

Exemple de Corrigé d'un TD
RÉPARATION DE L'ADN
(Étude moléculaire du *Xeroderma pigmentosum*)

En bleu = corrigé (réponses attendues) ; en orange des informations supplémentaires (juste pour votre information, donc non considérées comme une réponse ; en vert des conseils.

Xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique très rare. Elle se transmet sur un mode autosomal récessif. 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, vitres + filtre anti UV et néons non-émetteurs).

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. (essentiellement les UVB, 280 à 320 nm) 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 (et de pyrimidines) 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). Cette culture est effectuée pendant un temps très court, car il ne faut pas qu'il y ait répllication de l'ADN. Ce qui est suivi ici est l'incorporation de nucléotides radioactifs au niveau des régions re-synthétisées au cours du processus du NER et non la répllication elle-même. Ainsi, si la cellule est capable d'effectuer le NER, il y aura incorporation de radioactivité. Par contre, si la cellule ne peut effectuer ce type de réparation ou bien le fait de façon moins efficace que les cellules témoins, alors l'incorporation de ces nucléotides radioactifs sera diminuée voire absente.

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).

Informations sur les fusions cellulaires

Il est possible de faire fusionner les membranes de deux cellules en utilisant le **virus de Sendai** et du **PEG**. Dans le cas qui nous intéresse, les cellules prélevées sur les malades sont bien évidemment des cellules diploïdes, et homozygotes pour l'allèle muté, responsable du XP (car maladie récessive). Après fusion, on obtient alors des cellules hétérocaryoniques, c'est-à-dire contenant les deux types de noyaux, d'origines différentes (ces cellules restent des diploïdes, car la ploïdie concerne le nombre de chromosomes par noyau et non par cellule).

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 ?

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																				+

Reconnaitre en premier les tests effectués : ici deux types de tests génétique sont effectués :

- **Test de dominance-récessivité** (cas des hybrides réalisés avec les cellules d'individus non atteints) – à analyser en premier !

- **Test de complémentation fonctionnelle** : hybrides entre deux cellules de patients atteint de XP. – à analyser en second.

Ici nous faisons appel à l'ensemble de vos connaissances, n'hésitez pas à faire des passerelles entre vos différentes UE.

Les hybrides cellulaires avec des cellules d'individus non atteints correspondent à un **Test de dominance/ récessivité**.

Dans tous les cas, les hybrides sont capables d'effectuer une réparation. Par conséquent, pour tous les patients testés, le phénotype [XP] est récessif par rapport au phénotype [non atteint]. Ceci est attendu étant donné que cette maladie a un mode de transmission récessif.

On peut donc réaliser un test de complémentation fonctionnelle.

Les hybrides cellulaires entre individus atteints de XP correspondent à un **test de complémentation fonctionnelle**. Si l'hybride présente une restauration des activités de réparation, alors les deux lignées cellulaires complètent : les deux patients n'ont pas de gènes mutés en commun.

Par contre, s'il n'y a pas restauration de la réparation, alors il n'y a pas complémentation : les deux patients ont au moins un gène muté en commun.

Ce tableau nous permet de définir des groupes de complémentation (c'est-à-dire regroupant des individus qui ne complètent pas entre eux) : Soit ici

I	II	III	IV	V	VI	VII
1	2	4	5	6	11	14
3	10	8	9	7	16	17
13		12		15		19
				18		

En conclusion, il y a au moins 7 groupes de complémentation fonctionnelle. Donc il y a AU MOINS 7 gènes impliqués dans le XP.

Ces gènes ont été nommés XPA à XPG (A, B, C, D, E, F, G).

Les procédés de clonage de ces 7 gènes ont été multiples et variés. Par exemple :

- 1) Transfert d'ADN génomique humain normal dans les cellules humaines de patients XP.

Puis on sélectionne les cellules ayant une meilleure résistance aux lésions UV. Ceci est possible en raison de la récessivité des allèles XP-. Néanmoins, la difficulté est que les cellules humaines intègrent difficilement de l'ADN de haut poids moléculaire.

C'est ainsi que XPA a été cloné.

- 2) On peut utiliser également comme ADN transformant, non pas de l'ADN génomique, mais une banque d'ADN complémentaire (ADNc : des ADN obtenus grâce à une reverse transcriptase en utilisant comme matrice les ARN messagers, c'est-à-dire des séquences dépourvues d'introns, et par conséquent plus courtes que les ADN génomiques correspondants).

