

# Chapitre 2. La réplication de l'ADN.

Les divisions cellulaires, mitose ou méiose débutent à une phase où les chromosomes sont constitués de deux chromatides.

Ce chapitre a comme objectif de comprendre **les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant une reproduction de l'ADN conforme** (=maintien du patrimoine génétique au cours des générations cellulaires) .

# I. La réplication de la molécule d'ADN

[synTP03]

Selon quelles modalités passe-t-on d'une molécule d'ADN à deux molécules d'ADN identiques ?

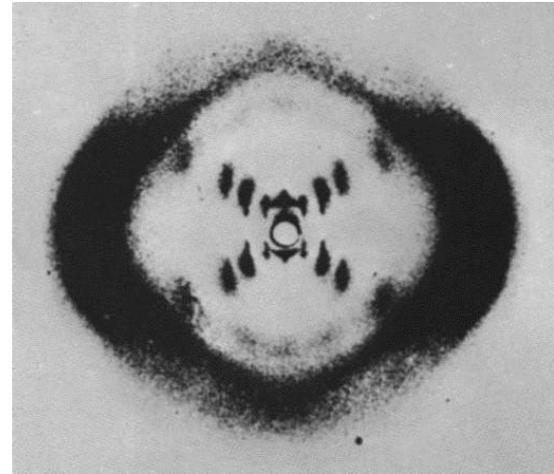
# Histoire des sciences

1941 - **Beadle** et **Tatum** (américain) : gènes

→ plans de construction des protéines

1944 - **Avery** (canadien) : gène <--> ADN

En 1951, Rosalind Franklin (une femme!!!) obtient la première radiographie de diffraction de rayons X au travers de l'ADN , l'interprète et pose les bases : double hélice, bases azotées vers l'intérieur et sucres à l'extérieur.



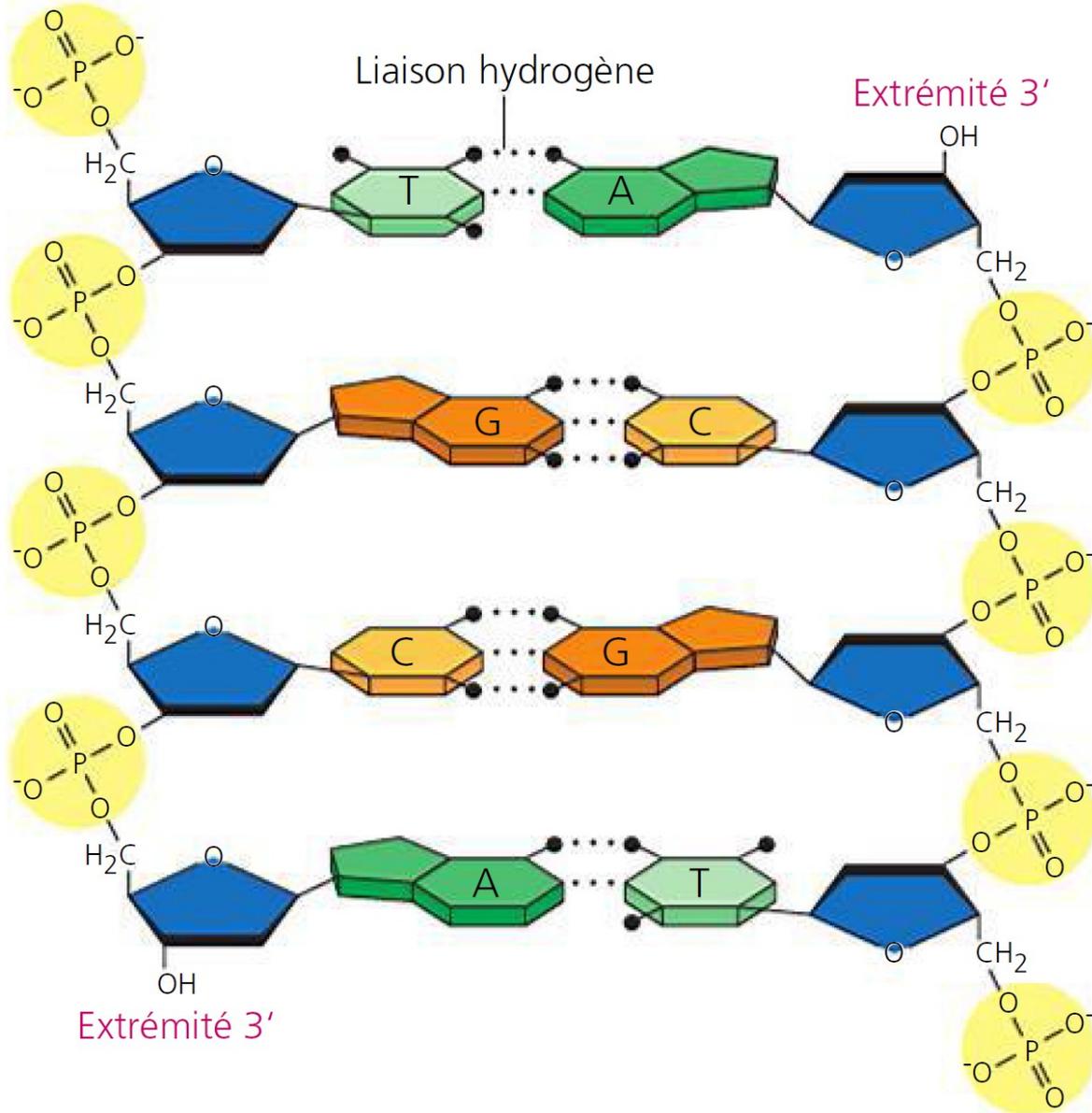
1953 - **Watson** (américain) et **Crick** (anglais) : structure de la molécule d'ADN

# Schéma d'une molécule d'ADN

Alors ?

Que reste t il de votre seconde ?????

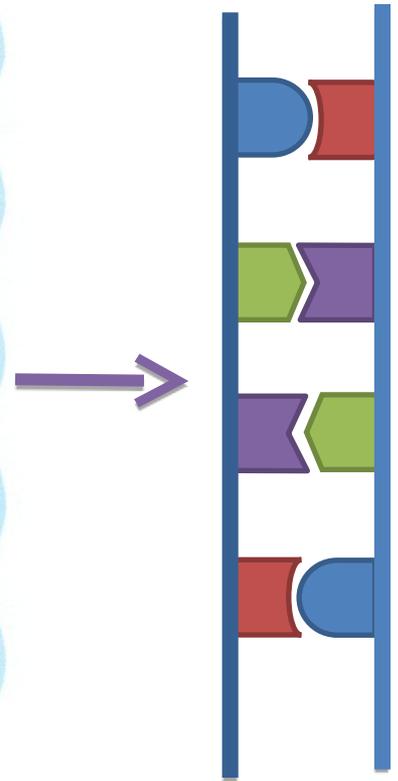
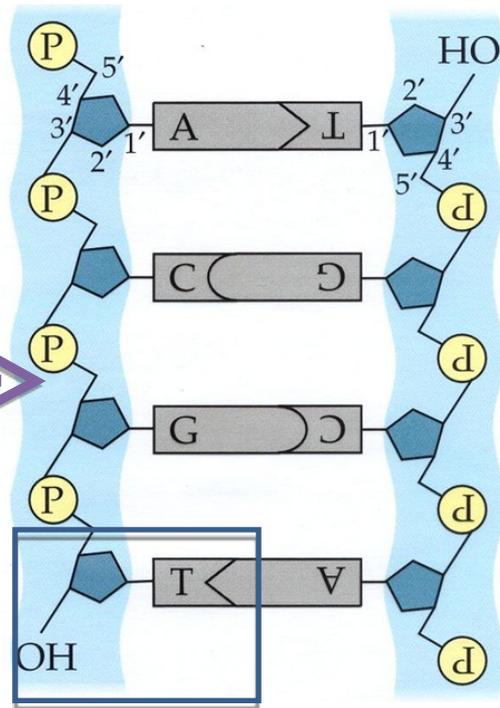
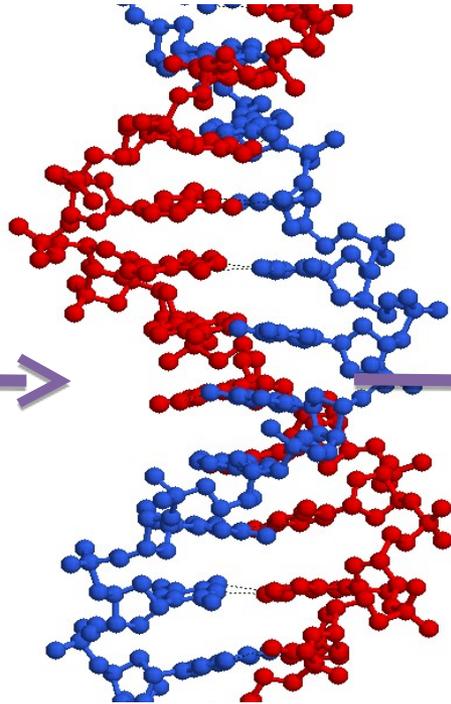
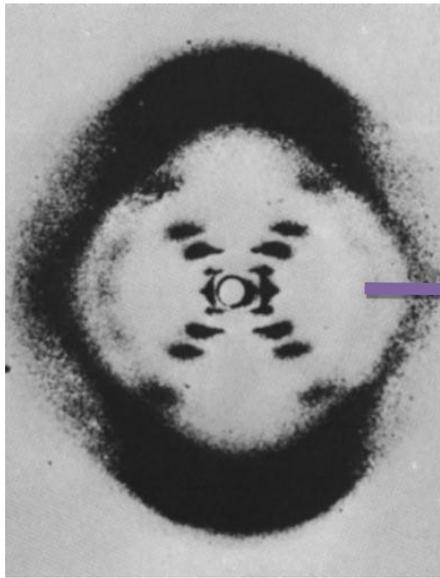
Extrémité 5'



Extrémité 3'

Extrémité 5'

# Du resultat à son interprétation

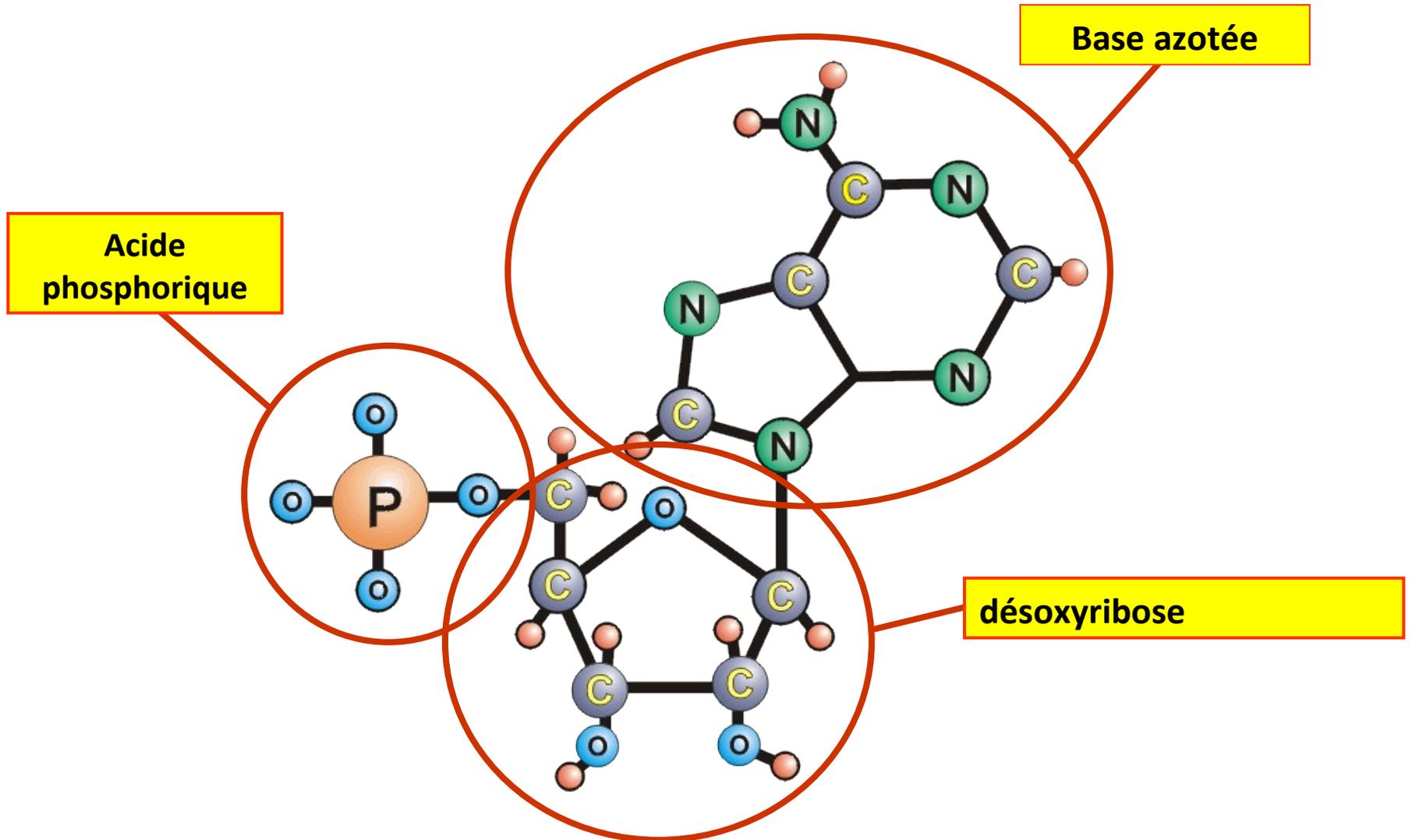


# Schéma d'une molécule d'ADN

ADN= acide desoxyribonucléotide = molécule formée de deux brins antiparallèles constitués exclusivement de nucléotides, formant une double hélice

- Deux brins...
- Des nucléotides... A... T... C... G...
- Complémentarité des nucléotides sur les deux brins

# nucléotide





# Comparaison ADN/protéine

Séquence ADN :

CGTTATAGATTACACACATATA...

Séquence polypeptidique:

Met-Lys-Leu-Asp-His-Glu...

