

Ce cours a des références

La réplication de l'ADN

1. Introduction générale

Pour comprendre le **cadre général** du phénomène de la réplication **quatre éléments** sont nécessaires à retenir

1. Caractéristique l'ADN en double hélice

"Il n'a pas échappé à notre que l'appariement spécifique des bases dans l'ADN, suggère un possible mécanisme de copiage du matériel génétique"

Watson et Crick, 1953

Plus précisément la possibilité de **rupture des liaisons hydrogènes** et la possibilité de **formation** des paires de bases par **complémentarité** : A-T et G-C ces caractéristiques nous orientes vers la possibilité d'obtenir deux molécules qui auront la même composition nucléotidiques qu'une molécule à deux brins dont les liaisons hydrogènes sont rompues par la température par exemple, les deux brins peuvent **recruter des nucléotides libres par complémentarité** (voir les caractéristiques de la double hélice cours précédent)

2. Le caractère semi conservatif

Caractère démontré par **Meselson et Stahl en 1958**, et qui ont utilisé des bactéries *E. coli* cultivées sur un milieu contenant du **N15** dit **lourd** (**radioactif**), puis transférées sur un milieu contenant du **N14** dit **léger** ou **normal**, après une génération » **30 mn** » (une division), après **extraction** de leurs ADN et **centrifugation** contre un gradient de **chlorure de césium**

3. synthèse **in vitro** et mise en évidence de l'ADN polymérase par Kornberg 1958.

En se basant sur la technique de marquage **radioactif** de l'élément P et la **centrifugation** pour séparer le brin d'ADN néosynthétisé du brin d'ADN ancien et finalement en testant **l'activité biologique d'un ADN viral** sur une bactérie *E. coli*. (**infection lytique**), Kornberg croyant à l'existence d'une enzyme capable de polymériser l'ADN, c'est son groupe qu'il la mise **en évidence** plus tard, en l'appelant **polymérase de Kornberg**, puis elle a pris le qualificatif de : **Adn polymérase**

4. La révélation par microscopie électronique de l'origine de réplication sur un chromosome d'*E. coli* par Carains(1964)

II. Expériences clés

A. Le caractère semi conservatif :

L'expérience de MATTHEW MESELSON et FRANKLIN STAHL en 1958

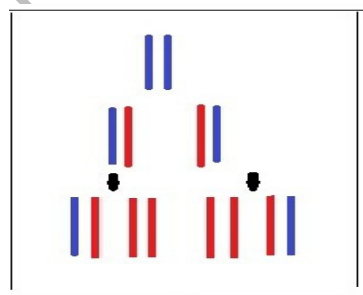
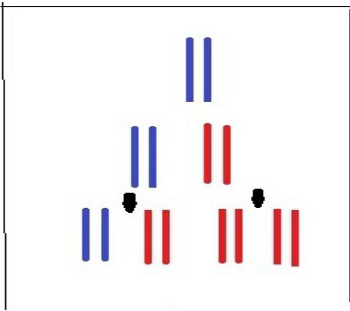
Jusqu'en 1958, trois hypothèses tentaient d'expliquer comment se duplique l'ADN

1. hypothèse **semi-conservative** : chaque cellule hérite d'une molécule d'ADN formée d'un brin ancien et d'un brin nouveau.
2. hypothèse **dispersive** : les molécules d'ADN sont formées de portions d'ADN ancien et d'ADN nouveau.
3. hypothèse **ségrégative** : une cellule hérite d'une molécule d'ADN nouvelle et l'autre cellule possède l'ancienne molécule.

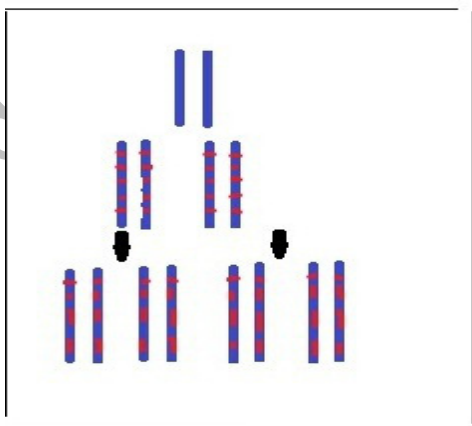
MATTHEW MESELSON et FRANKLIN STAHL en 1958 voulaient comprendre comment se réalisait la répllication de l'ADN bicaténaire: selon quelles modalités passe-t-on d'1 molécule d'ADN formée de deux brins à 2 molécules d'ADN bicaténares identiques ?

