

TD RÉPARATION DE L'ADN (Étude moléculaire du *Xeroderma pigmentosum*)

Xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique très rare. Selon les pays, elle touche 1 individu sur 100 000 à 1 sur 1 million (on estime qu'il y a entre 3000 et 4000 malades dans le monde). Elle est caractérisée par une hypersensibilité au rayonnement ultraviolet (U.V.), qui se traduit dès les premiers mois de la vie par l'apparition d'une hyperpigmentation cutanée sur les parties du corps exposées au soleil. Ces lésions dégénèrent en tumeurs cancéreuses avec une fréquence environ 4000 fois plus élevée que dans la population normale. L'espérance de vie des patients atteints de XP est réduite à 15-20 ans. À l'heure actuelle, les traitements consistent en l'ablation des tumeurs et en une protection drastique de la peau contre les ultraviolets (crème solaire et port de vêtements spéciaux).

I) Différents gènes peuvent être responsables du XP

L'hypersensibilité aux radiations ultraviolettes des malades atteints de XP est due à une anomalie génétique affectant le processus de réparation des lésions induites sur l'ADN. L'action principale des U.V. au niveau de l'ADN est la formation de liaisons covalentes entre deux pyrimidines consécutives (exemple : dimère de thymine T-T ou dimère C-T). La voie essentielle de réparation des dimères de thymine se fait par excision du fragment d'ADN portant la lésion, suivie de la re-synthèse de cette portion en utilisant pour matrice le brin intact. Ce mécanisme est appelé le NER (pour "Nucléotide Excision Repair", voir le cours).

Afin d'étudier les gènes dont les mutations sont responsables de cette pathologie, les chercheurs ont analysé la capacité des fibroblastes prélevés sur des patients atteints (dits xérodermiques) à réparer les lésions de l'ADN provoquées par les UV. Des fibroblastes de peau d'un individu non malade et d'individus xérodermiques ont été exposés aux U.V., puis cultivés en présence de thymidine tritiée).

L'incorporation dans les cellules de ce précurseur radioactif a été évaluée par autoradiographie : les zones de l'ADN réparées apparaissent sous forme de "grains sombres" au niveau des noyaux. L'estimation du nombre de grains par noyau donne une idée de l'importance en quantité des réparations effectuées. Cette analyse a permis de classer les malades atteints de XP en deux catégories.

- 20% des individus atteints de XP présentent un niveau normal d'incorporation de thymidine tritiée, autrement dit, leurs cellules sont capables d'effectuer le processus du NER. Des analyses génétiques ont démontré qu'un seul locus est à l'origine de cette forme de XP, dite le XP variant : ce gène est appelé XPV. L'étude du XP variant est présenté en partie III de ce TD.

- 80% des individus atteints de XP sont effectivement affectés dans le processus du NER. Dans le but d'étudier les gènes responsables de cette forme de XP chez 19 malades, différents hétérocaryons ont été réalisés par fusion cellulaire à partir de fibroblastes prélevés chez ces patients et chez un individu non atteint (N). Les résultats des expériences de réparation de l'ADN après irradiation aux UV sont présentés dans le tableau 1 (le signe + indique une réparation efficace des lésions et le signe - une absence de réparation).

Question 1 : D'après l'analyse des données du tableau 1, combien y a-t-il (au minimum) de gènes dont les mutations peuvent être responsables de cette forme de *Xeroderma pigmentosum* ?

| Tableau 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| patients | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | N |
| 1 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 3 | | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | | | | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | | | | | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | | | | | | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| 7 | | | | | | | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| 8 | | | | | | | | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | | | | | | | | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | | | | | | | | | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | | | | | | | | | | | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 12 | | | | | | | | | | | | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | | | | | | | | | | | | | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | - | + | + | - | + | - | + |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | - | + | + | - | + | + |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | - | + | + | + | + |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | - | + | - | + |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | + | + |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | + |
| N | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |

II) Étude des gènes XPA, XPB, XPD, XPF, XPG

Le gène XPA

Le gène XPA a été cloné et séquencé, il code une protéine de 273 acides aminés, qui contient à son extrémité NH2 une structure en doigt de zinc.

Question 2 : - Quelles familles de protéine sont caractérisées par la présence de structure en doigt de zinc ? - Quelle pourrait être l'activité de XPA ?

