



Faculté des Sciences - Rabat



Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire

-----  
Université Mohamed V - Agdal • Faculté des Sciences  
B.P. 1014 - Rabat - MAROC

**Filière SVI - S4**

**Module de Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Elément 2: Biologie Moléculaire**

**Partie 2:**

**Expression génétique**

**Réplication**

**Pr. B. BELKADI**

**Année universitaire 2011-2012**

# Plan

Introduction : Le Dogme Central

A- La réplication

I - Généralités de la réplication

II - Réplication continue et réplication discontinue

III - Réplication chez les procaryotes

IV- Fidélité de la réplication : PROOFREADING

V - La réplication et la division cellulaire

VI - La réplication chez les Eucaryotes

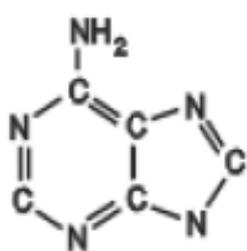
# INTRODUCTION

## Support de l'information génétique et Macromolécules

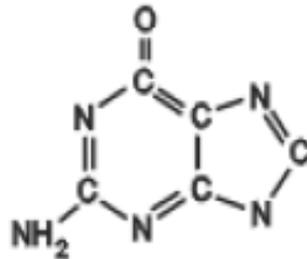
**Génome:** ensemble de gènes

**Gène:** unité fonctionnelle de l'information génétique.

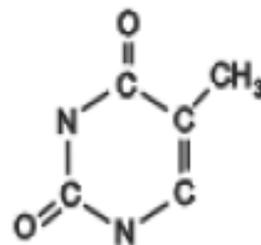
**Composition:** acides désoxyribonucléiques (ADN), séquences composés de bases puriques (Adénine, Guanine) et pyrimidiques (Thymine, Cytosine), d'oses et d'un groupement phosphate



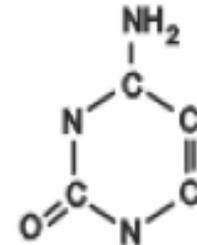
Adénine



Guanine



Thymine

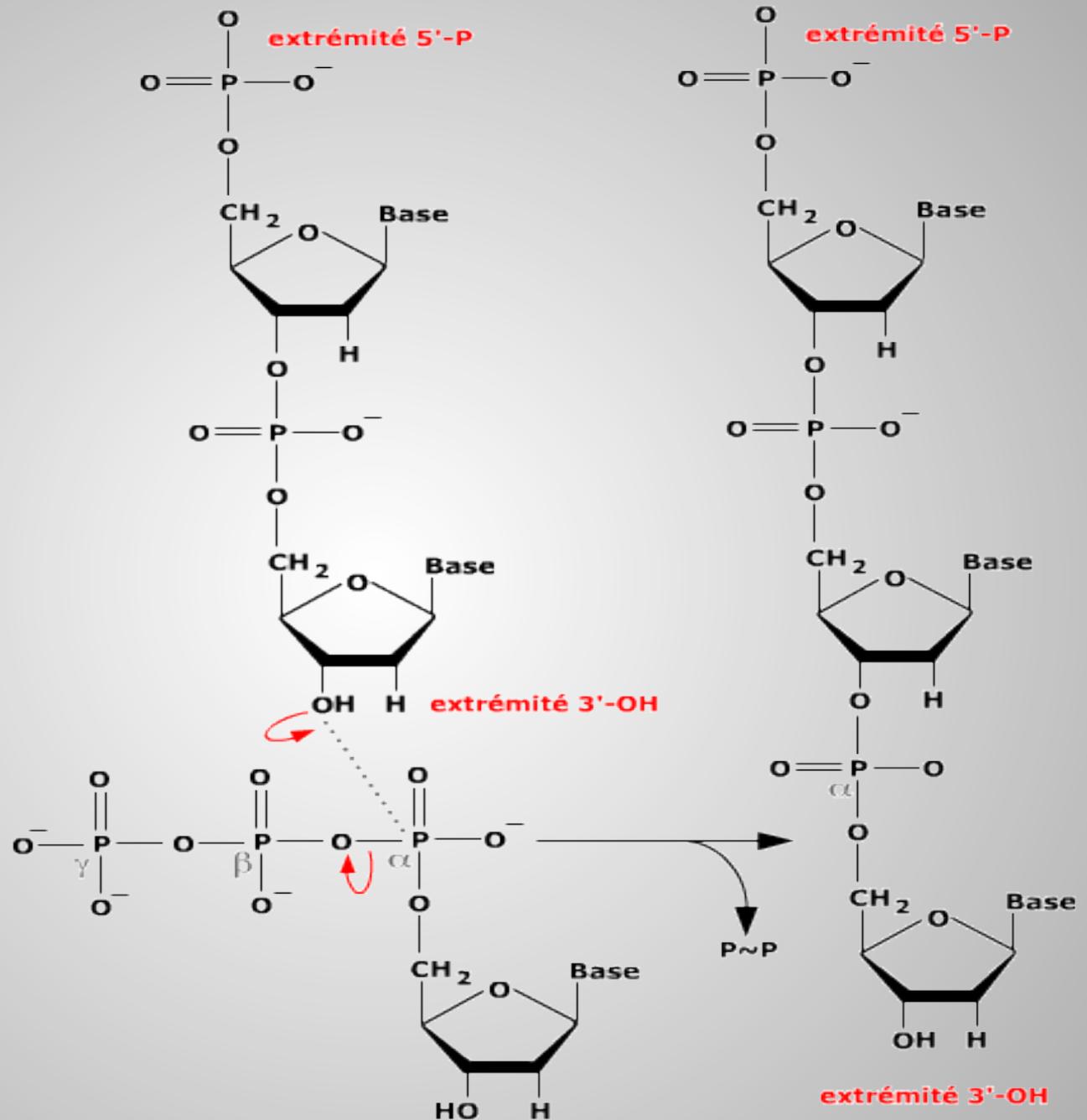


Cytosine

Purine

Pyrimidine

# Formation de la liaison phosphodiester



# Le dogme central

Réplication

Transcription

Traduction



**ADN**



**ARN**



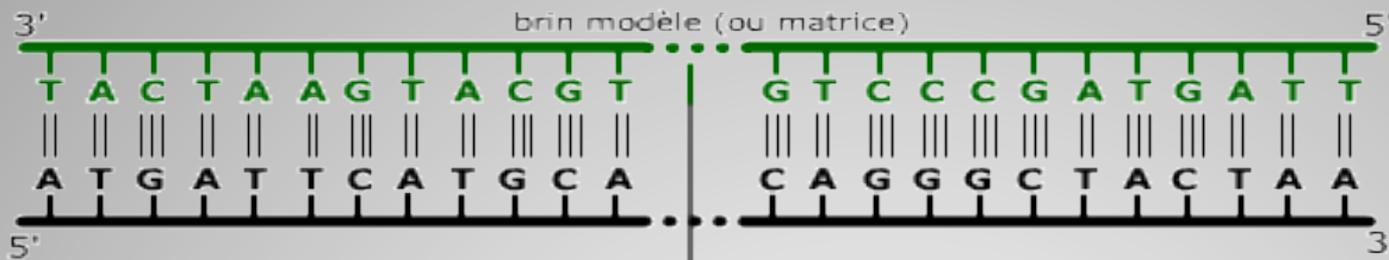
**PROTEINE**

Matrice ADN  
ADN polymérase III  
Protéines de réplication  
dNTP  
ATP  
Mg<sup>2+</sup>

Matrice ADN (brin sens)  
ARN polymérase  
Facteurs de transcription  
NTP  
Mg<sup>2+</sup>

Matrice ARNm  
Ribosomes  
Facteurs de traduction  
Acides aminés  
ARNt  
Synthases  
ATP, GTP, Mg<sup>2+</sup>

**Le flux de l'information génétique  
est unidirectionnel**



ADN  
double  
brin

**Transcription**

(complémentarité des bases)

ARN messenger



ARN  
messenger

**Traduction**

(code génétique)

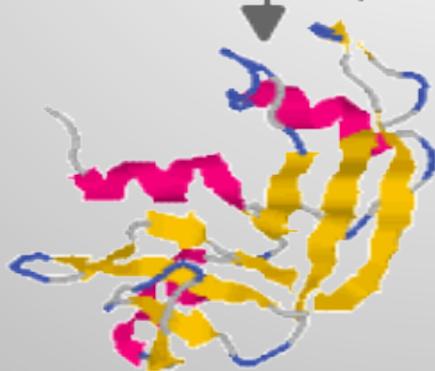
Protéine



20 aa  
possibles

**Repliement**

(code physico-chimique)



Synthèse des trois types de  
macromolécules informationnelles

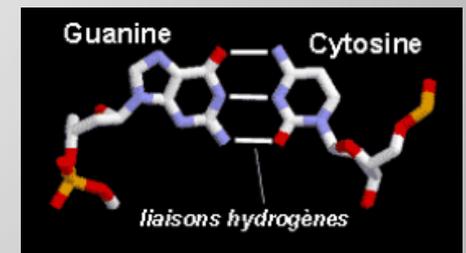
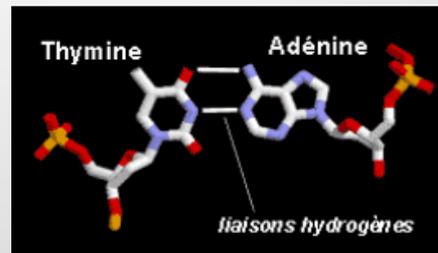
# A- Réplication

## I- Généralités

- Synthèse de plusieurs molécules d'ADN à partir d'une molécule parentale initiale afin de transmettre à la descendance une information génétique conforme.

