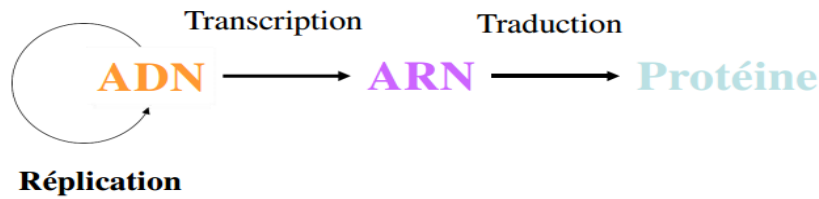


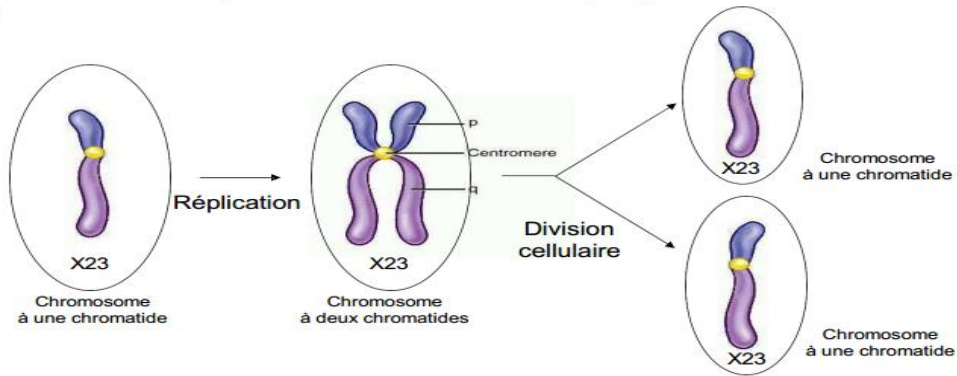
# Réplication de l'ADN



## Réplication:

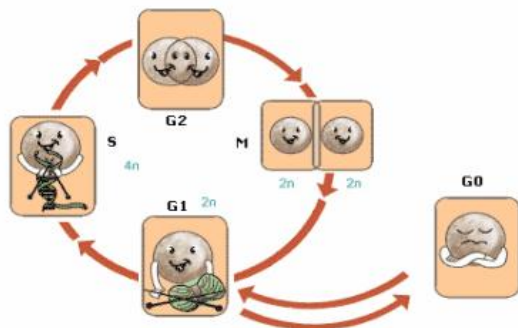
Le processus de réplication consiste en la formation d'une copie de la molécule d'ADN de la cellule mère.

- La duplication de l'ADN (et donc des chromatides) permet de passer de chromosomes à une chromatide à des chromosomes possédant deux chromatides identiques, portant la même information génétique.



- Lors de la mitose, ces deux chromatides sont réparties, chaque cellule - fille héritant d'une chromatide de chaque chromosome. On obtient ainsi deux cellules possédant la même information génétique que la cellule mère.

## Le cycle cellulaire chez les eucaryotes

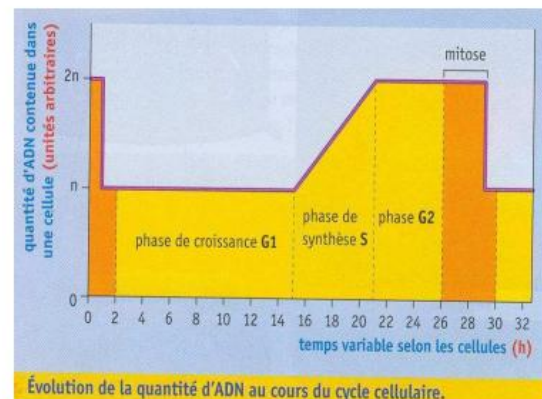


### Période de multiplication

**G1** : phase de préparation à la synthèse de l'ADN  
**S** : phase de synthèse de l'ADN  
**G2** : phase de préparation à la mitose  
**M** : mitose

### Période de quiescence

**G0** : pas de processus de division cellulaire  
Cellule au repos exerçant ses fonctions



# Comment l'ADN est dupliqué ?

## ● Expérience de Meselson et Stahl (1958)



### La question:

selon quelles modalités passe-t-on d'une molécule d'ADN formée de deux brins à deux molécules d'ADN bicaténaire identiques ?

