

LEXIQUE

Réplication

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 était donc identifié comme la molécule responsable de la transmission d'une information génétique. Hershey et Chase ont ensuite montré que l'ADN des bactériophages T2 qui infectent *E. coli* se retrouve dans les phages résultant de l'infection. Les molécules d'ADN phagique s'étaient donc répliquées à l'intérieur des cellules infectées et avaient transmis l'information génétique à la descendance. En 1953, Watson et Crick ont proposé le modèle de l'ADN en double-hélice de deux filaments polynucléotidiques et ont suggéré que chaque filament puisse servir de matrice pour la synthèse du brin antiparallèle, dont la séquence sera dictée par la complémentarité stérique des composants nucléotidiques. En 1958, Kornberg décrivait la purification d'une enzyme, appelée ADN polymérase, capable de catalyser la synthèse d'ADN en présence d'une amorce et d'un brin matrice. Le cadre conceptuel pour l'étude moléculaire de la transmission de l'information génétique était clairement tracé.

La réplication de l'ADN est donc le processus aboutissant à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par copie d'un brin matrice. Cette synthèse 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. La réplication d'un génome double brin est classiquement divisée en trois phases: (1) l'initiation corres-

pond 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. Pour cela, la réplication doit être contrôlée. Cette régulation s'effectue généralement lors de la phase d'initiation. Nous présentons ici la réplication chez les procaryotes, en prenant comme exemple la bactérie *Escherichia coli*, puis chez les eucaryotes chez lesquels nous prendrons comme exemples la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le virus de singe SV40.

La réplication du chromosome d'*Escherichia coli*

• L'initiation de la réplication

Les protéines impliquées dans l'initiation de la réplication d'*E. coli* ont toutes été identifiées, purifiées et caractérisées. La réplication du chromosome de cette bactérie a donc pu être reconstituée *in vitro* [1]. Les différentes fonctions nécessaires à la réplication et les protéines assurant ces fonctions sont présentées dans le *Tableau I*. La réplication du chromosome d'*E. coli* est démarrée de façon

bidirectionnelle à partir d'un site unique appelé *oriC*. Cette séquence porte plusieurs sites de reconnaissance d'une protéine essentielle pour l'initiation de la réplication appelée DnaA. Un premier complexe est formé, dans lequel 10 à 20 monomères de DnaA sont fixés à la séquence *oriC*. La formation de ce complexe permet l'ouverture de la double chaîne d'ADN et l'entrée de l'hélicase d'*E. coli*, essentielle pour la réplication, l'hélicase DnaB. Aidée par la protéine DnaC, l'hélicase DnaB va se fixer sur l'origine de réplication et ouvrir la double chaîne dans les deux directions, formant un complexe de préinitiation. La transcription des gènes adjacents à *oriC* et la présence de la protéine HU, qui fixe l'ADN de façon non spécifique (*histone-like protein*) sont de plus nécessaires à une formation efficace du complexe de préinitiation. En présence de SSB, protéine fixant l'ADN simple brin (*single-strand binding protein*) qui stabilise les régions dénaturées, de la gyrase et la topo-isomérase I, qui assurent le maintien du surenroulement de l'ADN à l'origine de réplication, de la primase de *E. coli* (DnaG) et de la polymérase (Pol III), la réplication du chromosome peut commencer.

La plupart des amorces de réplication sont de petites molécules d'ARN de quelques nucléotides de longueur. Les primases sont les polymérases responsables de la synthèse de ces ARN amorces. Comme toutes les polymérases, elles synthétisent l'ARN dans la direction 5' vers 3'. Elles sont toujours associées à une activité hélicase qui peut, dans certains cas, être portée par le même polypeptide. La primase d'*E. coli*, DnaG, est dépour-

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 Topo-isomérase I	FEN-1 ou MF1 RNase H1 Topo-isomérase I	Nucléase enlevant les amorces d'ARN. Nucléase enlevant les amorces d'ARN. 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>).