- Règles d'appariement:

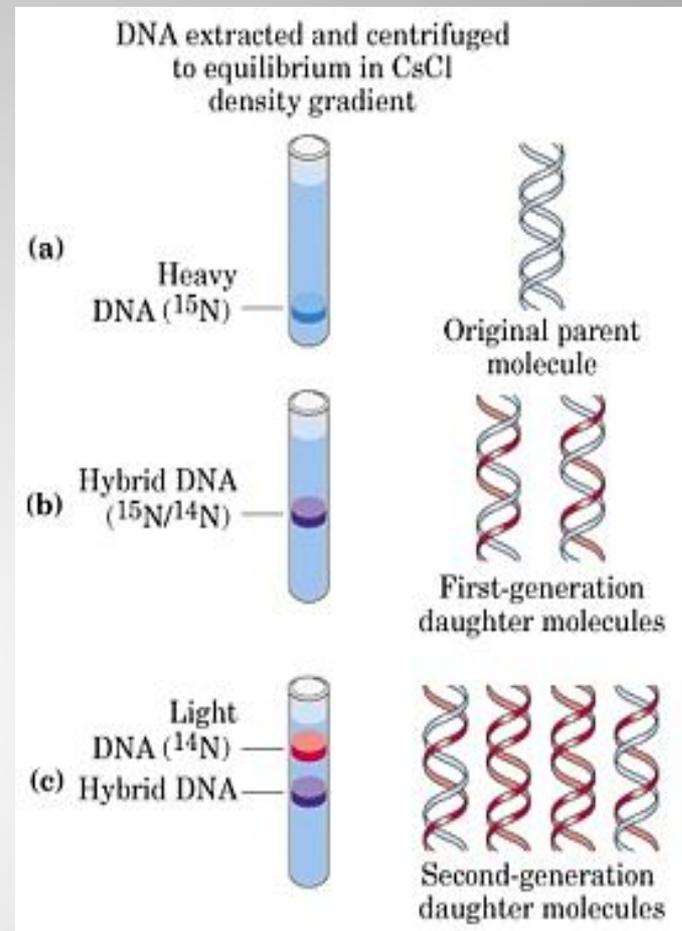
- $A \equiv T$
- $C \equiv G$



- Réplication est semi-conservative

**Première répllication**  
les molécules "lourdes" distribuées de façon égale entre les deux molécules filles

**Deuxième répllication**  
l'apparition de molécules de deux poids différents



**Expérience de Meselson-Stahl**  
avec *E. Coli*



**Répllication semi-conservative**  
la molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complétée par une chaîne nouvellement synthétisée.

# Vitesse de réplication de l'ADN

- Réplication est une réaction rapide:

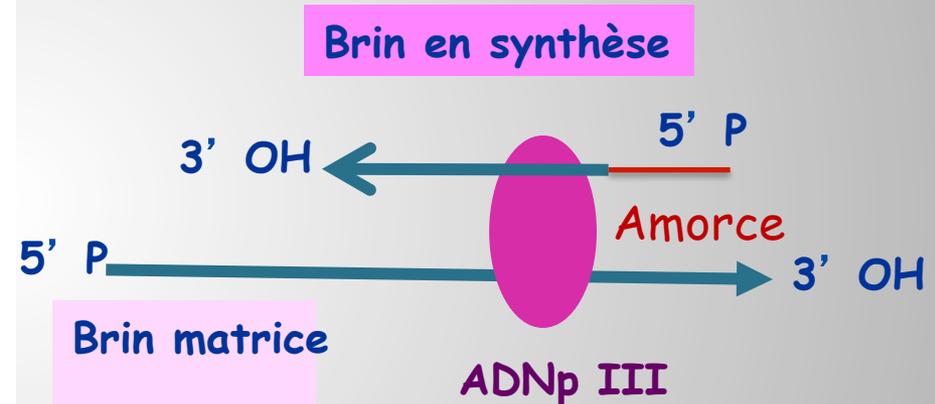
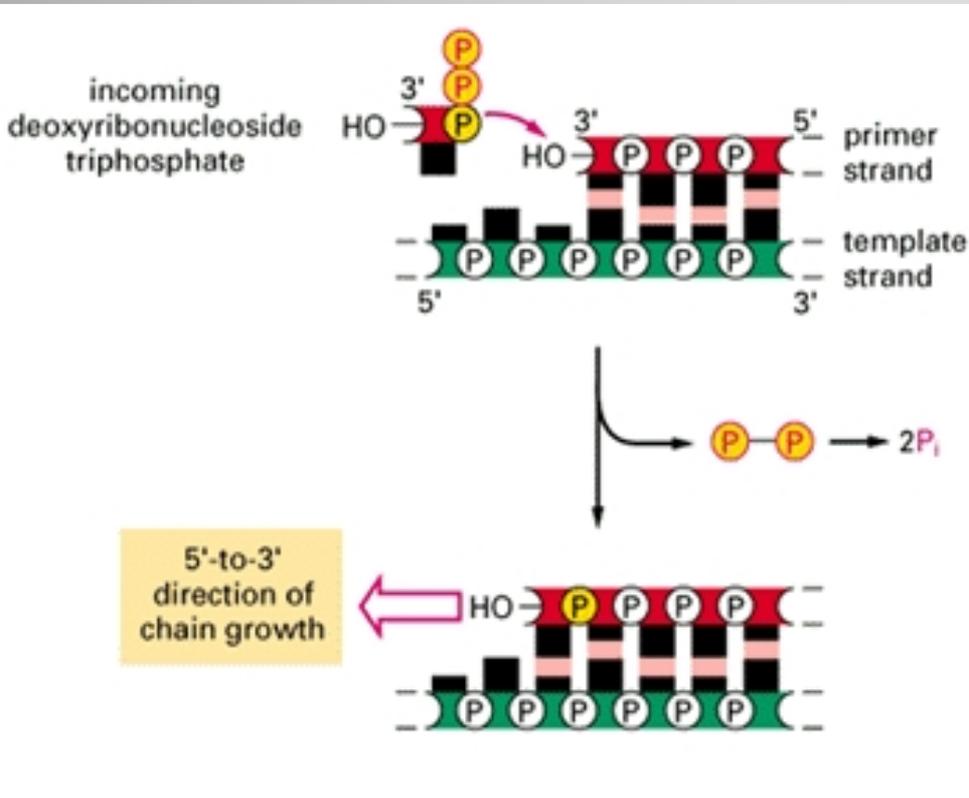
- **Bactéries: 1000 pb/sec/fourche,**

Chromosome *E. Coli* fait  $4,4 \cdot 10^6$  pb et réplique en 40 min d'où nécessité de 2 fourches

- **Cellules humaines: 100 pb/sec,**

Le génome humain fait  $3 \cdot 10^9$  pb , réplique en 8 heures, il faut au moins 1000 fourches de réplication

# Mécanisme de la réplication



Réaction asymétrique uniquement dans le sens  
 $5' P \rightarrow 3' OH$

## Asymétrie est liée à l'activité de l'ADN polymérase:

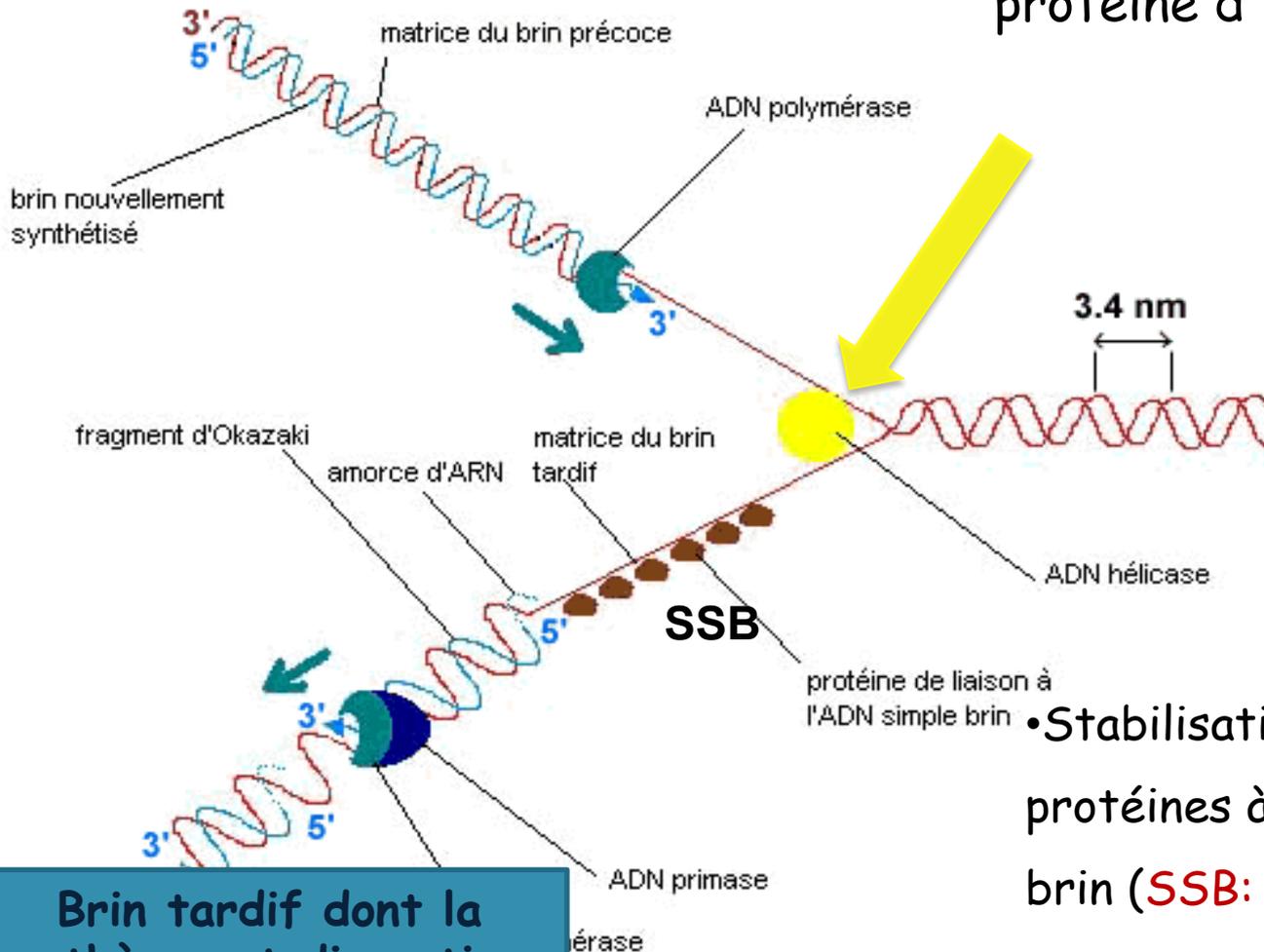
- nécessité d'avoir une amorce
- dernier résidus de l'amorce doit être apparié et avoir un groupement 3' OH libre
- Présence de nucléotides et du magnésium  $Mg^{2+}$  dans le milieu

ADNpIII utilise comme amorce un petit ARN de 500 nucléotides synthétisé par une primase.

\* *In vivo*, l'amorce est dégradée plus tard et remplacée par l'ADN grâce à l'enzyme appelée ADNpI.

