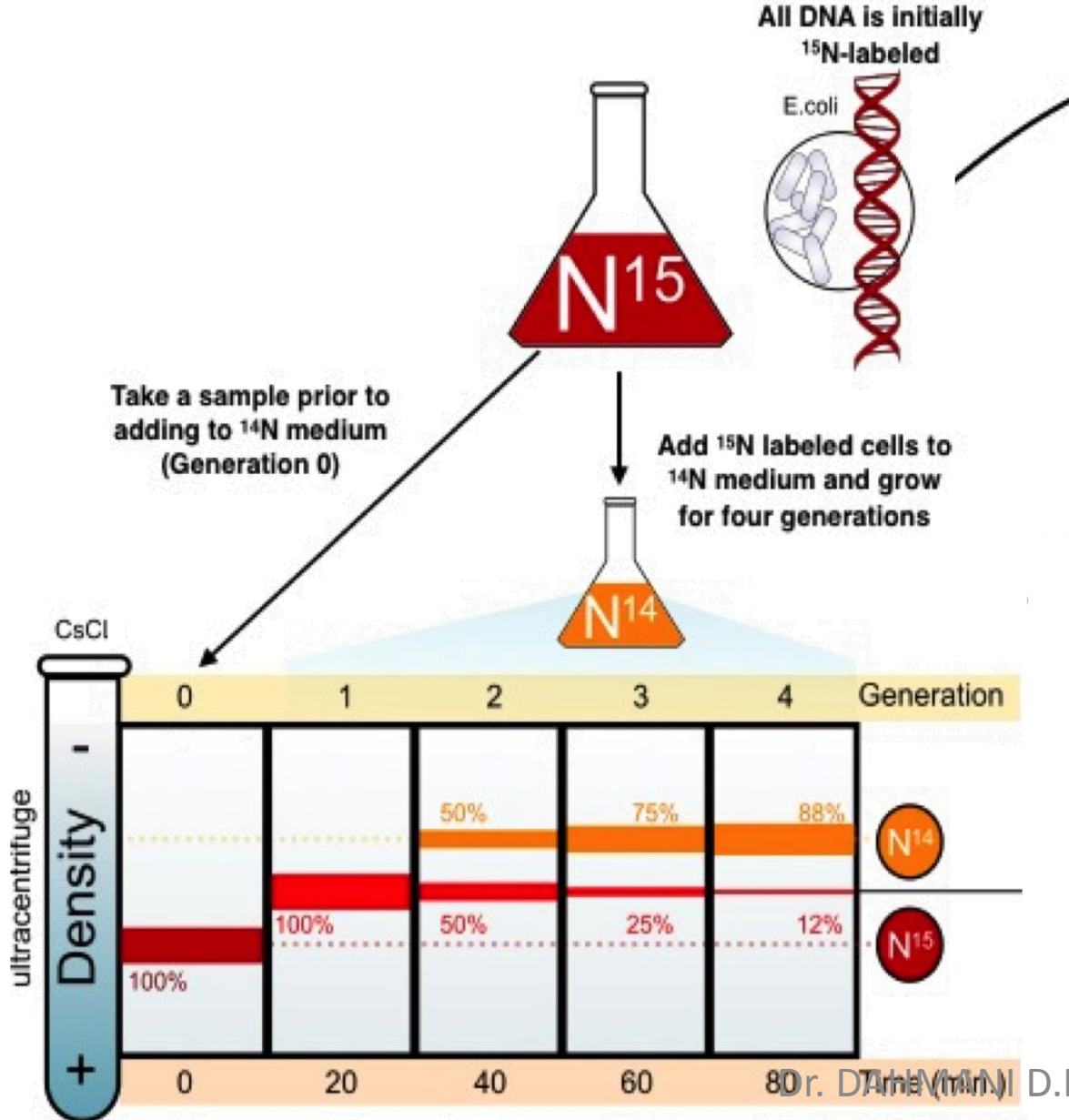
Résultats:

Après 2 générations, la moitié de l'ADN est hybride ($\text{N}14/\text{N}15$) et l'autre moitié est léger ($\text{N}14$)

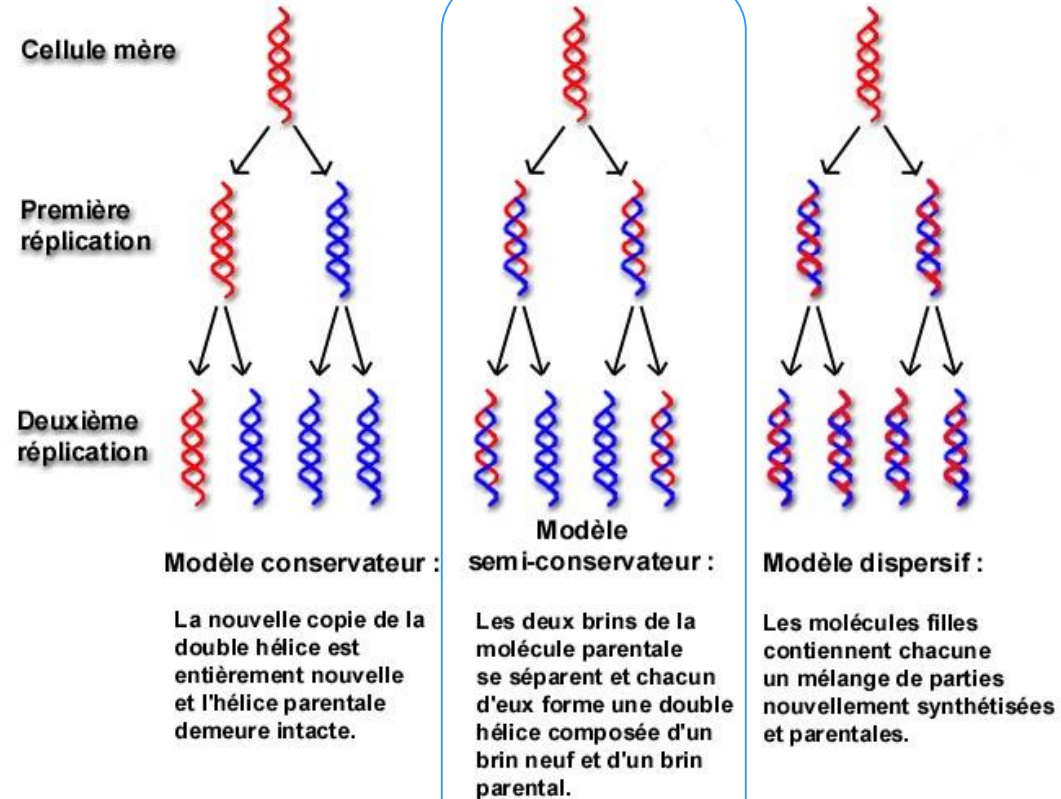


Conclusion: Le modèle de réplication est seulement possible si chaque molécule d'ADN contient un brin parent ($\text{N}15$) et un nouveau brin ($\text{N}14$). Donc, la réplication de l'ADN est semi-conservatrice.

Expérience Meselson & Stahl

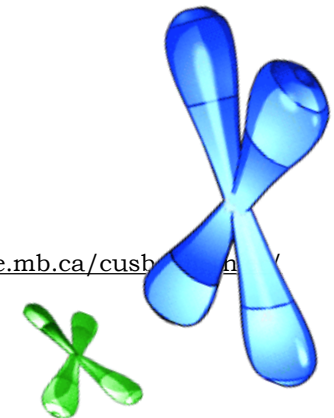


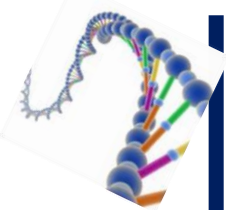
Les hypothèses de modèles de réplication



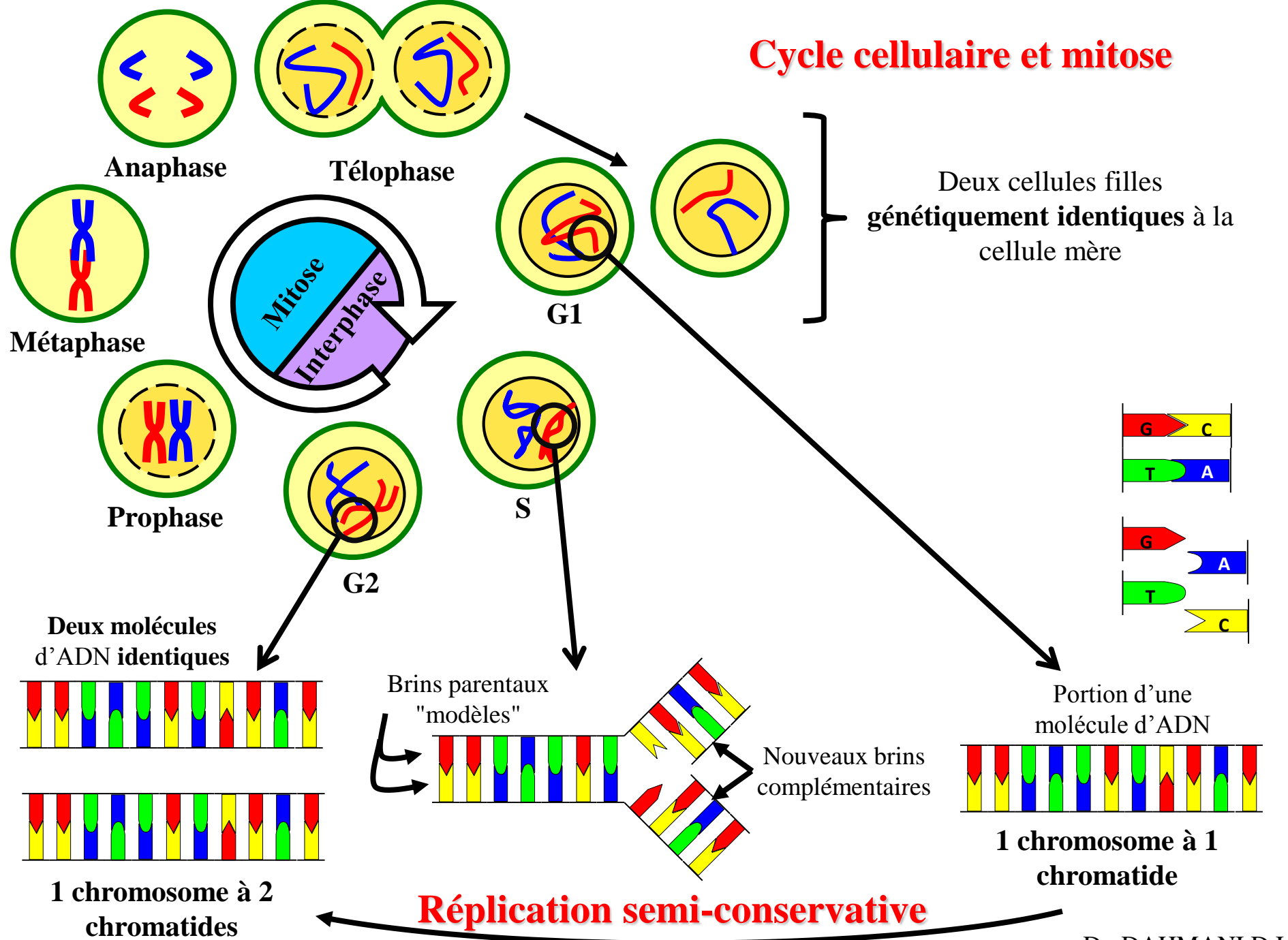
<http://www.ustboniface.mb.ca/cush...>

Dr. DAHMANI D.I





Cycle cellulaire et mitose



Les éléments nécessaire pour la réplication



■ Une matrice d'ADN constituée par un brin parental:

Chacun des deux brin va servir de modèle et constitue « la matrice » (Template).

■ La présence de nucléotides:

Sous forme des nucléosides triphosphates dATP, dTTP, dCTP et dGTP. Ces dernier apporteront en plus l'énergie nécessaire à la réaction.

■ La présence de nombreux enzymes:

- Permettant aux deux brins parentaux d'ADN de s'écarter.
- Accrocher les nucléotides les uns aux autres
- D'autres réactions qu'on verra plus tard

■ La présence de certains ions: (cations bivalents: Mg^{2+})

Qui est indispensable à la synthèse d'ADN car c'est un catalyseur et il influence la productivité

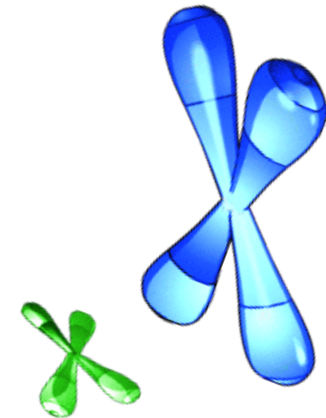
Les mécanismes de l'initiation de la réplication.

Notion de réplicon

L'unité d'ADN où se produit la réplication est appelée le réplicon. Ce réplicon a une origine où est initiée la réplication et une terminaison où est arrêtée la réplication.

La réplication chez les procaryotes

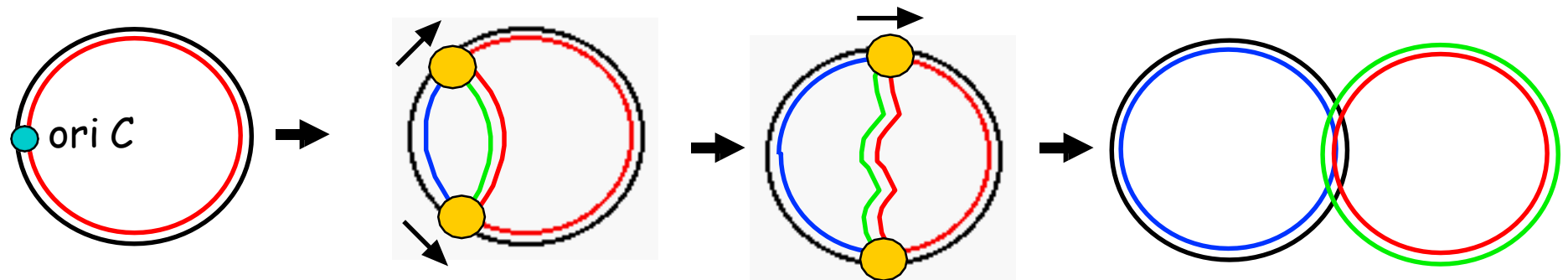
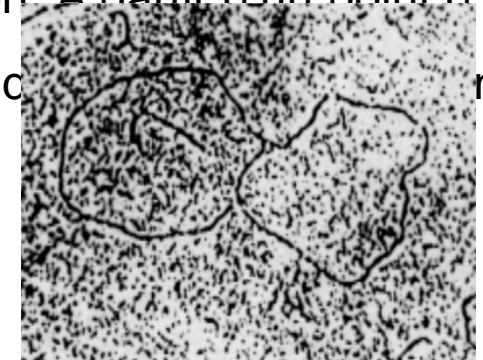
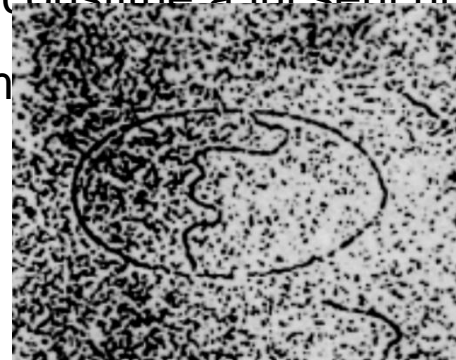
- Les étapes du modèle procaryote
 - Origine de réplication
 - Élongation du brin d'ADN continu 5' → 3'
 - Élongation du brin d'ADN discontinu 3' → 5'
 - Corrections subséquentes



La réplication chez les procaryotes

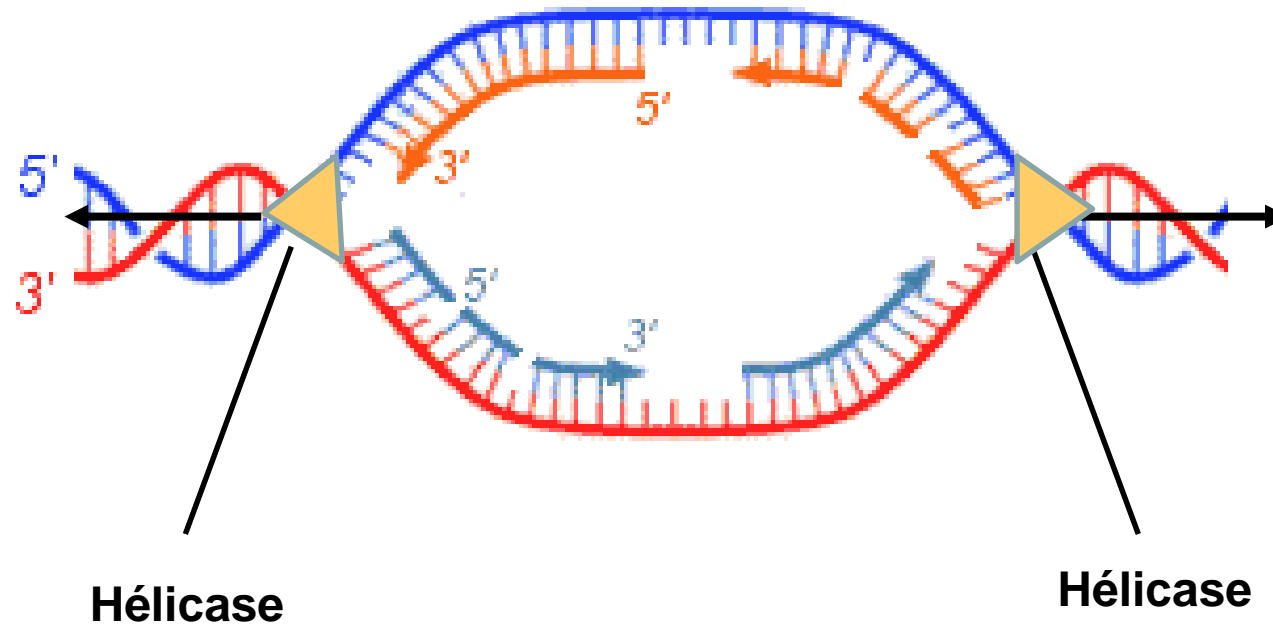
1. Origine de réplication (microscopie électronique: Cairns, 1962)

Notion de réplicon: L'ADN bactérien constitue à lui seul un réplicon. A partir d'un point d'initiation, la réplication se fait soit de manière bidirectionnelle, soit de manière unidirectionnelle.

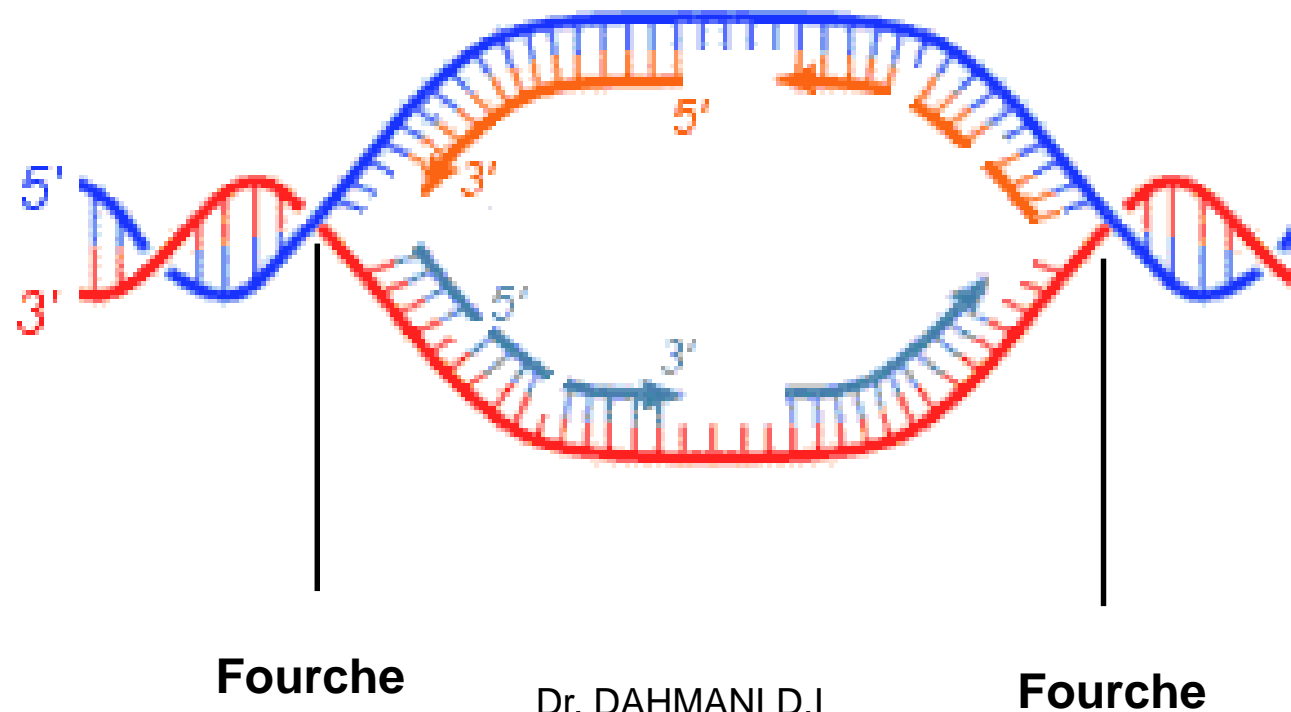


- 1 seule origine par chromosome : ori C
- réplication bidirectionnelle
- réplication rapide (≈ 1000 bases/s; 20 à 100 min)
- 1 séquence de terminaison

Les enzymes s'appellent les ***hélicases*** coupent et déroulent de courts segments d'ADN juste avant chaque fourche de réplication.

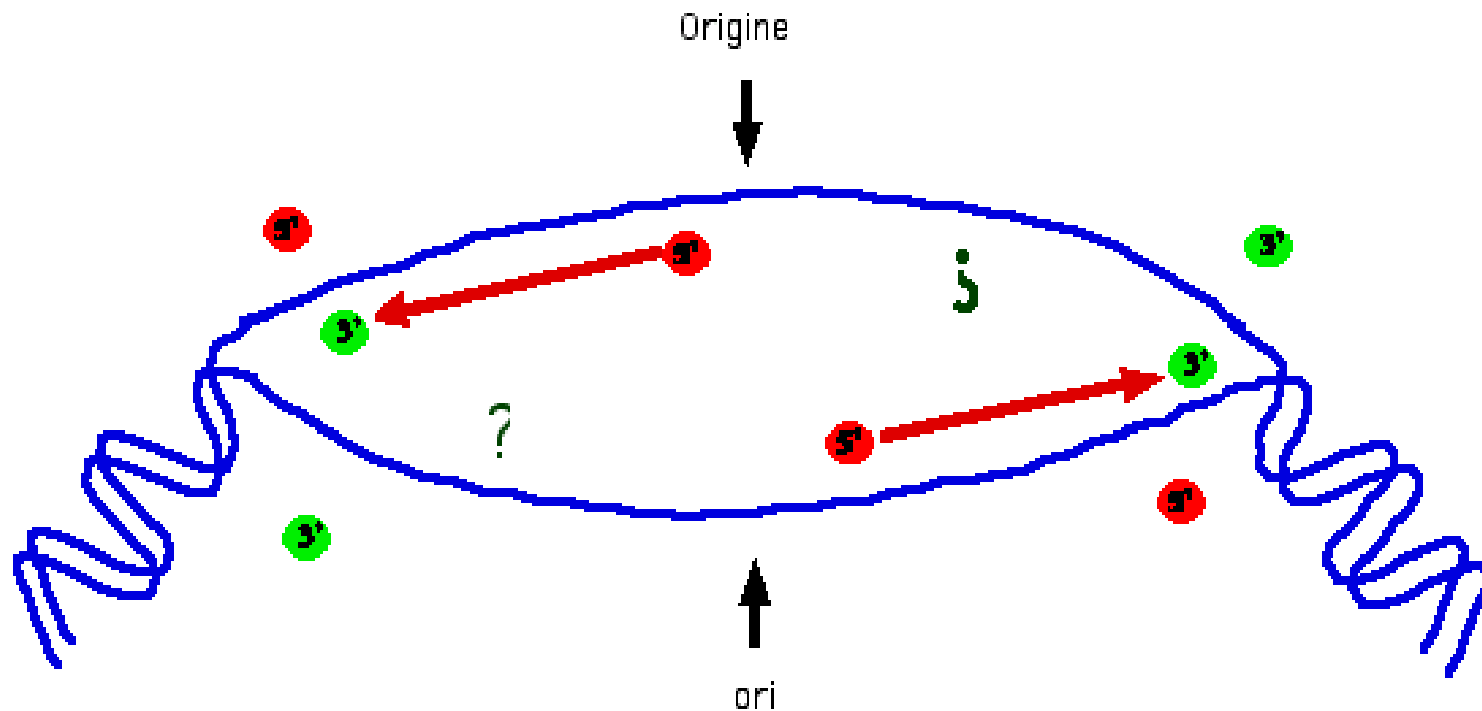


Les endroits où l'hélice est déroulée et où les nouveaux brins se développent s'appellent les **fourches de réplication**. Il y a une fourche de réplication à chaque côté d'une bulle de réplication.

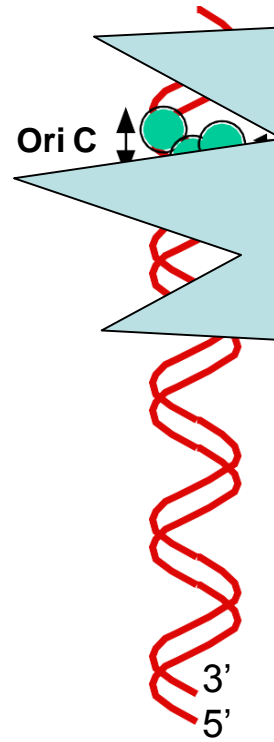


2. Phase d'initiation

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



2. Phase d'initiation



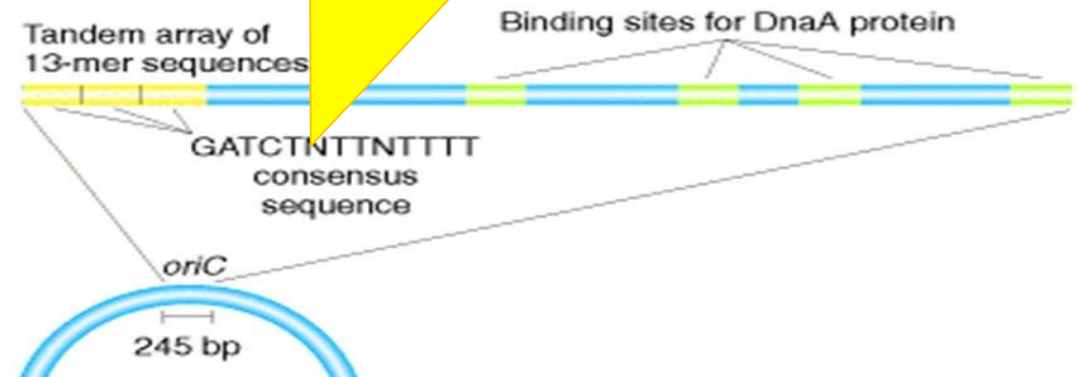
identique lorsqu'elle est lue dans le sens 5' → 3' sur un brin ou dans le sens 5' → 3' sur le brin complémentaire.