30 mai 1953, **Watson** et **Crick** publient :

Previous discussions of self-duplication have usually involved the concept of a template, or mould. Either the template was supposed to copy itself directly or it was to produce a 'negative', which in its turn was to act as a template and produce the original 'positive' once again. In no case has it been explained in detail how it would do this in terms of atoms and molecules.

Now our model for deoxyribonucleic acid is, in effect, a *pair* of templates, each of which is complementary to the other. We imagine that prior to duplication the hydrogen bonds are broken, and the two chains unwind and separate. Each chain then acts as a template for the formation on to itself of a new companion chain, so that eventually we shall have *two* pairs of chains, where we only had one before. Moreover, the sequence of the pairs of bases will have been duplicated exactly.

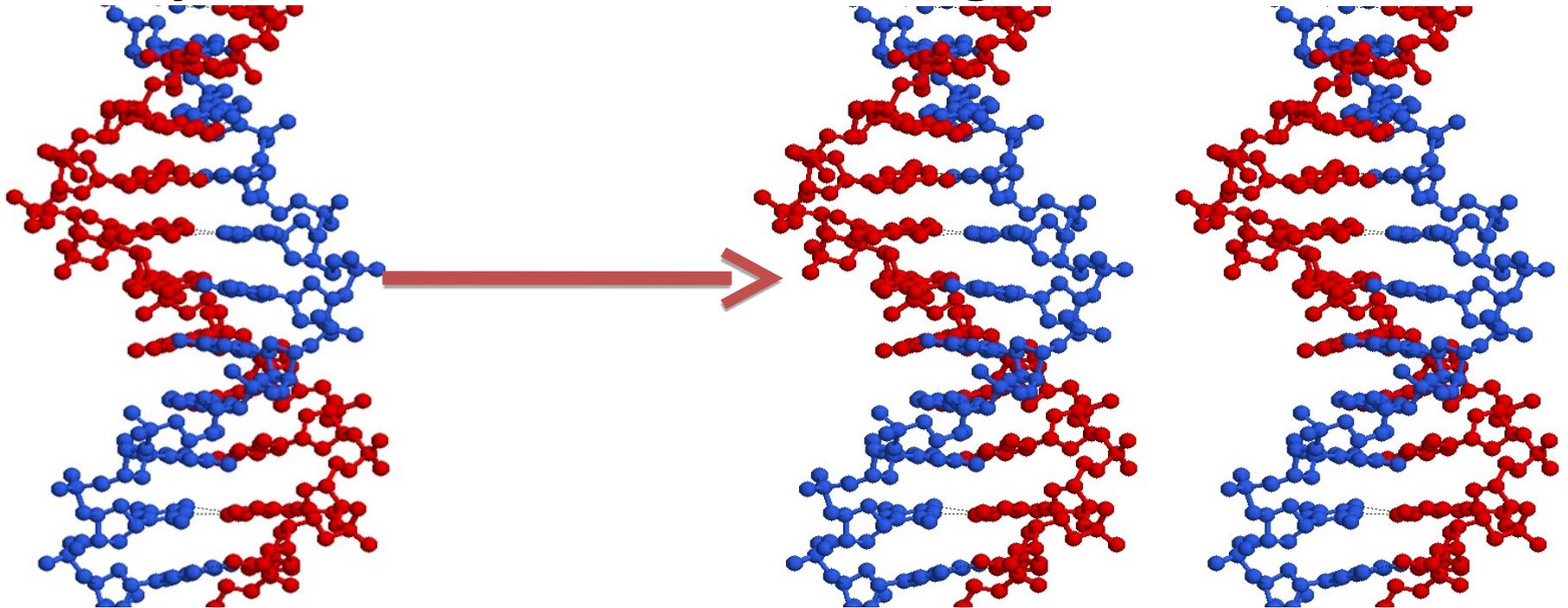
A study of our model suggests that the experiment could be done most simply if the relevant portion of it) takes the form of a figure. We imagine that at the time of the experiment, of the cell, free nucleotides, sugar precursors, are available in quantities such that at any time the base of a free nucleotide

For the moment, the general scheme we have proposed for the reproduction of deoxyribonucleic acid must be regarded as speculative. Even if it is correct, it is clear from what we have said that much remains to be discovered before the picture of genetic duplication can be described in detail. What are the polynucleotide precursors? What makes the pair of chains unwind and separate? What is the precise role of the protein? Is the chromosome one long pair of deoxyribonucleic acid chains, or does it consist of patches of the acid joined together by protein?

Réfutation du  
modèle précédent

nouveau modèle

Des 1953, **Watson** et **Crick** ont émis l'hypothèse que cette double hélice puisse « s'ouvrir », permettant ainsi la synthèse de nouveaux brins, **complémentaires** des brins originaux.



# 1.) L'expérience de Taylor (1957)



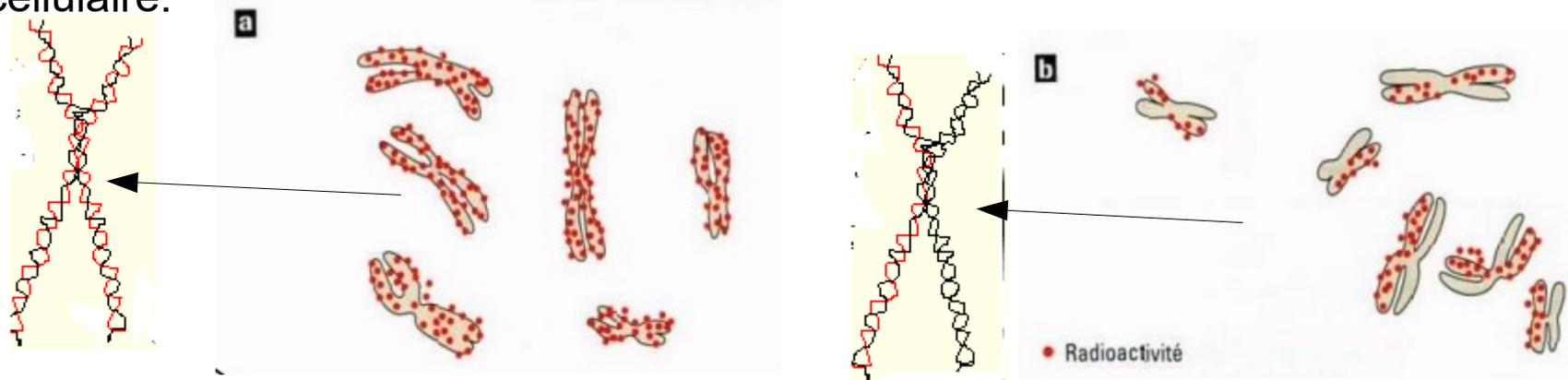
Information on the macromolecular organization of chromosomes and their mode of duplication has been difficult to obtain in spite of numerous attempts. One point of attack, long recognized but until recently unattainable, was the selective labeling of some component of the chromosome, the distribution of which could be seen in succeeding cell divisions. Reichard and Estborn<sup>1</sup> demonstrated that N<sup>15</sup>-labeled thymidine was a precursor of deoxyribonucleic acid (DNA) and that it was not diverted to the synthesis of ribonucleic acid. Recently Friedkin *et al.*<sup>2</sup> and Downing and Schweiger<sup>3</sup> have used C<sup>14</sup>-labeled thymidine to study DNA synthesis. In chick embryos and *Lactobacillus* there was no appreciable diversion

cept for occasional chromatid exchanges. Each chromosome is composed of two such units, probably complementary to each other. After each replication the four resulting units separate, so that each daughter chromosome always contains an "original" and a "new" unit. To explain the results, a model with two complementary units and a scheme of replication analogous to the Watson-Crick model of DNA is proposed.

- En **1957**, **Taylor** met en culture de jeunes **plantules** dans un **milieu nutritif contenant un « précurseur marqué » de l'ADN**. Ce précurseur est le **nucléotide T de l'ADN** dans lequel certains atomes d'hydrogène ont été remplacés par l'isotope radioactif de cet élément, le **tritium** ( $^3\text{H}$ ). Lorsque les cellules répliquent leurs molécules d'ADN, elles incorporent ce précurseur et l'ADN formé devient radioactif. Cette **molécule est alors détectable par la technique d'autoradiographie** : les cellules en culture sont écrasées et mises en contact avec un film photographique. Le rayonnement émis par les molécules radioactives impressionne le film, formant ainsi une tache noire (rouge dans le schéma) qui révèle la position de ces molécules dans la cellule.

- Les plantules sont cultivées pendant la durée d'un cycle cellulaire sur ce milieu radioactif. Taylor prélève alors des racines et réalise une première autoradiographie

(a). Les plantules sont ensuite transférées dans un second milieu, non radioactif. Une seconde autoradiographie (b) est réalisée après un second cycle cellulaire.



## 2.) L'expérience de Meselson et Stahl (1958)

*Introduction.*—Studies of bacterial transformation and bacteriophage infection<sup>1–5</sup> strongly indicate that deoxyribonucleic acid (DNA) can carry and transmit hereditary information and can direct its own replication. Hypotheses for the mechanism of DNA replication differ in the predictions they make concerning the distribution among progeny molecules of atoms derived from parental molecules.<sup>6</sup>



**Watson et Crick**

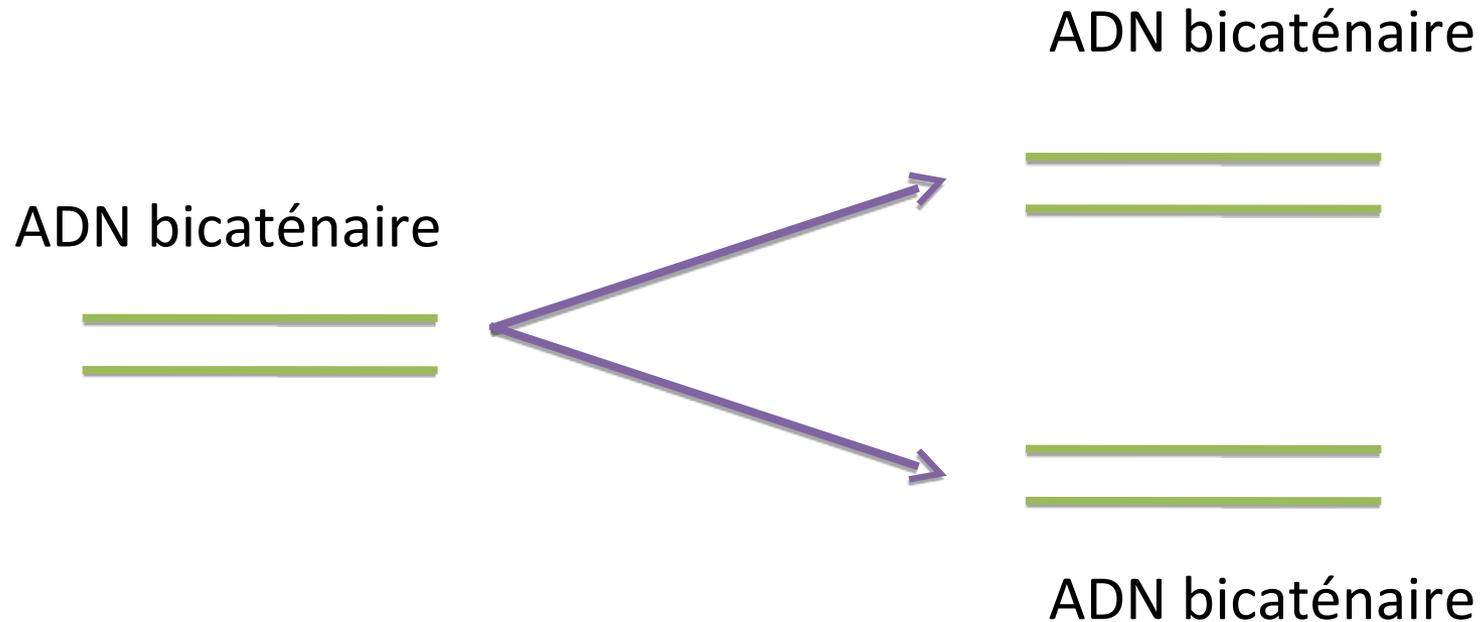


**Avery**

Pour tester les différents modèles de réplication de la molécule d'ADN, **Meselson et Stahl** mettent au point une expérience nécessitant la maîtrise de plusieurs éléments :

