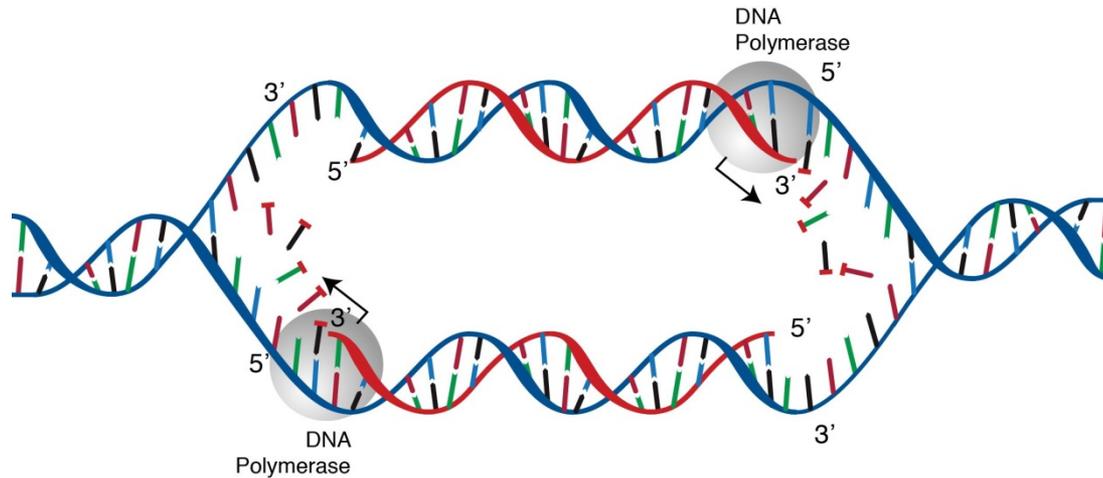
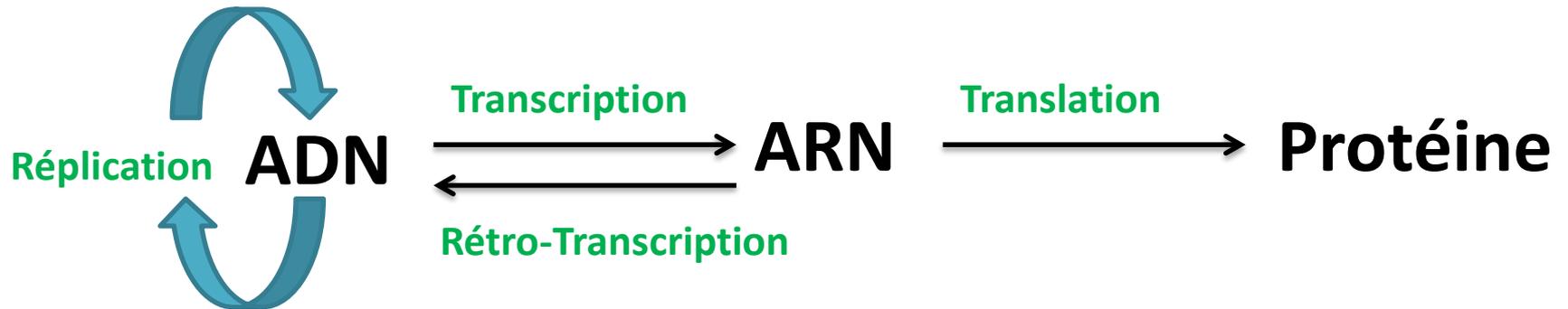


La Réplication

Chapitre II



Le «Dogme Central Simplifié» de la Biologie Moléculaire



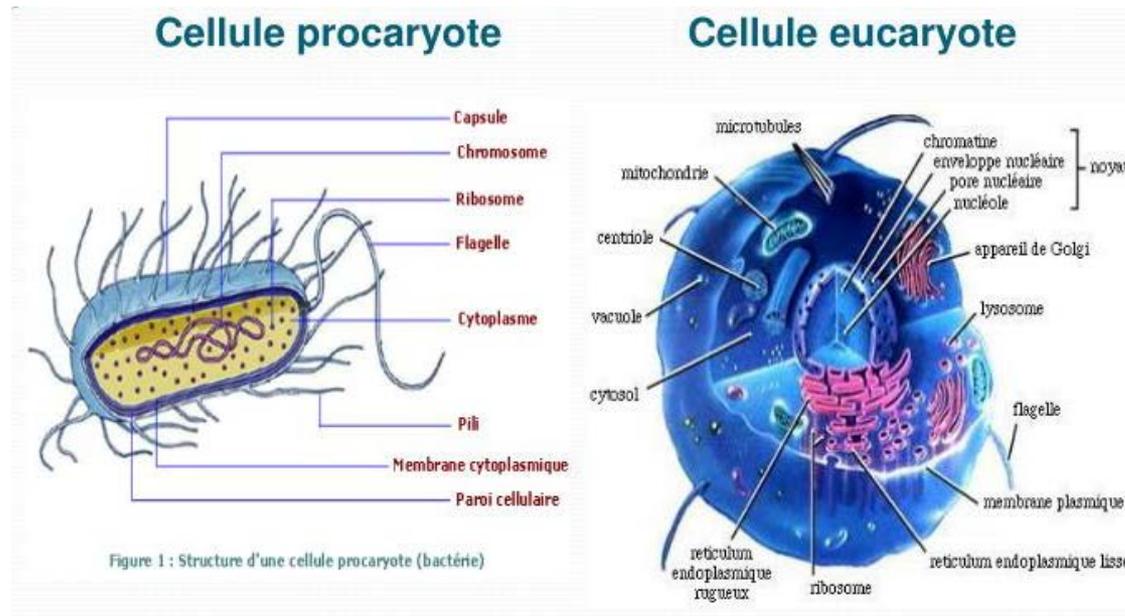
Objectifs du cours

- Comprendre la réplication chez les procaryotes et les eucaryotes
- Comprendre et décrire les étapes clés de la réplication de l'ADN
- Comprendre la structure et la fonction des ADN polymérases et des Télomérases
- Comprendre la structure des Télomères des eucaryotes
- Comprendre la réplication chez les rétrovirus
- Décrire une technique conventionnelle d'amplification du matériel génétique (ADN) au Laboratoire.

Procaryotes *versus* Eucaryotes

Procaryote	Eucaryote
Pas de Noyau	Existence d'un Noyau
Division cellulaire par scissiparité	Division cellulaire par mitose ou méiose
Pas d'organites intracellulaires	Plusieurs organites intracellulaires
Pas de cytosquelette	Cytosquelette (actines et microtubules, etc...)

