

LÉSIONS ET RÉPARATIONS DE L'ADN

Les voies de réparation de l'ADN interviennent lorsque notre ADN est endommagé. On n'endommage pas notre ADN uniquement lorsqu'on est exposés à un environnement particulièrement stressant. En effet, celui-ci est constamment endommagé (par exemple lorsque l'on se baigne, lorsque l'on respire ou même quand on reste oklm au soleil). *Par exemple, l'activité métabolique de base d'une cellule va générer des espèces réactives de l'oxygène qui vont induire une oxydation de l'ADN et en modifier les bases.*

Il existe différents types de lésions :

- **Les bases modifiées par oxydation** : la 8-oxo-guanine est une modification de la guanine du fait de radicaux libres ou d'agents alkylants.
- **Les cassures simple brin** : 1 seul brin d'ADN est lésé. 
- **Les cassures double brin** : plus grave que la coupure simple brin car les 2 brins sont lésés. 
- **Le pontage inter-brin** : formation de liaisons covalentes entre 2 brins d'ADN. C'est la pire de toutes les lésions. Il est provoqué par un certain nombre d'agents chimiques (cette lésion ne se fait pas spontanément, ou alors très rarement) : Gaz moutarde, Psoralène (traitement du psoriasis), Cisplatine (traitement utilisé en chimiothérapie). 
- **Formation de dimère de pyrimidine** : provoqué par l'exposition aux rayons UV ☀. Ce rayonnement UV va entraîner une modification des bases principalement sur la thymine : deux thymines adjacentes d'un même brin se lient de façon covalente (≠ de la liaison covalente dans le pontage inter-brin qui est sur le brin opposé !) provoquant une distorsion de la double hélice d'ADN. Cette anomalie engendre une perturbation des fonctions de l'ADN (mauvaise transcription...). Sur les dimères de pyrimidine il n'y a pas de rupture, contrairement aux lésions simples/doubles brin (qui sont donc plus graves). Le système de réparation des lésions de l'ADN induites par les rayons UV s'appelle **la voie NER**. 

A chaque lésion correspond un système de réparation !

Si un de ces systèmes fonctionne mal, des mutations peuvent apparaître (pouvant eux même aboutir à la formation de cancer ou d'autres maladies) (mutations ≠ lésions)

I. Xeroderma pigmentosum (XP)

C'est la maladie dites « des enfants de la lune ».

Le Xeroderma Pigmentosum est une **maladie génétique rare**. Les individus XP développent des **cancers cutanés** dans les zones exposées au soleil. Chez les patients atteints de XP, le système de réparation de l'ADN mis en place des suites d'une exposition aux rayonnements UV est défaillant. Les enfants sont dépourvus des enzymes permettant au système de fonctionner. L'exposition aux UV du soleil provoque alors des lésions de l'ADN difficilement réparable.

II. La voie NER (Nucleotide Excision Repair)

La voie NER est consacrée à la réparation par excision de nucléotides en cas de lésion de l'ADN liée aux UV, la voie de réparation des dimères de pyrimidines. C'est cette voie qui est défaillante chez les patients XP. Lorsqu'il y a une liaison covalente entre 2 thymines adjacentes, on va avoir une distorsion de la double hélice d'ADN. On distingue **2 grandes sous catégories** dans cette voie :

- La voie NER globale → Pour tout le génome.
- La voie NER couplée à la transcription → réservée aux régions transcrites.

