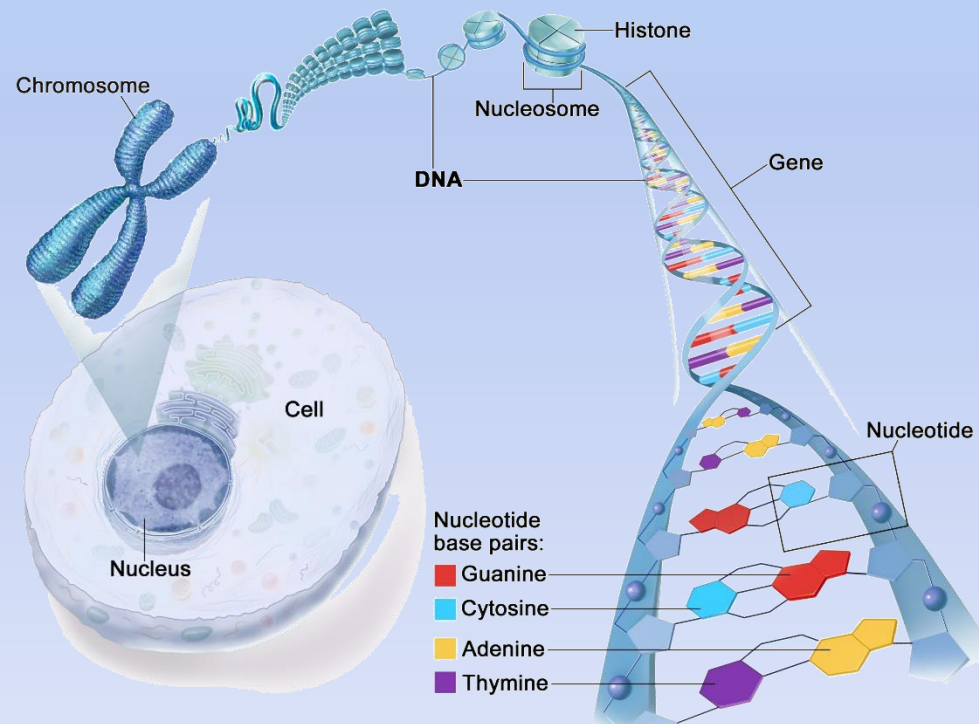


Module : **Biologie moléculaire**

Responsable du module : **Dr. AROUSSI Abdelkrim**

Classe : **Licence 3^{ème} année Biochimie**



3. Transmission et conservation de l'information génétique

- *La réplication de l'ADN et sa régulation*
 - *La réparation de l'ADN*

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

I- Généralités :

- En 1944, Oswald, MacLeod et McCarty ont démontré que l'ADN extrait d'une souche virulente de pneumocoque est capable de transformer une souche avirulente en la rendant pathogène (→L'ADN identifié comme la molécule **responsable de la transmission** d'une information génétique)
- En 1958, Kornberg décrivait la purification d'une enzyme : **ADN polymérase** capable de catalyser la synthèse d'ADN en présence d'une amorce et d'un brin matrice
- La synthèse d'ADN est catalysée par des ADN polymérases qui progressent dans la direction **5' vers 3'** à partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce d'ADN ou d'ARN.

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

II- La réplication d'un génome double brin :

Divisée en trois (03) phases :

1. **l'initiation** : correspond à la séparation des deux brins d'ADN au niveau de l'origine de réplication et à la synthèse de l'amorce
2. un complexe multiprotéique, appelé « réplisome », s'assemble à l'extrémité de l'amorce et la phase d'élongation de la réplication, qui correspond à la synthèse des brins d'ADN proprement dite, peut commencer
3. enfin, la réplication s'arrête lorsque le réplisome rencontre l'extrémité 5' d'un segment d'ADN ou lorsqu'il se heurte à un complexe spécifique de terminaison de réplication.

La réplication du génome d'une cellule doit être **coordonnée avec la division cellulaire**, afin de répartir le chromosome parental et le chromosome néosynthétisé dans les deux cellules filles

→ **Elle doit être contrôlée** (phase de l'initiation)

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

III- La réplication de l'ADN chez les eucaryotes :

Se trouve confrontée aux problèmes posés par :

- la taille des génomes
- leur distribution en plusieurs chromosomes qui sont répliqués une seule fois par cycle cellulaire
- la plus grande complexité de l'organisation cellulaire.

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

IV- Les méthodes d'étude de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes :

Les matériaux utilisés pour l'étude de la réplication de l'ADN des eucaryotes sont :

- (1) les organes en division cellulaire active – tels que le thymus de veau – pour la purification des protéines
- (2) les cellules en culture, qui permettent la synchronisation et donc l'accumulation de cellules en phase S
- (3) les virus, qui permettent la réalisation de systèmes de réplication in vitro
- (4) les eucaryotes unicellulaires – en particulier les levures – pour l'analyse génétique mais aussi biochimique, moléculaire et cellulaire de la réplication.

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

Le réplisome eucaryote : (Virus SV40)

Structure :

La purification des activités polymérase des cellules animales et leur étude dans le système de réplication in vitro de l'ADN du virus SV40 ont fourni de nombreuses informations sur la réplication de l'ADN chez les eucaryotes.