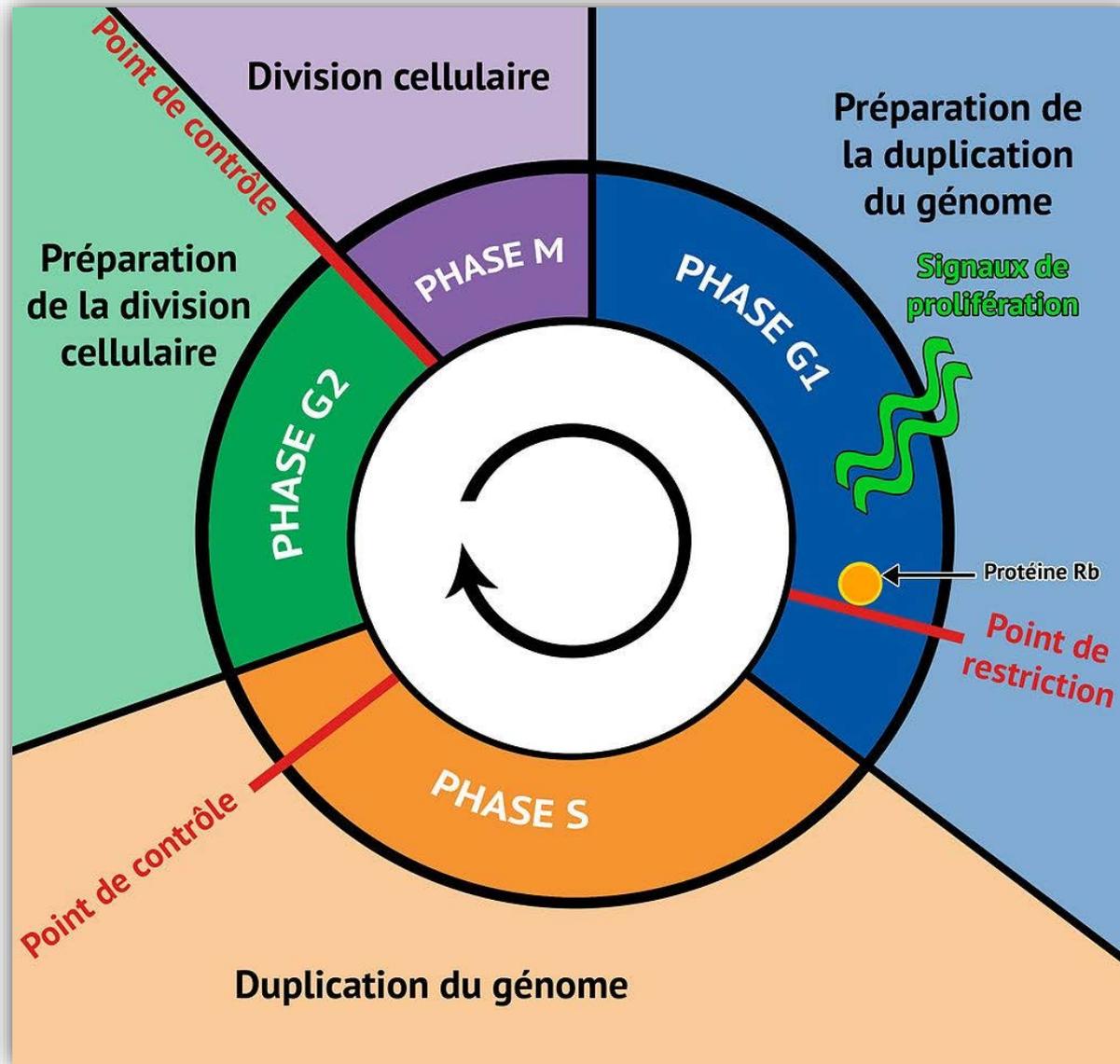
Procaryotes vs. Eucaryotes: En Image



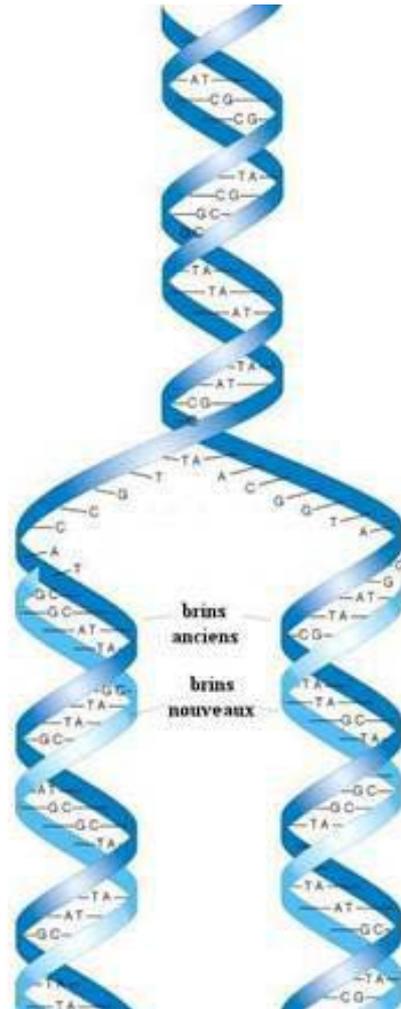
Définition

- Reproduction ou synthèse de l'ADN à l'identique au cours du cycle cellulaire
- Le dédoublement de l'ADN lors de la division cellulaire permet à chaque cellule fille de recevoir un génome complet dans son noyau (donc aucune information n'est perdue)
- La réplication se produit à la **phase S** (milieu du cycle cellulaire: entre G1 et G2) grâce à l'action d'enzymes appelés ADN polymérases.
- Polymérisation: synthèse de brin d'acides nucléiques
- La réplication doit respecter deux règles:
 - La totalité du génome doit être reproduit à chaque division cellulaire
 - Chaque molécule d'ADN n'est répliquée qu'une seule fois par cycle cellulaire

Cycle Cellulaire Simplifié

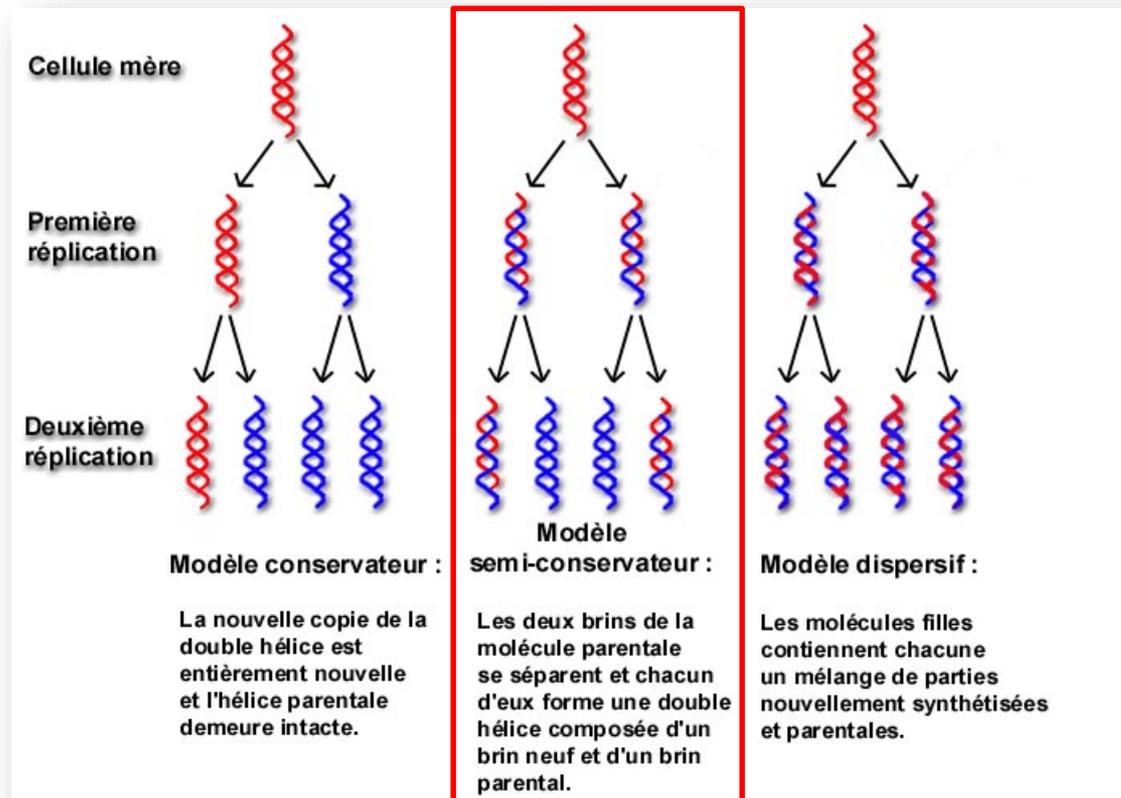


Réplication en Image



Les deux brins de la double hélice parentale se séparent et chacun spécifie un nouveau brin en suivant la règle de la complémentarité des bases: A-T ou C-G