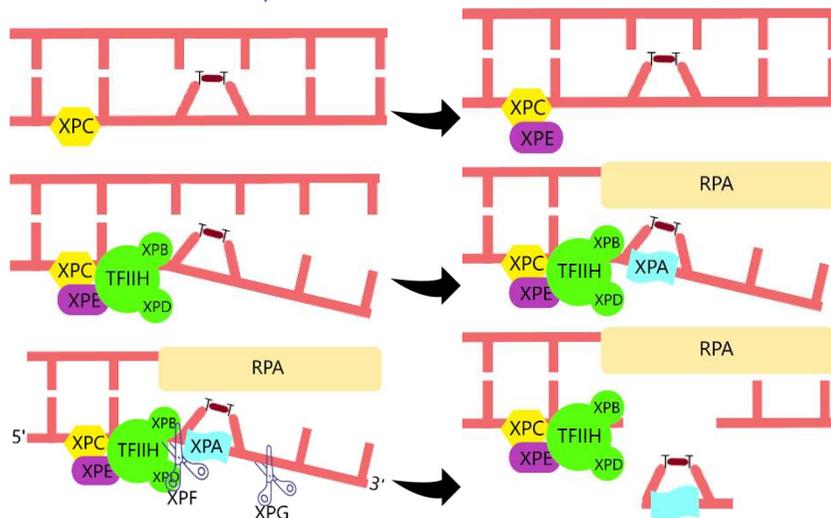
A- La voie NER globale

- Lorsque l'on a ce type de lésion, une protéine va pouvoir la détecter → **XPC** (XP comme xeroderma pigmentosum)
- **XPC** va recruter **XPE**
- Cet ensemble **XPC + XPE** va recruter **TFIIF**, le complexe protéique d'initiation de la transcription.
- **TFIIF** a de nombreuses activités enzymatiques, notamment un rôle d'hélicase grâce à ses sous-unités **XPB** et **XPD** (Une hélicase va pouvoir dérouler la double hélice d'ADN en séparant les 2 brins).

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

LÉSIONS ET RÉPARATIONS DE L'ADN

- ➔ Les deux brins sont donc libres, permettant à d'autres protéines d'agir :
 - XPA va reconnaître le brin lésé
 - RPA va reconnaître le brin sain et le protéger
- ➔ Ensuite d'autres enzymes vont venir exciser la lésion, des endonucléases (elles coupent en dedans) :
 - XPF/ERCC1 → coupe en 5' de la lésion (avant)
 - XPG → coupe en 3'



- ➔ Enfin, une ADN polymérase va venir combler le « trou » créé par XPF et XPG en resynthétisant de l'ADN.
- ➔ Pour finir, une ligase va permettre de relier l'ADN nouvellement synthétisé au reste du brin

B: La voie NER couplée à la transcription

RAPPEL : L'ADN est transcrit en ARN dans le noyau. Mais tout l'ADN n'est pas transcrit. Cette voie sera donc exclusivement pour les régions transcrites (c'est la voie TCR, Transcription-Coupled Repair)
 Cette voie va être très similaire à la précédente, la différence réside dans le déclenchement de la réparation. Dans la voie globale, c'est XPC qui va recruter XPE

et ensemble ils recruteront TFIID. Cependant, ici, c'est le fait que la transcription par l'ARN polymérase soit bloquée par la distorsion d'ADN qui va être l'élément déclencheur.

- ➔ L'ARN polymérase II (chargée de la synthèse d'ARN lors de la transcription) est couplée à la protéine CSB (Cockayne Syndrome B) qui lorsque la transcription est bloquée par une distorsion d'ADN, va rester sur place.
- ➔ CSB va ensuite recruter le complexe de réparation :
 - TFIID (dont XPB et XPD) → hélicase
 - XPA (brin lésé) RPA (protection du brin sain)
 - XPF + XPG → activité endonucléasique
 - ADN polymérase
 - Ligase.

