

2. Réplication du génome bactérien

Lorsqu'une cellule se divise pour donner 2 cellules-filles, il faut que l'ADN de ces cellules-filles soit l'exacte réplique de l'ADN de la cellule-mère, d'où le nom « réplication », ceci afin que les cellules-filles possèdent le même patrimoine génétique que la cellule-mère.

2.1. Conditions de réalisation de la réplication

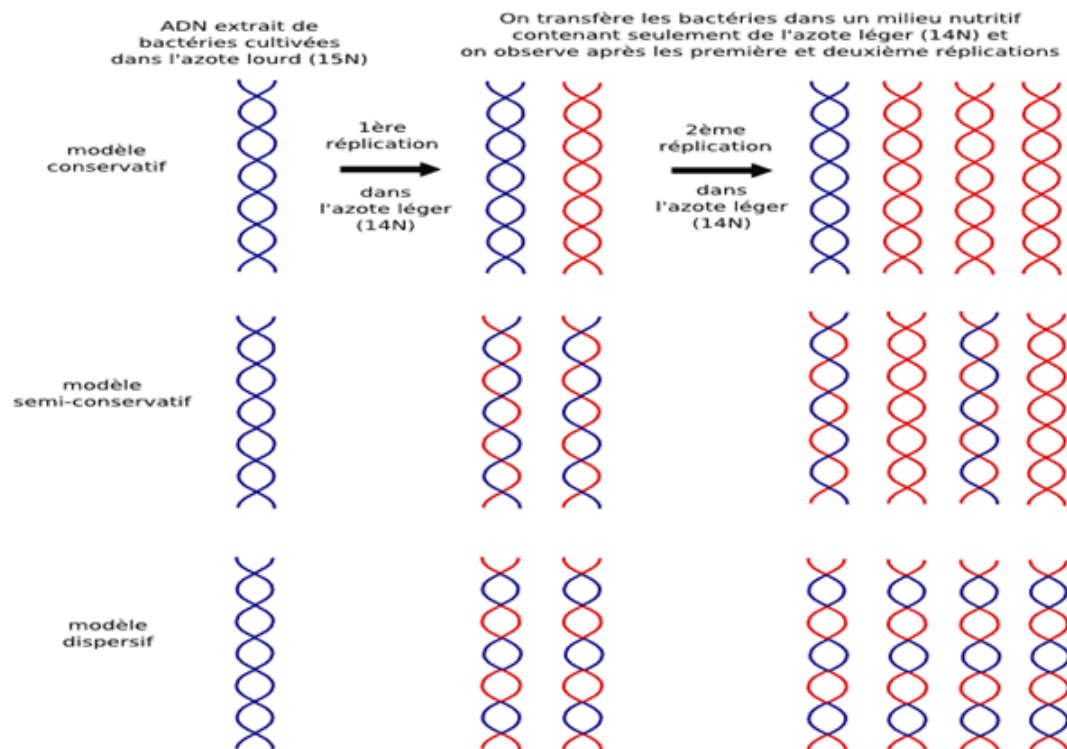
Éléments nécessaires pour réaliser la réplication → • Une molécule d'ADN parental : modèle ou matrice.

- Des nucléotides, sous forme de désoxyribonucléosides triphosphates : dATP, dTTP, dCTP, dGTP. Ces nucléosides triphosphates apportent en plus l'énergie nécessaire à la réaction (liaison phosphodiester riche en énergie)
- Une amorce d'ARN avec une extrémité 3'OH libre : il faut donc également des ribonucléosides triphosphates : ATP, UTP, CTP et GTP.
- Des enzymes et des protéines vont permettre aux 2 brins parentaux d'ADN de s'écarter, d'accrocher les nucléotides les uns aux autres...
- Des ions Mg^{2+}

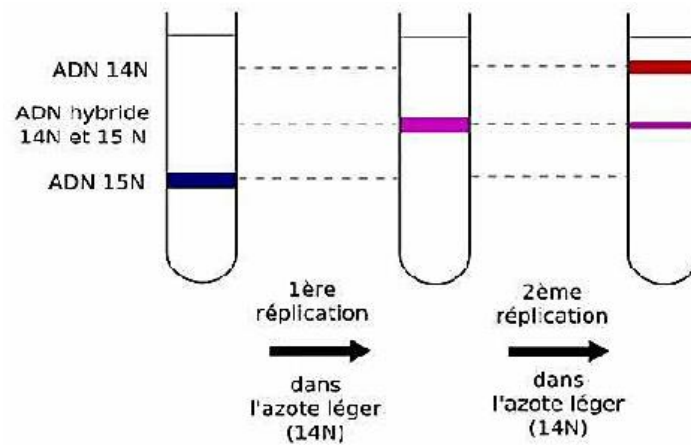
2.2. Caractéristiques fondamentales de la réplication

Expérience de Meselson et Stahl

- Des bactéries sont cultivées sur un milieu ne contenant que de l'azote lourd (^{15}N , sachant que l'azote « naturel » est ^{14}N) => Leur ADN est donc composé avec des atomes d'azote lourd.
- Ces bactéries sont ensuite placées sur un milieu ne contenant que de l'azote léger ^{14}N . => L'ADN maintenant synthétisé sera donc constitué d'azote ^{14}N , le seul présent dans le milieu **Le schéma suivant présente les molécules d'ADN suivant les trois hypothèses :**



