

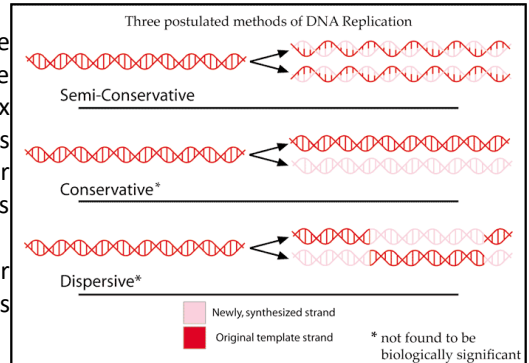
Partie 1 : Transmission, variation et expression du patrimoine génétique

Chapitre 2. La réplication de l'ADN et la PCR

I Les caractéristiques de la réplication [postTP 03 partie 1]

Dès la parution de l'article sur la structure de la molécule d'ADN (1953), Watson et Crick ont supposé que cette double hélice puisse « s'ouvrir » et servir de « moule » à la synthèse de deux nouveaux brins, complémentaires des brins originaux. Trois modèles ont été proposés pour décrire la réplication. Ils se basent tous sur l'utilisation de la molécule d'ADN préexistante, mais selon des modalités différentes :

- **Modèle conservatif** : Une molécule d'ADN se forme à partir des deux nouveaux brins. L'autre molécule d'ADN conserve les deux « anciens » brins.
- **Modèle semi-conservatif** : les deux molécules d'ADN se forment à partir d'un ancien brin et d'un brin nouvellement formé.
- **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.*



1.) L'expérience de Taylor et ses résultats (1957)

Taylor cultive des cellules de racines de fève dans une solution contenant de la thymidine radioactive. Il réalise ensuite une autoradiographie. En 1957, les scientifiques ne savent pas si une chromatide est constituée d'une ou plusieurs molécules d'ADN. De plus, Taylor n'a aucun moyen de synchroniser la multiplication cellulaire. Les résultats obtenus par Taylor ne permettent pas de trancher entre les différents modèles. En revanche, ils valident bien l'hypothèse de Watson et Crick.

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

Afin de trancher cette question, Meselson et Stahl vont avoir une approche très différente. Ils vont cultiver des bactéries en présence d'azote lourd (^{15}N). Après de nombreuses générations, les bactéries ont toutes des molécules d'ADN contenant de l'azote lourd. Ils transfèrent ces bactéries sur un milieu contenant de l'azote léger (^{14}N). Les bactéries continuent à se multiplier, mais en incorporant maintenant de l'azote léger à l'ADN nouvellement synthétisé (c.f. TP 4 pour l'analyse des résultats).

Pour repérer la présence d'azote lourd ou léger dans les molécules d'ADN, M/S utilisent un gradient de densité. Ils travaillent donc avec de l'ADN et non avec des chromosomes. De plus, synchronisant la multiplication cellulaire des bactéries, ils connaissent parfaitement le nombre de cycles cellulaires que les bactéries ont effectué.

Un autre aspect exceptionnel de ce protocole, c'est qu'il permet de tester les trois modèles en même temps.

Les résultats obtenus aboutissent à rejeter les modèles conservatif et dispersif (pour autant celui qui paraissait le plus logique à l'époque) et à retenir le modèle semi-conservatif. Cette conclusion a été depuis confirmée par d'autres expériences chez les Eucaryotes.

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

La réplication de l'ADN commence par la séparation locale des deux brins au niveau d'une ou plusieurs origines de réplication (grâce à une protéine qui reconnaît ces origines caractérisées par une abondance particulière en A et T, moins riches en liaisons hydrogènes, : la DnaA).

Chaque brin de la molécule initiale va servir de « moule », de matrice, pour la synthèse d'un brin complémentaire. La synthèse s'effectue grâce à l'intervention d'enzymes, en particulier les hélicase qui déroulent l'hélice d'ADN, des protéines (Single Strand Binding) qui stabilisent l'ADN en format monocaténaire, les ADN polymérases dont le rôle est de lire le brin matrice et de relier par une liaison covalente deux nucléotides « libres » complémentaires au brin matrice.