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

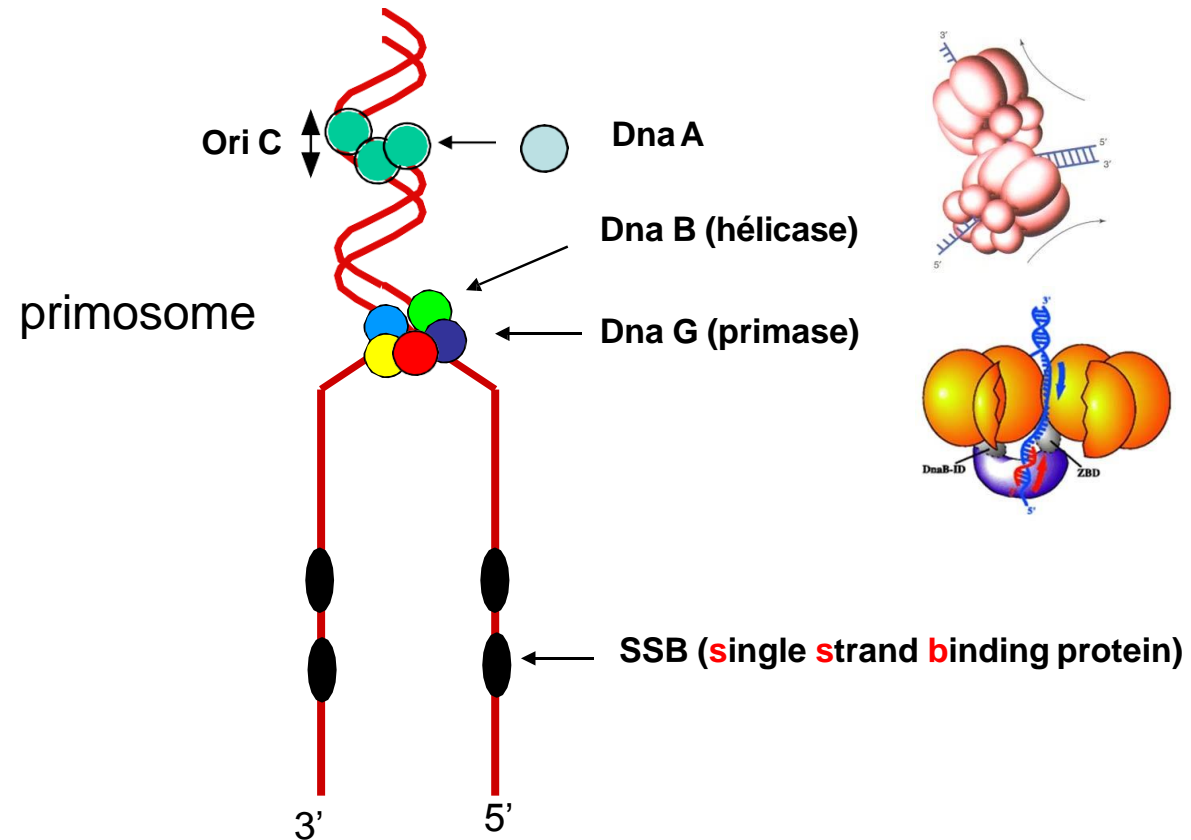
cette région du génome de motifs palindromiques qui sont reconnus par les Dam-méthylase pour méthyler certaines bases.

Bactérie 1	:	ATGTGGCGGGCGATAT
Bactérie 2	:	ATCTCCCGGGCGACAT
Bactérie 3	:	ATCTGGCGGGCGTTAT
consensus	:	AT*T**CGGCG****AT

1. reconnaissance de la séquence d'origine

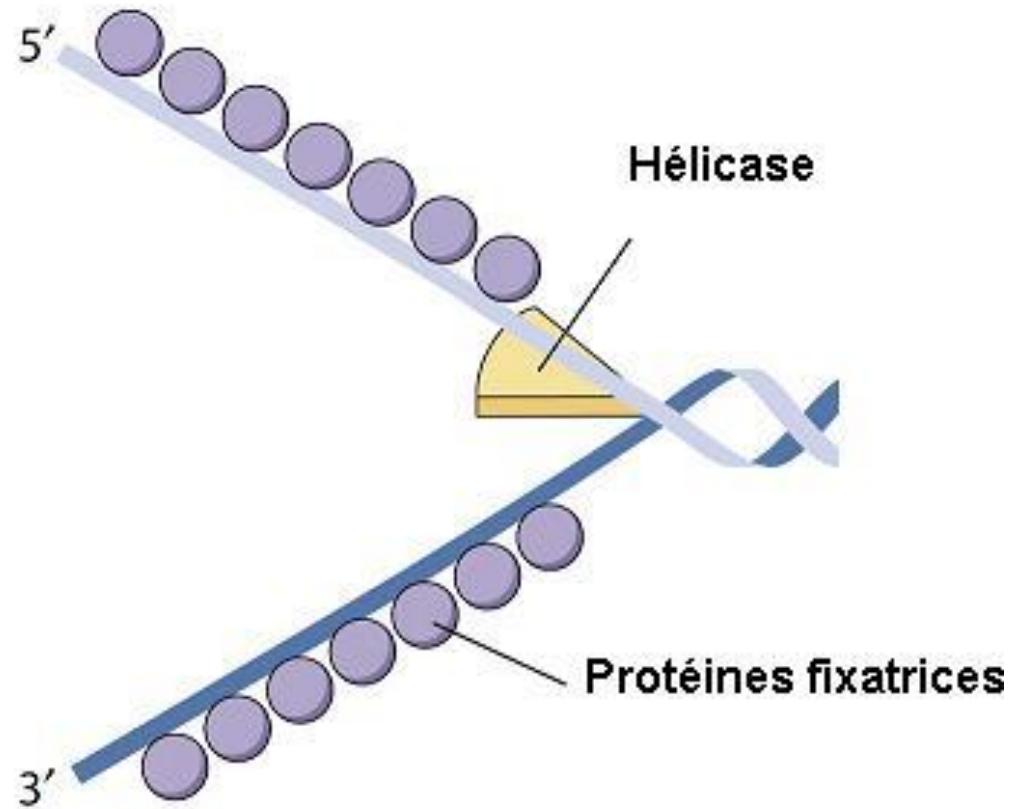


2. Phase d'initiation

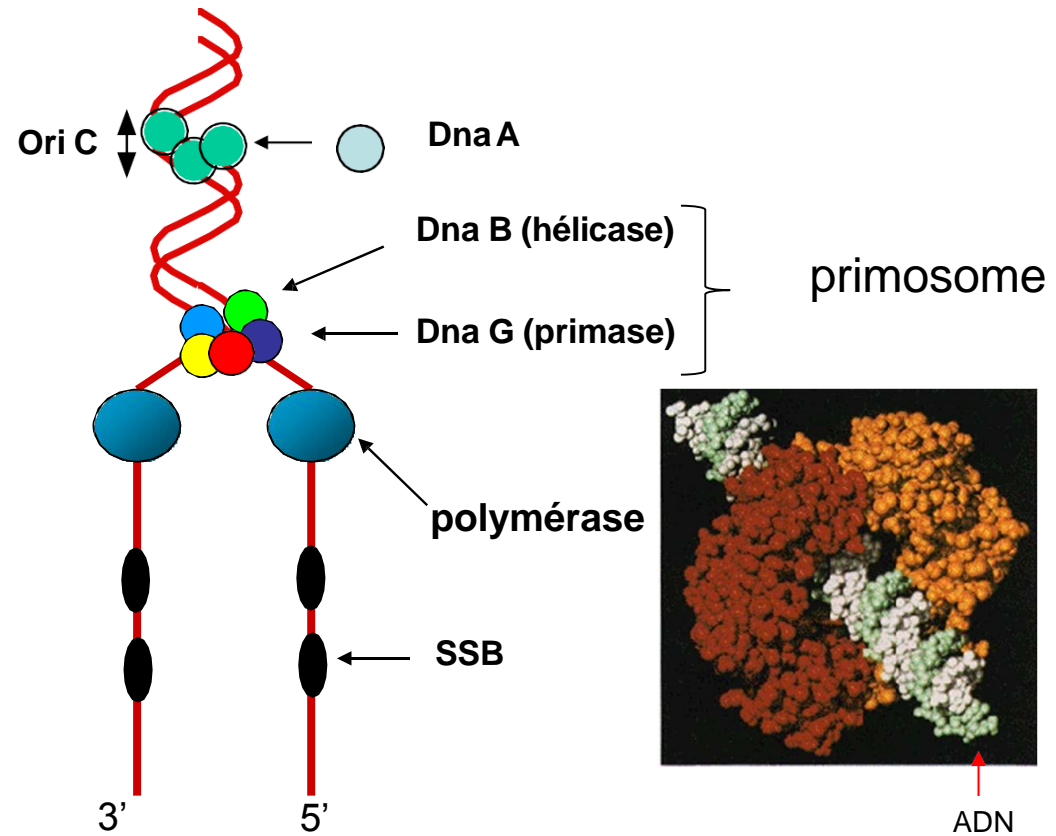


1. reconnaissance de la séquence d'origine
2. formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins

Les enzymes s'appellent les **protéines fixatrices** (single-stranded binding proteins) se lient aux brins exposés et les gardent séparés en bloquant la formation des liaisons hydrogènes.

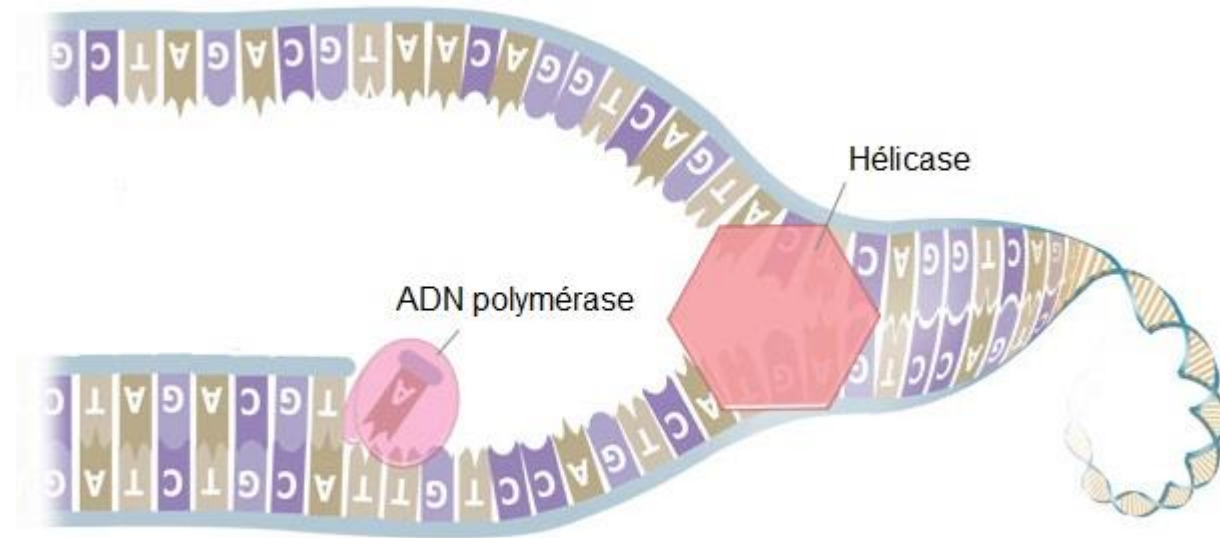


2. Phase d'initiation



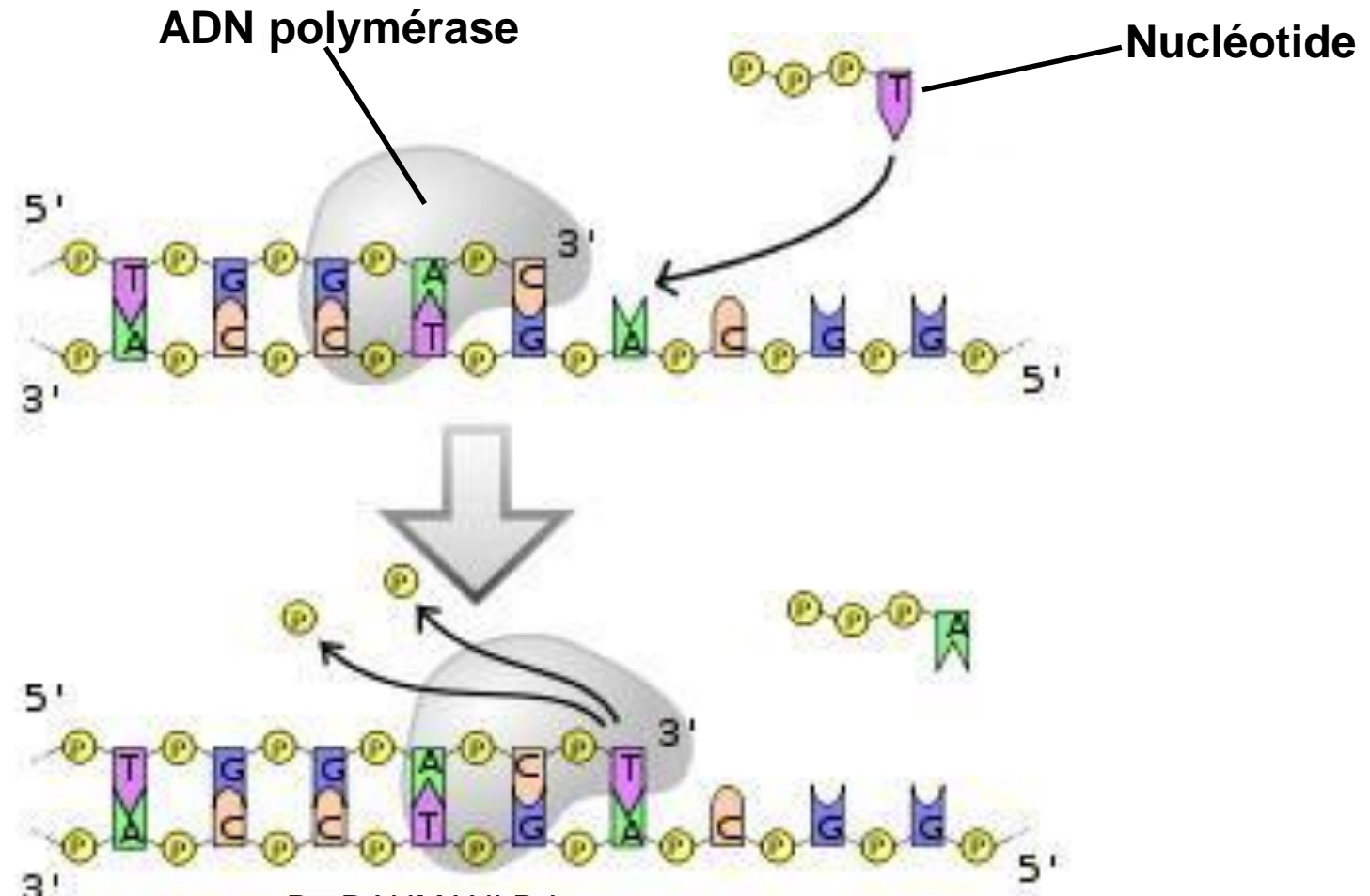
1. reconnaissance de la séquence d'origine
2. formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins
3. **accrochage de l'ADN polymérase**

- Une enzyme s'appelle **ADN polymérase** est responsable de fabriquer les nouvelles molécules d'ADN
- ADN polymérase s'insère dans la bulle de réplication

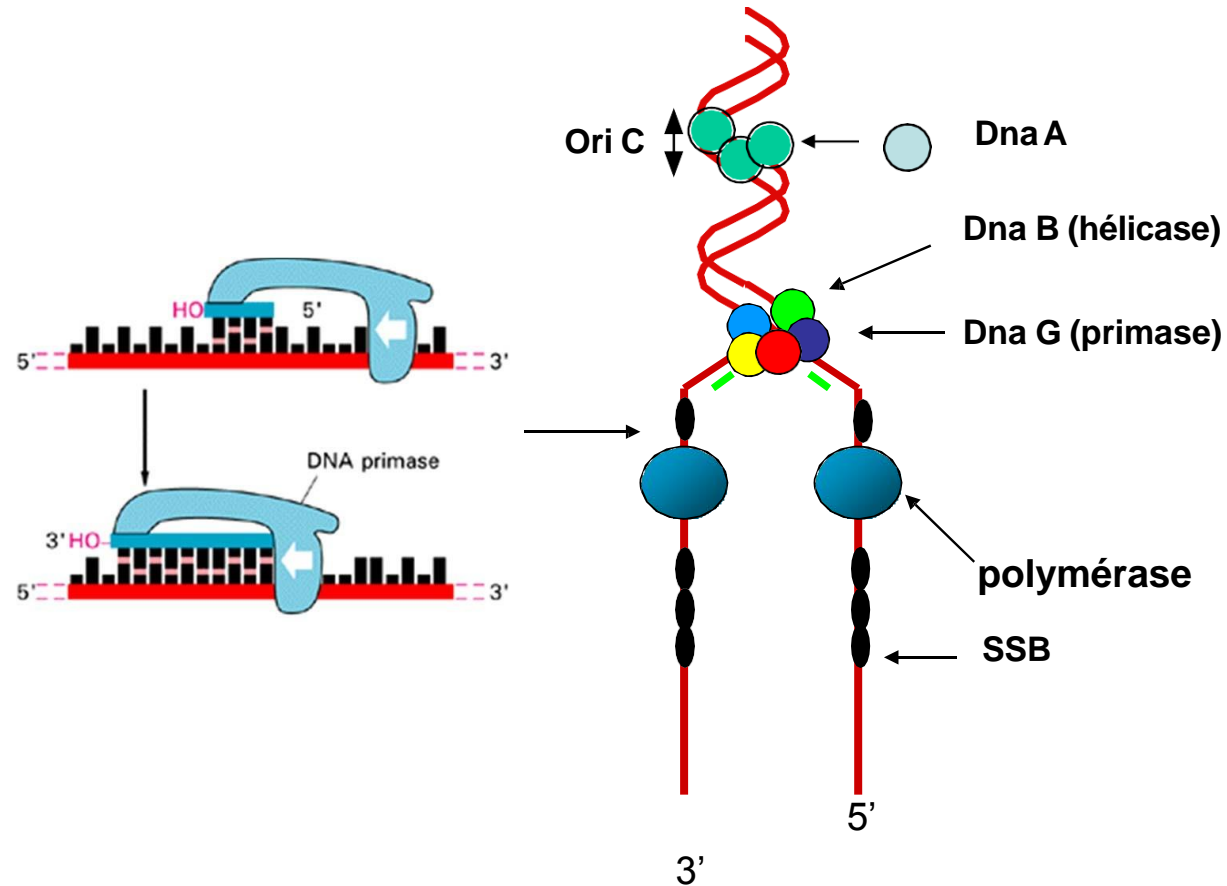




ADN polymérase utilise les brins parents comme matrice et commence à ajouter un nucléotide à la fois pour créer un nouveau brin complémentaire du brin existant.

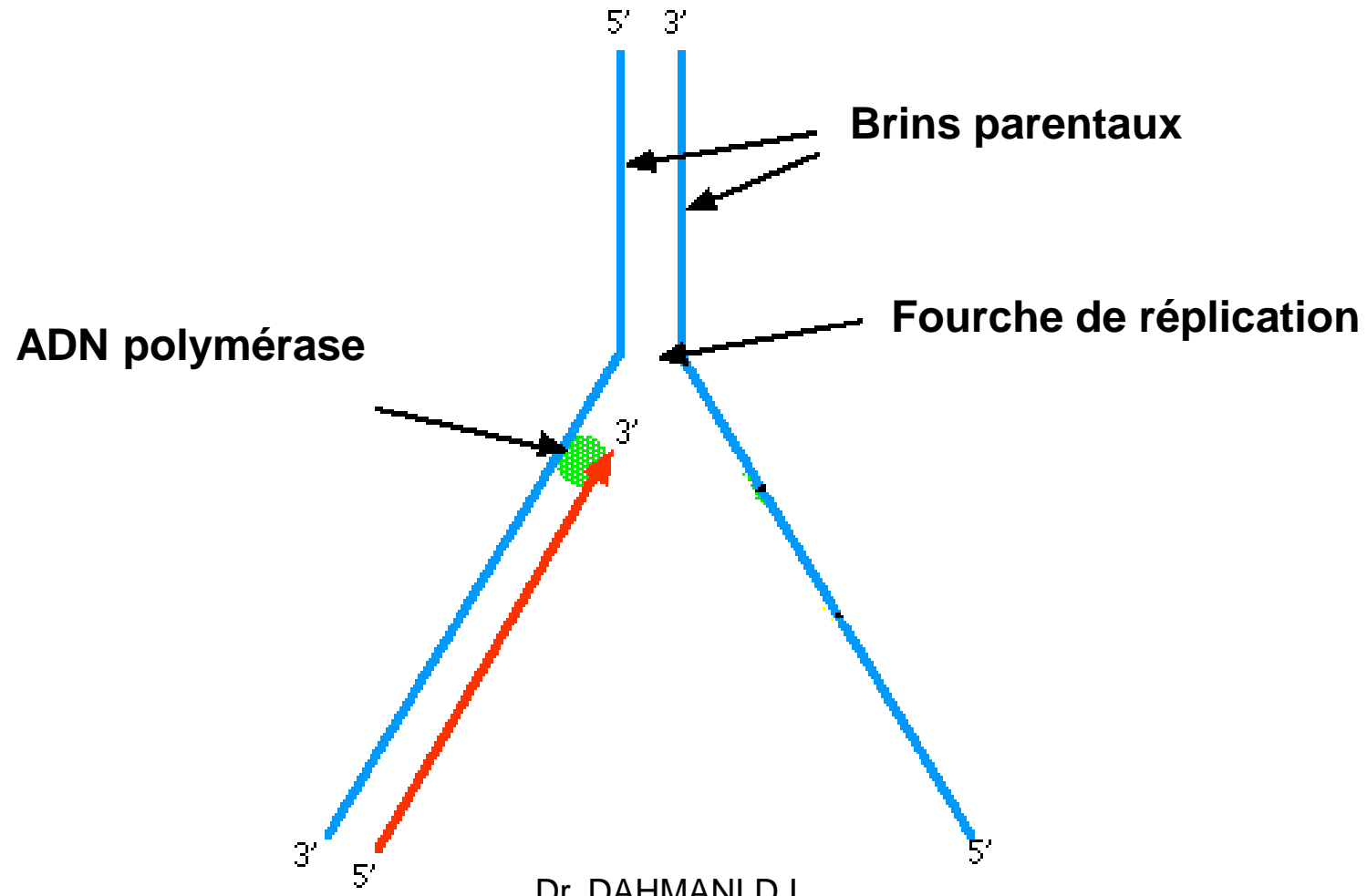


2. Phase d'initiation

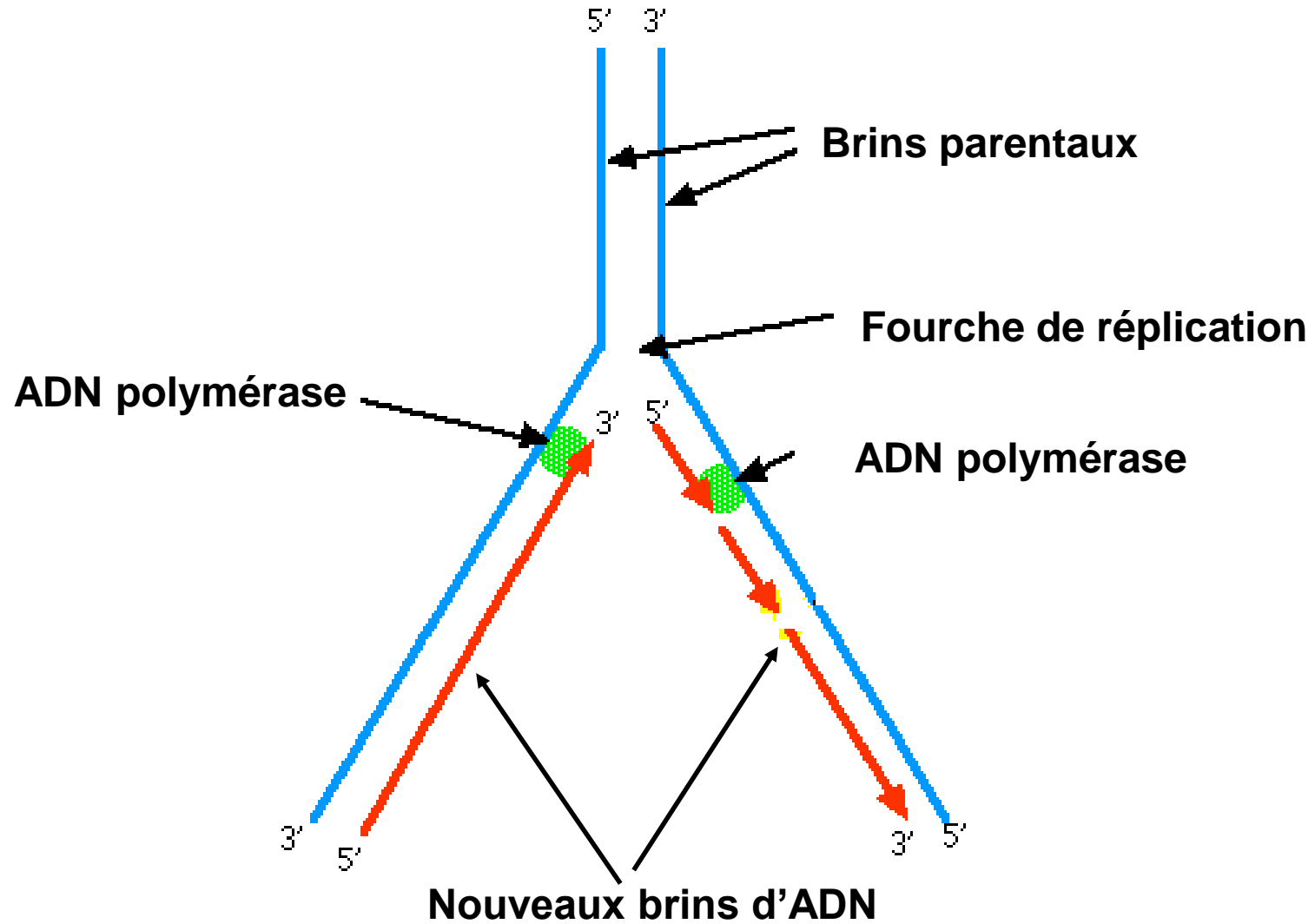


1. reconnaissance de la séquence d'origine
2. formation du primosome, ouverture du double brin et stabilisation des brins
3. accrochage de l'ADN polymérase
4. **synthèse d'une amorce ARN par la primase**

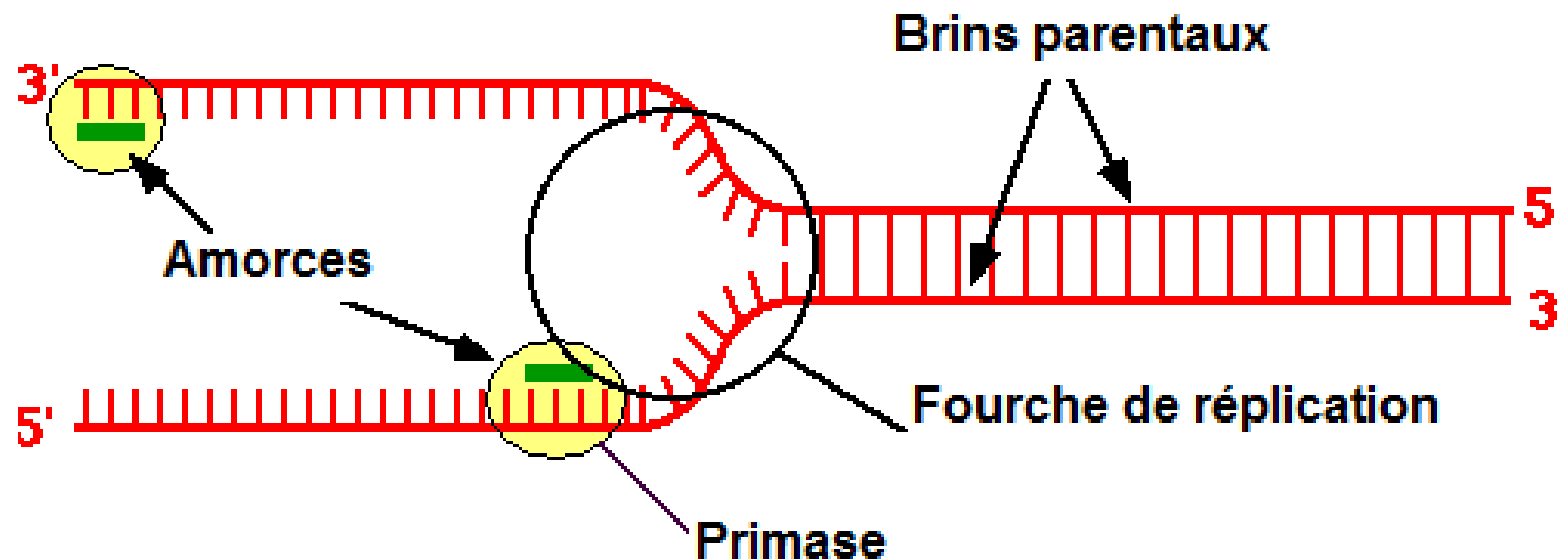
ADN polymérase commence à l'extrémité 3' du brin parental. Par conséquent, elle synthétise le nouveau brin d'ADN dans le sens 5' à 3'.



