Faculté des Sciences - Rabat

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire

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

Filière SVI - S6

Module de Génétique et Biologie Moléculaire – M21

Elément 2: Biologie Moléculaire – Pr. Bouchra BELKADI

Partie 2:
Expression génétique
Réplication

Année universitaire 2009-2010

belkadibouchra@yahoo.fr

Plan

Introduction : Le Dogme Central

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

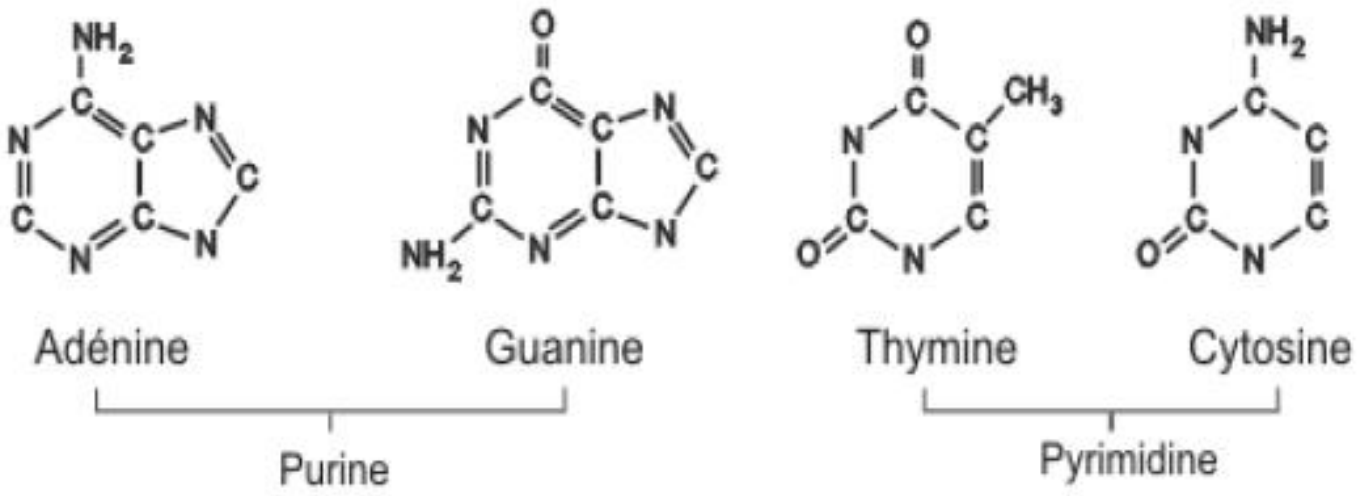
INTRODUCTION

Macromolécules et informations génétiques

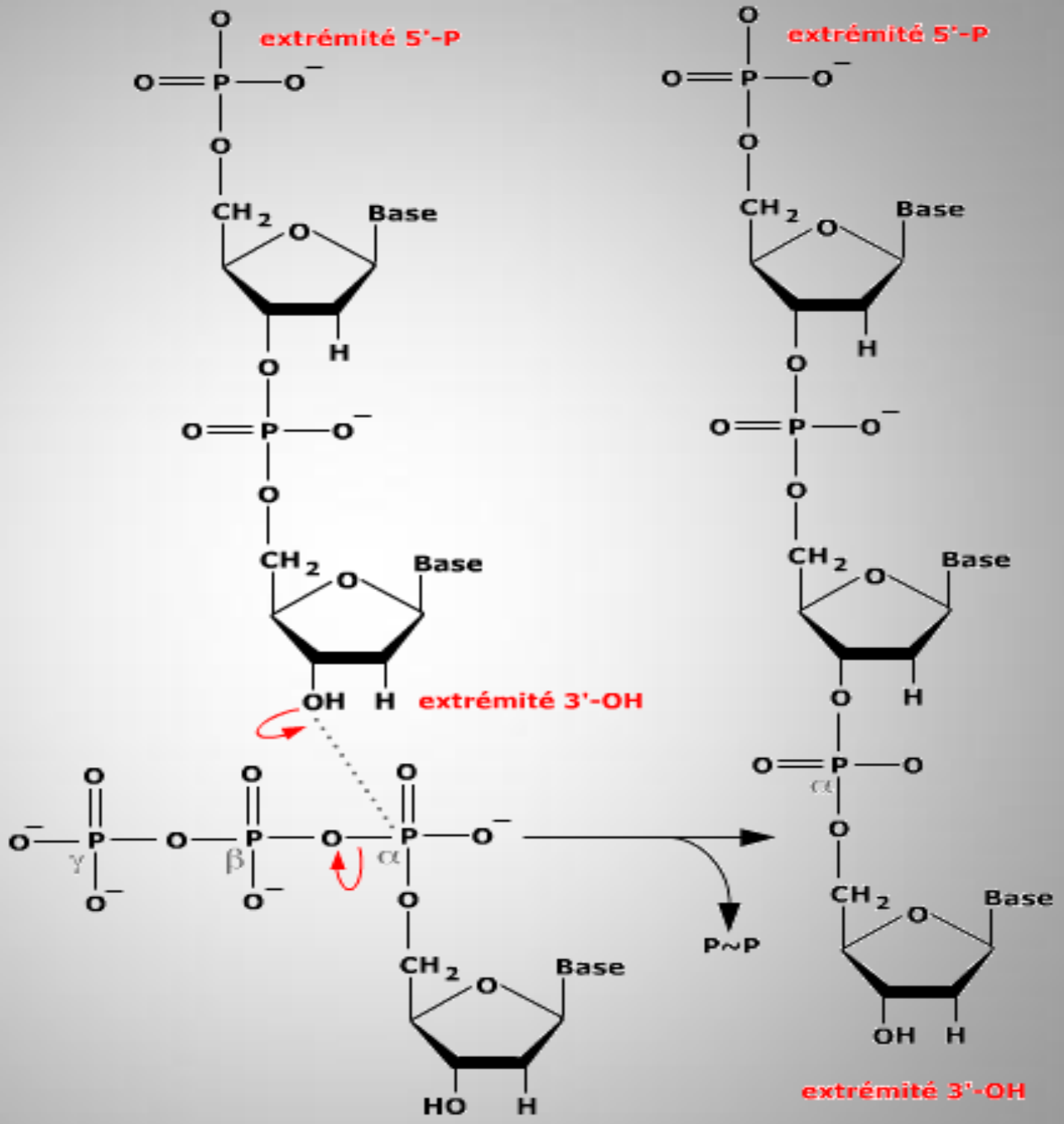
Génome: ensemble de gènes

Gène: unité fonctionnelle de l'information génétique.

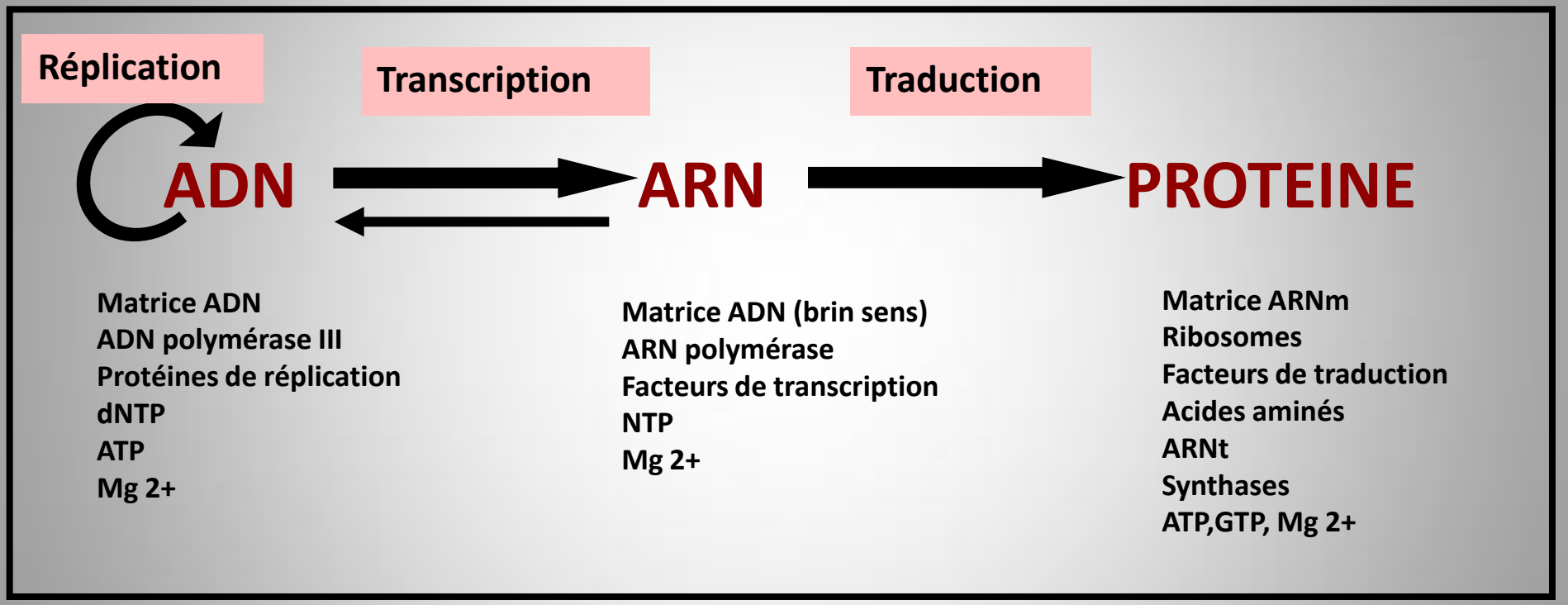
Composition: acides désoxyribonucléiques (ADN), séquences de bases puriques (Adénine, Guanine) et pyrimidiques (Thymine, Cytosine)