Pour trouver quelle hypothèse était la bonne, Meselson et Stahl cultivent des bactéries *E. coli* dont l'avantage est de présenter des cycles cellulaires rapides (moins de 30 min) et synchronisés.

Modèle conservatif: la molécule d'ADN mère est conservée, non modifiée avec formation d'une nouvelle molécule « fille ».



Modèle semi conservatif: les deux molécules d'ADN se dissocient et chaque brin sert de modèle pour la synthèse du brin complémentaire (nouveau)



Modèle dispersif: aucun brin n'est Conservé intact, La copie se réalise par Fragments dispersés dans l'ensemble de L'ADN

Quelle est la caractéristique fondamentale de la réplication ?

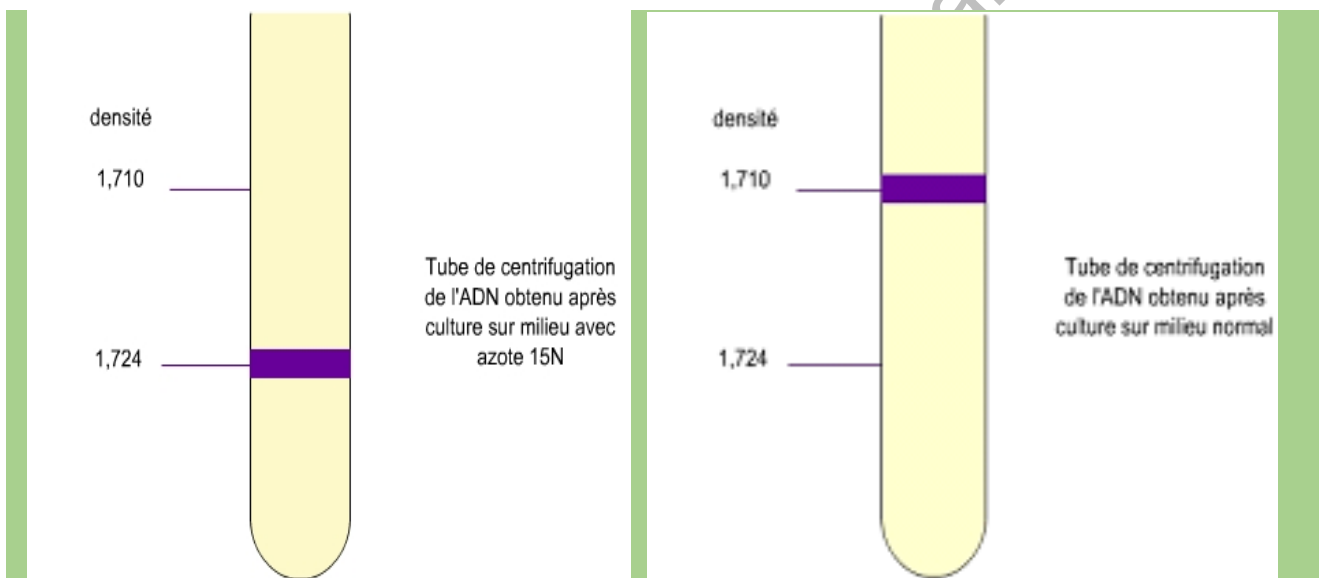
Le modèle de réplication de l'ADN a été trouvé après l'expérience qui va suivre.

MATTHEW MESELSON et FRANKLIN STAHL ont démontré expérimentalement que la réplication est semi conservative.

L'expérience a été réalisée sur la bactérie *Escherichia coli* et se déroule en plusieurs étapes :

