

Ce cours à des références

Réplication de l'ADN chez les eucaryotes

La réplication de l'ADN chez les eucaryotes se trouve confrontée aux problèmes posés par la taille des génomes, par leur distribution en plusieurs chromosomes qui sont répliqués une seule fois par cycle cellulaire et par la plus grande complexité de l'organisation cellulaire. Les solutions apportées par l'évolution à ces contraintes ont été, d'une part, la complication des mécanismes déjà présents chez les procaryotes et, d'autre part, la sélection de systèmes propres aux eucaryotes. Actuellement, on connaît beaucoup moins les détails de la réplication chez les eucaryotes que chez les procaryotes.

• Les méthodes d'étude

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**, 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, biochimique, moléculaire et cellulaire de la réplication.

• Le réplisome eucaryote

1. 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 (5kb) 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**. Qui reconnaît l'origine, modifie localement la structure de l'ADN et **agit comme hélicase** pendant l'élongation. Les autres protéines nécessaires à la réplication sont d'origine cellulaire. on peut

reconstituer *in vitro* en présence d'**antigène T**, 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 (pol α)**, constituée de 4 sous-unités, responsable de la synthèse des amorces d'ARN par son activité primase, et de leur élongation en courts fragments d'ADN par son activité polymérase ;
- **l'ADN polymérase δ (pol δ)**, constituée de deux sous-unités, responsable de l'élongation des amorces des deux 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)**, constituée de trois sous-unités, qui se fixe à l'ADN simple brin et stimule pol α et pol δ ;
- **le RF-C (replication factor C)**, constitué de 5 sous-unités, avec forte affinité pour le complexe matrice/amorce et qui est nécessaire pour charger le PCNA sur l'ADN ;
- **l'ADN topo-isomérase I**, élimine le surenroulement de l'ADN produit en amont de la fourche au cours de la réplication ;
- **l'ADN topo-isomérase II**, sépare les deux chromosomes de se à la fin de la synthèse ;
- **la RNase H1 et le MF1 (maturation factor 1, appelé aussi nucléase FEN-1) qui éliminent les amorces ;**
- **l'ADN ligase I**, **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.

2. Mise en place et activité

on peut résumer les étapes de la synthèse **in vitro** de l'ADN de SV40, selon le modèle proposé par **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 ;

(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 comme 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, l'ADN polymérase ϵ (pol ϵ), est codée par un gène essentiel chez les levures. De plus, la présence de la pol ϵ a été montrée dans les cellules animales. Le fait que l'ADN de SV40 puisse se répliquer *in vitro* sans la pol ϵ n'exclut pas que la répllication des chromosomes des cellules animales dépende néanmoins de l'activité de cette enzyme. Dans un système **in vitro**, on a pu démontrer l'implication de la pol ϵ dans la réparation de l'ADN. Au moins deux autres ADN polymérases « spécialisées » sont présentes chez les eucaryotes : l'ADN

polymérase β , qui est impliquée dans la réparation par excision de bases, et l'ADN **polymérase γ** qui **réplique l'ADN mitochondrial**.

• origines de répllication des chromosomes eucaryotes

Les chromosomes de *S. cerevisiae* contiennent des séquences conservées appelées **ARS** (autonomous replicating sequence) responsables de l'initiation de la répllication. La structure de ces séquences a été étudiée ainsi que l'importance fonctionnelle des segments qui les constituent : elles contiennent toutes une séquence consensus de onze paires de bases **ACS** (ARS consensus sequence) nécessaire pour leur fonction mais pas suffisante en l'absence d'autres séquences environnantes moins bien conservées. Pour ce qui concerne les origines de répllication des cellules animales, les informations sont préliminaires et sujettes à un débat intense et passionné. Actuellement, il est impossible d'affirmer que la séquence d'une région d'ADN détermine à elle seule le site d'initiation de la répllication. Certains résultats donnent plus d'importance à l'organisation « spatiale » des régions d'initiation, qui pourraient donc montrer une variabilité de la séquence nucléotidique et qui seraient associées à des structures chromatiniennes et/ou nucléaires qui seraient le vrai signal pour la mise en place du réplisome.