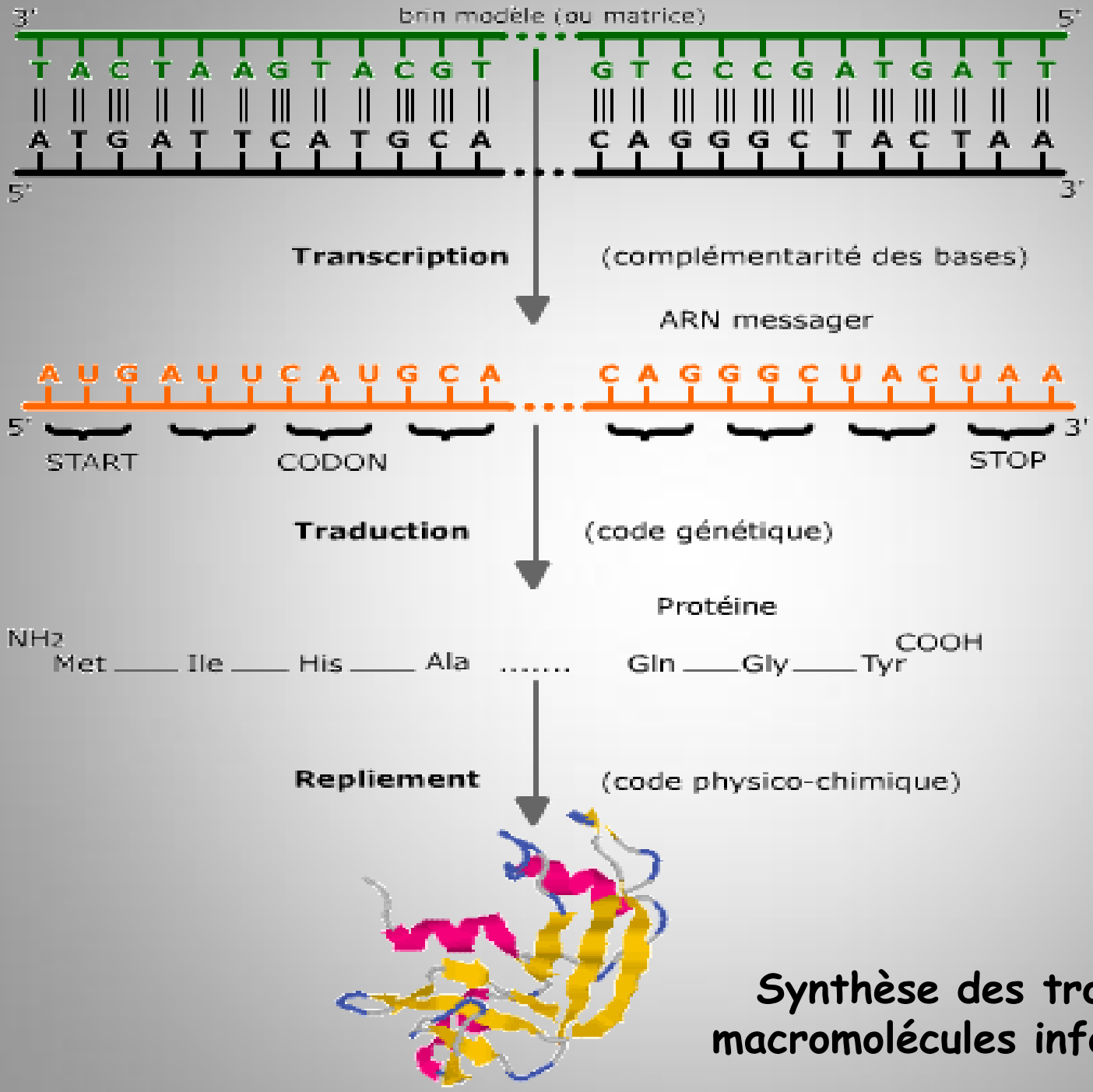
Formation de la liaison phosphodiester



Le dogme central



Le flux de l'information génétique est unidirectionnel



ADN double brin

ARN messager

20 aa possibles

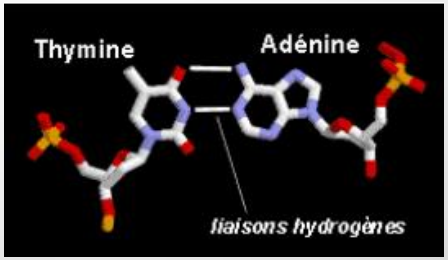
Synthèse des trois types de macromolécules informationnelles

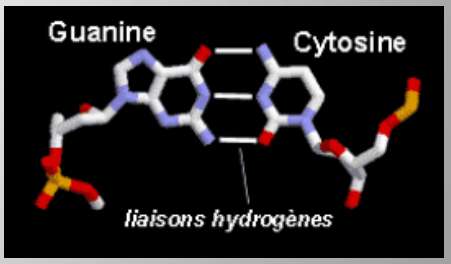
Réplication

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 = T
  - C ≡ G



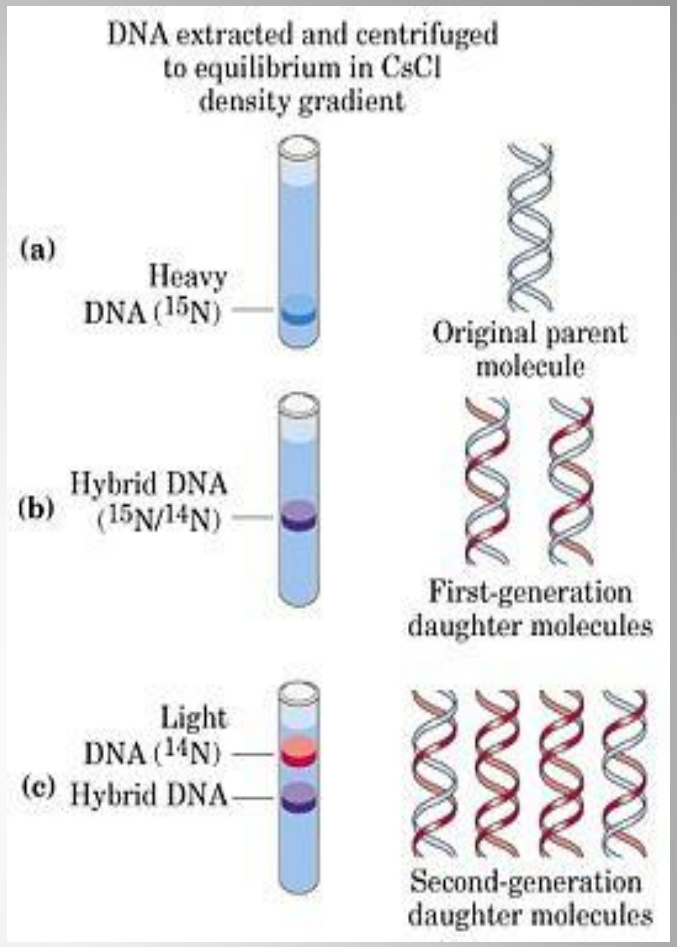


  - Réplication est semi-conservative

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

➡ **Non à la réplication conservative**

Deuxième réplication
l'apparition de molécules de deux poids différents



Expérience de Meselson-Stahl avec *E. Coli*

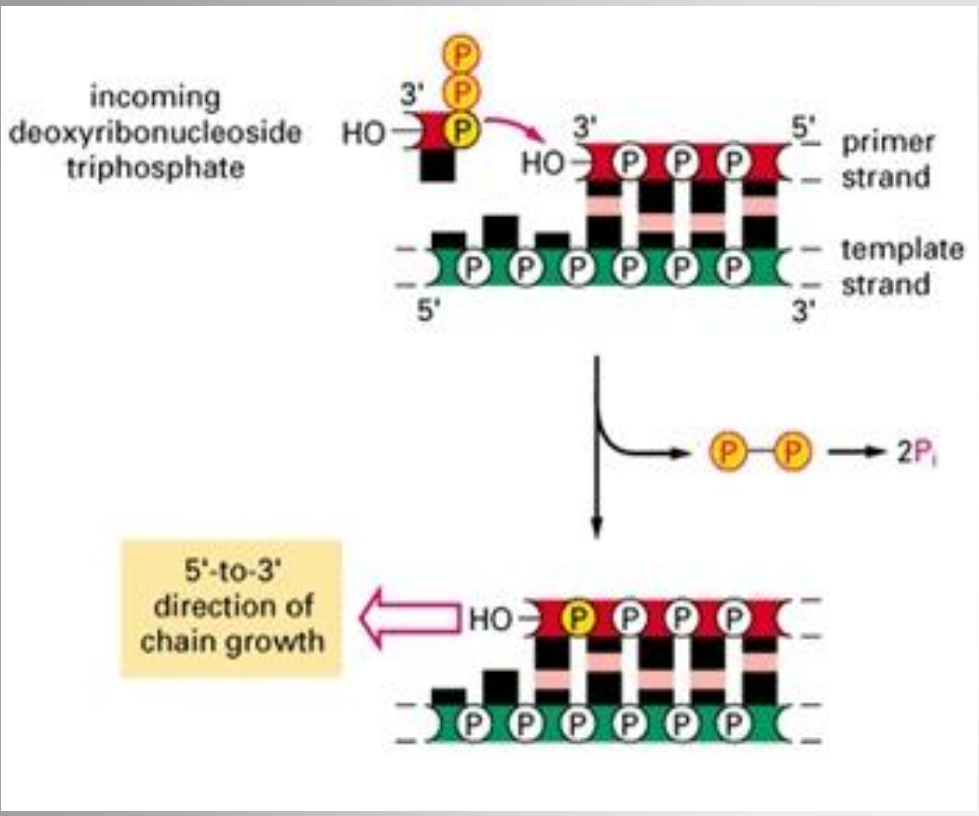
Réplication semi-conservative
la molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complétée par une chaîne nouvellement synthétisée.