### Les hypothèses:

Pour expliquer la duplication d'un ADN bicaténaire, trois modèles ont été proposés.

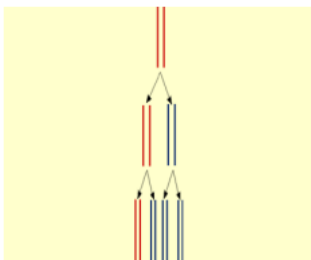
Ces modèles se basent tous sur l'utilisation de la molécule d'ADN "mère" comme matrice pour sa réplication, mais selon des modalités différentes :

- Le modèle conservatif
- Le modèle semi-conservatif
- Le modèle dispersif

## Réplication de l'ADN

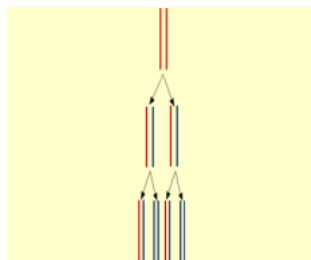
### ● Expérience de Meselson et Stahl

#### Le modèle conservatif



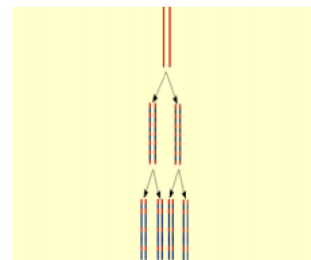
A partir d'une molécule d'ADN bicaténaire "mère", on forme une nouvelle molécule d'ADN bicaténaire. On garde donc ici une molécule "mère", non modifiée (elle est donc conservée), tout en "créant" une nouvelle molécule ("fille").

#### Le modèle semi-conservatif



On dissocie les deux brins de la molécule d'ADN bicaténaire "mère". Chaque brin sert donc de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire, l'ensemble reformant une molécule d'ADN bicaténaire. Chaque nouvelle molécule "fille" ne conserve donc que la moitié de la molécule "mère".

#### Le modèle dispersif

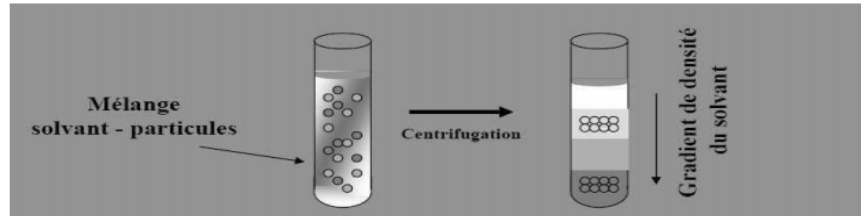


On ne conserve aucun brin intact. La copie se réalise par fragments dispersés dans l'ensemble de l'ADN, permettant de former les deux molécules d'ADN bicaténaire "filles".

## Sédimentation: centrifugation à l'équilibre

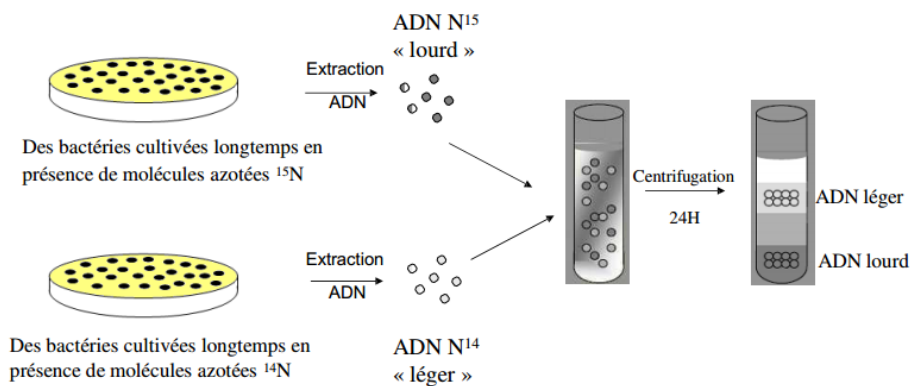
La centrifugation à l'équilibre permet de séparer les particules en suspension en fonction de leur densité.

