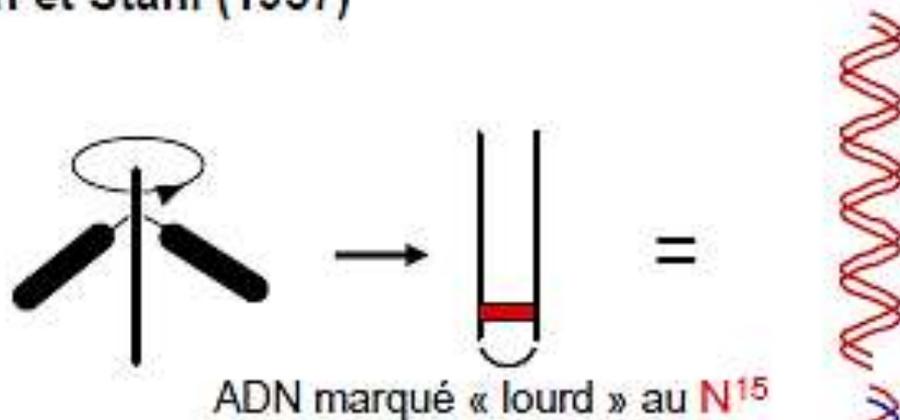


## **2. Réplication du génome bactérien**

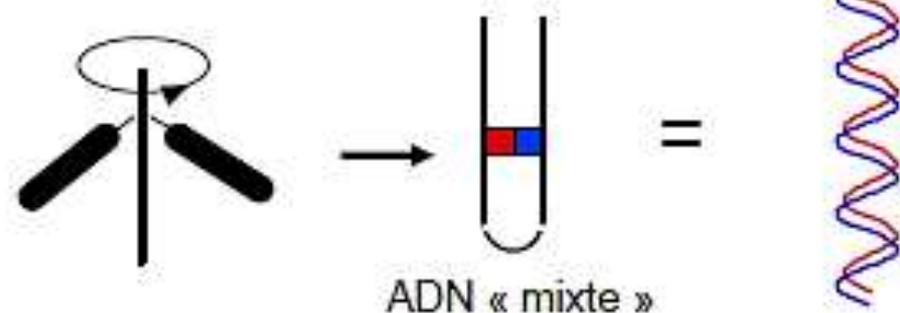
Synthèse de plusieurs molécules d'ADN à partir d'une molécule parentale initiale afin de transmettre à la descendance une information génétique conforme.

# Mise en évidence expérimentale de la réplication **semi conservative** chez les bactéries par Meselson et Stahl (1957)

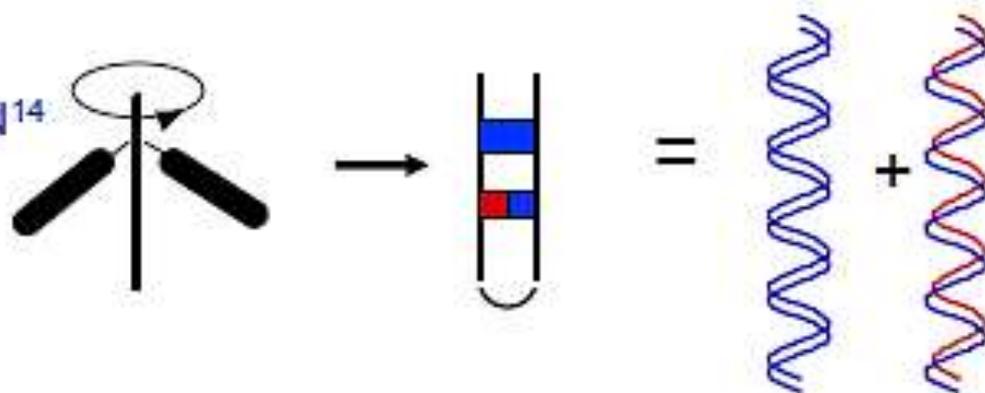
1. culture en milieu  $N^{15}$



2. transfert et culture en milieu  $N^{14}$



3. Poursuite de la culture en milieu  $N^{14}$



# Vitesse de réplication de l'ADN

- Réplication est une réaction rapide:

- **Bactéries: 1000 pb/sec/fourche,**

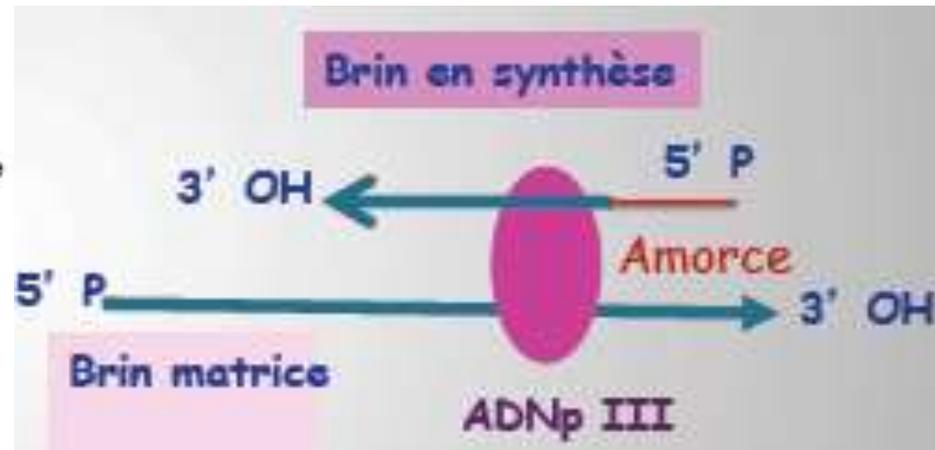
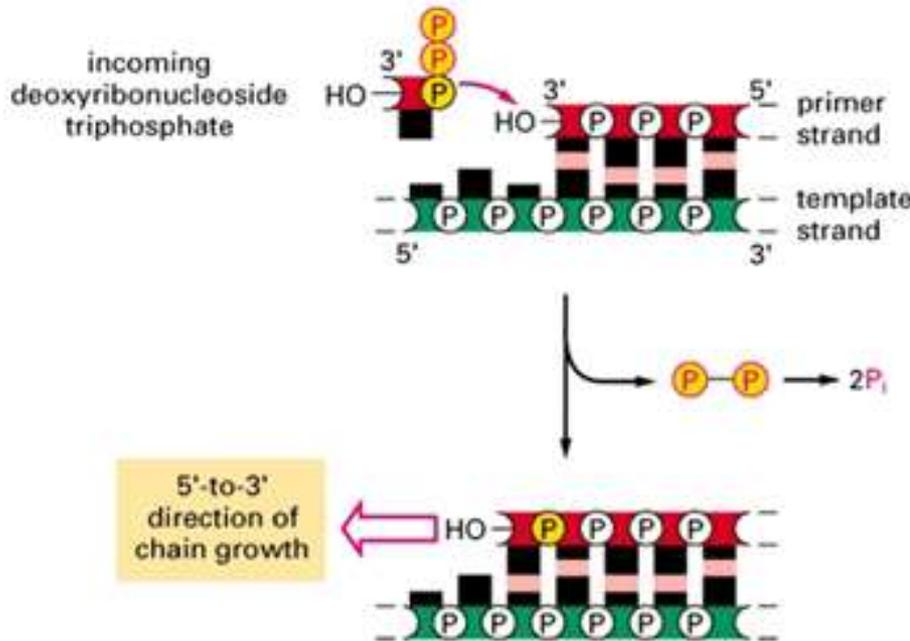
Chromosome E. Coli fait  $4,4 \times 10^6$  pb et réplique en 40 min d'où nécessité de 2 fourches

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

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

# Mécanisme de la réplication

(A)