C'est ainsi que XPC a été cloné.

- 3) Clonage par expression hétérologue, c'est-à-dire transfert d'ADNc humain sauvage dans des cellules de rongeurs déficientes pour la réparation de l'ADN.

- 4) Microinjection d'ARNm dans les cellules humaines déficientes en réparation de l'ADN.

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

Le gène XPA

Le gène XPA a été cloné **par complémentation fonctionnelle** 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 ?

Il existe plusieurs types de doigt de zinc. En règle générale, on trouve 4 acides aminés qui sont en interaction avec un atome de zinc. Les acides aminés impliqués sont soit des cystéines, soit une association de cystéine et d'histidine. L'atome de zinc sert à stabiliser la structure dans l'espace, qui va se présenter sous forme d'un doigt.

Les doigts de zinc se trouvent dans deux grands types de domaines fonctionnels :

- domaines de fixation à l'ADN (cas des doigts de zinc de type C2H2, C2C2, C6(Zn)2) ; on les trouve au niveau du domaine de fixation à l'ADN chez de nombreuses protéines effectuant un rôle de régulateur de la transcription.

- domaines d'interaction entre protéine (Il s'agit des LIM domaines (C3H4) ou des Ring domaines (C6)) ; dans ce cas ces motifs servent d'adaptateurs capables d'effectuer l'interaction entre différentes protéines.

- *Quelle pourrait être l'activité de XPA ?*

Par conséquent, on peut supposer que XPA va interagir soit avec de l'ADN, soit avec une autre protéine (ou bien avec les deux) et ceci via ces 2 doigts de zinc.

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.

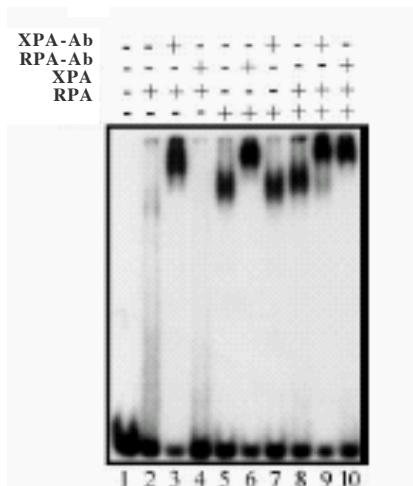


Figure 1 : Autoradiogramme. Les incubations ont été réalisées avec les protéines indiquées sur la figure et un fragment d'ADN double brin (41pb), contenant une seule lésion et marqué à son extrémité 5' avec du ^{32}P . Après incubation, les produits de la réaction ont été séparés sur gel de polyacrylamide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

Il s'agit d'une expérience de retard sur gel. Cette technique permet de mettre en évidence si une protéine se fixe ou non sur un fragment d'ADN précis. Ainsi s'il y a fixation de la protéine sur le fragment (autrement dit s'il y a formation d'un complexe ADN-protéine), alors ceci va avoir pour conséquence une augmentation de l'encombrement du fragment : déposé sur un gel de polyacrylamide, le complexe ADN-peptide migrera moins vite (donc moins loin) que le fragment seul (d'où le terme de « retard sur gel »). De plus, comme l'ADN utilisé est radioactivement marqué, alors le complexe ADN-protéine le sera également. Il suffit donc d'effectuer une autoradiographie (film autoradiographique appliqué sur le gel) pour visualiser à la fois l'ADN non complexé (on parle de sonde libre) et le complexe ADN-protéine.

Remarque : Lors des incubations réalisées avec les deux protéines, celles-ci sont préincubées ensemble, sans ADN à une température de 0°C, puis incubées 15 minutes en présence de l'ADN à température ambiante.

Il est important de toujours se poser la question du **but de l'expérience** (même si cela ne vous est pas explicitement demandé). Les auteurs de ce travail veulent savoir d'une part si chacune des protéines XPA ou RPA peut ou non se fixer (seule) sur l'ADN lésé, et d'autre part s'il y a ou non

formation d'un complexe ternaire associant XPA et RPA sur le même ADN. Et n'oubliez pas de rechercher les éventuels témoins positifs ou négatifs.