Le virus SV40 possède un génome circulaire d'environ 5 kb qui est répliqué à partir d'une origine bidirectionnelle.

Une seule protéine d'origine virale est nécessaire pour la duplication du génome de SV40 : l'antigène T.

Les autres protéines nécessaires et suffisantes à la réplication sont d'origine cellulaire.

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

En présence d'antigène T, on peut reconstituer *in vitro* un système de réplication de molécules d'ADN contenant l'origine de réplication de SV40 en utilisant les protéines cellulaires purifiées :

- l'ADN polymérase α , quatre sous-unités, $\rightarrow$ synthèse des amorces d'ARN, et de leur élongation en courts fragments d'ADN par son activité polymérase
- l'ADN polymérase δ , 2 sous-unités, $\rightarrow$ l'élongation des amorces des 2 brins néosynthétisés
- le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), permet à la pol δ d'incorporer des milliers de nucléotides sans se détacher de la matrice
- la RP-A (replication protein A), 3 sous-unités, se fixe à l'ADN monobrin, stimule pol α et δ
- le RF-C (replication factor C), 5 sous-unités, forte affinité pour le complexe matrice/amorce et qui est nécessaire pour charger le PCNA sur l'ADN
- l'ADN topo-isomérase I, qui élimine le surenroulement de l'ADN produit en amont de la fourche au cours de la réplication ;

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

- l'ADN topo-isomérase II, permet aux deux génomes (chromosomes s'il s'agit de réplication chez les cellules humaines) de se séparer à la fin de la synthèse
- la RNase H1 et le MF1 (maturation factor 1, = nucléase FEN-1) qui éliminent les amorces
- l'ADN ligase I, qui lie entre eux les fragments d'ADN néosynthétisés.

L'activité de ces composants est nécessaire et suffisante pour obtenir *in vitro* deux copies surenroulées d'une molécule d'ADN contenant l'origine de SV40.

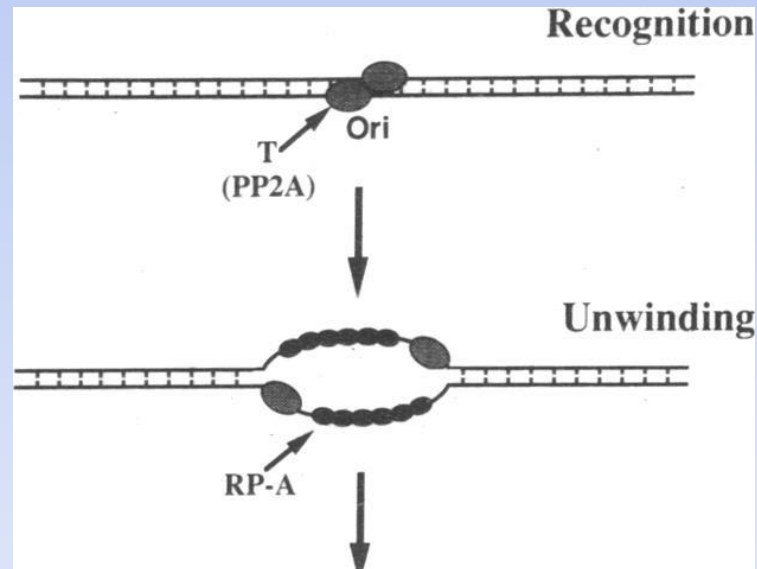
Les protéines d'origine cellulaire nécessaires pour la réplication du génome de SV40 constituent un ensemble fonctionnel conservé chez tous les eucaryotes étudiés jusqu'à présent.

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

Le réplication chez SV40

Les étapes de la synthèse *in vitro* de l'ADN de SV40, selon Waga et Stillman :

- (1) l'antigène T reconnaît l'origine, s'y fixe sous forme de double hexamère, déroule un segment de l'origine, interagit avec les composants du complexe responsable de la synthèse des amorces d'ARN et se positionne de part et d'autre de l'origine
- (2) RP-A se fixe à l'ADN simple brin et la pol α synthétise les deux amorces ARN/ADN des brins continus dans les deux sens