• régulation de la répllication au cours du cycle cellulaire

L'identification et l'étude des séquences ARS de *S. cerevisiae* ont permis de mettre en évidence leur fonction d'origine de répllication chromosomique et d'étudier les protéines qui interagissent avec elles. En particulier, un complexe multiprotéique, appelé **ORC** (origin recognition complex) est présent tout au long du cycle cellulaire sur les **ARS de *S. cerevisiae*** et change de structure après la mitose. Seule la forme postmitotique apparaît capable de permettre le démarrage de la répllication à partir d'une **ARS**, après interaction avec une protéine signal activée en fin de **phase G1**. Après le démarrage, le complexe ARS/ORC change de structure et apparaît inactivé sur les deux copies

chromosomiques jusqu'à la mitose, empêchant ainsi une nouvelle réplication à partir de la même origine avant la division cellulaire. Puisque des protéines similaires à celles du **complexe ORC** sont présentes dans les cellules animales, il est probable que ce mécanisme sera au moins partiellement conservé chez les eucaryotes multicellulaires. Dans les cellules animales, la disparition de la membrane nucléaire au cours de la mitose semble jouer un rôle central parmi les mécanismes qui empêchent la réutilisation d'une origine. Chez le xénope, « l'autorisation à répliquer » l'ADN serait donnée par un complexe multiprotéique dont le positionnement sur la chromatine dépend d'un facteur incapable de traverser la membrane nucléaire. Ce facteur ne pourrait entrer dans le noyau et se fixer à la chromatine qu'au moment de la lyse de la membrane nucléaire, à la mitose, permettant au complexe responsable de « l'autorisation à répliquer » de devenir fonctionnel. Ce dernier serait modifié et/ou déplacé au cours de la réplication de l'ADN en rendant impossible une nouvelle réplication d'une même région d'ADN au cours de la même phase S. On peut remarquer ici que la compartimentation du matériel génétique dans le noyau pose aux eucaryotes le problème du transport à partir du cytoplasme des protéines impliquées dans la réplication. Le signal de localisation nucléaire de la pol α de *Schizosaccharomyces pombe* a été étudié en détail.

• L'assemblage des nucléosomes

les nucléosomes existant sur l'ADN en cours de réplication sont déstabilisés par la fourche et se reconstituent sur les deux doubles hélices post-répliquatives., les histones H3 et H4, néosynthétisées, sont acétylées et déposées en tétramère sur l'ADN répliqué. Deux dimères des histones H2A/H2B complètent ensuite le nucléosome par une réaction qui est indépendante de la réplication. Un complexe protéique appelé CAF-1 (chromatin assembly constitué de trois sous-unités, est responsable du positionnement du tétramère des histones H3/H4 néosynthétisés sur l'ADN répliqué: son activité dépend de la réplication, peut-être par

une interaction indirecte avec la fourche. Le facteur CAF-1 pourrait donc être un composant du réplisome des cellules animales.