Les particules sont mélangées à un solvant (chlorure de Césium) capable de former son propre gradient de concentration sous l'effet d'un champ de gravitation. Pendant la centrifugation, le solvant forme un gradient de densité qui englobe les densités des différentes particules présentes à l'intérieur du tube.



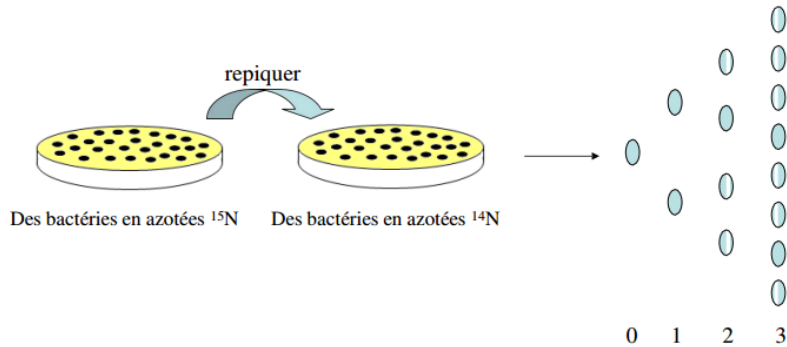
Chaque particule s'arrête à l'endroit où sa densité est égale à celle du solvant. En effet la différence de densité entre une particule et le solvant est nulle.

## Centrifugation à l'équilibre: exemple avec ADN



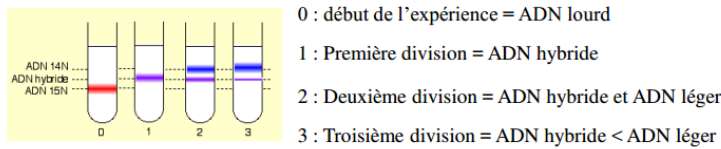
**Principe:**

Des bactéries cultivées depuis longtemps en présence de molécules azotées  $^{15}\text{N}$  sont repiquées sur un milieu contenant des molécules azotées  $^{14}\text{N}$

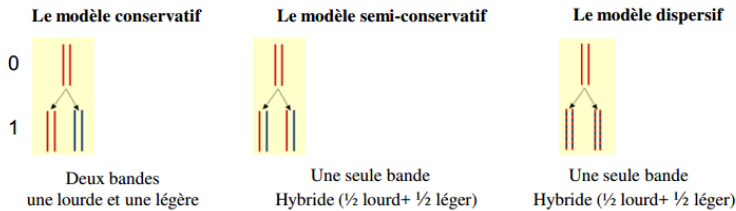


Des fractions sont prélevées après différents temps correspondant à 1, 2, 3, ... divisions. L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de Césium et centrifugé 24h à 100.000 g

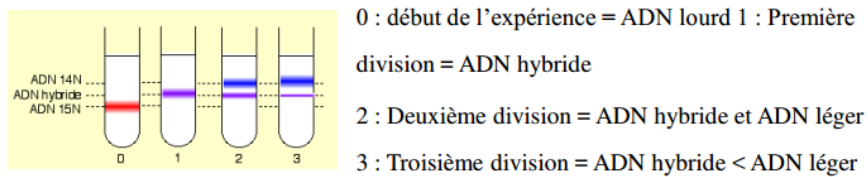
**Résultat de Meselson et Stahl**



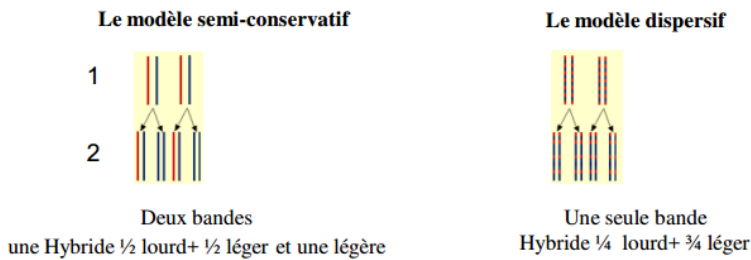
Qu'attend-on pour les trois modèles proposés ?