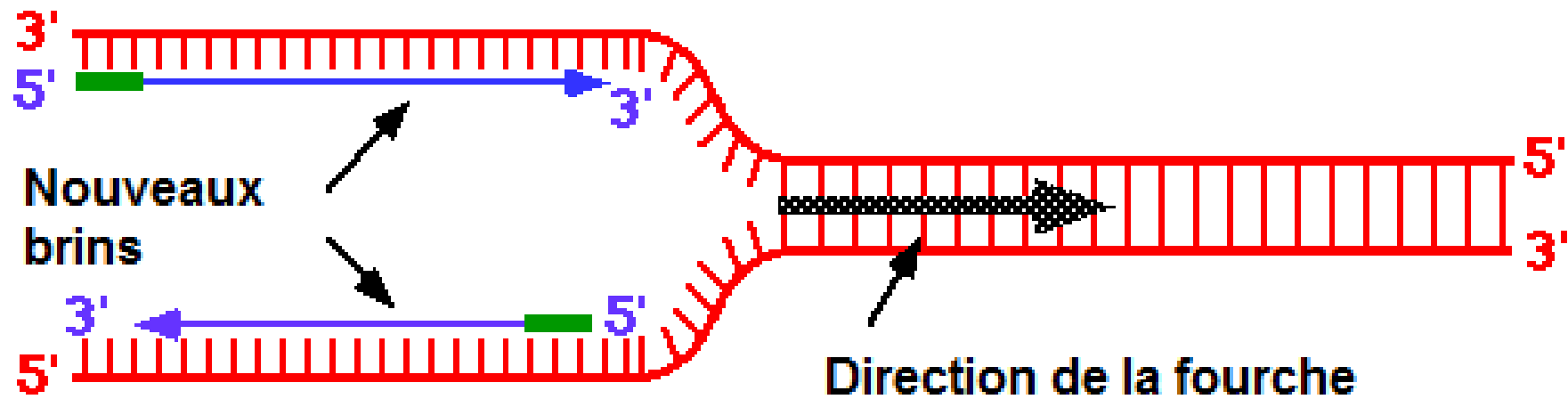
La réplication d'ADN continue avec la fourche de réplication sur un brin et loin de la fourche sur l'autre brin.



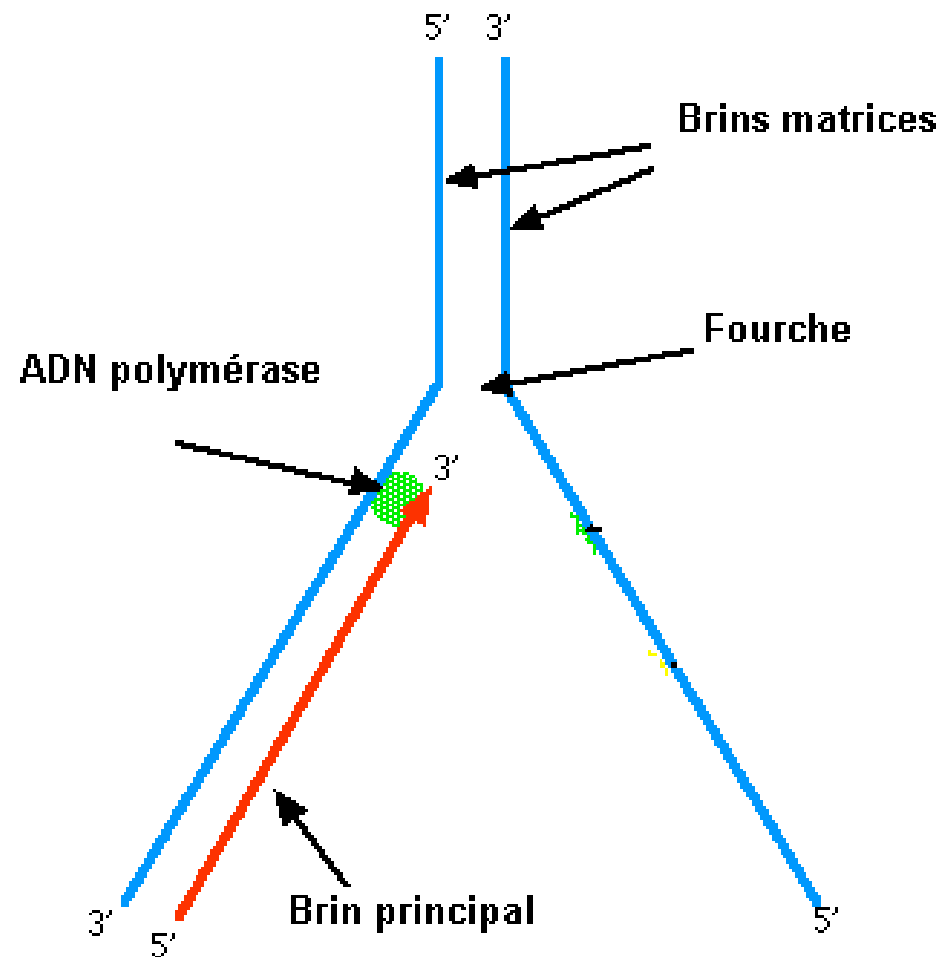
Note: ADN polymérase ne peut pas construire le nouveau brin sans un point de départ. Un enzyme s'appelle **primase** synthétise une **amorce** de 10 à 60 paires de nucléotides d'ARN avec une séquence de bases complémentaire à la matrice d'ADN.



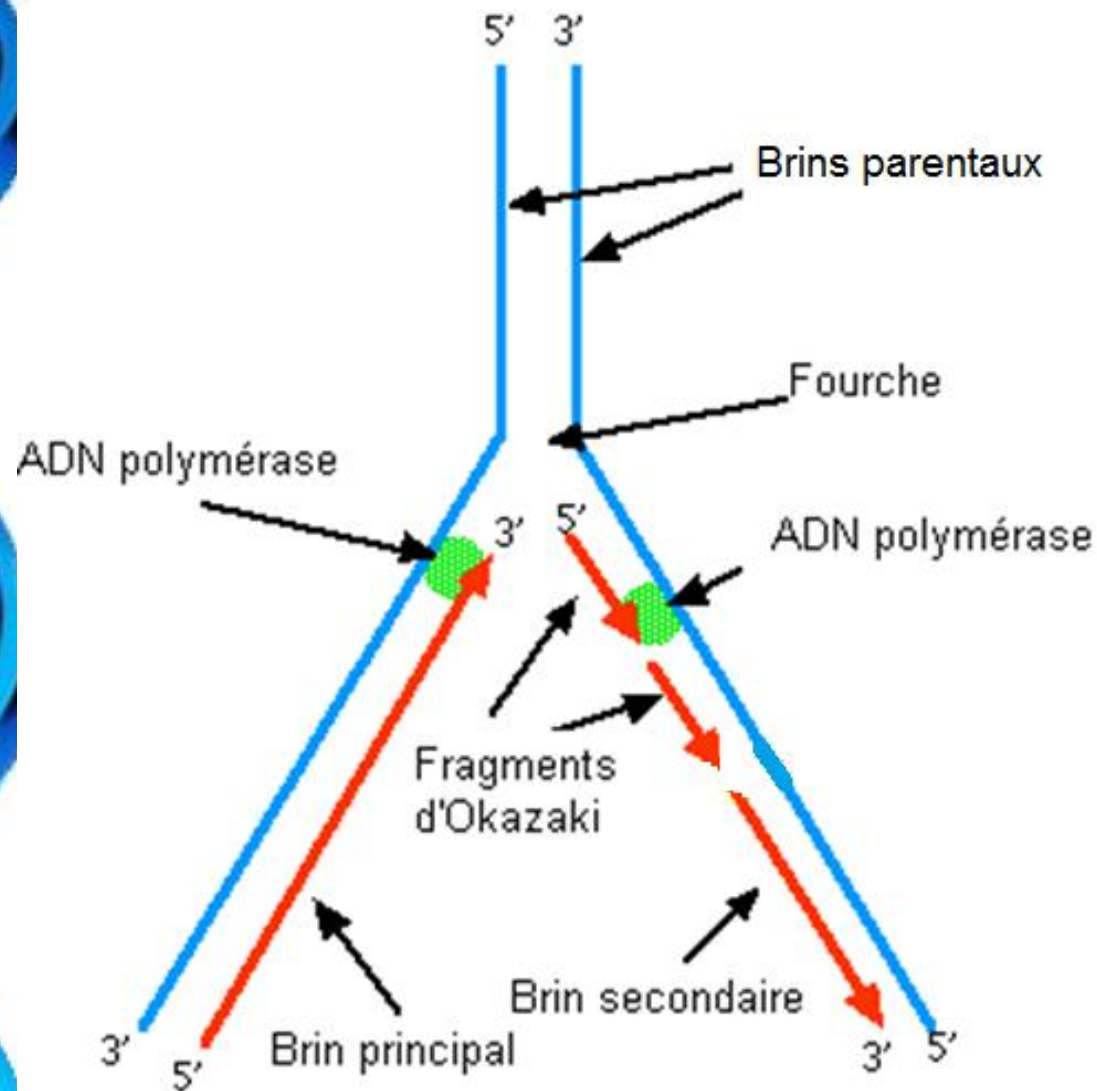
L'ADN polymérase utilise l'amorce comme un point de départ pour l'élongation d'un brin fils. Elle ajoute les nucléotides à l'amorce.



Un nouveau brin est construit sans interruption dans le sens 5' à 3'. Sur ce brin, l'élongation suit le déplacement de la fourche de réplication. Ce brin est le ***brin principal*** (leading strand).



L'autre brin est aussi construit dans le sens 5' à 3', mais dans la direction opposée. Ce brin est formé en petits morceaux et plus lentement que le brin principale alors on dit qu'il est le **brin secondaire** (lagging strand).



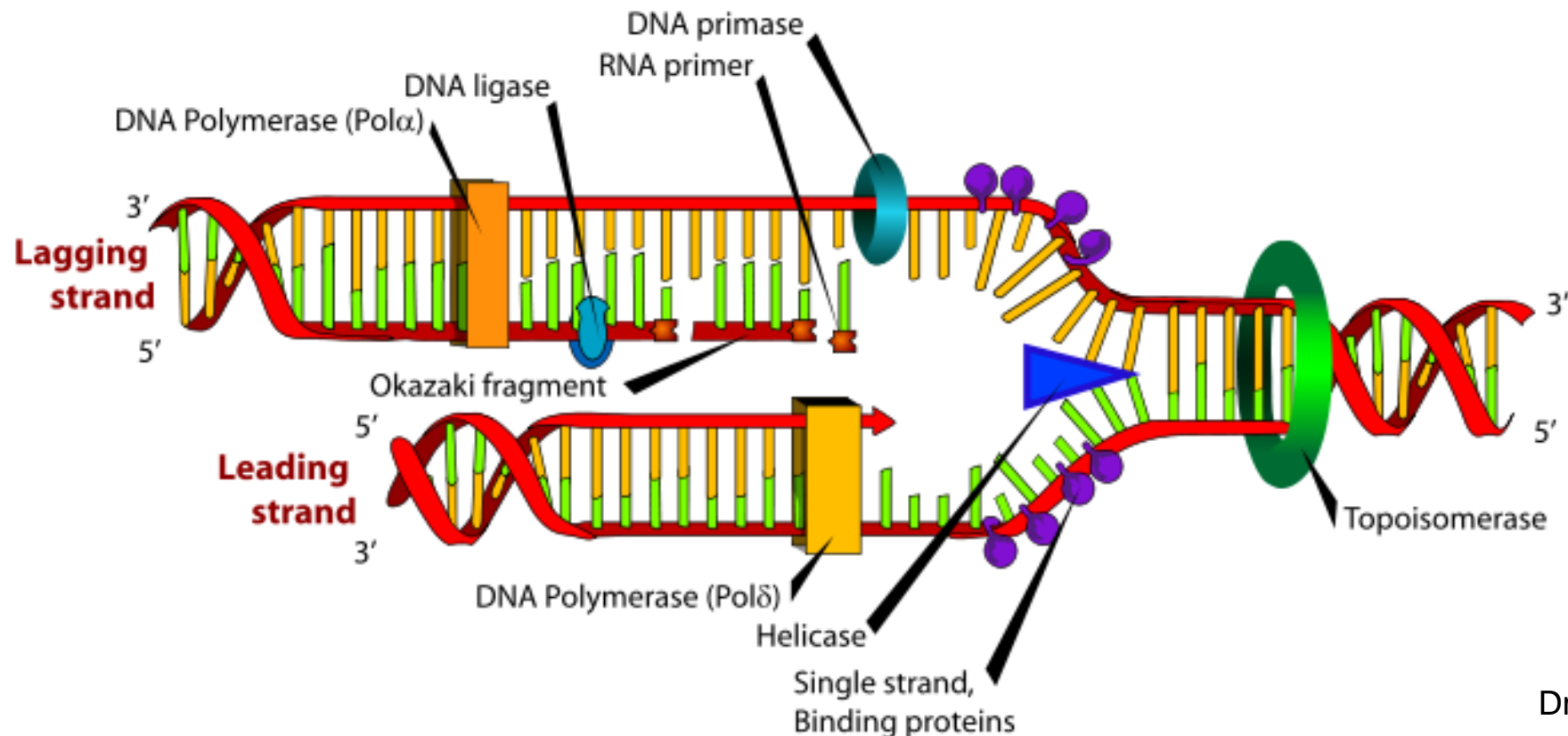
Les petits morceaux sont appelés les **fragments d'Okazaki**.

3. Elongation

Note: Il y a plusieurs ADN polymérases dans la bulle de réplication à la fois!

Polymérase III: poursuit la synthèse de ADN sur l'amorce

Polymérase I: hydrolyse les amorces et les remplace par de ADN



3. Elongation

➤ L'élargissement nécessite:

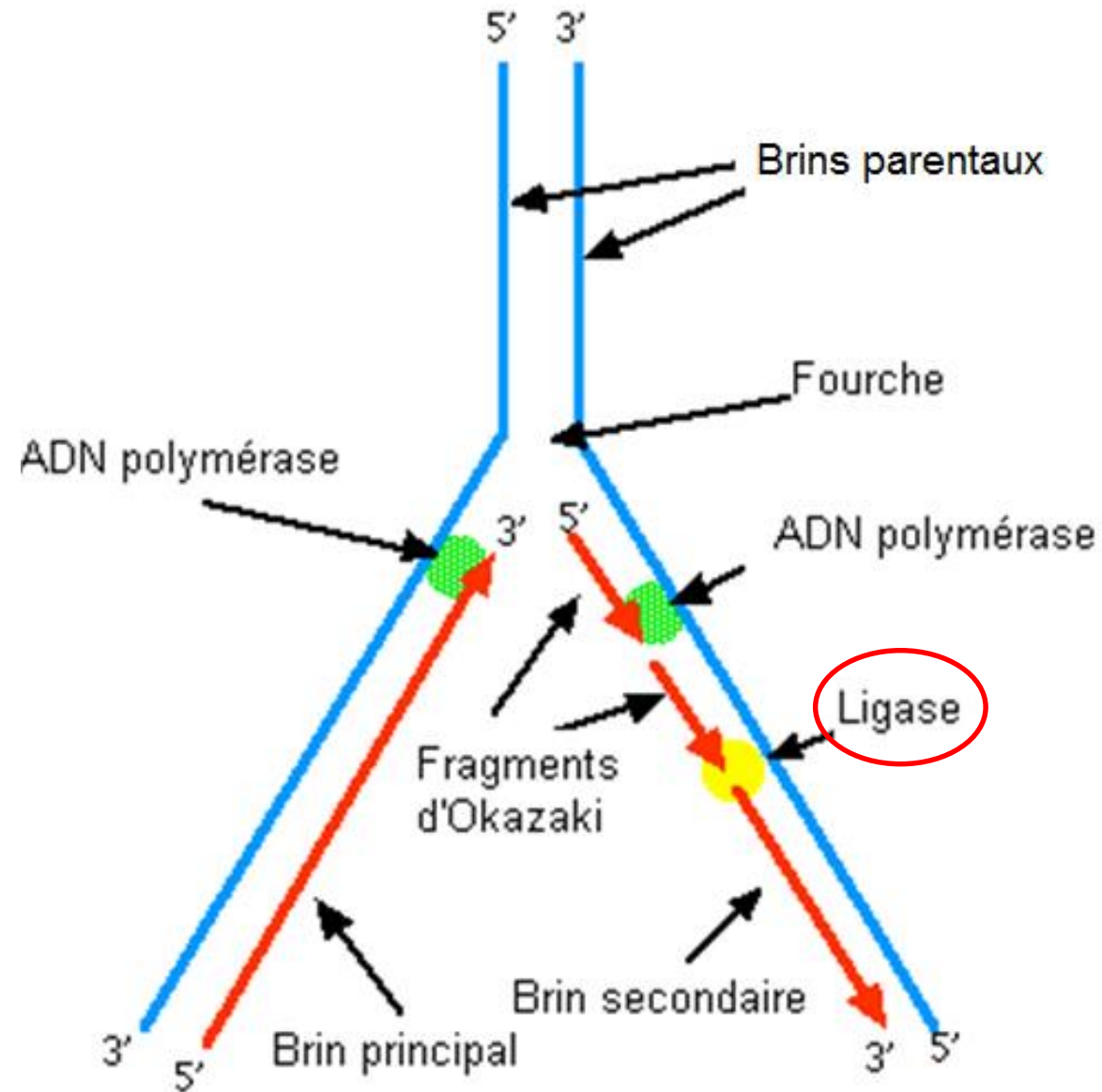
- ADN polymérases (activité de copie 5' → 3') : III > I, II

	ADN polymérase I	ADN polymérase II	ADN polymérase III
Structure	Monomérique	> 4 sous unités	> 10 sous unités (core + clamp + protéines associées)
Rôle	Élimine les amorces lors de la réplication + réparation	Réparation de l'ADN	Réplication de l'ADN génomique
Polymérisation 5' → 3'	Oui	Oui	Oui (sous-unité α)
Exonucléase 3' → 5'	Oui	Oui	Oui (sous-unité ϵ)
Exonucléase 5' → 3'	Oui	Non	Non
Vitesse de polymérisation	16-20 bases / sec	5-10 bases / sec	250-1000 bases / sec

Tableau récapitulatif des principales polymérases procaryotes (il existe d'autres polymérases : Pol IV et V)

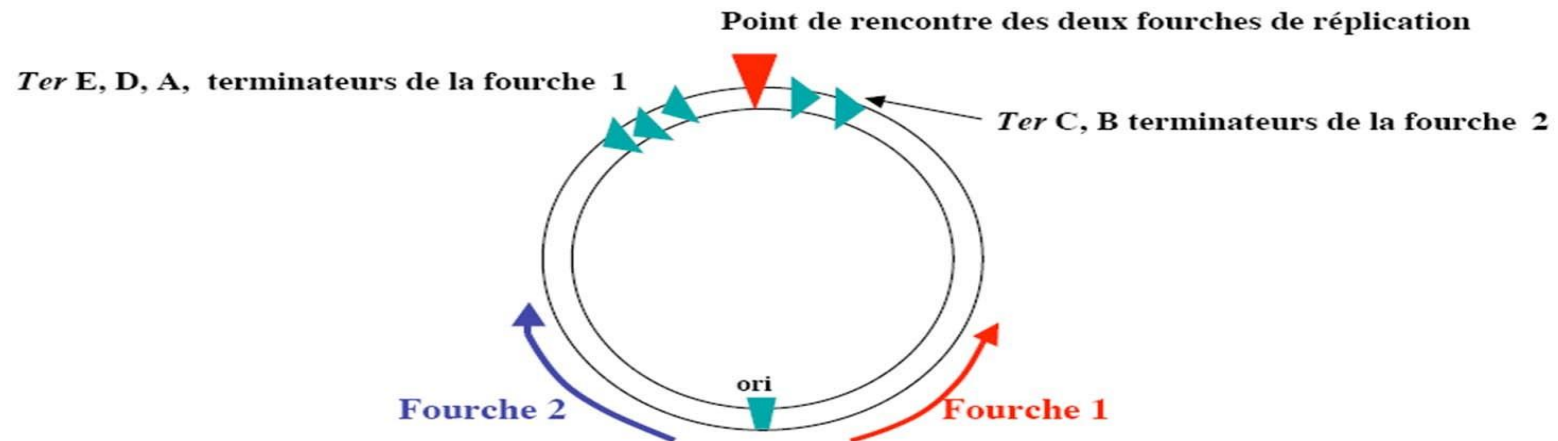
- matrice formée par 1 simple brin, dNTP, Mg⁺⁺
- amorce ARN avec OH libre en 3'
- hélicases, gyrases (supertour-) (topoisomérases) ...

Enfin, une enzyme appelée **ligase** vient pour lier les fragments d'Okazaki ensemble.

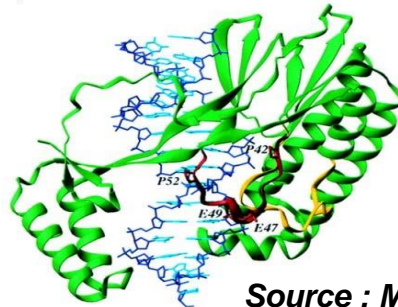


4. Terminaison

- ❖ Présence de séquences « terminator » pour chacune des deux fourches



- ❖ La protéine Tus (terminator utilisation substance) reconnaît les séquences d'arrêt de réplication et bloque DnaB



Source : Mulugu et coll., PNAS 2001

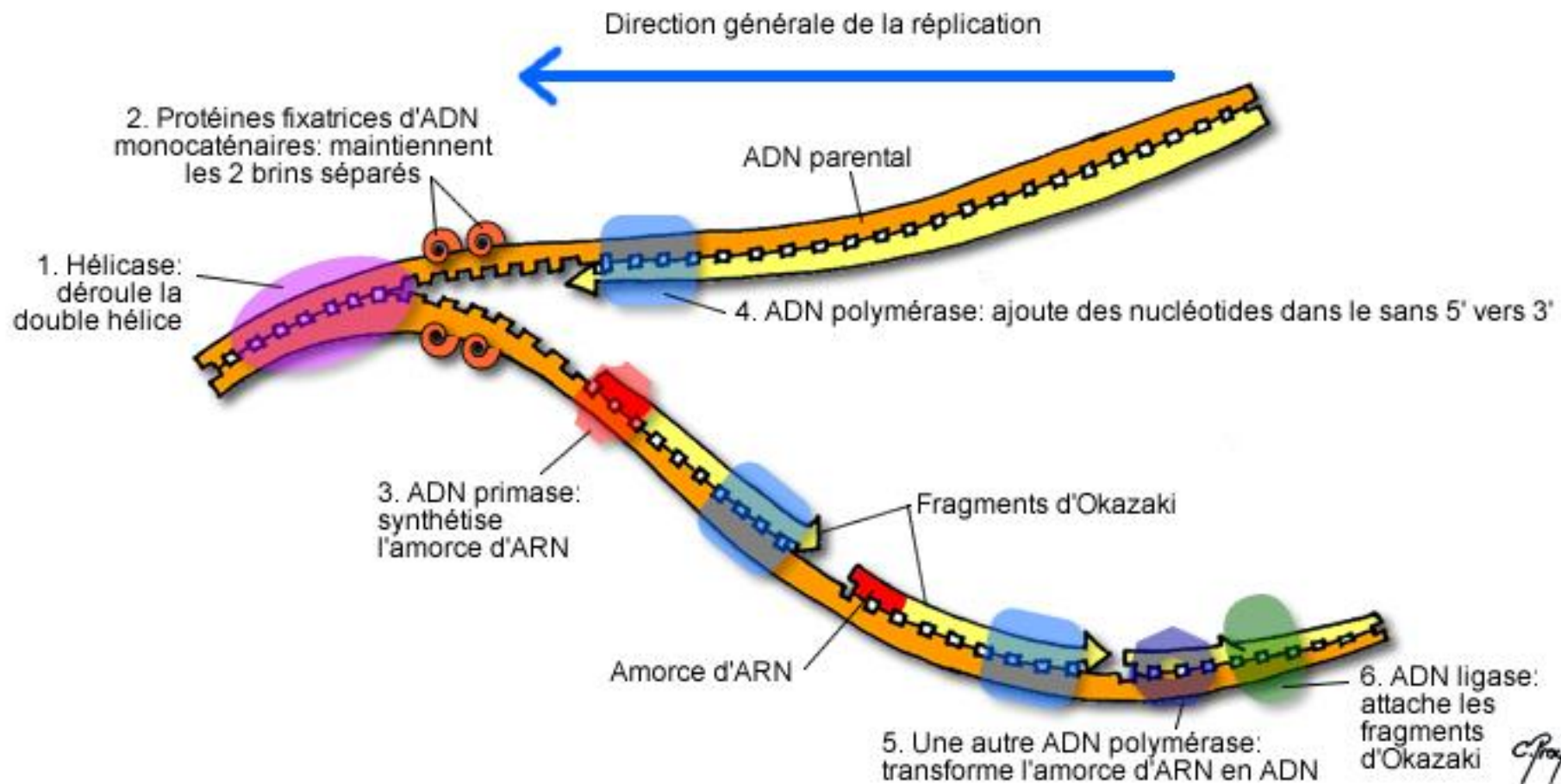
- ❖ Intervention d'une topoisomérase IV pour catalyser la séparation des 2 chromosomes




- ❖ La phase de vérification et correction
- ❖ Après qu'un brin d'ADN est construit, l'ADN polymérase II le relise et l'édite
- ❖ Si l'ADN polymérase trouve un erreur, un enzyme s'appelle **nucléase** l'enlève
- ❖ ADN polymérase remplace l'erreur avec le/les nucléotide(s) correct(s)

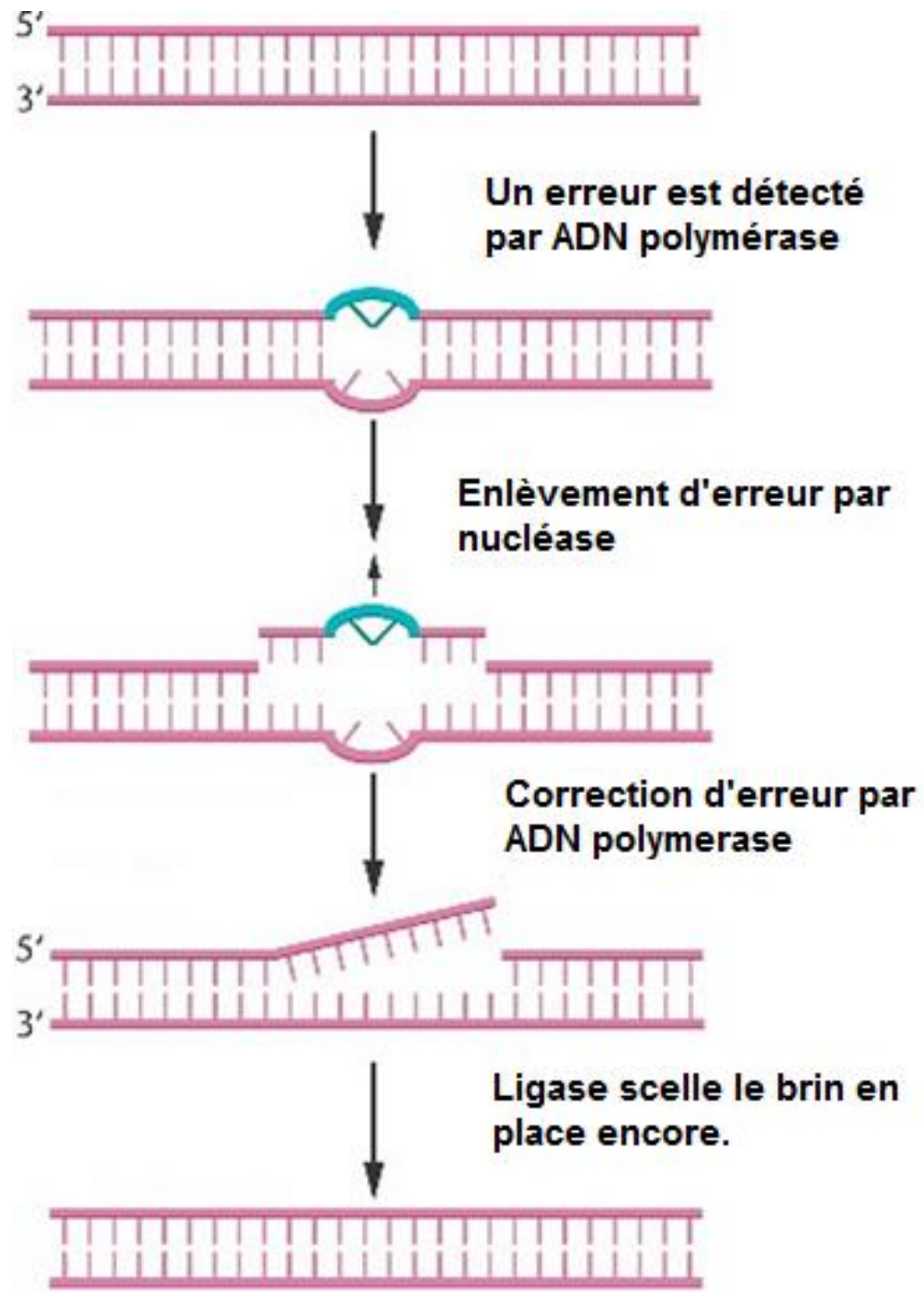
Sommaire

1. **Hélicase** ouvre le double hélice d'ADN pour former une bulle de réplication.
2. Les **protéines fixatrices** se lient aux brins parentaux pour leurs garder séparé
3. Les **primases** fabriquent des **amorces d'ARN** sur les brins parentaux
4. Les **ADN polymérases** utilisent les amorces comme les points de départ. Elles ajoutent les nucléotides d'ADN aux amorces et construisent les nouveaux brins.