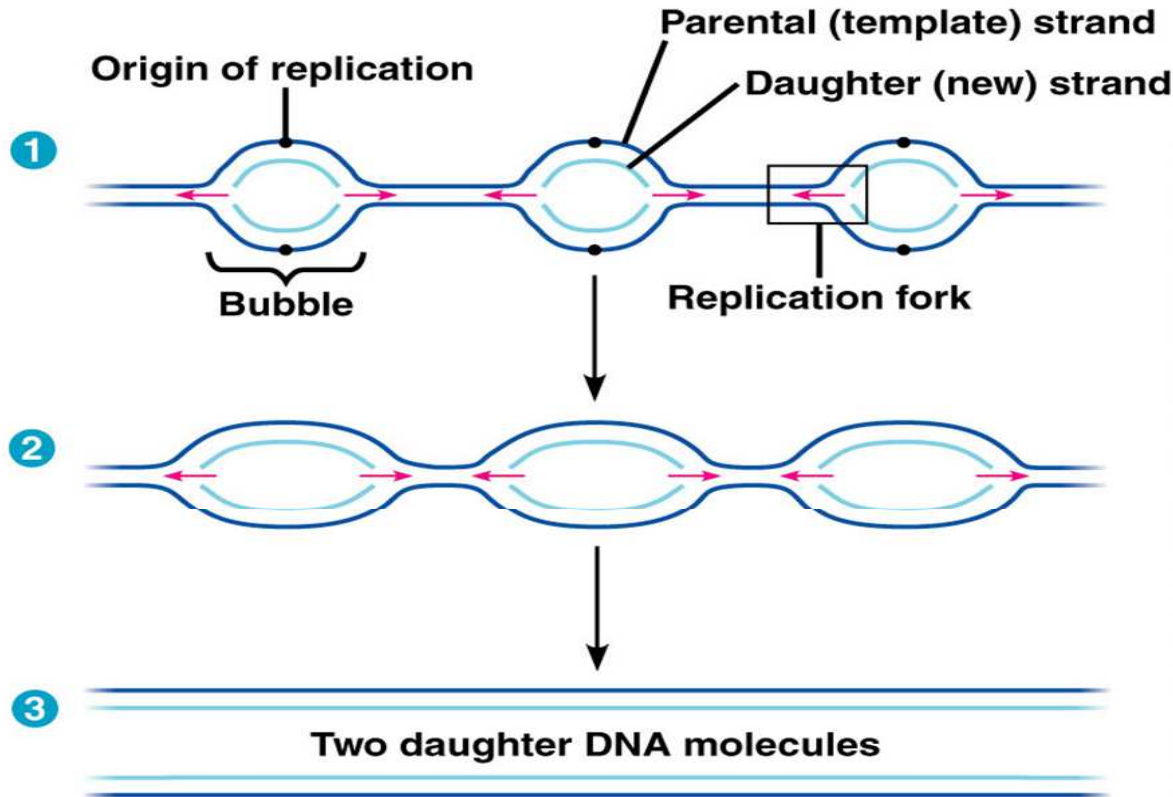
• Points de contrôle de la réplication

L'étude de la réponse cellulaire aux éléments qui perturbent la réplication a révélé l'existence de voies de contrôle qui empêchent la mitose au cours de la phase S. Chez les levures de type sauvage, **l'hydroxyurée** provoque l'arrêt de la réplication. Certains mutants, au contraire, n'arrêtent pas leur cycle en présence de ce produit et peuvent entrer en mitose même si leur génome n'est pas complètement dupliqué. Naturellement, cette mitose est létale. **L'étude biochimique des produits des gènes identifiés grâce à ces mutants est en cours.** On sait, néanmoins, déjà qu'il existe plusieurs voies de contrôle responsables de l'inhibition de la mitose pendant la réplication. **De plus, la vitesse de la réplication est aussi contrôlée,** au moins chez *S. cerevisiae*, en réponse à des lésions sur l'ADN. Un des gènes impliqués dans ce contrôle semble être l'homologue fonctionnel d'un gène humain qui est muté chez les malades atteints d'ataxie-télangiectasie. **La compréhension des voies de contrôle de la phase S peut donc déboucher sur des résultats importants en pathologie humaine.**