Réaction asymétrique uniquement dans le sens 5' P--->3' OH

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

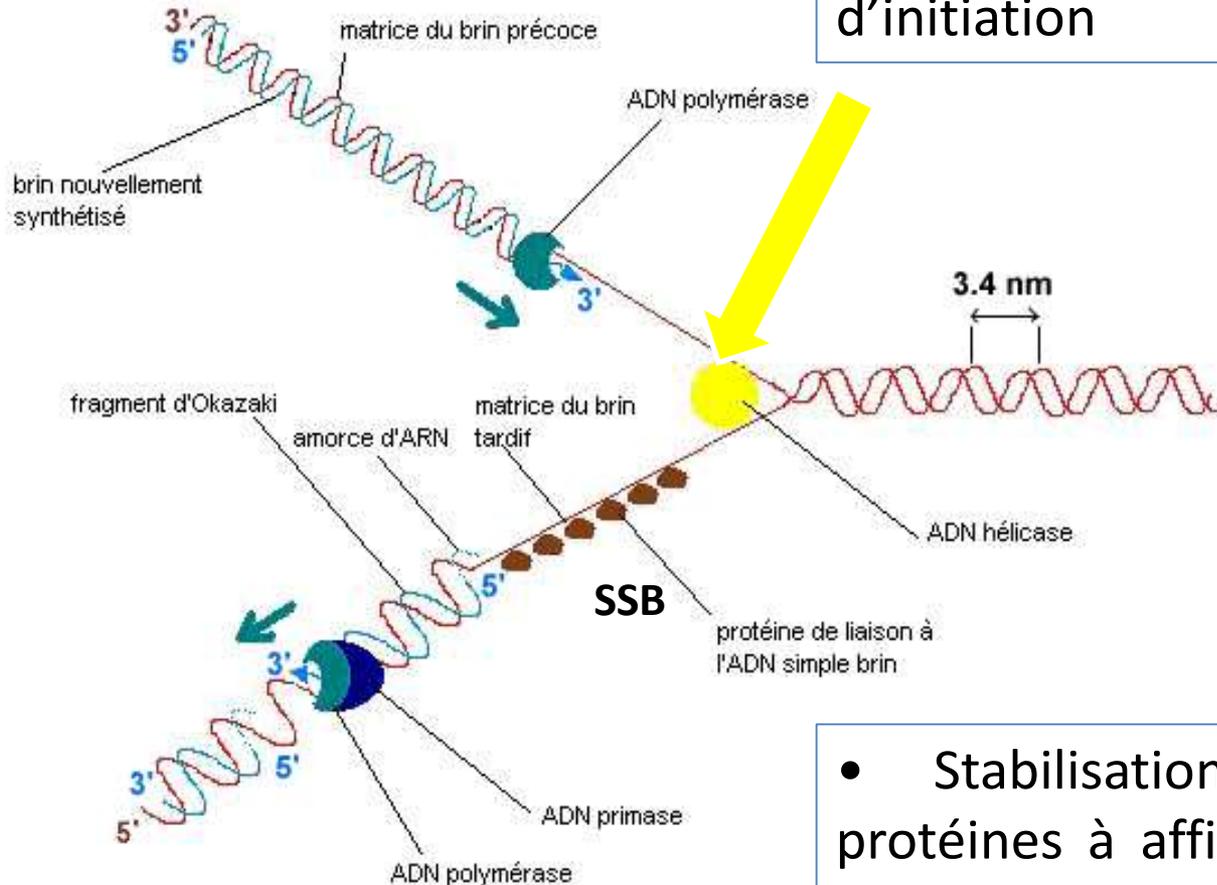
- nécessité d'avoir une amorce
- dernier résidus de l'amorce doit être apparié et avoir un groupement 3'OH libre
- Présence de nucléotides et du magnésium  $Mg^{2+}$  dans le milieu

**ADNpolyIII** 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 **ADNpolyI**.

## Brin précoce dont la synthèse est continue

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



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

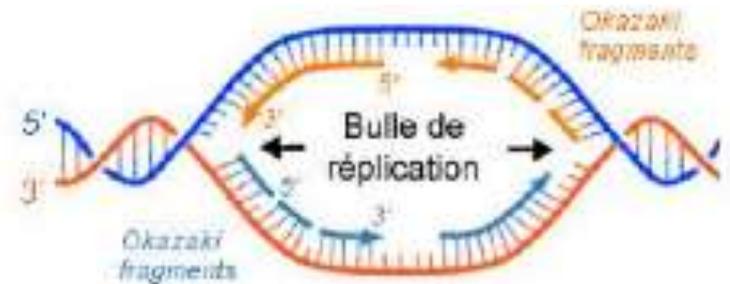
- Stabilisation d'ADNs par des protéines à affinité pour ADN simple brin (SSB: Single Strand Binding protein) empêchant le réappariement