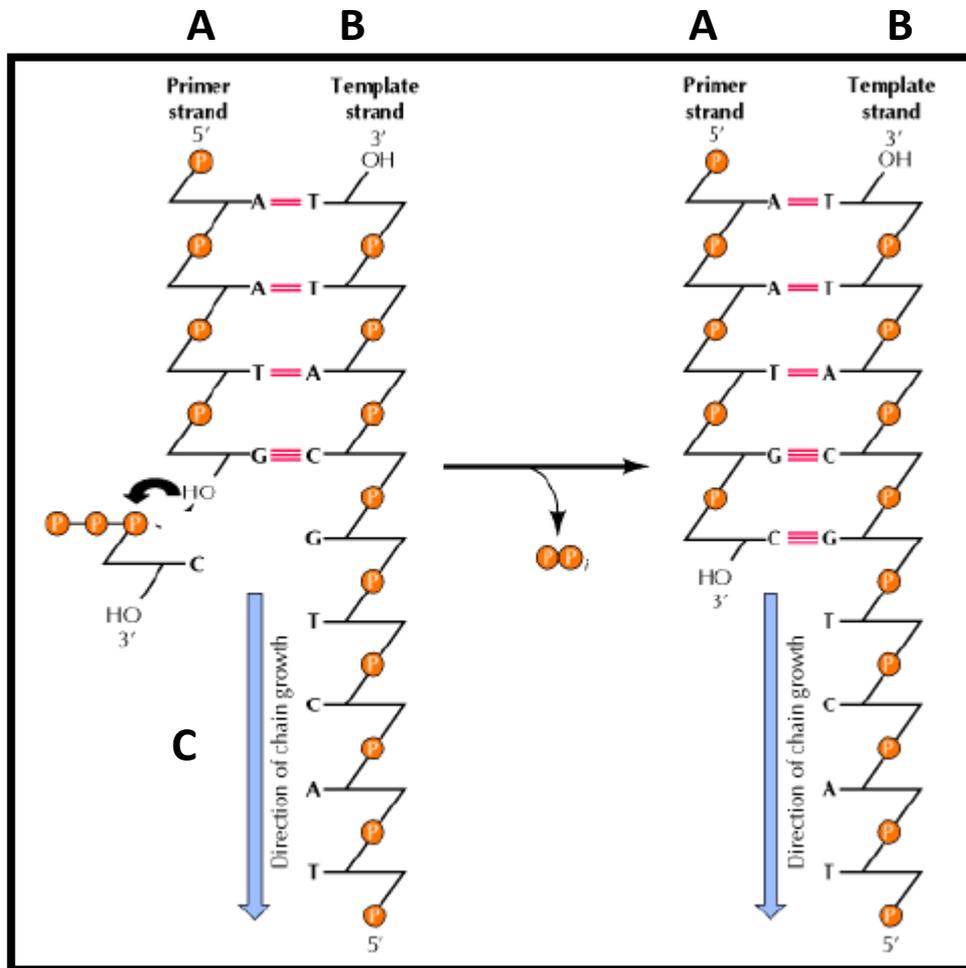
La réplication est semi-conservative



Historique: Démontrée 1958 par Meselson et Stahl:

- Les deux brins parentaux servent de modèle pour la synthèse du nouveau brin
- Les deux brins néoformés se séparent à chaque cycle
- A la première réplication: un brin de chaque double hélice provient de la cellule mère (50%)
- A la deuxième réplication: on a deux brins d'ADN de la cellule mère sur les 4 double hélices (50%)

Synthèse d'un nouveau brin d'ADN



Légende:

A: amorce

B: matrice d'ADN

C: Direction de l'élongation

- Synthèse de la nouvelle copie de l'ADN est faite dans le **sens 5' vers 3'**
 - Les dNTPs sont ajoutés à l'extrémité 3'OH du dernier nucléotide de l'amorce
 - Le choix parmi les 4 dNTPs (dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs) est basé sur la complémentarité avec les bases du brin matriciel
- La lecture du brin matriciel se fait selon une directionnalité 3' vers 5' (antiparallèle à la synthèse du nouveau brin)
- Hybridation correcte de l'amorce à la matrice d'ADN est une étape nécessaire
amorcer: commencer
- Formation de liaison phosphodiester entre le dNTP et l'amorce en voie d'élongation
- Formation de pyrophosphates (PPi) qui résultent de l'hydrolyse de la fonction triphosphate.

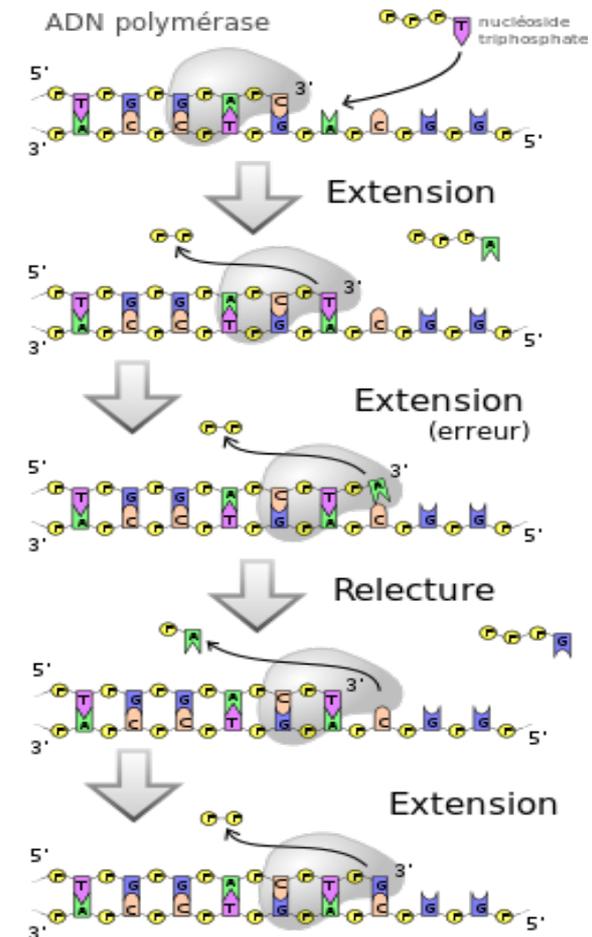
Les ADN polymérase

- Enzymes responsables de la polymérisation des nucléotides lors de la réplication de l'ADN: sont des **catalyseurs de la synthèses de l'ADN**
- **ADN-dépendantes**: leur fonction dépend de la présence d'une matrice d'ADN pour synthétiser un nouveau brin (ne peuvent pas effectuer une synthèse *de novo*)
- Leur activités dépendent de la présence:
 - Une matrice d'ADN
 - Une amorce (petit fragment d'ADN) avec une extrémité 3'OH libre
 - Des substrats (Desoxyribonucléotides 5' triphosphates: dNTPs)
 - Des ions magnésiums (Mg^{2+}) pour stabiliser le complexe ADN-protéines
- Les types d'ADN polymérase:
 - Procaryotes: 3 types d'ADN polymérase: ADN Pol I, II et III
 - Eucaryotes: 5 types d'ADN polymérase: ADN Pol α , β , δ , ϵ et γ

Les activités des ADN polymérases

Les ADN polymérases ont deux activités principales lors de la réplication de l'ADN:

- 1. Activité polymérasique 5' vers 3' :**
synthèse/extension du nouveau brin d'ADN
- 2. Activité exo-nucléasique :** dégradation de l'une des extrémités du brin synthétisé
 - 2.1. Exonucléase 3' vers 5' :** Hydrolyse le 3' OH du dernier nucléotide du brin néoformé si celui-ci ne s'apparie pas correctement avec le nucléotide complémentaire du brin matriciel. Elle assure une fonction d'édition: ***Proofreading***
 - 2.2. Exonucléase 5' vers 3' :** Hydrolyse l'extrémité 5'OH lors de la jonction des segments d'ADN synthétisés sur le brin retardé