On peut donc, dès cette première observation, **rejeter le modèle conservatif.**

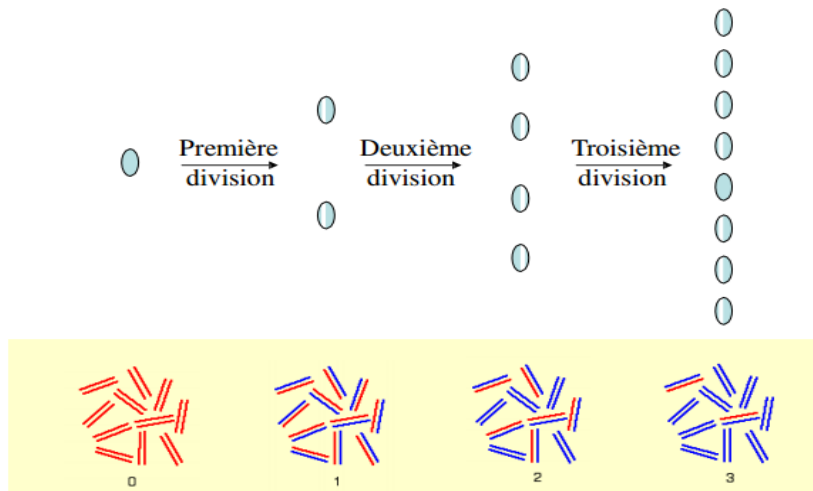


Qu'attend-on pour les trois modèles proposés ?



L'expérience de Meselson et Stahl permet donc de mettre en évidence le fait que **la réplication se réalise selon un mode semi-conservatif.**

La réplication se réalise selon un mode **semi-conservatif**.



### Réplication:

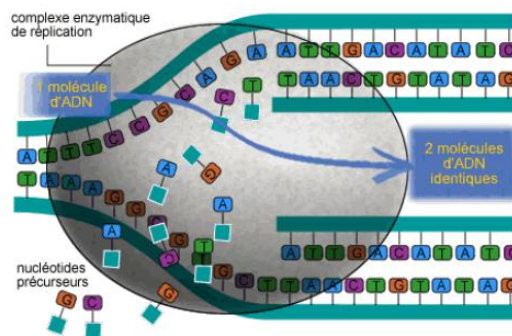
Le processus de réplication consiste en la formation d'une copie de la molécule d'ADN de la cellule mère.

- ADN matrice (DNA template)
- ADN polymérase
- Protéines de réplication (Primase, Helicase, Topoisomérase / DNA gyrase, SSB (Single Strand Binding protein))
- dNTPs, ATP, Mg<sup>2+</sup>

### La réplication de l'ADN fait intervenir un complexe protéique

- Au cours de la réplication chaque brin d'ADN va être copié par complémentarité de séquence via un complexe enzymatique: **Le replisome**
- L'ajout de nucléotide va ce faire par complémentarité de séquences

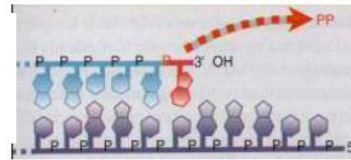
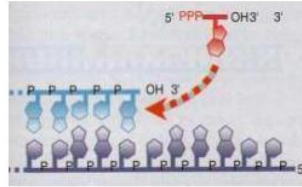
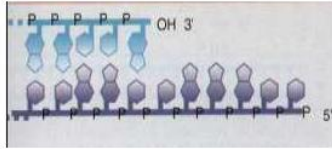
A → T  
G → C  
T → A  
C → G



- Ce replisome comprend plusieurs protéines: ADN polymérase, hélicase une primase...