REPLICATION DE L'ADN

## Brin tardif dont la synthèse est discontinue

## 2.1. 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.



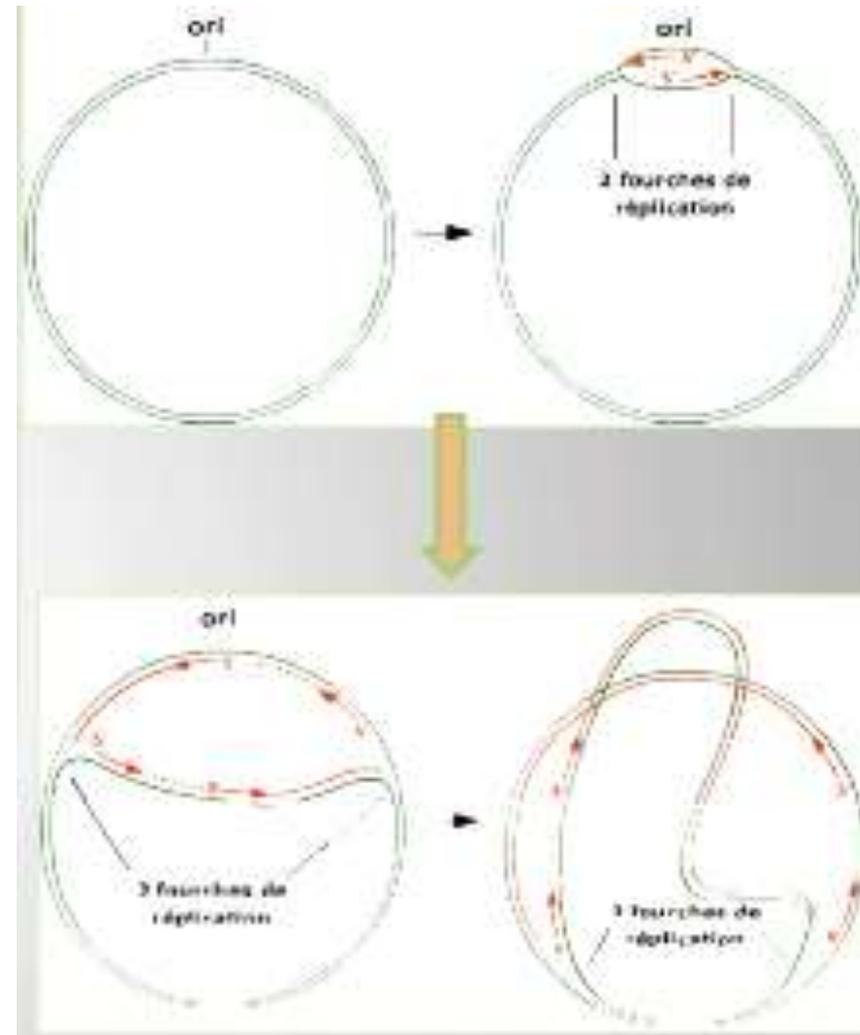
# Réplication de l'ADN circulaire:

**\*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**



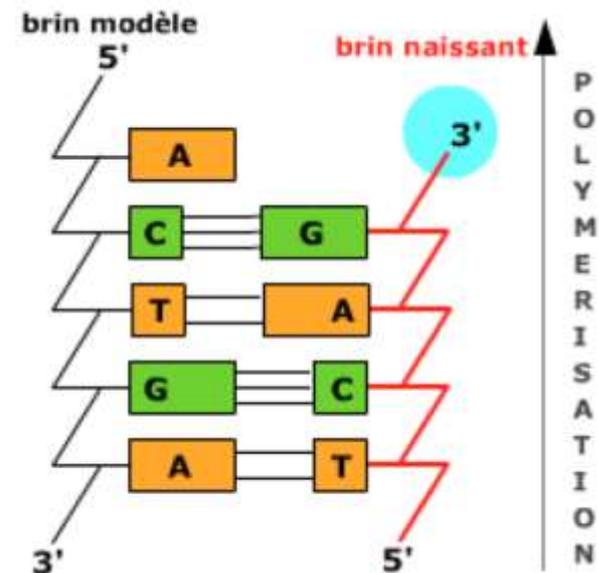
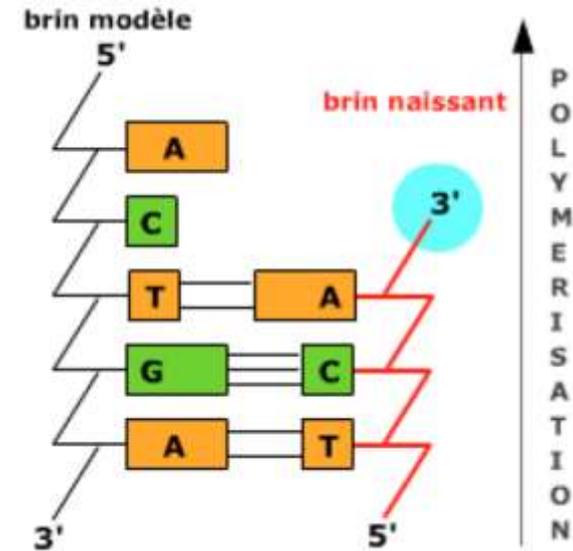
Dans un système de réplication bidirectionnelle, chacun des deux brins néosynthétisés est donc produit pour moitié par synthèse continue et pour l'autre moitié par synthèse discontinue.