La protéine XPA s'associe à RPA (replication protein A), une protéine impliquée à la fois dans la recombinaison, la réplication et le NER.

Des expériences de retard sur gel ont été réalisées en présence, respectivement, de XPA et RPA. Les résultats sont présentés Figure 1.

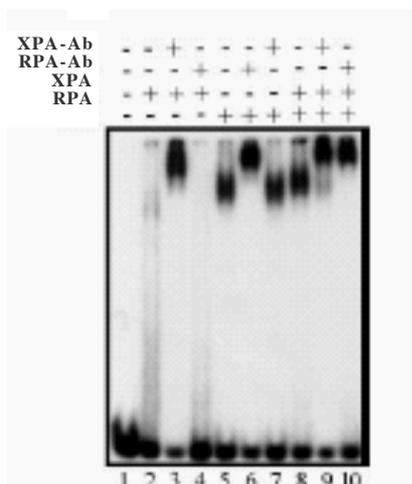


Figure 1 : Autoradiogramme. Les incubations ont été réalisées avec les protéines indiquées sur la figure et un fragment d'ADN double brin (41pb), contenant une seule lésion et marqué à son extrémité 5' avec du ^{32}P .

Après incubation, les produits de la réaction ont été séparés sur gel de polyacrylamide natif et visualisés par autoradiographie.

Question 3: - Analysez les résultats présentés Figure 1. Selon vous, quel est l'intérêt d'avoir utilisé des anticorps ? Quelles conclusions pouvez-vous tirer concernant le rôle des protéines étudiées ?

Les gènes XPB et XPD

Dans le but de caractériser l'activité des produits des gènes XPB et XPD, une équipe de chercheurs a réalisé les expériences suivantes : un oligonucléotide de 74 bases complémentaire d'une région de l'ADN du phage M13 a été marqué par la T4 polynucléotide kinase en présence de $[\gamma^{32}P]$ ATP. Une fois marqué, il a été mélangé avec 1 mg d'ADN circulaire simple brin du phage M13 pour obtenir la structure présentée Figure 2.

Après ajout de 20 ng de protéine XPB ou XPD au substrat décrit Figure 2, l'incubation est réalisée à 37°C en présence ou non d'ATP (voir légende de la Figure 2). La réaction est arrêtée et analysée sur un gel de polyacrylamide non dénaturant dont un schéma de l'autoradiogramme est présenté.

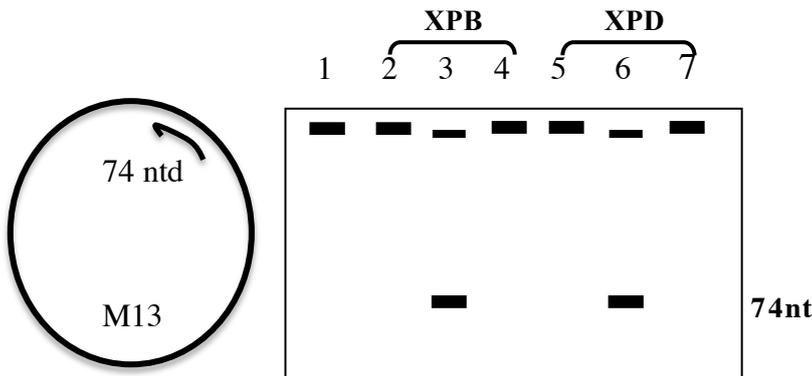


Figure 2 : Autoradiogramme
 Puits 1: Aucune protéine n'est ajoutée au mélange.
 Puits 2-4: 20 ng de XPB sont ajoutés au mélange.
 2) La réaction est arrêtée après 3 min.
 3) La réaction est arrêtée après 40 min.
 4) Pas d'ATP présent dans le mélange.
 Puits 5-7 : 20 ng de XPD sont ajoutés au mélange.
 5) La réaction est arrêtée après 3 min.
 6) La réaction est arrêtée après 40 min.
 7) Pas d'ATP présent dans le mélange.

Question 4: - Expliquez les différentes étapes du protocole. - Que visualise-t-on sur l'autoradiogramme ? - Quelle est l'activité des protéines XPB et XPD ?

L'ADN du phage M13 a été linéarisé et deux oligonucléotides complémentaires des extrémités libres de cet ADN ont été synthétisés.