	VOIE NER GLOBALE	VOIE NER COUPLÉE A LA TRANSCRIPTION
SPÉCIFICITÉS	Agit sur tout l'ADN sans distinction	Agit uniquement sur les parties transcrites de l'ADN
INITIALISATION DE LA VOIE	XPC + XPE	CSB qui est couplée à l'ARN polymérase
COMPLEXE RECRUTÉ	TFIID	TFIID
HÉLICASÉS (ouverture de l'hélice)	XPB + XPD (Sous-unités de TFIID)	
PROTECTION DES BRINS	XPA → brin lésé RPA → brin sain	
EXTRACTION DE L'ADN ENDOMMAGÉ (endonucléases)	XPF/ERCC1 → 5' XPG → 3'	
RESYNTHESE	ADN polymérase	
LIGATION	Ligase	
DISFONCTIONNEMENTS + MALADIES ASSOCIÉES	Cancer Xeroderma Pigmentosum	Vieillesse prématuré Cockayne syndrome

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

LÉSIONS ET RÉPARATIONS DE L'ADN

III. La localisation

On va essayer de localiser les différentes molécules impliquées dans le système de réparation et observer leur fonctionnement en créant des molécules hybrides, couplées à des molécules fluorescentes comme de la GFP. Les hybrides doivent :

- Être fonctionnels (on vérifiera le fonctionnement grâce à un test de complémentation).
- Avoir un niveau d'expression équivalente à la normale.

A- Dans une situation physiologique

On observe XPC, XPA et TFIIH dans le noyau : on constate déjà qu'elles ne sont pas au même endroit.

- XPA semble se répartir de façon plutôt homogène dans le noyau
- XPC semble se retrouver en petits amas dans certaines zones particulières
- TFIIH est encore plus hétérogène et semble se rassembler nettement dans des zones bien définies.

1. XPC

On réalise un double marquage XPC/ADN (grâce au Hoescht, qui marque l'ADN) : on observe que XPC colocalise avec l'ADN dans le noyau, et ce même en mitose.

2. TFIIH

On réalise un marquage de XPB (une sous-unité de TFIIH, donc on marque TFIIH finalement) et on observe en parallèle une image en contraste de phase des noyaux. En superposant les deux images, on s'aperçoit que TFIIH s'accumule au niveau du **nucléole**. Le nucléole est une sous structure nucléaire, particulière, sans membrane et très bien organisée. C'est une usine à pré ribosomes. *Les ribosomes sont des petites structures qui s'assemblent en chaîne pour traduire de l'ARN messenger dans le cytosol. Ils sont exportés du noyau au cytosol via les pores nucléaires.*

TFIIH est un complexe multifonctionnel :

- Utile dans la voie NER
- Utile dans l'initiation de la transcription (cf biomol)

- L'ensemble de TFIIH se fixe avec les deux hélicases (XPB et XPD) au niveau de la TATA Box, au niveau du promoteur du gène. C'est l'activité de ces hélicases qui va permettre l'ouverture des brins d'ADN.
- Une extension de TFIIH, le domaine Cter retient la polymérase.
- Ensuite, des kinases vont venir phosphoryler la queue Cter de TFIIH : celle-ci va changer de conformation et ne pourra plus retenir l'ARN polymérase, ce qui va entraîner l'initiation de la transcription. C'est pour cela qu'on voit beaucoup TFIIH au niveau du nucléole : il n'y a pas beaucoup d'ADN dans le nucléole, et le peu d'ADN qu'on y trouve est responsable de la synthèse des ARN ribosomiaux (le constituant essentiel des ribosomes) donc il y a une activité transcriptionnelle dans le nucléole très élevée (on a besoin de beaucoup de TFIIH pour tout transcrire). TFIIH est important pour 2 classes d'ARN polymérases (il existe 3 types d'ARN polymérases 1,2 et 3) :
 - ARN polymérase 1 : Spécialisées dans la transcription d'ARN ne participant pas à la synthèse des protéines (= ARN non codant, par exemple l'ARN ribosomique)
 - ARN polymérase 2 : Spécialisées dans la transcription d'ARN participant à la synthèse des protéines (ARN messagers).

B- Dans une cellule irradiée aux UV (création de dimères de pyrimidines)

Avant la lésion → XPB est concentrée dans le nucléole (XPB, sous-unité de TFIIH)

Après la lésion →

- 4 minutes après, on voit que XPB a disparu du nucléole et s'est **répartie dans le noyau** (la fluorescence est plus homogène).
- 4 heures après, la fluorescence s'est concentrée au niveau de foyers très intenses : ce sont **les sites de réparation de l'ADN**, le complexe est sorti du nucléole pour aller réparer l'ADN lésé via la voie NER.