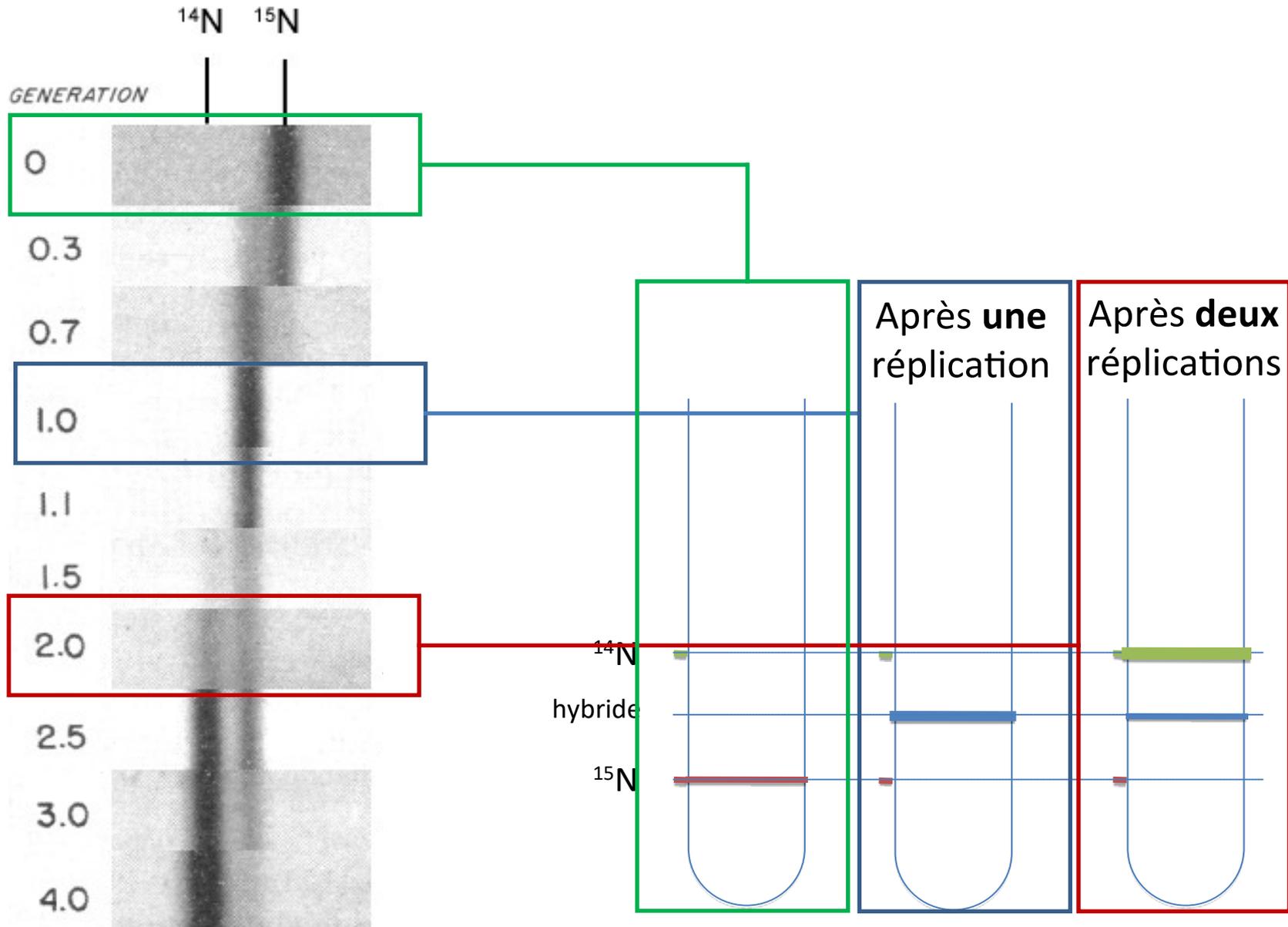
- ils réussissent à **synchroniser** la multiplication bactérienne.
- Ils mettent au point un milieu de culture dans lequel les sources d'azote utilisées par les bactéries sont constituées d'azote  $^{15}\text{N}$  (**marquage**).
- une technique de centrifugation par gradient de densité permettant de séparer l'ADN constitué de  $^{14}\text{N}$  de l'ADN constitué de  $^{15}\text{N}$  (**identification**).

# Contraintes initiales sur l'ensemble des modèles



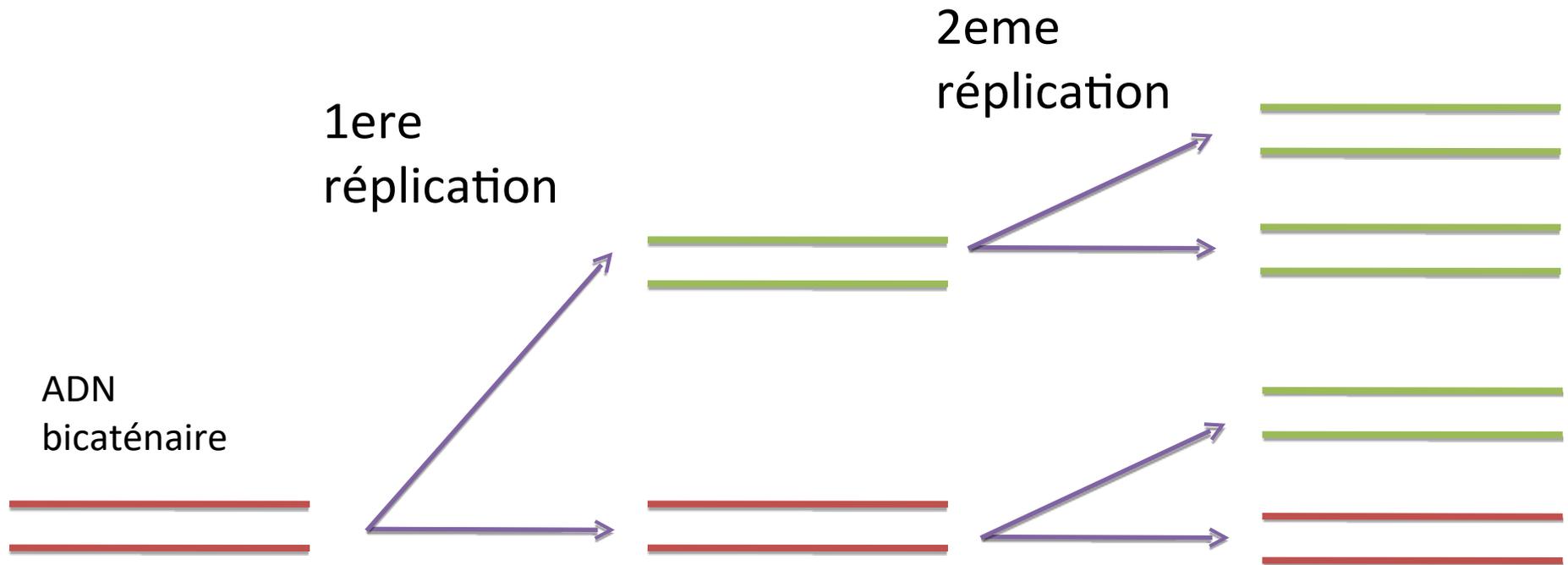
- Les brins de la molécule d'ADN préexistant se dissocient puis chaque brin sert de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire.  
**=conservation de l'IG**
- Des précurseurs doivent être apportés (absorption)

# Résultats obtenus par Meselson et Stahl

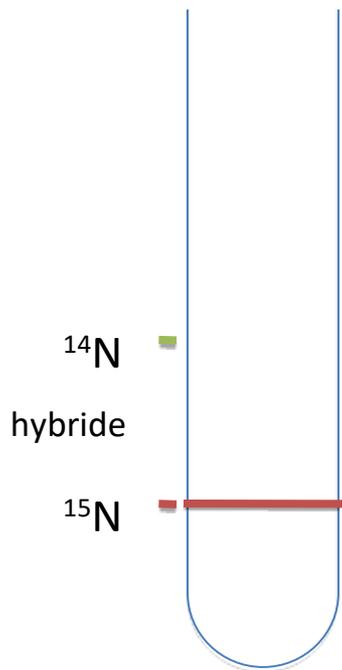
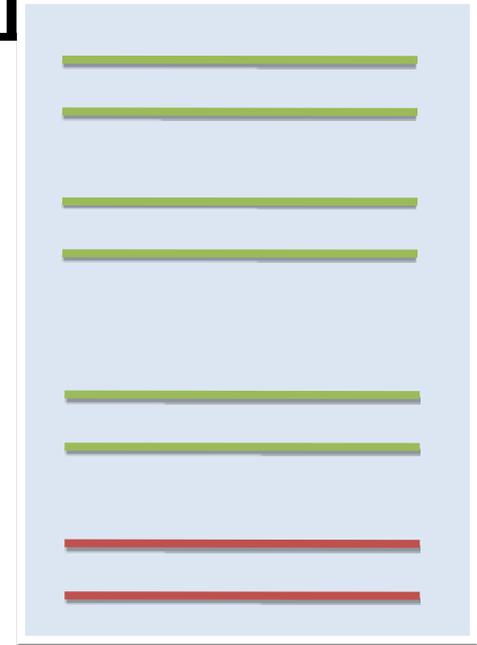
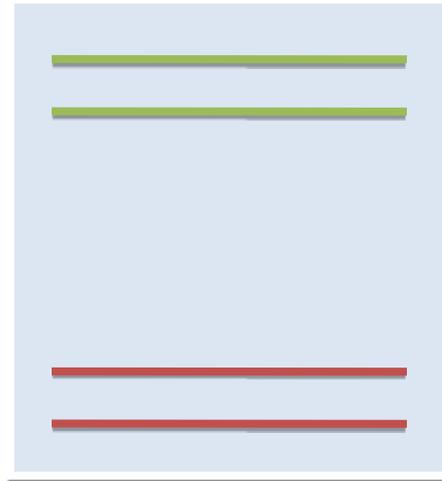


# Hypothèse 1: modèle conservatif

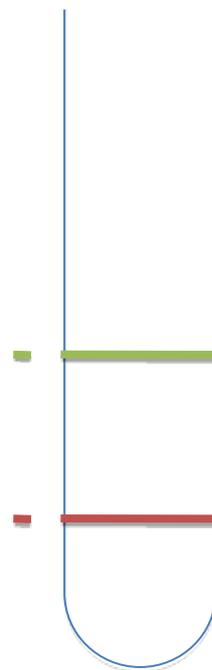
Une molécule d'ADN se forme à partir des deux nouveaux brins. L'autre molécule d'ADN conserve les deux « anciens » brins.