# II- Réplication continue et discontinue

Brin précoce dont la synthèse est continue



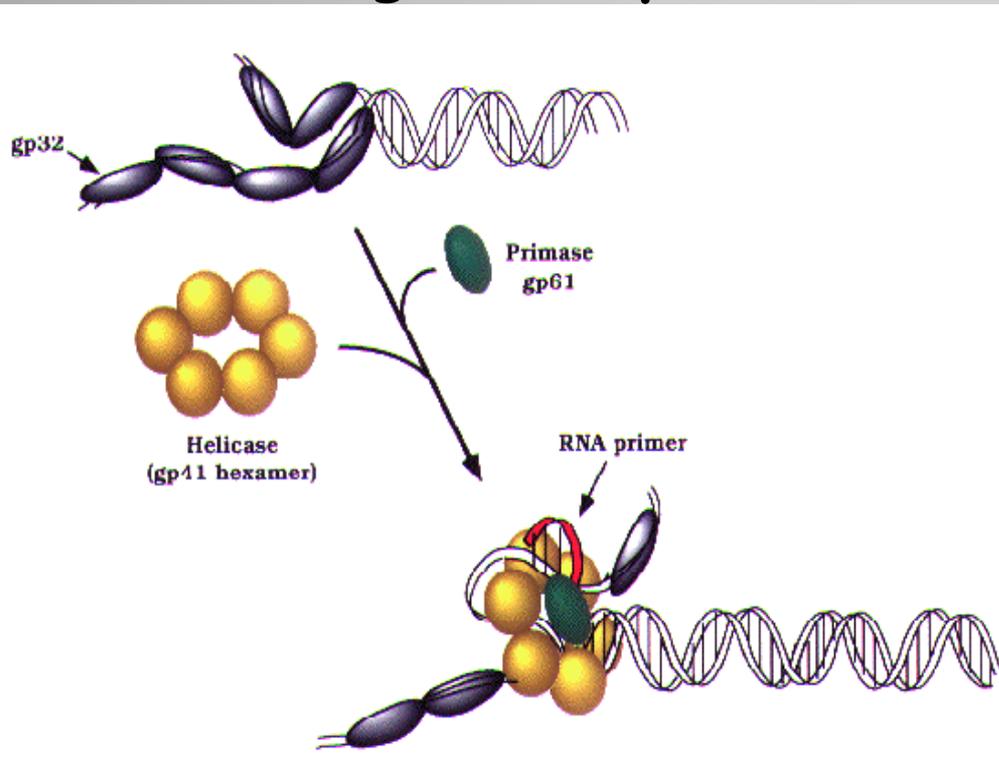
Brin tardif dont la synthèse est discontinue

- Déroutement de la double hélice par une **Hélicase** qui se fixe sur la protéine d'initiation

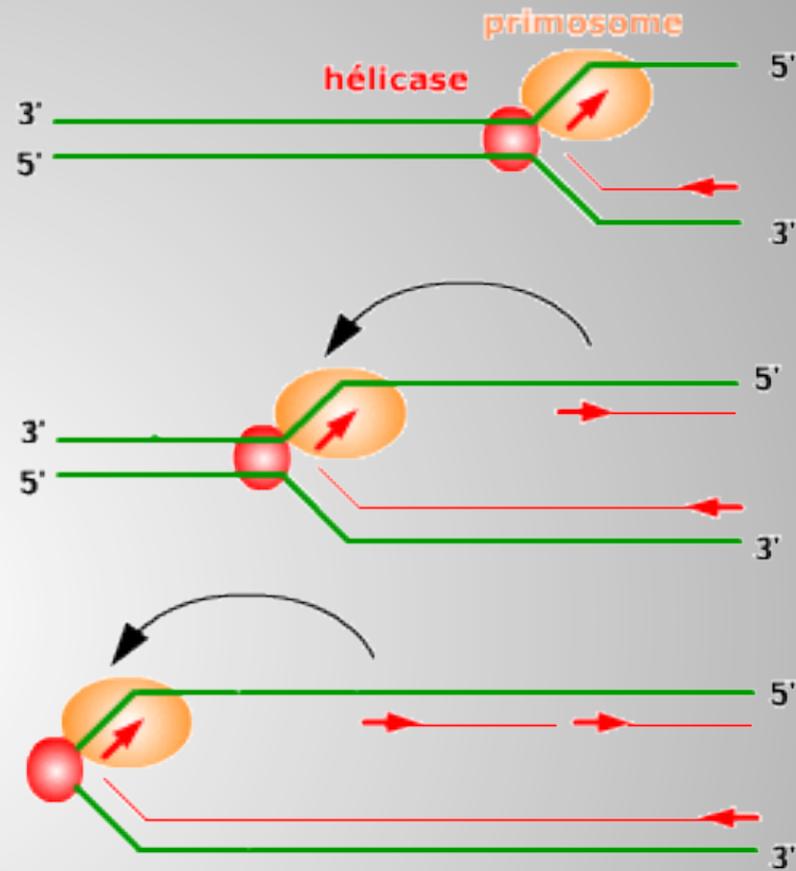
**3 étapes:**  
- initiation,  
- élongation  
- terminaison

- Stabilisation d'ADNs par des protéines à affinité pour ADN simple brin (**SSB: Single Strand Binding protein**) empêchant le réappariement

## Assemblage d'un primosome



## Déplacement du primosome



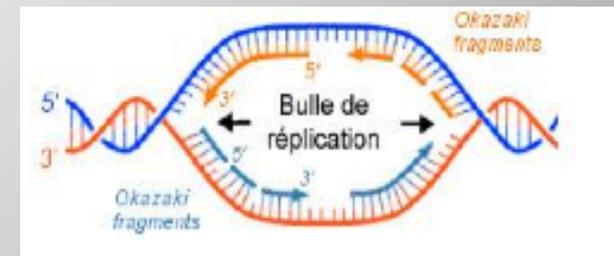
**Réplisome** contient:

- Primosome = hélicase + primase déroulent et amorcent l'ADN par synthèse d'amorce ARN
- ADN gyrase supprime les super-enroulements

# III- Réplication chez les procaryotes:

## 1- Initiation de la réplication:

- Origine de la réplication **Ori C** ou **Ori V** (plasmide)
- Séquences de 300 pb environ formées de séquences répétitives, **flanquées de séquences riches en AT**, reconnues spécifiquement par des protéines permettant l'initiation (dnaA)
- Ouverture de la double hélice et formation de la **fourche de réplication**
- Réplication bidirectionnelle à partir d'une origine de réplication.



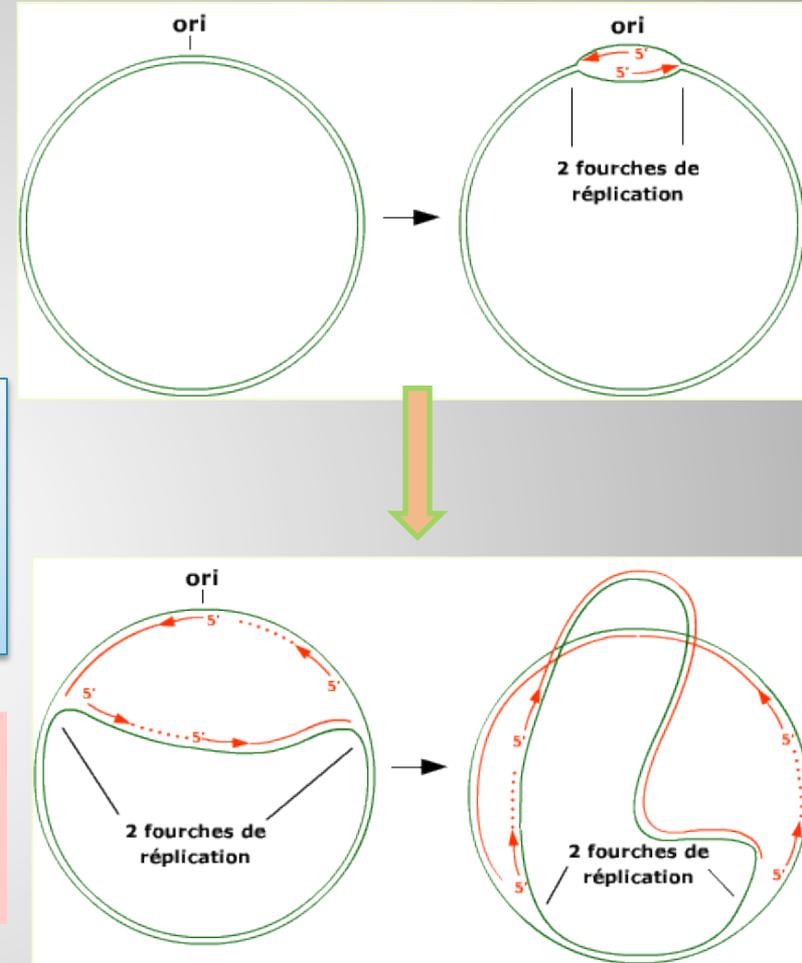
# Réplication de l'ADN circulaire: structure thêta

**\*Pré-initiation :** Dénaturation de l'ADN au niveau de l' OriC

**\*Initiation:** Mise en place des amorces

>>> Deux fourches de réplication progressent dans 2 directions opposées accompagné de détorsion de la double hélice.

**\*Elongation :** Au niveau de chaque fourche, la synthèse d'ADN est semi-conservative et semi-discontinue

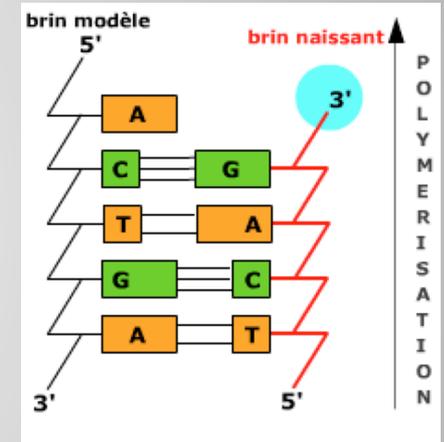
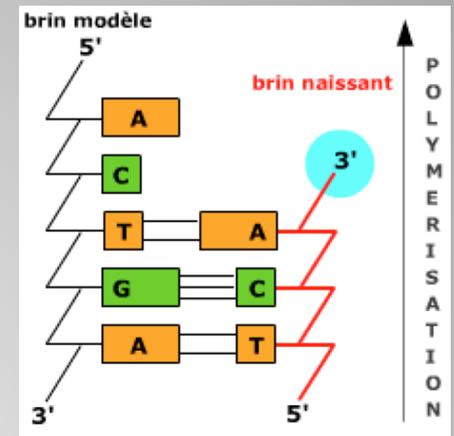


Dans un système de réplication bidirectionnelle, chacun des deux brins néosynthétisés est donc produit pour moitié par synthèse continue et pour l'autre moitié par synthèse discontinue.