L'oligonucléotide en 5' est constitué de 18 nt, l'autre, en 3', de 34 nt. Après avoir été marqués à l'aide de la T4 polynucléotide kinase en présence de $[\gamma^{32}P]$ ATP, ils ont été hybridés avec l'ADN M13 linéarisé. Différentes concentrations de protéines XPD ou XPB ont été ajoutées au mélange et la réaction a été poursuivie comme décrit précédemment. Les résultats sont présentés Figure 3.

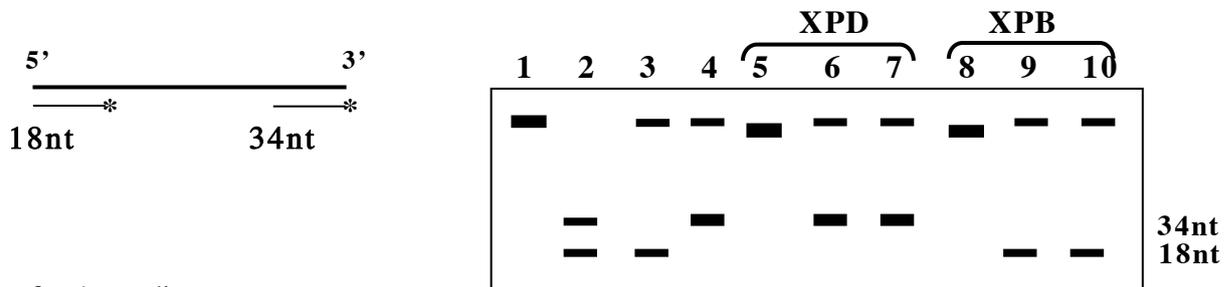


Figure 3 : Autoradiogramme
 Puits 1: Aucune protéine n'est présente dans le mélange réactionnel.
 Puits 2: L'ADN a été chauffé à 95°C pendant 5 min, sans ajout de protéine.
 Puits 3: 50 ng de la protéine UvrD ont été ajoutés au mélange (hélicase ayant une activité. 3'→5')
 Puits 4: 50 ng de la protéine RAD3 ont été ajoutés au mélange (hélicase ayant une activité 5'→ 3')
 Puits 5-7: Respectivement 5, 10 ou 20 ng de protéine XPD ont été ajoutés au mélange.
 Puits 8-10: Respectivement 5, 10 ou 20 ng de protéine XPB ont été ajoutés au mélange.

Question 5 : - Analysez la figure 3. - Quel est l'intérêt des protéines UvrD et RAD3 dans cette expérience ? - Quelles précisions pouvez-vous apporter concernant les activités respectives des protéines XPB et XPD ? - À votre avis quel est leur rôle dans le NER ?

Les gènes XPG et XPF

Afin de déterminer la fonction de la protéine XPG, les chercheurs ont incubé de l'ADN circulaire simple brin du phage M13 avec la protéine XPG à 37°C pendant 90 min. La réaction a été arrêtée et analysée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de BET. Les résultats sont présentés Figure 4.

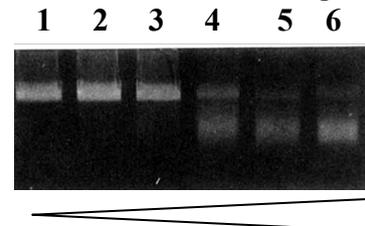
Figure 4 :

Puits 1-6 : l'ADN a été incubé avec des quantités croissantes (0 – 60 ng) de protéine XPG.

circulaire

linéaire

XPG ng



Question 6 : - Analysez la figure 4. - Quelle activité de la protéine XPG est mise en évidence ? - Le fait d'avoir utilisé comme substrat de l'ADN circulaire et simple brin, vous permet-il de préciser son mode d'action ? Quel témoin manque-t-il ?

Les protéines XPF et ERCC1 agissent sous forme de complexe (XPF-ERCC1) et possèdent une activité de clivage de l'ADN. Afin de préciser le rôle des protéines XPF-ERCC1 et XPG dans le mécanisme d'excision- réparation, leur activité a été testée sur un autre substrat d'ADN, comme montré Figure 5A.