Pour que l'ADN polymérase puissent réaliser la synthèse du brin complémentaire (sens 5' → 3') à partir de la lecture du brin ancien (sens 3' → 5'), il faut tout d'abord que des amorces complémentaires au brin modèle soient présentes au niveau de l'origine de réplication c'est le rôle d'une enzyme, la Primase (ici l'amorce produite par la primase sera de l'ARN). L'ADN polymérase peut alors commencer son action de lecture et de synthèse à partir d'une extrémité OH 3' du dernier ribose de l'amorce...

Au fur et à mesure de la synthèse, les nucléotides « libres » complémentaires sont parfaitement placés face aux nucléotides du brin d'ADN servant de « modèle ». La réplication se fait de la même façon sur les deux brins mais compte tenu de la lecture à sens unique de du brin dans le sens 3' vers 5'... matrice par l'ADNpol, un brin est répliqué de façon continue, l'autre de façon fragmentée (par « fragments d'Okasaki »).

De nombreuses ADN polymérases réalisent en même temps la réplication d'une molécule d'ADN. L'existence de plusieurs origines de réplication permet une synthèse rapide de la molécule d'ADN.

En microscopie, après marquage de la molécule d'ADN, on peut voir des yeux de réplication durant la phase S de l'interphase qui correspondent aux zones en réplication.

Enfin, une autre ADN polymérase vient remplacer les amorces ARN par des fragments d'ADN et les fragments d'Okasaki et les extrémités des brins synthétisés sont liés par une enzyme : la ligase.

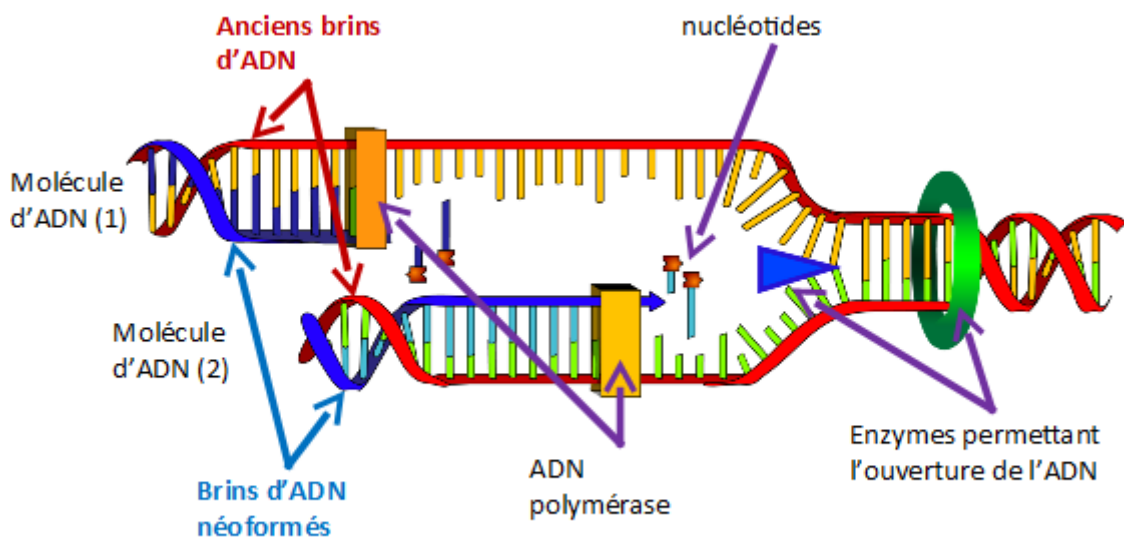


Schéma du modèle de la réplication à savoir restituer.

Avec : Fragments d'Okasaki

La lecture du brin se réalise dans le sens 3' → 5' et donc la synthèse du nouveau dans le sens 5' → 3'. Compte tenu de l'ouverture limitée de l'œil, un nouveau brin va être polymérisé (créé) de manière continue, l'autre sous forme de fragments ensuite liés : les fragments d'Okasaki.