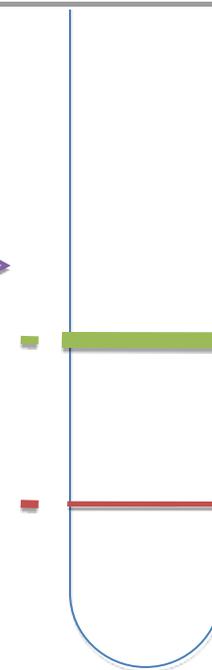
# Hypothèse 1



1ere  
réplication

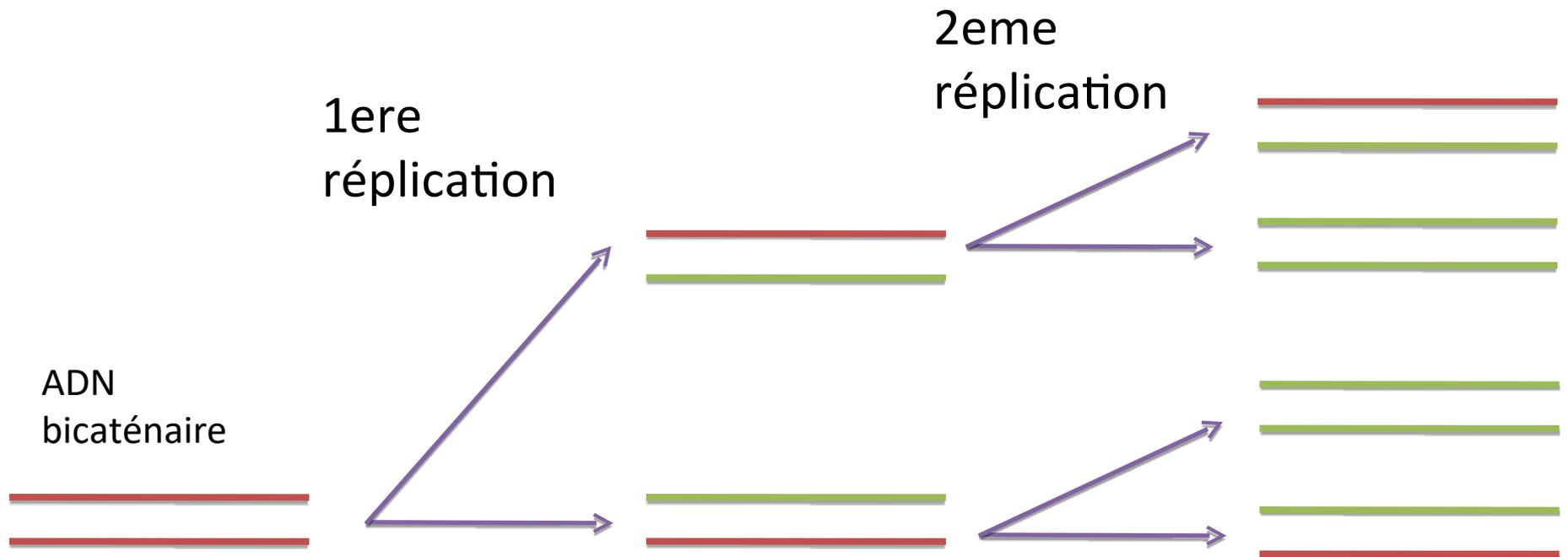


2eme  
réplication

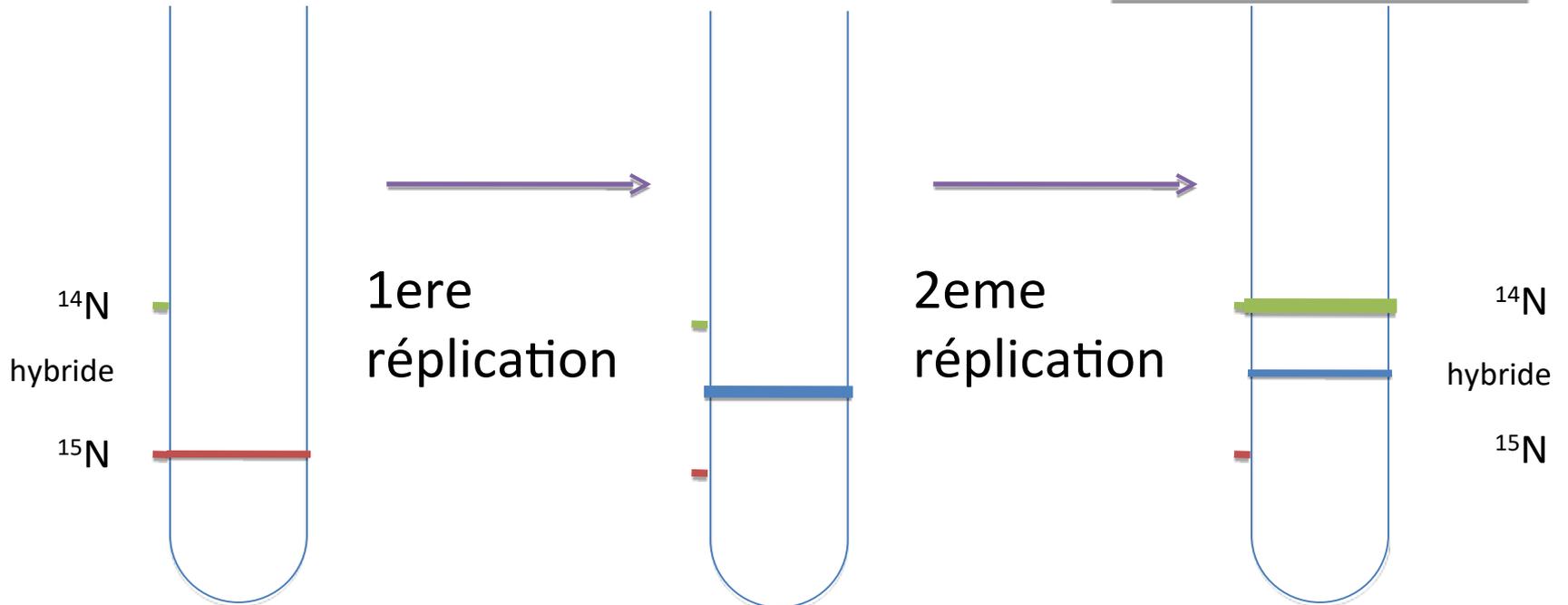
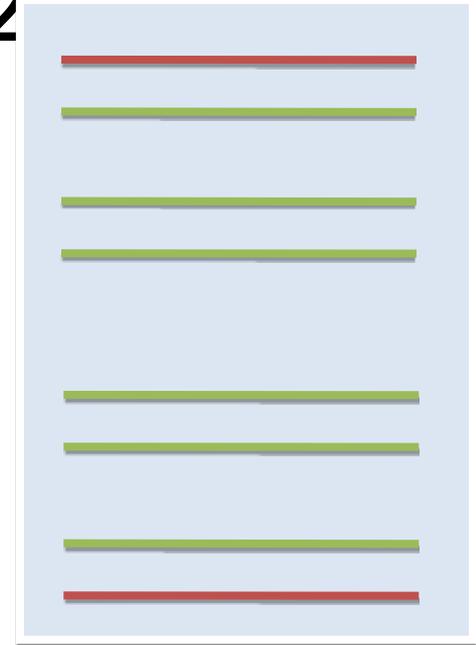
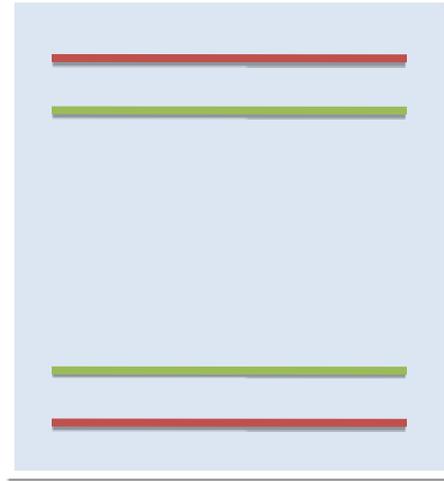
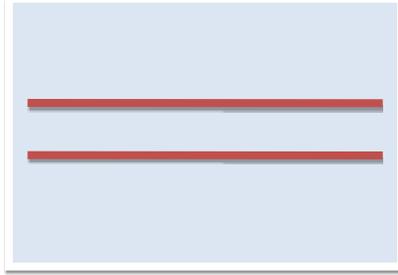


## Hypothèse 2: modèle semi-conservatif

les deux molécules d'ADN se forment à partir d'un ancien brin et d'un brin nouvellement formé.

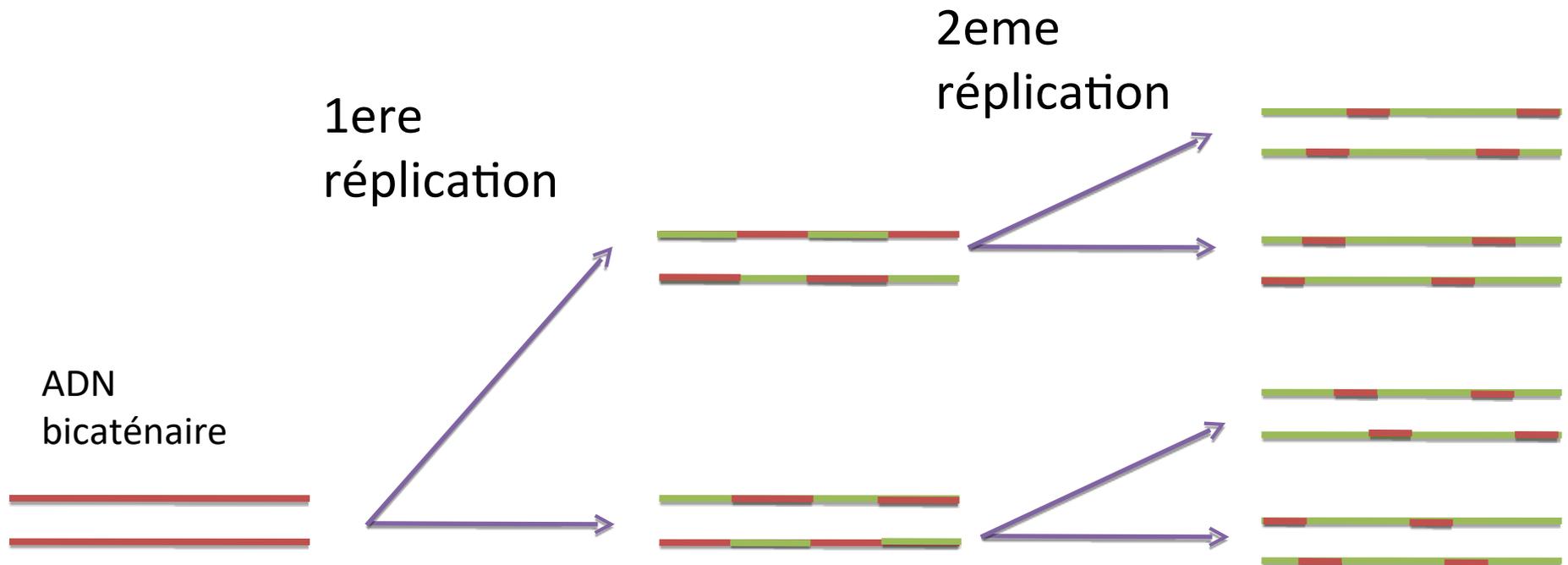


# Hypothèse 2

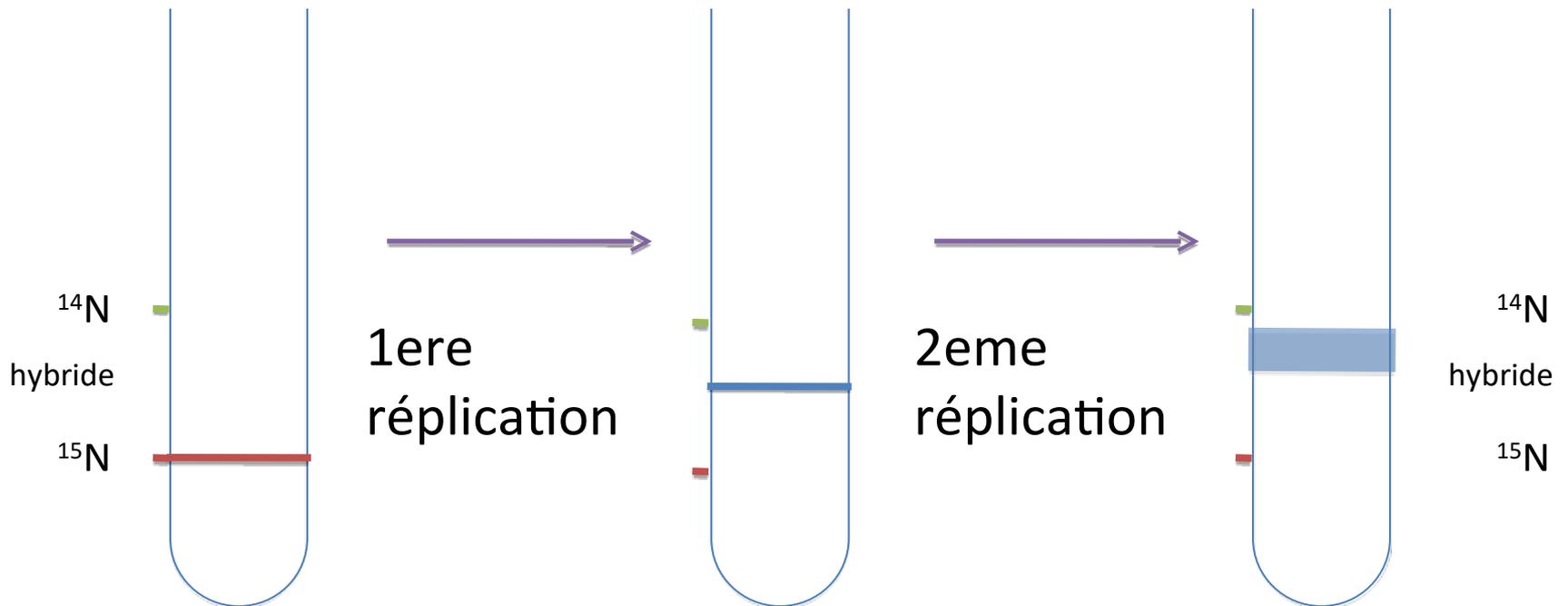
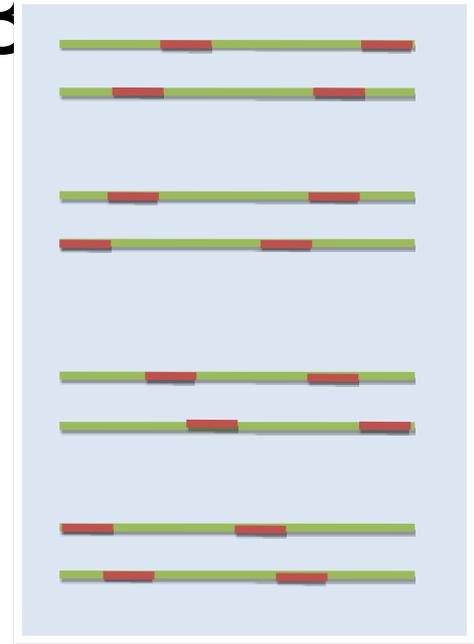
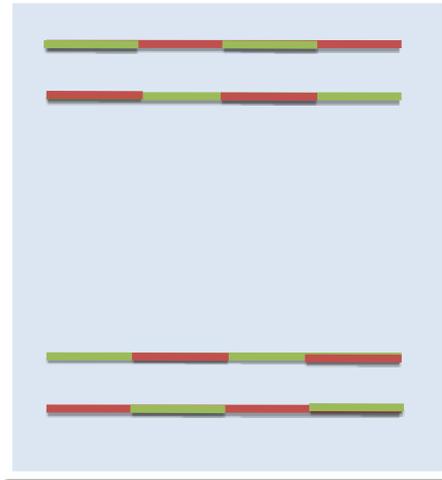
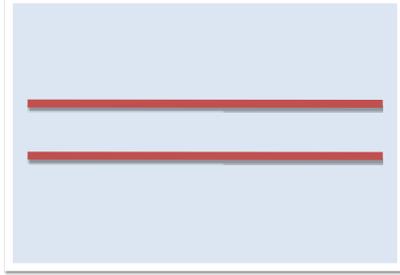


# Hypothèse 3: modèle dispersif

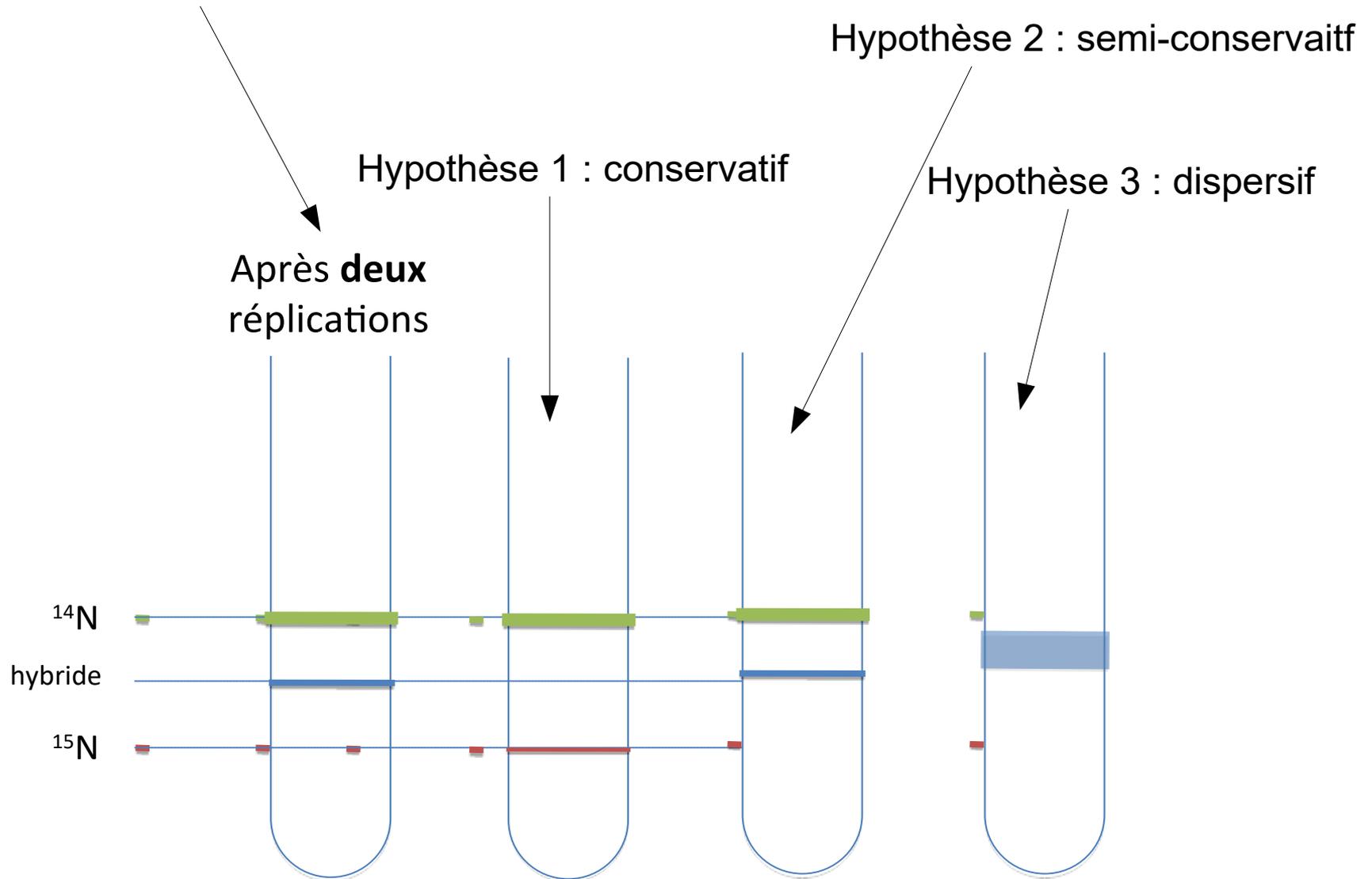
les deux anciens brins sont dispersés par fragments dans l'ensemble des deux molécules formées. *Le modèle dispersif peut être associé avec l'un des deux modèles précédents.*