Analyse du gel :

- **Puits 1 = ADN seul.** Il s'agit du témoin, correspondant au fragment d'ADN seul, afin de connaître sa distance de migration lorsqu'il n'est pas perturbé (retardé) par la fixation d'une protéine.

- **Puits 2 = ADN + XPA.** On constate la présence d'un complexe, mais en très petite quantité (bande de très faible intensité en haut du gel). Par conséquent, il semblerait que la protéine XPA soit capable de se fixer à l'ADN sonde, mais avec une faible affinité ou bien le complexe est instable (en tout cas dans les conditions utilisées pour l'expérience).

- **Puits 3 = ADN + XPA + Ac anti-XPA.** On note un retard plus important avec une plus grande quantité d'ADN retardé (bande plus intense). Ce retard plus important est dû à la fixation sur le complexe ADN-XPA des Ac-AntiXPA, d'où un encombrement encore plus grand (et donc une migration encore plus lente). On parle de « **supershift** ». En présence des Ac anti XPA on observe une stabilisation possible du complexe ADN-XPA. Néanmoins, il faut vérifier que les Ac-AntiXPA ne se fixent pas seuls à l'ADN (voir plus loin).

- **Puits 4 = ADN + XPA + Ac anti-RPA.** **Aucun** retard n'est visible. Cela signifie que les Ac-anti-RPA ne se fixent pas sur l'ADN sonde ni sur l'éventuel complexe ADN-XPA. On en déduit une bonne spécificité des Ac anti-RPA puisqu'ils ne reconnaissent pas XPA.

- **Puits 5 = ADN + RPA.** On visualise une bande en haut du gel, assez intense. Par conséquent il y a eu formation d'un complexe ADN-RPA. Il semble que RPA se fixe mieux à l'ADN que XPA (en tout cas dans les conditions de l'expérience). Là encore, il s'agit soit d'une meilleure affinité, soit d'un complexe plus stable.

- **Puits 6 = ADN + RPA + Ac anti-RPA.** On note un retard plus important avec une bande assez intense. Ce complexe migre moins vite que le précédent en raison de la fixation sur le complexe ADN-RPA des Ac-Anti RPA, d'où un encombrement plus grand (**Supershift**).

- **Puits 7 = ADN + RPA + Ac anti XPA.** Le retard est identique à celui observé puits 5 (même intensité et même distance de migration). Cela indique qu'il n'y a pas eu fixation des Ac-Anti XPA ni sur l'ADN ni sur le complexe ADN-RPA. Autrement dit, les Ac anti-XPA ont eux aussi une bonne spécificité et ne présentent pas de réaction croisée avec RPA. Cela répond à notre interrogation en puits 3.

- **Puits 8 = ADN + XPA + RPA :** Présence d'un retard, le complexe migre moins vite que le précédent (super shift). Ceci indique qu'il y aurait un complexe ADN-RPA-XPA. Néanmoins, on ne peut pas conclure directement.

- **Puits 9 = ADN + XPA + RPA + Ac-antiXPA.** Présence d'un retard plus important que le précédent (celui du puits 8). Cela indique que nous avons fixation sur le complexe ADN-protéine(s) des Ac-Anti XPA, et par conséquent que ce complexe contient la protéine XPA (dont cet Ac est spécifique comme nous l'avons déduit du puits 7).

- **Puits 10 = ADN + XPA + RPA + Ac-antiRPA.** Présence d'un retard plus important que dans le puits 8. Cela indique que nous avons fixation sur le complexe ADN-protéine des Ac-Anti RPA, et par conséquent que ce complexe contient la protéine RPA (dont cet Ac est spécifique comme nous l'avons déduit du puits 4).

Remarque : on pourrait imaginer deux possibilités. **Soit, cas a**, les deux protéines interagissent sur le même ADN, **soit, cas b**, on a des exemplaires de l'ADN sonde qui sont fixés à RPA et d'autres exemplaires de ce même ADN sonde fixés à XPA. Toutefois, nous pouvons aisément trancher en faveur de l'hypothèse a puisque nous n'observons qu'une seule bande de retard en présence des deux protéines, alors que l'hypothèse b conduirait à la présence de deux bandes.