## 2- Élongation de la réplication:

Les **polymérase**s ont 2 rôles:

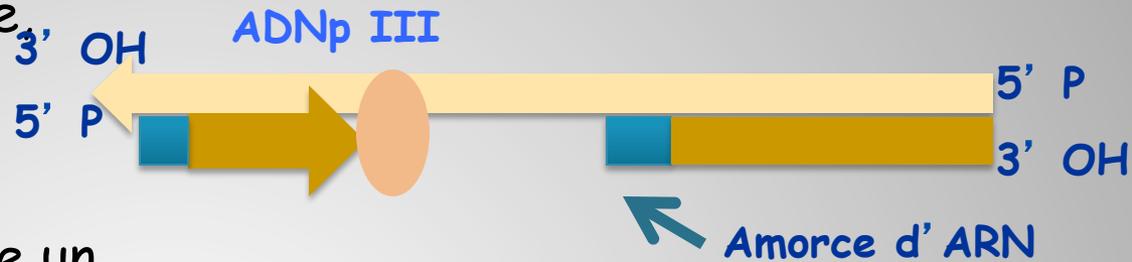
1- Incorporation des bases en respectant les règles de complémentarité >>> synthèse en continue d'un nouveau brin précoce (ADN pol III)



2- Dégradation des amorces ARN grâce à son activité d'exonucléase 5' ->3' et resynthèse de la partie manquante pour assurer la fidélité de la réplication (ADN pol I).

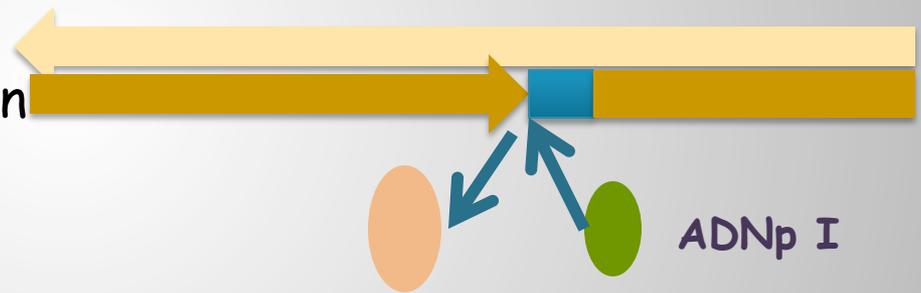
# Assemblage de deux fragments sur le brin retardé

Après la synthèse de l'amorce, la primase est remplacée par ADNp III (dnTP).

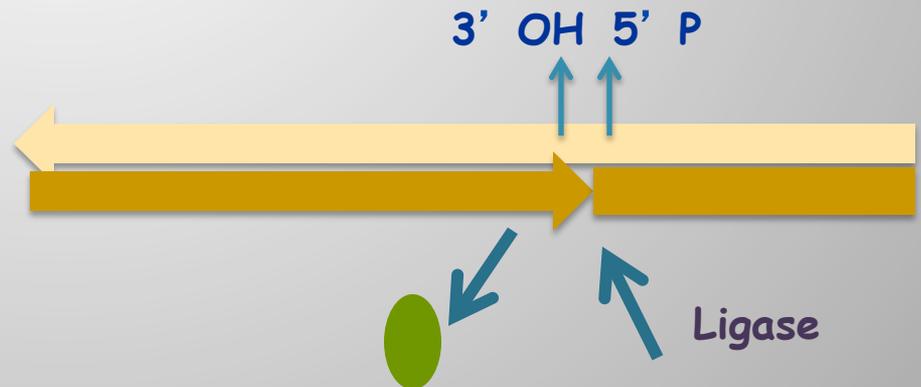


>>> Synthèse jusqu'à atteindre un ADN précédemment synthétisé.

L'ADN pol I prend alors le relais en continuant la synthèse de l'ADN pendant qu'elle enlève l'amorce ARN.



L'ADN ligase remplace la pol I après que l'amorce a été enlevée et soude les deux fragments ensemble.



# Comparaison des différentes polymérases

Fonction	Type I	Type III
Polymérase 5' → 3'	+	+
Exonucléase 3' → 5'	+	+
Exonucléase 5' → 3'	+	-
<b>Matrice amorce:</b>		
Double brin	-	-
Simple brin + amorce	+	+
<b>Activités</b>		
Vitesse (Kpb/min)	0,67	100
Nombre (molécules/cellule)	400	10 à 20

ADN pol III rapides, peu nombreuses et moins versatiles au niveau de l'exonucléase

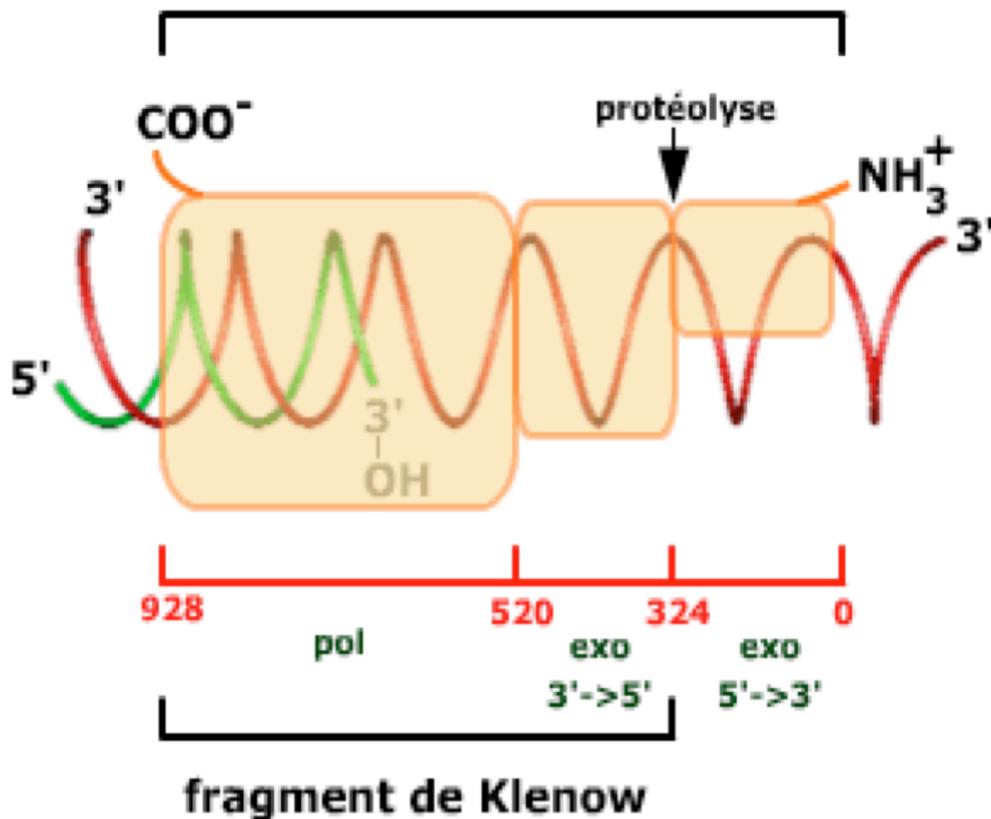


Réplication et mécanisme d'autocorrection

L'ADN pol I étant très présente mais lente et pouvant facilement exonucléer, elle assurerait donc un rôle de réparateur de l'ADN.

# ADN polymérase I et fragment de Klenow de la bactérie *E. coli*

## ADN-polymérase I



- Domaine N-terminal: activité exonucléasique orientée de  $5' \rightarrow 3'$  principalement utilisée dans la réparation de l'ADN.

- Domaine central: activité exonucléasique orientée de  $3' \rightarrow 5'$ , activité de correction d'épreuves (édition).

- Le gros domaine C-terminal possède l'activité de polymérisation, orientée de  $5' \rightarrow 3'$ .

3 domaines structuraux et fonctionnels portés par la même chaîne polypeptidique

# Changements dans la topologie de l'ADN au cours de la réplication

- ❑ Déroulement de la double hélice par l'Hélicase
- ❑ Super enroulement de l'ADN répliqué par les topoisomérases.

Ce processus joue un rôle important dans la régulation de la réplication.

- Le relâchement est nécessaire pour la réplication
- Le super-enroulement est nécessaire pour contenir tout l'ADN dans la cellule.

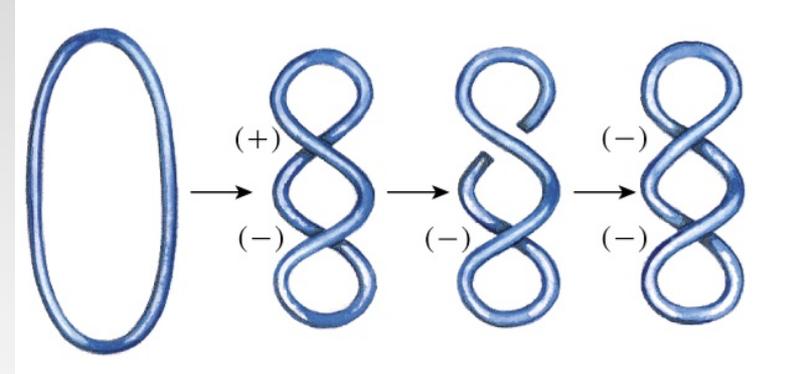
# Régulation de l'état d'enroulement de l'ADN

## Cas du génome circulaire

**L'ADN gyrase : topoisomérase type II:** Catalyse le croisement de brins

- Introduction de super-tours négatifs dans l'ADN,
- Coupure des 2 brins parentaux
- Séparation