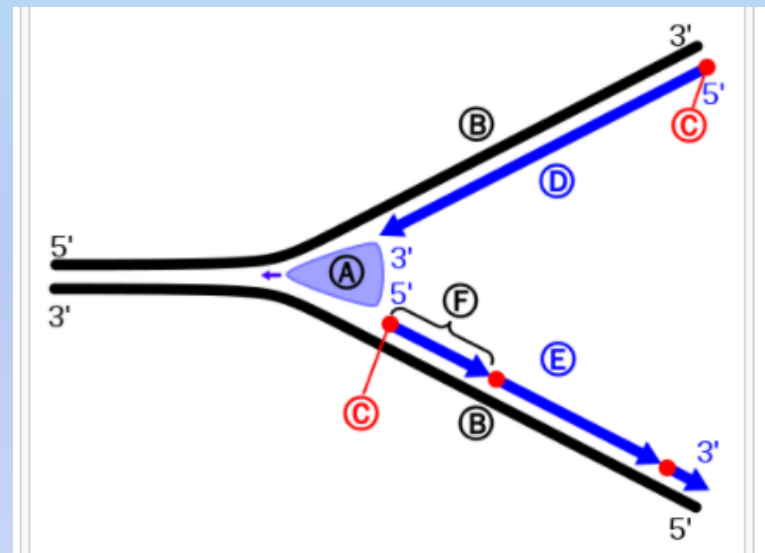
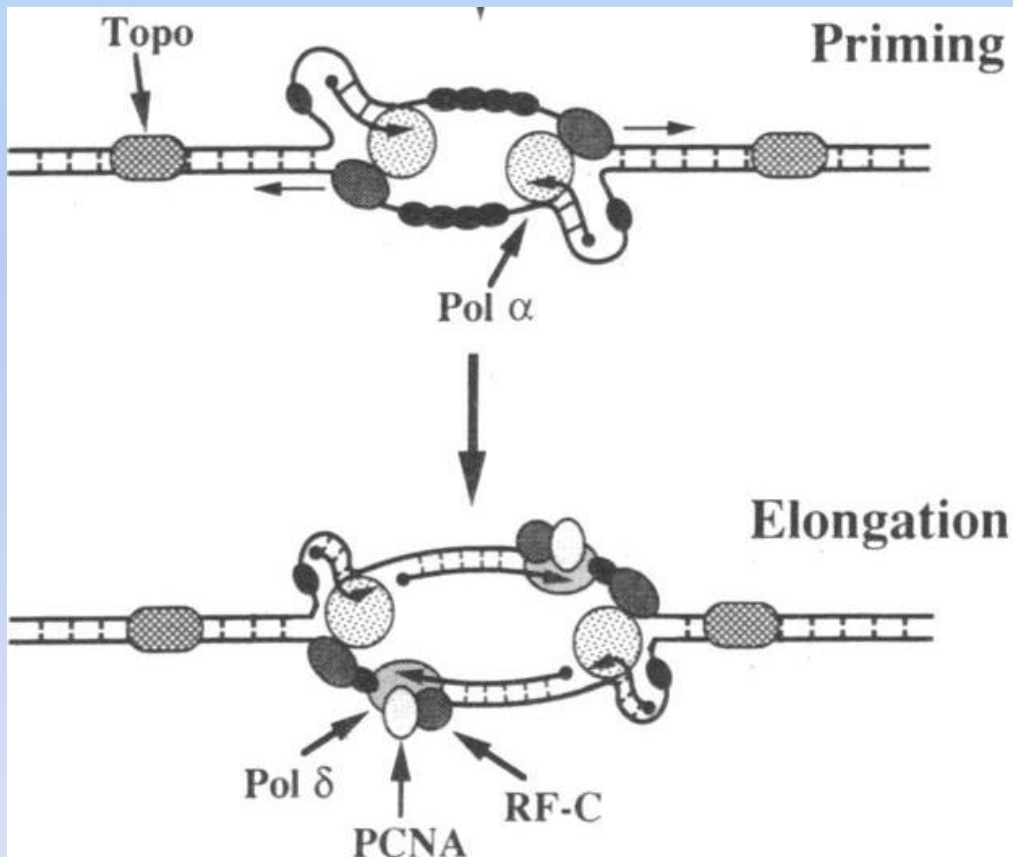
1. La réplication de l'ADN et sa régulation

Le réplication chez SV40

- (3) RF-C reconnaît le complexe matrice/amorce et charge le PCNA en provoquant le remplacement de la pol α par la pol δ qui poursuit la synthèse pendant que l'antigène T fonctionne en hélicase et que l'ADN topo-isomérase I relâche la tension en amont de la fourche
- (4) la pol α synthétise une amorce sur le brin qui sera copié de façon discontinue et est ensuite remplacée par la pol δ
- (5) l'amorce est éliminée par l'action de la RNase H1 et de l'activité exonucléasique 5'-3' de MFI/FEN-1
- (6) l'extrémité 5' du premier fragment d'Okazaki est liée par l'ADN ligase I à celle 3' du deuxième et ainsi de suite
- (7) quand la synthèse des deux copies est complète, l'ADN topo-isomérase II leur permet de se séparer

1. La réplication de l'ADN et sa régulation

Le réplication chez SV40



Réplication de l'ADN :

- (A) lieu de séparation des brins par l'enzyme hélicase ;
- (B) brins « parents » ;
- (C) amorce ;
- (D) brin continu (dit avancé), dans le sens 5' vers 3' ;
- (E) brin discontinu (dit retardé), formé de fragments d'Okazaki ;
- (F) fragment d'Okazaki.