L'utilisation des Anticorps permet par conséquent de mettre en évidence la présence de la protéine d'intérêt dans le complexe. Ainsi grâce aux Ac anti-RPA ou anti-XPA, nous mettons en évidence

l'existence d'un complexe ternaire ADN+XPA+RPA. De plus, il semble que les Ac anti-XPA permettent une stabilisation du complexe ADN-XPA (comparaison des puits 2 et 3).

Surtout n'oubliez pas de conclure !

Conclusion :

- Fixation de XPA sur l'ADN, mais avec une faible affinité et/ou mauvaise stabilité.
- Fixation de RPA sur l'ADN, avec une meilleure affinité (et/ou stabilité) par rapport à XPA
- Formation d'un complexe ternaire comprenant ADN, XPA et RPA (puits 8, 9, 10).

Il manque deux témoins.

D'une part, il manque le contrôle correspondant à l'utilisation d'un ADN non porteur d'une lésion (on ne sait donc pas si cette fixation se fait spécifiquement sur un ADN lésé ou non).

D'autre part, il manque un contrôle avec juste l'ADN plus les anticorps pour être absolument certain qu'il n'y a pas de fixation des Ac sur l'ADN. (On a quand même un résultat allant dans ce sens mais c'est indirect).

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 $[\gamma^{32}\text{P}]$ 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.

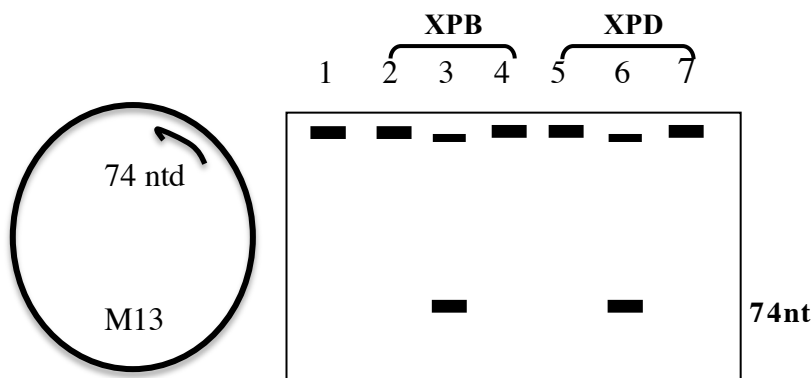


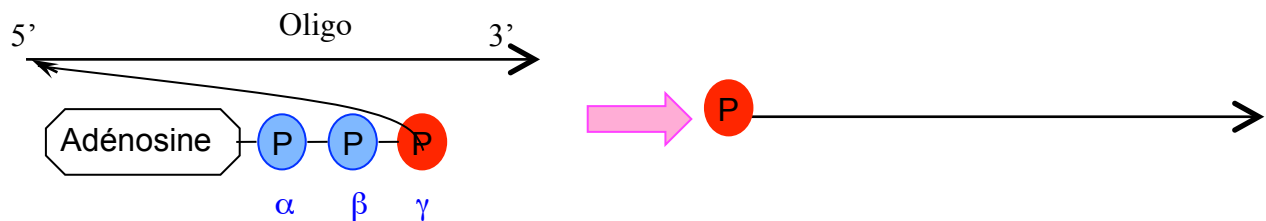
Figure 2 : Autoradiogramme
 Puits 1: Aucune protéine n'est ajoutée au mélange.
 Puits 2-4: 20 ng de XPB sont ajoutés au mélange.
 2) La réaction est arrêtée après 3 min.
 3) La réaction est arrêtée après 40 min.
 4) Pas d'ATP présent dans le mélange.
 Puits 5-7 : 20 ng de XPD sont ajoutés au mélange.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

Marquage à la polynucléotide kinase de l'oligonucléotide

La polynucléotide kinase (PNK) en présence d'ATP $[\gamma^{32}\text{P}]$, va prendre le dernier groupement phosphate (celui en position γ , et donc celui qui est radioactif) de l'ATP et le fixer en 5' de l'oligo.

Attention : Avec un oligo, contrairement à un fragment d'ADN linéaire classique (obtenu par exemple par digestion), il n'est pas utile d'effectuer une étape de déphosphorylation avec une phosphatase, car ces molécules synthétiques ne sont pas phosphorylées !



La molécule ainsi marquée ne le sera donc qu'en 5' uniquement.