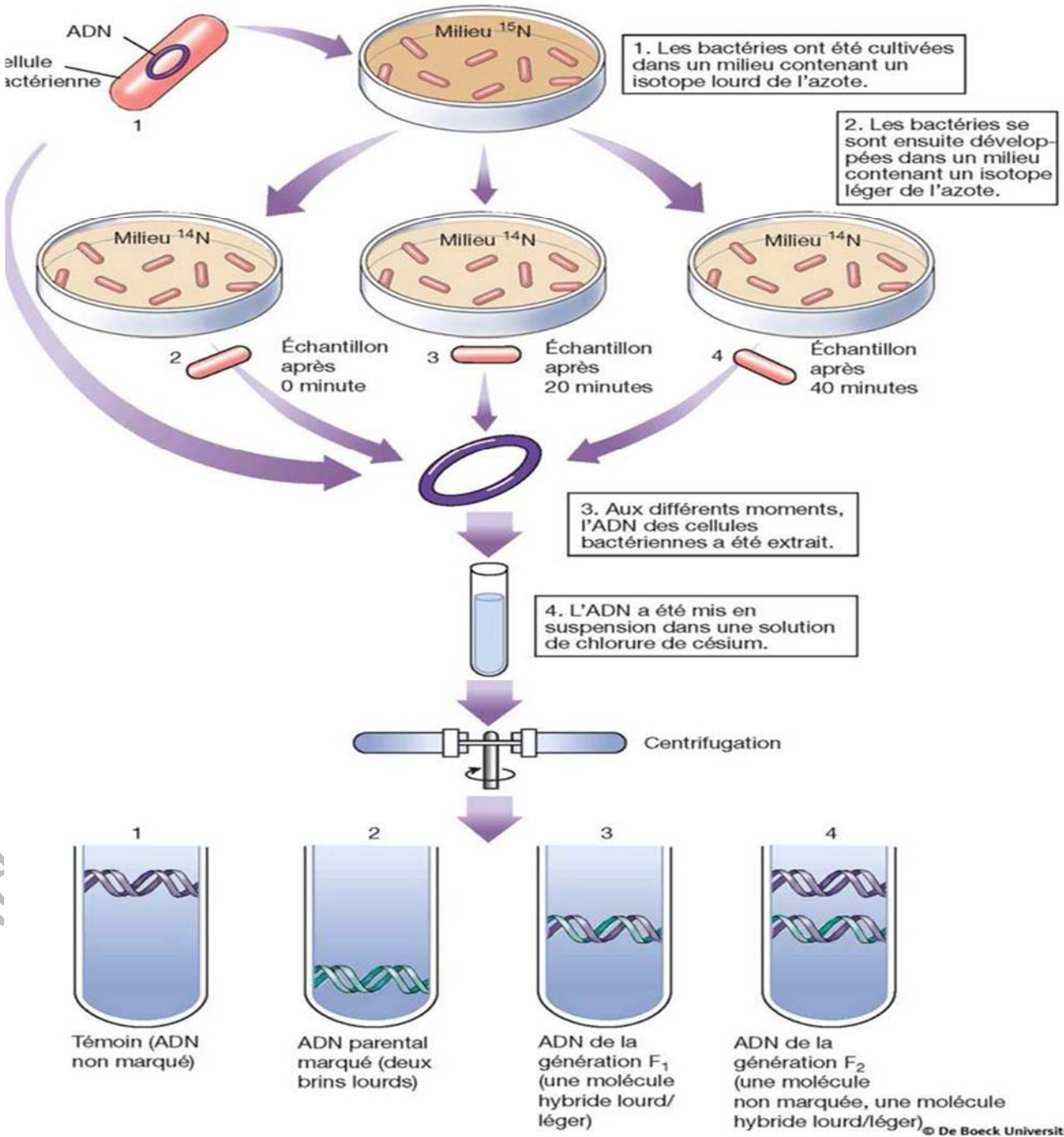
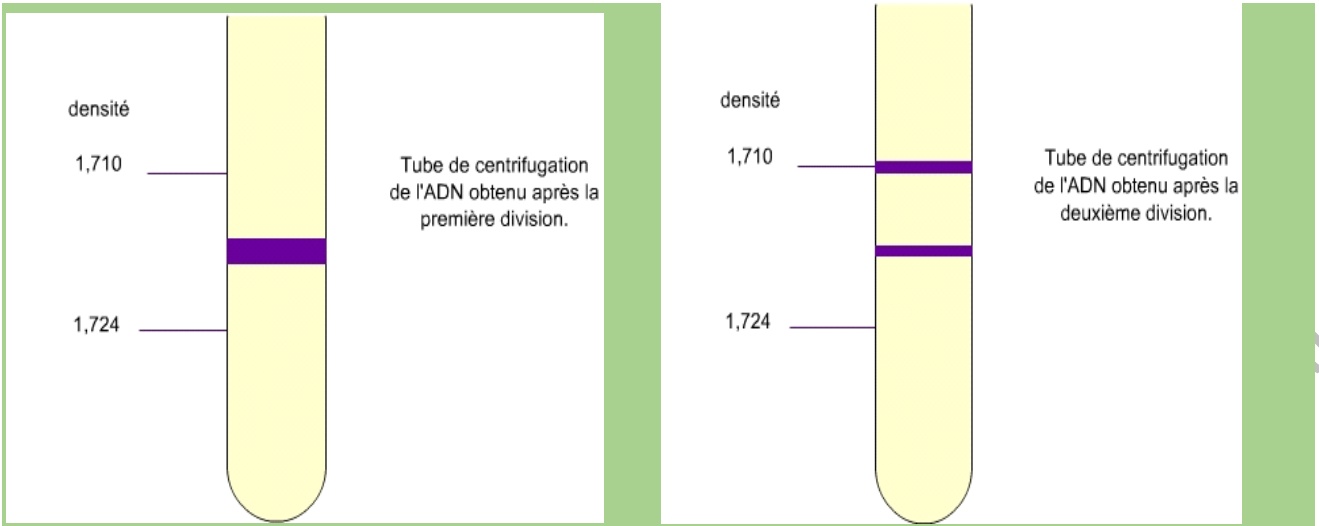
1. EXPERIENCE PRELIMINAIRE