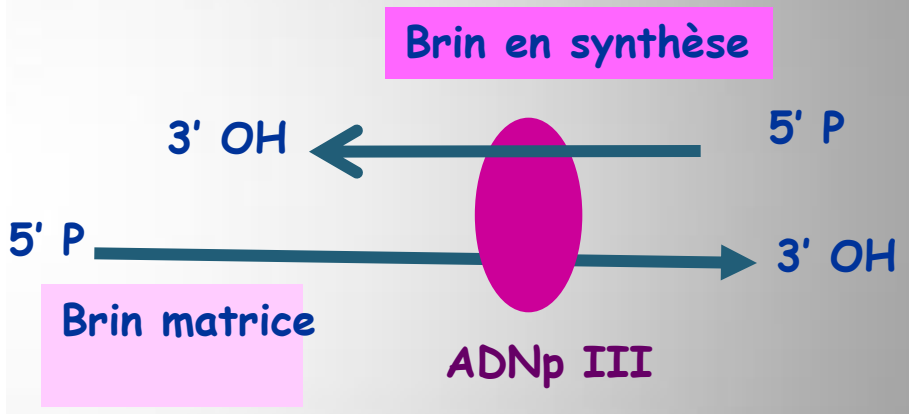
- Réplication est une réaction rapide:

  - Bactéries: 1000 pb/sec/fourche, Chromosome unique avec $4,4*10^6$pb copié par 2 fourches (nécessité de 40 min)

  - Cellules humaines: 100 pb/sec, le génome humain fait $3*10^9$ 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-->3'OH

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

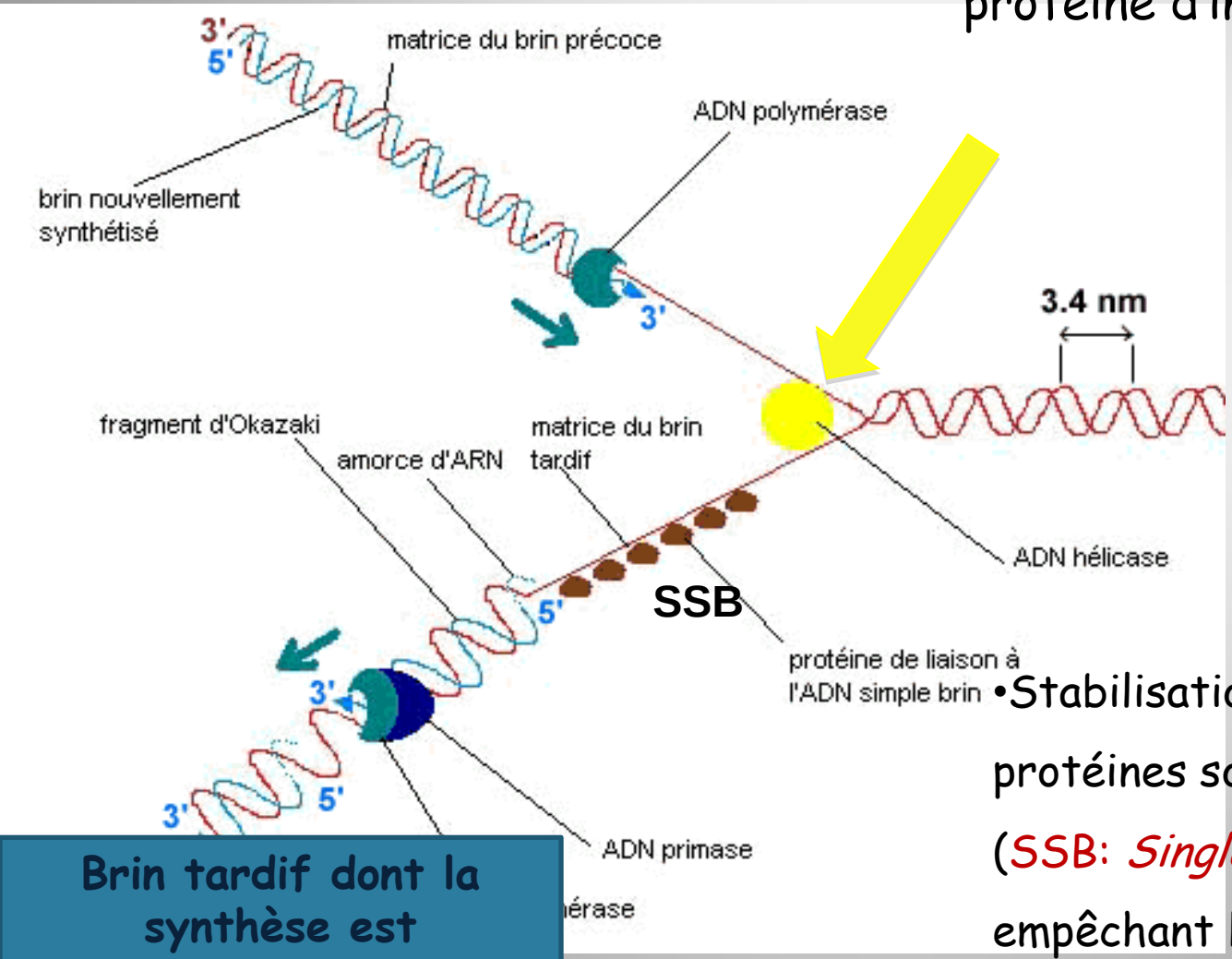
- nécessité d'avoir une amorce
- dernier résidus de l'amorce doit être apparié et avoir un groupement 3'OH libre
- Présence de nucléotides et du magnésium Mg2+ dans le milieu

•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



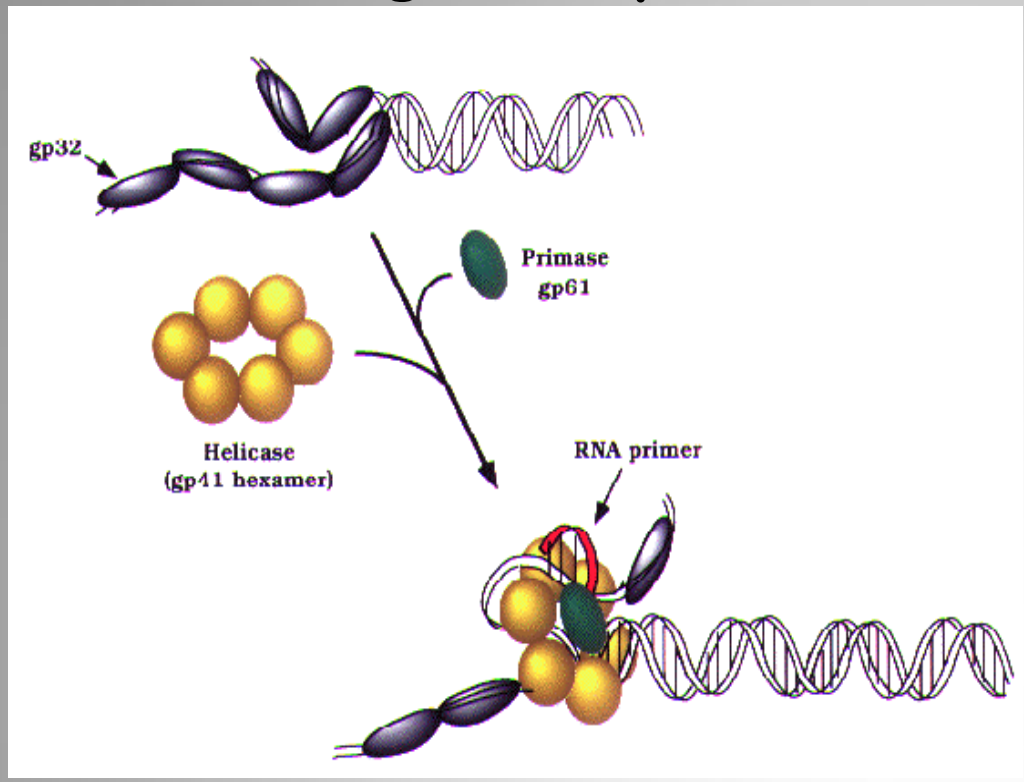
Brin tardif dont la synthèse est

• Déroulement de la double hélice par une Hélicase qui se fixe sur la protéine d'initiation

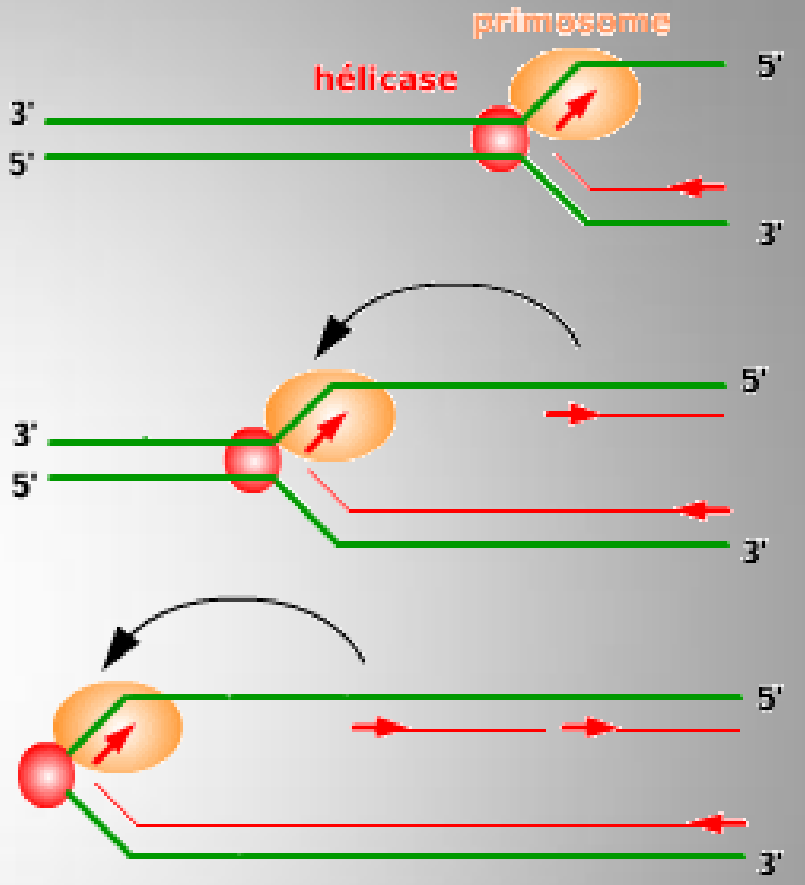
3 étapes:
- **initiation,**
- **élongation**
- **terminaison**

•Stabilisation d'ADNs par des protéines sous forme simple brin (SSB: *Single Strand Binding protein*) empêchant le réappariement

Assemblage d'un primosome



Déplacement du primosome



Réplisome contient:

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

III- Réplication chez les procaryotes:

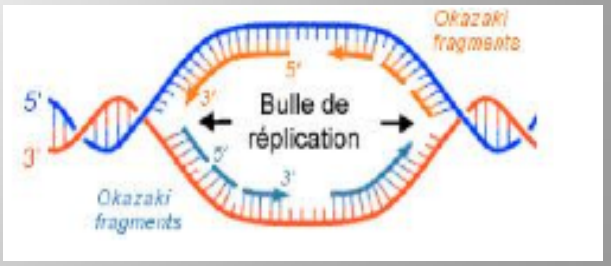
1- Initiation de la réplication:

- Origine de la réplication **Ori C** ou **Ori V** (plasmide)

- Séquence de 300 pb environ formée de séquences répétitives, flanquée de séq riches en AT, reconnue 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.