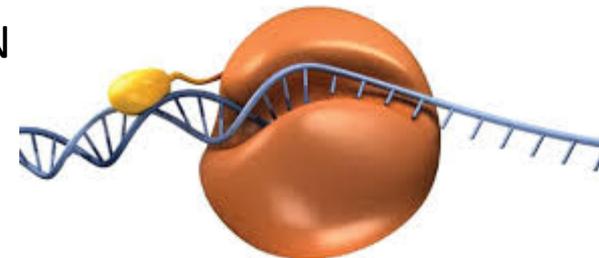
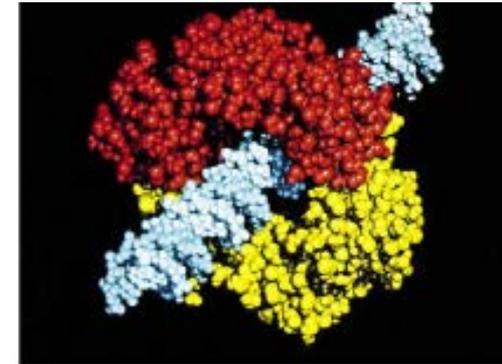
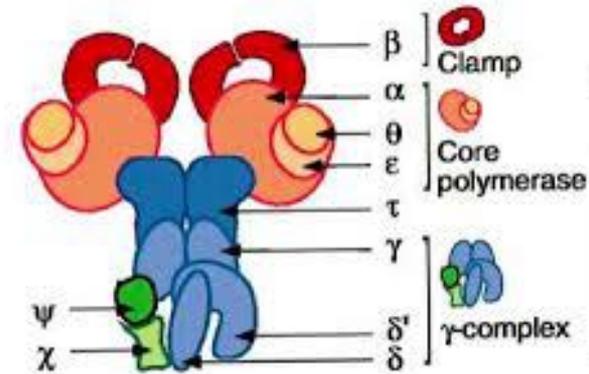
Les ADN polymérases des procaryotes

Les procaryotes ont 3 types de polymérases dont deux sont principalement utilisées lors de la réplication:

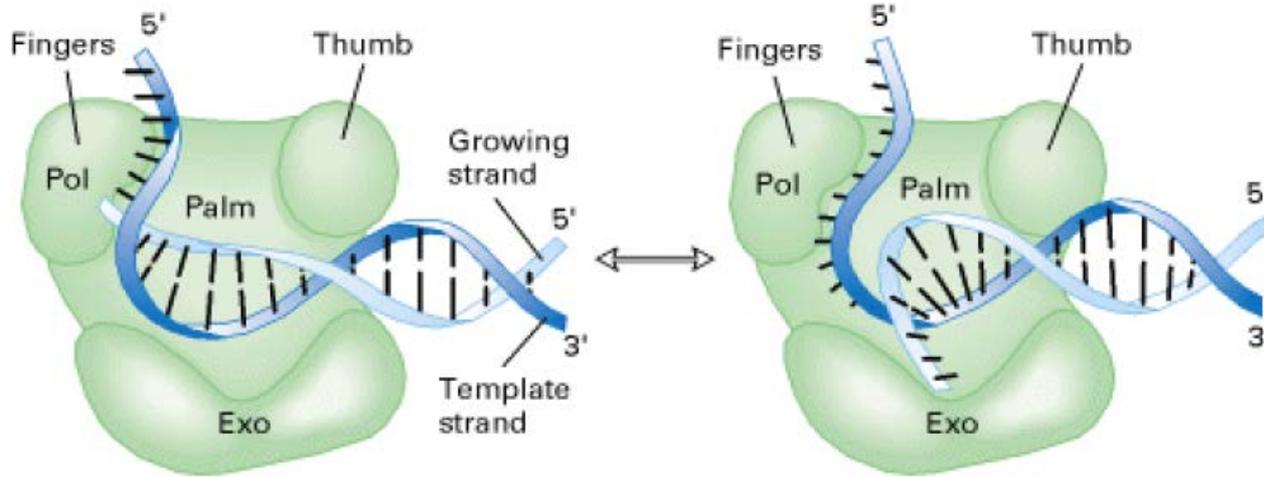
- **Les ADN polymérases I (Pol I)**: Elles sont nombreuses ~ 400 molécules/cellule. Pol I est impliquée dans la réparation et la réplication de l'ADN. Pol I n'est pas assez processive (10-20 nt/événement) et elle se dissocie de l'ADN matriciel après ajout de ~ 20 nucléotides. Elle possède:
 - *une activité polymérasique 5'-3'*: responsable de la synthèse de fragments courts d'ADN pour combler les brèches laissées par Pol III lors de la réplication .
 - *une activité exonucléasique 5'-3'*: pour la dégradation des amorces d'ARN
 - *une activité exonucléasique 3'-5'*: pour la relecture lors de la réparation
- **Les ADN polymérases III (Pol III)**: Sont des complexes de protéines (multimères) responsables de la synthèse de fragments longs d'ADN lors de la réplication. Pol III a une vitesse de synthèse rapide (~ 1000 nt insérées/s). La molécule est aussi très processive (105 nt/événement). **C'est la polymérase majeure des bactéries**. Elle possède:
 - *une activité polymérasique 5'-3'*
 - *une activité exonucléasique 3'-5'*

Structure de Pol III

- Pol III est une **holoenzyme** formée de 3 sous unités:
 - La sous unité α (alpha): *activité polymérasique 5'-3'*
 - La sous unité ϵ (epsilon): *activité exonucléasique 3'-5'*
 - La sous unité θ (thêta): maintien la structure du complexe
- Pol III fait partie du **réplisome** qui est un multimère
 - Deux molécules de Pol III
 - Deux unités τ (tau): servent à doubler/dimériser Pol III
 - Un complexe γ (gamma)
 - . Une unité γ
 - . des sous-unités δ (delta) et δ' (delta prime)
 - . Une unité χ (Khi)
 - . Une unité ψ (Psi)
 - Deux unités β (beta): utilisées comme pince (clamp) à ADN



Mécanismes d'édition/proofreading par Pol III



Position catalytique

Absence d'erreur lors de l'incorporation du nucléotide sur le bout 3'

Position d'édition

Présence d'erreur lors de l'incorporation du nucléotide sur le bout 3'



- **Dégradation du nucléotide mal apparié** et la réplication continue

Exemple: Le taux d'erreur de Pol III chez E. Coli est de 1 bp pour chaque 10^7 nt ajoutés

Réplication: Les protéines majeures

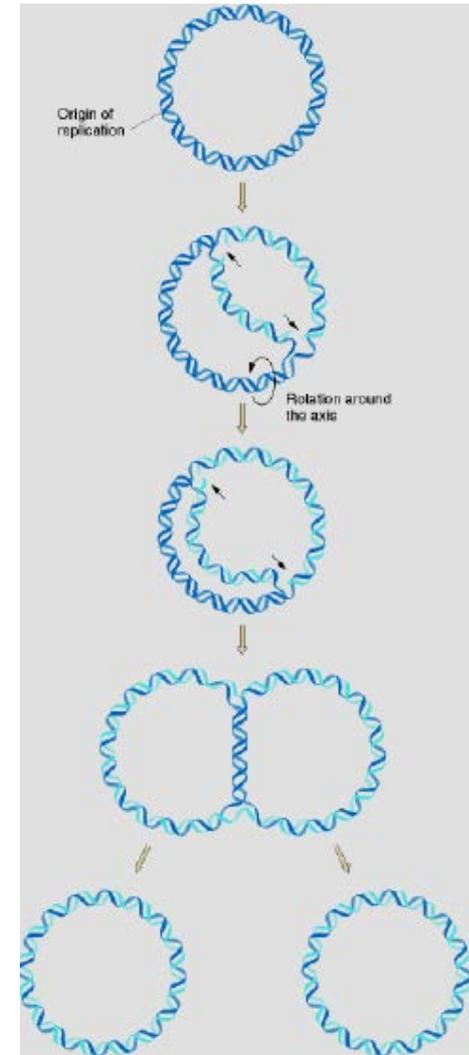
La réplication se fait en trois étapes majeures: Initiation, elongation, et terminaison

1. **Les Hélicases:** Déroulent la double hélice en cassant les liaisons hydrogènes entre les deux brins d'ADN en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP ou du GTP
2. **Les Protéines SSB** (single Strand Binding Protein): se fixent sur l'ADN simple brin pour l'empêcher de se réenrouler lors de la réplication
3. **La Primase:** ARN polymérase ADN-dépendante responsable de la synthèse de l'amorce d'ARN
4. **Les Topo-isomérases:** régulent la structure topologique de l'ADN en démêlant les nœuds (surenroulement) d'ADN
5. **Les ADN ligases:** reconstituent la liaison phosphodiester entre deux nucléotides juxtaposés sur un brin d'ADN. Elles lient les Fragments d'Okazaki synthétisés par Pol I lors de la réplication. Cette réaction a besoin d'une consommation d'ATP.