Ces bactéries sont cultivées sur un milieu normal. Après extraction de leur ADN, on pratique une centrifugation de ces molécules, dite en gradient de densité*. On agit de même avec des bactéries cultivées sur un milieu dont l'azote normal ^{14}N du chlorure d'ammonium est remplacé par l'isotope ^{15}N de l'azote, dit azote lourd.



2. EXPERIENCE de MESELSON et STAHL

Des bactéries cultivées depuis longtemps en présence de molécules azotées ^{15}N sont repiquées sur un milieu contenant des molécules azotées ^{14}N et permettant la synchronisation des divisions. Des fractions sont prélevées correspondant à 1, 2, 3, ... divisions. L'ADN est extrait, placé dans la solution de chlorure de Césium et centrifugé 24h à 100.000 g. La position des ADN est repérée par une mesure de la densité optique. On obtient le résultat suivant.



Cette expérience permet de démontrer le caractère semi-conservatif de la multiplication de la molécule d'ADN chez les bactéries. Cette expérience a pu être réalisée grâce à plusieurs mises au point techniques :

1 - Meselson et Stahl mettent au point une technique d'obtention de gradient de densité par centrifugation. En utilisant du chlorure de Césium de densité moyenne 1,72, ils obtiennent après 24h de centrifugation à grande vitesse un gradient de densité (environ de 1,70 à 1,75), gamme qui englobe la densité de l'ADN (1,710).

2- Ils mettent au point une méthode qui permet de synchroniser pendant quelques générations la division des bactéries.



En résumé :

1. Les bactéries avant l'expérience se divisent pendant plusieurs générations dans un milieu contenant du **N15** (isotope lourd). Par conséquent, au début de l'expérience, tout l'ADN est essentiellement uniformément marqué avec du **N15** et a une densité lourde.
2. Les cellules sont ensuite transférées dans un milieu contenant du **N14**.
3. L'ADN est isolé à partir d'échantillons de culture prélevés à différents temps :

Autrement dit (en tenant compte des divisions couramment appelées génération, ce qui signifie répllication de l'ADN :

- Au début de l'expérience (temps 0) : tout l'ADN est lourd
- Après transfert dans le milieu **N14**, tout l'ADN a une densité « hybride » exactement intermédiaire. Ce qui indique que les molécules répliquées contiennent des quantités égales de deux isotopes d'azote.
- Après une seconde génération dans le milieu **N14**, la moitié de l'ADN a la densité de l'ADN avec du **N14** (ADN léger) sur les deux brins, et l'autre moitié a une densité hybride.

- Après trois générations, 6/8 ont la densité de l'ADN avec du N14 et 2/8 ont une densité hybride. Le ratio avec l'ADN hybride est donc de : 3/4 (léger) : 1/4 (hybride).