N.B. : cette technique de marquage peut se faire également sur un ADN double brin, mais après sa déphosphorylation par une phosphatase).

Analyse du protocole :

Un oligonucléotide, complémentaire d'une région du phage M13 a été marqué radioactivement au niveau de son extrémité 5'.

Cet oligonucléotide est mis en présence d'un ADN circulaire simple brin du phage M13. Il va y avoir formation de la structure présentée Figure 2, par hybridation de l'oligonucléotide sur l'ADN du phage M13.

Après migration, le gel est analysé par autoradiographie : autrement dit on ne visualisera que les molécules d'ADN marqué. Deux types de molécules peuvent donc être révélées : soit l'ADN M13 hybridé à l'oligonucléotide (puits 1) soit l'oligonucléotide seul (non hybridé, qui dans ce cas, migrera en fonction de sa taille).

Puis la protéine XPB ou XPD est ajoutée. Au bout de 3 min, on n'observe aucun changement par rapport au puits témoin 1. Par contre au bout de 40 min, une nouvelle bande est mise en évidence à 74 nt. Il s'agit de l'oligonucléotide seul, non fixé sur l'ADN du phage M13. Par conséquent en présence de XPB ou de XPD et d'ATP, on libère au bout de 40 min d'incubation l'oligonucléotide. Toutefois, on peut noter que la réaction est partielle puisqu'il reste encore de l'oligonucléotide hybridé sur certaines molécules d'ADN M13 (cf. bande révélée en haut du gel mais d'intensité moindre si on compare avec le signal détecté puits 1).

Par contre en l'absence d'ATP, il n'y a pas de libération de l'oligonucléotide, ce qui se traduit par une bande de haut poids moléculaire et de forte intensité (identique à celle du puits 1).

Conclusion :

En présence d'ATP, ces deux protéines sont capables de "deshybrider" l'oligonucléotide fixé sur l'ADN M13. Il pourrait donc s'agir de protéines ayant une activité de type **hélicase**.

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 $[\gamma^{32}\text{P}]$ 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.

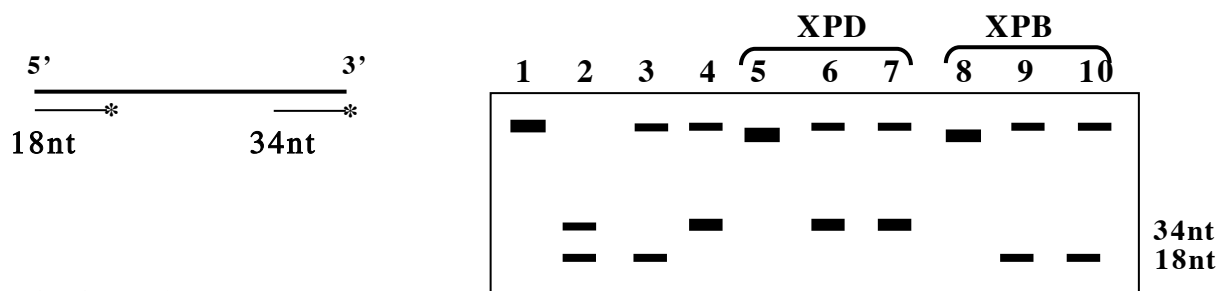


Figure 3 : Autoradiogramme

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 ?

Le but de cette expérience est dans un premier temps de voir si la molécule d'ADN "hybride" ainsi créée, linéaire et partiellement double brin, est bien un substrat pour nos deux hélicases XPB et XPD. (But à identifier avant de répondre, analyse rapide du déroulé de l'expérience, recherche de témoins négatifs et positifs)

Analyse des résultats

Le principe est le même que précédemment. Ce qui est révélé sur l'autoradiogramme correspond aux oligos marqués, donc trois molécules sont visualisables : l'hybride (ADN M13 + au moins un des deux oligo, voire les deux), et chacun des deux oligos individuellement (puisque'ils sont de taille différente).