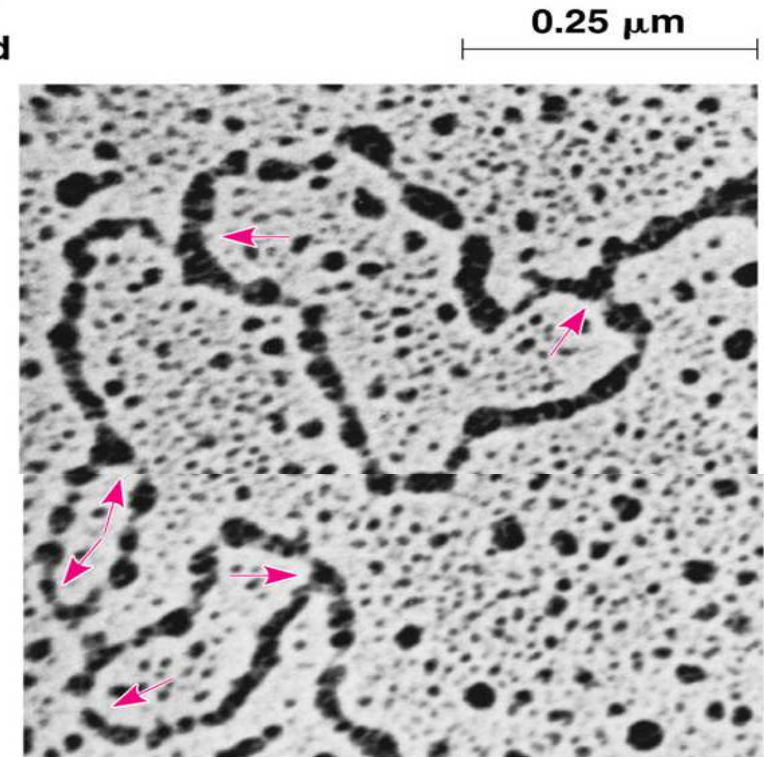
Conclusion

toutes les ADN polymérase du monde vivant, celui des archéobactéries, appartiennent à la même famille que les polymérase α , δ et ϵ des eucaryotes, . Il y a donc une certaine conservation de la structure des ADN polymérase dans le monde vivant. Cependant, chez les eucaryotes, on observe une augmentation de la complexité des origines de réplication et du nombre de protéines impliquées dans l'initiation et dans l'élongation.

- origine de réplication (plusieurs?)
- "oeil" de réplication



(a) In eukaryotes, DNA replication begins at many sites along the giant DNA molecule of each chromosome.

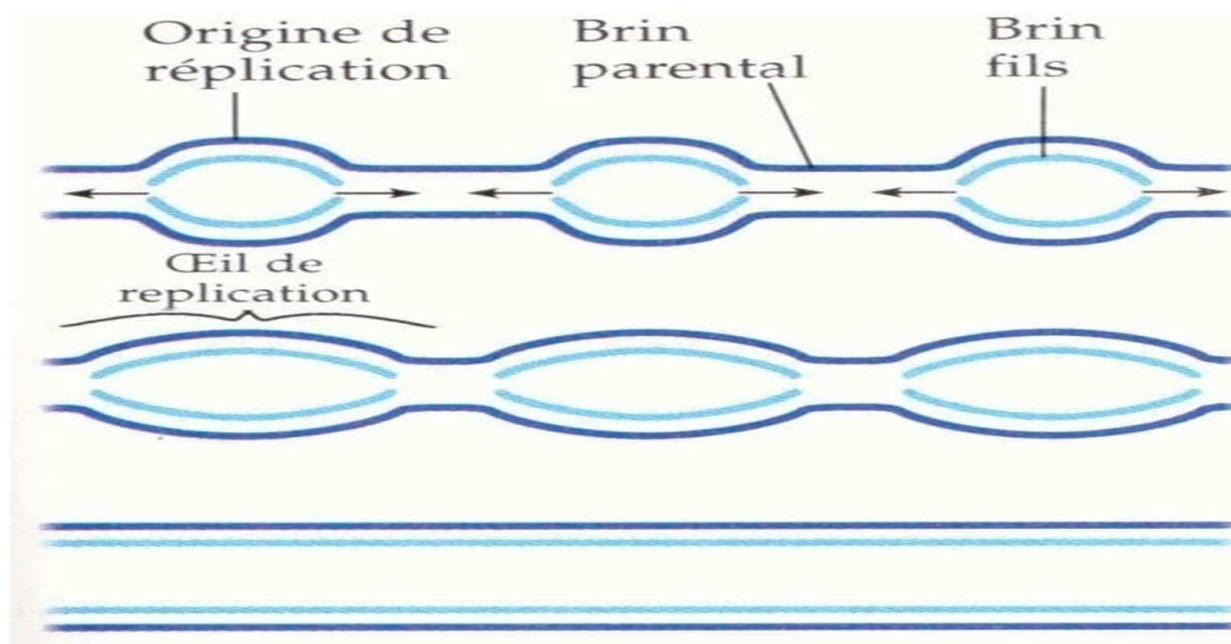


(b) In this micrograph, three replication bubbles are visible along the DNA of a cultured Chinese hamster cell (TEM).