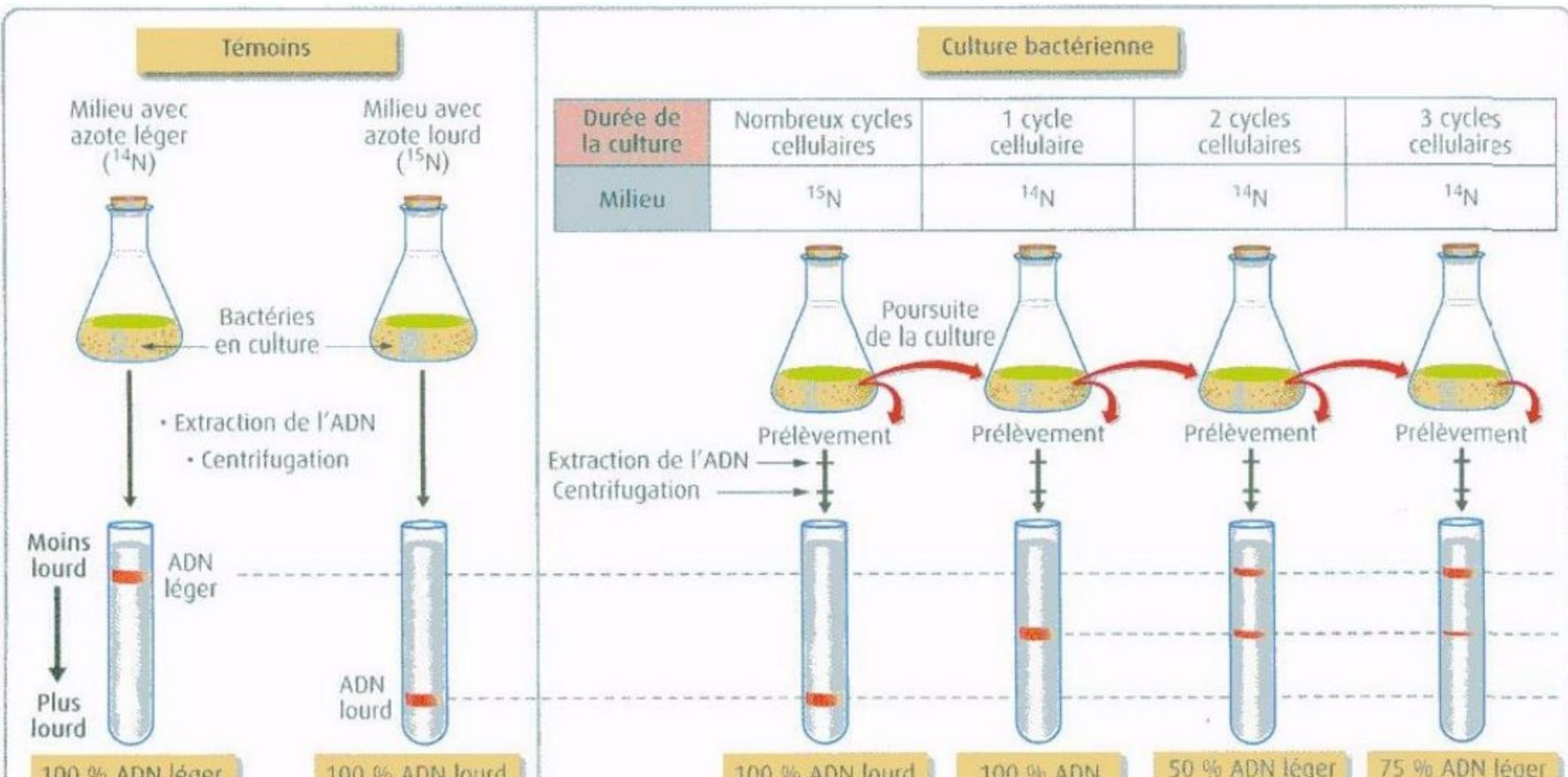
# Hypothèse 3



# Résultat expérimental



**Les expériences de Meselson et Stahl (1958) :**



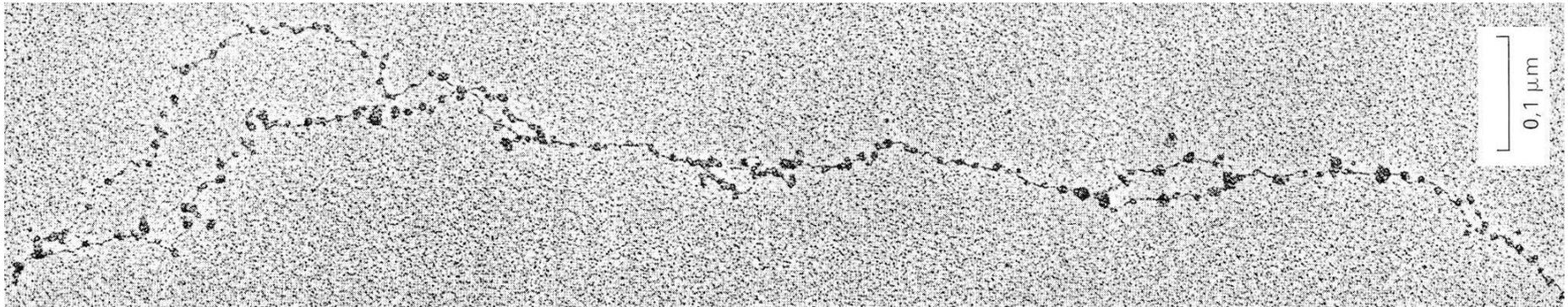
# conclusion

Seule la simulation du modèle semi-conservatif permet d'aboutir aux résultats observés.

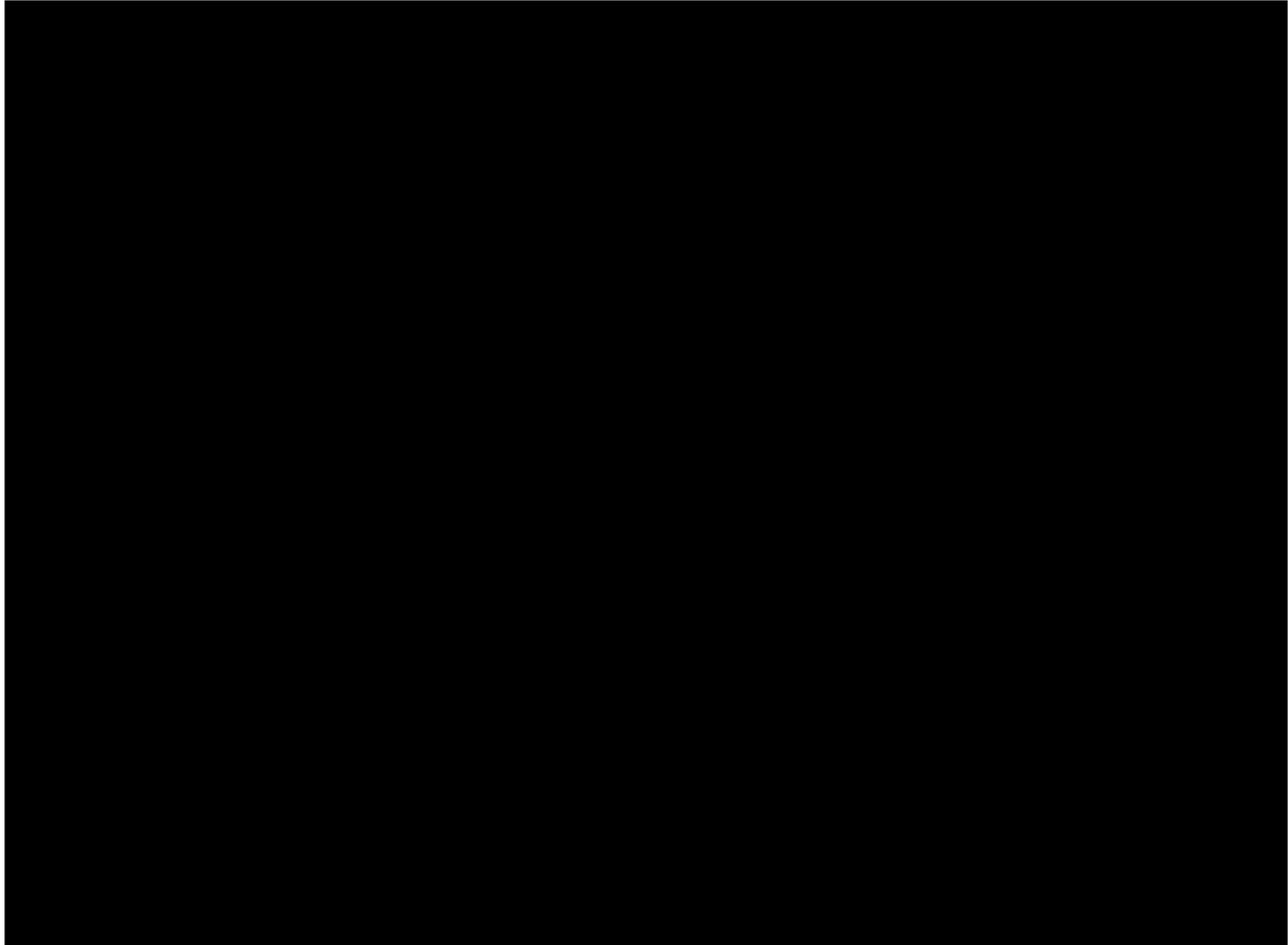
**La réplication se réalise selon un mode semi-conservatif.**

Ce modèle a été depuis confirmé par des études plus précises, pour aboutir au modèle actuel de fonctionnement de la réplication.

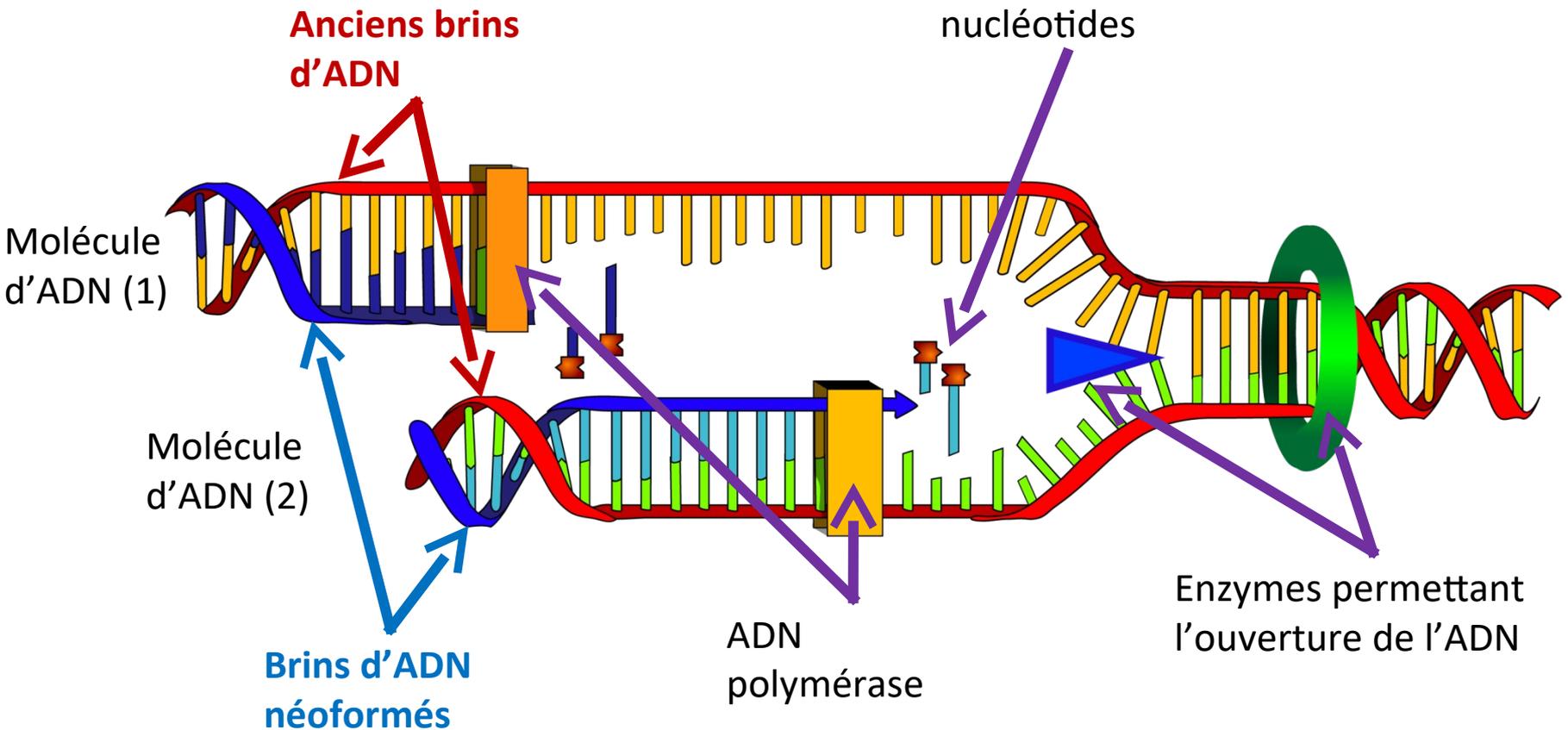
### 3.) La réplication de l'ADN à l'échelle moléculaire