## 2.2. Élongation de la réplication:

- **Les polymérases ont 2 rôles:**

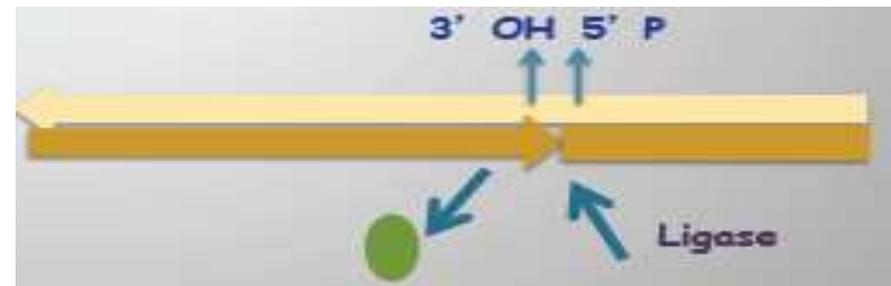
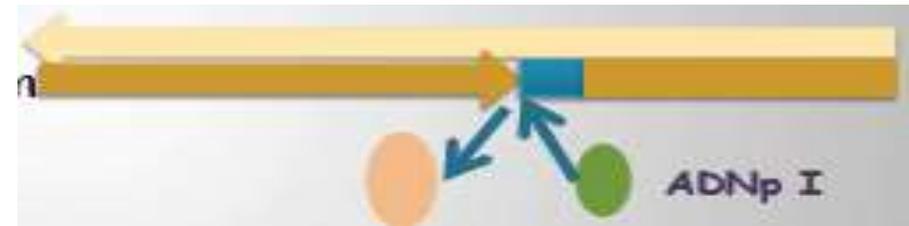
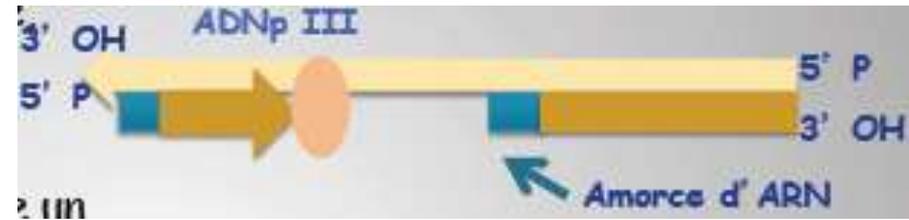
1- Incorporation des bases en respectant les règles de complémentarité >>>> synthèse en continue d'un nouveau brin précoce (ADN pol III)

2- Dégradation des amorces ARN grâce à son activité d'exonucléase 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

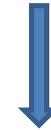
- Après la synthèse de l'amorce, la primase est remplacée par ADNpoly III (dnTP).
- >>> Synthèse jusqu'à atteindre un ADN précédemment synthétisé.
- L'ADN polyl prend alors le relais en continuant la synthèse de l'ADN pendant qu'elle enlève l'amorce ARN.
- L'ADN ligase remplace la pol I après que l'amorce 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.

## 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.

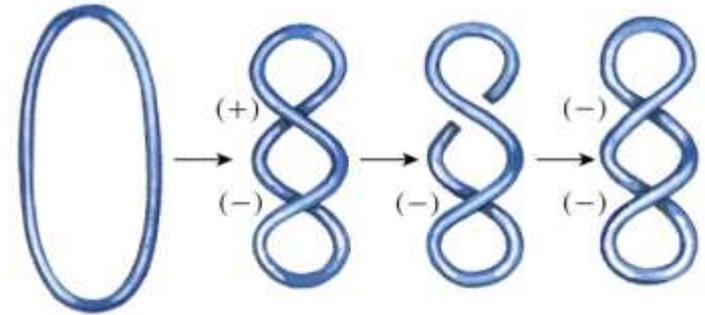
# Régulation de l'état d'enroulement de l'ADN