Donc retour à l'état relâché d'ADN

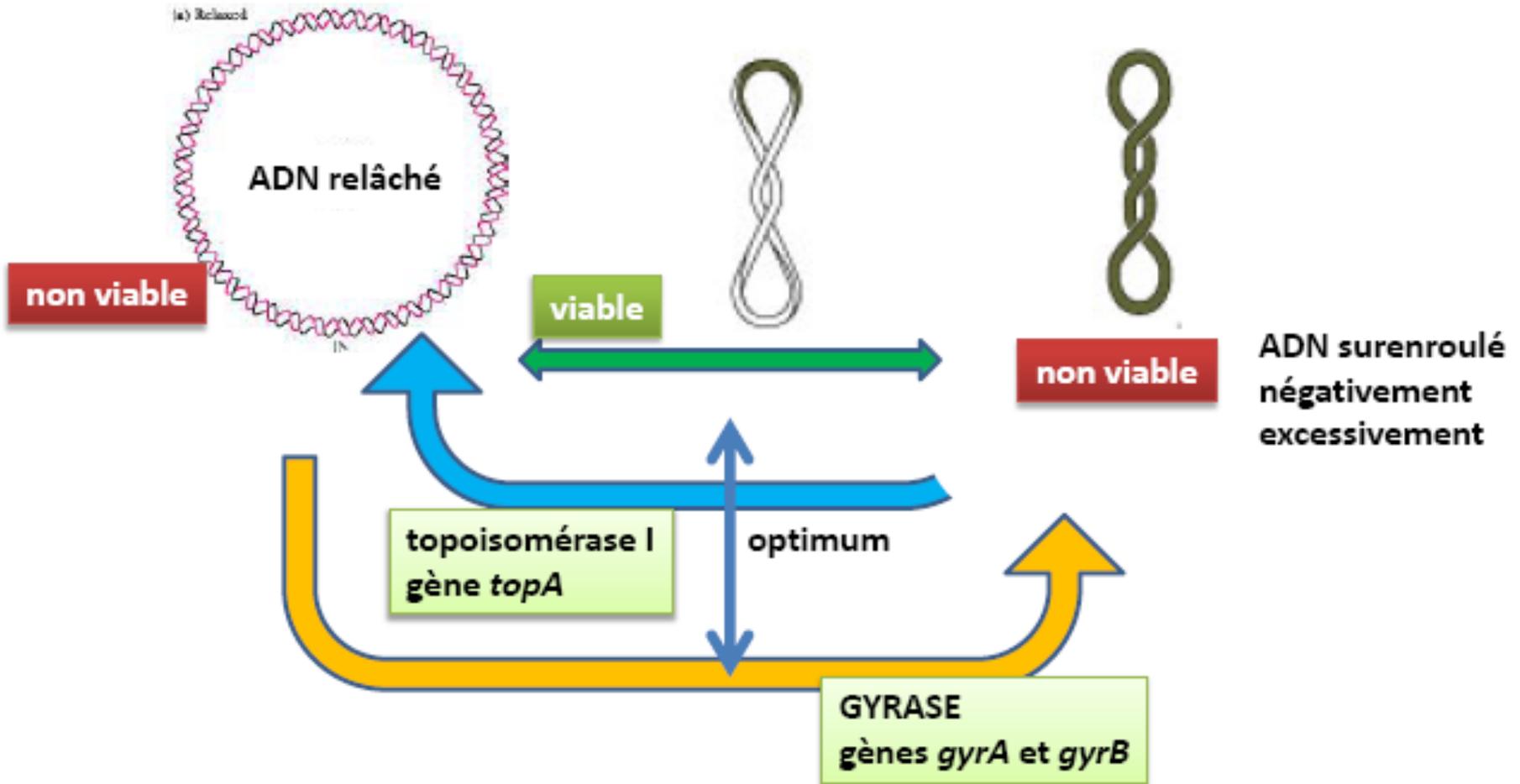


Mécanisme d'action de la gyrase sur un ADN circulaire

Gyrase est **spécifique** et **essentielle** à la réplication des bactéries

**Topoisomérase de type I:** régule l'état d'enroulement  
>>> Nécessaire pour contenir tout l'ADN dans la cellule

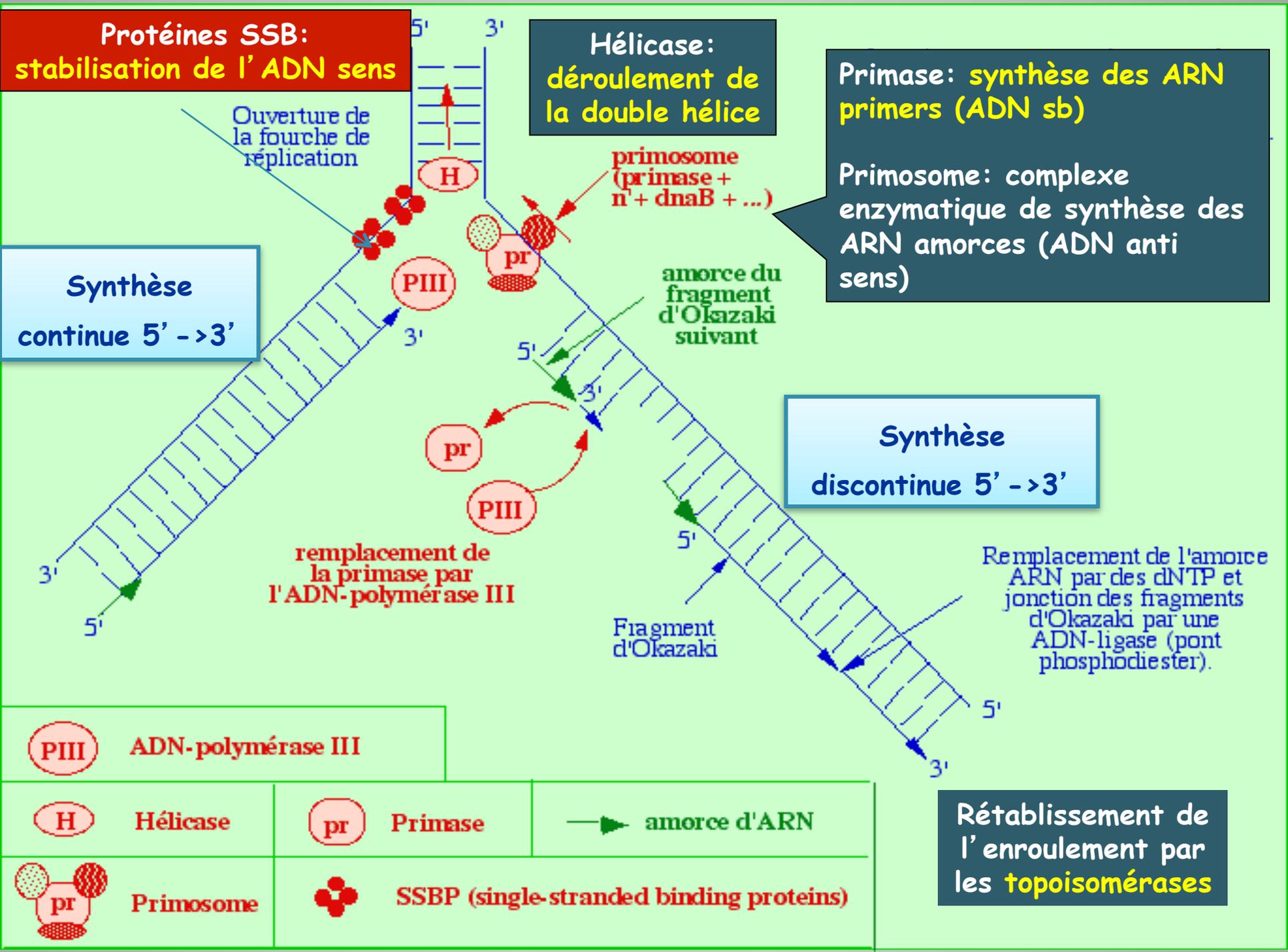
# Contrôle du taux de surenroulement de l'ADN



L'inhibition de l'activité des enzymes est létale pour les bactéries d'où l'effet d'un certain nombre d'antibiotiques, aminocoumarines, les quinolones et les fluoroquinolones.

# Enzymes de la réplication

Enzyme	Fonction
ADN polymérase III (pol III)	Principales enzymes de polymérisation
ADN polymérase I (pol I)	Excise l' amorce ARN et remplit les trous
Hélicase (dnaB)	Déroule la double hélice à la fourche de réplication
Primase (dnaG)	Amorce les nouveaux brins d' ADN
Protéines se liant à l' origine de réplication (dnaA)	Facilite la fusion pour ouvrir le complexe
Protéines se liant à l' ADN simple brin (Ssb): Déroulase	Empêche le réappariement des brins de l' hélice ouverte
ADN ligase (ligA, ligB)	Soude les coupures dans l' ADN
Gyrase	Réduit les torsades formées par la progression de la fourche et catalyse le superenroulement de l' ADN répliqué
Topoisomérase I	Régule l'état d'enroulement de l'ADN



**Protéines SSB: stabilisation de l'ADN sens**

**Hélicase: déroulement de la double hélice**

**Primase: synthèse des ARN primers (ADN sb)**

**Primosome: complexe enzymatique de synthèse des ARN amorces (ADN anti sens)**

**Synthèse continue 5' ->3'**

**Synthèse discontinue 5' ->3'**

**Rétablissement de l'enroulement par les topoisomérases**

Ouverture de la fourche de réplication

primosome (primase + n + dnaB + ...)

amorce du fragment d'Okazaki suivant

remplacement de la primase par l'ADN-polymérase III

Fragment d'Okazaki

Remplacement de l'amorce ARN par des dNTP et jonction des fragments d'Okazaki par une ADN-ligase (pont phosphodiester).