- **Puits 1** : Aucune protéine n'a été ajoutée. On visualise uniquement une bande de grande taille, correspondant à l'ADN M13 hybridé avec les deux oligos. **Témoin négatif.**

- **Puits 2** : Aucune protéine n'a été ajoutée, mais l'ADN a été chauffé à 95°C. Ceci aboutit à la dénaturation de la molécule hybride, avec séparation de l'ADN M13 et des deux oligo. Par conséquent, on voit uniquement deux bandes radioactives correspondant respectivement aux oligos de 34 et 18 nt (c'est-à-dire les deux oligos libres). L'ADN de haut poids correspondant à l'ADN du M13 n'est plus révélé, n'étant plus hybridé avec les oligo radioactifs. **Témoins de migration des deux oligonucléotides libres.**

- **Puits 3** : 50 ng de la protéine UvrD. Il s'agit d'une activité hélicase agissant de 3' vers 5'. On constate l'apparition d'une bande à 18 nt, traduisant la libération du petit oligonucléotide. Il s'agit également d'un témoin permettant de s'assurer que le système utilisé permet de visualiser une activité hélicase 3' -> 5'.

- **Puits 4** : 50 ng de la protéine RAD3. Il s'agit d'une activité hélicase agissant de 5' vers 3'. On constate l'apparition d'une bande à 34 nt, traduisant la libération du grand oligonucléotide. Il s'agit également d'un témoin permettant de s'assurer que le système utilisé permet de visualiser une activité hélicase 5' -> 3'.

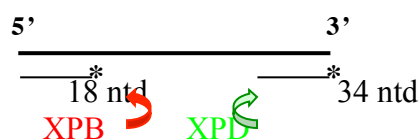
- **Puits 5 à 7** : Quantité croissante de protéine XPD. On constate comme avec RAD3, qu'il y a libération de l'oligo de 34 ntd. **Par conséquent, XPD a comme RAD3 une activité hélicase agissant de 5' vers 3'.**

- **Puits 7 à 10** : Quantité croissante de protéine XPB. On constate comme avec UvrD, qu'il y a libération de l'oligo de 18 ntd. **Par conséquent, XPB a comme UvrD une activité hélicase agissant de 3' vers 5'.**

On voit ici l'intérêt des deux hélicases témoins (RAD3 et UvrD), car elles ont servi de témoin permettant d'identifier sans ambiguïté le sens de l'activité hélicase de XPB et XPD.

Conclusion :

XPD a donc une activité Hélicase allant de 5' vers 3' et XPB une activité Hélicase allant de 3' vers 5'.



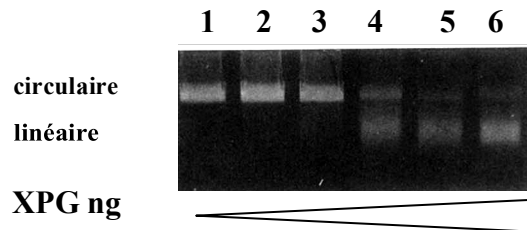
Leur rôle dans le NER consiste à dérouler la double hélice de part et d'autre de la lésion de façon à ce que les autres protéines impliquées dans le processus de réparation puissent se positionner et à faciliter l'élimination du morceau simple brin porteur de l'altération.

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.



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 ?

Analyse de la figure 4

- Puits 1 : ADN circulaire simple brin du phage M13. Témoin de migration.

- Puits 2 à 6 : Incubation en présence de quantité croissante de protéine XPG. On remarque qu'à partir du puits 4, le profil de l'ADN change. D'après la légende, il s'agirait de la forme linéaire du M13 simple brin. Surtout après cette description rapide ; ne vous arrêtez pas là, il faut analyser puis conclure.

Donc la présence de la protéine induit la transformation de l'ADN circulaire en ADN linéaire. Ceci implique que cet ADN a été coupé en présence de XPG. **Donc XPG est une nucléase.**

Le fait d'avoir utilisé comme substrat un ADN circulaire permet de mettre en évidence que cette nucléase est **une endonucléase** et non une exonucléase.

Attention, il s'agit ici d'une activité endonucléase qui a pour substrat un ADN simple brin. On ignore si elle fonctionne sur du double brin.

Le témoin qui manque dans cette expérience est un ADN M13 linéaire pour pouvoir comparer avec les puits 4 à 6 et non simplement faire confiance à la légende.

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.