## 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

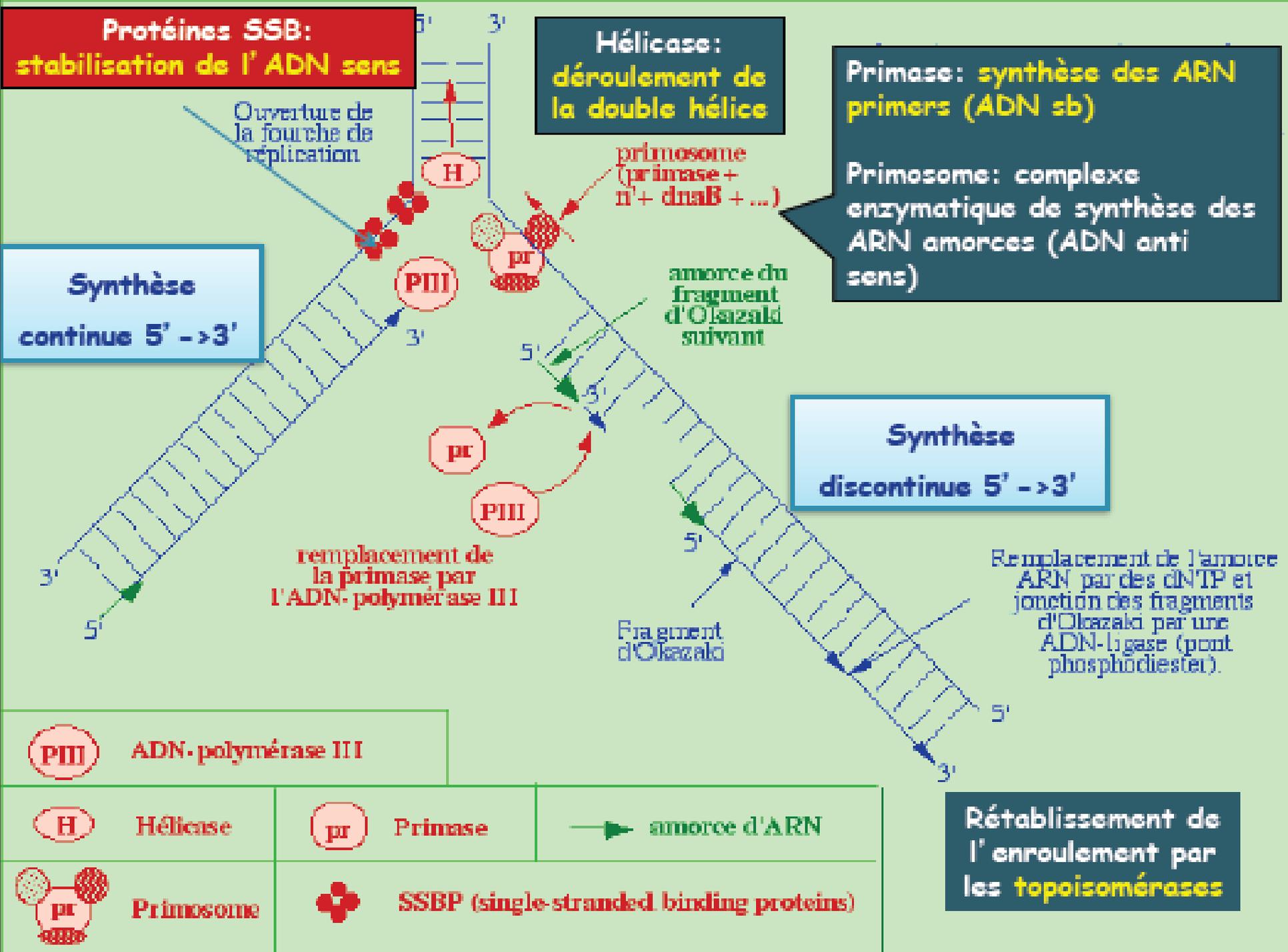
Gyrase est **spécifique** et **essentielle** à la réplication des bactéries