Sommaire continué

- 
1. **Brin principal:** Le brin qui est construit sans interruption dans la direction de la fourche.
 2. **Brin secondaire:** Le brin qui est construit lentement et en petits morceaux s'appellent les **fragments d'Okazaki**.
 3. ADN polymérase I enlève les amorces d'ARN et leurs remplace avec des nucléotides d'ADN
 4. **Ligase** colle/attache les fragments d'Okazaki ensemble





Note finale: Problème avec les fragments d'Okazaki

ADN polymérase toujours a besoin une amorce ou une pièce d'ADN d'utiliser comme un point de départ pour la réplication.

Chaque fois que l'ADN polymérase coupe une amorce d'un fragment d'Okazaki, l'espace est remplie par l'addition de nucléotides à l'extrémité 3' du fragment d'Okazaki adjacent.

Éventuellement, il n'y aura pas de fragment adjacent où des nouveaux nucléotides peuvent être ajoutés pour remplir l'espace. Par conséquent, chaque réplication entraîne un brin fils plus court que les brins parents.



Mots croisés

¹ s	e	m	i	-	c	o	n	s	e	r	v	² a	t	e	u	r							
												d											
							³ d	i	s	c	o	n	t	i	n	u							
												p											
								⁴ a			⁵ n	u	c	l	é	o	t	i	d	e			
								d				l											
⁶ c	⁷ o	n	t	i	n	u						⁸ h	y	d	r	o	g	è	n	e			
	k						l					m											
	a						i					⁹ a	d	n	h	é	l	i	c	a	s	e	
	z						g					r											
	a						¹⁰ a	d	n	p	r	i	m	a	s	e							
	k						s					s											
¹¹ m	i	t	o	s	e							¹² d	i	s	p	e	r	s	i	f			

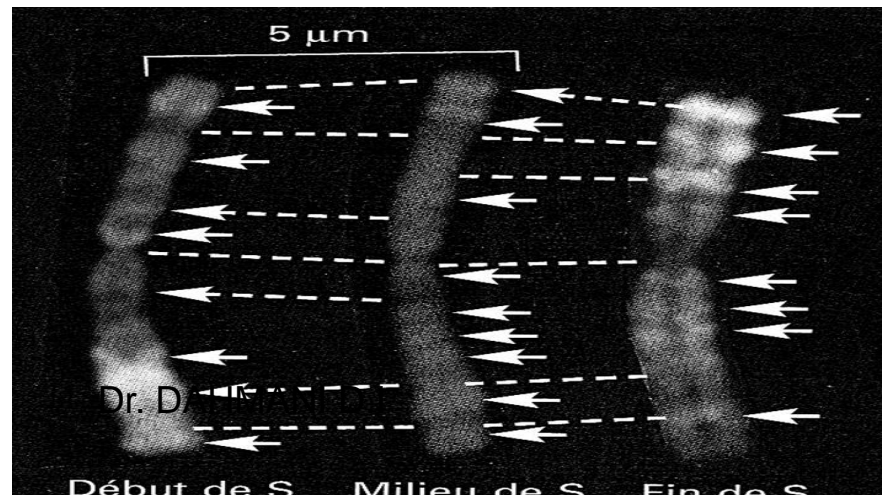
Horizontal

12. Modèle de réplique d'ADN où chaque nouveau brin fille est un mélange des brins parentaux et de brins nouvellement synthétisés



La réplication chez les eucaryotes

- le mécanisme général est \approx de celui des procaryotes la réplication a lieu pendant la phase S du cycle cellulaire
- présence de nombreuses régions (20 à 30 000 chez l'homme) capable de fixer le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC) et définissant des unités de réplication d' \approx 100 à 200 kpb: les réplicons.
- présence de « minichromosome maintenance proteins » (MCM) l'activation de ORC/MCM est régulé par les cyclines et les « cyclin-dependent protein kinases » (voir cours de Bio Cellulaire)



La réplication chez les eucaryotes

Caractéristiques particulières:

- La réplication se fait en de nombreux points d'initiation.
- Elle fait intervenir un nombre d'ADN polymérases plus important que chez les procaryotes. (9 ADN polymérases chez les eucaryotes).
- La polymérase alpha/primase. Cette polymérase est impliqué dans l'initiation de la réplication ("priming").
 - ✓ La polymérase bêta.
 - ✓ La polymérase gamma.
 - ✓ La polymérase delta.
 - ✓ La polymérase epsilon.

Les ADN polymérases

❖ ADN polymérases

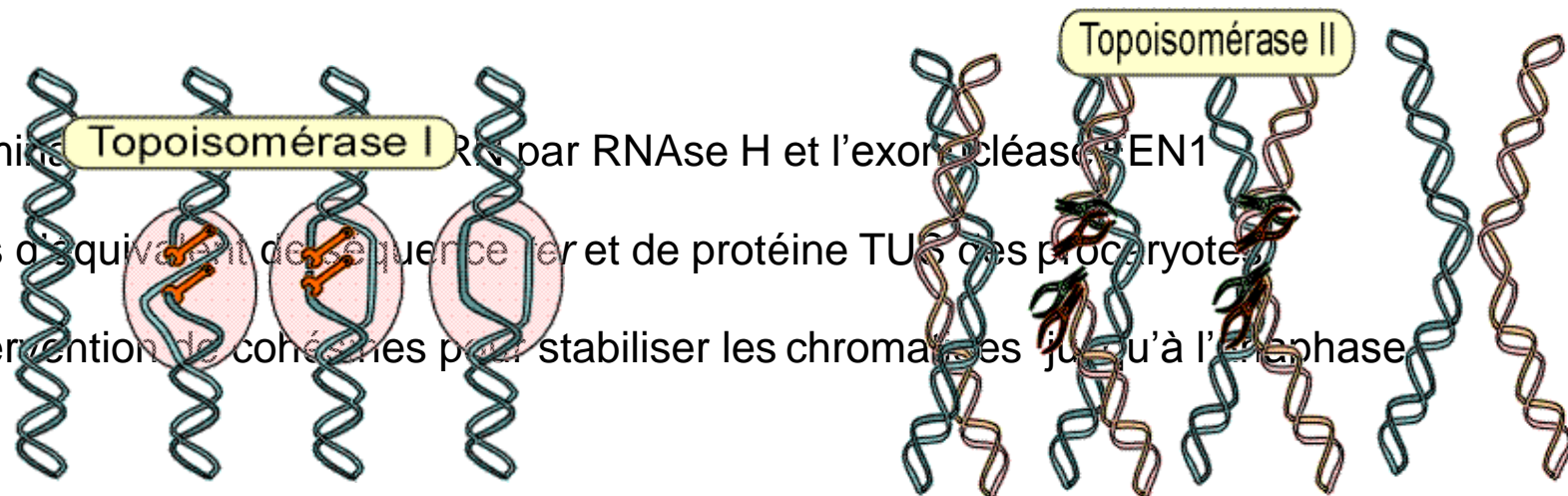
		localisation	équivalent procaryote	activité	activité 3'-5' exonucléase	facteurs associés
α	= POLA	noyau	ADN Pol I	initiation	-	Primase, RP-A
β	= POLB	noyau		réparation , finition	-	
γ	= POLG	mitochondri e		synthèse, réparation	+	
δ	= POLD1	noyau	ADN Pol III	synthèse , finition	+	RF-C, PCNA
ε	= POLE	noyau	ADN Pol II	synthèse , réparation	+	
κ	= POLK	noyau		liaison des cohésines	?	
η, ι, ζ	= POLH, I, Z	noyau		réparation "by-pass »	?	
θ, λ	= POLQ, L	noyau		réparation	?	
σ	= POLS	noyau		cohésion des chromatides	?	

❖ élimination de la superhélice par Topoisomérase I et de l'ARN par RNase H et l'exonucléase XPG-EN1

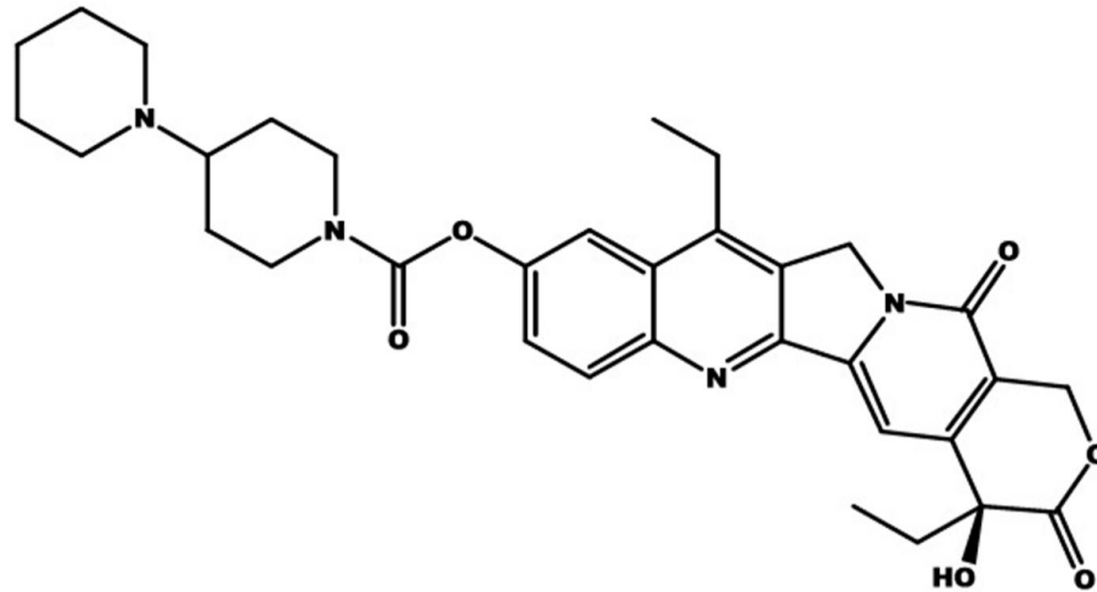
❖ pas d'équivalent de séquence Ter et de protéine TUS des procaryotes

❖ intervention de cohésines pour stabiliser les chromatides jusqu'à l'anaphase

❖ intervention de topo-isomérases de type I (A, B) et II



Les topo-isomérases humaines sont la cible de certains agents de chimiothérapie anti-tumorale



Exemple : irinotecan® (inhibiteur de la topo I humaine)

LES ENZYMES ET PROTEINES EUCARYOTES

- **Les hélicases** : pour séparer les brins parentaux
- **Les protéines RPA** : pour maintenir les 2 brins séparés (ce sont les équivalents des protéines SSB chez la bactérie)
- **Les topoisomérases** : pour éliminer les surenroulements positifs et introduire des négatifs.
- **La primase (qui est une ARN polymérase ADN dépendante)** : pour synthétiser les amorces d'ARN
- **L'ADN polymérase eucaryote** : il y en a 5 : α , β , γ , δ , ϵ .

ADN POL δ :

C'est une ADN polymérase ADN-dépendante.

- Elle réalise la réplication totale du brin avancé en 5' \rightarrow 3' (initiation et élongation)
- Elle réalise la majorité de la réplication du brin retardé (élongation)
- Elle a une activité polymérasique en 5' \rightarrow 3' et une fonction d'édition en 3' \rightarrow 5'.
- Sa processivité (capacité de l'enzyme à rester associée sur le brin d'ADN parental) est régulée par un anneau ou clamp, qui est une protéine particulière nommée la PCNA (Proliferating Cellular Nuclear Antigen).
- Elle intervient aussi sur la finition des brins d'ADN (pour compléter les lacunes)



ADN POL α :

- Elle intervient uniquement sur le brin retardé pour initier la réplication.
- Elle est associée à la primase : elle prend le relai direct au niveau des fragments d'Okazaki eucaryote (100-200 nt), sur le brin retardé.

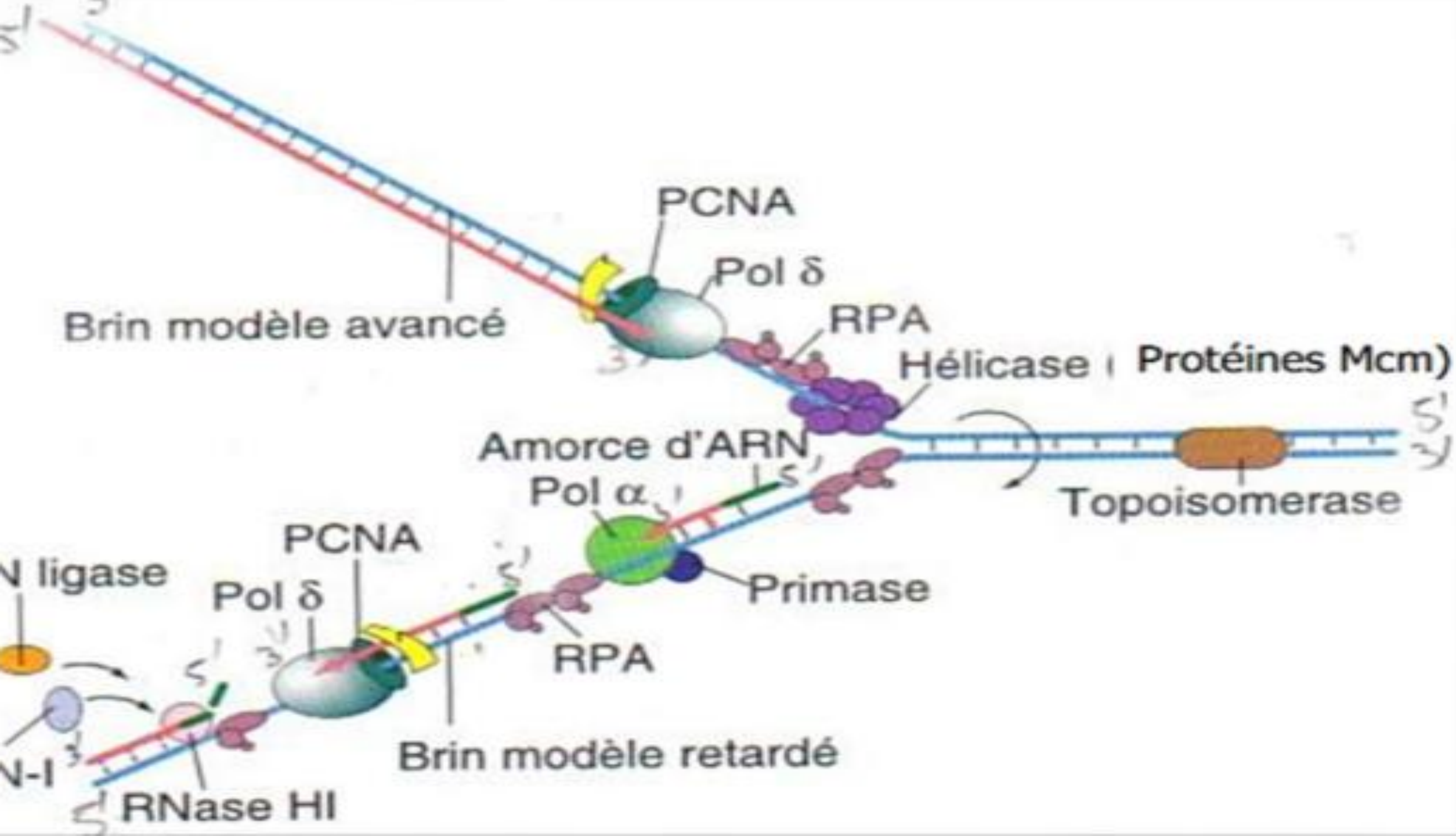


ADN POL γ :

Elle est impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial.

ADN POL ϵ , ADN POL β :

Elles sont impliquées dans la réparation de l'ADN

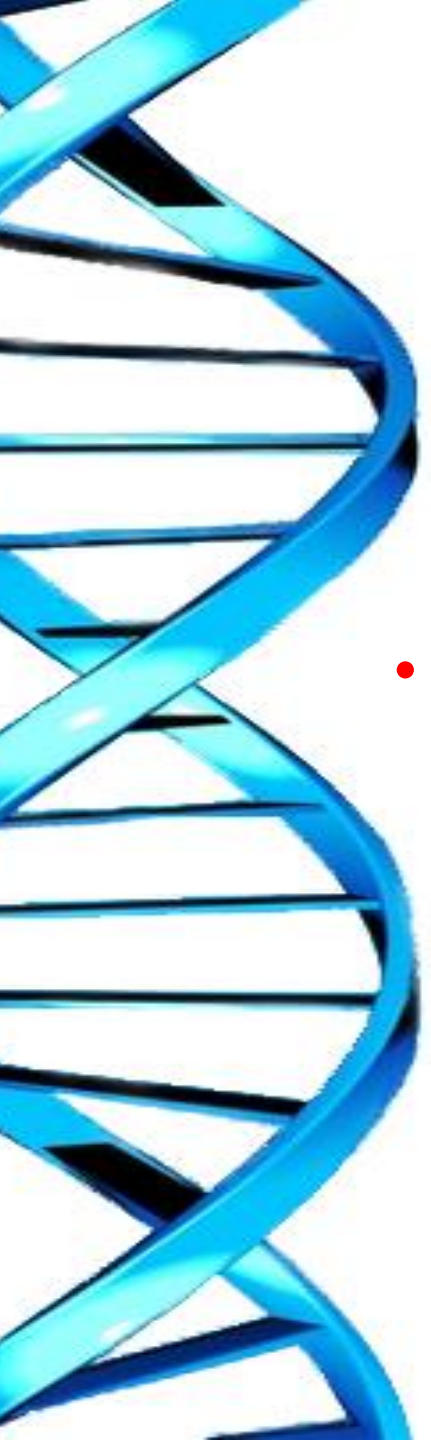




PARTICULARITE EUCARYOTE

1 ère particularité eucaryote : *La présence de nucléosomes*

- Les génomes des cellules filles doivent être identiques au génome de la cellule mère, ce qui concerne également les nucléosomes.
- Les nucléosomes parentaux restent associés, puis une répartition équivalente se fait entre les deux brins (brin parental et brin fils) de la molécule d'ADN.
- Pendant la phase S du cycle cellulaire, de nouveaux nucléosomes sont synthétisés pour compléter les nucléosomes parentaux dans les cellules filles.
- Chaque brin possède alors 50% de nucléosomes parentaux et 50% de nucléosomes néosynthétisés.



- **2 ème particularité eucaryote** : *La présence des télomères*

Les télomères

Le chromosome étant linéaire, la fin de la réplication est marquée par l'addition, par des enzymes spécifiques, les télomérases, de séquences répétées qui forment les télomères,

- **Les télomères:** sont indispensables pour préserver l'intégrité du matériel génétique au cours du cycle cellulaire.
- **L'ADN télomérique:** est formé par des répétitions très régulières, **en tandem**, d'un motif simple de **5 à 8 paires de bases riches en guanine** qui se traduit **par la constitution de boucles**, de tiges ou de structures **à quatre brins**, très stables.

La perte du télomère ou son absence de réparation entraîne une instabilité du chromosome qui se perd dans les cellules survivantes.

Si elle n'est pas réparée, cette dégradation aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort de la cellule.

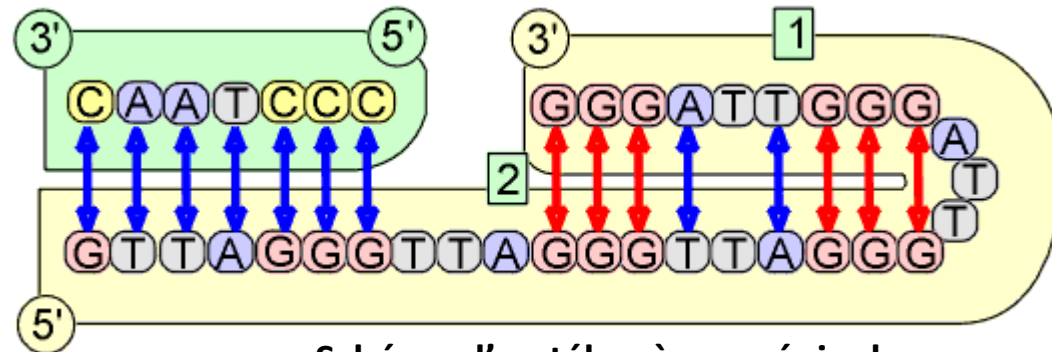
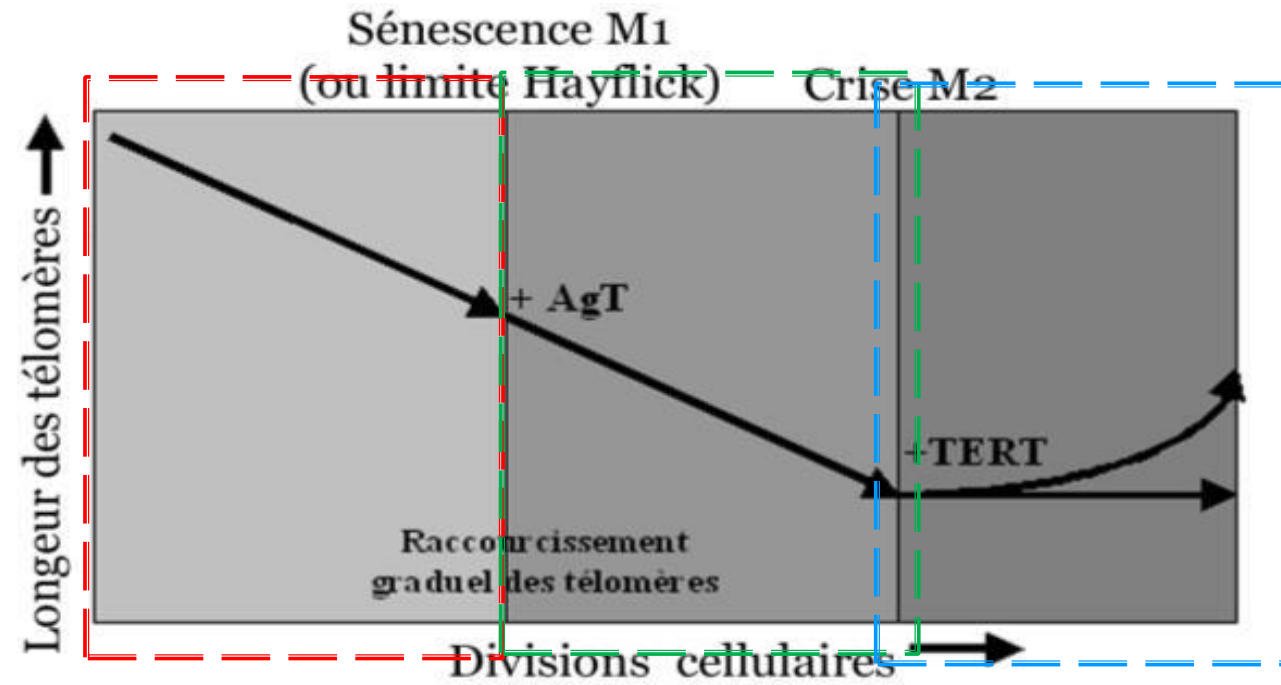


Schéma d'un télomère en épingle.

Le fragment 5' se termine normalement. En [1], le fragment 3' se recourbe en épingle. Les guanines [2] se combinent entre elles par une modification de leur configuration des sucres associés. L'extrémité est ainsi protégée de la dégradation par les DNases.