Les séquences de reconnaissance chez les procaryotes

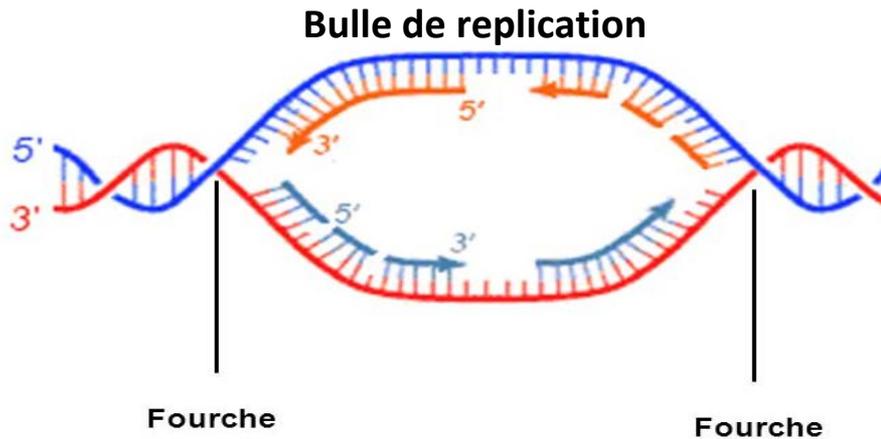
Origines et terminaisons chez E. Coli

- **Origine de réplication:** site d'initiation d'environ 240 bp. Elle est constituée de séquences répétées flanquées de séquences riche en A et T. La réplication commence à ce point dans les deux sens (**bidirectionnelle**) jusqu'à la fin.
- **Le Termineur:** site de terminaison. Il est plus long et est composé de séquences quasi identiques de 23bp
- **Protéines de reconnaissance:** reconnaissent les sites d'initiation et de terminaison.



Etapes de la réplication procaryotes (1)

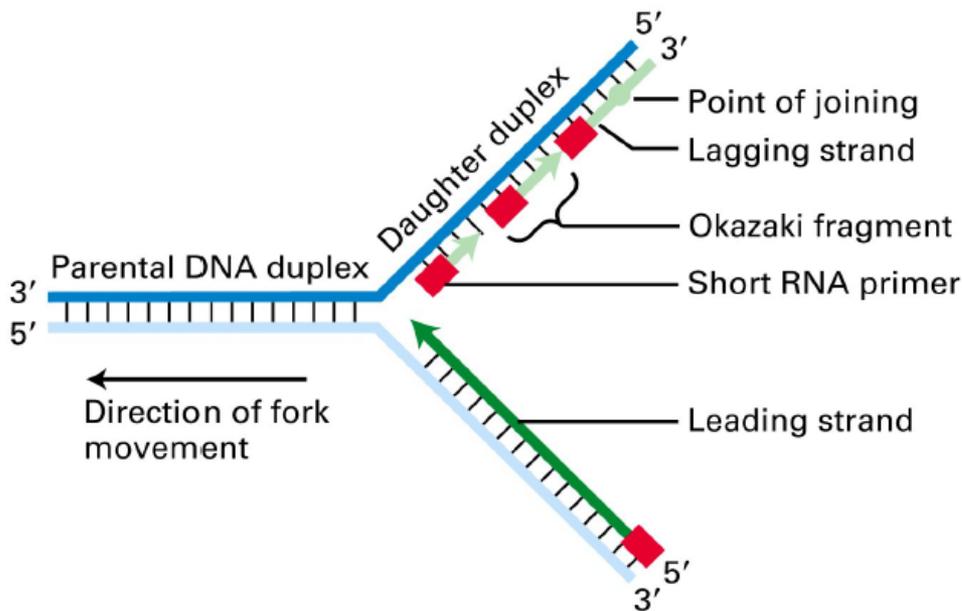
A. Initiation: Elle aboutie à l'ouverture de la double hélice et à la formation de la fourche de réplication



- Ouverture de la double hélice sur 40 bp suite à la reconnaissance de l'origine de réplication
- Les Topo-isomerases relâchent les contraintes topologiques qui surviennent lors de l'ouverture de la double hélice
- Formation d'une bulle/oeil de réplication et de deux fourches de réplication
- Une fourche de réplication est l'endroit où l'hélice est déroulée et où les nouveaux brins se développent. Il y a une fourche de réplication à chaque côté d'une bulle de réplication
- Séparation des deux brins par les helicases
- Stabilisation de chaque brin par les protéines SSB pour les empêcher de se ré-enrouler.

Etapes de la réplication procaryotes (2)

B.1. Extension du brin direct/précoce/continue (Leading Strand):



Parental DNA duplex: ADN matriciel

Daughter duplex: ADN fille

Point of joining: Point de jonction

Leading strand: brin direct/précoce/continue

Lagging strand: brin indirect/retardé/discontinue

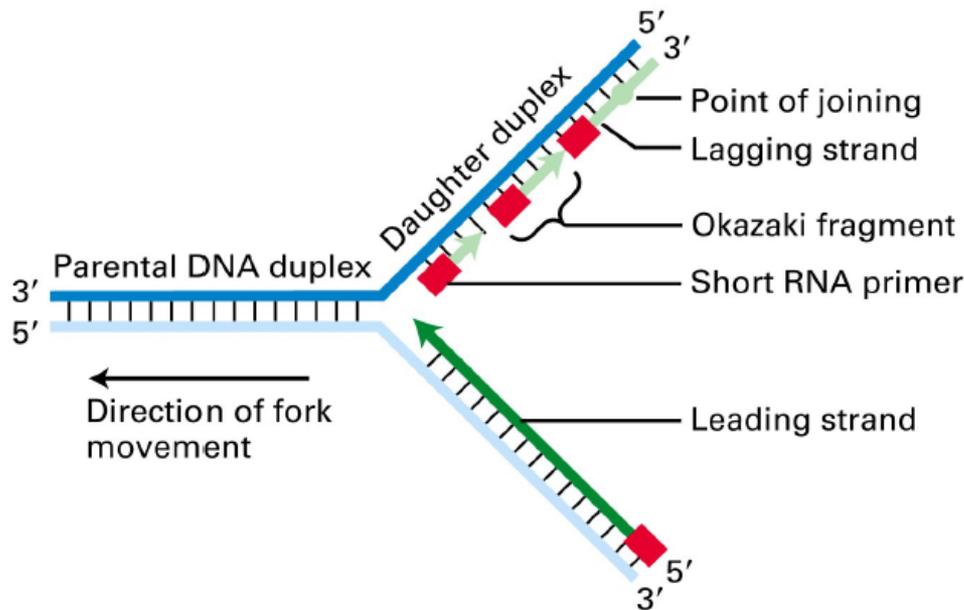
Short RNA primer: Amorce à ARN

Direction of fork movement: Direction du mouvement de la fourche

- Elle se fait dans **le sens** du déplacement de la fourche
- L'amorce à ARN (**rouge; 10-50nt**) est synthétisée et mise en place au niveau de l'origine de réplication par les Primases
- Pol III est responsable de l'élongation du brin précoce en ajoutant des dNTPs à l'extrémité 3'OH libre de l'amorce
- Formation d'une nouvelle double hélice entre le brin matriciel et le nouveau brin synthétisé.