* La polymérase δ réplique l'ADN du virus SV40. La fonction d'une autre polymérase essentielle chez les eucaryotes, ϵ , est encore inconnue.
 ** Primase et Pol α forment un complexe multiprotéique lors de la synthèse des amorces.

vue d'activité hélicase et interagit avec l'hélicase DnaB lors de l'initiation de la réplication du chromosome.

Des exceptions à l'utilisation d'ARN comme amorce ont été observées chez les procaryotes, dans le monde des bactériophages et des plasmides, et chez les eucaryotes dans le monde des virus. Les bactériophages et les plasmides qui se répliquent par cercle roulant, c'est-à-dire pour lesquels la synthèse des deux brins d'ADN est découplée, utilisent une amorce d'ADN, ainsi que les parvovirus. Le bactériophage Phi-29 de

Bacillus subtilis et les adénovirus utilisent une protéine comme amorce, créant un lien covalent protéine-ADN [2].

• *L'élongation de la réplication*

Élongation est le terme utilisé pour désigner la synthèse proprement dite de l'ADN lors de la progression des fourches de réplication. La polymérase III d'*E. coli* est la seule ADN polymérase essentielle à la viabilité de cet organisme. Elle est responsable de la duplication de son chromosome. Comme de nombreuses polymérases de phages, virus ou eucaryotes, Pol III

est composée de plusieurs polypeptides [3]. Elle est caractérisée par une très grande processivité, c'est-à-dire par la capacité de polymériser plusieurs milliers de nucléotides sans se décrocher, et par une très grande rapidité de synthèse, puisqu'elle progresse à la vitesse d'environ 1 000 nucléotides par seconde. La fourche de réplication est asymétrique, un des brins étant synthétisé de façon continue et l'autre de façon discontinue, sous forme de fragments de 1 à 2 kb de longueur appelés fragments d'Okazaki. Cependant, la réplication des deux brins d'ADN est effectuée de façon concertée grâce à la formation d'un dimère entre les deux polymérases actives sur chacun des brins (figure 1).

L'holoenzyme polymérase III est composée de 10 sous-unités. La sous-unité α possède l'activité de polymérisation, elle est associée à la sous-unité ϵ , responsable, par son activité exonucléasique 3'-5', de la correction des bases erronées (*proof-reading*). La grande processivité de Pol III est conférée par la sous-unité β . Cette sous-unité est chargée sur l'ADN par le complexe γ et forme une structure circulaire qui encercle les brins d'ADN et facilite la progression de la polymérase. Le complexe γ , qui fait partie de l'holoenzyme, est responsable de la charge et du décrochement de la sous-unité β . L'action de ce complexe permettra à la polymérase responsable de la synthèse du brin discontinu de quitter et de retrouver la matrice pour chaque fragment d'Okazaki, alors que la polymérase responsable de la synthèse du brin continu ne se dissocie de l'ADN que lorsque la réplication du chromosome est terminée. Enfin, grâce à la sous-unité τ , les polymérases des brins continus et discontinus forment un dimère, ce qui permet la synthèse coordonnée des deux brins d'ADN.

D'autres protéines sont associées à la fourche de réplication chez *E. coli*. L'hélicase DnaB ouvre la double hélice d'ADN en aval de la polymérase. La topo-isomérase I et la gyrase résolvent les tensions de surenroulement créées par le déplacement de la machinerie de réplication. La SSB protège l'ADN simple brin créé sur chacun des brins par l'hélicase. La