## L'ADN polymérase

- L'ADN polymérase allonge une chaîne d'ADN en additionnant les nucléotides un par un dans le sens **5' vers 3'** (il n'existe pas d'activité 3'→5')



- La polymérisation est rapide
  - 1000 nt/sec chez les bactéries
  - 50 nt/sec
- L'ajout de nucléotide va ce faire par complémentarité de séquences
- L'énergie de la réplication est fournie par l'hydrolyse du nucléotides

A → T  
 G → C  
 T → A  
 C → G



- Les ADN polymérase font une réplication fidèle: elle font peut d'erreur 1 sur 10<sup>9</sup>

## L'ADN polymérase: correction sur épreuve

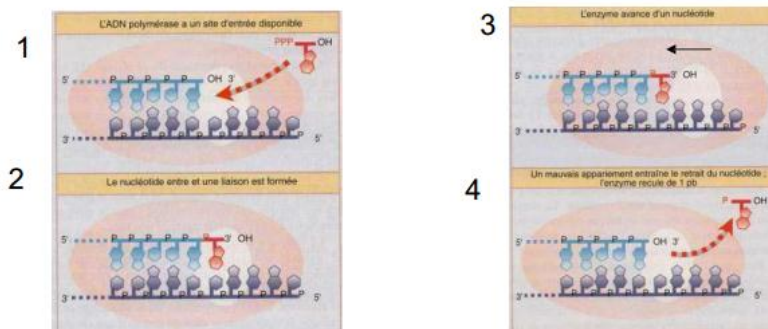
La fidélité de la réplication est assurée par deux mécanismes:

### L'appariement des bases:

l'appariement entre les bases nucléiques est la première source de la fidélité cependant on estime que la fréquence d'incorporation d'un nucléotide erroné devrait être de l'ordre de 10<sup>-3</sup> par nucléotide incorporé.

### La correction sur épreuve:

La correction sur épreuve est liée a une activité exonucléase 3'→5' de l'ADN polymérase (toutes les ADN pol)



**L'ADN polymérase et son activité exonucléolytique de correction d'épreuves . 1 .** L'ADN polymérase incorpore un mauvais nucléotide malgré la sélection de base par complémentarité. **2.** Le nucléotide entre et une liaison se forme. **3 .** L'enzyme avance d'un nucléotide . **4 .** Un mauvais appariement entraîne le retrait du nucléotide et l'enzyme recule de 1 pb

## Les mutations de l'ADN

- Au cours de la réplication : les substitutions survenant lorsqu'un nucléotide mal apparié est incorporé, et les changements du cadre de lecture qui résultent de la délétion ou de l'insertion d'un nucléotide supplémentaire. Ces erreurs peuvent être repérées et corrigées par l'ADN polymérase elle-même grâce à son activité de correction d'épreuves cependant toutes ne sont pas réparées  $1/10^9$  -> Apparition de **mutations**
- Les mutations correspondent à des changements permanents dans la séquence nucléotidique de l'ADN
  - Remplacement d'une paire de bases par une autre (substitution)
  - Addition ou la délétion d'une ou plusieurs paires de bases (insertion ou délétion)
- Conséquence d'une mutation
  - Mutation silencieuse: mutation touchant un ADN non essentiel ou qui occasionne un effet négligeable
  - Mutation favorable: celle qui confère un avantage à la cellule
  - Le plus souvent les mutations sont néfastes
- La fidélité de la réplication de l'ADN détermine en grande partie la stabilité du génome.

## L'ADN polymérase

Les génomes des organismes contiennent plusieurs ADN polymérases

### Chez les bactéries

**Pol I** : impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle possède les deux activités 5'→3' et 3'→5' (activité exonucléase), et participe à la synthèse des fragments d'Okazaki. Elle intervient aussi en fin de réplication pour éliminer les amorces d'ARN.

**Pol II** : impliquée dans la réplication de l'ADN endommagée et possède l'activité 5'→3' et une activité 3'→5' exonucléase.