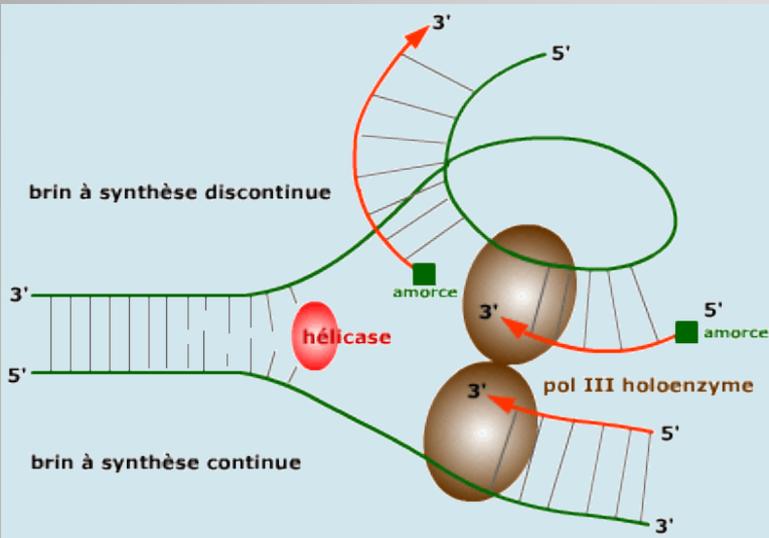
PIII ADN-polymérase III

H Hélicase pr Primase amorce d'ARN

pr Primosome SSBP (single-stranded binding proteins)

# Mécanisme de synthèse des deux brins d'ADN en même temps

- Formation d'une boucle par le brin à synthèse discontinue, sur un tour complet
- Tour de 180° du fragment d'Okazaki en cours de synthèse le plaçant dans la même orientation que le brin à synthèse continue



Synthèse d'ADN asymétrique et simultanée sur les deux brins



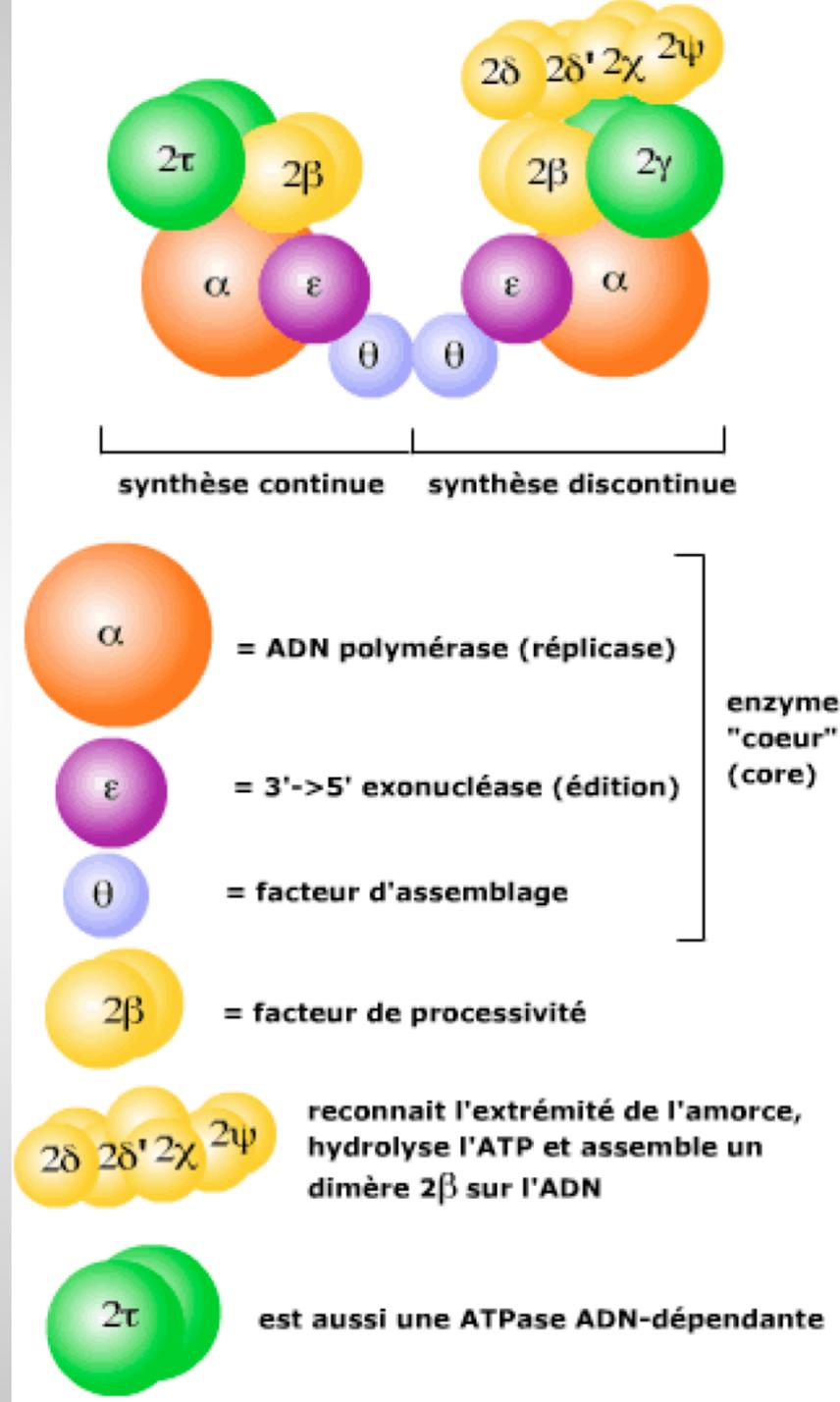
Complexe enzymatique (ADN polymérase III) avec deux sites catalytiques liés se déplaçant à la même vitesse dans une seule et même direction.

# ADN-polymérase III holoenzyme

Chez *E. coli*, la dissymétrie de fonctionnement de l'ADN-pol III (réplicase) correspond à une dissymétrie de composition en 2 complexes enzymatiques formés d'une dizaine de sous-unités différentes.



l'un assure la synthèse du brin continu et l'autre la synthèse du brin discontinu



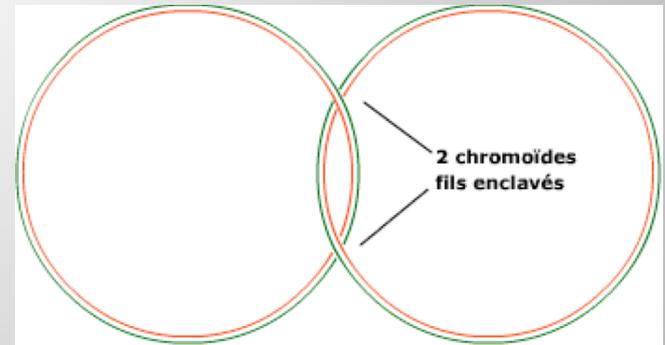
### 3- Terminaison de la réplication

Au niveau d'une séquence TER située à l'opposé de l'origine de réplication reconnu par la protéine Tus qui met fin à la réplication

Mécanisme fait intervenir d'autres protéines

❖ Lorsque la réplication d'un chromosome circulaire est terminée, les 2 molécules obtenues sont reliées ensemble, comme les maillons d'une chaîne.

>>> La séparation se fait par une **topoisomérase**



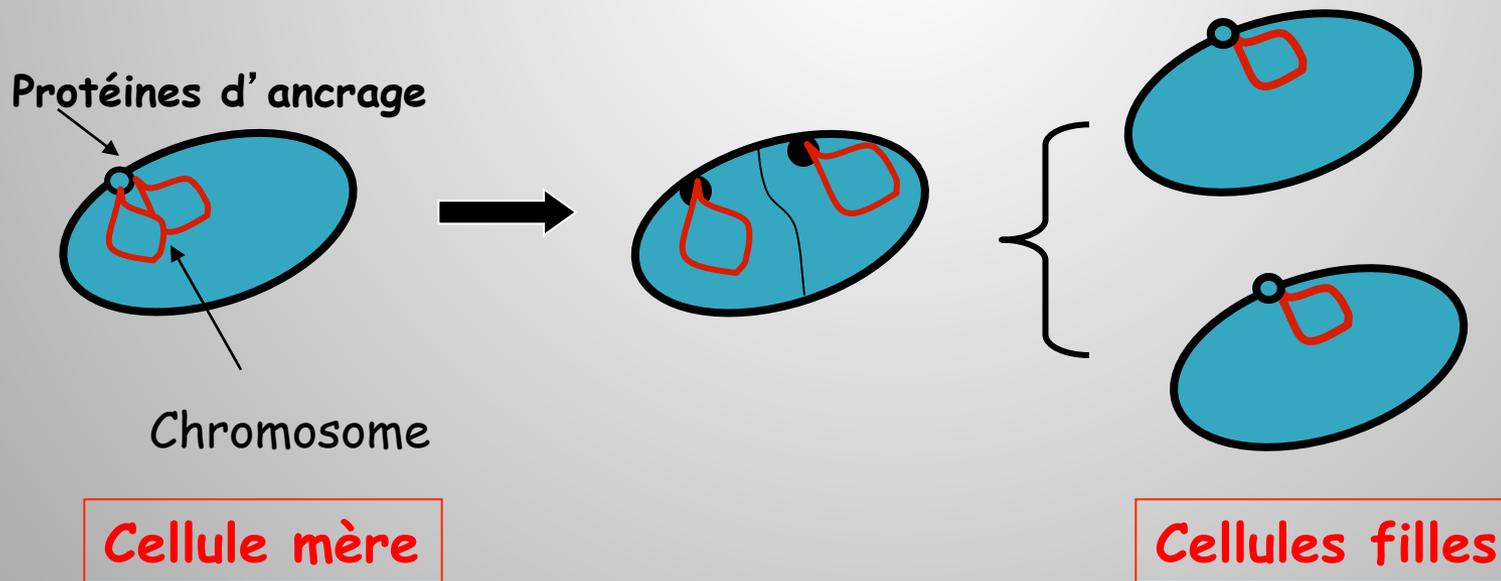
❖ lors de la rencontre de 2 fourches de réplication, la Topoisomérase type IV assure la ligature

# IV- Réplication et division cellulaire

Modèle de partition des 2 molécules d'ADN entre les 2 cellules filles:

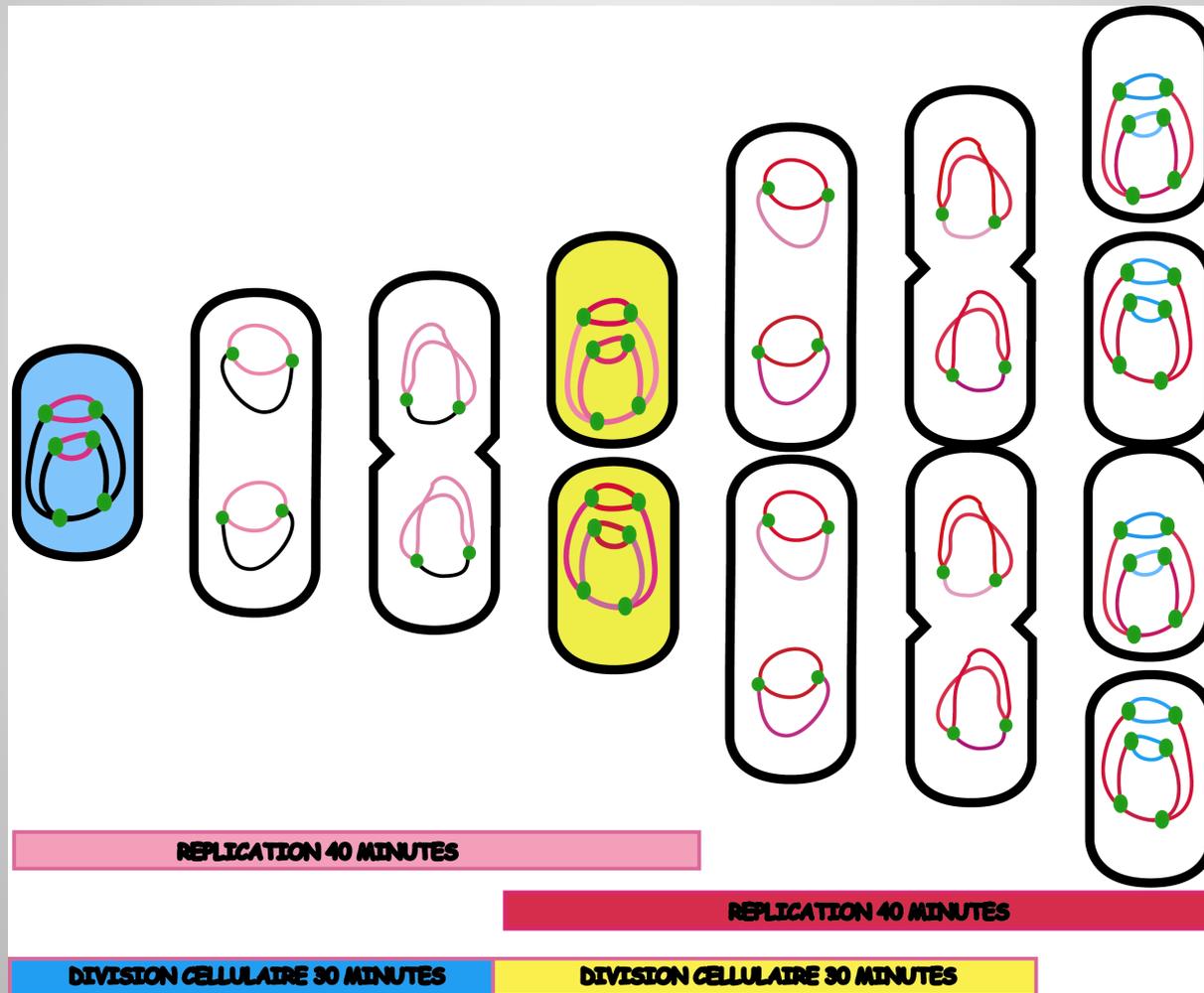
- ADN reste attachée à une protéine membranaire
- Les 2 ports d'attachement se séparent
- La membrane se divise en entraînant chacun une molécule d'ADN vers une cellule fille.

Synchronisation avec un système complexe de régulation



# Réplication de l'ADN et division cellulaire

Une cellule peut se diviser en un temps plus court que le temps de réplication de l'ADN



Expérimentalement, on peut provoquer la partition inégale chez les bactéries en utilisant des mutants.

## Séparer la division cellulaire de la réplication :

- ◆ en empêchant la division cellulaire, on obtient des cellules avec plusieurs chromosomes (les minicells)
- ◆ en empêchant la réplication, on obtient des bactéries sans chromosome, des sacs à protéines (maxicells)

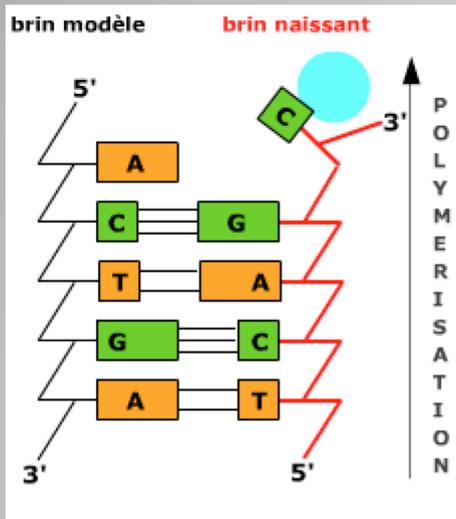
# V- Fidélité de la réplication de l'ADN: Correction des erreurs d'élongation PROOFREADING

**C'est la correction d'une absence de complémentarité entre les nucléotides de 2 brins d'ADN**

Taux de mutation faible de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  erreurs/paire de bases insérées grâce à:

- Règles d'appariement des bases sur le modèle du brin matriciel
- Activité correctrice des enzymes Pol I et III
  - ➔ Activité *exonucléasique*  $3' \rightarrow 5'$  (enlever un nucléotide mal apparié et remplacer par le bon nucléotide)
- Existence d'un *système multi enzymatique* comprenant une *endonucléase* associée à une *exonucléase bidirectionnelle* ( $3' 5'$  et  $5' 3'$ ), à une *ligase* et à une *ADN pol III*.

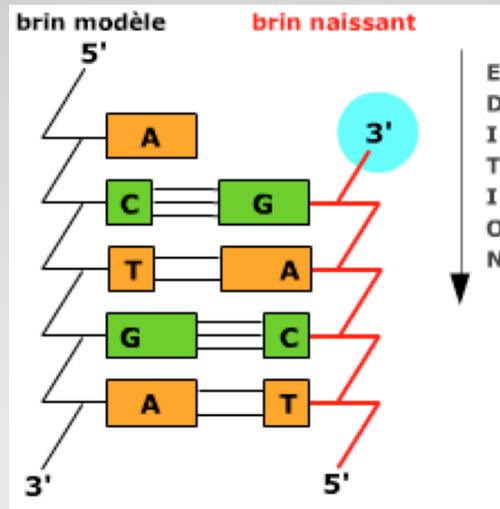
# Correction d'épreuves (édition)



Mésappariement



Arrêt de l'élongation



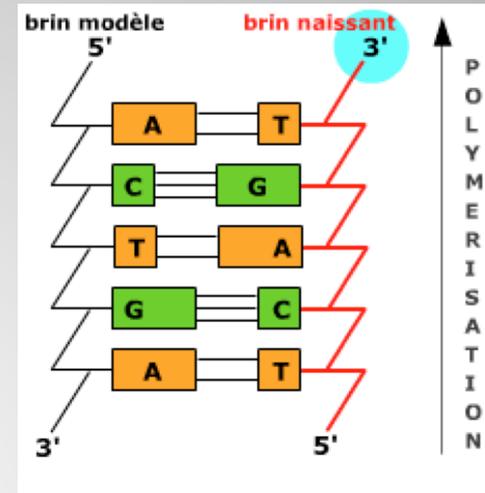
Elimination du mésappariement



La polymérase se réassocie au modèle-amorce corrigé

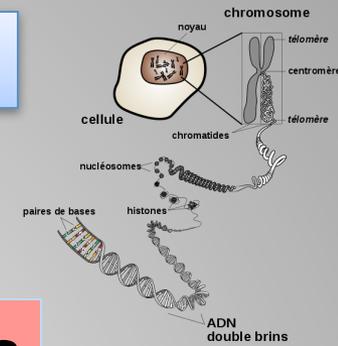


L'extrémité 3'-OH du brin naissant se positionne correctement dans le site catalytique de l'enzyme



Reprise de l'élongation

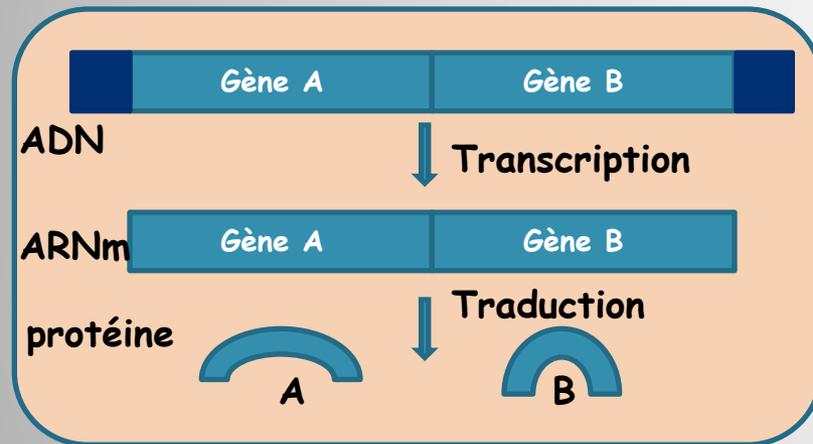
# Génétique des procaryotes et des eucaryotes



Différences dues

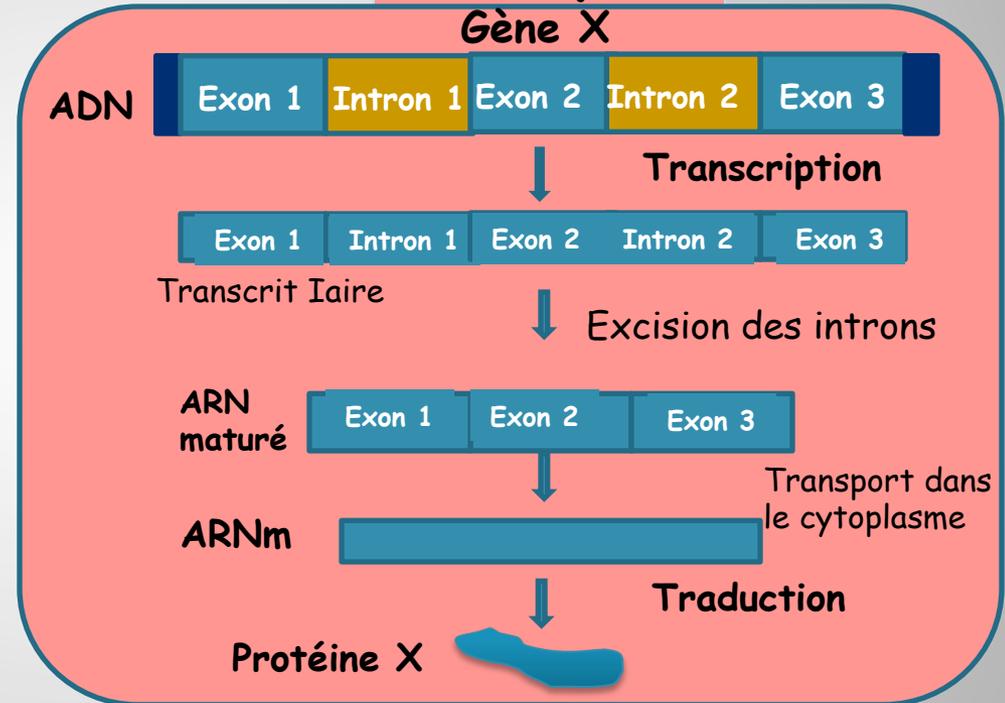
- à la présence d'un noyau chez les eucaryotes
- à une organisation différente de l'ADN (introns et exons)