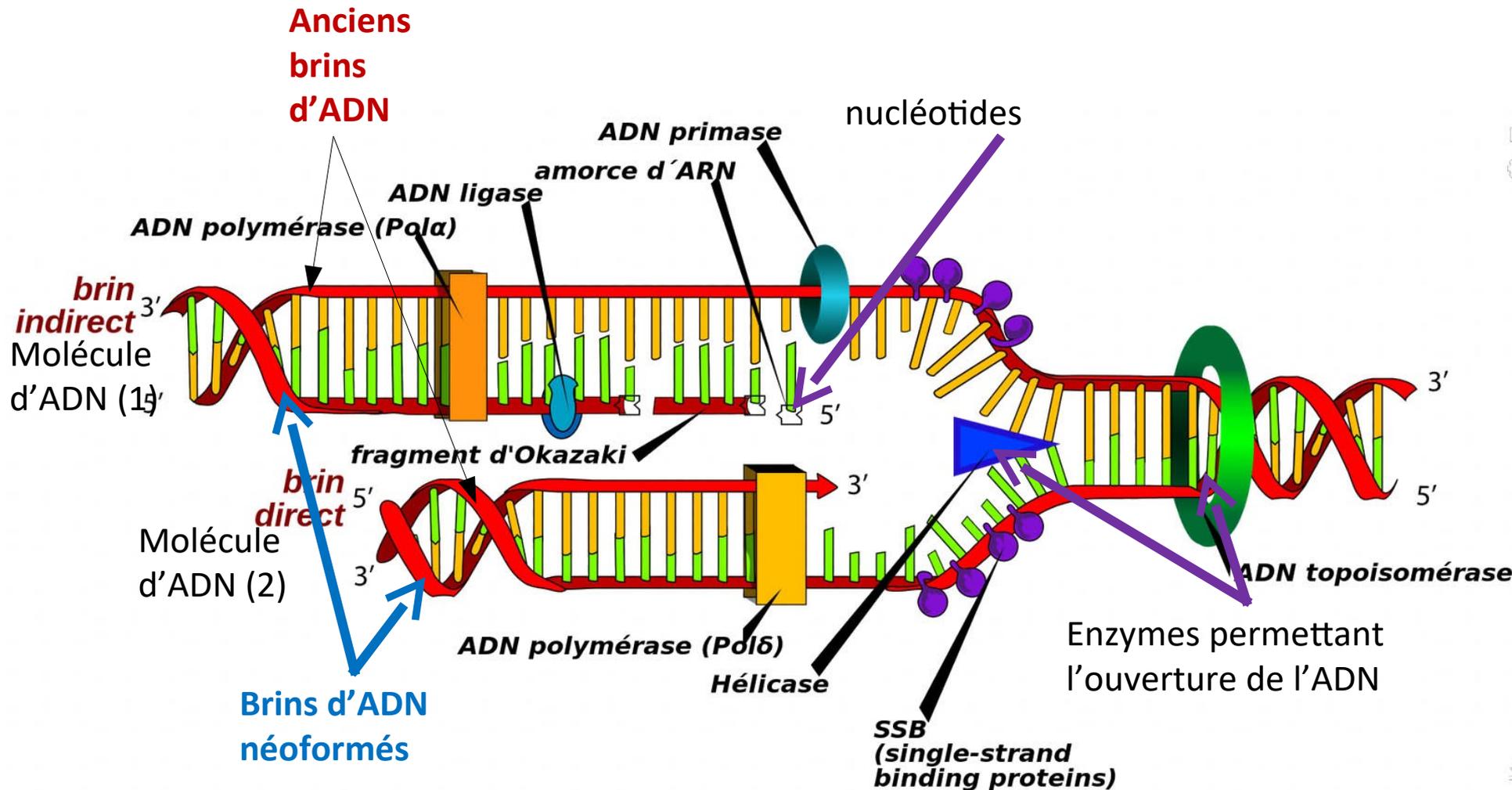
# Réplication à l'échelle moléculaire



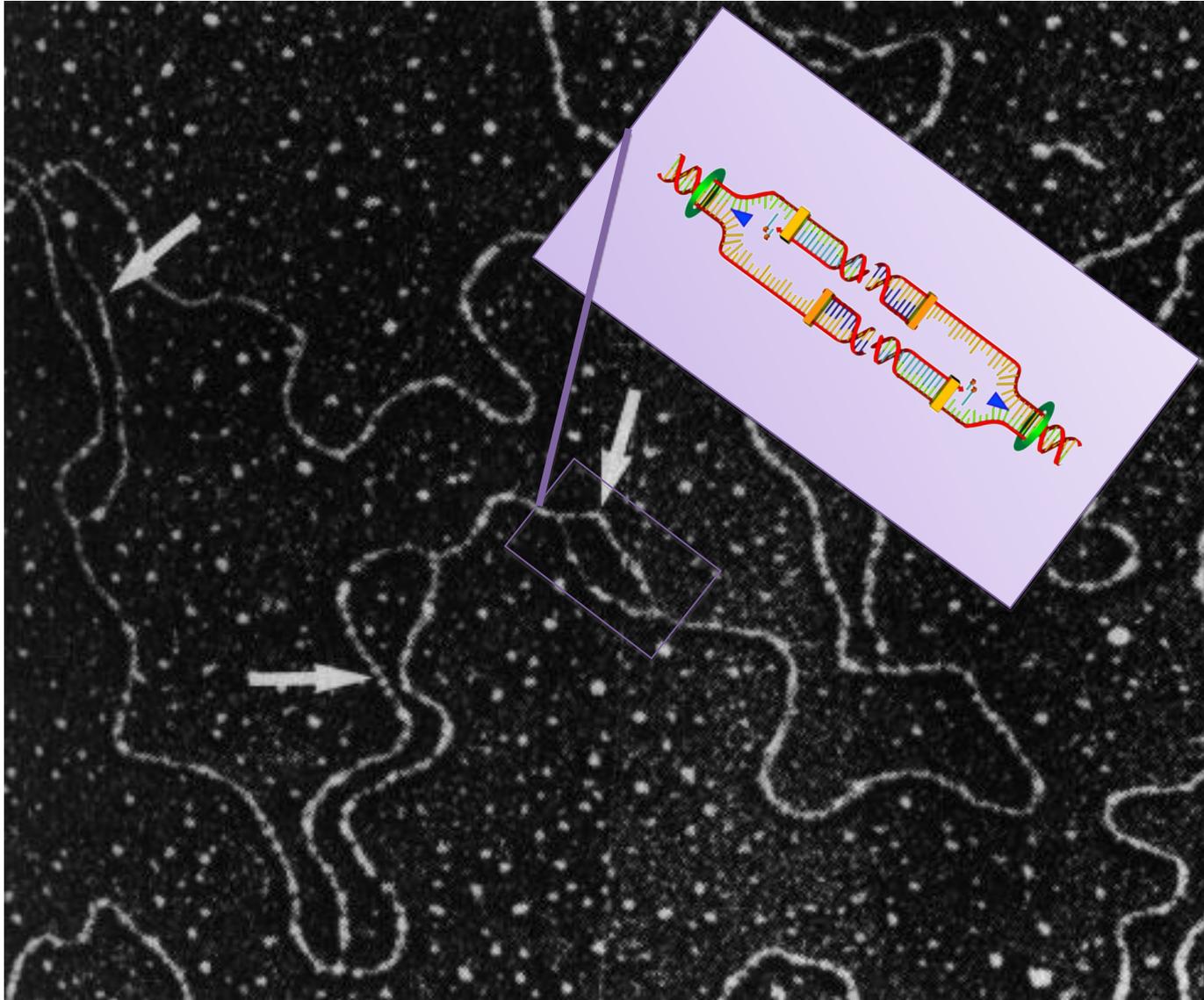
# Modèle moléculaire de la réplication



# Modèle moléculaire de la réplication

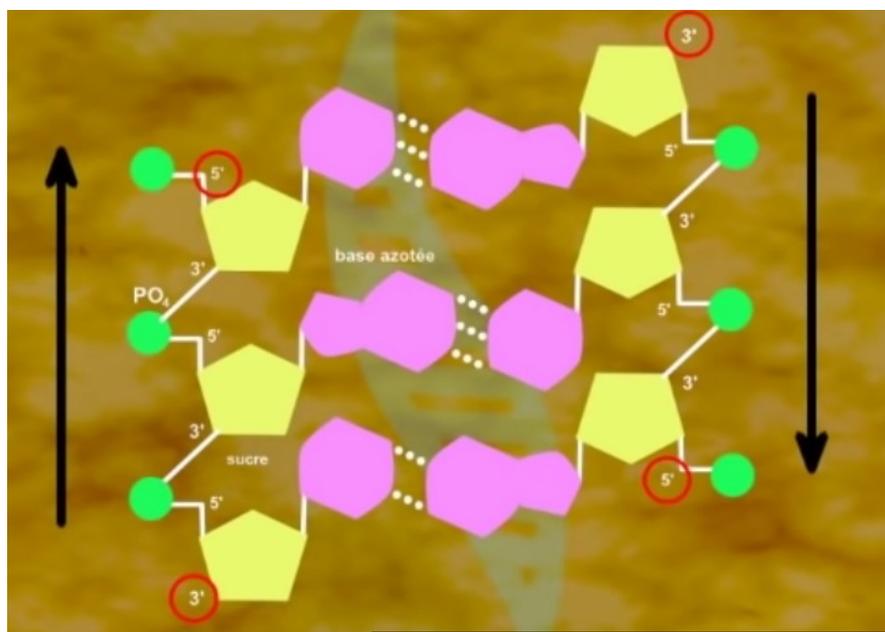


# Œil de répliation

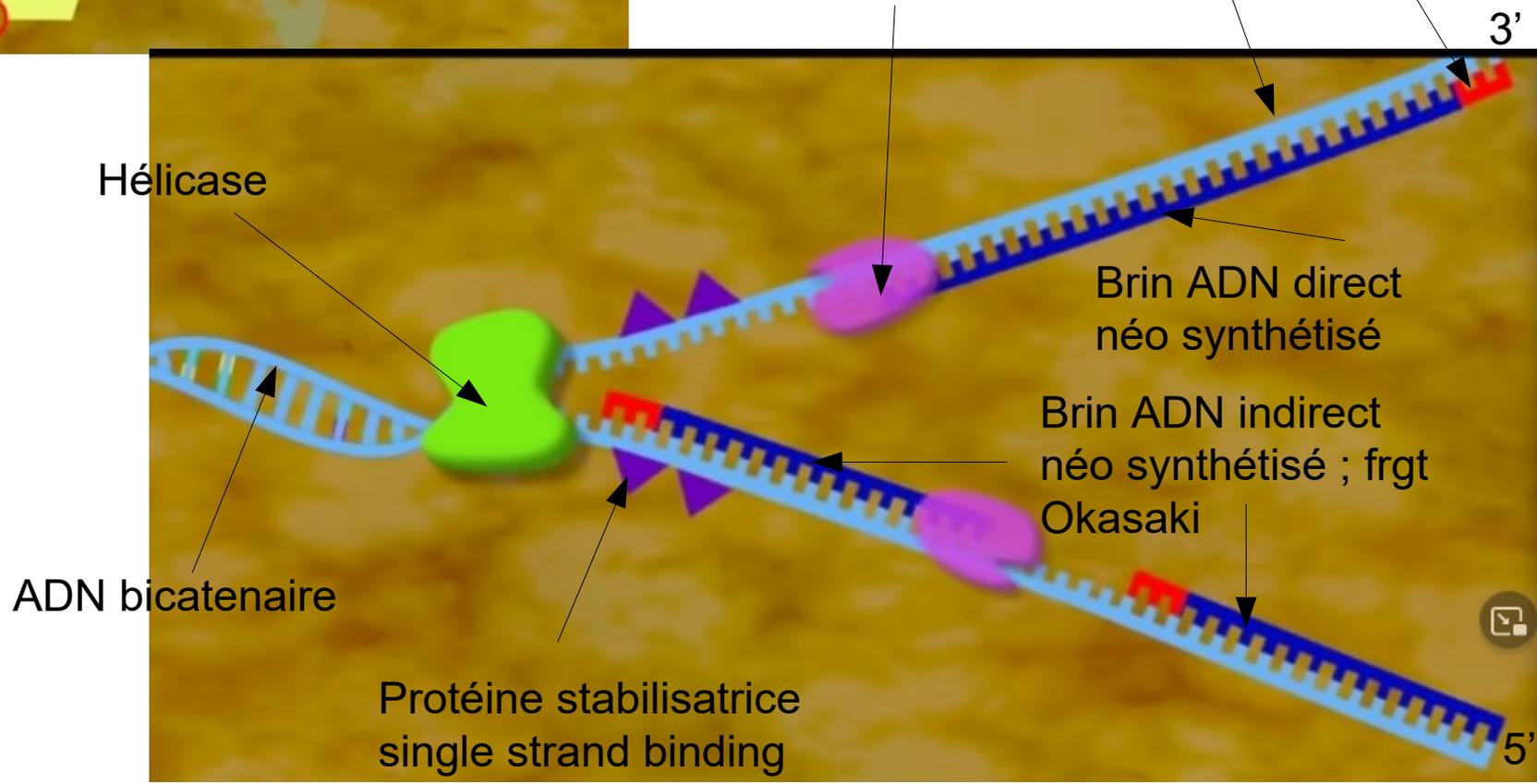


## **Description du processus de réplication :**

- 1- reconnaissance de la(bactéries) ou des(eucaryotes) origines de réplication grâce à une protéine qui reconnaît ces origines, la DnaA(zones riches en NT Aet T(moins de liaisons hydrogènes))**
- 2- séparation locale des deux brins au niveau de chaque origine de Réplication grâce à une protéine qui rompt les liaisons hydrogène, l'hélicase , des protéines vont stabiliser cet état.**
- 3- des amorces complémentaires au brin modèle sont présentées au niveau de l'origine de réplication.**  
**C'est une enzyme, la Primase qui produit des amorces qui sont de type ARN chez les eucaryotes.**
- 4- L'ADNpolymérase lit et synthétise la séquence nucléotidique en ajoutant des nucléotides à partir d'une extrémité OH du C3' du dernier ribose de l'amorce ou de celle OH C3' du désoxyribose du précédent nucléotide positionné.**