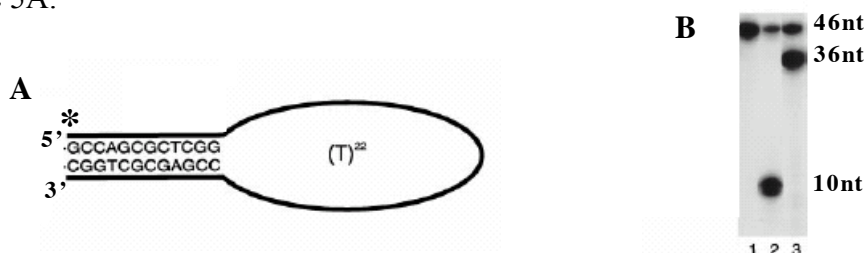


Figure 5 :

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.

Analyse de la figure 5

Avant d'aller plus loin on effectue une analyse rapide de l'expérience (qu'est ce qui est observé, pourquoi et dans quel but).

Il s'agit d'un autoradiogramme. Par conséquent on révèle uniquement les fragments radioactifs, c'est-à-dire **les fragments qui possèdent le marquage en 5'**.

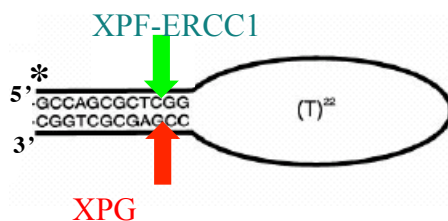
Le but de cette expérience est de voir où ces différentes protéines vont couper cet ADN substrat.

- **puits 1** : ADN seul, témoin, on révèle une bande de 46 nt, correspondant à l'oligo intact, mais dénaturé (car il s'agit d'un gel dénaturant).

- **puits 2** : ADN + XPF-ERCC1, on révèle une bande de 10 nt. Cela indique que XPF-ERCC1 coupe à 10 nt de l'extrémité marquée de l'oligo (et donc de son extrémité 5'), soit 2 pb avant la région simple brin (sur le brin supérieur : voir flèche verte sur le schéma ci-dessous)

- **puits 3** : ADN + XPG, on révèle une bande de 36 nt. Cela indique que XPG coupe à 36 nt de l'extrémité marquée de l'oligo (et donc de son extrémité 5'), soit 2 pb après la région simple brin (sur le brin inférieur ; voir flèche rouge sur le schéma ci-dessous)

Soit : Ne jamais hésiter à faire un schéma, parfois plus explicite qu'un long texte.



Par conséquent, le complexe XPF-ERCC1 coupe le brin juste 2 nucléotides avant la région simple brin (non appariée). Par contre XPG coupe le brin juste 2 nucléotides après la région simple brin.

L'action conjointe des deux (XPF-ERCC1 et XPG) va donc permettre de couper le brin en amont et en aval de la région simple brin, ce qui permet d'exciser ce fragment.

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

Voir transparent avec schéma du NER chez l'homme (cours). Il faut bien sûr là connaître son cours !

Le dimère de pyrimidine crée un dommage "protubérant" sur l'ADN. Il peut-être reconnu par deux mécanismes :

- soit la réparation globale du génome impliquant une reconnaissance de la lésion par les complexes DDB1-XPE et XPC-hHR23B ; ce dernier se fixe sur le brin lésé au niveau de la lésion.

- soit la réparation couplée à la transcription ; en effet, la présence du dimère de pyrimidine va bloquer l'avancement de l'ARN polymérase, qui va quitter la matrice après action des protéines CSA et CSB.

Les deux voies se rejoignent pour la suite du processus. Au niveau de la lésion, il va y avoir fixation de XPA et de RPA, XPA étant localisée sur le brin lésé. RPA va ouvrir la double hélice au niveau de la lésion (son activité étant inhibée par XPA, qui limite l'ouverture). La dénaturation locale de la

double hélice est facilitée par les hélicases XPD et XPB, qui sont associées à TFIIH, et qui vont permettre l'ouverture de part et d'autre de la lésion.

Puis, il y aura fixation du complexe XPF-ERCC1 en amont de l'ouverture de la double hélice, et celle de XPG en aval. Ces deux endonucléases vont alors effectuer une coupure simple brin, qui va permettre de libérer un fragment d'ADN long de 27 à 29 nt et contenant le dimère de pyrimidine.

Enfin, il y aura re-synthèse de la portion manquante par les ADN pol δ/ϵ , et action de la ligase, qui refermera la coupure simple brin.