On s'aperçoit qu'il y a une **redistribution de certaines de ces protéines** après lésion de l'ADN. → Cela suggère qu'il y a **une mobilisation** de ces facteurs au niveau des sites endommagés.

Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

LÉSIONS ET RÉPARATIONS DE L'ADN

RÉCAP :

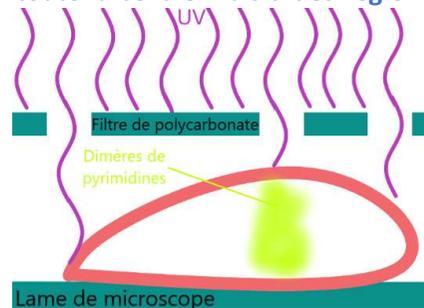
XPC → physiologiquement, tout au long de l'ADN, même en mitose

TFIIH → physiologiquement, au niveau du nucléole, où la transcription est très active, car il est un facteur de transcription majeur, qui permet l'ouverture de la double hélice d'ADN (activité hélicase de ses sous unités **XPB** et **XPD**).

→ A la suite d'une lésion de l'ADN par UV, s'échappe du nucléole pour aller sur le site de réparation de l'ADN, interrompant son rôle dans la transcription pour participer à la voie NER.

La réparation de l'ADN est prioritaire sur les autres activités de la cellule, c'est pour ça que le **TFIIH** peut se permettre de quitter le nucléole et la synthèse d'ARN ribosomiaux pour aller réparer l'ADN.

On peut aussi induire des lésions non pas sur toute la cellule mais à **des régions localisées** de celle-ci afin d'avoir plus de précisions : on peut utiliser un **filtre de polycarbonate**, qui possède des pores. Les UV ne pourront passer qu'à travers ces pores qui ont une dimension précise. On observe alors, avec des anticorps spécifiques pour les dimères de pyrimidine, que les dommages se situent bien au niveau de l'exposition aux UV.



IV. L'ordre de sollicitation

A- XPA nécessaire au recrutement de XPC et TFIIH ?

Si on prend une cellule déficiente pour **XPA** et qu'on induit des lésions, on s'aperçoit qu'**XPC** et **TFIIH** sont quand même recrutés normalement au niveau des sites de lésion.

- **XPA** n'est donc pas nécessaire au recrutement d'**XPC** et de **TFIIH**
- **XPA** intervient après **XPC** et **TFIIH**.

B- XPC nécessaire au recrutement de XPA et TFIIH ?

Si on prend une cellule déficiente pour **XPC** et qu'on induit des lésions, on s'aperçoit que la concentration de **XPA** et **TFIIH** (représenté par **XPB**, qui en est une sous-unité, sur l'image) est très faible au niveau des sites de lésion.

- **XPC** n'est donc pas nécessaire au recrutement d'**XPA** et de **TFIIH**
- **XPC** intervient avant **XPA** et **TFIIH**.

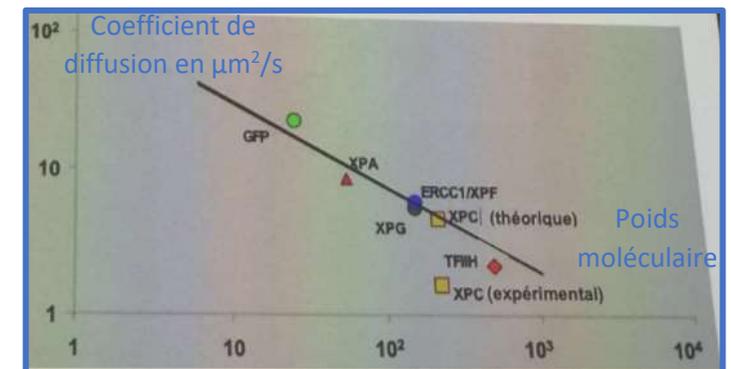
C'est en faisant des expériences de ce genre, en utilisant des cellules défailtantes pour une protéine puis en les irradiant et en observant les autres protéines qu'on a réussi à comprendre l'ordre d'intervention des différentes protéines de la voie NER.