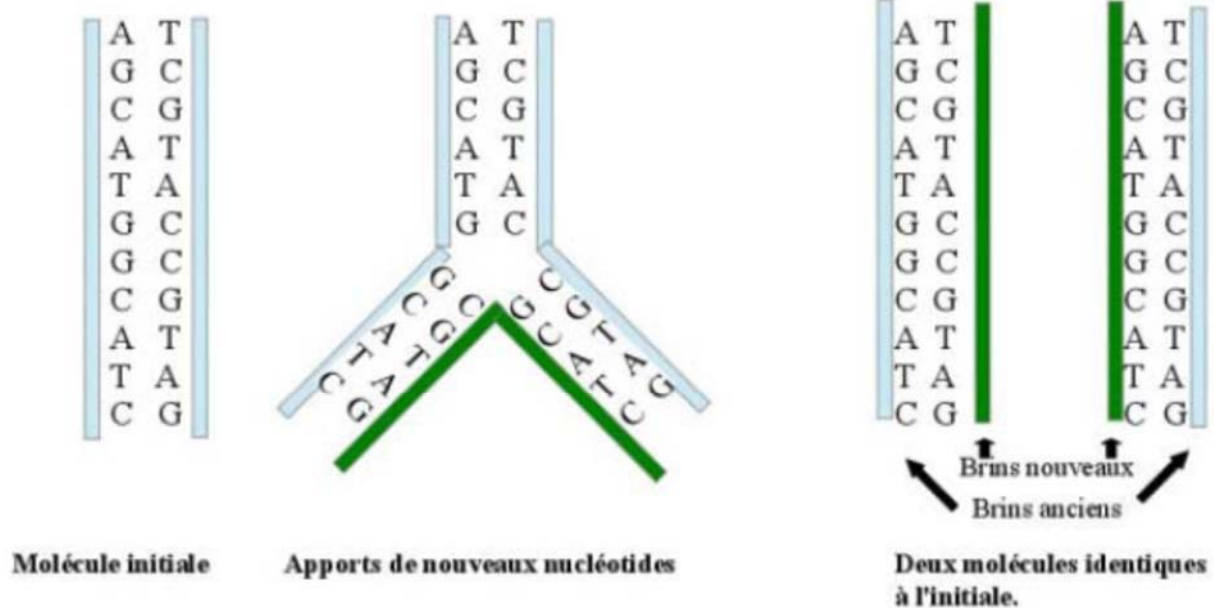
Conclusion : le mode de réplication est semi conservatif

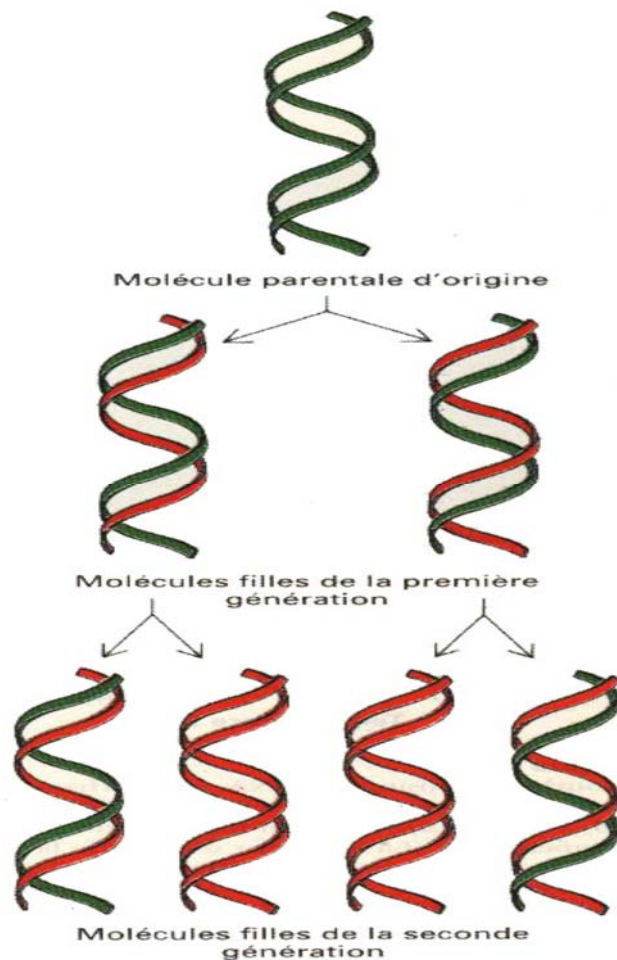
Alors :

La réplication est dite « **semi-conservatrice** ». c.à.d. que sur les deux brins de toute molécule d'ADN, il y' a toujours :

- 1 brin d'ADN ancien qui provient de l'un des 2 brins d'ADN parental.
- 1 brin d'ADN jeune, nouvellement formé.