Résultats

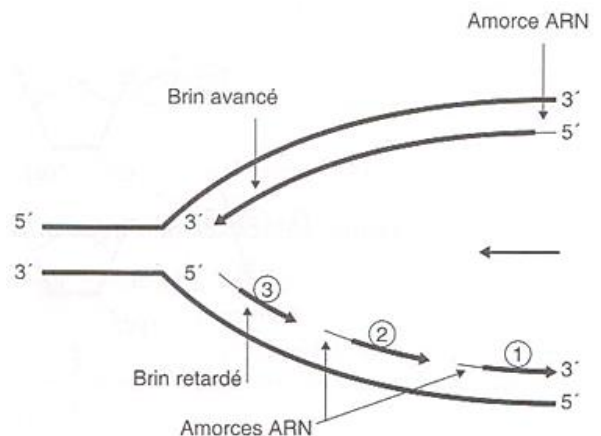


Conclusion :

La réplication est **semi-conservative** car dans les 2 brins de toute molécule d'ADN, il y a toujours un brin d'ADN ancien provenant de l'ADN parental et un brin nouvellement formé. Il se produit la séparation des 2 brins de l'ADN parental qui sert de matrice, et simultanément une copie de chaque brin parental pour donner un brin « fils » qui reste lié au brin parental.

2.3. Règles de la réplication

- La polymérisation de l'ADN se fait :
 - Dans le sens 5' - 3'
 - De façon complémentaire, selon les règles d'appariement A-T et G-C
 - Selon un mode antiparallèle



- La réplication est **semi-discontinue**

- Elle progresse à une vitesse de 1000 nucléotides à la seconde par fourche.

2. 4. Activités des ADN polymérases

Lors de la formation de la liaison phosphodiester entre un désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate et le brin en voie d'élongation, il y a hydrolyse de la fonction triphosphate et formation de pyrophosphate (PPi).

Les ADN polymérases ont des activités bien spécifiques :

- Une **activité polymérasique 5' vers 3'** qui est leur activité principale.
- Une **activité exo-nucléasique** qui correspond à la dégradation d'une des extrémités du brin néo-synthétisé de l'ADN lors de la réplication et qui peut être de 2 types :
 - De 3' vers 5', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 3'OH. L'activité exo-nucléasique 3' vers 5' permet ce qu'on appelle le **proofreading**, qui correspond à la correction d'un mauvais appariement de base en cassant la liaison phosphodiester et en remplaçant le nucléotide mal apparié.
 - De 5' vers 3', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 5'phosphate, lors de la jonction des segments d'ADN synthétisé sur le brin retardé.

2.5. ADN polymérases bactériennes dans la réplication

Comme dit précédemment, les ADN polymérases procaryotes sont de 3 types et pour la réplication nous allons principalement étudier le fonctionnement des ADN polymérases I et III.

- Les **ADN polymérases I** (ou **enzyme de Kornberg**) sont les plus nombreuses (400 molécules/cellule). Elles présentent l'activité polymérasique 5' vers 3' ainsi que les activités exo-nucléasique 5' vers 3' et 3' vers 5'. La vitesse de synthèse des ADN polymérase I est faible (20 nt/s) et ce sont des enzymes peu processive (10-20 nt/événement) ; ces caractéristiques ne leur permettent pas de faire la majorité de la réplication des ADN procaryotes. Elles sont utilisées dans la réparation de l'ADN ainsi que pour combler les brèches laissées par l'ADN polymérase III.

- Les **ADN polymérases III** (ou **enzyme cœur**) sont des multimères hétérogènes de gros poids moléculaire qui sont responsables de la synthèse des fragments longs de l'ADN, ayant une vitesse de synthèse rapide (environ 1000 nt incorporés/s) ainsi qu'une grande processivité (10^5 nt/événement). Elles présentent les activités polymérasiques 5' vers 3' et exo-nucléasique de 3' vers 5' mais pas exo-nucléasique de 5' vers 3'.

2.6. Mécanisme de la réplication

La synthèse doit respecter certaines propriétés : les deux fourches répliquatives doivent migrer dans des sens opposés, la synthèse de l'ADN se fait dans la direction 5' vers 3' et ainsi le brin matriciel est lu de 3' vers 5', les deux brins de l'ADN sont antiparallèles et synthétisés simultanément.

2.6.1. Les différentes protéines mise en jeu

- Les **protéines de reconnaissance** reconnaissent les sites d'initiation et de terminaison.
- Les **hélicases** (ou DNA B) déroulent la double hélice par rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les deux brins de l'ADN, avec consommation d'**ATP**.
- Les **protéines SSB** (pour *single stranded binding protein*) ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches répliquatives.
- La **primase** est une ARN polymérase ADN dépendante qui synthétise l'amorce.
- Les **topo-isomérases** relâchent les contraintes de torsion de l'ADN, elles sont de deux types et seule la topo-isomérase de types II consomme de l'**ATP**. La topo-isomérase de type II d'E-Coli s'appelle l'ADN-gyrase.
- Les **ADN ligases** (ou DNA G) catalyse la formation de la liaison phosphodiester, mais est incapable de placer les nucléotides. Lors de réparation de l'ADN les nucléotides en place ne sont plus triphosphatés, l'ADN ligase a donc besoin d'un apport en **ATP**.