V. La vitesse de diffusion des protéines

Nous avons vu que certaines de ces protéines sont capables de diffusion (par exemple **TFIIH**, qui se déplace du nucléole aux sites de réparation), et elles le font avec une certaine vitesse. Il existe des mécanismes très importants pour l'efficacité des systèmes de réparation qui régulent cette diffusion. On peut étudier ces phénomènes de diffusion par les techniques de FRAP/FLIP.

→ On sait que le coefficient de diffusion dépend (en partie) de la taille de la molécule (son poids moléculaire).

Connaissant donc la taille de ces molécules, on peut voir si le coefficient de diffusion qu'on observe correspond au poids moléculaire qu'on attend. Et on s'aperçoit que la vitesse n'est pas toujours proportionnelle au poids des molécules.



Le tutorat est gratuit, toute vente ou reproduction est interdite !

LÉSIONS ET RÉPARATIONS DE L'ADN

- Par exemple, le coefficient de diffusion théorique de **XPC** (petit carré jaune théorique) est beaucoup plus élevé que son coefficient de diffusion réel (petit carré jaune expérimental). Cela signifie qu'il y a une assez grande fraction de **XPC** qui **n'est pas libre** et qui est **liée à la molécule d'ADN**. **XPC** est en fait une protéine sentinelle qui se balade le long de l'ADN.
- On peut étudier le déplacement des protéines à l'aide d'un FRAP : ici, on s'intéresse à la protéine **XPA**, dont on va tuer la fluorescence par photoblanchiment :

-Sans avoir créé de lésion sur l'ADN : on s'aperçoit qu'après avoir tué la fluorescence d'**XPA** sur une ligne, au bout de quelques minutes la fluorescence revient complètement. Cela signifie que **les protéines XPA sont mobiles**, elles ont rediffusé dans tout le noyau.

-Après avoir créé des lésions UV sur l'ADN : on s'aperçoit qu'après avoir tué la fluorescence d'**XPA** sur une ligne, la fluorescence ne revient pas complètement. Cela signifie **qu'une partie des protéines XPA s'est immobilisée dans certaines zones**, probablement car elle s'occupe des lésions d'ADN provoquées par les UV. Cependant, si tout se déroule bien, la fluorescence va revenir au bout d'un moment sur la ligne irradiée, une fois que les lésions auront été réparées.

PROTÉINE	TEMPS DE MOBILISATION AU SITE DES LÉSIONS UV (déterminé par FRAP)	RÔLE	
XPC	1,5 min	Initiateur de la voie NER globale	Relâché rapidement
CSB	2,5 min	Initiateur de la voie NER couplée à la transcription	Relâché rapidement
TFIIH (XPB)	4 min	Ouverture de l'ADN	Plus long
PCNA (permet la réplication de l'ADN)	20-25 min	Resynthèse	Très long

En conclusion, nous avons appris grâce aux techniques de biologie cellulaire que :
 → Chaque protéine de la voie NER présente une distribution particulière : il n'y a **pas d'holocomplexe** qui arriverait sur la lésion d'un seul coup. Le recrutement des protéines se fait au fur et à mesure, les unes après les autres.

→ La mobilité intra-nucléaire des facteurs se fait par diffusion passive en fonction du poids moléculaire (sauf pour **XPC**).

→ L'assemblage se fait rapidement et séquentiellement au site de dommage, sauf pour la réplication / resynthèse qui est plus longue (PCNA).

→ **TFIIH** est localisé au niveau du nucléole et assure un couplage transcription / réparation

On a donc un **système flexible**, efficace et **multifonctionnel** qui coordonne plusieurs activités.