**Pol III** : c'est la **principale polymérase** bactérienne qui intervient dans l'élongation de la chaîne d'ADN lors de la réplication au niveau du brin avancé et de la synthèse des fragments d'Okazaki

# L'ADN polymérase

Les génomes des organismes contiennent plusieurs ADN polymérases

## Chez les eucaryotes

**ADN Pol  $\alpha$  (primase):** ce complexe synthétise de courtes amorces ARN à l'origine de la réplication sur le brin avancé ainsi que des amorces ARN pour les fragments d'Okazaki du brin retardé. **ADN Pol  $\beta$ :** Cette polymérase est impliquée dans des processus de réparation de l'ADN. Elle ne possède pas de fonction exonucléasique.

**ADN Pol  $\gamma$ :** Cette polymérase intervient dans la réplication de l'ADN mitochondrial.

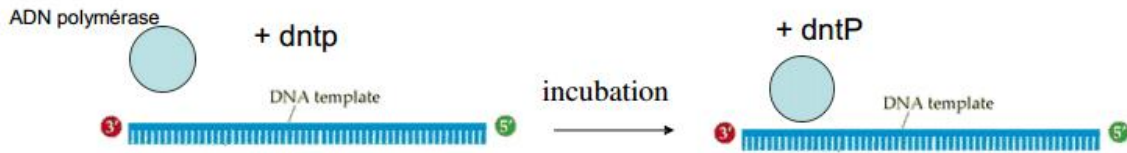
**ADN Pol  $\delta$ :** C'est la polymérase principale qui intervient dans la réplication de l'ADN chez les Eucaryotes, avec l'ADN Pol  $\epsilon$ , dans la synthèse du brin avancé et du brin retardé. Elle possède aussi une activité exonucléasique 3' vers 5' intervenant dans la correction des erreurs et dans des processus de réparation.

**ADN Pol  $\epsilon$ :** Elle possède une activité polymérase 5' vers 3' et une activité exonucléase 3' vers 5' et intervient dans la réplication et la réparation de l'ADN.

## Initiation de la réplication

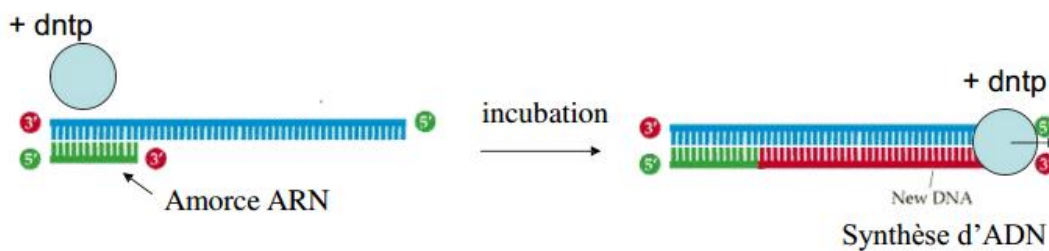


## Démarrage de la réplication



Aucune synthèse d'ADN

Les ADN polymérases ne commencent pas une nouvelle chaîne polynucléotidique en reliant deux nucléosides triphosphates



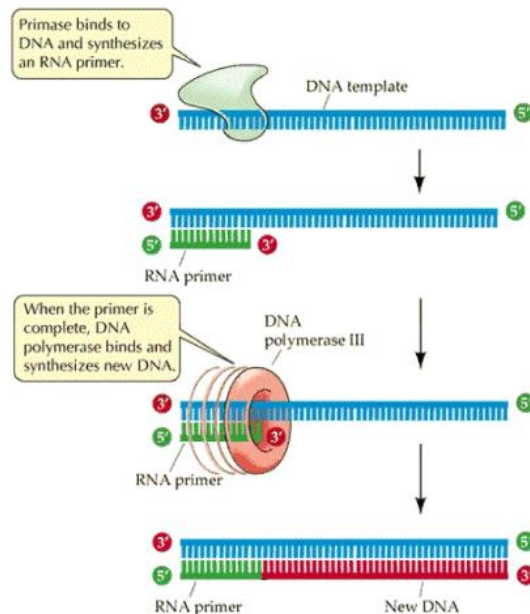
Les ADN polymérases ont absolument besoin d'une extrémité 3' -OH d'un brin «amorce» Apparié auquel ajouter les nucléotides suivants.