2.6.2. Origines et terminaisons chez E-Coli

L'origine de réplication possède une séquence répétée de 13 pb riche en thymine (T), ainsi qu'une séquence GATC présente une dizaine de fois.

Le terminateur mesure environ 350 kb et est composé de 7 séquences quasi identiques de 23 pb.

2.6.3. Les étapes de la réplication procaryote

- **Ouverture de la double hélice et formation de la fourche répliquative**

L'ouverture de la double hélice sur 40 pnb est permise par reconnaissance de l'origine de réplication par les **Dna A**. Les topo-isomérases relâchent les contraintes topologiques appliqués à la double hélice par son ouverture. L'ouverture de l'ADN entraîne la formation de l'œil de réplication et des deux fourches de réplication. Les hélicases (Dna B) se mettent alors en place pour permettre le déroulement des deux brins ; les topo-isomérases, elles, sont présentes en aval (en avant) de la fourche permettant d'enlever les contraintes essentielles à l'avancée de l'hélicase. D'autre part les protéines SSB protègent les ADN simples brins pour les empêcher de se réenrouler.

- **Elongation du brin précoce dans le sens de déplacement de la fourche**

Le brin qui servira de matrice au brin précoce est lu dans le même sens que l'avancée de la fourche, c'est-à-dire de 3' vers 5'. Au niveau de l'origine de réplication les ADN polymérases nécessitent une amorce qui sera mise en place par les primases. Cette amorce sera ici de l'ARN, l'ADN pouvant être utilisé in vitro. L'ADN polymérase III sera responsable de l'initiation et de l'élongation du brin précoce.

- **Elongation du brin tardif dans le sens inverse du déplacement de la fourche**

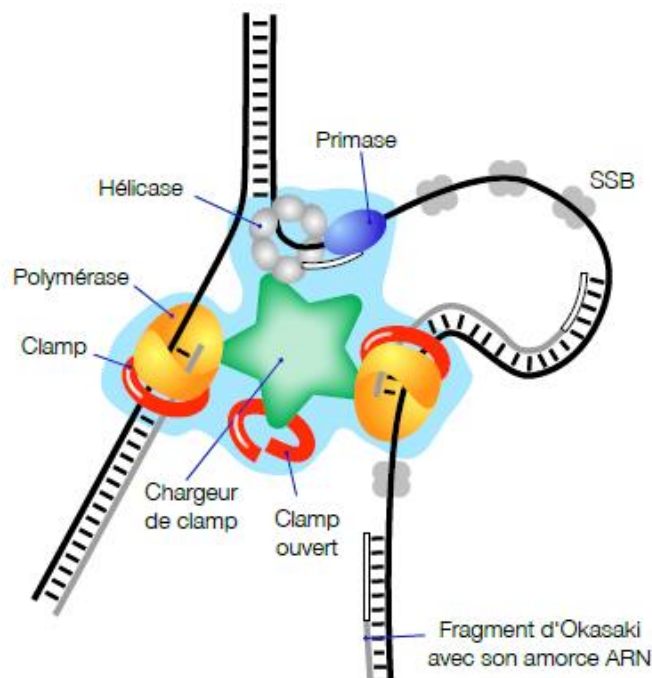
Le brin qui servira de matrice pour le brin tardif doit également être lu dans le sens 3' vers 5', mais comme nous l'avons déjà vu précédemment, la fourche se déplace dans le sens inverse et donc l'ADN polymérase III qui sera également responsable de l'élongation du brin tardif. De cette manière sa synthèse sera segmentée en fragment de taille relativement constante à chaque fois que le brin matriciel sera assez « découvert » et ainsi on respectera le sens d'élongation de 5' vers 3'. Ces fragments sont appelés **fragments d'Okasaki**. Les fragments d'Okasaki eucaryote mesurent 100 à 200 pb et les procaryotes 1000 à 2000 pb. A chaque segment il y a recrutement d'une primase pour la synthèse d'une amorce d'ARN constitué de 10 à 50 nucléotides selon l'espèce. Par la suite les amorces vont être détruites par des protéines à activité ribonucléasique telles que des RNases, et l'ADN polymérase I va compléter la brèche entièrement. La dernière liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' du premier fragment et l'extrémité 3' du deuxième fragment, ce qui correspond à l'épissage, sera réalisée par la ligase.

- **Terminaison**

Le terminateur est le site de fixation de protéines « Tus » qui reconnaît les régions Ter. Chez E-Coli, la partie entre les deux terminateurs n'est d'abord pas répliquée, les deux ADN circulaires sont ainsi associés, on utilise alors la topo-isomérase II pour les dissocier. L'ADN polymérase I complètera ensuite les parties non répliquées.

2.7. 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 asymétrique et simultanée sur les deux brins