Ainsi, à chaque **réplication** il se produit une **séparation des deux brins d'ADN parental** par simple rupture des liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires. Une fois séparée, chaque brin servira de **modèle** pour la **synthèse** d'un **nouveau brin complémentaire**. On obtient donc deux molécules d'ADN identiques, **chacune des deux contenant un brin parental et un brin fils.**





La sédimentation à l'équilibre permet de séparer des molécules d'ADN $15N$ et $14N$

- L'ADN marqué au $15N$ est plus dense et se sépare bien en centrifugation à l'équilibre de l'ADN $14N$

Interprétation

A la génération 0: une seule bande ADN marquée $15N$

A la première génération: 1 seule bande dont la densité est intermédiaire entre $15N$ et $14N$

A la deuxième génération: 2 bandes, 1 de densité $14N$, l'autre intermédiaire

Pour 4 générations il y a essentiellement de l'ADN $14N$

B. Mise en évidence de l'ADN polymérase

Expérience de Kornberg 1958

Le mode semi-conservatif de la synthèse de l'ADN implique les éléments suivants :

- ❖ Une molécule d'ADN double brin capable de servir de modèle
- ❖ Des désoxyribonucléotides précurseurs de la chaîne nouvelle,
- ❖ Une enzyme : ADN-polymérase, capable de les relier, cette enzyme (hypothétique pour l'instant) est fondamentale car non seulement elle devra assurer la liaison covalente ($3'-5'$ phosphodiester) entre les nucléotides mais elle devra aussi être capable de «choisir» ceux-ci en fonction du modèle présent selon la règle d'appariement des bases.

POLYMERISATION DE DESOXYRIBONU-CLEOTIDES IN VITRO

Pour purifier et étudier cette enzyme, Kornberg a mis au point un système de synthèse *in vitro* à partir d'extraits d'abord assez grossiers d'*E. coli*.

Comment :

1. Évaluer de tels systèmes?
2. Prouver qu'une synthèse a bien lieu *in vitro* ?
3. Distinguer l'ADN néo synthétisé de celui qui est obligatoirement présent dans l'extrait comme modèle ?

Kornberg va lui aussi faire appel à des **marqueurs isotopiques** : des nucléotides comportant des phosphores **32 radioactifs (32P)**, si une synthèse a lieu, elle fera appel à ces **précurseurs radioactifs** et le polymère résultant sera **radioactif**, «**marqué**» et facilement **repérable**.

D'après l'analyse des **nucléotides libres présents dans le cytoplasme**, Kornberg décide de choisir des **nucléotides triphosphorylés en 5'** alors que les constituants de l'ADN sont mono phosphorylés et que bien souvent, l'hydrolyse de polynucléotides produit des mononucléotides phosphorylés en 3' !: la cellule utilise effectivement des nucléotides 5' triphosphorylés et l'énergie fournie par la libération du pyrophosphate.

Remarque:

Dans son mélange réactionnel, Kornberg dispose d'**ADN modèle**, de **précurseurs naturels**, de **l'ADN polymérase active (il l'espère)**, auquel il ajoute des **précurseurs radioactifs**.

Après la réaction, la **radioactivité se trouvera partagée entre l'ADN éventuellement synthétisé in vitro (en incorporant des monomères marqués)** et **l'excédent de précurseurs qui n'ont pas été incorporés**.

Il est essentiel d'éliminer tous ces précurseurs libres pour attribuer de la radioactivité à une macromolécule

En pratique, les macromolécules sont précipitées par adjonction d'un acide organique et les petites molécules «acido-solubles» (y compris les précurseurs radioactifs) sont éliminées par Centrifugation.

Le culot, après **plusieurs lavages**, contient les **macromolécules (y compris l'ADN) débarrassées de tout précurseur non incorporé dans la chaîne**.

Kornberg **trouvait** quelque **radioactivité** dans **des fractions acido-précipitables**. Radioactivité qui, à l'époque ne dépassait guère le seuil de confiance des compteurs, mais Kornberg y croyait

Plusieurs équipes, partant de kilogrammes de pâte d'E.coli, ont peu à peu concentré **l'activité de l'ADN polymérase** jusqu'à la purifier est qui fut nommée «**polymérase de Kornberg**».

1.2 REPLICATION IN VITRO

Cette L'expérience prouve qu'une synthèse de polydésoxyribonucléotide est réalisable in vitro mais **ne prouve pas que l'ADN synthétisé est conforme au modèle ni que la synthèse soit une réplication semi-conservative**.