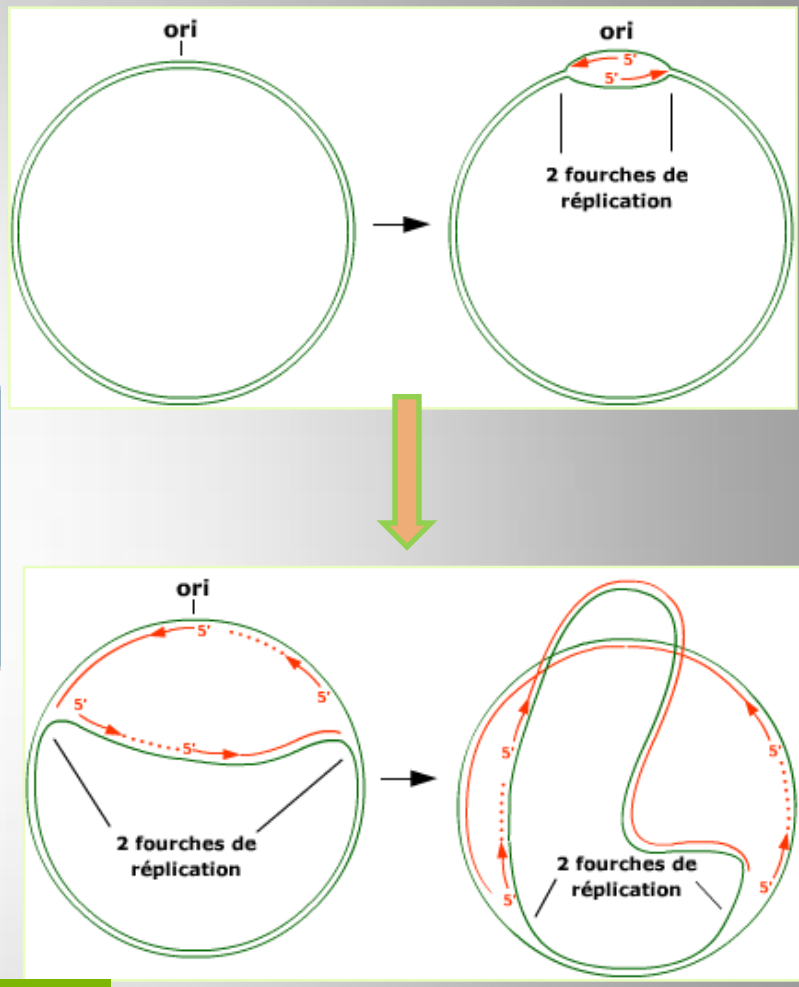
Réplication de l'ADN circulaire: structure thêta

***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.

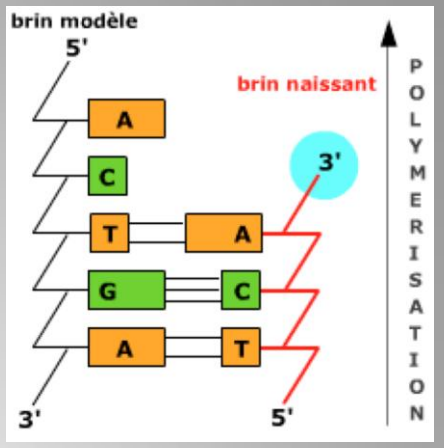
***Elongation** :Au niveau de chaque fourche, la synthèse d'ADN est semi-conservative et semi-discontinue



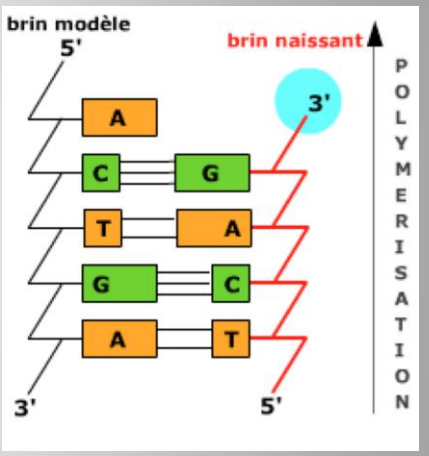
Dans un système de réplication bidirectionnelle, chacun des deux brins néosynthétisés est donc produit pour moitié par synthèse continue et pour l'autre moitié par synthèse discontinue.

2- Élongation de la réplication:

Les polymérases ont 2 rôles:



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

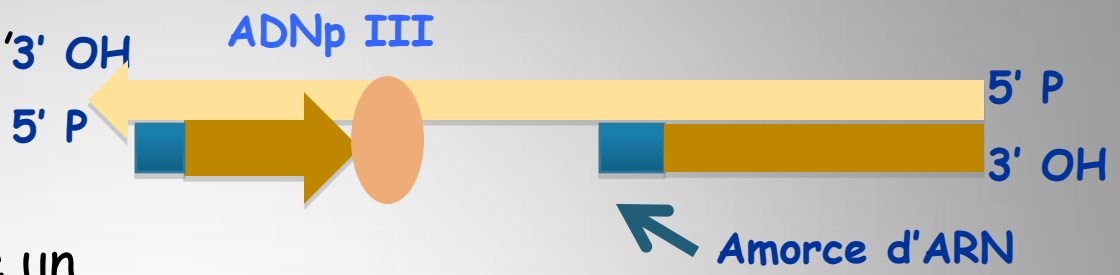


2- Dégradation des amorces ARN grâce à son activité d'exonucléase 3'->5' et resynthèse de la partie manquante pour assurer la fidélité de la réplication (ADN pol I).

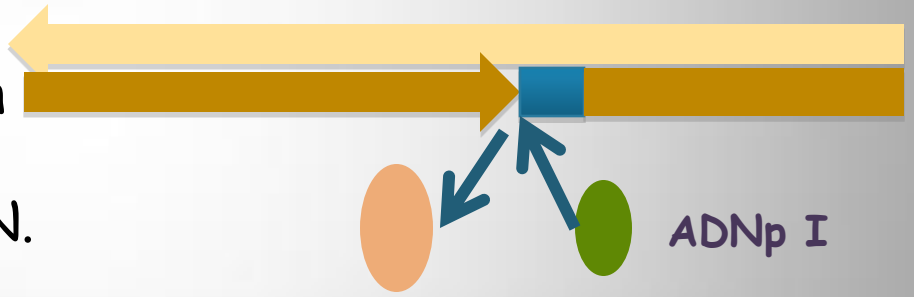
Assemblage de deux fragments sur le brin retardé

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

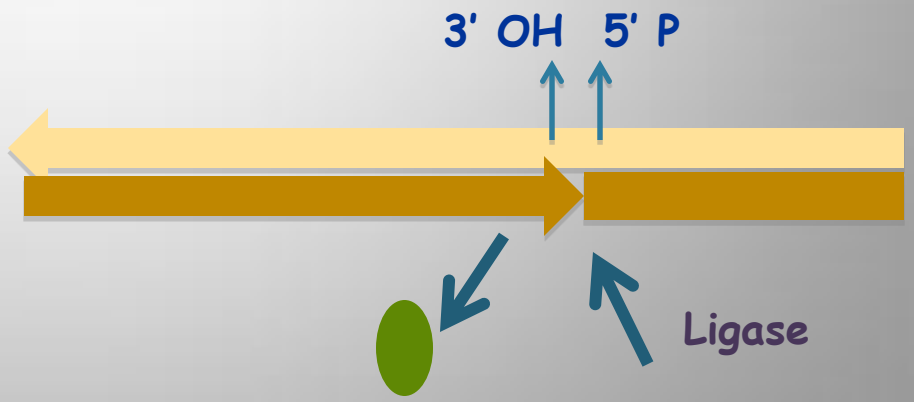
>>> Synthèse jusqu'à atteindre un ADN précédemment synthétisé.



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

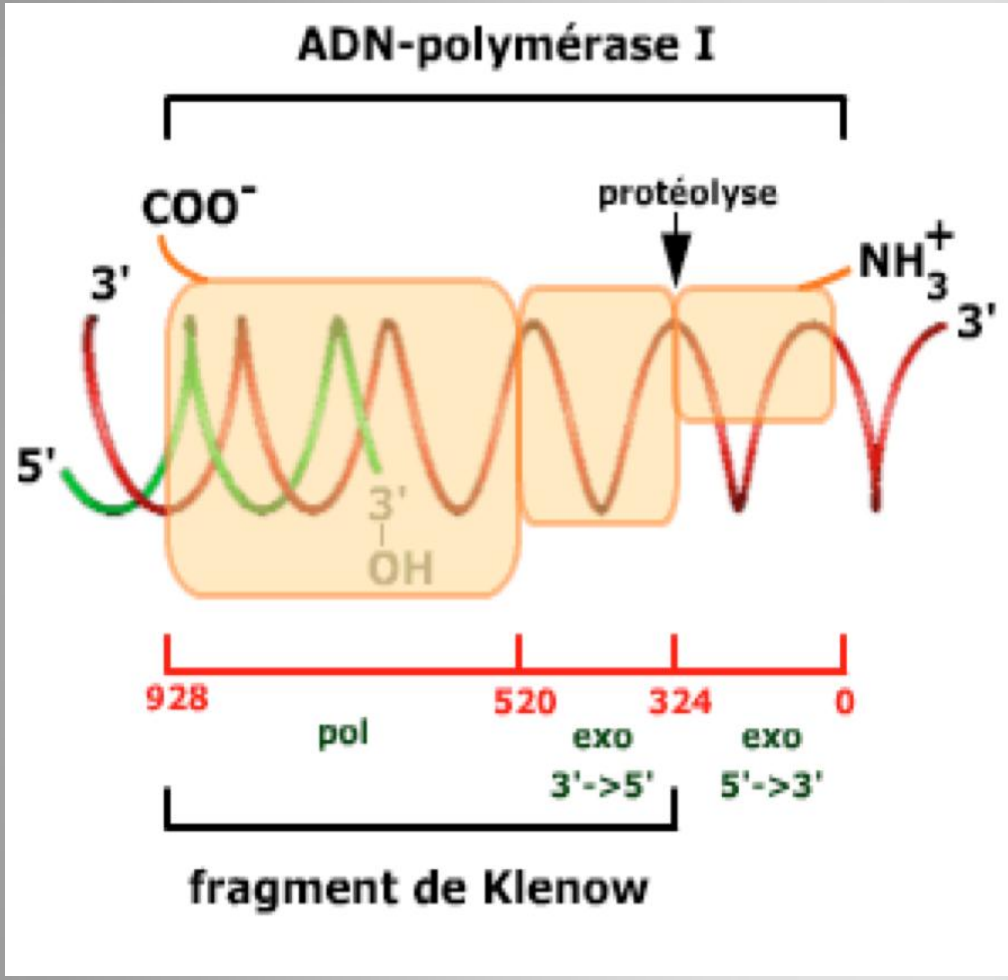
Fonction	Type I	Type III
Polymérase 5'->3'	+	+
Exonucléase 3'->5'	+	+
Exonucléase 5'->3'	+	-
Matrice amorce:		
Double brin	-	-
Simple brin + amorce	+	+
Double brin avec coupure	+	-
Activités		
Vitesse (Kpb/min)	0,67	100
Nombre (molécules/cellule)	400	10 à 20