Etapes de la réplication procaryotes (3)

B.2. Extension du brin indirect/retardé/discontinue (Lagging Strand):



Parental DNA duplex: ADN matriciel

Daughter duplex: ADN fille

Point of joining: Point de jonction

Leading strand: brin direct/précoce/continue

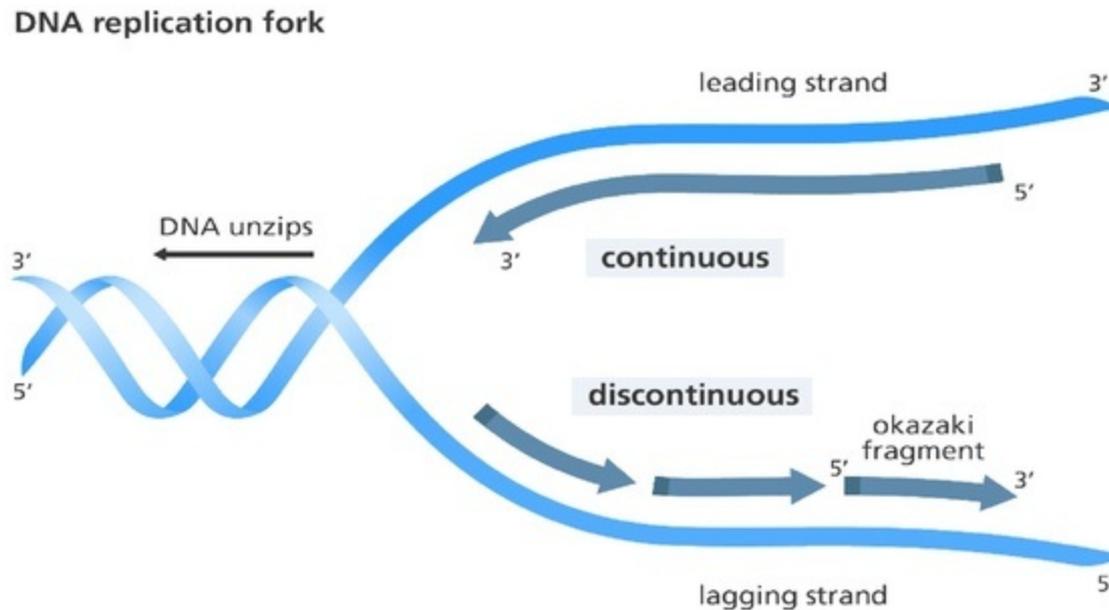
Lagging strand: brin indirect/retardé/discontinue

Short RNA primer: Amorce à ARN

Direction of fork movement: Direction du mouvement de la fourche

- Elle se fait dans le **sens inverse** du déplacement de la fourche
- La synthèse du brin retardé se fait de manière discontinue par petit fragments à chaque fois que le brin matriciel est détaché du brin précoce
- Ces fragments sont appelés **fragments d'Okazaki**. Pour former chaque segment il y a synthèse d'amorces ARN assez rapprochées sur le brin parental par les **Primases**
- Les amorces ARNs vont être détruites par les **RNAses** qui sont des enzymes qui ont une activité ribonucléasique
- Pol I intervient en comblant les brèches
- L'ADN **Ligase** va ensuite lier la liaison phosphodiester entre les bouts 5' du premier fragments et 3' du second fragment
- Formation d'une nouvelle double hélice.

Résumé de l'Extension en Image



DNA unzips: ADN déroulé/ouvert

Continuous: Continue

Discontinuous: Discontinue

Leading strand: brin direct/précoce/continue

Lagging strand: brin indirect/retardé/discontinue

Okazaki fragment: Fragment d'Okazaki

DNA replication fork: La fourche de replication de l'ADN



Etapes de la réplication procaryotes (4)

C. Terminaison

- Mécanismes n'est pas très bien connu
- Signal ou régions de terminaisons (***Ter***) au niveau de l'ADN
- Sont des sites de fixation de protéines tel que ***Tus***
- ***Tus*** reconnaît ces régions et met fin à la réplication.

Réplication chez les Eucaryotes

Mécanismes de réplication similaires à ceux des procaryotes... mais les eucaryotes utilisent les ADN polymérase différentes

Pol α : Primase ou ARN Pol. Elle synthétise les amorces ARN

Pol β : Réparation de l'ADN. Elle correspond au Pol I chez les bactéries

Pol δ : Réplication du brin précoce/direct/continue et des fragments d'Okazaki avec l'aide de Pol ϵ et du PCNA. C'est la **polymérase principale** des eucaryotes (correspond à Pol III)

Pol ϵ : Réplication et Réparation de l'ADN. Responsable de la synthèse des bouts d'ADN (Téломères)

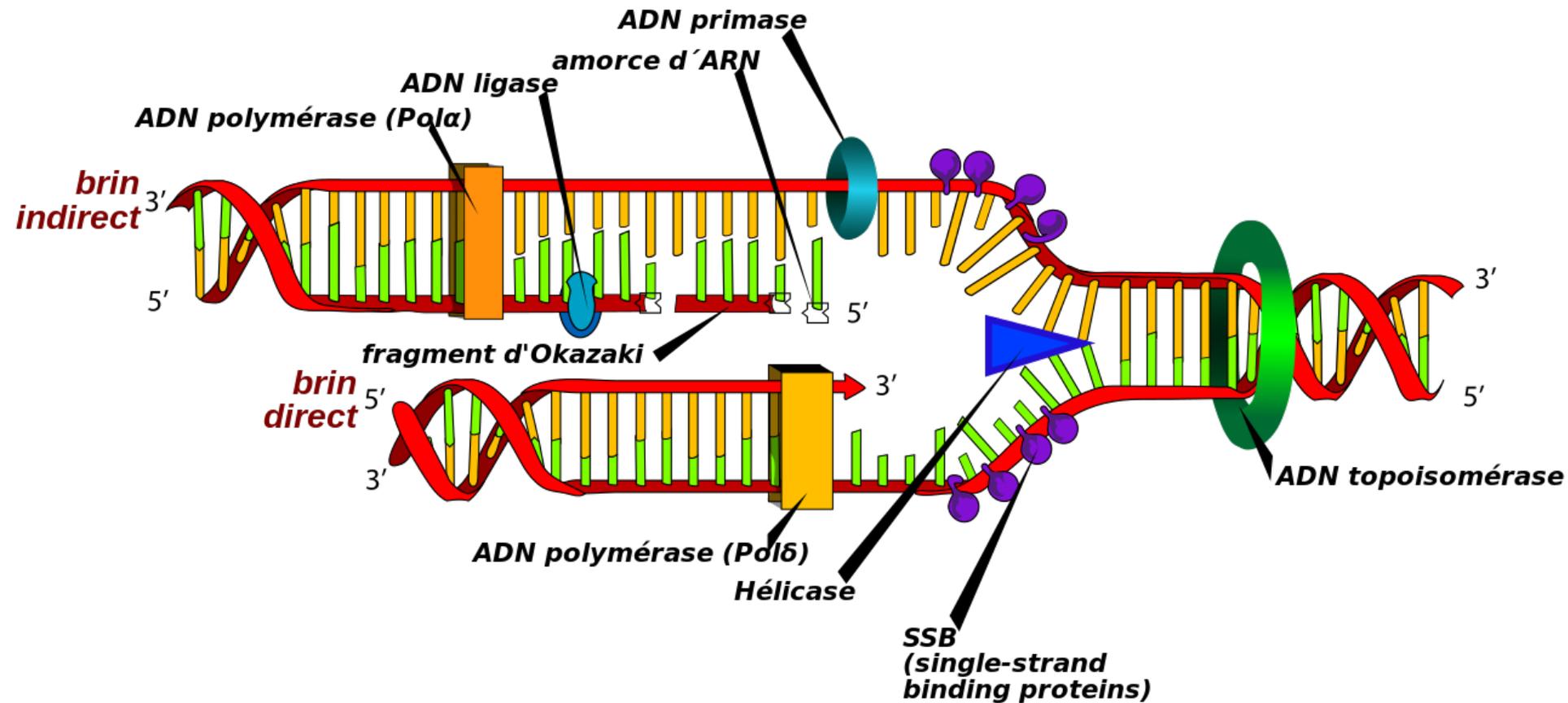
Pol γ : Réplication de l'ADN mitochondrial

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*. PCNA est un trimer qui augmente la processivité de Pol δ . Elle a une forme de **collier coulissant** qui s'associe à Pol δ donc correspond aux sous unités β (clamp) de Pol III