Tableau I

PROTÉINES PARTICIPANT À LA RÉPLICATION (D'après [4])

<i>E. coli</i>	SV40	Fonction
DnaB	antigène T	ADN-hélicase, utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour catalyser l'ouverture de la double hélice d'ADN; stimule la synthèse de l'amorce sur l'ADN simple brin.
DnaC	antigène T	Permet la fixation de l'hélicase et de la primase sur de l'ADN couvert de SSB (assemblage du primosome).
DnaG	Primase Pol α^{**}	Primase, polymérase responsable de la synthèse de l'amorce.
SSB	RP-A	Protéine se fixant à l'ADN simple brin; stimule la polymérase et facilite le chargement de l'hélicase.
Complexe γ	RF-C	ATPase dépendante de l'ADN; se fixe au complexe matrice amorce; stimule la polymérase.
τ β	PCNA	Dimérisation de la polymérase. Facteur de processivité de la polymérase.
Pol III core Ligase	Pol δ^* (α , θ , ϵ) Ligase I	ADN polymérase; 3'-5' exonucléase. Catalyse la jonction des fragments d'ADN.
Polymérase I RNase H1	FEN-1 ou MF1 RNase H1	Nucléase enlevant les amorces d'ARN. Nucléase enlevant les amorces d'ARN.
Topo-isomérase I	Topo-isomérase I	Maintien du surenroulement après passage de la fourche de réplication; relâche l'ADN.
Gyrase		Maintien du surenroulement après passage de la fourche de réplication; introduit des super-tours.
Topo-isomérase IV	Topo-isomérase II	Décatéation des chromosomes après synthèse.
Tus		Arrêt de la réplication par fixation aux « terminateurs » de réplication (<i>Ter</i>).

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

I- Généralités :

Le déchiffrement du code génétique, par lequel des codons de trois nucléotides codent pour un acide aminé, a valu en 1968 le prix Nobel à ses découvreurs.

Cette complémentarité entre séquence d'ADN et séquence protéique révèle l'importance de conserver strictement et transmettre à l'identique la séquence nucléotidique, afin de toujours traduire la même protéine.

Cet ADN est fragile et peut être soumis à de nombreux stress naturels au cours de la vie de la cellule, qu'ils soient endogènes ou exogènes.

→ **Possibilités de dommages que peut subir l'ADN → des mécanismes que les cellules possèdent pour les corriger.**

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

II- Nature et origine des dommages à l'ADN :

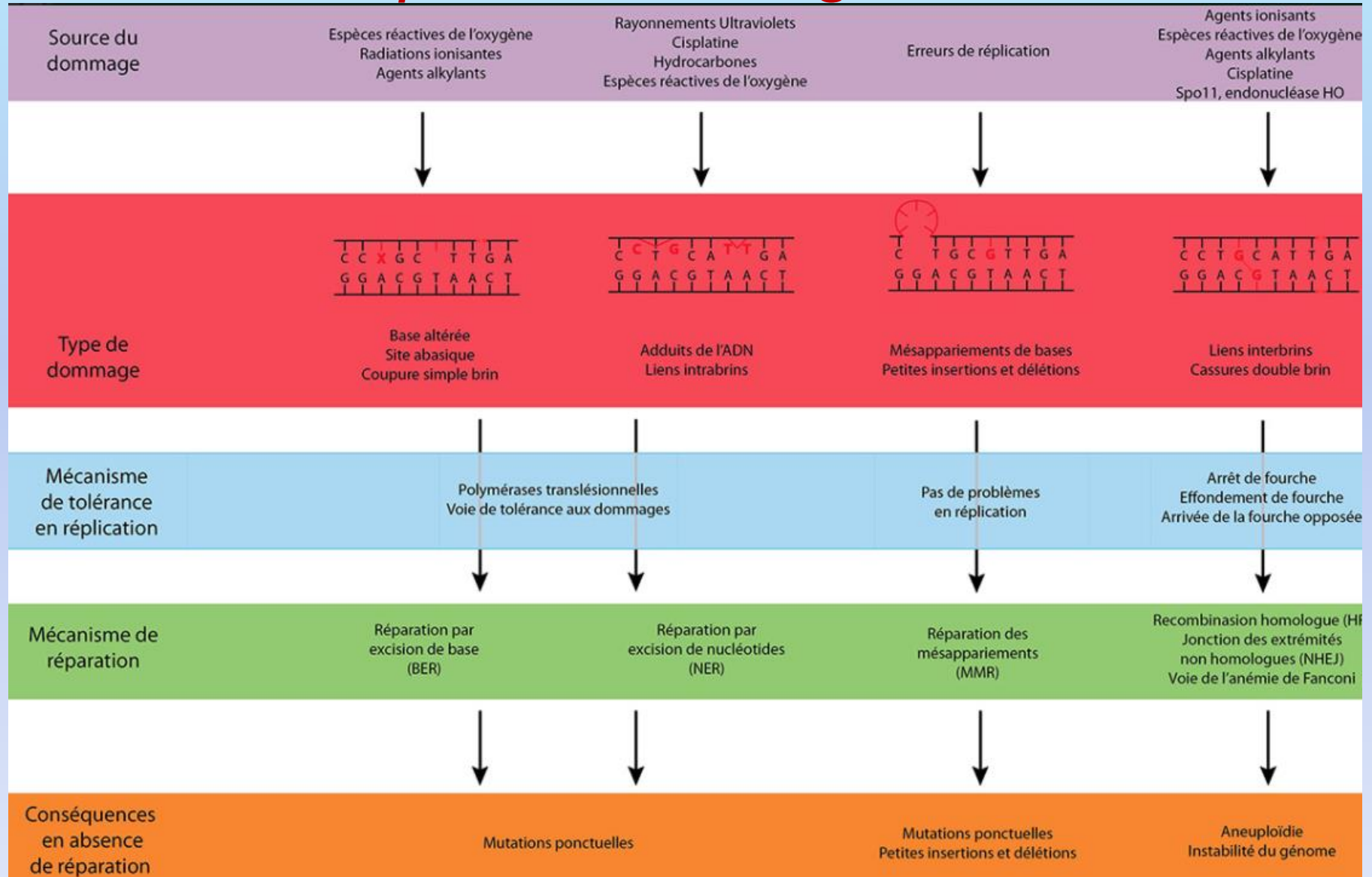
Le métabolisme cellulaire normal produit entre autre des espèces réactives de l'oxygène (→sources de nombreux dommages)

l'environnement soumet en permanence un organisme à différentes agressions, tels le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes ou des agents mutagènes chimiques.