**Topoisomérase de type I: régule l'état d'enroulement**

>>> Nécessaire pour contenir tout l'ADN dans la cellule

# 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'**

remplacement de la primase par l'ADN-polymérase III

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**

**PIII** ADN-polymérase III

**H** Hélicase

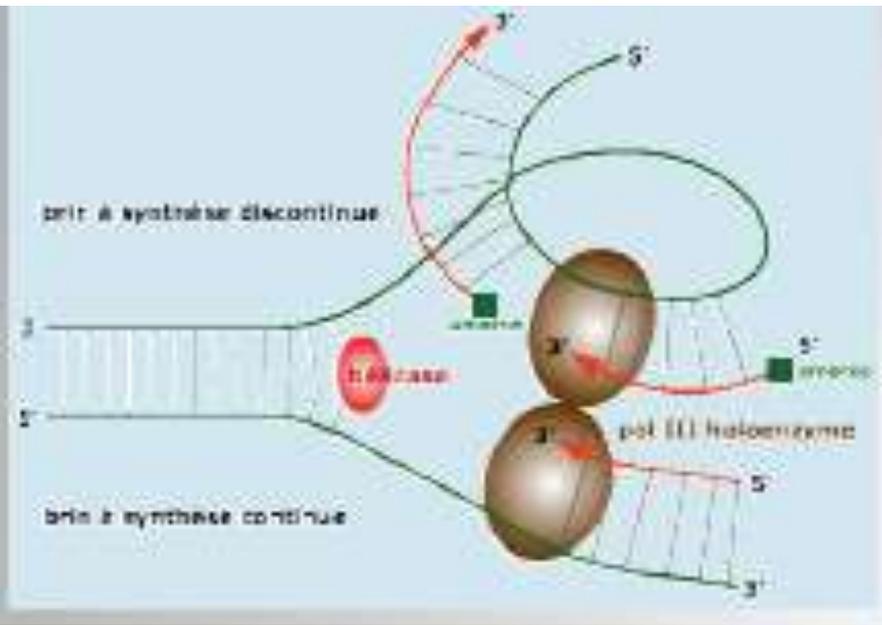
**pr** Primase

—▶ amorce d'ARN

**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.

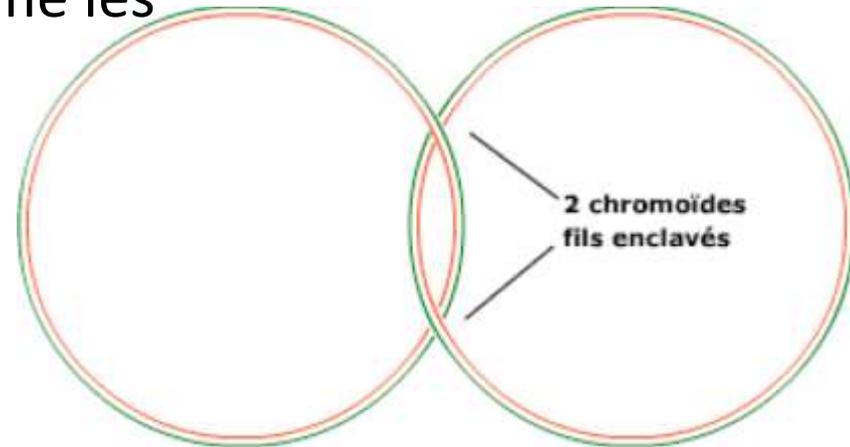
## 2.3. Terminaison de la réplication

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 ligation

# 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 ( $3' \rightarrow 5'$  et  $5' \rightarrow 3'$ )**, à une ligase et à une ADN pol III.