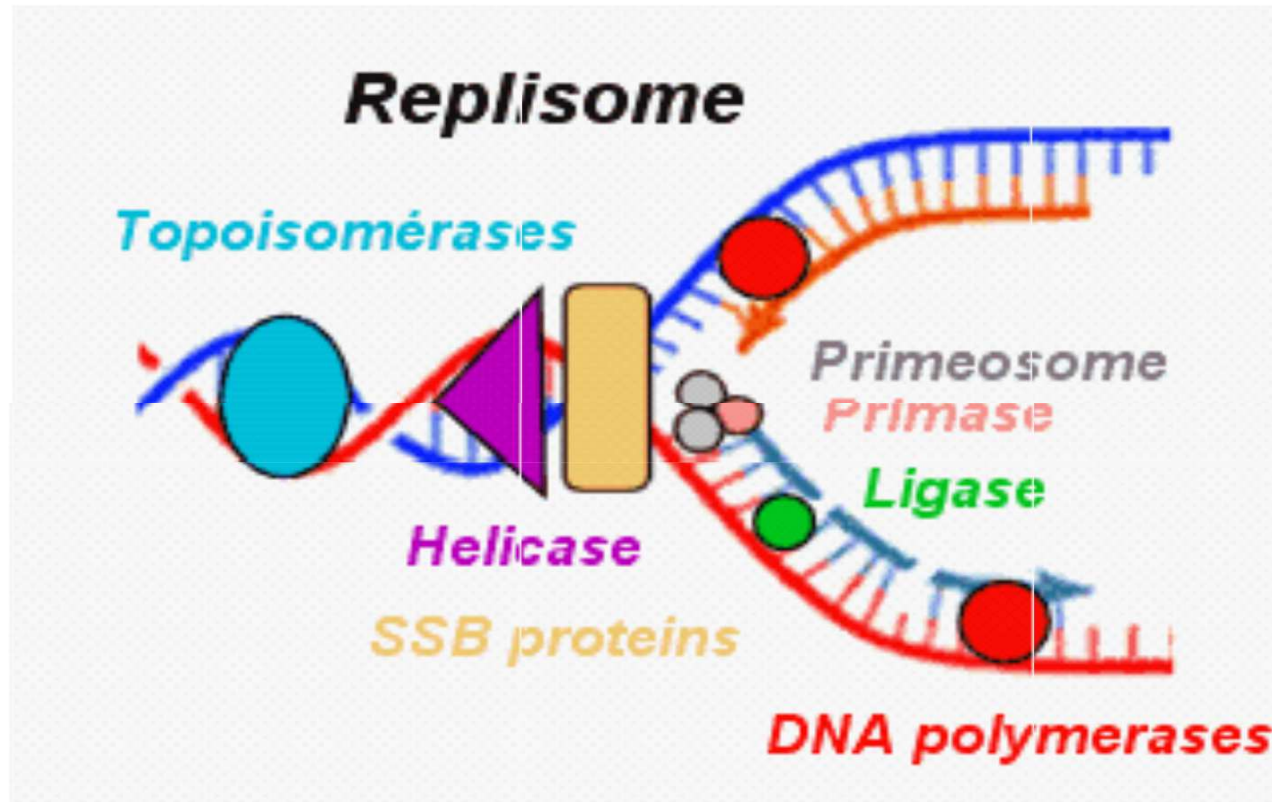
Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

La vitesse de réplication de l'ADN:

- **homme:** env. **50 nucléotides/s**
- **procaryotes:** env. **500 nucléotides/s.**
- cellules eucaryotes **amplifient la vitesse** de réplication en faisant apparaître **plusieurs oeils de réplication** sur la même molécule



- l'ensemble de l'activité enzymatique localisée au sein d'une fourche de réplication constitue un **réplisome**.



La réparation d'erreurs:



- **erreurs** dans une molécule d'ADN complète: **1 pour 1 milliard**
- lors de la réplication ce taux est de **1 pour 10'000**:
- il existe donc un **mécanisme de correction** lorsque l'ADN est copié
- **Bactéries: ADN polymérase** qui vérifie si chaque nucléotide est **correct** **durant tout le processus de copie.**
- Lorsqu'un nucléotide est incorrectement lié, la polymérase **élimine le mauvais nucléotide** et le **remplace** par le bon **avant de continuer la synthèse**

- **Eucaryotes: plusieurs protéines** en plus de la polymérase sont nécessaires pour corriger les erreurs.
- Il existe aussi des **mécanismes de réparation** dans l'ADN existant. En effet l'ADN est constamment soumis à des **dommages physico-chimiques** (agents chimiques, émissions radioactives, rayons X, ultraviolets, etc...). Tous ces **changements ou mutations** sont **corrigés continuellement** par des enzymes.