Parfois, des molécules toxiques pour l'ADN sont utilisées comme outil thérapeutique, notamment en chimiothérapie. Les lésions ainsi générées sont de natures très diverses :

bases altérées ou perdues, liens intra – ou inter-brins, dimères de thymines, cassures simple ou double brin

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène



2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

Le métabolisme de l'ADN lui-même est source de dommages. Ainsi, les polymérases, qui réalisent la copie à l'identique de l'ADN lors de la réplication, commettent parfois des erreurs qui rompent la complémentarité entre les deux brins.

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

La réparation de l'ADN comprend l'ensemble des voies permettant de rétablir l'intégrité de l'information génétique.

1. Réponses aux dommages nucléotidiques et simple brin
2. Réponse aux lésions réplcatives
3. Réponse aux cassures double brin
 - ▶ Les voies de signalisation des dommages
 - ▶ La recombinaison homologue

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

1. Les voies de signalisation des dommages :

La reconnaissance d'un dommage à l'ADN met en place, en parallèle de la réparation, une voie de signalisation qui optimise les conditions cellulaires pour la réparation du dommage.

Exemple : Chez *S. cerevisiae*, elle implique l'activation de deux protéines kinases centrales, Tel1 (ATM chez les Mammifères) et Mec1 (ATR chez les Mammifères).

Le point de contrôle Tel1 reconnaît de préférence les extrémités franches des cassures double brin (Mec1 est activé préférentiellement par l'ADN simple brin).