ADN monocaténaire  
 ADN polymérase  
 Amorce ARN Synthétisée par une primase

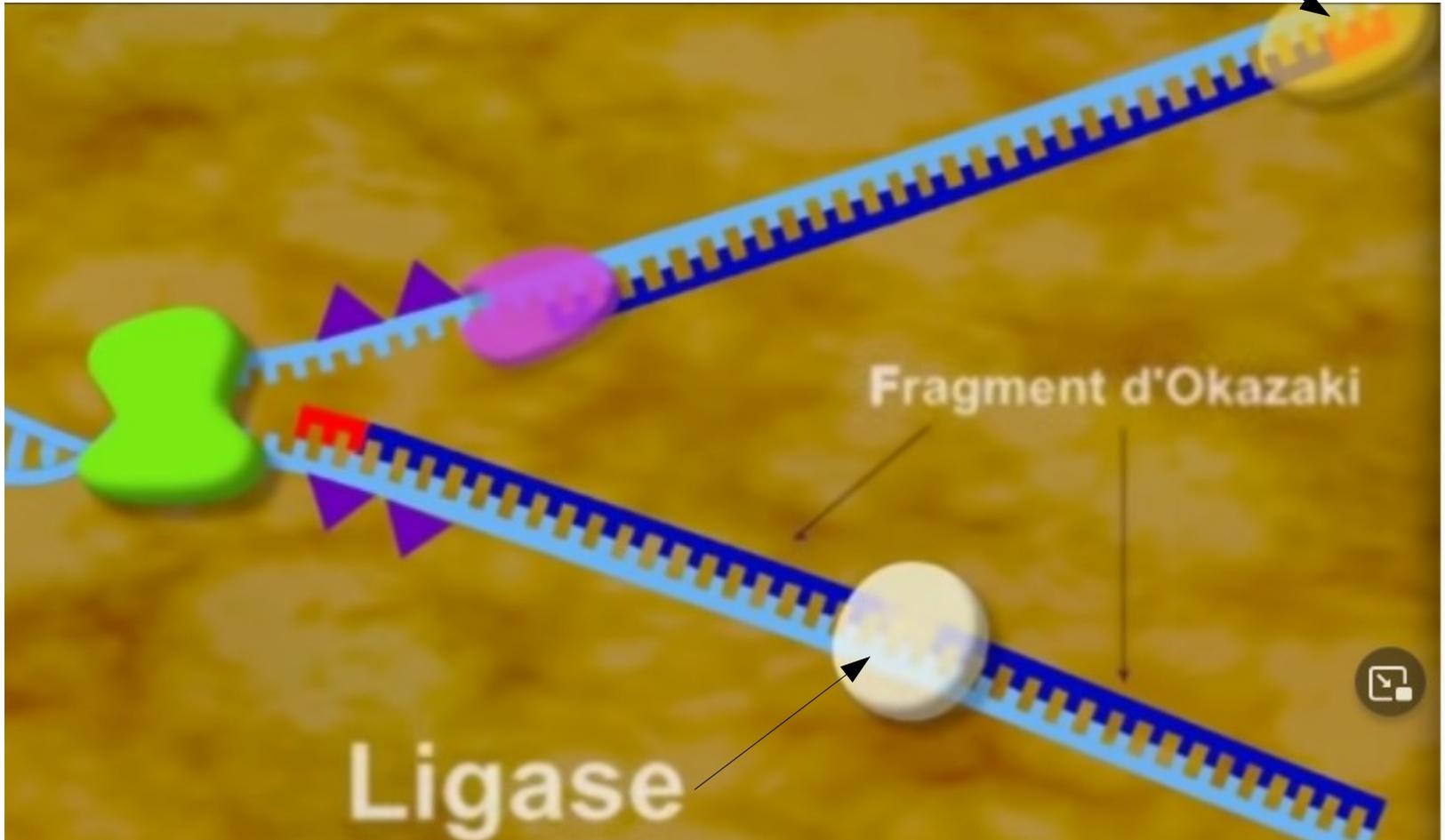


## Description du processus de réplication :

4 suite- L'ADN polymérase lit et synthétise la séquence nucléotidique à partir du brin dont l'extrémité 5' est du côté de l'ouverture par l'hélicase de façon continue et l'autre brin de façon discontinue car elle ne peut lire que dans le sens 3' vers 5' : ceci nécessite de nombreuses amorces ARN et produit des fragments d'ADN nommés fragments d'Okazaki.

5- Une seconde ADN polymérase vient remplacer les amorces ARN. Par des séquences ADN et des ligases viennent joindre avec des liaisons covalentes les nucléotides aux extrémités des fragments non joints (Okazaki et fragments directs issus d'yeux différents.)

ADNpolymérase 1



Fragment d'Okazaki

Ligase

Tableau 14.4.1 : Réplication de l'ADN procaryote : les enzymes et leur fonction

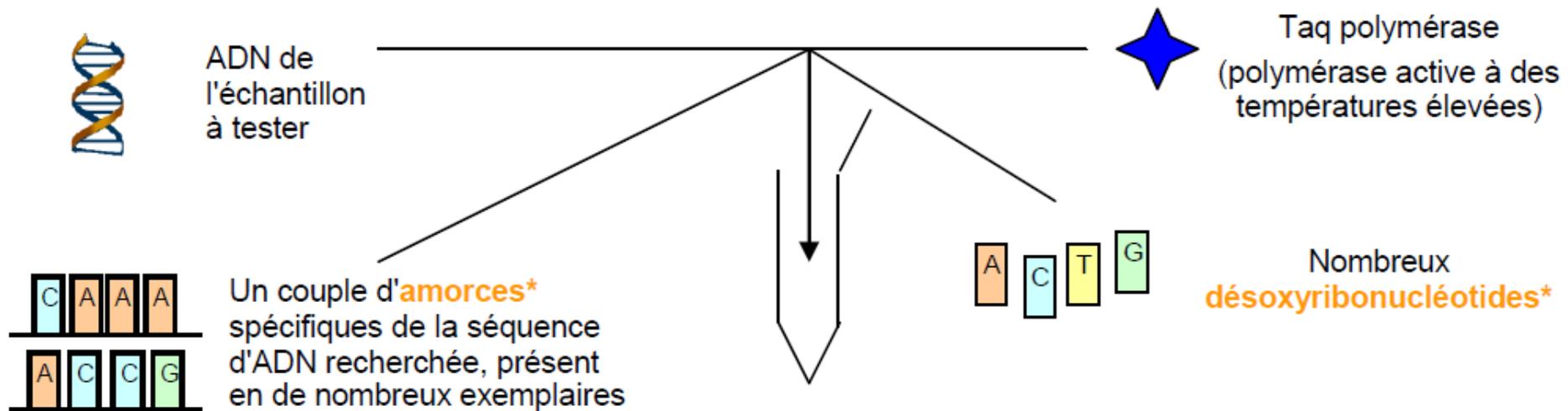
Enzyme/protéine	Fonction spécifique
Pôle ADN II	L'activité de l'exonucléase élimine l'amorce de l'ARN et la remplace par de l'ADN
ADN pol II	Fonction de réparation
ADN pol III	Enzyme principale qui ajoute des nucléotides dans la direction 5'-3'
Hélicase	Ouvre l'hélice de l'ADN en rompant les liaisons hydrogène entre les bases azotées
Ligase	Comble les espaces entre les fragments d'Okazaki pour créer un brin d'ADN continu
Primase	Synthétise les amorces d'ARN nécessaires au démarrage de la réplication
Pince coulissante	Aide à maintenir l'ADN polymérase en place lorsque des nucléotides sont ajoutés
Topoisomérase	Aide à soulager le stress sur l'ADN lors du déroulement en provoquant des cassures puis en refermant l'ADN
Protéines de liaison à brin unique (SSB)	Se lie à l'ADN monocaténaire pour éviter le retour en arrière de l'ADN.

## II. La technique PCR [synTP03]

# Principe de l'amplification par PCR

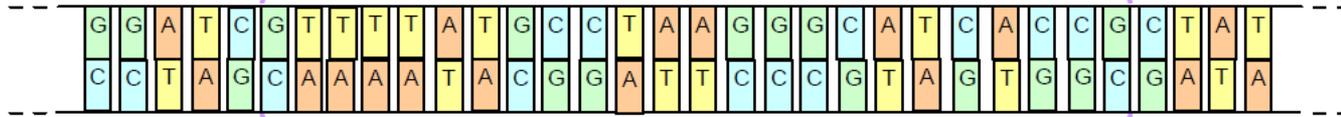
La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une **technique d'amplification d'ADN *in vitro***. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de **trois étapes** : une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une **élongation** grâce à l'action d'une **ADN polymérase\***. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la **durée d'un cycle** est de l'ordre de la **minute**).



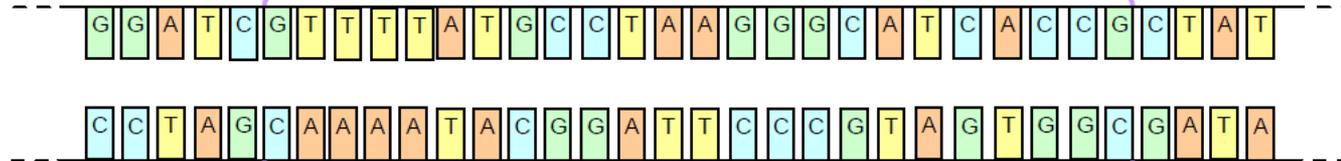
# 1<sup>er</sup> cycle

séquence recherchée, à amplifier



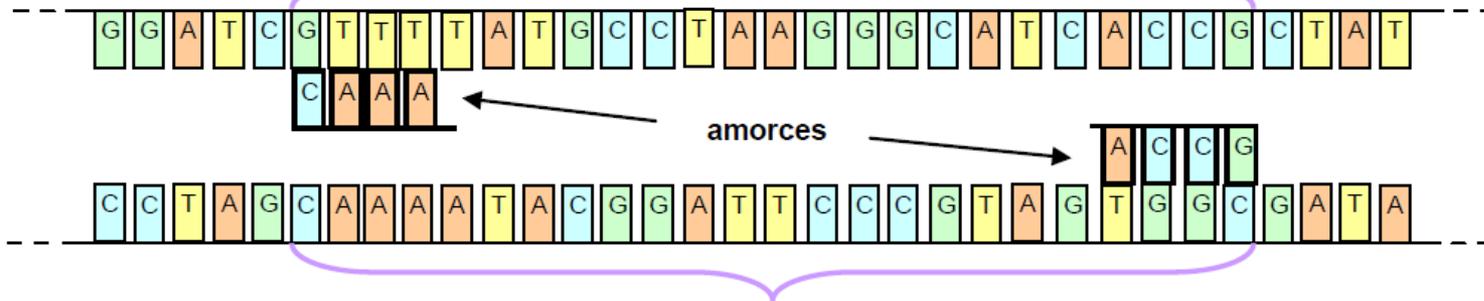
**Etape I :**  
*Dénaturation* de l'ADN  
=> séparation des 2 brins

Chauffage ( 95°C )



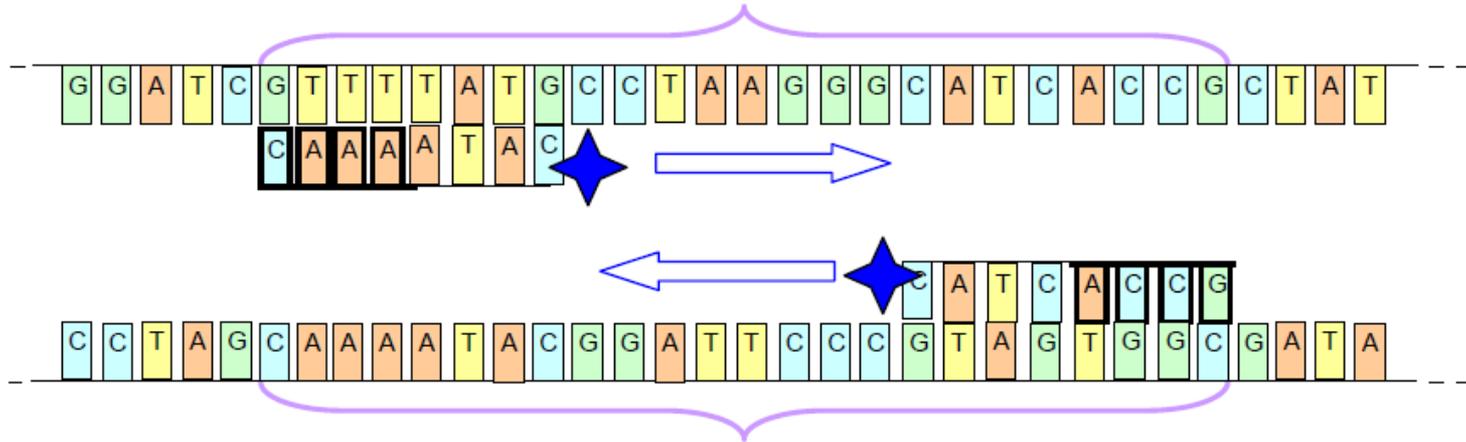
**Etape II :**  
*Hybridation* des amorces

Diminution de la température  
( entre 40 et 65°C, en fonction de la longueur  
et de la séquence des amorces )