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. (Cf TD n°5)

Le processus de réparation par synthèse translésionnelle intervient au moment de la réplication de l'ADN endommagé. La présence de lésion sur l'ADN bloque l'avancement de l'ADN polymérase impliquée dans la réplication "normale" de l'ADN (avec polymérase δ pour le brin précoce, pol ϵ pour le brin tardif, et pol α pour les amorces). La pause de la fourche de réplication induit l'échange de la polymérase classique par des polymérases spécialisées (pol Zêta ζ à Kappa κ). Ces polymérases sont plus flexibles vis-à-vis de l'appariement entre les bases, ce qui leur permet de poursuivre la synthèse au niveau du blocage. Il semble, qu'il y ait une spécialisation en fonction du type de lésion : un type de lésion précis est "translu" par une polymérase précise. Une fois le blocage passé, la polymérase classique reprend sa place.

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 :

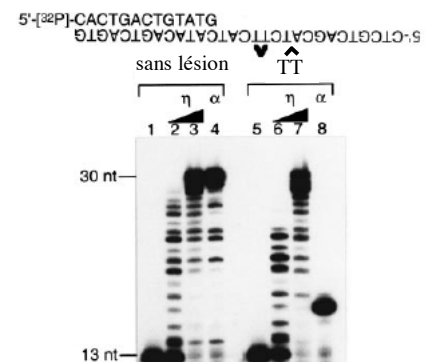
La matrice amorcée utilisée est présentée au-dessus du gel : il s'agit d'un oligonucléotide 30mer hybridé à un oligonucléotide 13mer marqué en 5' par du ^{32}P . Le 30mer est soit sans lésion (puits 1 à 4), soit porteur d'un dimère de thymine (indiqué par \blacktriangle , puits 5 à 8). Après une incubation 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 .

Comme d'habitude, on analyse rapidement l'expérience effectuée, et ce qui va être observé afin de trouver le but de l'expérience. Sans oublier éventuellement les témoins négatifs ou positifs. Il s'agit d'un gel dénaturant, par conséquent les deux brins vont être séparés, mais seul l'oligonucléotide marqué en 5' sera visible, et on pourra constater s'il a été ou non allongé.

Puits 1 et 5 : il s'agit de témoins négatifs (sans polymérase), ce qui permet de connaître la distance de migration du brin amorce de 13 nucléotides.

Puits 4 : incubation dans le cas d'une matrice sans lésion en présence de la polymérase α (polymérase impliquée dans la réplication, synthèse des amorces). On peut voir que le brin amorce a été complètement allongé, le produit final fait 30 nucléotides comme le brin matrice.

Puits 8 : incubation d'une matrice porteuse d'une lésion en présence de la polymérase α . On peut constater que le brin amorce n'a pas été complètement allongé, seuls trois nucléotides ont été ajoutés. Or ceci correspond à la distance entre la fin de l'amorce et le dimère de thymine. Ainsi, la polymérase α n'est pas en mesure d'effectuer une synthèse translésionnelle.

- Même question avec la protéine hXPV. - Que peut-on conclure quant à l'activité de cette protéine ?

Puits 2 et 6 : incubation en présence hXPV. Dans les deux cas, on peut voir que le brin amorce a été complètement allongé (le produit final fait 30 nucléotides comme le brin matrice). Ainsi, avec ou sans lésion sur le brin matrice, la protéine XPV est capable de réaliser la synthèse du brin complémentaire. Elle est donc capable de synthèse translésionnelle, même si elle est moins processive que la polymérase α (plus d'arrêts de synthèse).

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 ?

Nous avons vu que les individus atteints de XP-V sont mutés au niveau du gène codant la polymérase XPV (ou pol η). En cas d'exposition aux UV, il y a introduction de dimère de thymine dans l'ADN des cellules les plus exposées : les cellules de la peau. Au moment de la réplication, ces lésions vont bloquer les fourches de réplication. En l'absence chez ces individus atteints de XP-V, de polymérase XPV fonctionnelle, d'autres polymérases vont prendre le relais comme la polymérase iota ou la polymérase zêta. Or contrairement à la polymérase η (pol η), laquelle est spécialisée dans la synthèse translésionnelle des dimères de thymines, ces deux polymérases font beaucoup d'erreurs, d'où l'introduction de mutations à un taux plus élevé, et l'augmentation du taux de cancers.