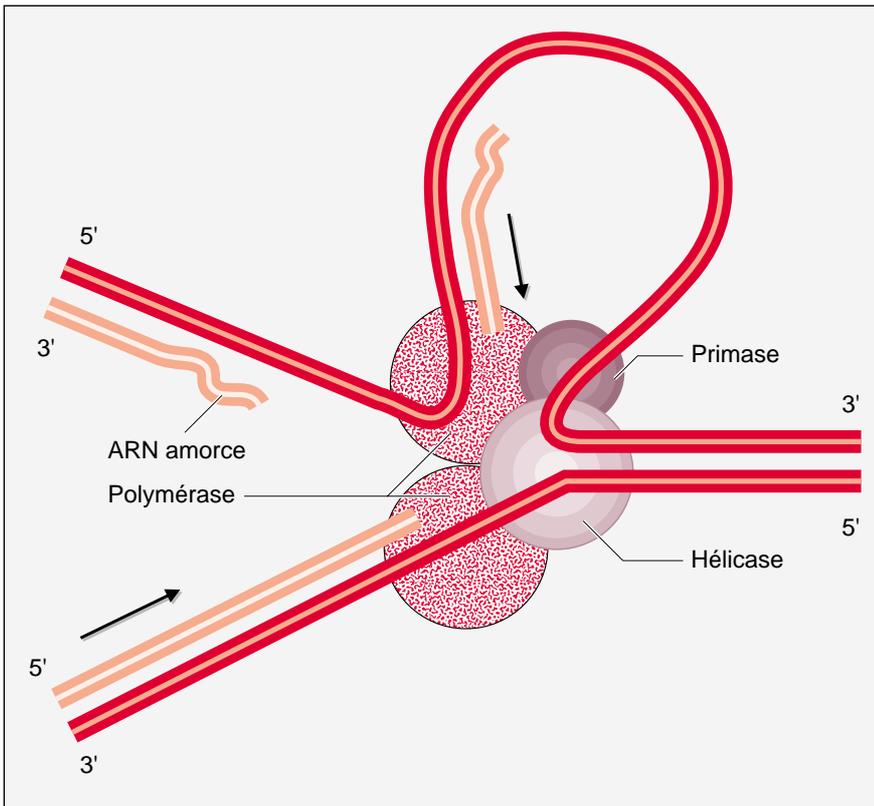


Figure 1. **Représentation schématique d'une fourche de réplication en cours d'élongation.** Les brins matriciels sont représentés en rouge, les brins néosynthétisés en rose. Le complexe multiprotéique (replisome) actif à la fourche de réplication est représenté par deux molécules de polymérase (Pol III pour *E. coli*, pol δ pour SV40), une molécule de primase (primase pour *E. coli*, pol α et primase pour SV40) et l'hélicase (DnaB pour *E. coli*, l'antigène T pour SV40). (D'après [2, 4].)

synthèse des fragments d'Okazaki est mise en route par la primase (DnaG), et se termine par la digestion de l'amorce, soit par la RNase H, soit par l'activité exonucléase de la polymérase I d'*E. coli* (Pol I). La région simple brin créée par la destruction de l'amorce ARN est rendue double brin par cette même polymérase I. Les fragments d'Okazaki sont ensuite liés par la ligase [4].

La polymérase II d'*E. coli* ne semble pas participer à la synthèse du chromosome, mais uniquement à la réparation de certaines lésions. Cependant, le rôle exact de cette polymérase est encore mal connu.

• La terminaison de la réplication

La réplication du chromosome circulaire d'*E. coli* se termine lorsque les deux fourches se rencontrent, donc

dans la majorité des cas, dans une région diamétralement opposée au site d'initiation de la réplication *oriC*. Cependant, la région terminale de la réplication chez *E. coli*, de même que chez plusieurs autres bactéries, possède des séquences spécifiques d'arrêt de réplication [5]. Ces séquences appelées *Ter* sont reconnues par une protéine, Tus, qui en se fixant sur les sites *Ter* arrête la progression de la fourche de réplication de façon transitoire. Les complexes Tus-*Ter* sont orientés et ne bloquent que les fourches venant d'une direction. Les sites *Ter* sont disposés de part et d'autre de la région terminale de réplication d'*E. coli*, définissant une région d'environ 300 kb dans laquelle les fourches de réplication peuvent entrer mais dont elles ne peuvent pas sortir.

Le chromosome d'*E. coli* étant circulaire, les deux copies du chromosome doivent être décaténées après réplication. Cette réaction est réalisée chez *E. coli* par une topo-isomérase spécifique et essentielle pour la cellule, la topo-isomérase IV [6]. Les chromosomes doivent alors être répartis dans les deux futures cellules filles, processus qui est couplé à la division cellulaire.