Implication des télomères dans la sénescence cellulaire:

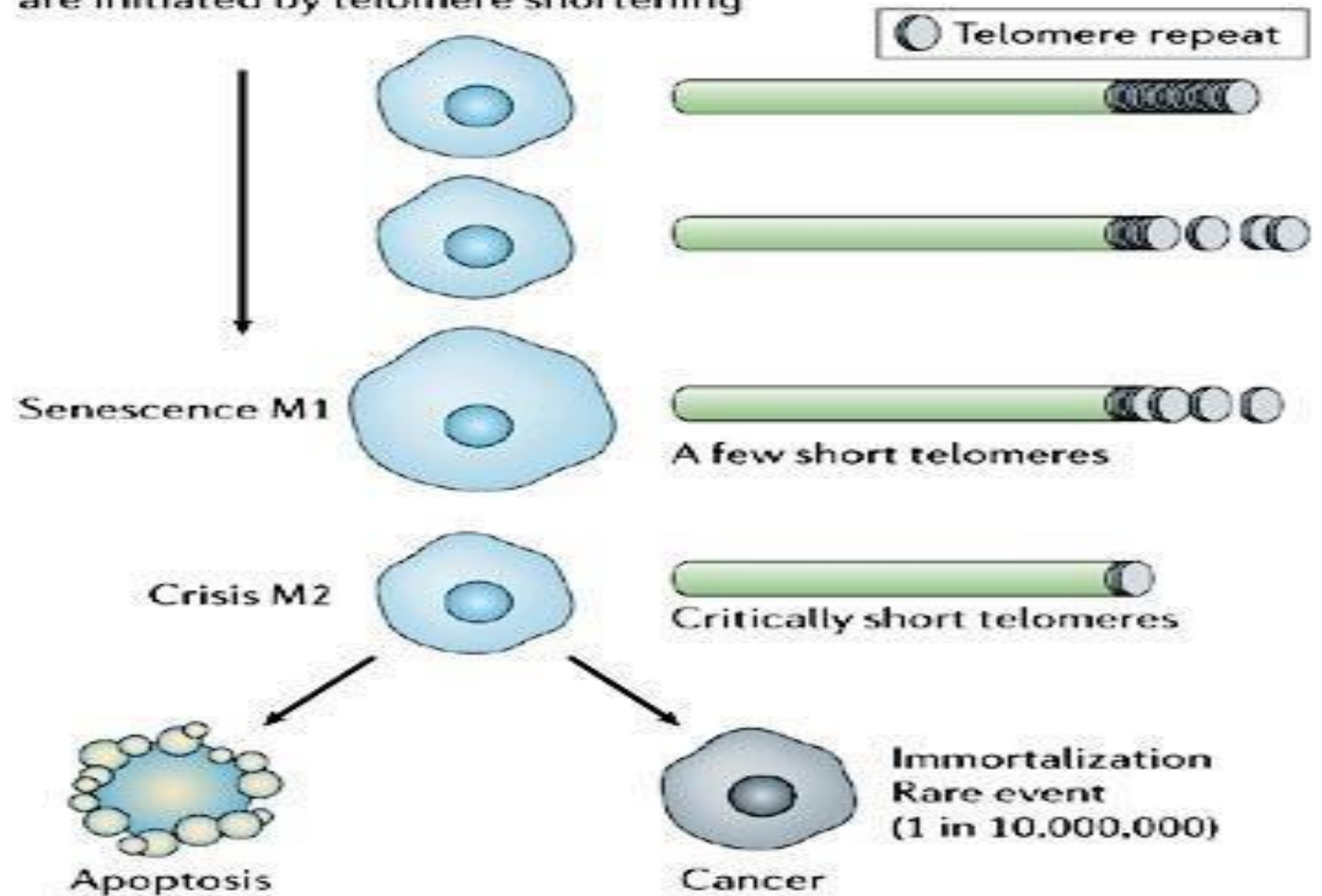
- Pendant la prolifération en culture, les cellules humaines voient leurs télomères diminuer en longueur.
- Les cellules peuvent entreprendre entre 40 et 50 divisions avant d'entrer en sénescence (M1), un état de crise dépendant de p53.
- Les cellules immortalisées avec un oncogène, comme l'AgT, peuvent franchir cette limite et ajouter entre 30 et 40 divisions avant d'atteindre la limite M2.
- L'allongement des télomères, à l'aide de la sous-unité catalytique (TERT) de la télomérase, peut permettre de franchir cette limite proliférative en maintenant la longueur des télomères





Suite...

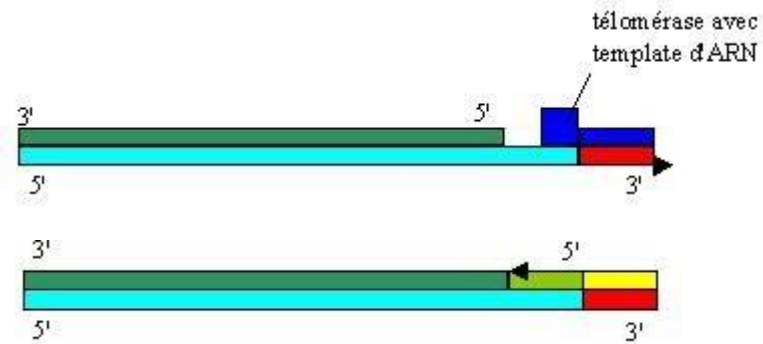
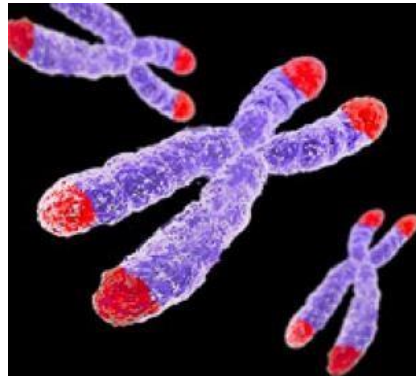
M1 (senescence) and M2 (crisis) pathways are initiated by telomere shortening



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

La vie nous étonne encore!

- Les **téломères**: sont les séquences de nucléotides retrouvés à l'extrémité des chromosomes linéaires.

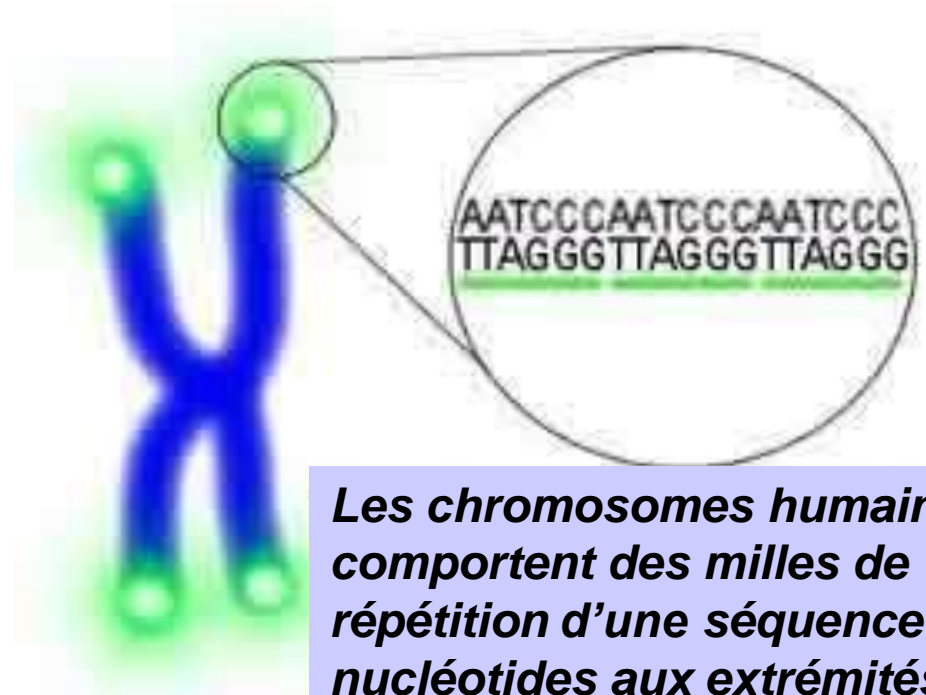


- La **télomérase** est une enzyme qui prolonge les télomères.

Les télomères et la télomérase

- La découverte et leur fonction de **protection chromosomique**:

- Herman **Muller** et Barbara **McClintock** proposent les caractéristiques de manière indépendante en **1930**



Les chromosomes humains comportent des milles de répétition d'une séquence de 6 nucléotides aux extrémités <<TTAGGG>>

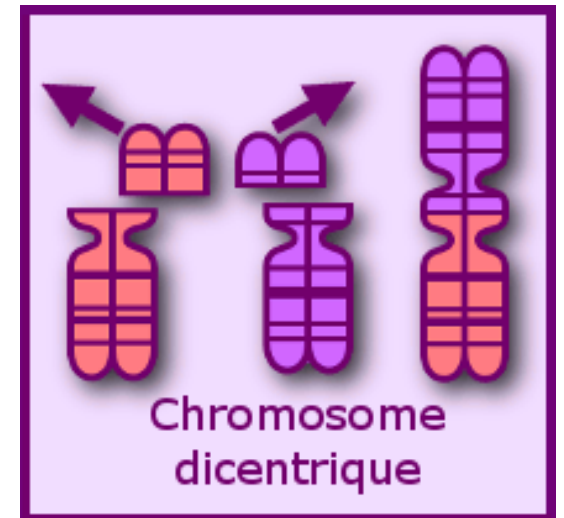
Muller, 1930

- Étudiant de Thomas Hunt Morgan
- Induit des mutations aléatoires dans les chromosomes de la mouche du vinaigre (*Drosophila*) et remarque que les extrémités chromosomiques semble résister aux rayons-X.
- Il propose que les extrémités doivent comporter des gènes de <<protection>>
- Il a été accordé le prix Nobel en 1946 pour la génération de mutations par l'irradiation aux rayons-X
 - Il n'avait pas tout à fait raison...

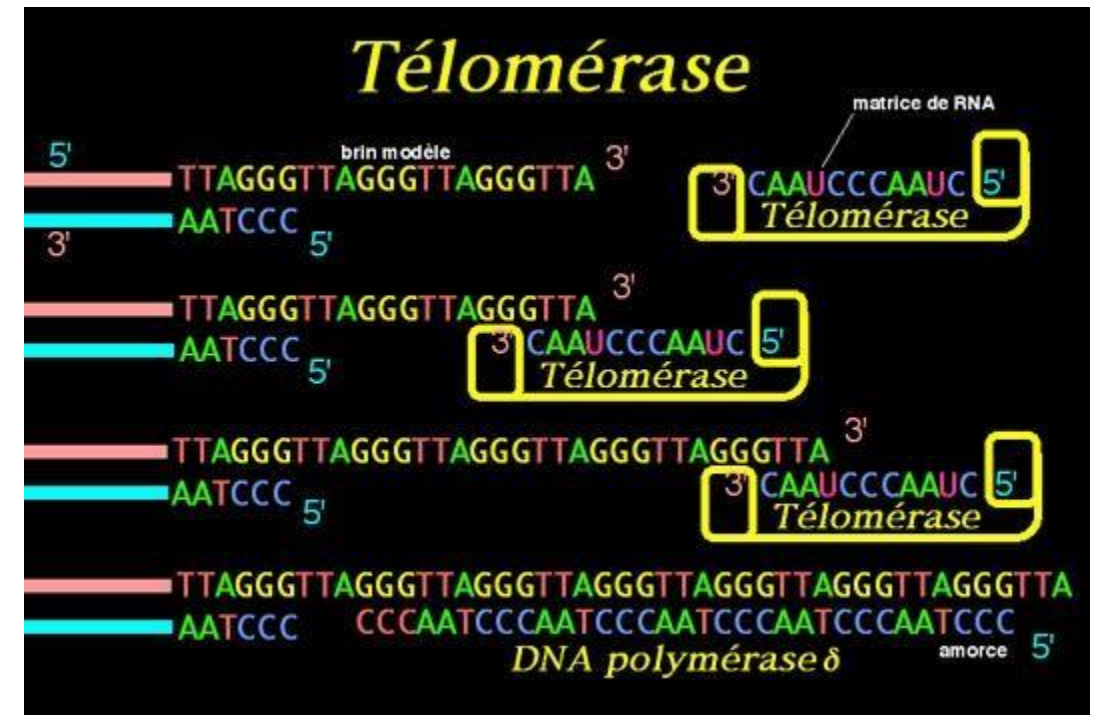
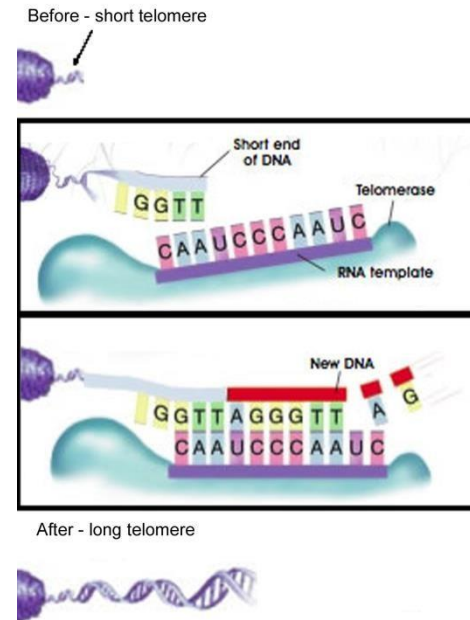


McClintock, 1941

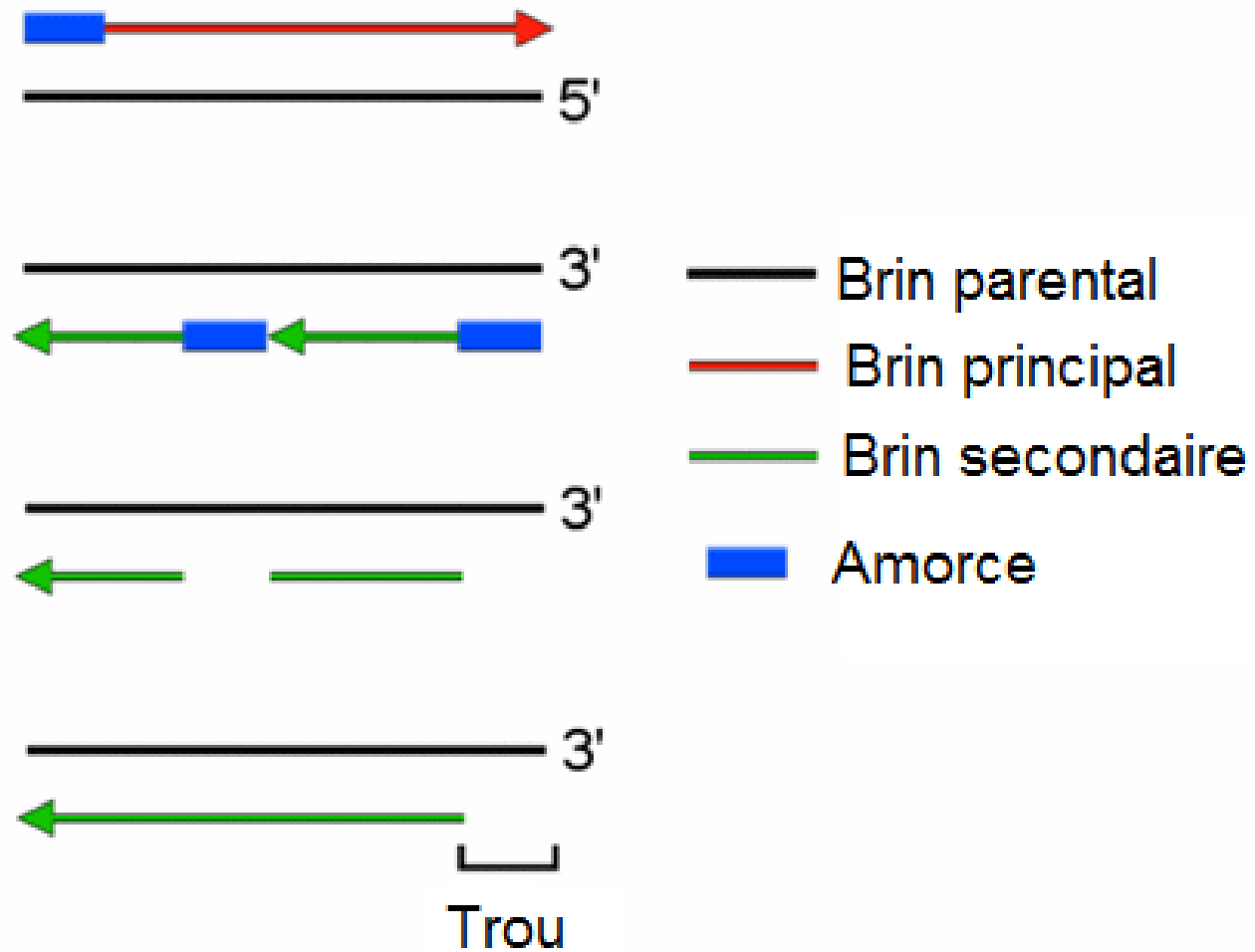
- Modèle: maïs
- Étudie les conséquences des ruptures chromosomiques en produisant des chromosomes de maïs dicentriques qui se divisent lors de la mitose.
- Elle remarque que les extrémités (télomères) sont instables (fragiles) une fois brisés et ont tendance à se lier à n'importe quelle autre séquence simple à proximité.



Suite...McClintock



- En répétant son protocole avec divers types de cellules chez le même organisme modèle, **les cellules embryonnaire** donnaient des résultats intéressants. Une fois l'extrémité chromosomique a subit une rupture, un mécanisme semble <<réparer>> la séquence. Aujourd'hui les scientifiques attribuent cette réparation à <<**téломérase**>>, une enzyme active chez les cellules souches, les cellules embryonnaires et certaines cellules somatiques.

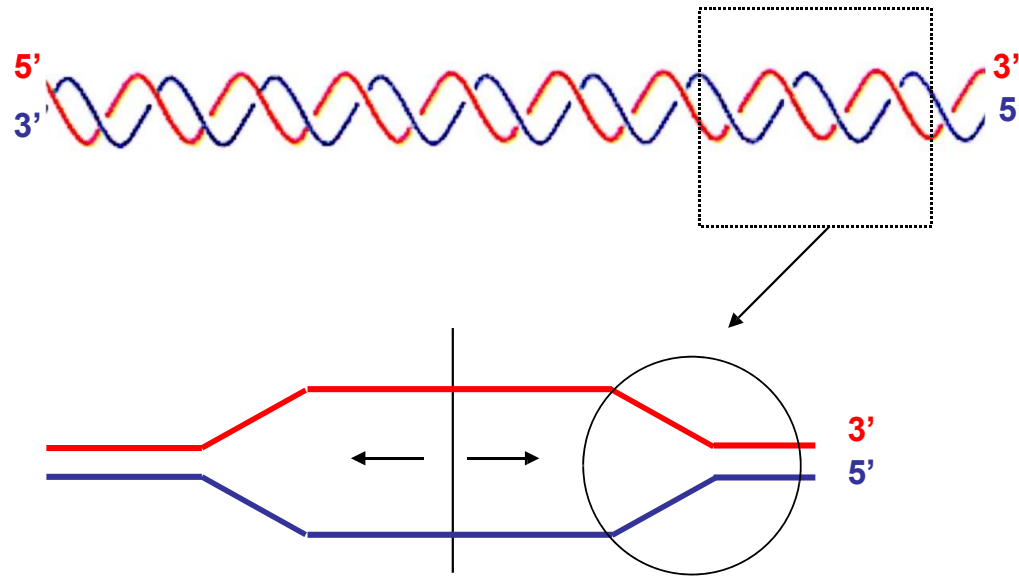


Quelques bases ne sont pas répliqué. Cette perte d'ADN peut mener à la mort cellulaire!

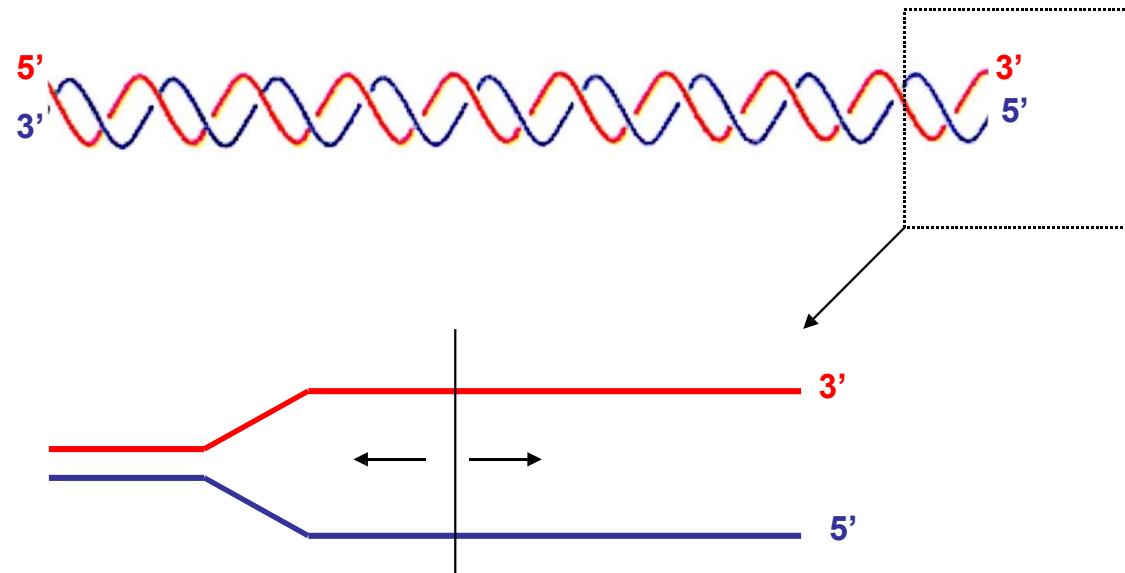
Solution pour la perte de bases:

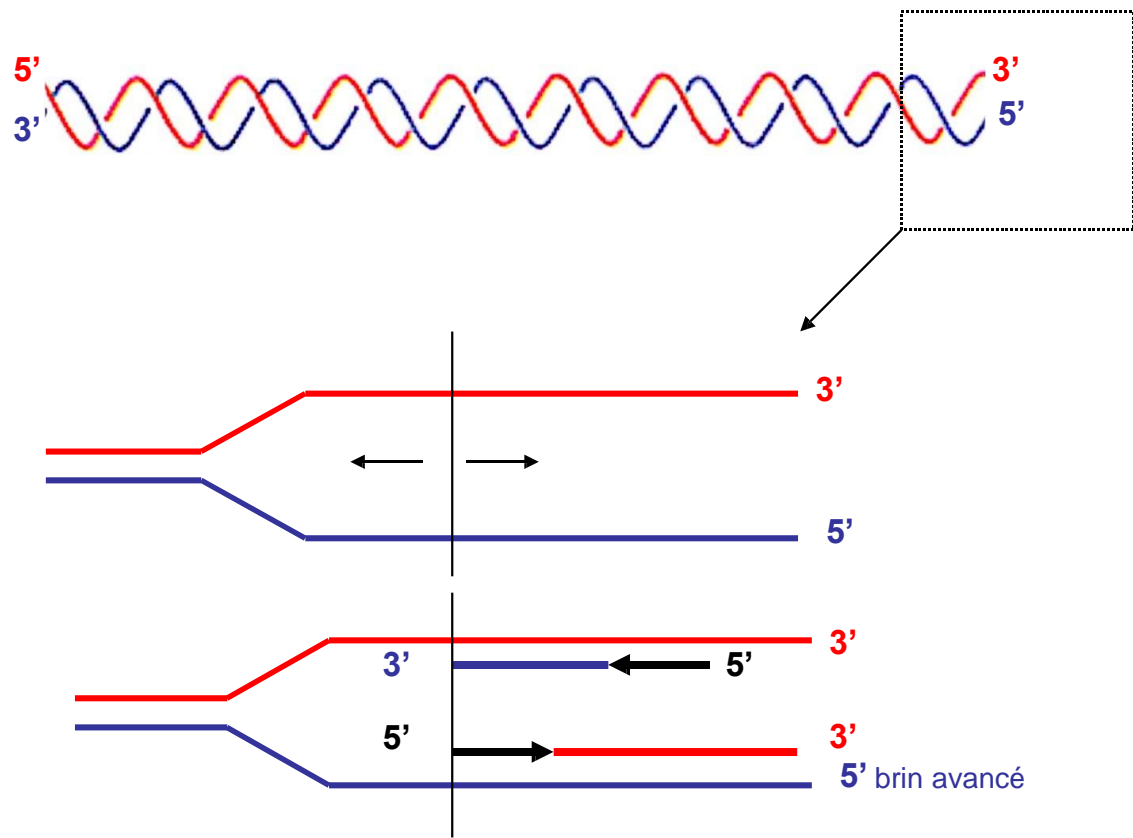
- À l'extrémité de chaque chromosome, il y a une extension spéciale appelée un **télomère**.
- Le télomère est composé de la séquence TTAGGG répétée des milliers de fois.
- Ces nucléotides répétitives sont inutiles – si ils ne sont pas répliqués, la cellule n'est pas affectée

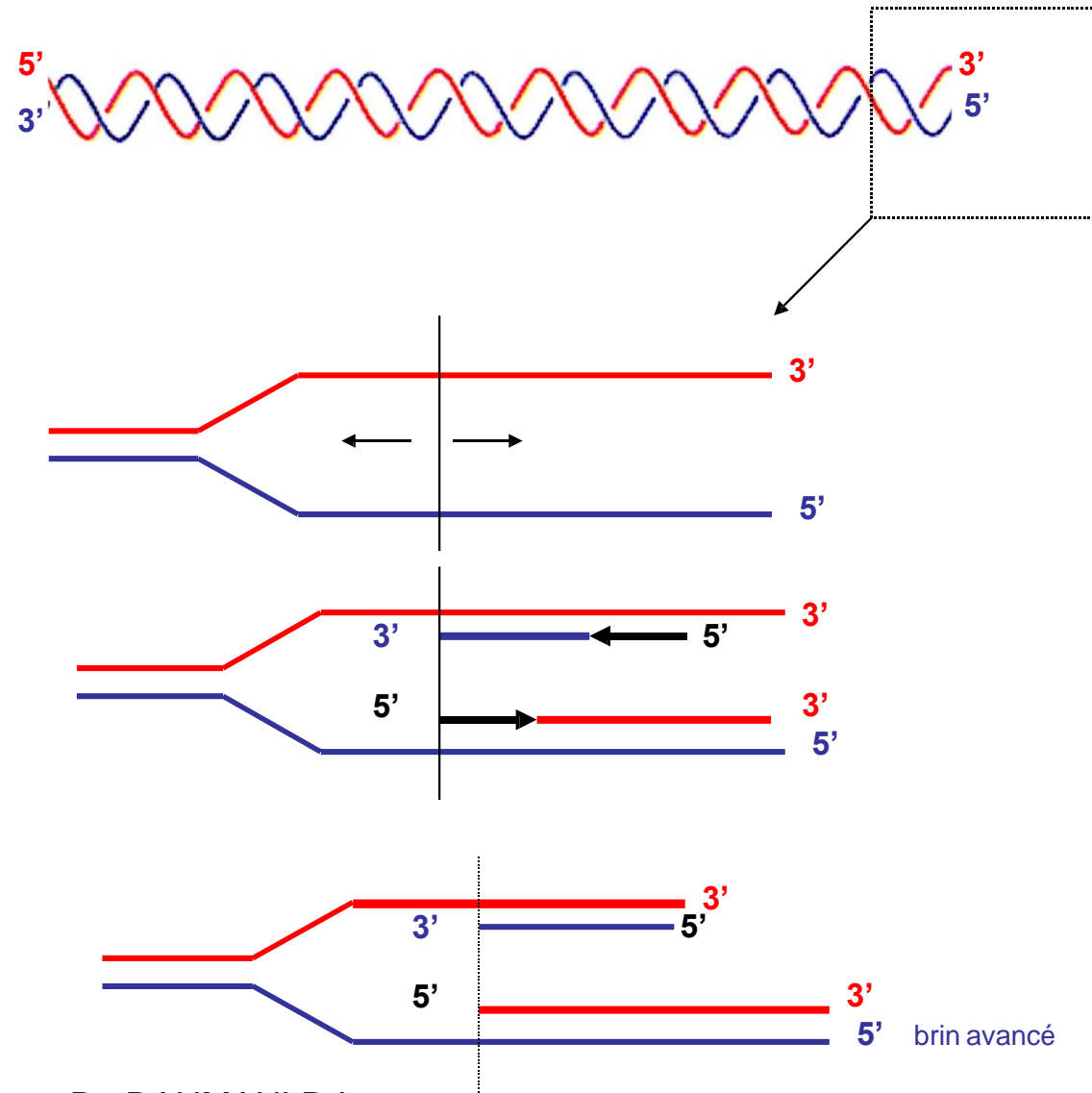
La réplication des extrémités télomériques