## Procaryote



- ADN **circulaire** dans le cytoplasme
- Toutes les régions d'ADN sont codantes

## Eucaryote



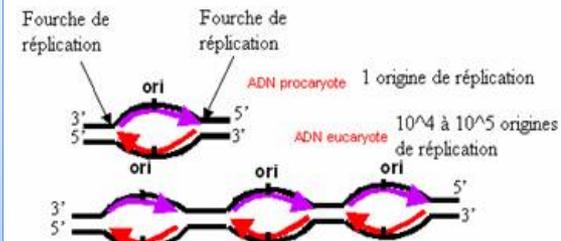
- ✓ ADN linéaire individualisé sous forme de chromosomes dans le noyau
- ✓ Séparation spatiale de la transcription et la traduction, ARNm passe dans le cytoplasme

# VI- Réplication chez les eucaryotes:

Même système que celui des procaryotes avec le brin avancé et le brin retardé >>> **Mais, quelques différences**

- ADN plus long

- Plusieurs **origines de réplication** activées de manière synchronisée et progressant à la même vitesse (50 nucléotides/s)



- Plusieurs polymérases agissant simultanément tout en ayant des fonctions différentes:

α: synthèse de l' amorce, élongation et réparation de l' ADN;

β: réparation de l' ADN,

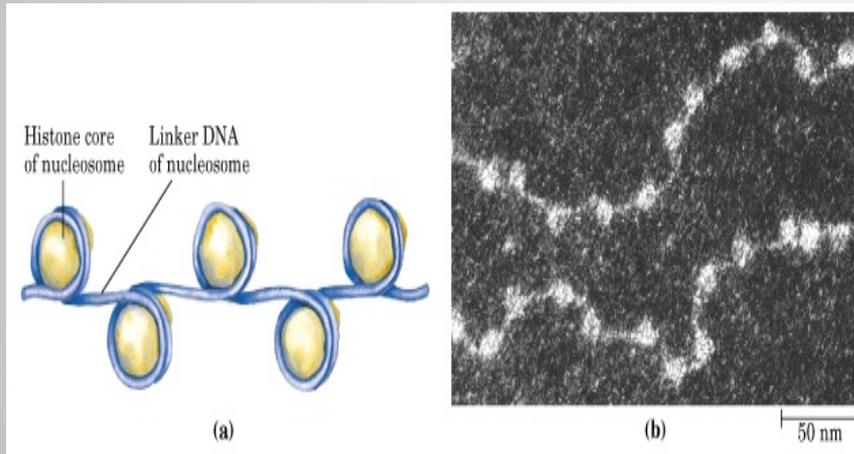
γ: réplication de l' ADN mitochondriale ...

δ: Elongation des brins plus réparation de l' ADN

ε: Réparation et remplacement de l' ARN au niveau du brin retardé (Similaire à Pol I )

- L'ADN est intégré dans la chromatine associée aux histones.

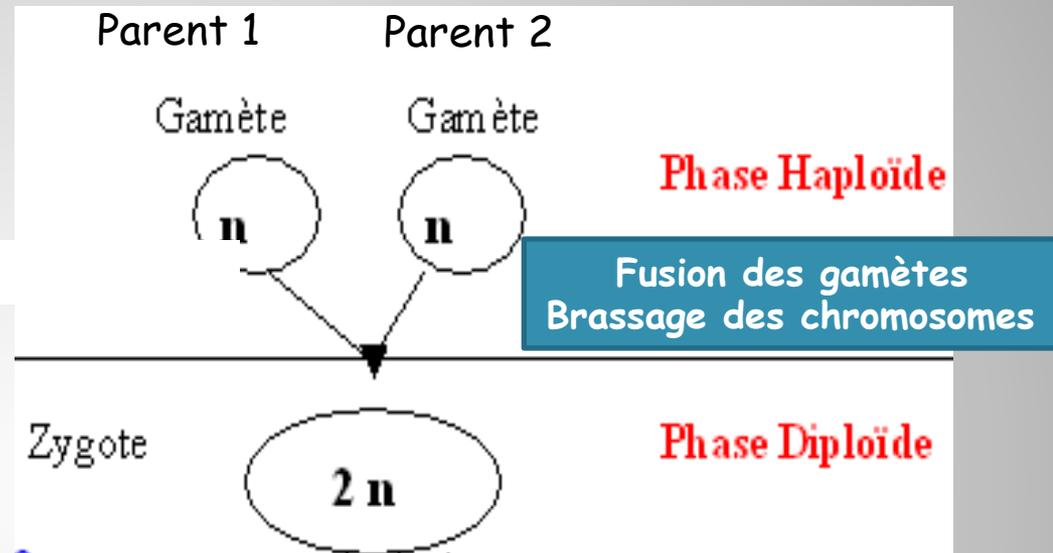
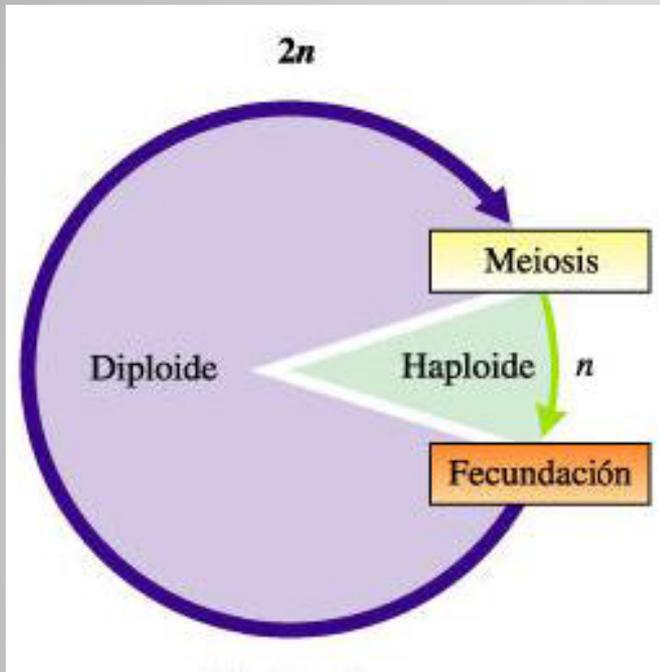
Donc, au moment de la réplication, il y a production d'histones >>>> duplication de la masse d'histones aussi.



Structure complexe des chromosomes (chromatine et protéines histones)

Structures complexes discoïdes autour desquelles est entouré l'ADN : **nucléosomes** constituent une barrière ralentissant la polymérase (faible vitesse de progression de la fourche de réplication)

# Division cellulaire chez les eucaryotes

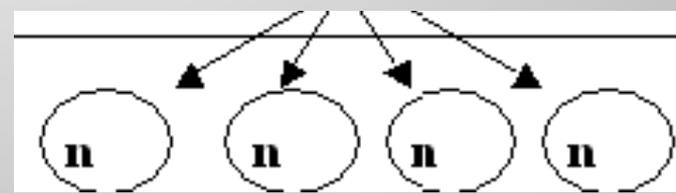


Mitoses

Organisme diploïde

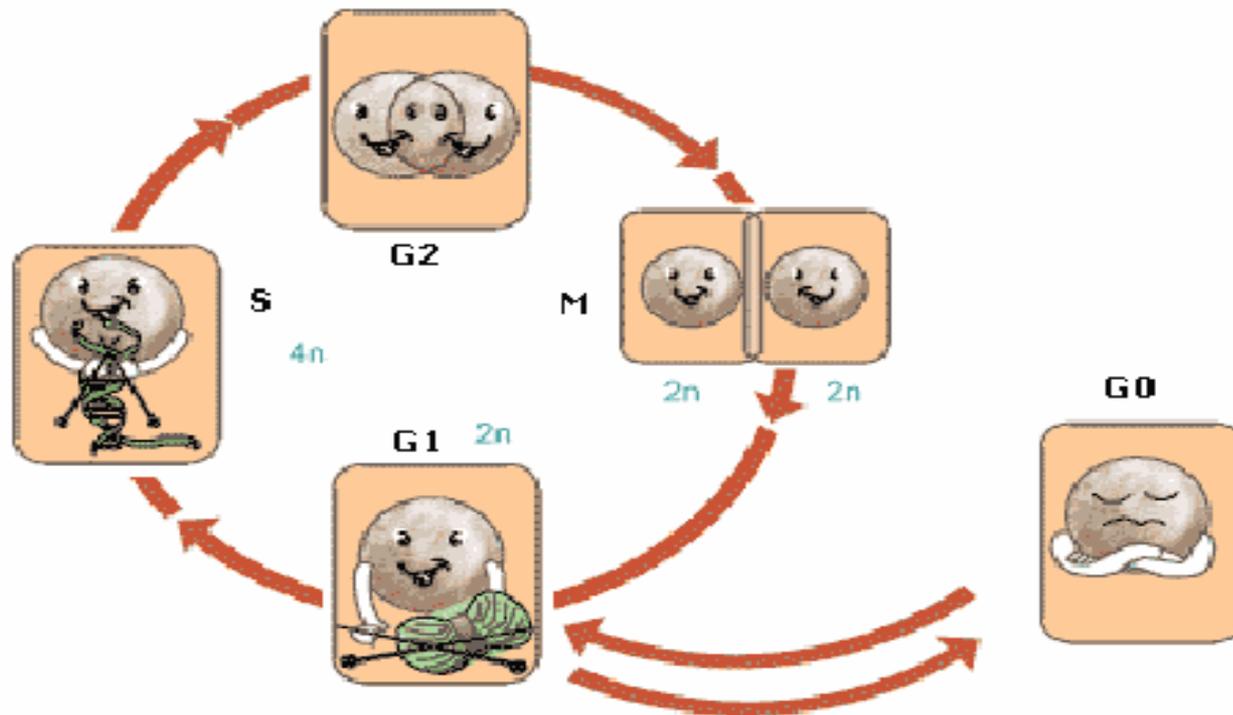
Méiose

Recombinaison méiotique



Cycle sexuel chez les eucaryotes

# Synthèse d'ADN uniquement pendant la phase S du cycle cellulaire



## 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