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*



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

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

- Le gros domaine C-terminal possède l'activité de polymérisation, orientée de 5'->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

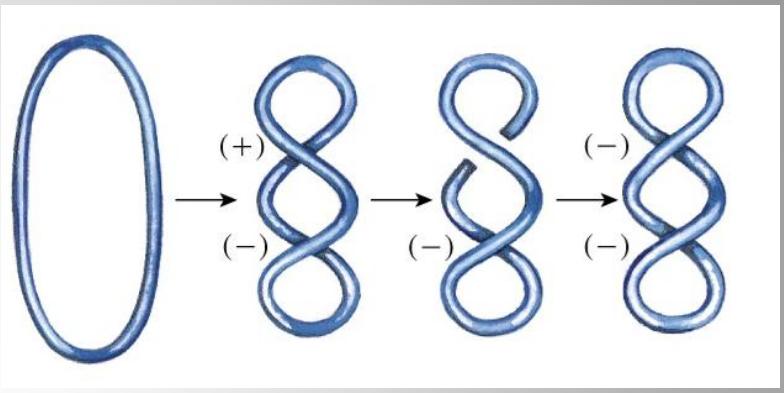
L'ADN gyrase : topoisomérase type II: Catalyse le croisement de brins

- Introduction de super-tours négatifs dans l'ADN,

- Coupure des 2 brins parentaux

- Séparation

Donc retour à l'état relâché d'ADN

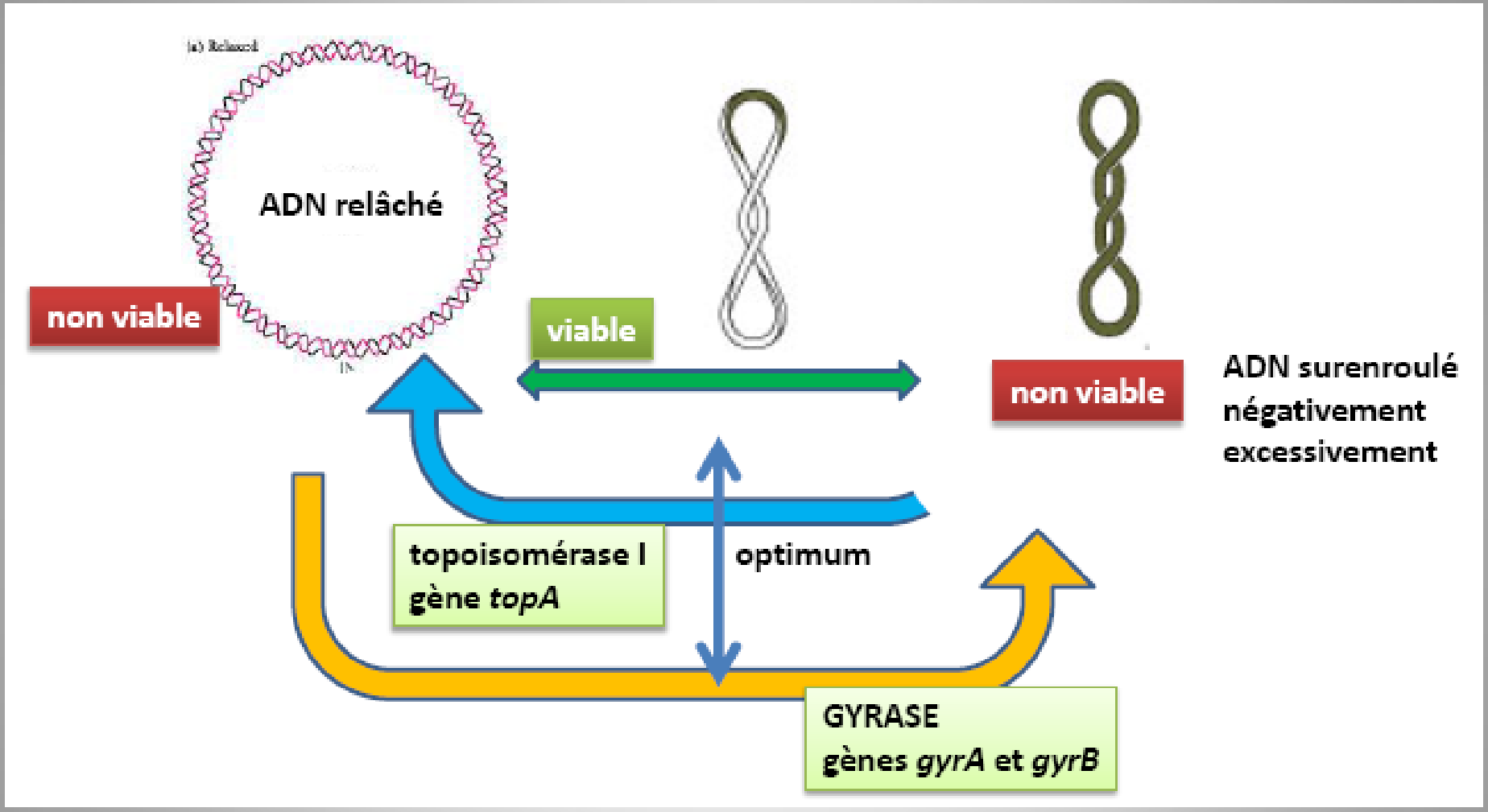


Mécanisme d'action de la gyrase sur un ADN circulaire

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

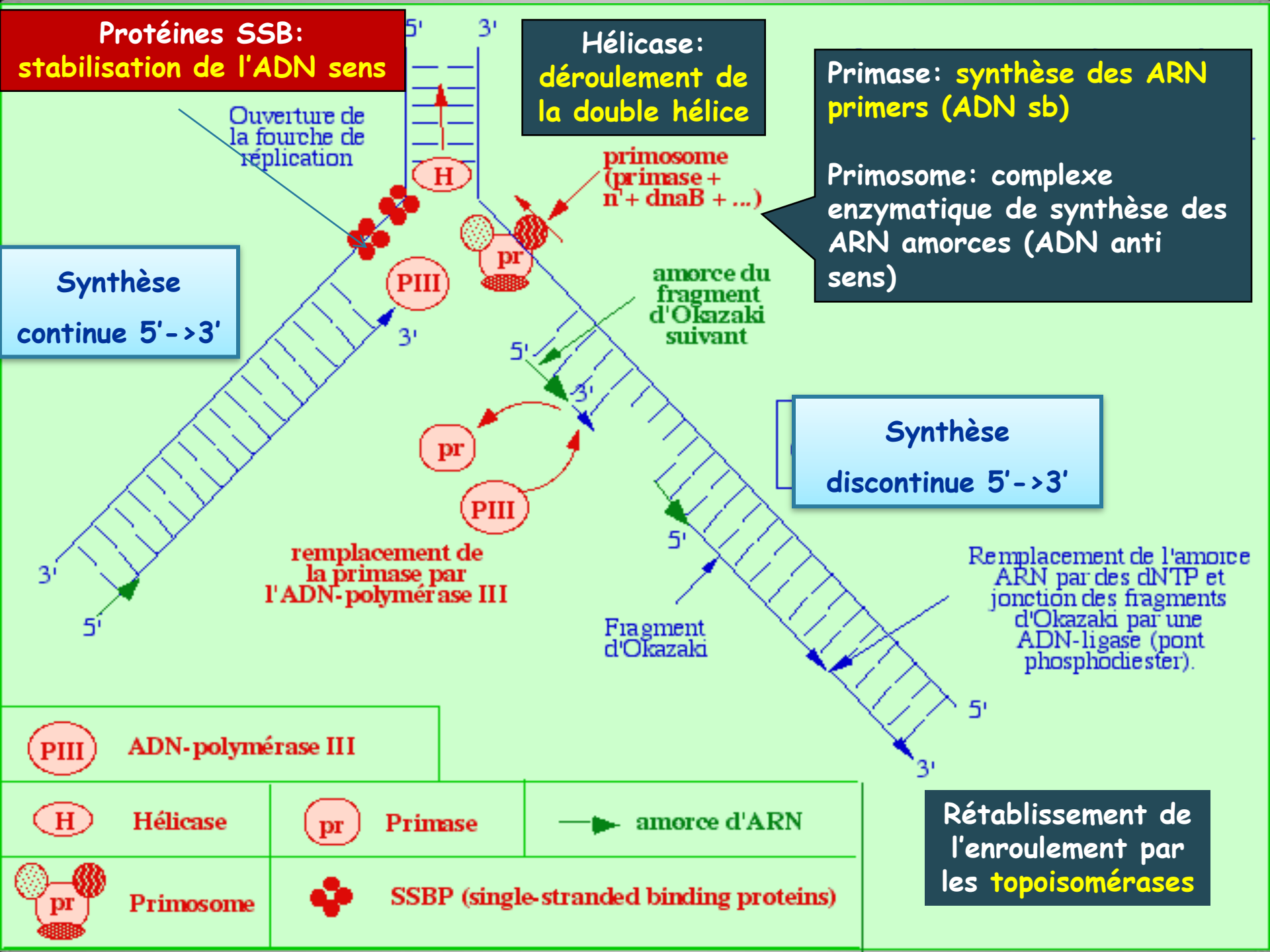
Contrôle du taux de surenroulement de l'ADN