Le prix Nobel de Médecine et Physiologie 2009 est décerné à Elizabeth H Blackburn, Carol W Greider, Jack W Szostak pour « la découverte du mécanisme de protection des chromosomes par les télomères et la télomérase »



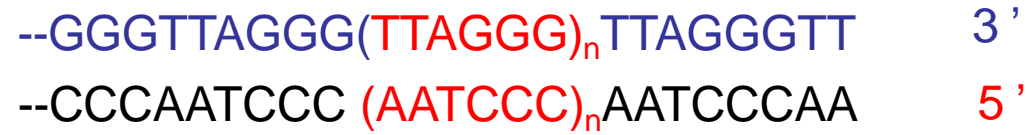




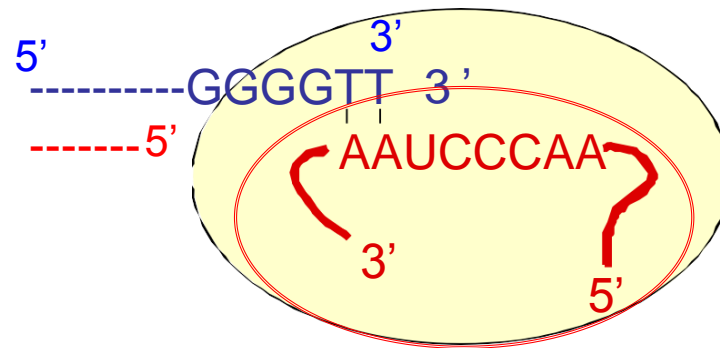
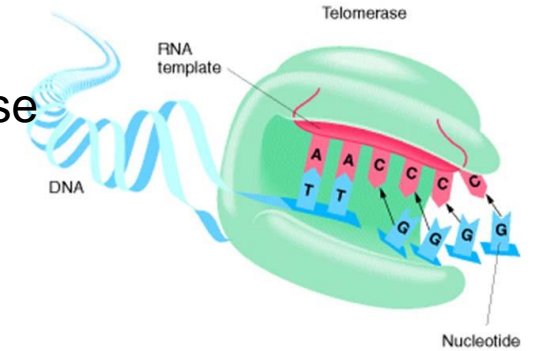
Dr. DAHMANI D.I



❖ L'ADN des télomères contient des séquences répétées



❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase



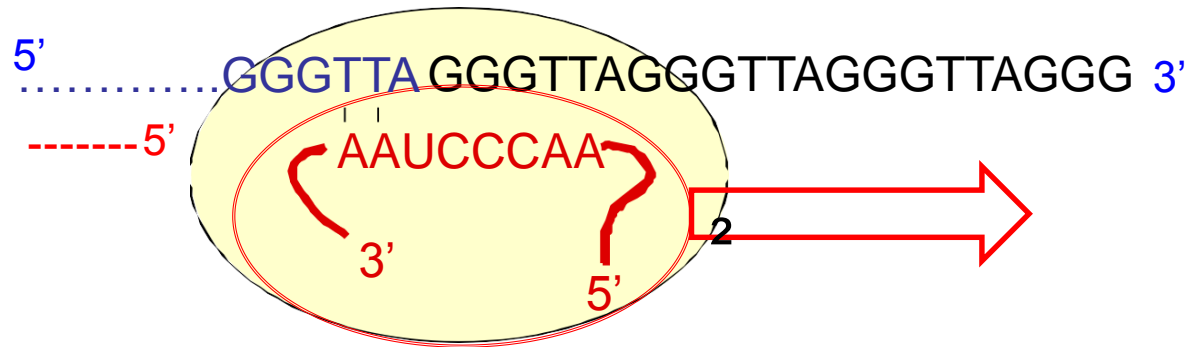
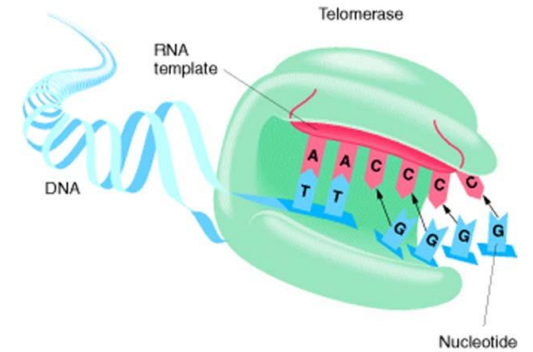
1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'



❖ L'ADN des télomères contient des séquences répétées



❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase



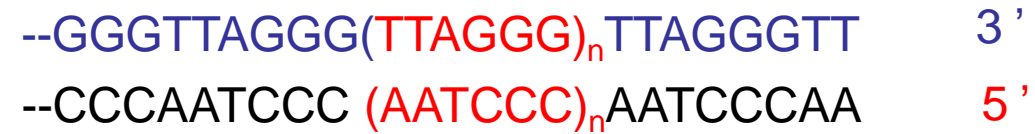
1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'

2. Elongation

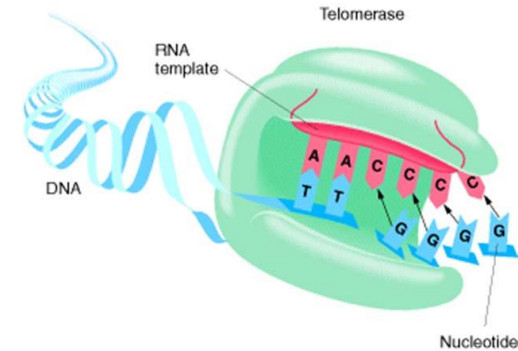
3. Translocation



❖ L'ADN des télomères contient des séquences répétées



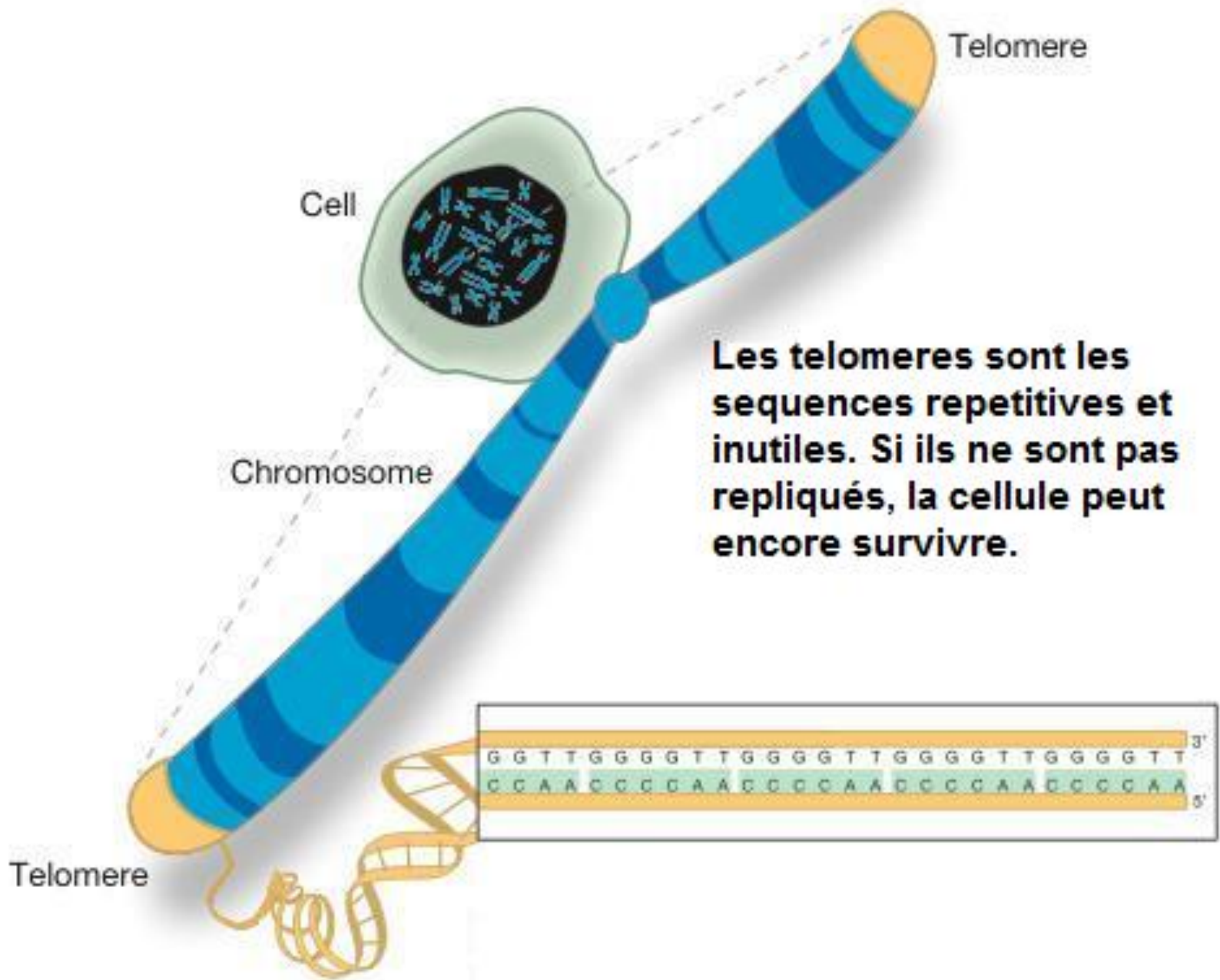
❖ télomérase à ARN possédant une activité reverse-transcriptase




1. Appariement de l'ARN de la télomérase avec l'extrémité 3'
2. Elongation
3. Translocation

4. Synthèse d'une amorce ARN puis fixation de l'ADN polymérase

Dr. DAHMANI D.I

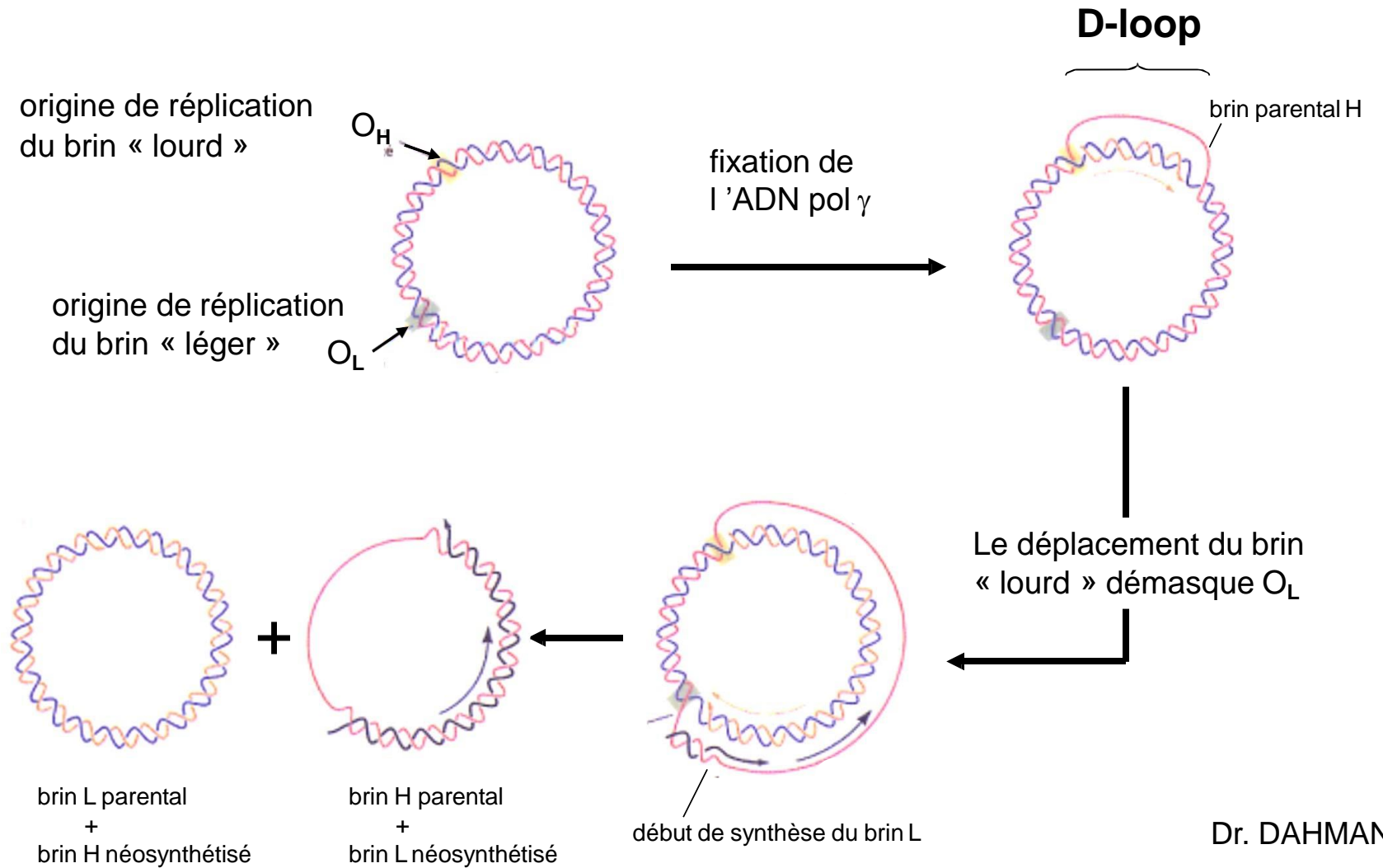


Les répétitions des télomères et le cancer.

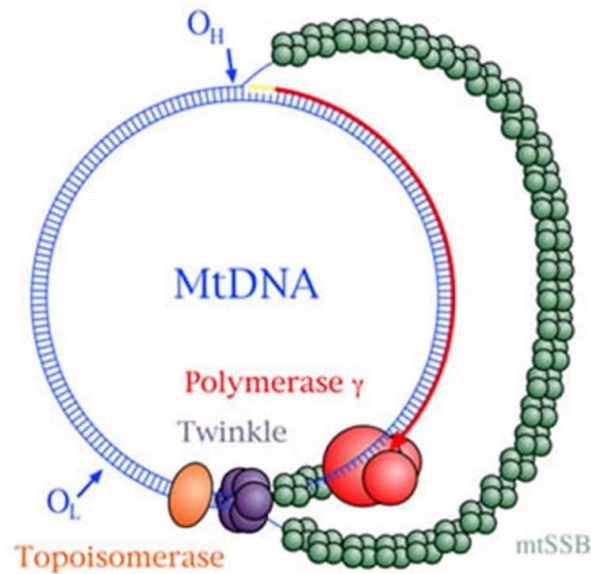
- 
- L'érosion des télomères entraîne la mort de la cellule (sénescence).
 - L'activité du gène qui code la télomérase est directement liée à la longévité de la vie et le cancer.
 - Les cellules cancéreuses qui évite le mécanisme naturel de l'apoptose démontre une activité accrue de la télomérase

Réplication de l'ADN mitochondrial

La réplication de l'ADN mitochondrial circulaire utilise 2 origines de réplication, une ADN pol γ et fait intervenir une structure intermédiaire à 3 brins.



- ❖ La réplication de l'ADNmit est contrôlée par des gènes nucléaires et fait intervenir de nombreux facteurs protéiques d'origine nucléaire.

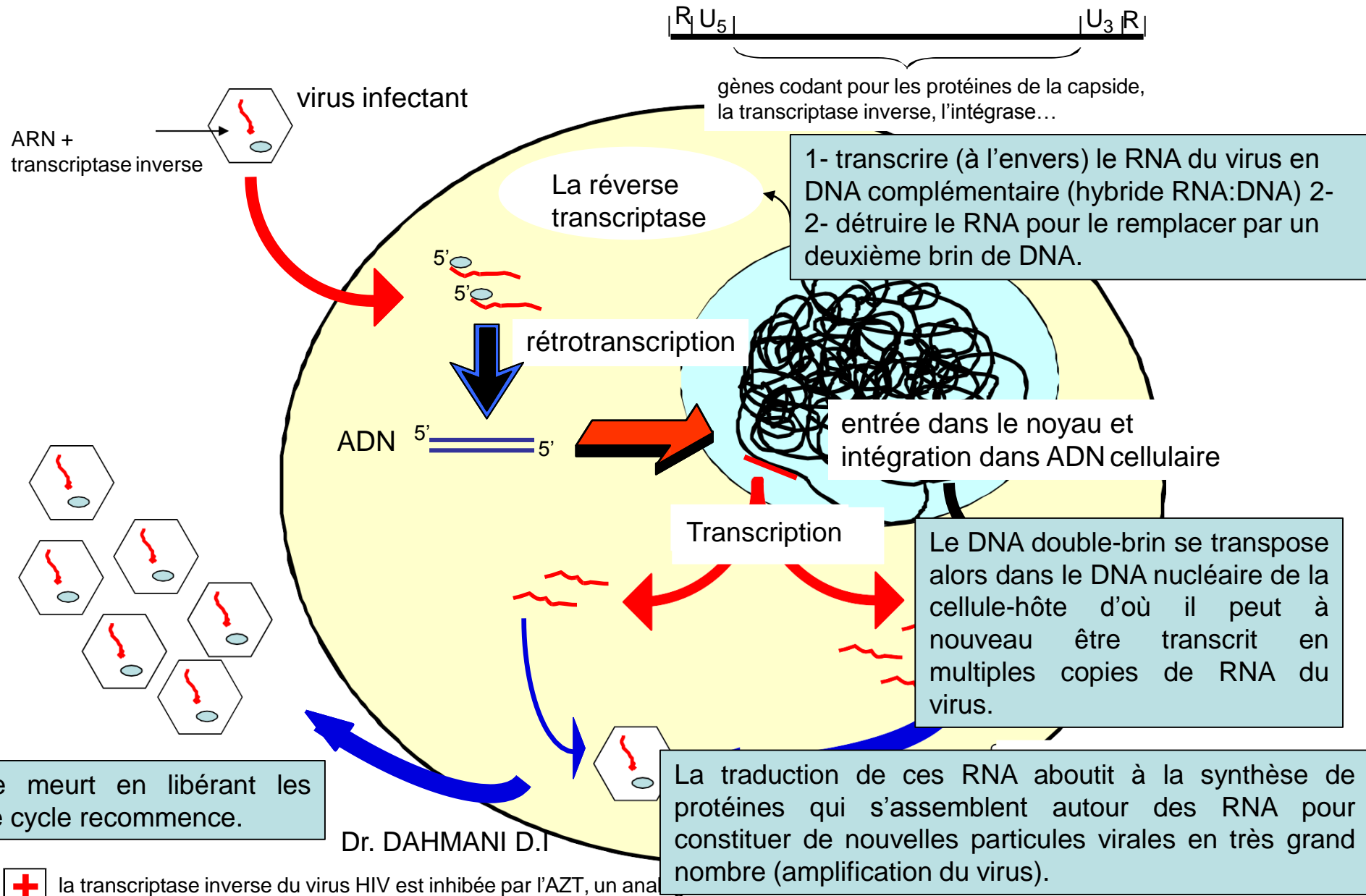


Initiation Factors:
RNA Polymerase
mtTFA
mtTFB1
mtTFB2

Additional Activities:
Priming
RNaseH1/5'-3' Exonuclease
Ligase III

- ❖ La réplication de l'ADNmit n'est pas limitée à la phase S du cycle cellulaire

Réplication des rétrovirus



Réparation de l'ADN




- La réplication de l'ADN est semi-répllicative, complémentaire à la matrice et l'ADN polymérase III peut réparer ses erreurs.
- On observe alors que la réplication est un mécanisme qui engendre peu d'erreurs

La vérification et la correction



- La **réplication** de l'ADN semble ordonné mais en réalité elle est chaotique, donc il est nécessaire d'avoir un mécanisme de correction en place.
- **Le taux d'erreur:** une erreur tous les 10 000 à 100 000 nucléotides.
- L'ensemble des enzymes qui participent à la réplication de l'ADN est connu sous le nom de **machine à répliquer**.
- La fidélité finale de la réplication est de 1/10 000 000.

Altérations

- 
- Cependant, des altérations de l'ADN peuvent se produire.
 - Ces phénomènes ne sont pas rares, et certains sont même spontanés (désamination fréquente des bases), alors que d'autres induits (chaleur enlève énormément de purines sur un brin) :
 - ✓ Accidents de réplication
 - ✓ Altération dues à l'instabilité chimique des bases
 - ✓ Modifications dues à l'environnement

<i>Altération</i>	<i>Facteurs</i>	<i>Réparation</i>
Perte d'une base (création d'un site AP apyrimidique ou apurinique)	Induit, 1 100 fois par jour	→ Excision-réparation de base
Désamination (perte de $-NH_2$)	Induit à cause de l'instabilité de ces groupes	→ Correction des erreurs d'appariement → Excision-réparation du nucléotide
Hydroxylation (ajout de $-OH$)	Rayons X Rayons gamma Produits chimiques	→ Excision-réparation du nucléotide
Alkylation ou méthylation	Donneurs présents dans la cellule	→ Excision-réparation de base
Dimères T-T ou C-C	Rayons UV	→ Réparations post-répliquatives
Mauvaise séquence	Induit, erreurs dans la réplication de l'ADN	→ Correction des erreurs d'appariement
Coupures des brins	Radiations ionisantes	→ Excision-réparation du nucléotide



Mécanismes de réparation procaryote (E-Coli)

Dr. DAHMANI D.I

I- Mécanismes prenant place en dehors de la période de réplication

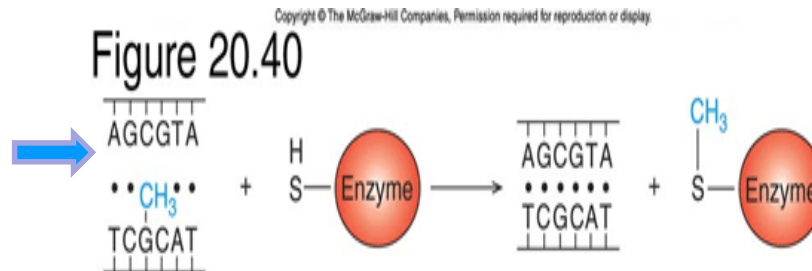
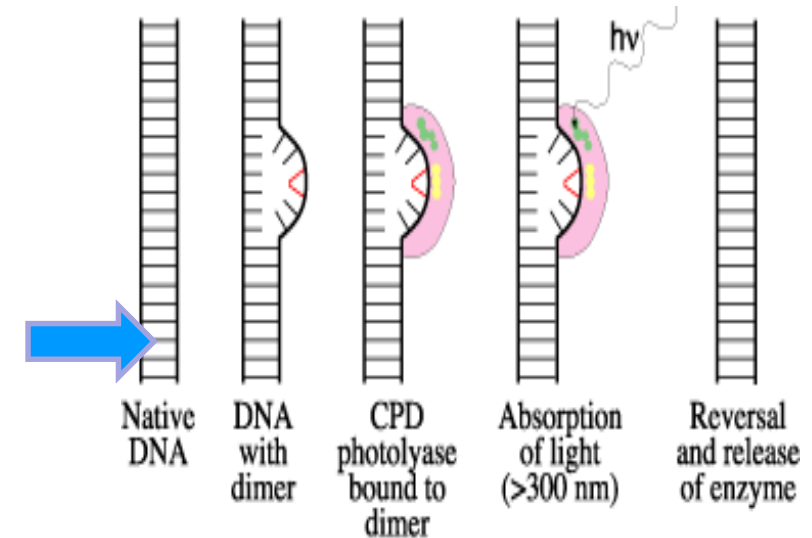
1. Réparation par réversions des lésions :

Ce type de réparation utilise très peu de protéines et restaure immédiatement les liaisons.

• **Photo-réactivation** : les photolyases sont des enzymes activées par l'énergie lumineuse et qui participent à la réparation de l'ADN par coupure des liaisons covalentes au niveau des dimères de thymine.

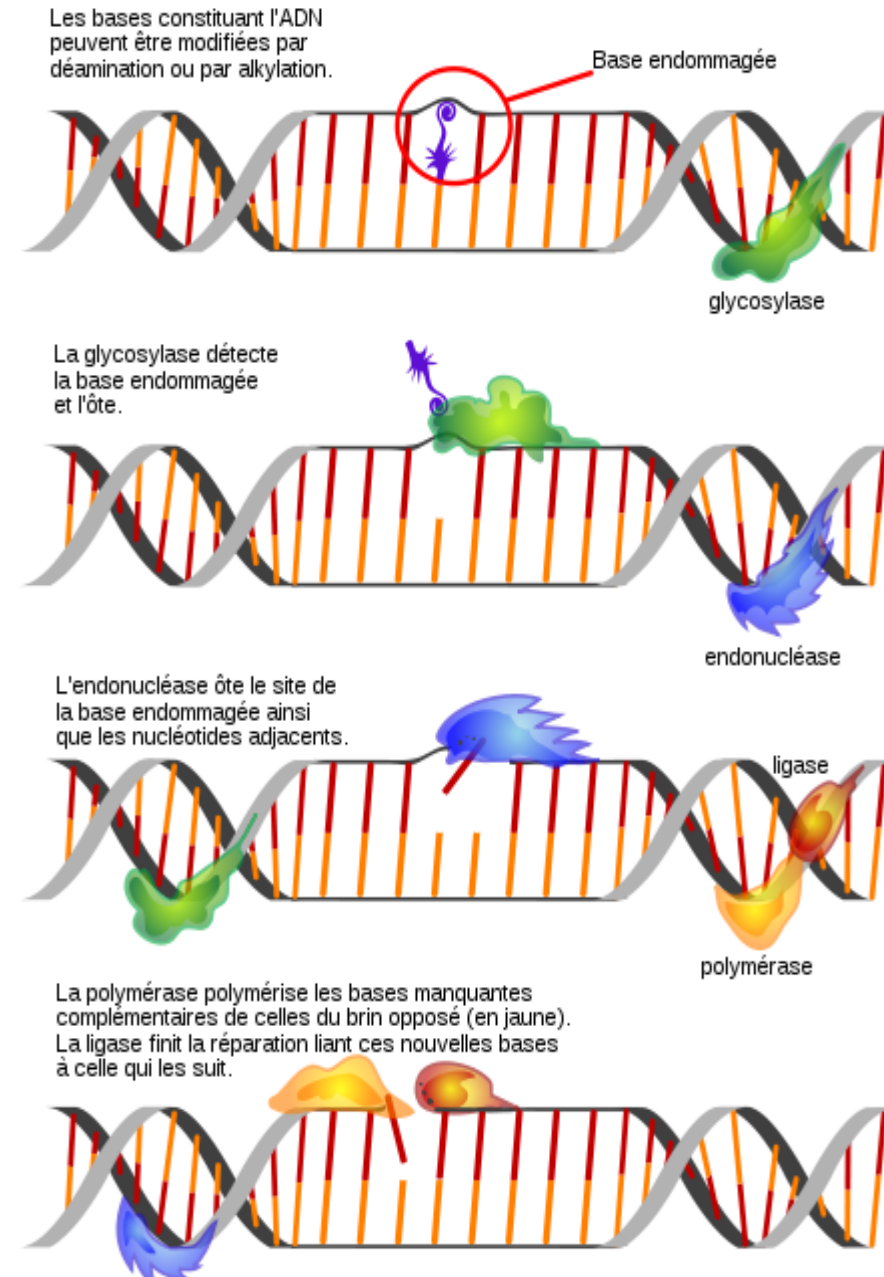
• **Réversion de coupure simple brin** : par une ADN ligase lorsqu'il n'y a pas de pertes de bases.