Figure 5 :

A) Schéma de la structure d'ADN utilisée. Cet oligonucléotide de 46 bases possède à ses extrémités 12 bases capables de s'hybrider entre elles et une série de 22 thymidines au milieu. L'appariement des bases forme une structure en « épingle à cheveux » ayant une partie double brin (longue de 12pb) et une simple brin. Cet oligonucléotide a été marqué radioactivement à son extrémité 5'.

B) Autoradiogramme. Les différentes protéines ont été incubées en présence de la structure en « épingle à cheveux » dans un tampon adéquat. Les produits de la réaction ont été séparés sur gel dénaturant. Puits 1 : Aucune protéine n'est ajoutée au mélange ; Puits 2 : 20 ng de XPF-ERCC1 ont été ajoutés ; Puits 3 : 20 ng de XPG ont été ajoutés.

Question 7 : - Analysez la figure 5B. - Que pouvez-vous conclure à propos de l'activité des protéines XPG et XPF-ERCC1 ? - Proposez un mécanisme d'action pour XPG et XPF/ERCC1 dans le NER.

Question 8 : - Faites une synthèse des données obtenues concernant le NER et proposez un schéma récapitulatif.

III) Cas du *Xeroderma pigmentosum variant* (XP-V)

La forme du XP variant a été abordée dans la partie I de ce TD, elle est due à des mutations dans un huitième locus : le gène XPV. À la différence des autres gènes précédemment décrits, ce gène n'est pas impliqué dans le processus du NER. Par contre, les cellules XP-V présentent un taux de mutation supérieur à la normale après irradiation aux UV. De plus, il a été démontré que les extraits cellulaires de différents malades atteints de XP-V sont incapables d'effectuer la synthèse "translésionnelle" au niveau d'un dimère de thymine.

Des tests de complémentation *in vitro* ont été réalisés afin de purifier une protéine capable de restaurer cette synthèse dans trois extraits cellulaires de cellules XP-V. Cette protéine est appelée hXPV. La séquence de la protéine hXPV correspond à celle d'une ADN polymérase de type η ("eta").

Des expériences de réplication *in vitro* d'une matrice intacte ou endommagée (présence d'un dimère de thymine) ont été réalisées afin de tester la capacité de synthèse « translésionnelle » de la protéine hXPV par rapport à l'ADN polymérase α . Les résultats sont présentés Figure 6.

Figure 6 :

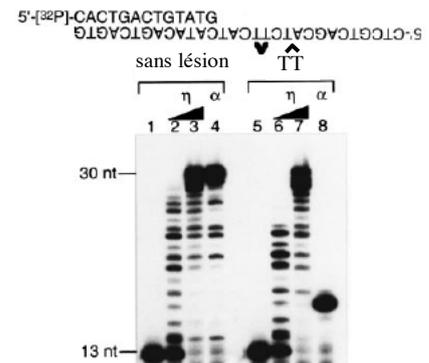
La matrice amorcée utilisée est présentée au-dessus du gel : il s'agit d'un oligonucléotide 30mer hybridé à un oligonucléotide 13mer marqué en 5' par du ^{32}P . Le 30mer est soit sans lésion (puits 1 à 4), soit porteur d'un dimère de thymine (indiqué par \blacktriangle , puits 5 à 8). Après une incubation réalisée dans un tampon adéquat contenant des dNTP, une migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en condition dénaturante est réalisée. L'autoradiographie de ce gel est présentée ci-contre.

Puits 1 et 5 : incubations réalisées sans polymérase.

Puits 2 et 6 : incubations réalisées en présence de 0,05 ng de hXPV (notée η).

Puits 3 et 7 : incubations réalisées en présence de 0,5 ng de hXPV (notée η).

Puits 4 et 8 : incubations réalisées en présence de 0,1 ng de polymérase α .



Question 9 : - Décrivez, puis interprétez les résultats obtenus avec la polymérase α .

- Même question avec la protéine hXPV.

- Que peut-on conclure quant à l'activité de cette protéine ?

Il existe d'autres polymérases capables d'effectuer la réplication d'un ADN endommagé, comme polt (iota) ou pol ζ ("zêta"), mais à la différence de la polymérase XPV (pol η), elles sont capables d'erreurs (placement d'autres nucléotides que des adénosines en face du dimère de thymine).

Question n°10 : Cette nouvelle donnée peut-elle permettre d'expliquer le fort taux de mutations incorporées dans les cellules XP-V après irradiation UV ?