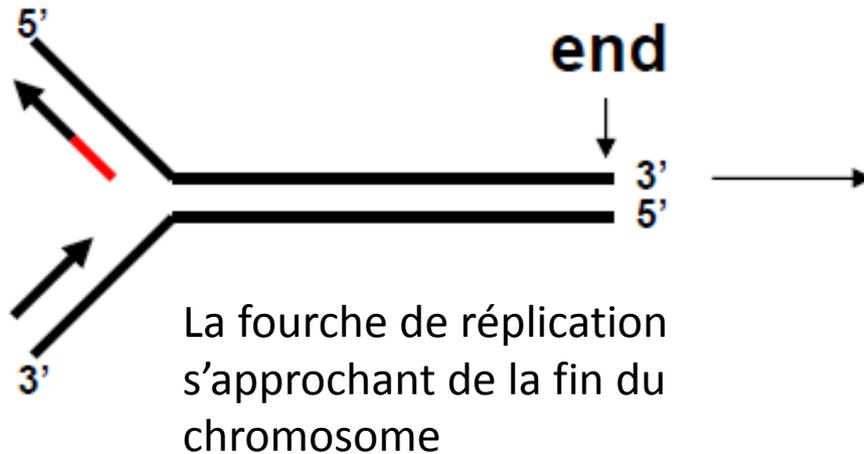


Structure du PCNA

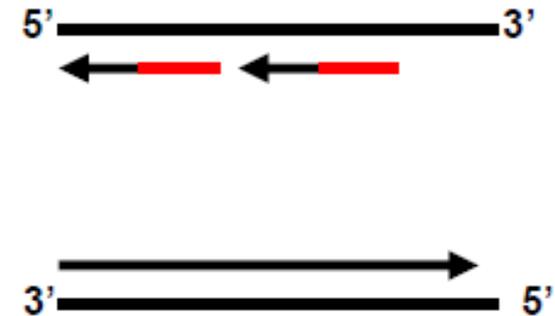
Réplication chez les Eucaryotes (2)



Problème avec les fragments d'Okazaki



Le brin retardé n'est pas synthétisé jusqu'à la fin du brin parental (**3' overhang**)



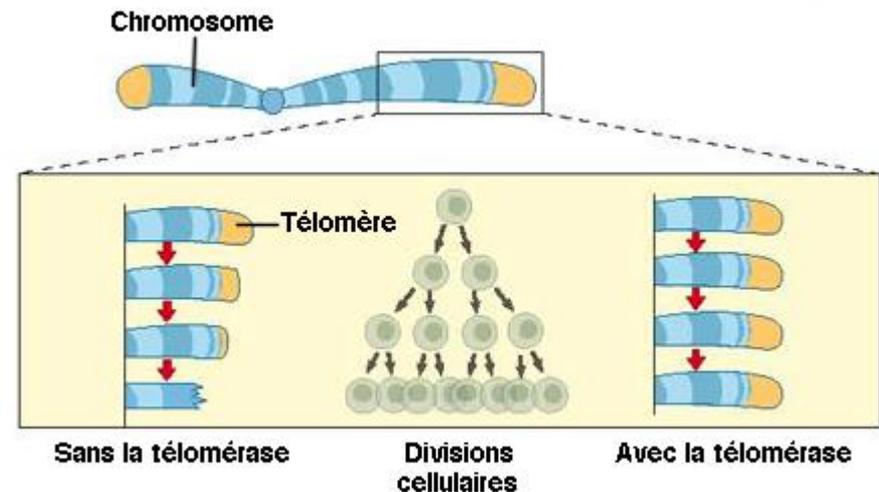
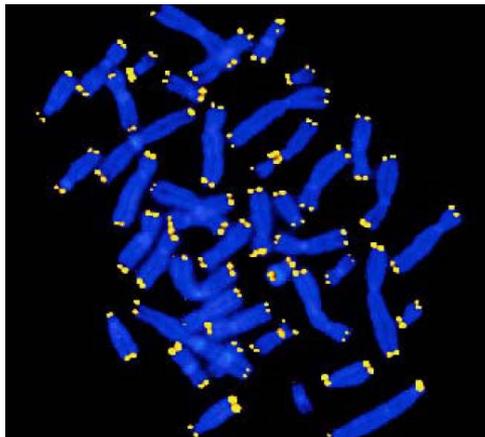
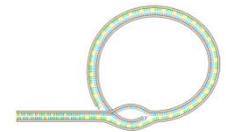
Le brin précoce est synthétisé jusqu'à la fin du brin parental

...Donc sans un mécanisme de protection endogène/naturelle, les chromosomes se raccourcissent à chaque cycle de réplication de l'ADN.

Les Télomères

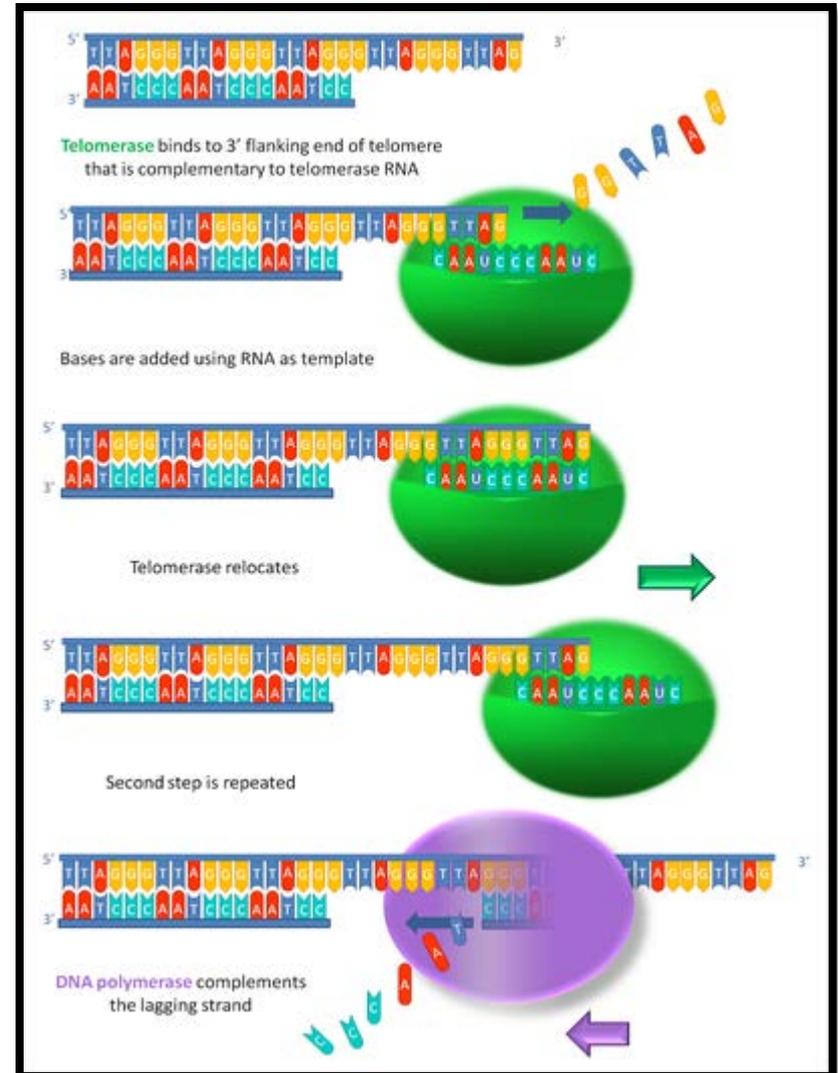
- Les Télomères sont des séquences répétitives non codantes à l'extrémité des chromosomes: **Bonnets**
- **5'-TTAGGG-3'** répétée quelques **centaines de fois** avant le 3' OH final (chez l'homme)
- **Rôles principales:**
 - Maintenir l'intégrité de l'information génétique: la taille des chromosomes diminue à chaque division cellulaire. Si les extrémités des chromosomes étaient libres il y aurait une perte des chromosomes.
 - Protéger l'ADN contre l'effet des exo-nucléases
 - Inhiber la fusion des chromosomes au niveau des extrémités
- Télomérases: ADN polymérases qui synthétisent les télomères