• **Réversion de dépurination par une purine insertase** : restaure la liaison osidique, enzyme spécifique d'une base.



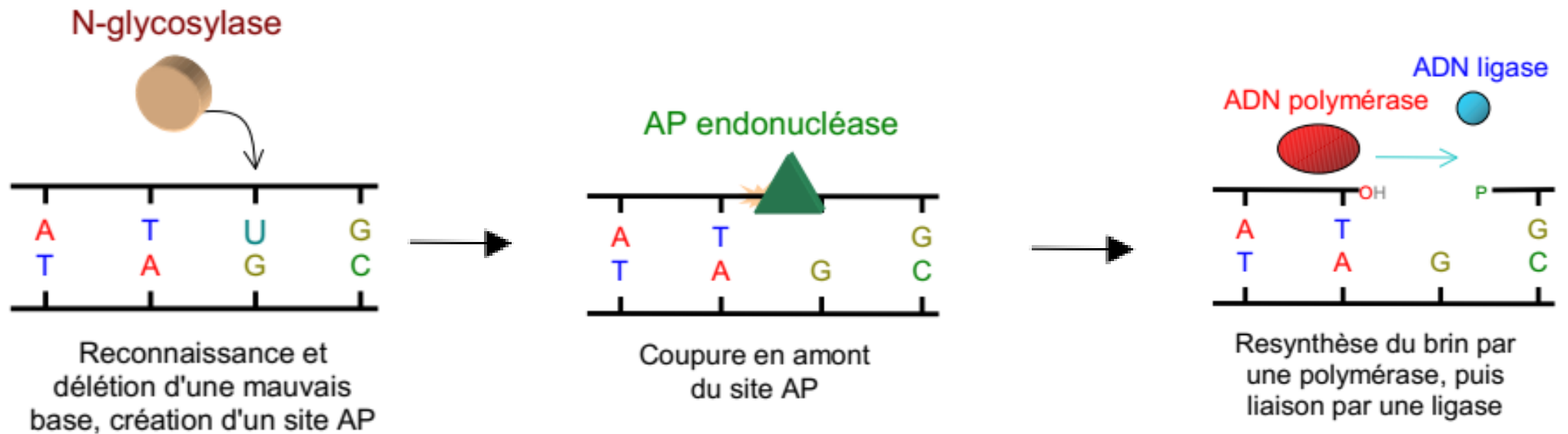
2) Réparation par excision de base (système BER) :

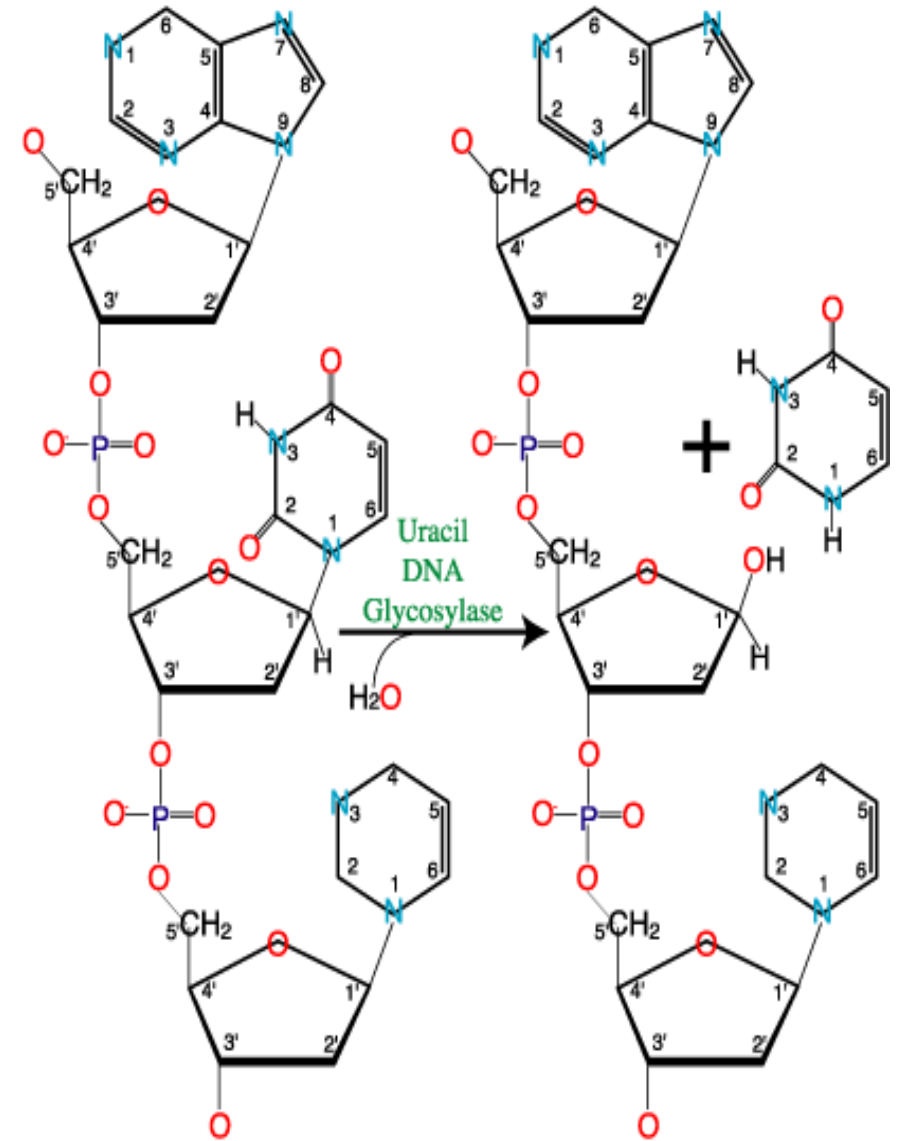
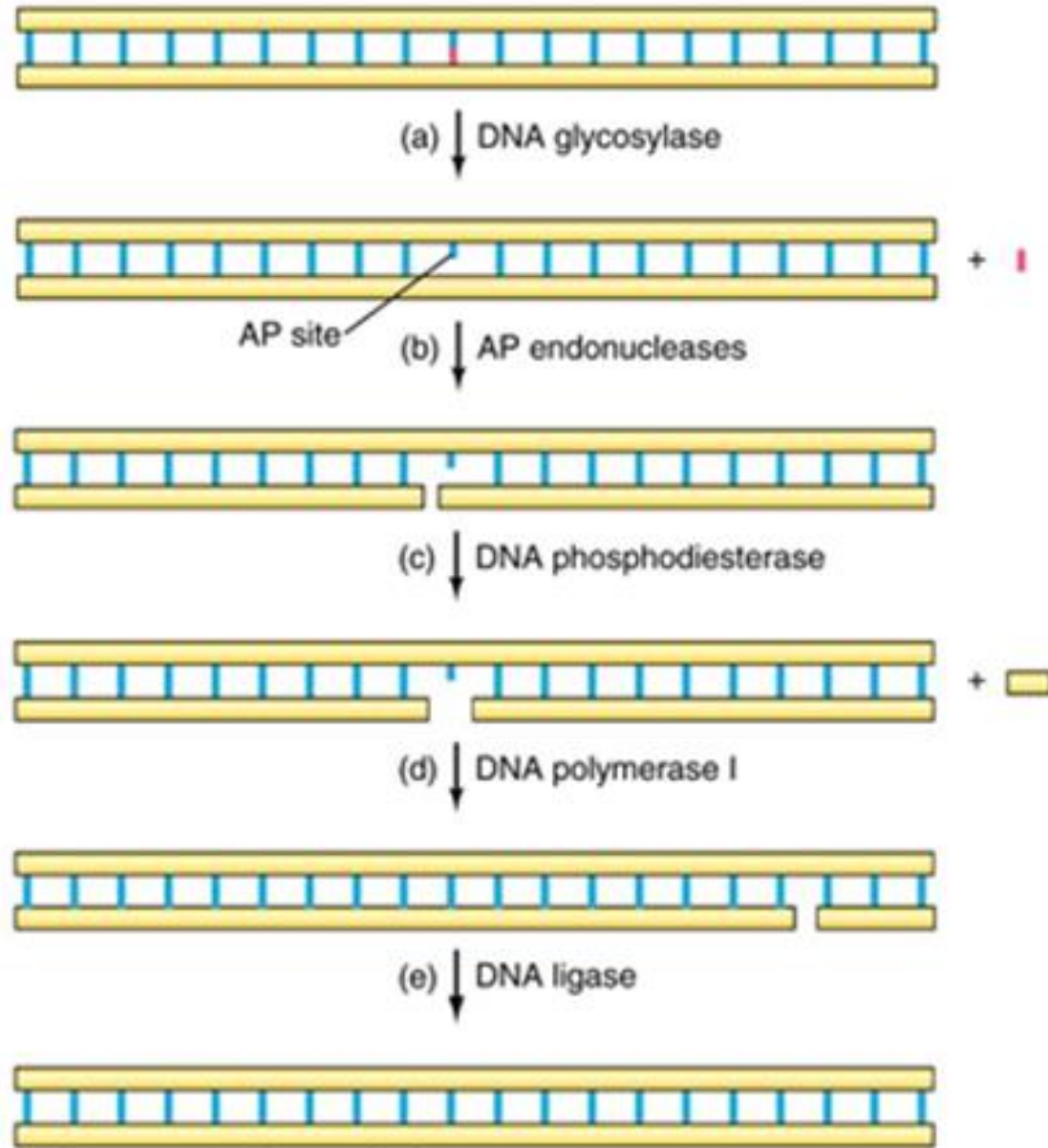
- Ce mécanisme est présent chez les procaryotes et les eucaryotes et essentiellement impliqué dans les réparations de mutations endogènes jusqu'à 4 nucléotides.
- L'**ADN glycosylase** coupe la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose, entraînant l'apparition d'un site AP.
- Il y a uniquement extraction de la base sans coupure de liaison phosphodiester. Il existe de nombreuses glycosylases dans la cellule, chacune reconnaît une (plusieurs) base(s) modifiées différentes.
- Une endonucléase 3'-5' coupe la liaison phosphodiester adjacente au site AP, l'ADN-polymérase I enlève le site AP et synthétise le morceau d'ADN manquant, puis l'ADN-ligase met en place la liaison Phosphodiester manquante.



2) Excision-réparation de base (système BER) (SUITE) :

- Ce type de réparation est communément utilisé pour éliminer les bases incorrectes (comme l'uracile) ou les bases alkylées.
- On sait que les cytosines peuvent être méthylées dans le cas d'une désactivation.
- Cependant, suite à une désamination, la cytosine devient une Uracile.
- La glycosylase est supposée reconnaître et supprimer les liaisons U–G, or ce mécanisme est loin d'être parfait. On parle alors de *points chauds de mutation* à ces endroits où les mutations sont fréquentes







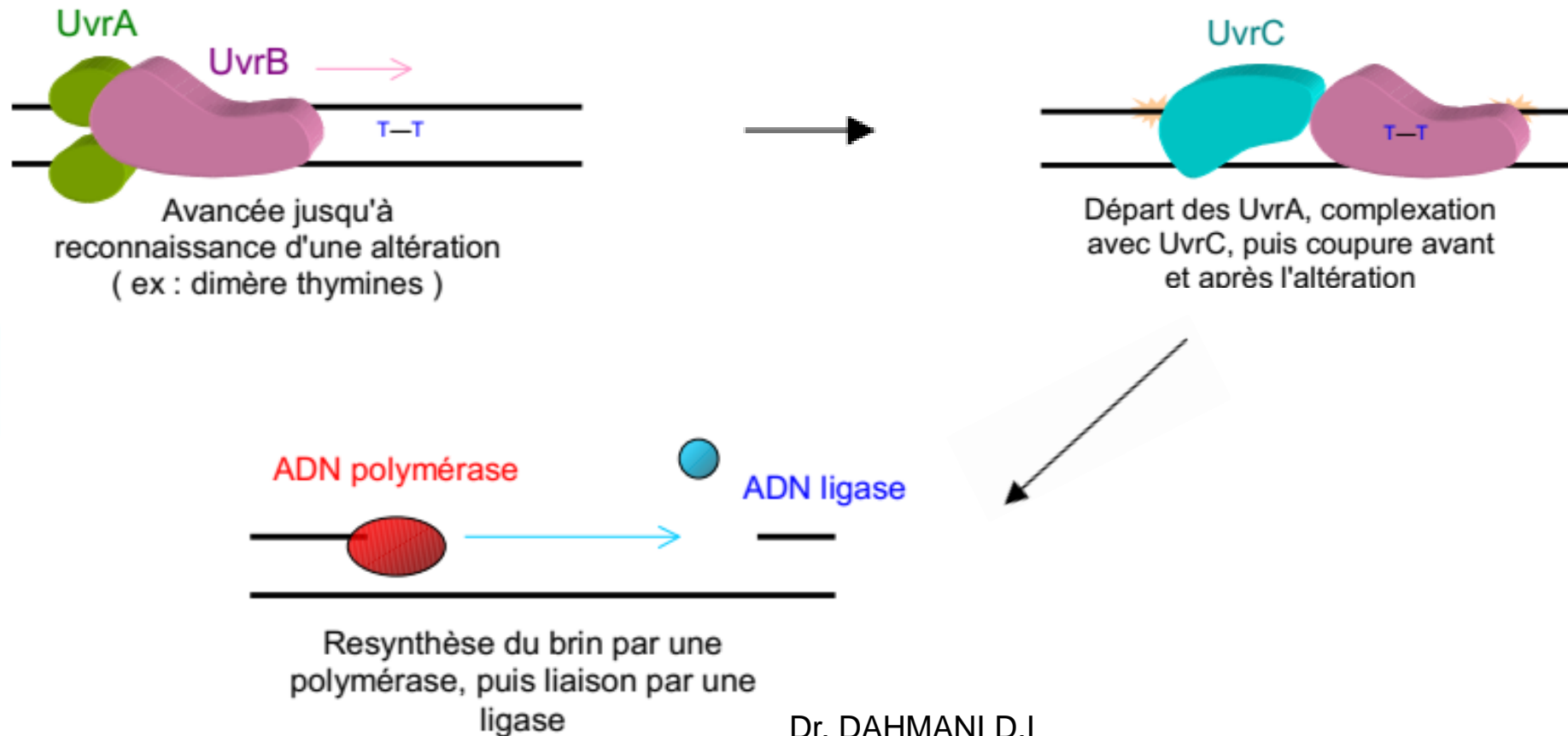
3. Réparation par excision de nucléotides (système NER) :

- Ce mécanisme est présent chez les procaryotes et les eucaryotes et permet la réparation de plusieurs nucléotides. Il prend également en compte une endonucléase 3'-5', l'ADN-polymérase I et l'ADN-ligase.
- Le système NER correspond au mécanisme de réparation par les UV (Uvr). Le complexe Uvr A, B, C, D reconnaît les distorsions de l'ADN.

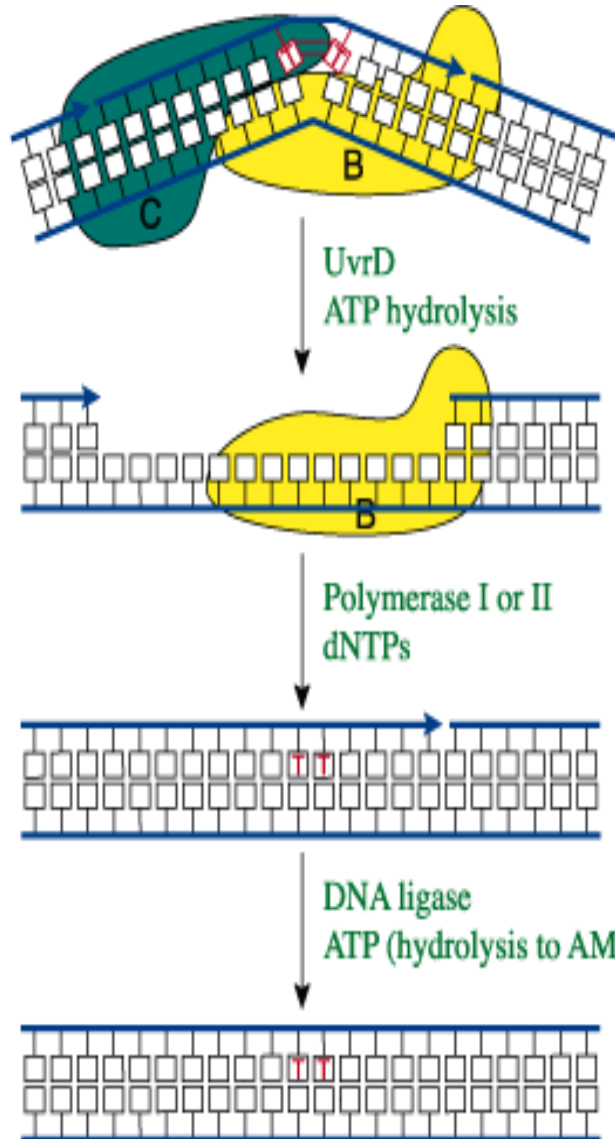
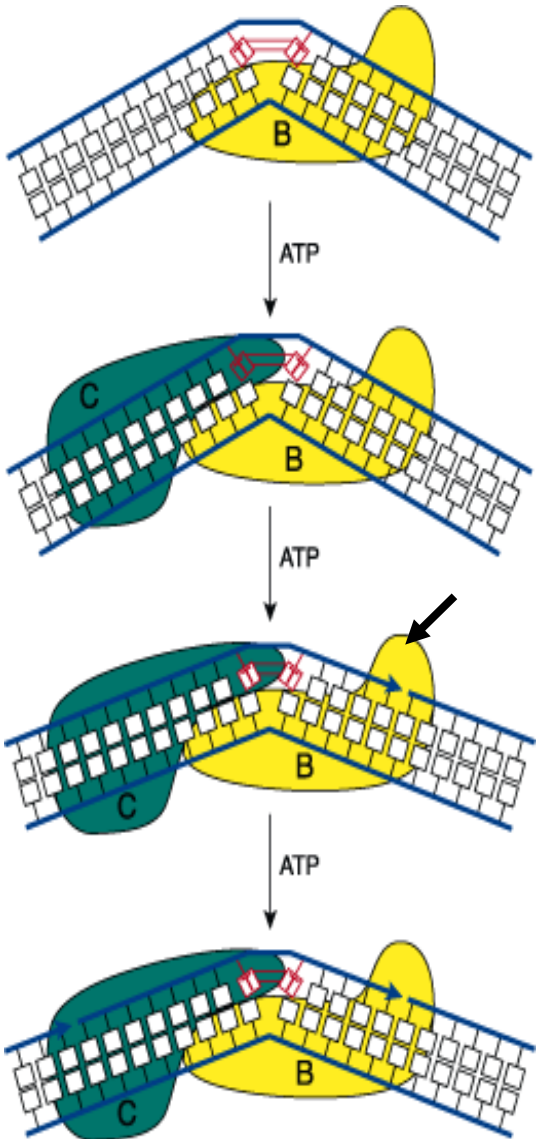
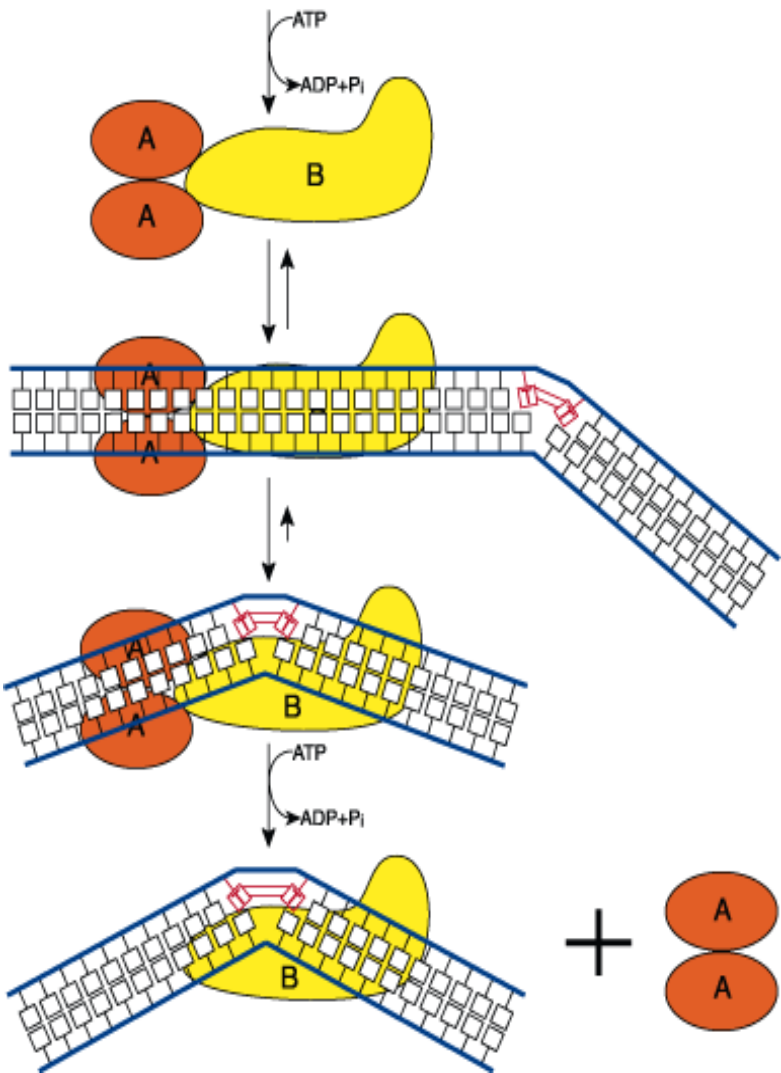
3) Excision-réparation du nucléotide (système NER) (SUITE):

- Bien que l'excision-réparation de base joue un rôle important dans la réparation de l'ADN, ce mécanisme n'est pas suffisant, notamment parce que les N glycosylases ne sont pas capables de réparer certaines erreurs.

• L'excision-réparation du nucléotide est un mécanisme plus flexible.



Modèle E.Coli

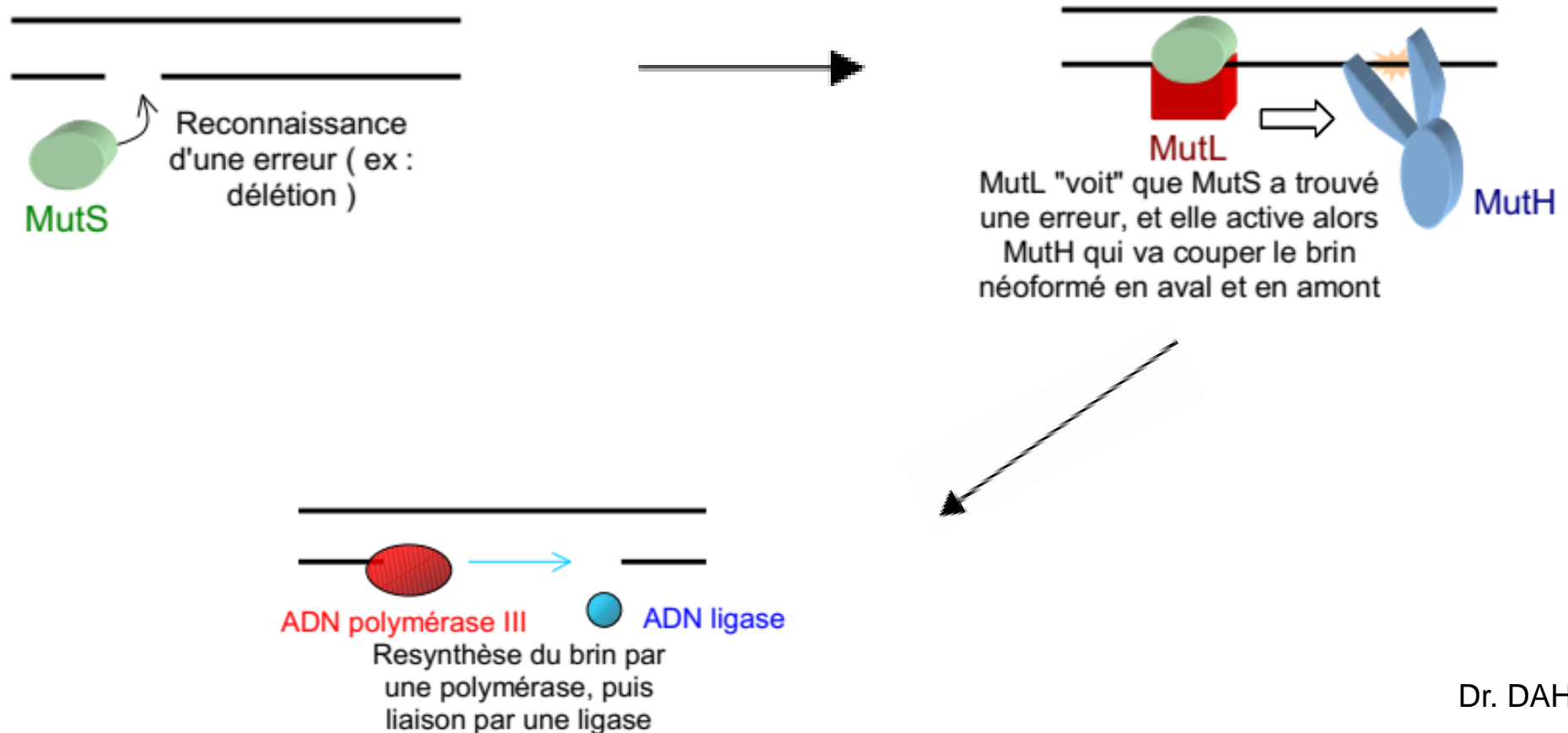


Dr. DAHMANI D.I

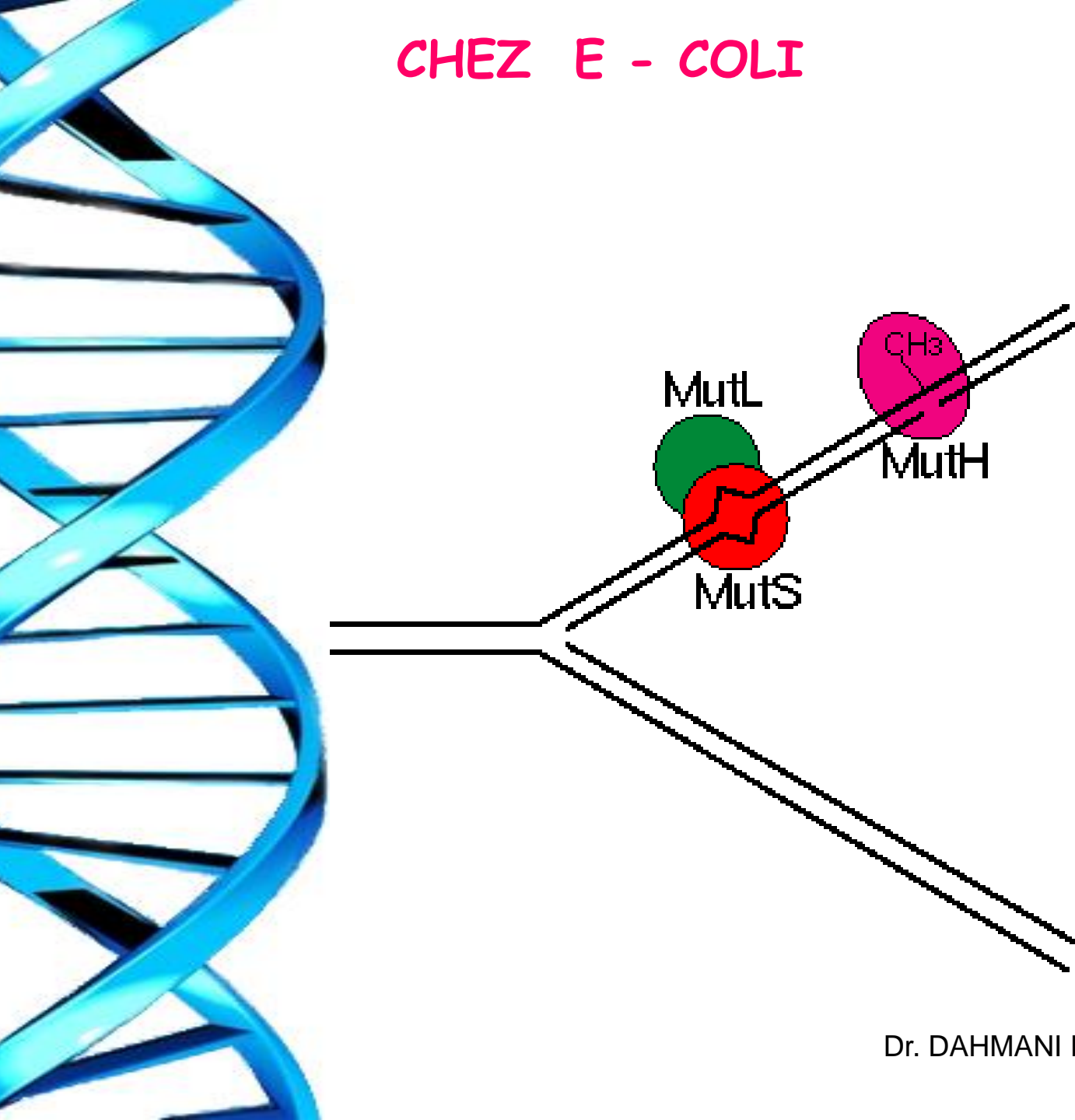
II-Mécanismes de réparation liés à la période de réplication