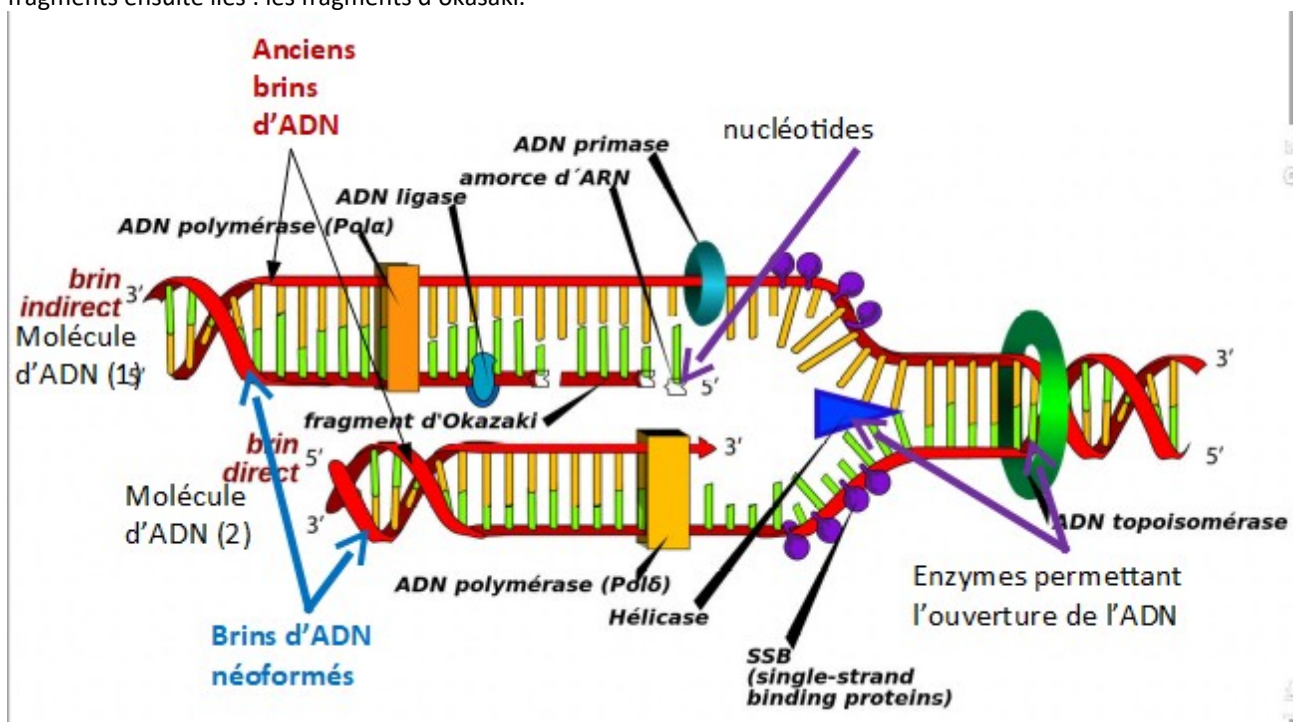


Tableau 14.4. 1 : Réplication de l'ADN procaryote : les enzymes et leur fonction

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 [postTP 03 partie 2]

La technique PCR a été inventée petit à petit et perfectionnée.

Bref historique de la technique :

- **1953** : Découverte de la **structure en double hélice de l'ADN** par James Dewey Watson et Francis Harry Compton Crick, (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1962) d'après les travaux de Rosalind Franklin.
- **1956** : Découverte de l'**ADN polymérase** ADN dépendante (ADN pol I) par Arthur Kornberg (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1959).
- 1986 : Première publication publique sur la PCR par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993).
- **1988** : **Première PCR** réalisée avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus*, par Saiki RK.
- **1992** : Invention de la **PCR en temps réel** par Higuchi R.
- **1996** : Mise au point des **polymérases temporairement inactives et activables par la chaleur** par Birch DE.

Elle permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN connue, à partir :

- d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence *spécifique* d'ADN (l'amplicon))
- d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides
- de nucléotides
- d'ADN polymérases thermosensibles.

On peut ainsi, par exemple, détecter la présence du VIH ou mesurer une charge virale (concentration du virus dans le plasma), des traces d'OGM (organismes génétiquement modifiés), ou encore des virus d'hépatites B, C et D.

cette technique se fonde sur la combinaison de deux facteurs :

- les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation spécifique à l'ADN double brin spécifique des ADN polymérases dépendantes à l'ADN thermostables ;
- les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique (cf. réaction en chaîne).

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase).

Cette technique permet une multiplication de l'échantillon selon une loi exponentielle jusqu'à un nombre de cycles finis après quoi des facteurs commencent à empêcher le processus (une phase de plateau quantitatif apparaît).