## Qui synthétise l'amorce ARN: La primase

Au niveau de la bulle de réplication une Primase (ADN polymérase) associée à d'autres protéines forme le primosome

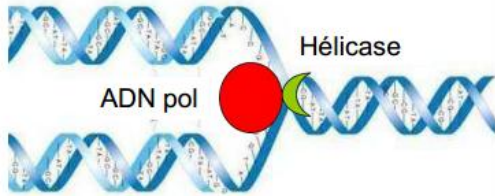
Elle synthétise de petites portions d'ARN (amorce), reconnues par l'ADN polymérase pour initier la réplication

La synthèse de l'amorce ARN ce fait de 5' vers 3'



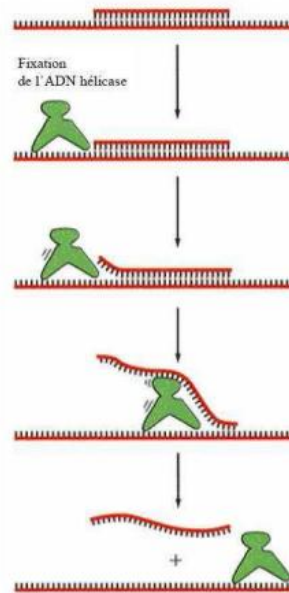
## L'hélicase

Afin permettre la progression de l'ADN polymérase long du double brins d'ADN la double hélice doit être ouverte.



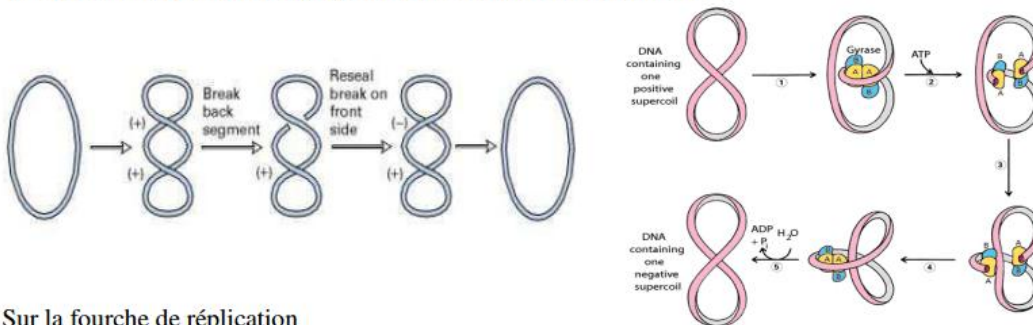
Cette ouverture de l'ADN est assurée par une enzyme appelée : **Hélicase.**

Les hélicases déroulent l'hélice et séparent les deux brins parents, en rompant les liaisons hydrogènes qui les unissent

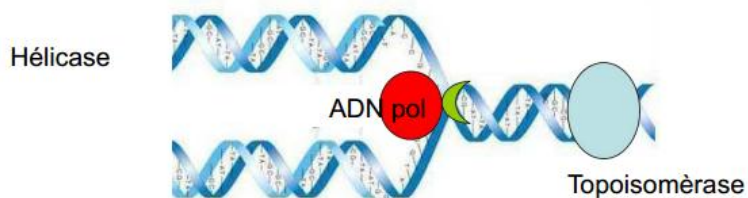


## Les topoisomères

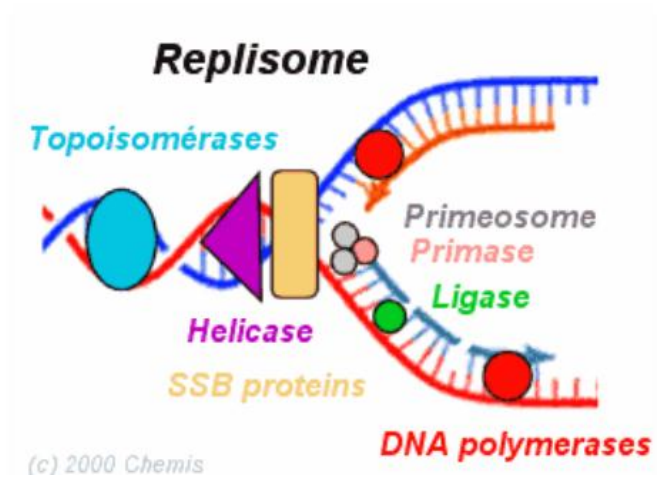
Les Topoisomères sont chargées d'introduire des supertour négatif à chaque extrémité de la bulle de réplication. Elles diminuent ainsi le degré de surenroulement de l'hélice et permettent l'ouverture et la progression de la fourche de réplication