1) Correction des erreurs d'appariement

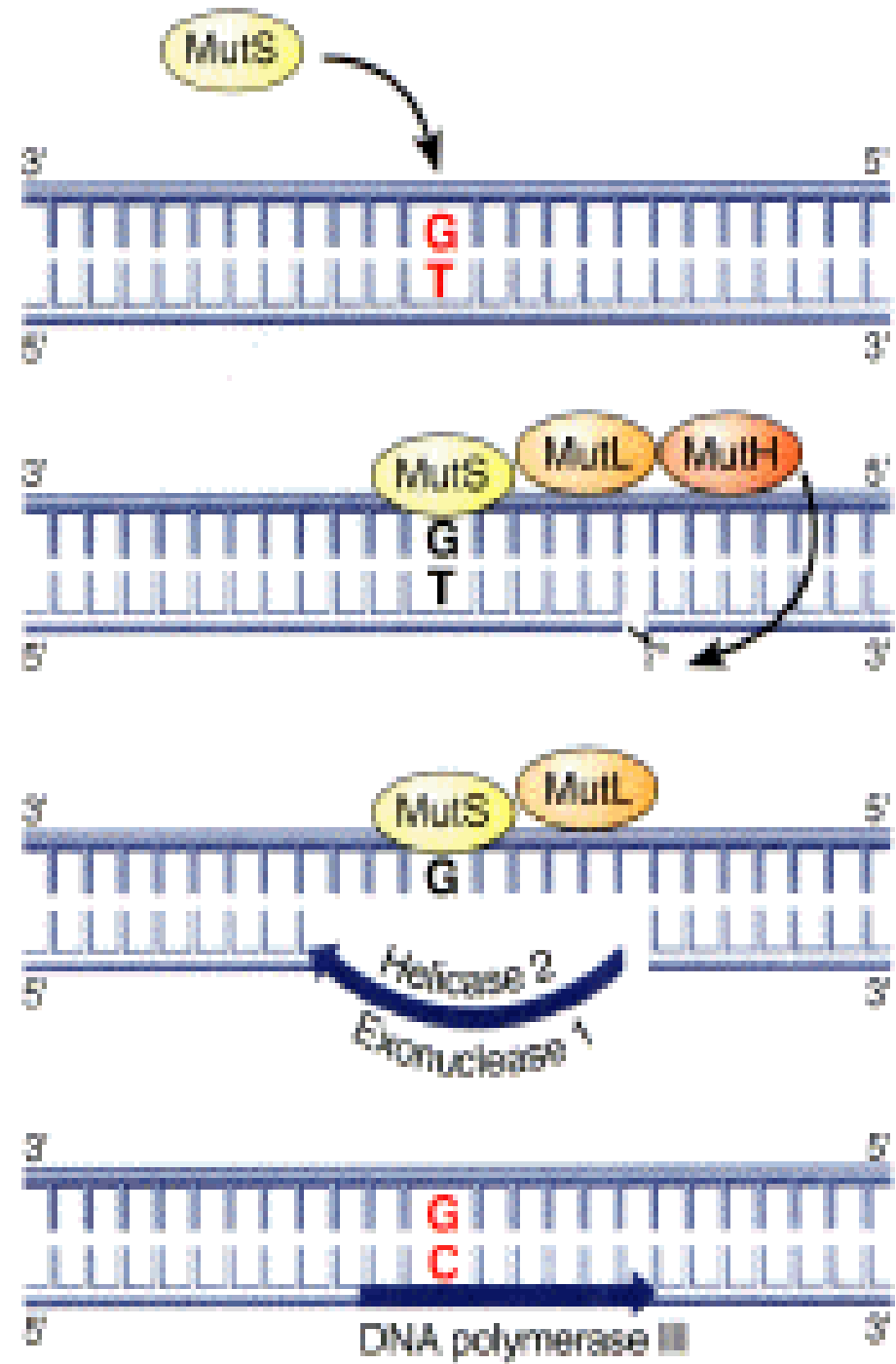
La plupart des mésappariements dans l'ADN surviennent après la réplication de l'ADN, mais ils peuvent aussi survenir après une désamination d'une cytosine méthylée



CHEZ E - COLI

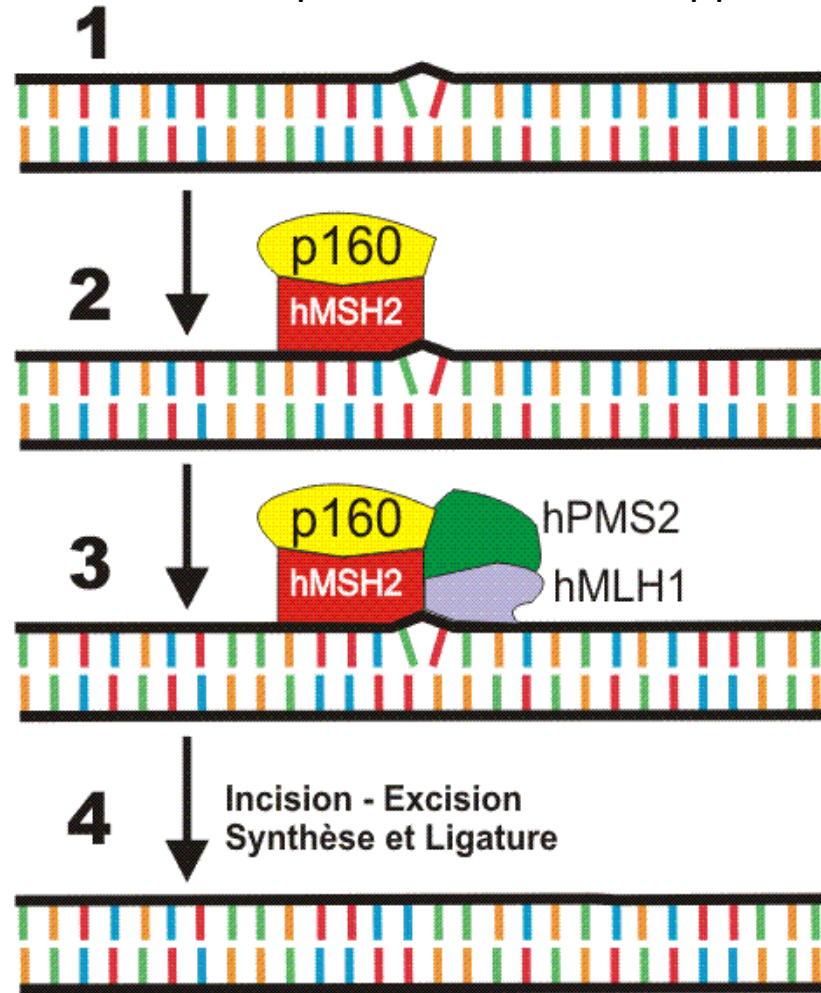


- Mut S reconnaît le mésappariement
- Fixation de Mut L qui stabilise
- Mut H repère un site méthylé proche de la mutation
- Excision puis réparation



2) Les gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*) :

Codent pour les enzymes de réparation des mésappariements de l'ADN. Le schéma ci-dessous explique la réparation de l'ADN après erreur de mésappariement.



En [1], on note deux mésappariements.

En [2], les protéines repèrent le site et se fixent sur ce site.

En [3], d'autres protéines de réparation se fixent sur le site

En [4], une incision – excision, une nouvelle synthèse et une ligature permettent la restitution ad integrum.

III- Mécanismes de réparation après à la période de réplication

1) Réparation des lésions simultanée des deux brins:

Parfois la situation est critique

- le brin parental contient un dimère de thymine.
- Le brin fils contient une lacune.

L'information sur un court fragment d'ADN est totalement perdue pour chacun des deux brins.

Cette situation est plus souvent rencontrée après réplication, lors d'une anomalie répllicative majeur qui va conduire le système de réparation avec les enzymes d'excision-resynthèse à être débordé.

Elle se produira alors une brèche appelée « lacune post-répllicative »

Elle se rencontre aussi en dehors de la réplication, après dommages induits par des radiations ionisantes ou des agents oxydants.

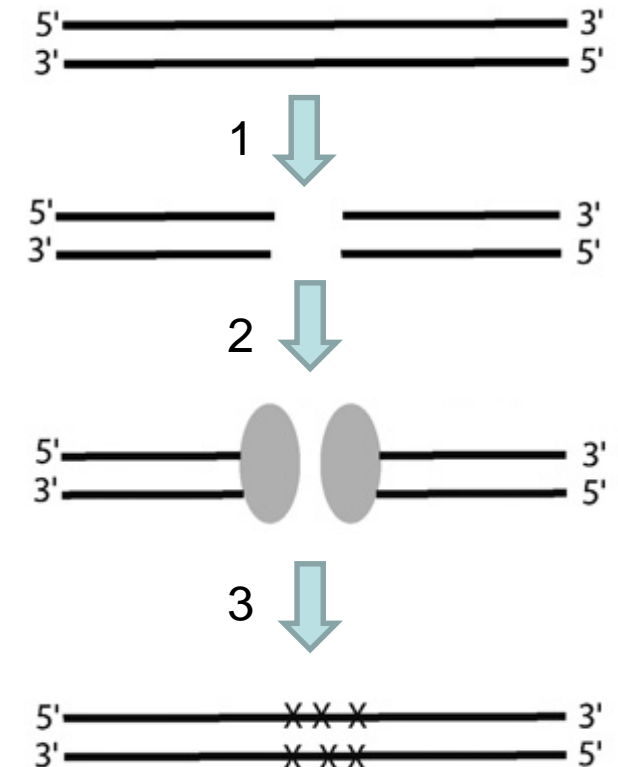
A-Réparation par la liaison non homologue des extrémités

Mécanisme :

1) l'existence d'une brèche sur les deux brins d'ADN peut être réparée a minima par une simple ligation.


2) Fixation de protéines spécifiques permettant de limiter la dégradation des nucléotides puis fixation de protéines permettant le pontage des extrémités.

3) Ligature des extrémités par des ligases après alignement des séquences (cette réparation ne restitue pas la séquence parentale ad integrum « réparation intégrale »)



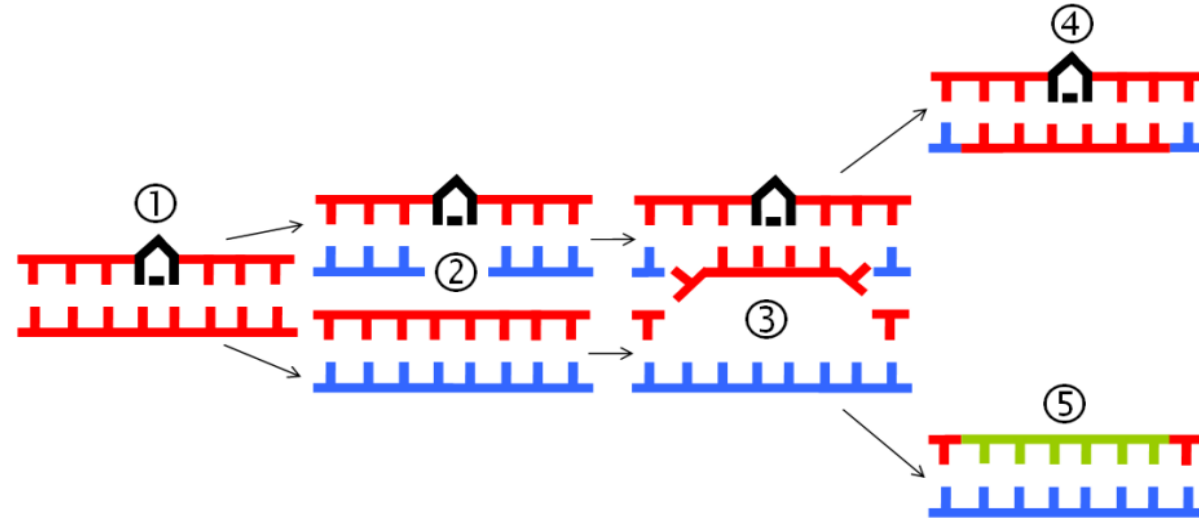
→ Ce mécanisme est assez fréquent chez les eucaryotes supérieur car le risque de changement du phénotype après une telle réparation est minime.

B- Réparation par recombinaison de molécules filles (homologue):

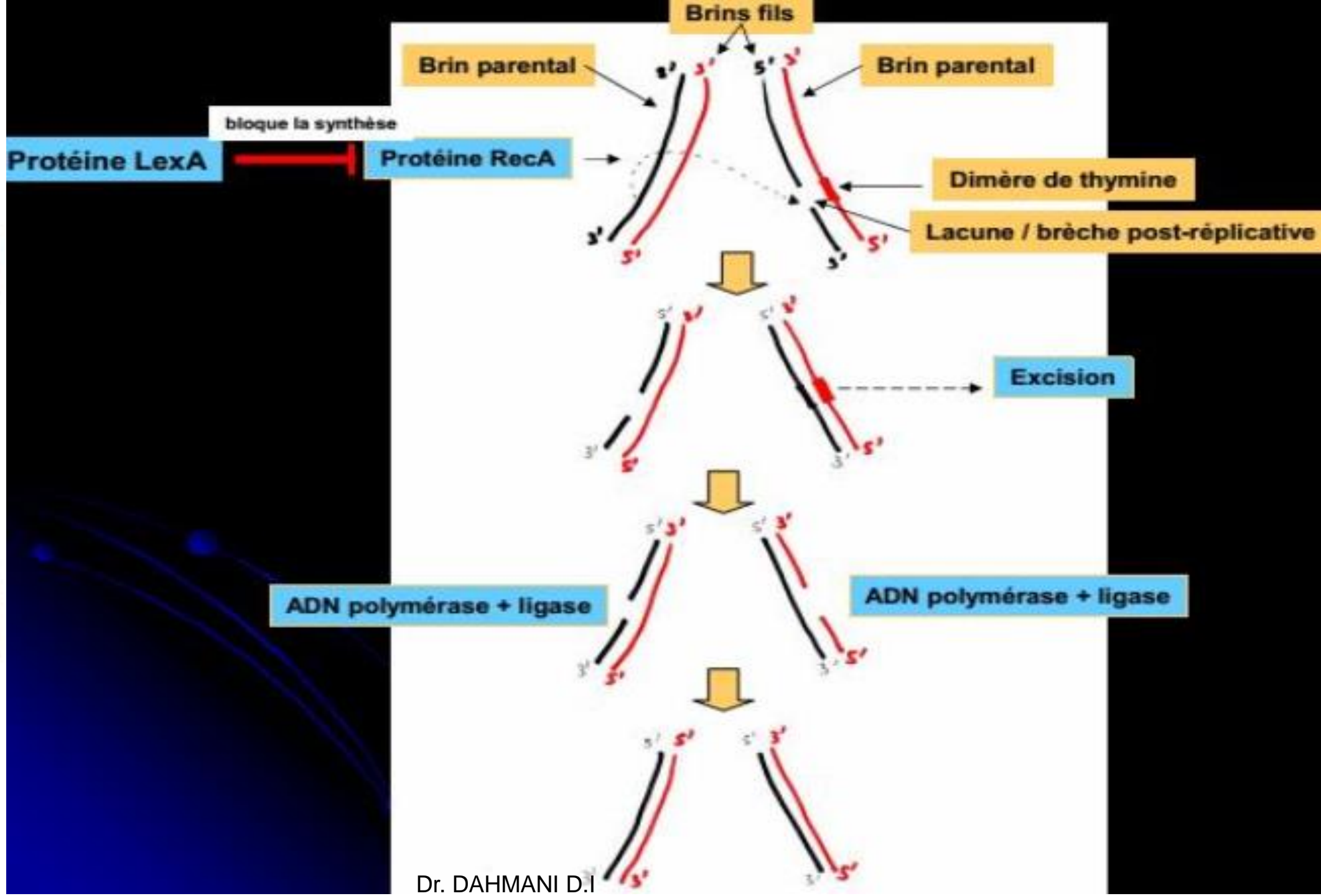
- 
- Ce mécanisme est surtout décrit chez les procaryotes, mais existe aussi chez les eucaryote.
 - Plus compliqué dans son mécanisme il permet la restitution ad intergrum« réparation intégrale » de la séquence malgré la perte de l'information sur les deux brins :
 - **De l'existence d'une deuxième molécule d'ADN identique lors de la réplication**
 - **En dehors d'elle, de l'existence d'un deuxième chromosome contenant une molécule d'ADN intact et identique à la séquence manquante, pour réparer l'altération.**

B- Réparation par recombinaison de molécules filles (homologue):

Si un œil de réplication contient des altérations (par exemple un dimère de thymine sur le brin parental (1)), il y a normalement **blocage de la replication**. Ce qui induit une **lacune post-réplivative** sur le brin fils 1 (2). Cette lacune est **remplie** par la séquence **du brin parental opposé identique** à ce brin fils, qui **est prélevée par la protéine REC A** (3). Cela va **fournir la séquence correcte** et créer une **deuxième lacune sur le brin parental opposé**. Puis le dimère est **excisé par des enzymes d'excision**(4)



- ✓ **Les deux lacunes** (à la place du dimère de thymines et sur le brin parental opposé) **sont ensuite corrigées grâce à l'ADN polymérase** qui synthétise la **séquence complémentaire et antiparallèle** de chaque brin parental.
- ✓ **La bactérie possède près de 1 millier de protéines REC A, qui sont normalement présentes en quantité suffisante pour effectuer les recombinaisons.**



IV- Le système SOS chez E-coli

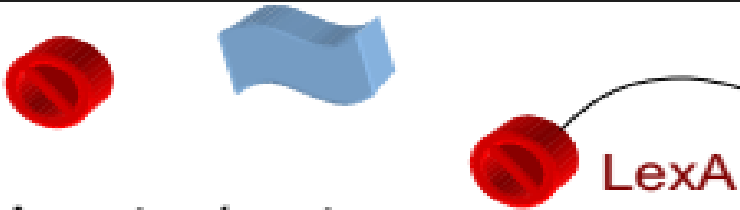
Le système SOS regroupe **un ensemble de gènes (env. 30)** qui est impliqué dans **la réplication de l'ADN**, dans **la réparation de l'ADN** et dans **la division cellulaire** et dont l'expression est contrôlée par une altération de l'ADN.

- ***Si les dommages dans l'ADN sont trop importants*** : le système SOS se met en place. C'est le dernier système pour tenter de réparer les dommages de l'ADN. C'est un système de réparation par recombinaison homologue, sauf qu'il est inductible.
- ***Lorsque les systèmes de recombinaisons sont débordés***, **la réplication est stoppée. Le système SOS se met en place.** Il active la deuxième **fonction de la protéine REC A** : son **activité protéolytique** (=dégradation de protéines).
- Cette activité aboutit à **la dégradation de son propre répresseur LEX A**. Il y a alors **synthèse de protéines REC A** et **d'une vingtaine d'autres protéines issues des gènes SOS**. Cela permet de **stimuler le système de recombinaison homologue**.
- ***Remarque*** : Contrairement aux autres systèmes de réparation, le système SOS est **inductif** : il s'adapte, alors que les réparations par excision réparation sont **constitutives**.

ADN peu endommagé

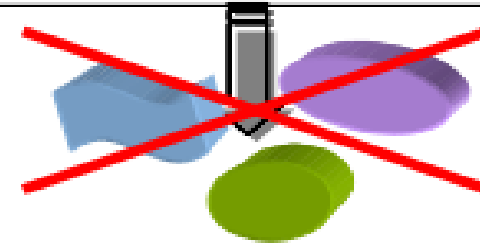


RecA

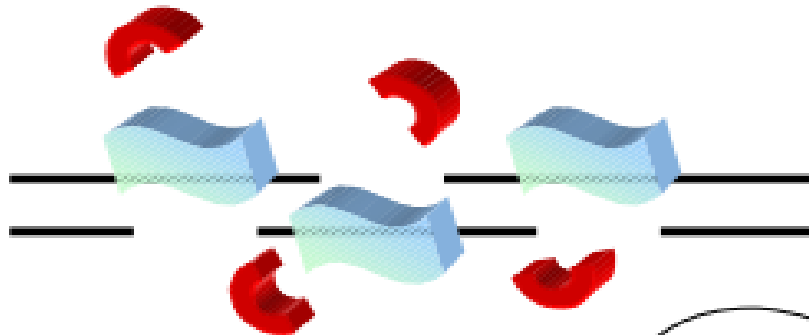


Les LexA sont présentes en concentrations normales

Répression des gènes codant pour des protéines de réparation.

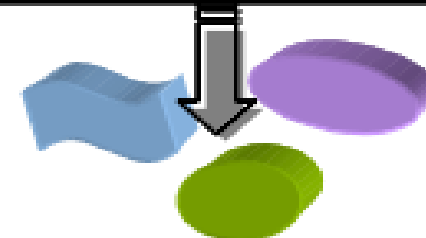


ADN très endommagé



Les RecA associés à l'ADN simple brin lysent les LexA

Expression des gènes codant pour des protéines de réparation.





Mécanismes de réparation chez les eucaryotes

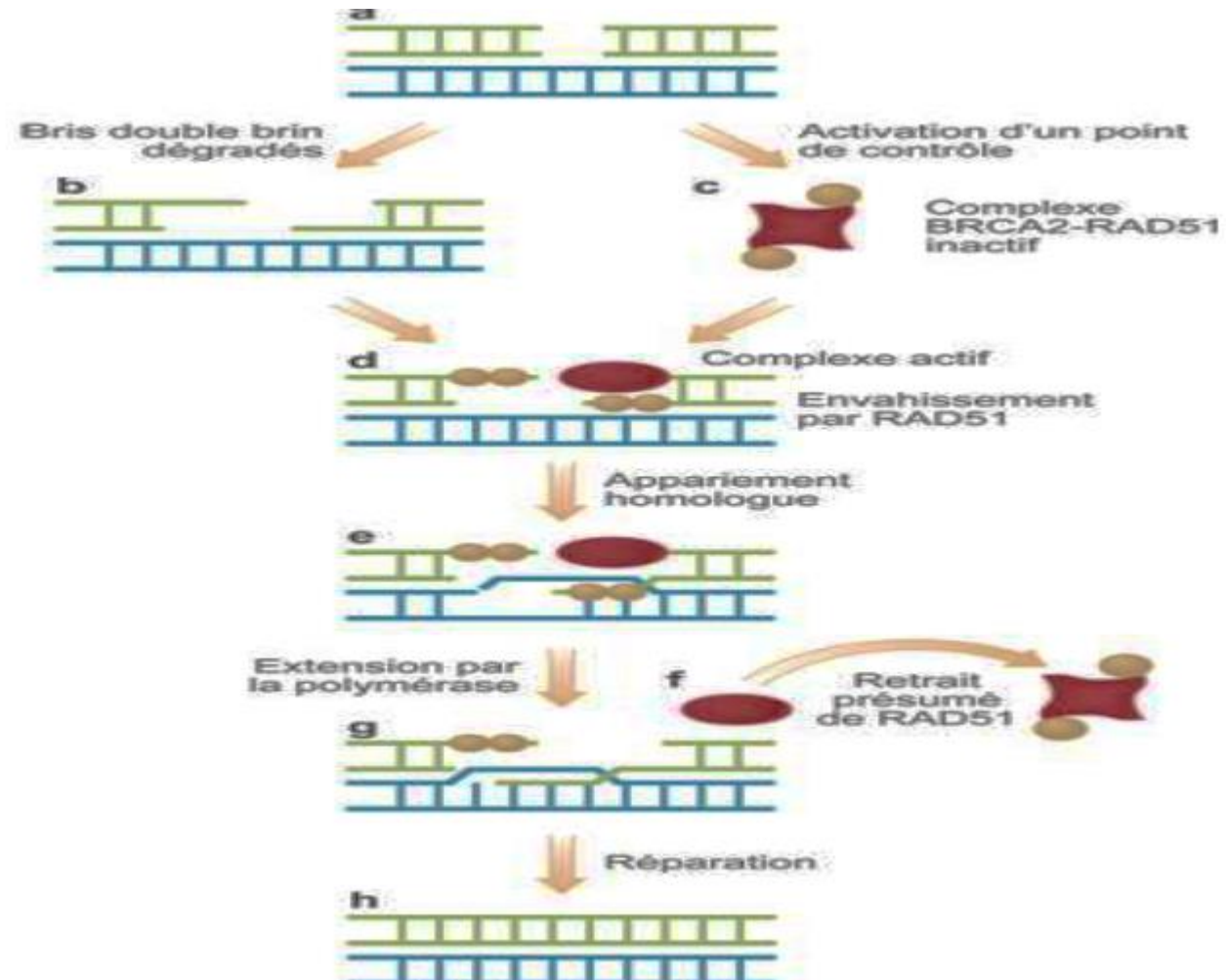
Dr. DAHMANI D.I

Mécanismes de réparation eucaryote

- Les mécanismes de réparation ont été hautement conservés au cours de l'évolution : le mécanisme de réparation eucaryote a des analogies avec E-Coli.
- Chez l'Homme on identifie des gènes impliqués dans différents types de la réparation : réversion directe du dommage, le système BER, le système NER, la réparation des mésappariements, la réparation par recombinaison.
- Chez les eucaryotes il n'y a pas d'équivalent du système SOS avec augmentation importantes de l'expression des protéines impliquées dans la réparation ; mais plutôt relocalisation et concentration des protéines de réparation dans des complexes sub-nucléaires.
- Attention le système d'opéron n'existe pas chez les eucaryotes, le génome étant trop compliqué, et ainsi il n'y a donc pas de système de réparation de type SOS (donc pas de protéine de type Rec A).

Chez l'Homme :

Le système est équivalent mais il fait intervenir chez l'Homme la **protéine RAD 51** (homologue eucaryote de REC A), associée aux protéines **BRCA1 et BRCA2**





QUESTION

ANSWER

A composite image with a light blue background. On the left, a hand in a blue nitrile glove holds a test tube. In the center, a white test tube rack holds several test tubes, one of which contains a red liquid. On the right, a 3D model of a DNA double helix is shown, with red and blue spheres representing the base pairs and sugar-phosphate backbone. The text "Merci de votre attention" is overlaid in the center in a bold, red, sans-serif font.

Merci de votre attention