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

1. Les voies de signalisation des dommages : *S. cerevisiae*

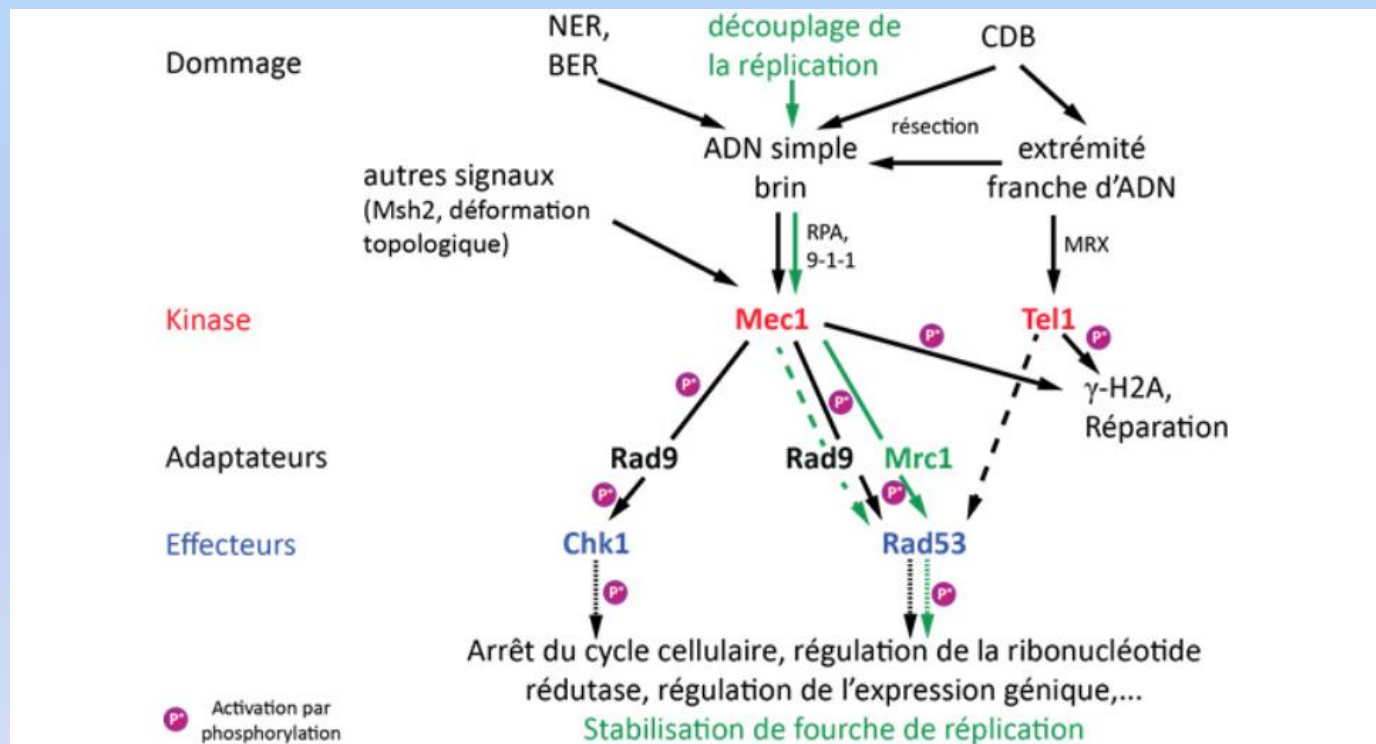


Figure 2 - Voie de signalisation des dommages à l'ADN

Les principaux constituants de la voie de signalisation en réponse à un dommage à l'ADN chez *S. cerevisiae* sont représentés, ainsi que les événements de phosphorylation. L'apparition d'un dommage à l'ADN crée des structures qui permettent l'activation des points de contrôle cellulaires Mec1 et Tel1. Ceux-ci activent la transduction du signal par une cascade de phosphorylations. En vert : la voie de signalisation activée en cas de dommage réplcatif. Les tirets indiquent une voie secondaire.

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

1. Les voies de signalisation des dommages : *S. cerevisiae*

L'activation de Tel1 et Mec1 permet la **phosphorylation** de l'histone H2A sur plusieurs milliers de bases autour de la cassure, ce qui favorise la réparation. L'activation de Mec1 entraîne alors la transduction du signal via une cascade de phosphorylations ce qui conduit à une grande variété de réponses

Cette signalisation permet aussi la stabilisation des fourches de réplication en phase S
Mec1 est l'acteur central de cette cascade de signalisation.

2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

2. La recombinaison homologue :

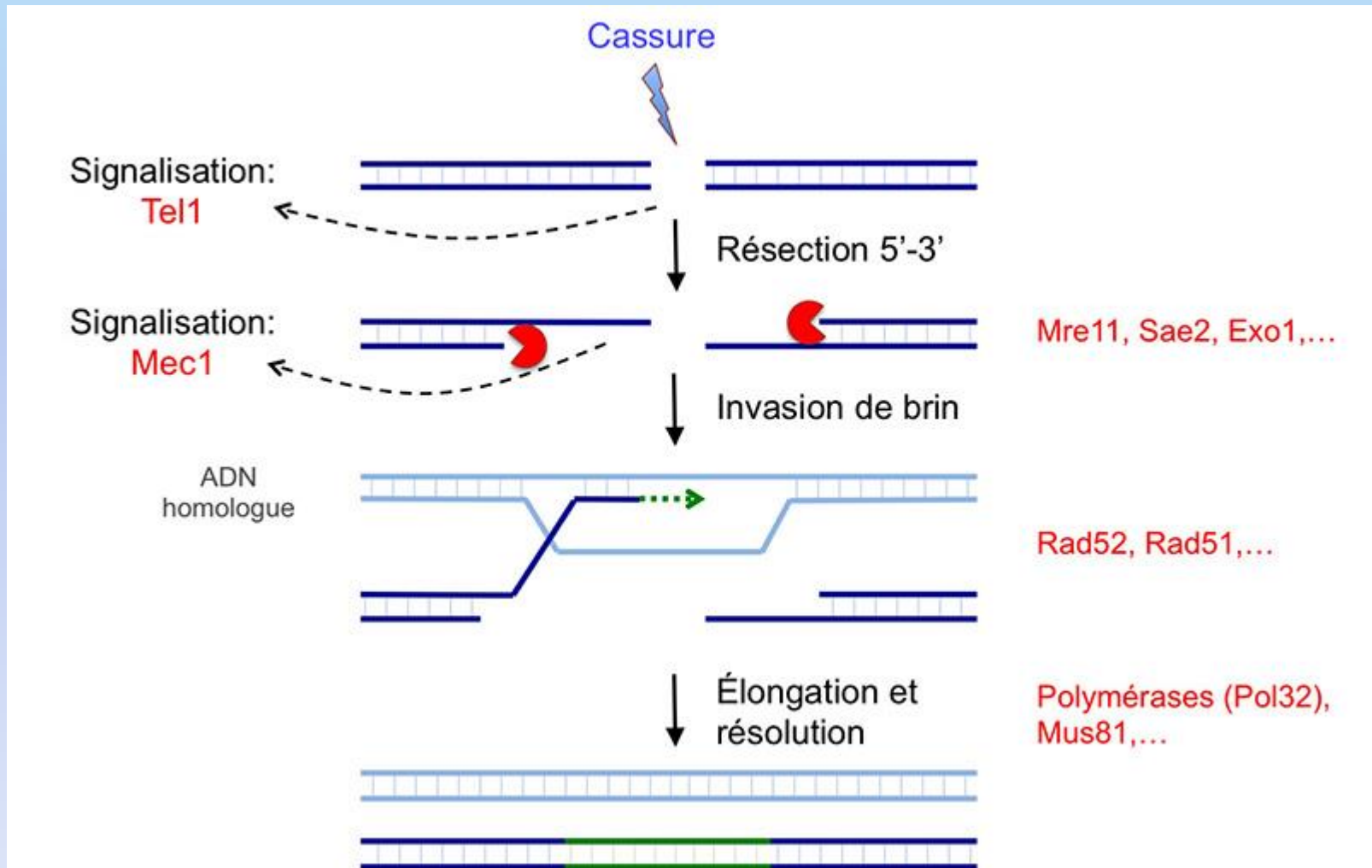
Parmi l'ensemble des lésions pouvant survenir, les cassures double brin sont des dommages très risqués pour les cellules. Un des mécanismes majeurs de réparation de ces cassures est la voie de la recombinaison homologue. Cette voie utilise une séquence homologue à la région de la cassure pour permettre une réparation des cassures double brin selon les étapes suivantes :