Sur la fourche de réplication



# Le réplisome



## Mécanisme de réplication

### La synthèse d'ADN est semi-discontinue

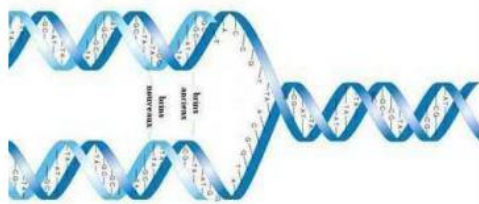
- Les faits

- La structure antiparallèle des deux brins d'ADN.

- Les deux brins sont répliqués en même temps et donc la fourche se déplace dans le sens 5' -> 3' sur un brin et donc 3' ->5' sur l'autre.

- La problématique

- Les ADN polymérase ne synthétise l'ADN uniquement de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'



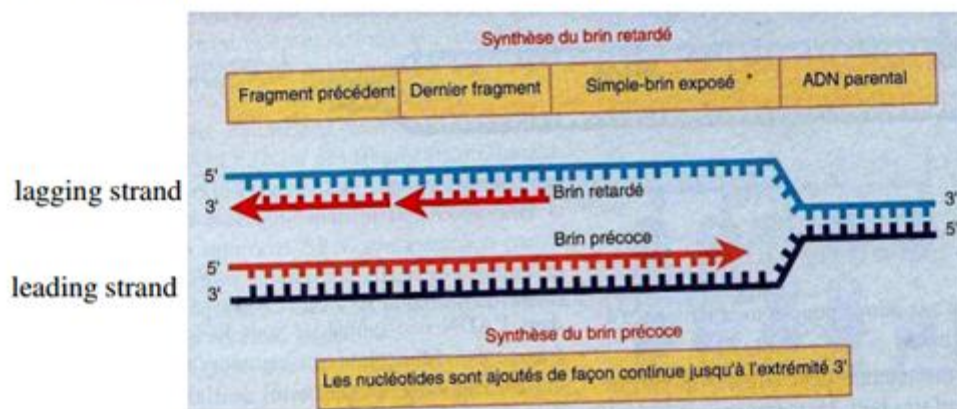
- La réplication ne peut pas être identique entre les deux brins d'ADN.

### NB : La réplication n'est pas identique entre les deux brins d'ADN

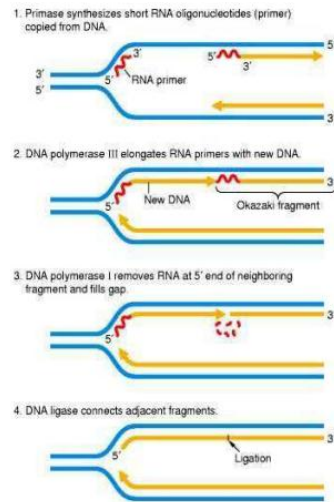
Au niveau de la fourche de réplication on distingue :

-le brin où la réplication s'effectue de manière **continue**, on parle de *brin avancé* ou *brin précoce* : sur ce brin la synthèse d'ADN se déroule de façon continue dans le sens 5' -> 3' à mesure que le duplex parental est déroulé.

-le brin où la réplication s'effectue de manière **discontinue**, on parle de *brin retardé* : sur ce brin une partie du brin parental doit être exposée, puis un segment est synthétisé dans le sens inverse (par rapport au sens de déplacement de la fourche). On a la synthèse d'une série de fragments de 5' -> 3' (Fragment Okazaki) qui sont ensuite reliés entre eux pour donner naissance à un brin intact.



## Les fragments d'Okazaki



## La fourche de réplication