• La régulation de la réplication

La nécessité de coordonner réplication et division cellulaire implique la régulation de ces deux processus. La réplication du chromosome de *E. coli* est contrôlée au moment du démarrage. Par ailleurs, la division cellulaire est bloquée lorsque la réplication a été perturbée.

Le modèle du réplisome, proposé par Jacob et Brenner en 1963 pour expliquer la régulation de la réplication, reste souvent le modèle de choix. Il supposait l'existence d'un «réplicateur», mettant en route la réplication par fixation sur une cible lorsqu'il atteint une concentration cellulaire suffisante. Chez *E. coli*, ce rôle est joué par la protéine DnaA, dont la synthèse est contrôlée et qui est, de plus, en état d'équilibre entre deux formes, l'une active, l'autre inactive. La cible de DnaA, *oriC*, est elle-même soumise à un deuxième niveau de régulation. Après l'initiation, l'origine de réplication est héli-méthylée, puisque la méthylation du brin néosynthétisé n'est pas immédiate, et, dans cet état héli-méthylé, *oriC* est séquestrée sous forme de complexe avec des protéines membranaires. Ce processus évite une réutilisation immédiate des séquences *oriC* [7].

• Les erreurs de réplication

La survie d'un organisme dépend de la fidélité de la duplication de son génome. Le taux d'erreur d'incorporation de la polymérase III est de 10^{-5} , mais les corrections effectuées par l'action exonucléase 3'-5' (*proof-reading*) de la polymérase ramènent ce taux d'erreur à 10^{-7} . Le taux d'erreur final de la réplication du chromosome d'*E. coli*, qui est de 10^{-10} , résulte de l'action d'un système de correction de mésappariements

agissant après réplication (*mismatch repair*) [8]. Chez *E. coli*, le système de méthylation de l'ADN permet de différencier le brin parental du brin néosynthétisé, ce dernier étant transitoirement non méthylé après le passage des fourches de réplication. Des protéines spécialisées, les protéines Mut, corrigent donc spécifiquement les mésappariements résultant des erreurs de réplication en prenant le brin parental comme modèle. Une partie des erreurs de réplication surviennent lorsque l'ADN a été endommagé, puisque, dans ces conditions, un système de réplication fautive, permettant la synthèse à travers la lésion, est induit [9]. A côté de ces erreurs d'incorporation, conduisant à l'apparition de mutations ponctuelles, la réplication peut également, en particulier lorsqu'elle est bloquée dans sa progression, conduire à des réarrangements impliquant de grandes séquences d'ADN [10].

La 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. Néanmoins, les résultats acquis permettent de dresser un tableau assez clair [11].

• 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, 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.

• 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 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. Celui-ci reconnaît l'origine, modifie localement la structure de l'ADN et agit ensuite comme hélicase au cours de l'élongation. Les autres protéines nécessaires et suffisantes à la réplication sont d'origine cellulaire. 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 (pol α), constituée de quatre 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*), qui 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 cinq sous-unités, qui montre une 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;

- l'ADN topo-isomérase II, qui permet aux deux chromosomes de se séparer 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, 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.

2. Mise en place et activité

Schématiquement, on peut résumer les étapes de la synthèse *in vitro* de l'ADN de SV40 de la manière suivante, selon le modèle proposé par Waga et Stillman [11, 12]: (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.

Il faut maintenant souligner qu'une troisième ADN polymérase, 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 réplication 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.

- *Les origines de réplication des chromosomes eucaryotes*

Les connaissances actuelles sur la nature des origines de réplication des chromosomes eucaryotes nous viennent essentiellement de l'étude de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [11, 13]. Les chromosomes de *S. cerevisiae* contiennent des séquences conservées appelées ARS (*autonomous replicating sequence*) qui sont responsables de l'initiation de la réplication. La structure de ces séquences a été étudiée en détail 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 réplication 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 réplication. 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. L'évolution aurait donc sélectionné un système permettant la réplication coordonnée

d'un grand nombre de segments chromosomiques sans la contrainte du maintien d'une séquence spécifique de l'origine.