Le mécanisme de la recombinaison homologue, conservé dans le monde vivant, suit trois grandes étapes, initiées par une cassure double-brin de l'ADN :

- **Une phase présynaptique** durant laquelle le site de cassure est reconnu, partiellement dégradé et où les protéines de recombinaison sont assemblées ;
- **Une phase synaptique**, qui englobe la recherche et l'échange de brins avec un ADN double-brin intact dont la séquence est similaire (homologues) à la molécule lésée ;
- **Une phase post-synaptique** durant laquelle la synthèse d'ADN est initiée au site d'échange de brin (ce qui restaure la séquence perdue au site de cassure en utilisant l'ADN intact comme matrice) puis la résolution des intermédiaires d'échange de brins.

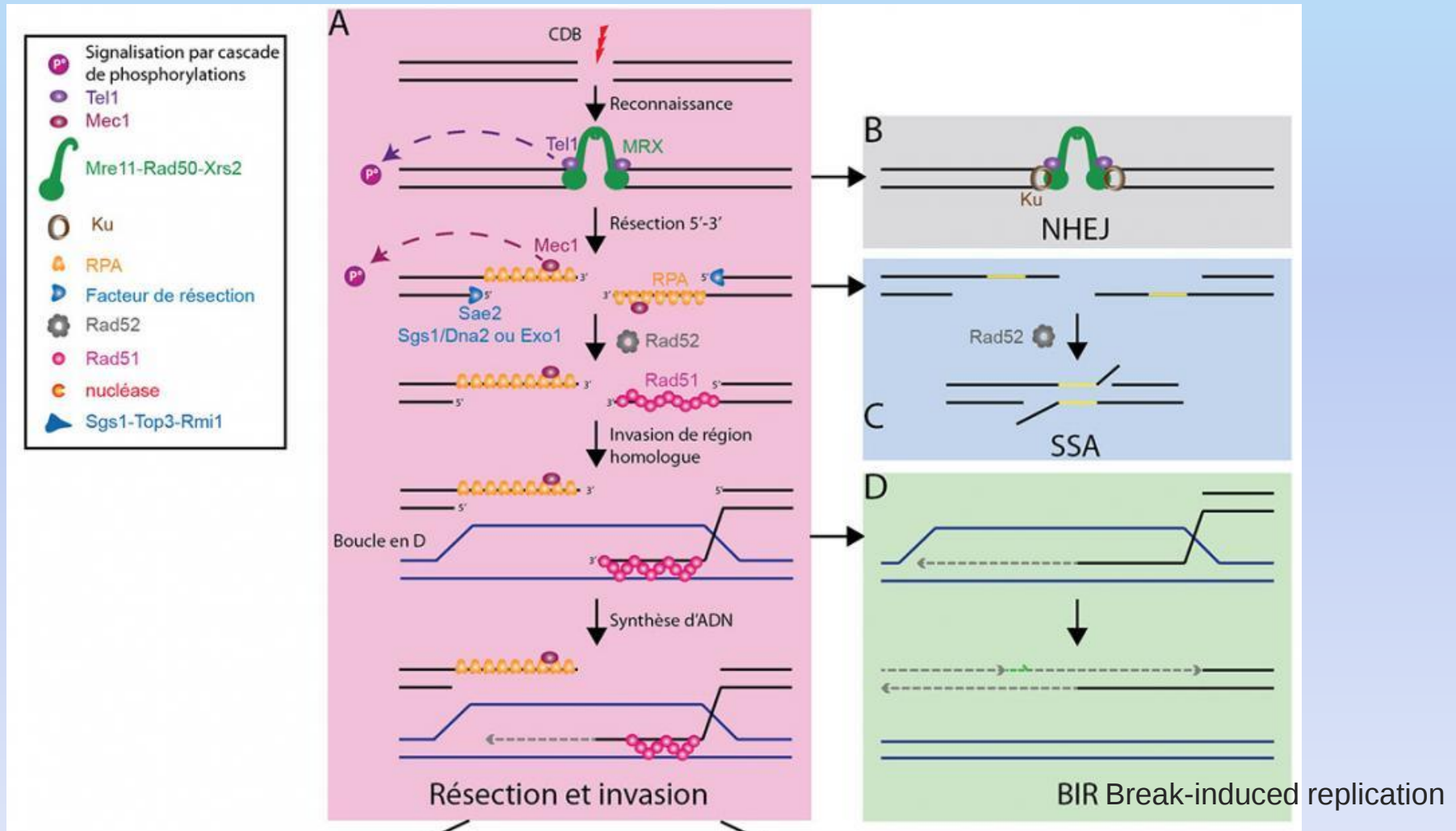
2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :