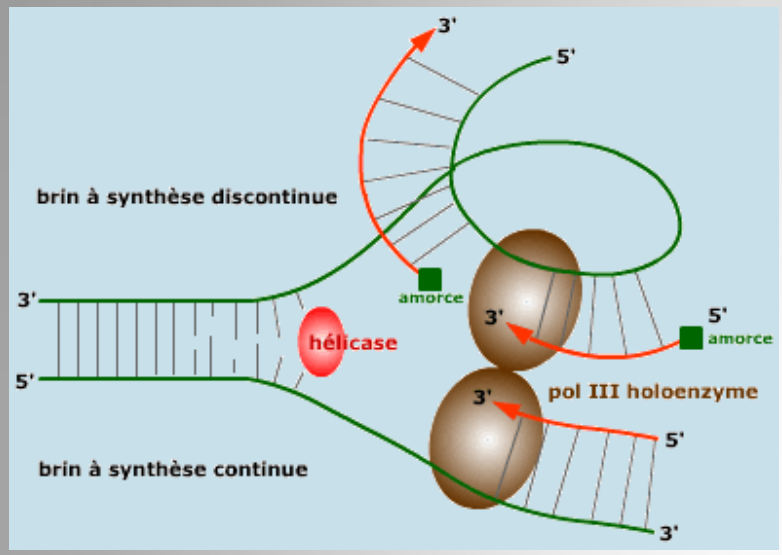
L'inhibition de l'activité des enzymes est létale pour les bactéries d'où l'effet d'un certain nombre d'antibiotiques, aminocoumarines, les quinolones et les fluoroquinolones.

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)	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


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'
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).
Rétablissement de l'enroulement par les topoisomérases
ADN-polymérase III
Hélicase
Primase
amorce d'ARN
Primosome
SSBP (single-stranded binding proteins)

Mécanique 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

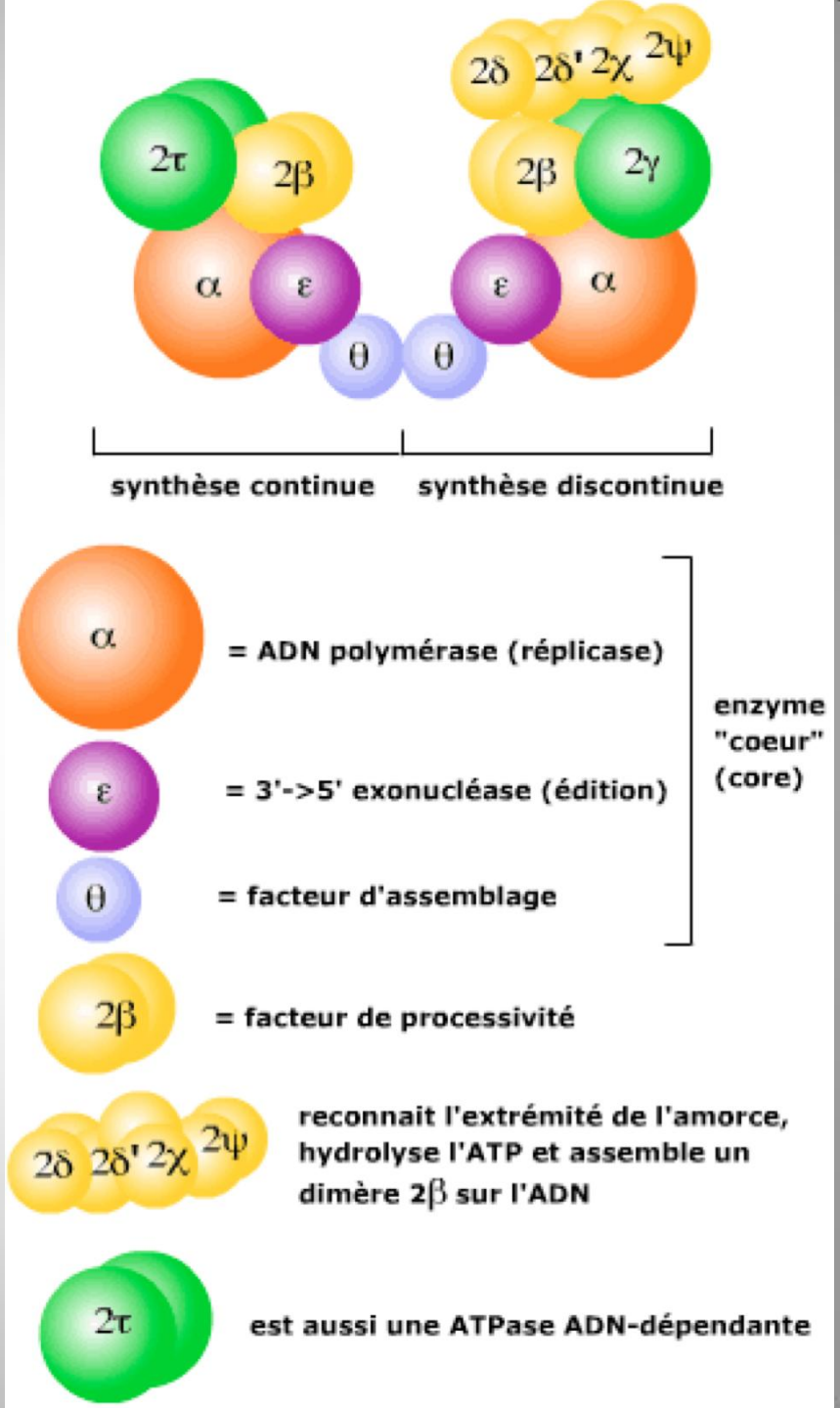
Synthèse d'ADN assymétrique et simultanée sur les deux brins

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 fonctionnementde 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



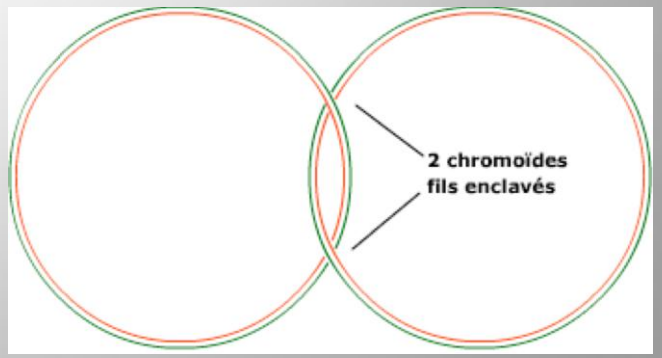
3- Terminaison de la réplication

- 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

- Rencontre de 2 fourches de réplication (Topoisomérase type IV assure la ligation)