- *La régulation de la réplication 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 réplication 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 réplication à partir d'une ARS, après interaction avec une protéine signal activée spécifiquement 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 [14]. 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 [15]. 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 [16].

- *L'assemblage des nucléosomes au cours de la réplication de l'ADN*

Un problème intéressant, notamment chez les cellules animales, concerne la reconstitution de la chromatine au cours de la réplication de l'ADN. D'une part, les nucléosomes existant sur l'ADN en cours de réplication sont déstabilisés par la fourche et se reconstituent sur les deux doubles hélices postrépliatives. D'autre part, 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 factor-1*), 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 [17].

- *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 [18].

Conclusion

Les mécanismes et les molécules impliqués dans la réplication de l'ADN sont remarquablement conservés entre eucaryotes et procaryotes (Tableau I). De plus, alors que la polymérase III bactérienne appartient à une différente famille de molécules, toutes les ADN polymérases du troisième « empire » du monde vivant, celui des archéobactéries, appartiennent à la même famille que les polymérases α , δ et ϵ des eucaryotes, et que la polymérase II de *E. coli*. Il y a donc une certaine conservation de la structure des ADN polymérases 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. En outre, les eucaryotes ont instauré des systèmes de transport intracellulaire et une mise en place de multiples voies de contrôle de la phase S dont le déroulement est coordonné avec les autres phases du cycle cellulaire ■

Bénédicté Michel

Docteur ès sciences, directeur de recherche au Cnrs. Génétique microbienne, Inra, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Giuseppe Baldacci

Docteur ès sciences, directeur IFCl-Cnrs, Laboratoire de génétique et biologie moléculaire de la réplication, 7, rue Guy-Moquet, BP8, 94801 Villejuif, France.

RÉFÉRENCES

1. Kaguni JM, Kornberg A. Replication initiated at the origin (*oriC*) of the *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes. *Cell* 1984; 38: 183-90.
2. Kornberg A, Baker TA. DNA replication, 2nd ed. New York: Freeman 1991.
3. Kelman Z, O'Donnell M. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 171-200.
4. Stillman B. Smart machines at the replication fork. *Cell* 1994; 78: 725-8.
5. Hill TM. Arrest of the bacterial DNA replication. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 603-33.
6. Rothfield LI. Bacterial chromosome segregation. *Cell* 1994; 77: 963-6.
7. Crooke E. Regulation of chromosomal replication in *E. coli*: sequestration and beyond. *Cell* 1995; 82: 877-80.
8. Schaaper RM. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *E. coli*. *J Biol Chem* 1993; 268: 23762-5.
9. Devoret R. Mécanisme de la mutagenèse SOS chez les bactéries. *Med Sci* 1993; 9: I-VIII.
10. Bierne H, Michel B. When replication forks stop. *Mol Microbiol* 1994; 13: 17-23.
11. Julian Blow J. Eukaryotic replication. Oxford: Oxford University Press, 1996.
12. Waga S, Stillman B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vivo*. *Nature* 1994; 369: 207-12.
13. Newlon CS. DNA replication in yeast. In: De Pamphilis ML, ed. *DNA replication in eucaryotic cells*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 873-914.
14. Cocker JL, Piatti S, Santocanale C, Nasmyth K, Diffley JFX. An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 1996; 379: 180-2.
15. Maine MA, Khoo CY, Mills AA, Musahl C, Laskey RA. The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* 1995; 5: 1270-9.
16. Bouvier D, Baldacci G. The N-terminus of fission yeast DNA polymerase α contains a basic pentapeptide that acts *in vivo* as a nuclear localization signal. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 1697-705.
17. Krude T. Nucleosome assembly during DNA replication. *Curr Biol* 1995; 5: 1232-4.
18. Pavlovich AG, Hartwell LH. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 1995; 82: 841-7.

TIRÉS À PART

B. Michel.

IRBM

ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI ROMA "LA SAPIENZA"