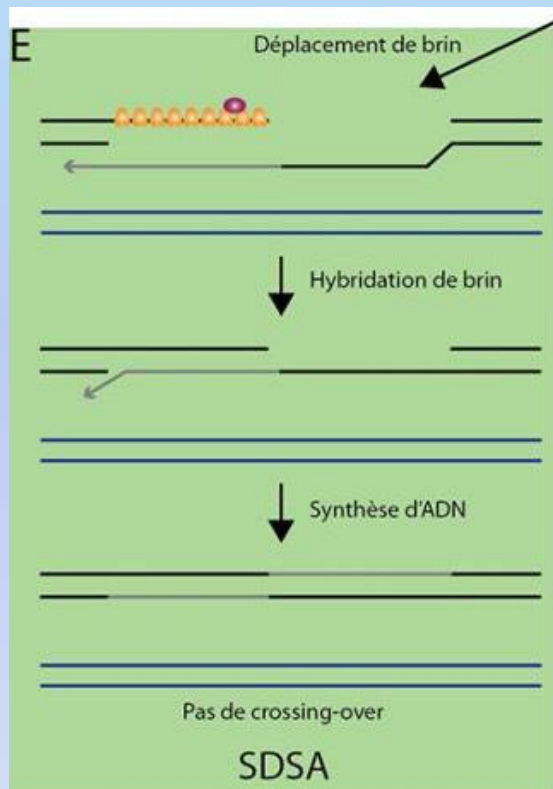
2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :

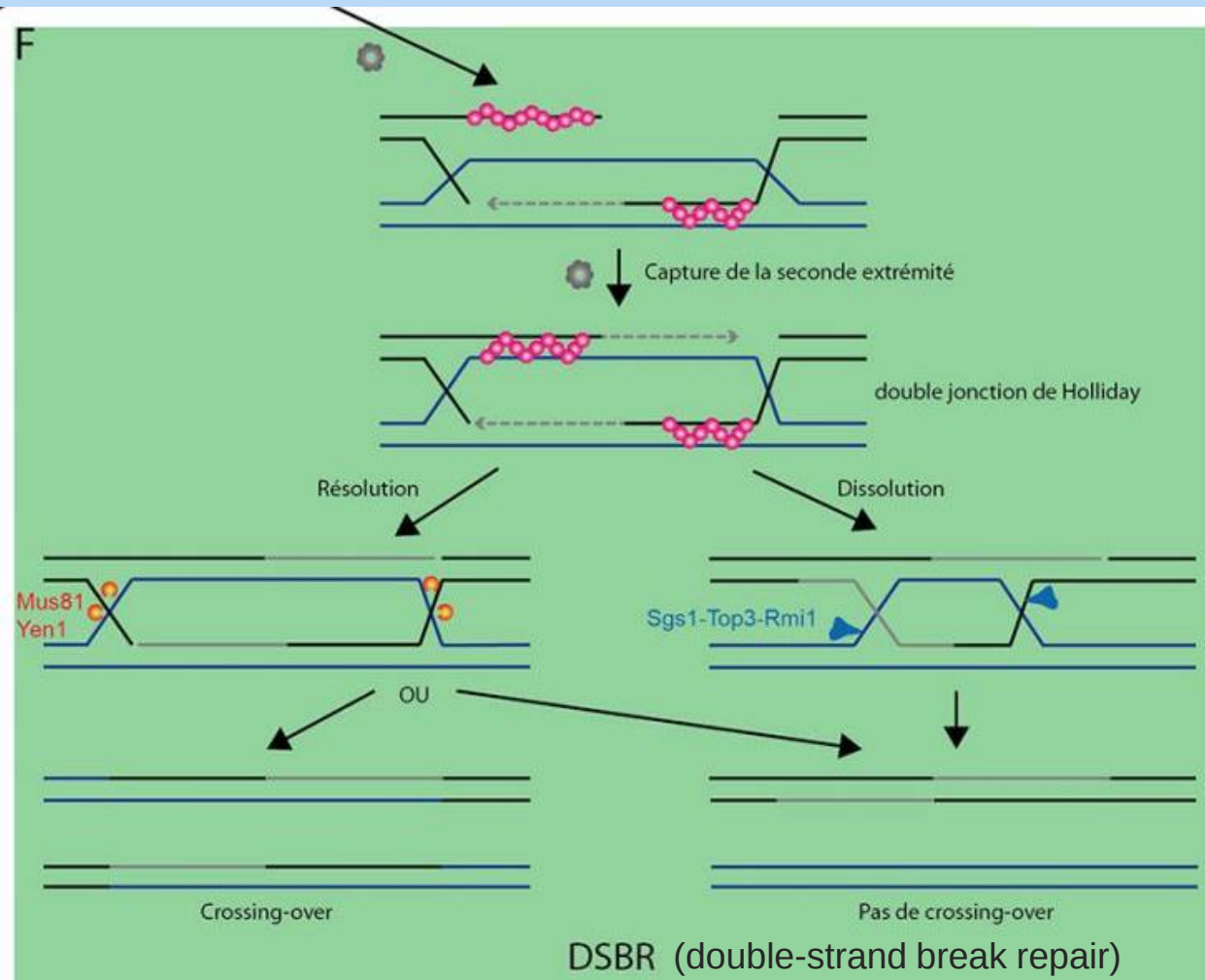


2. La réparation de l'ADN et détection du pouvoir mutagène

III- Des réparations adaptées à chaque type de dommage :



(synthesis-dependent strand annealing)





Merci pour votre attention