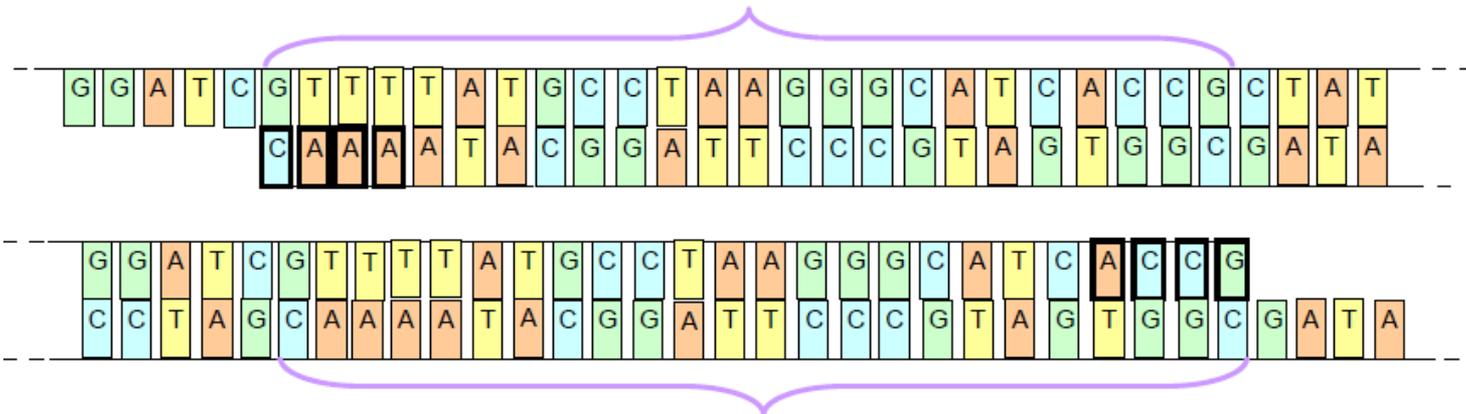


**Etape III :**  
*Elongation* des brins d'ADN grâce à la  
**Taq polymérase** à partir des deux amorces

**Hausse de la température**  
( 72°C : **température optimale**  
pour l'action de la Taq polymérase)

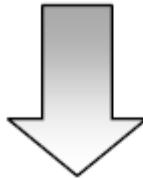


**Résultat du 1<sup>er</sup> cycle**



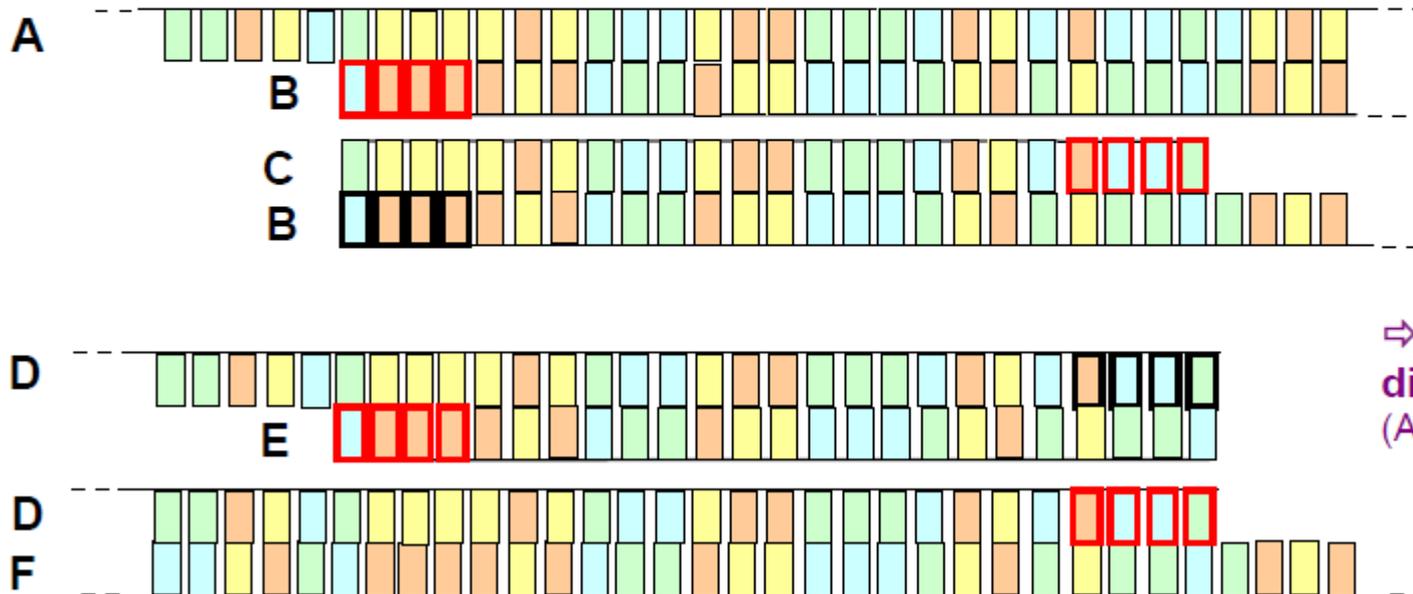
## Résultats du 2<sup>nd</sup> cycle

(après les étapes I, II et III)



**Remarque** : le couple d'amorces du 2<sup>nd</sup> cycle est identique à celui du 1<sup>er</sup>.

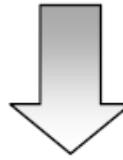
Il est représenté de couleur différente pour faciliter la lecture du schéma



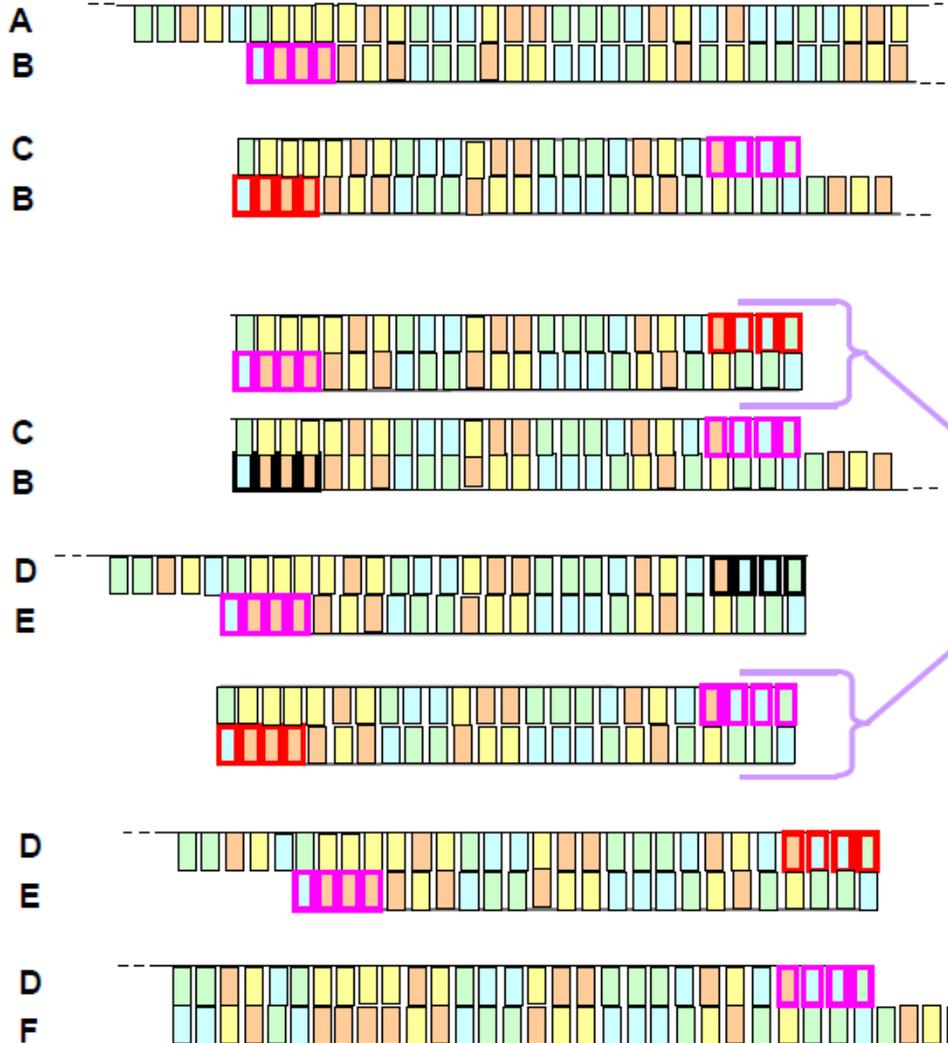
⇒ 6 brins d'ADN différents obtenus (A, B, C, D, E et F)

# Résultats du 3<sup>ème</sup> cycle

(après les étapes I, II et III)



Remarque : le couple d'amorces est toujours le même



**Séquence cible d'ADN**

= « amplicon »

(molécule d'ADN double brins  
précisément définie à ses extrémités)



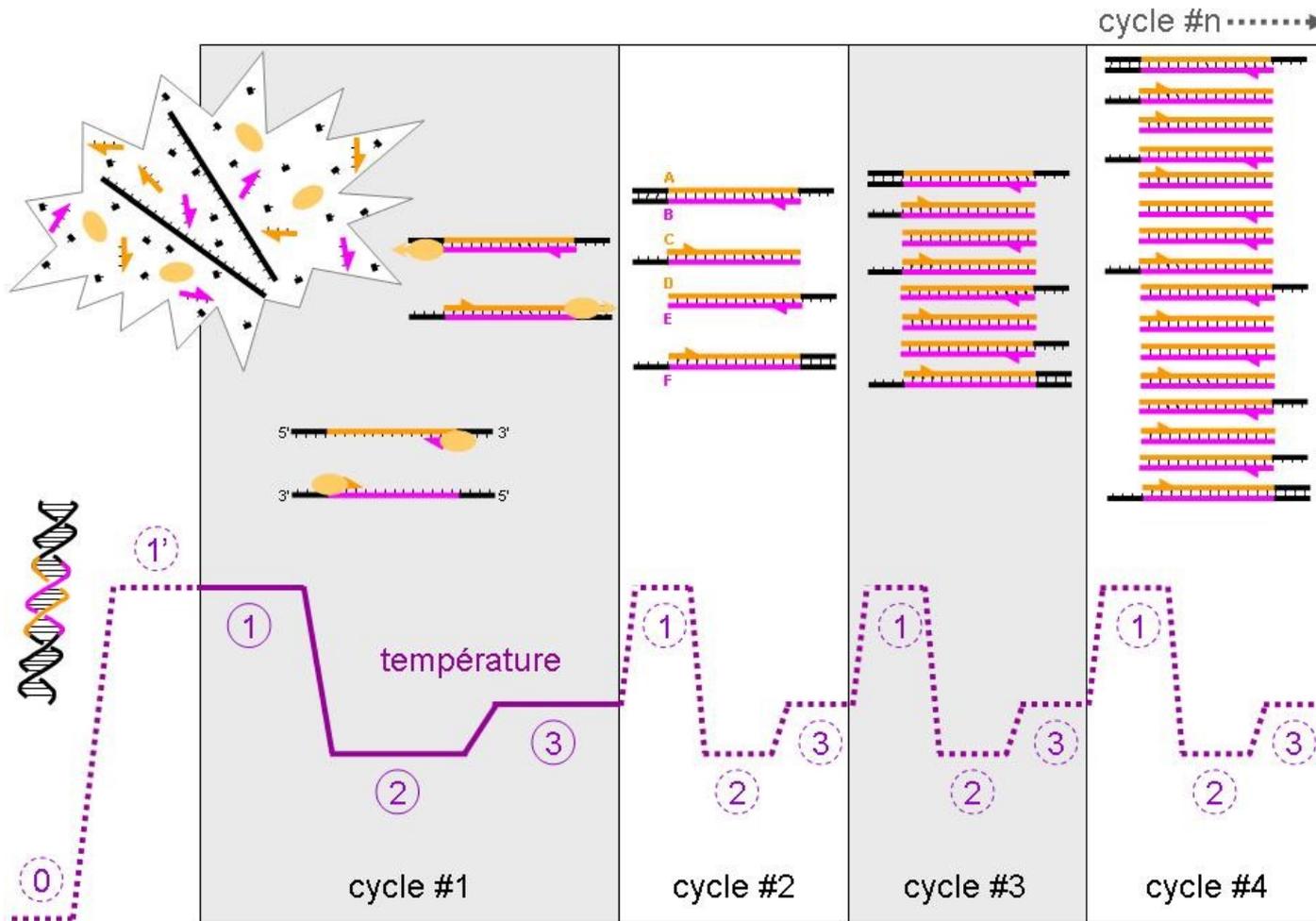
### Cycle de PCR répété de 20 à 50 fois

⇒ n cycles de PCR permettent en théorie de produire  $2^n$  copies de la séquence ciblée (amplicon).  
Il est ainsi possible d'obtenir **plus d'un million de copies** de la séquence d'ADN recherchée **en une vingtaine de cycles**.

Cette technique est très utilisée pour déceler la présence de marqueurs tumoraux ADN typique et pour suivre l'efficacité d'un traitement en cours...

Remarque :

Polymérase Chain Reaction (PCR) à aborder, permet d'identifier la présence de certains gènes de prédisposition.



# Exercice n°7 p 31

## 7 Une expérience pour déterminer le mode de réplication

- Le BrdU est un nucléotide modifié qui peut être utilisé par la cellule à la place d'un nucléotide à thymine (appelé thymidine).
- Des cellules de mammifère sont cultivées pendant deux cycles cellulaires et de façon synchrone dans un milieu contenant du BrdU. Les cellules sont prélevées pendant la métaphase de la deuxième division cellulaire puis les chromosomes sont colorés à l'acridine orange et observés en microscopie optique à fluorescence. Les chromatides qui contiennent du BrdU dans un seul des deux brins de la molécule d'ADN apparaissent jaune tandis que les chromatides dont la totalité de la double hélice d'ADN contient du BrdU apparaissent très orangés.

### QUESTIONS

- Rappelez quelles sont les différentes hypothèses concernant le mode de réplication de l'ADN.
- Expliquez à l'aide de schémas quelle hypothèse est validée par cette expérience.
- On cultive ces cellules pendant un cycle supplémentaire sans BrdU et on observe les chromosomes au cours de la troisième division cellulaire. Observerait-on la même coloration des chromosomes dans toutes les cellules ? Justifiez votre réponse.



Résultats expérimentaux : chromosomes après traitement au BrdU (MO).

# 1 Reproduction cellulaire

---

- Dans un organisme pluricellulaire, les cellules qui meurent sont en permanence renouvelées afin d'assurer le fonctionnement de l'organisme.

**Expliquez comment les différentes étapes du cycle cellulaire permettent d'assurer la reproduction conforme d'une cellule.**

*Votre exposé devra être structuré par une introduction, un développement et une conclusion. Il devra être accompagné de schémas explicatifs en choisissant pour simplifier  $2n = 6$ .*