Donc **La suite de L'expérience** va consister à **tenter la synthèse in vitro d'un ADN «biologiquement actif»**.

L'activité biologique la plus facile à détecter étant, à l'époque, la **capacité d'infection d'un ADN de bactériophage**. Le modèle choisi est le **phage ϕ X 174** soit une molécule circulaire d'environ **5000 nucléotides** seulement. **Nucléotides et non pas paires de nucléotides** car il s'agit, pour la particule phagique d'un ADN simple brin que nous appellerons le **brin +**.

Le changement d'un seul de ces nucléotides rend la molécule **inactive (non infectieuse)**.

In vivo, la première étape de l'infection par ce **bactériophage simple brin** est la synthèse d'un **brin complémentaire** pour réaliser une forme circulaire double brin à partir de laquelle **seront reproduits des brins +** qui assureront la descendance phagique.

- pour la synthèse *in vitro* du brin «-» : l'ADN polymérase purifiée ne peut relier des polynucléotides et donc ne peut pas réaliser la liaison phosphodiester qui permet de circulariser un brin d'ADN. Le problème a été résolu par la purification d'une enzyme qui, *in vivo*, remplit cette fonction : l'ADN ligase.

La système va donc comprendre :

1. des molécules d'ADN purifiées de λ 174 (brin +)
2. les 4 désoxyribonucléotides
3. l'ADN polymérase
4. la ligase

En principe, il doit assurer la synthèse de brins - complémentaires du brin + et circulaires.

- Deuxième problème :

Comment séparer les brins- des brins + ?

Problème surmonté par l'utilisation d'un précurseur particulier à la synthèse d'ADN : la 5-bromodésoxyuridine, analogue de nucléotide utilisé par la cellule comme de la thymidine (sera apparié à l'adénine) mais le brome va «alourdir» la molécule d'ADN qui utilise ce précurseur.

La différence de densité est suffisante pour permettre la séparation de brins+ (comportant de la thymidine) de brins - (comportant de la bromodésoxyuridine) par ultracentrifugation sur un gradient de densité de CsCl.

- le brin - synthétisé *in vitro* n'est pas infectieux, seul un brin + peut l'être. Donc Kornberg recommençait une synthèse *in vitro* en utilisant les brins - comme modèles. Pour synthétiser des molécules qui vont s'avérer infectieuses : aucune erreur sur 5000 nucléotides assemblés *in vitro*

C. OBSERVATIONS DE CAIRNS

Cairns a été le premier à observer un chromosome entier d'E. coli en cours de répliation. Il a associé des techniques de marquages isotopiques et d'autoradiographie suivie d'observation en microscopie électronique.

Après avoir cultivé des bactéries dans un milieu contenant de la thymidine à faible activité spécifique, pendant un temps dépassant la durée du cycle, il met au point une méthode de lyse de la cellule permettant de libérer l'ADN directement sur une grille de microscopie électronique, en minimisant les risques de cassures mécaniques de la molécule.

La préparation est recouverte d'une émulsion photographique et après développement, l'examen révèle des grains d'argent le long de la molécule d'ADN. Ces observations ont montré la circularité du chromosome d'E.coli, forme répandue chez les procaryotes, les virus et l'ADN des organites (mitochondries et chloroplastes) des cellules eucaryotiques

Cairns a effectué des marquages plus courts et déduit des images obtenues que la répliation commence en un point du chromosome bactérien et fait le tour de celui-ci.

Plus tard, d'autres chercheurs ont ajouté à un marquage long par la thymidine tritiée à faible activité spécifique un marquage très bref par de la thymidine tritiée à forte activité spécifique. Après autoradiographie, l'intensité des grains permet de distinguer les deux marquages. On observe alors, des sortes de «bulles».

L'interprétation

- d'après l'observation de ces «fourches» (**fortement marquées**), il est clair que la réplication se fait à partir des deux brins anciens simultanément (les figures matérialisées par les grains d'argent seront appelées **fourches de réplication**).
- puisque l'on observe **deux** de ces fourches, c'est que la réplication est **bidirectionnelle**.
- si la réplication est bidirectionnelle c'est qu'il existe une «**origine de réplication**». Cette notion n'est pas que topographique, on verra qu'effectivement, seule une séquence précise dans l'ADN de la réplication.

Remarque

Les cellules Eucaryotes contiennent plusieurs origines de réplication par chromosome,