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

>>> La séparation se fait par une topoisomérase

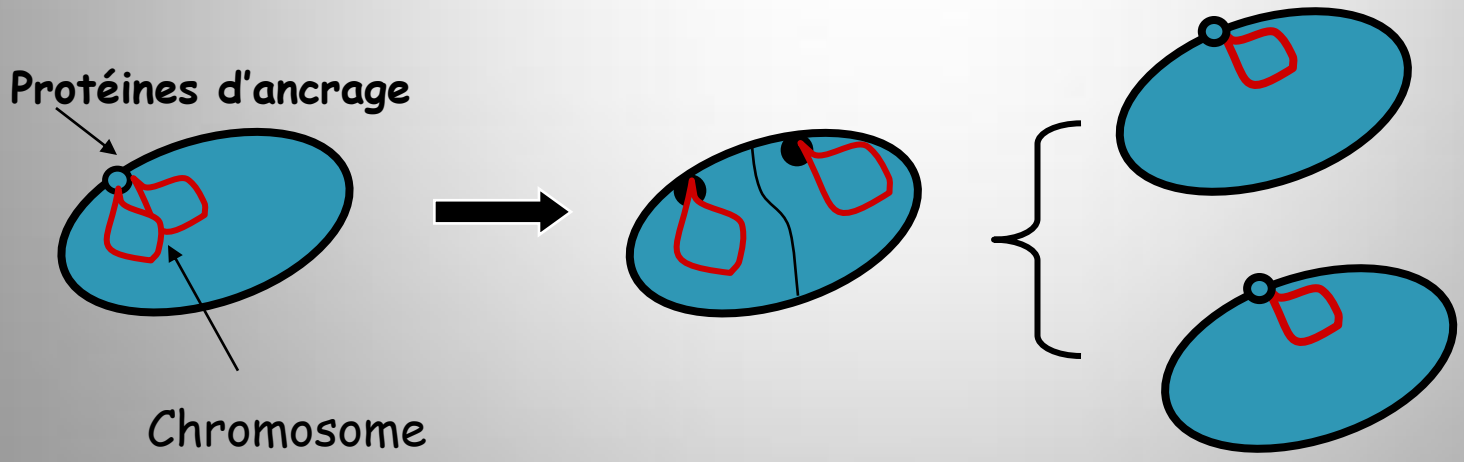


IV- Réplication et division cellulaire

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

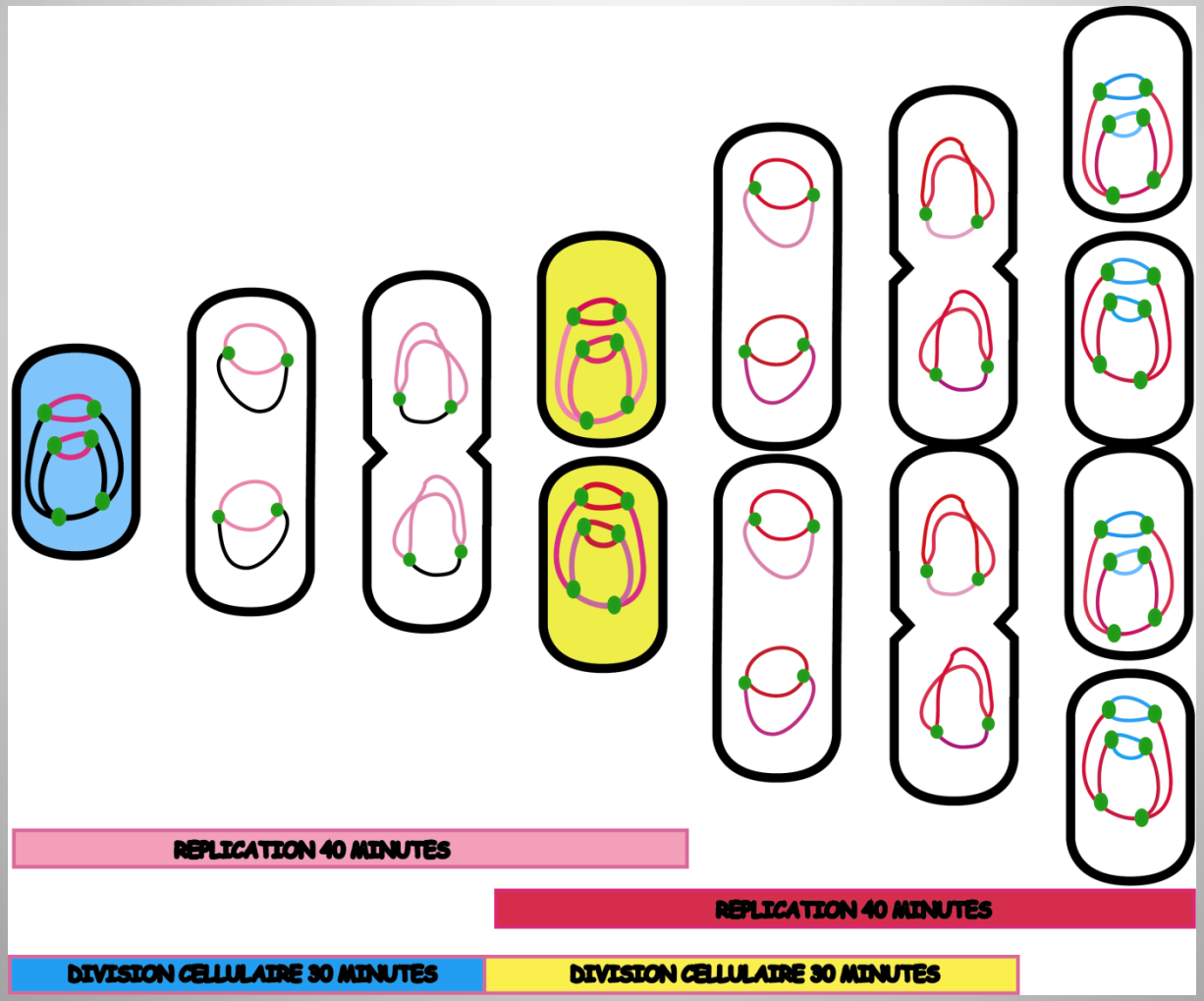
- ADN reste attachée à une protéine membranaire
- Les 2 ports d'attachement se séparent
- La membrane se divise en entrainant chacun une molécule d'ADN vers une cellule fille.

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

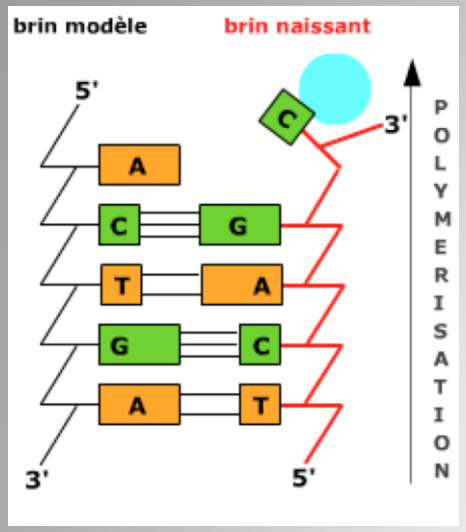
Taux de mutation faible de 10^{-8} à 10^{-11} erreurs/paire de bases insérées grâce à:

- Règles d'appariement des bases sur le modèle du brin matriciel
- Activité correctrice des enzymes Pol I et III

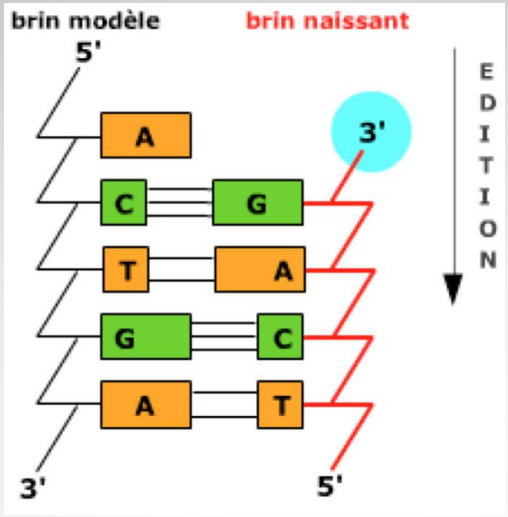
→ Activité *exonucléasique* 3'→ 5' (enlever un nucléotide mal apparié et remplacer par le bon nucléotide)

- Existence d'un système multi enzymatique comprenant une **endonucléases** associée à une **exonucléase bidirectionnelle (3'5' et 5'3')**, à une **ligase** et à une **ADN pol III.**

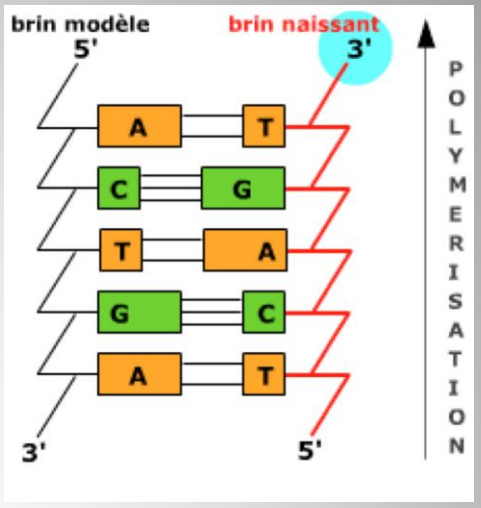
Correction d'épreuves (édition)



Mésappariement



Elimination du mésappariement



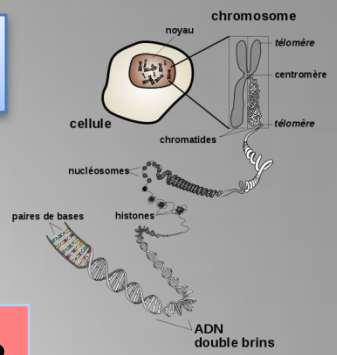
Reprise de l'élongation

Arrêt de l'élongation

La polymérase se réassocie au modèle-amorce corrigé

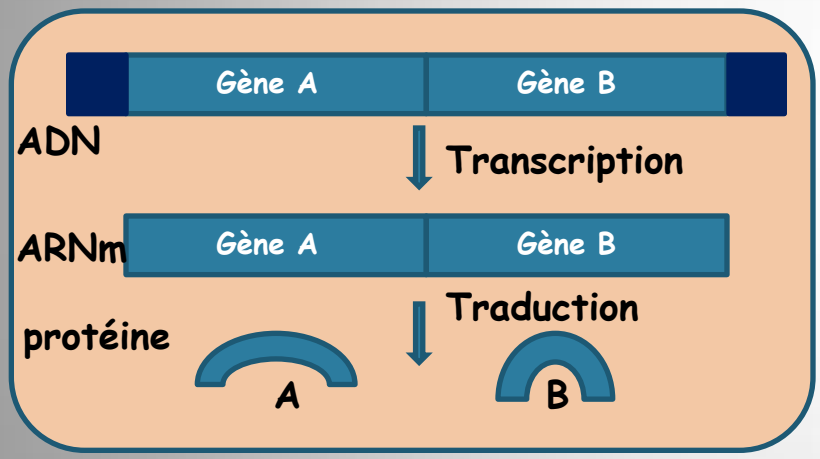
L'extrémité 3'-OH du brin naissant se positionne correctement dans le site catalytique de l'enzyme

Génétique des procaryotes et des eucaryotes

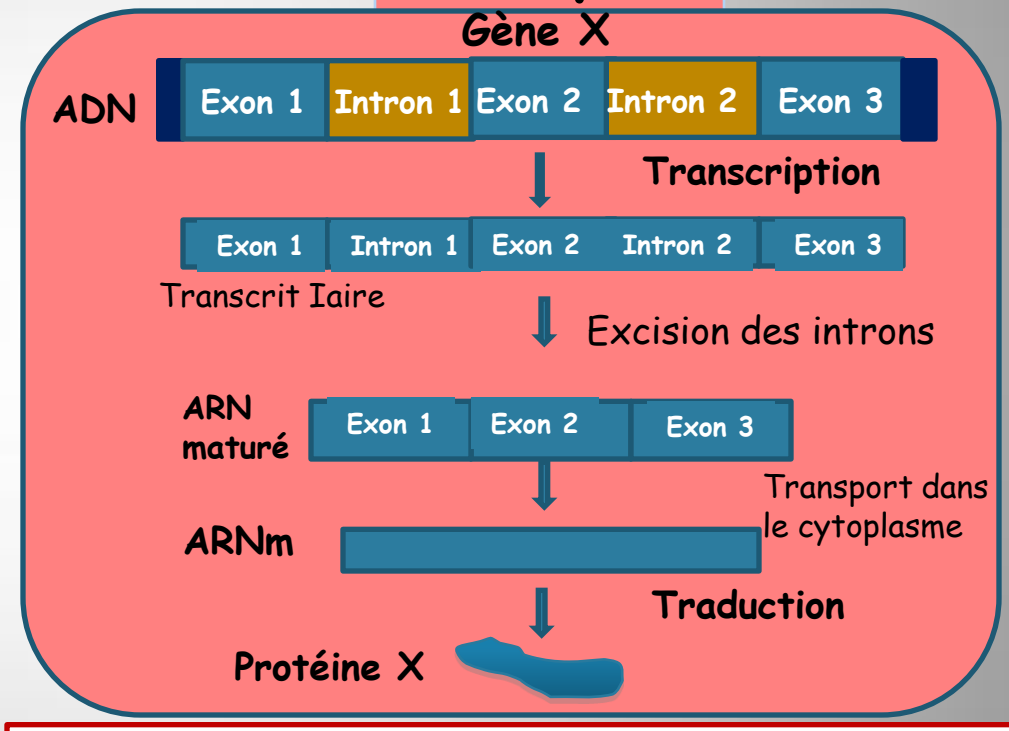


Différences dues
- à la présence d'un noyau chez les eucaryotes
- à une organisation différente de l'ADN (introns et exons)