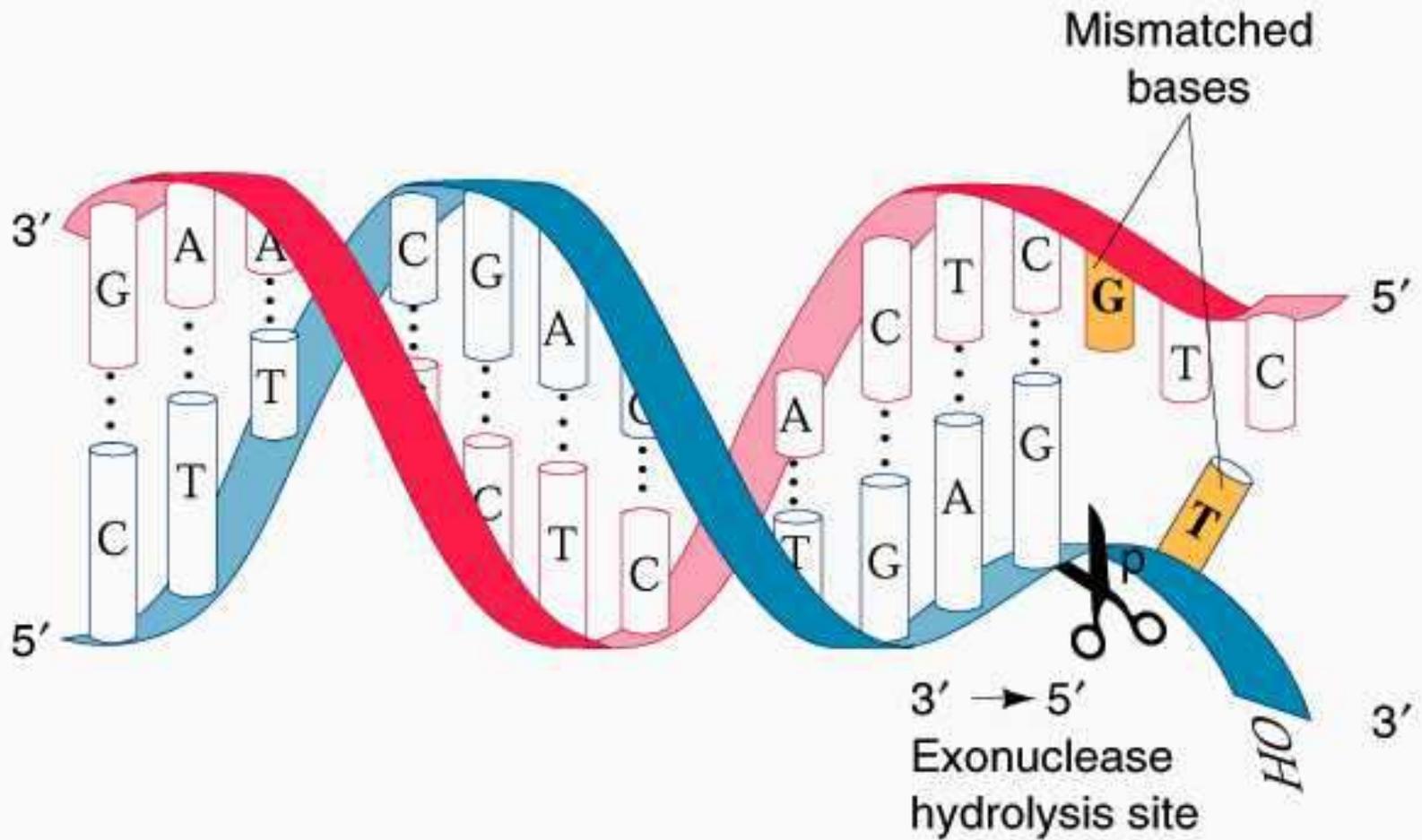
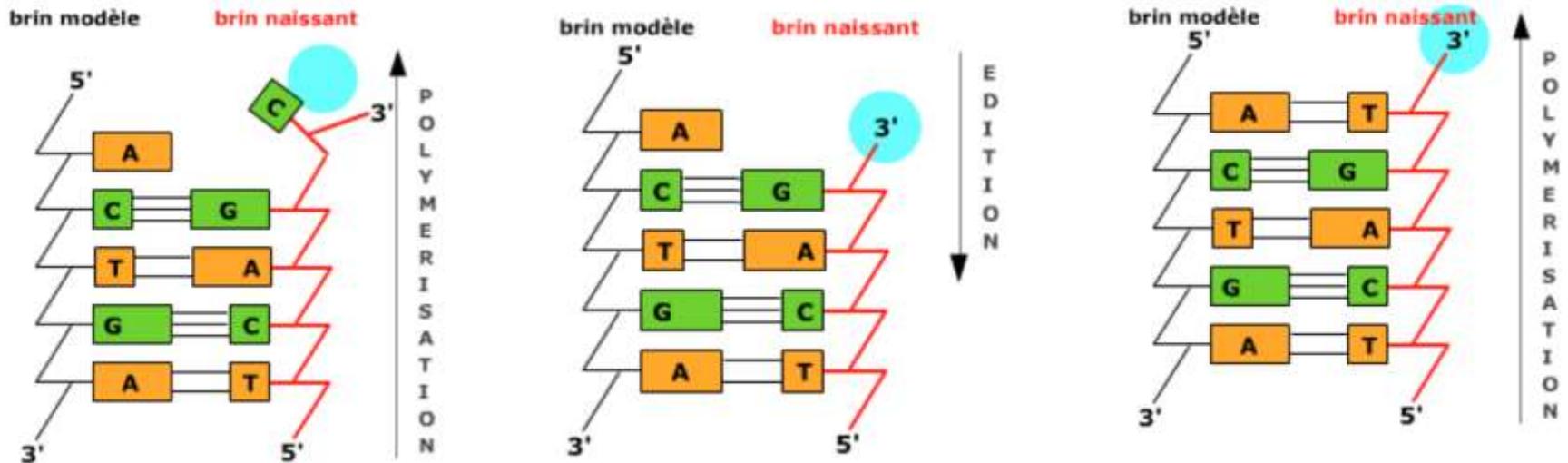


Figure 24-7. The 3'→5' exonuclease function of DNA polymerase I.  
 Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

# 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**