Structure du télomère en boucle



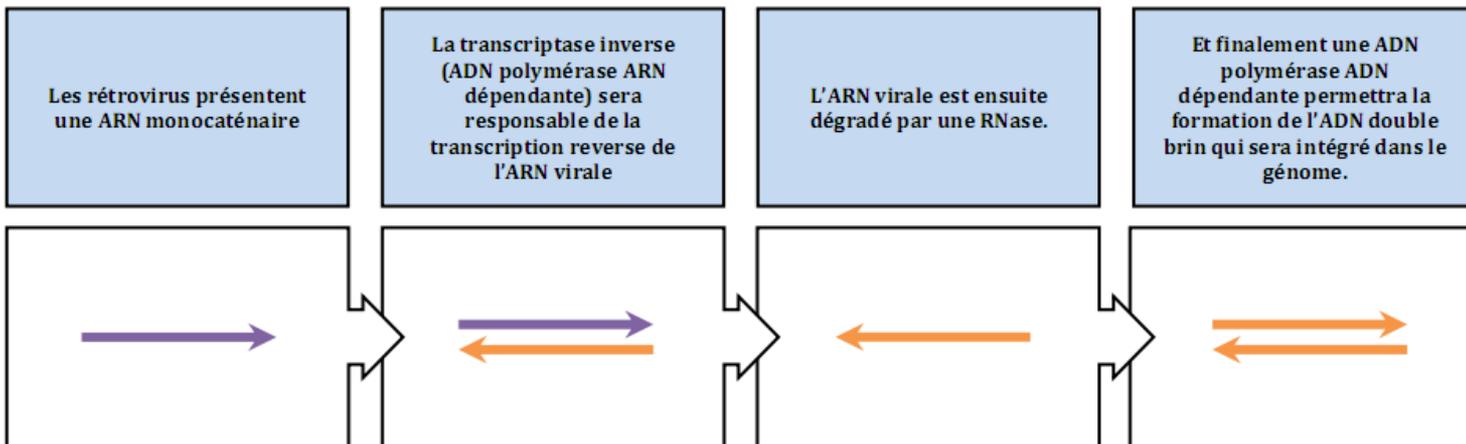
Les Télomères

- Ribonucléoprotéines formées de deux unités:
 1. **Unité d'ARN (TERC: Telomerase RNA component)** sert de matrice pour la formation des télomères
 2. **Unité protéique (TERT: Telomerase Reverse Transcriptase)** qui a une activité de transcriptase inverse ou ADN polymérase ARN-dépendente
- L'extrémité 5' terminal du TERC sert de modèle/matrice pour le TERT lors de la synthèse des unités de répétitions
- Formation des ces unités de répétitions permet d'allonger le bout 3'OH du brin modèle (neo-synthétisé)
- Cet allongement sert à la fixation d'une nouvelle amorce pour continuer la réplication avec l'aide de l'ADN polymérase



Réplication chez les rétrovirus

- Les rétrovirus sont des virus à ARN dont le génome est intégré dans le génome du sujet infecté sous la forme ADN au cours du cycle viral (**Virus du SIDA**)
- Passage de l'ARN simple brin à l'ADN double brin se fait grâce à 3 enzymes:
 - ADN polymérase ARN dépendante (Transcriptase inverse)
 - RNase
 - ADN polymérase ADN dépendante

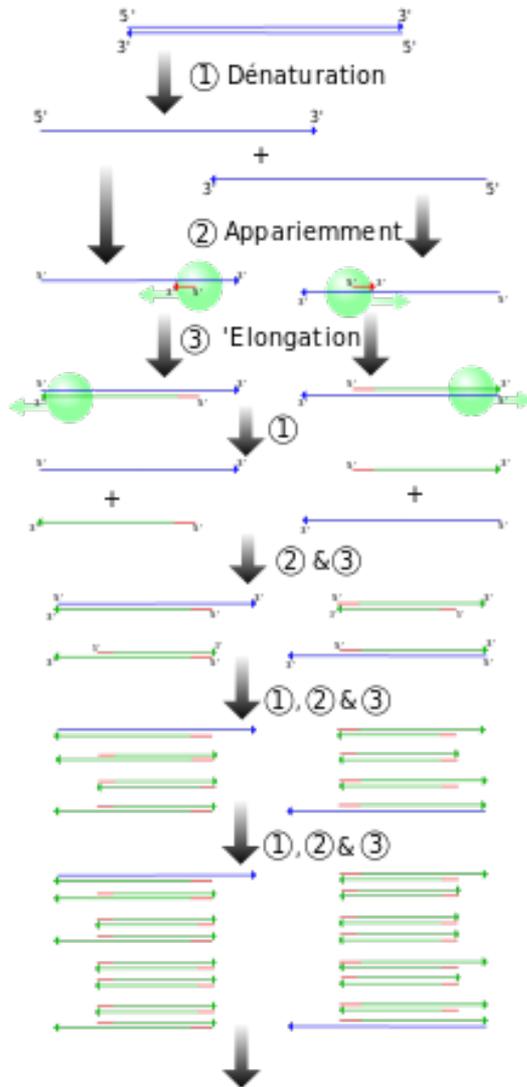


Réplication de L'ADN au Laboratoire

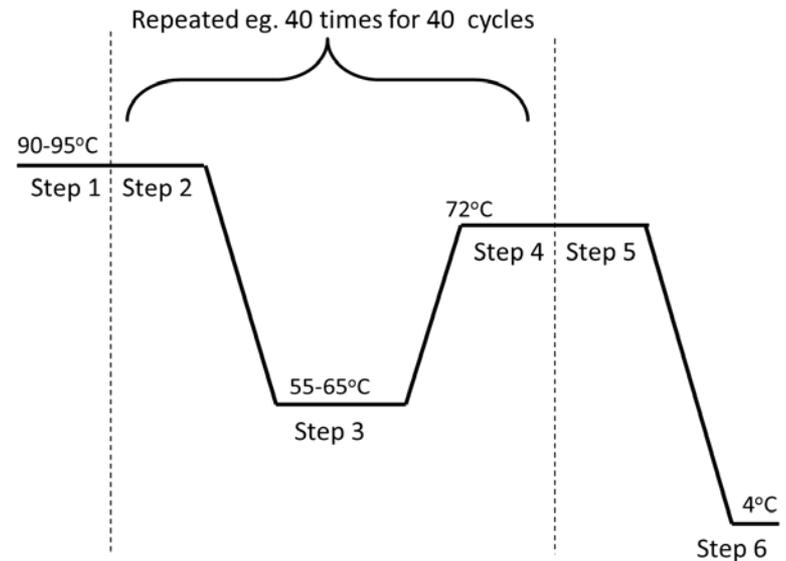
- **Polymerase Chain Reaction (PCR):** Réaction en Chaîne par Polymérase est une technique de réplication ciblée *in vitro*
- Elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon particulier contenant très peu d'ADN, une quantité importante d'un fragment d'ADN de taille bien définie
- Elle a été décrite par **Karry Mullis** en 1985 (Prix Nobel de Chimie en 1993)
- Le tube qui contient l'échantillon est placé dans un appareil appelé ThermoCycler. Cette machine permet de faire changer la température pendant des cycles bien déterminés
- Les réactifs/molécules nécessaires pour faire une PCR sont:
 - L'ADN à amplifier
 - Les amorces
 - L'ADN polymérase (*Thermophilus aquaticus* (Taq) qui est thermorésistante)
 - Les 4 desoxyribonucleotides (dNTPs)
- Les étapes de la PCR:
 - **Dénaturation**
 - **Hybridation/Appariement des amorces**
 - **Elongation**



Les Etapes de la PCR en Image



Augmentation exponentielle de la quantité de fragments courts



Thermocycler

Résumé

- La réplication consiste à la duplication du génome
- La réplication est semi-conservative
- La synthèse du nouveau brin se fait dans le sens 5' vers 3'
- La réplication est initiée a une séquence spécifique appelé Origine
- La réplication est bidirectionnelle (en général) aboutissant à la formation de deux fourches de réplifications qui se déplacent dans le sens opposé
- L'ADN polymérase ne peu pas dérouler les brins de l'hélice, ni initier la synthèse d'un nouveau brin sans l'aide d'autres protéines majeures
- A la fourche de réplication, un brin est étendue continuellement et l'autre brin sera synthétisé de manière discontinue (fragments d'Okazaki et amorces à ARN)
- La PCR est la technique de base pour amplifier l'ADN au laboratoire.

Questions?