Procaryote



Eucaryote



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

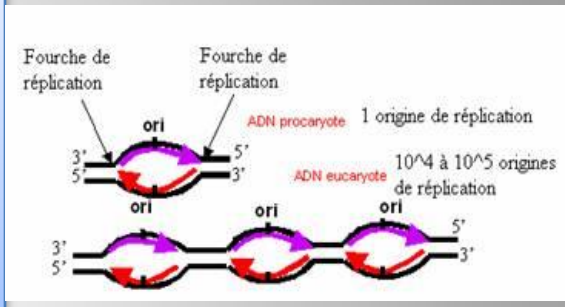
✓ADN linéaire individualisé sous forme de chromosomes dans le noyau
✓Séparation spatiale de la transcription et la traduction, ARNm passe dans le cytoplasme

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,

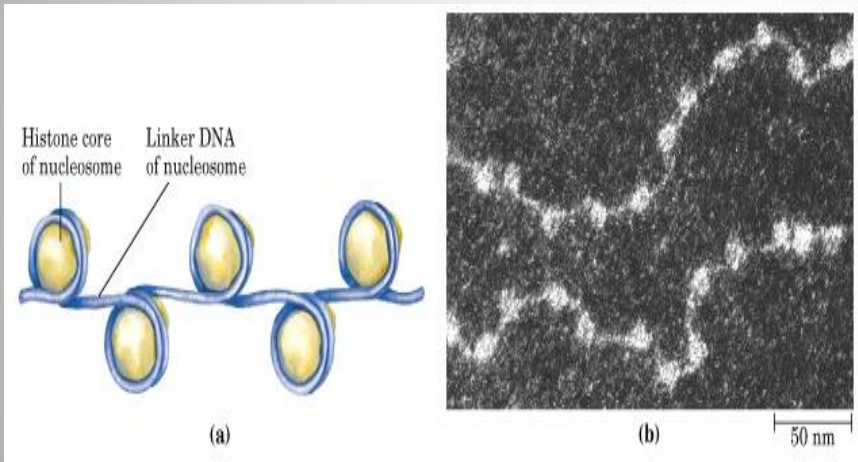
Y: réplication de l'ADN mitochondriale …

δ: Elongation des brins plus réparation de l'ADN

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

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

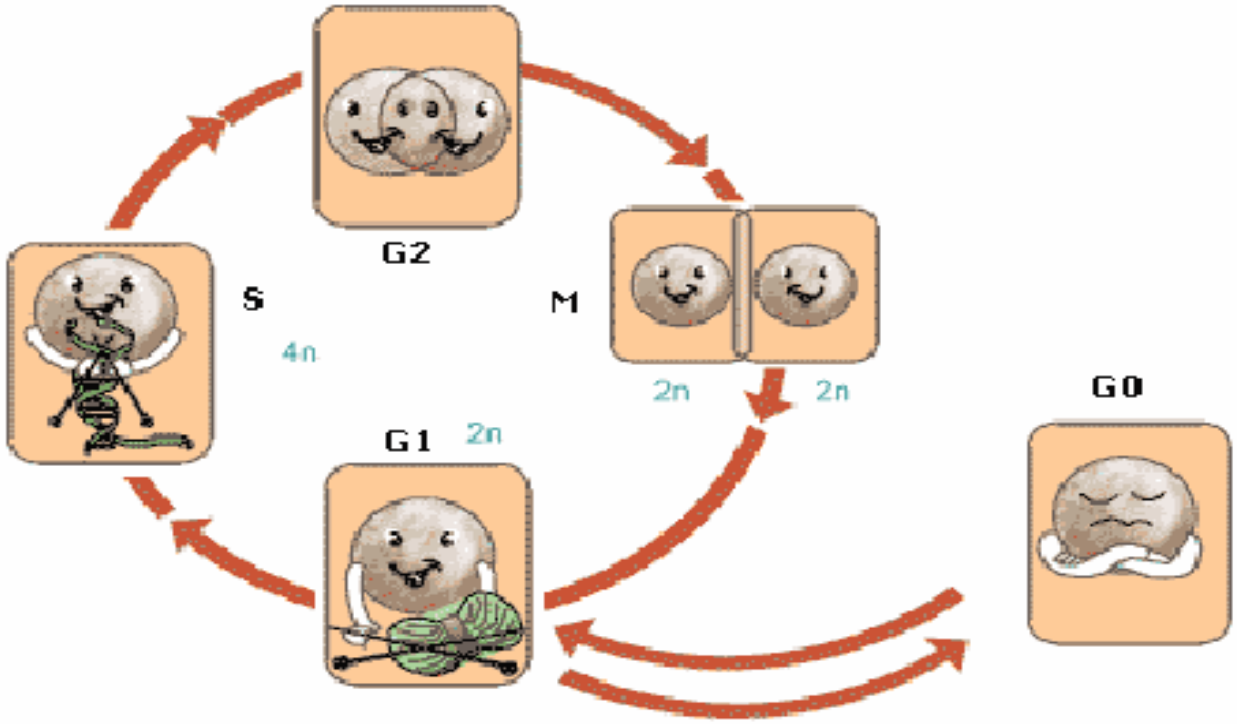
Donc, au moment de la réplication, il y a production d'histones >>>> duplication de la masse d'histones aussi.



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)

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



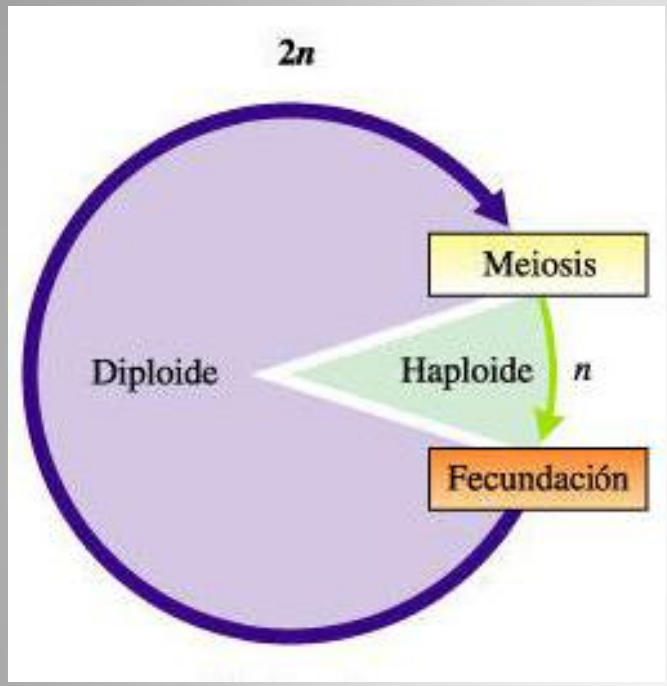
Période de multiplication

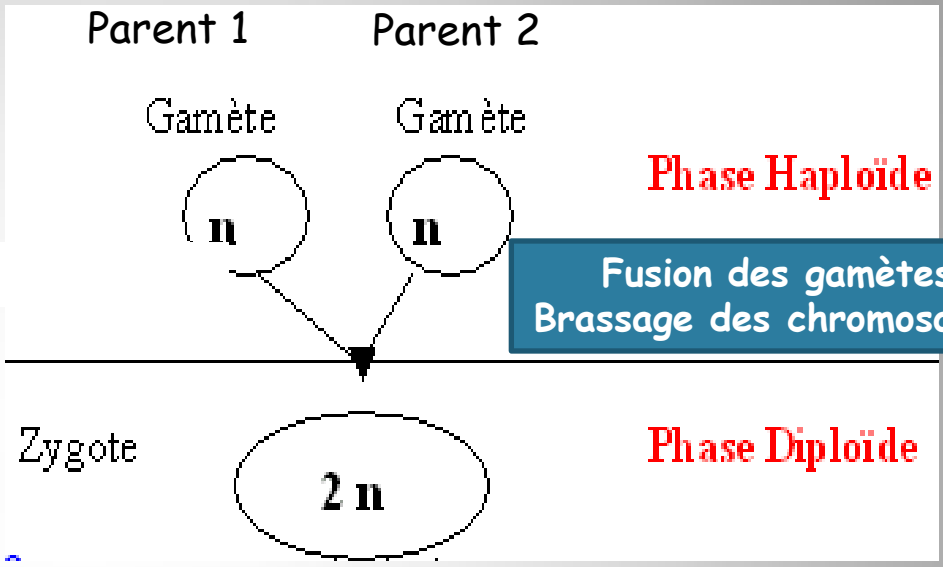
G1 : phase de préparation à la synthèse de l'ADN
S : phase de synthèse de l'ADN
G2 : phase de préparation à la mitose
M : mitose

Période de quiescence

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

Division cellulaire chez les eucaryotes

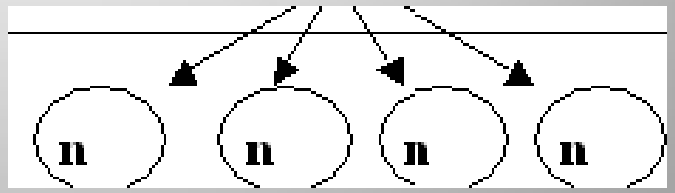




Mitoses

Organisme diploïde

Cycle sexuel chez les eucaryotes

Méiose

Recombinaison méiotique