

RÉPARATION DE L'ADN

Un processus d'importance cruciale

Il existe trois grandes classes de macromolécules dans les cellules vivantes : l'ADN, les ARN et les protéines. Ces macromolécules peuvent subir des lésions de diverses natures par suite d'interactions avec leur environnement (endogène ou exogène). Ces lésions sont inévitables car la cellule produit elle-même certains des agents réactifs responsables de ces altérations, en particulier des espèces réactives de l'oxygène lors de la respiration.

Dans de nombreux cas, ces lésions altèrent la fonction de la protéine ou de l'acide nucléique qui en est victime.

Que faire de ces molécules endommagées ?

Pour les protéines et les ARN, la solution est simple, la cellule les détruit et recycle les monomères. Des complexes de ribonucléases ou de protéases se chargent de digérer les molécules altérées. Protéines et ARN sont donc des molécules «**jetables**», qui sont remplacées quand elles sont hors d'usage.

Pour l'ADN, c'est complètement différent, c'est en effet la seule molécule de la cellule qui n'est pas **remplacée** mais systématiquement **réparée** lorsqu'elle subit des dommages. On mesure l'importance de la molécule d'AND qui est le réceptacle de l'information génétique. Préserver son intégrité est un enjeu majeur pour la cellule.

L'importance de ce processus biologique, de réparation, peut se voir de plusieurs manières:

- ▶ C'est un processus pratiquement **universel**, tous les types d'organismes vivants partageant des mécanismes communs de réparation de l'ADN
- ▶ Plus d'une centaine de gènes est impliquée dans la réparation de l'ADN au sens large. Ceci correspond à une fraction importante du génome des organismes vivants.
- ▶ Les mutations altérant le fonctionnement des mécanismes de réparation de l'ADN sont responsables de pathologies génétiques graves et sont souvent associées à la survenue de cancers précoces.

Les mécanismes de réparation

Face à la profusion des types de lésions et de défauts dans la structure de l'ADN, les cellules vivantes ont développé un ensemble de mécanismes de réparation d'une grande sophistication. Pas moins de **six différentes voies** existent pour réparer l'ADN. Ces mécanismes sont partiellement redondants, certaines lésions pouvant parfois être prises en charge par plusieurs systèmes de réparation différents, suivant les conditions. Même s'il existe des variations, ces six mécanismes de réparation sont présents et conservés dans tous les embranchements du vivant.

Les six systèmes de réparation sont :

La **réversion directe** de la lésion.

La réparation par **excision de base** (Base excision repair ou **BER**)

La **réparation des mésappariements** (Mismatch repair ou **MMR**)

La réparation par **excision de nucléotides** (Nucleotide excision repair ou **NER**)

La réparation par **recombinaison homologue**

La **suture d'extrémités non-homologues** (Non-homologous end joining ou NHEJ)

Le mécanisme choisi pour la réparation d'une lésion donnée dépend de la nature de celle-ci. Les deux derniers, par exemple, prennent en charge les cassures de l'ADN.

I. La réparation directe

La réparation directe ou réversion recouvre un ensemble de mécanismes qui permettent de défaire ou de retirer la lésion sans nécessiter de synthèse à nouveau de l'ADN. La cellule défait simplement ce qui a été fait à l'ADN.

La plupart des autres mécanismes de réparation, à part le Non-homologous end joining, impliquent au contraire **l'élimination de la région endommagée** qui est ensuite **resynthétisée** par une **ADN polymérase**. La réparation directe ne concerne que des lésions simples et implique une enzyme spécialisée pour chaque type de lésion. C'est un mécanisme coûteux, puisqu'il faut une protéine et donc un gène ad hoc pour chaque cas particulier. Ca ne concerne donc que des lésions très fréquentes qui peuvent justifier un mécanisme spécifique.

I.a. Réparation des dimères de thymine

Le principal mécanisme de réparation directe est celui qui traite les dimères de thymine (ou de pyrimidines). Une enzyme spécialisée, la **CPD-photolyase** (**c**yclobutane **p**irimidine **d**imer **p**hotolyase) utilise la lumière pour ouvrir le cycle cyclobutane, formé entre les deux thymines. Un photon est capté par un premier chromophore (un dérivé de la flavine ou du folate, suivant les espèces) qui va activer un second chromophore, le FADH, dans le site actif. Le FADH activé va alors donner un électron au dimère de pyrimidine pour ouvrir le cycle cyclobutane. A la suite d'un réarrangement des liaisons, le cyclobutane s'ouvre, les thymines sont régénérées et l'électron est rendu à la flavine.

Les cellules qui subissent la formation de dimères de thymine sont nécessairement exposées à la lumière puisque cette lésion est causée par les UV. Ainsi la CPD-photolyase peut toujours trouver les photons nécessaires à son activité. C'est par la lumière qu'est réparée une lésion causée par la lumière.

Les mammifères placentaires (et donc l'homme), **n'ont pas de CPD-photolyase** et réparent ces lésions par une autre voie, ce qui illustre le caractère redondant des différents mécanismes de

réparation. En revanche on trouve cette enzyme chez la plupart des autres animaux, y compris les mammifères marsupiaux, chez les plantes et chez les procaryotes.

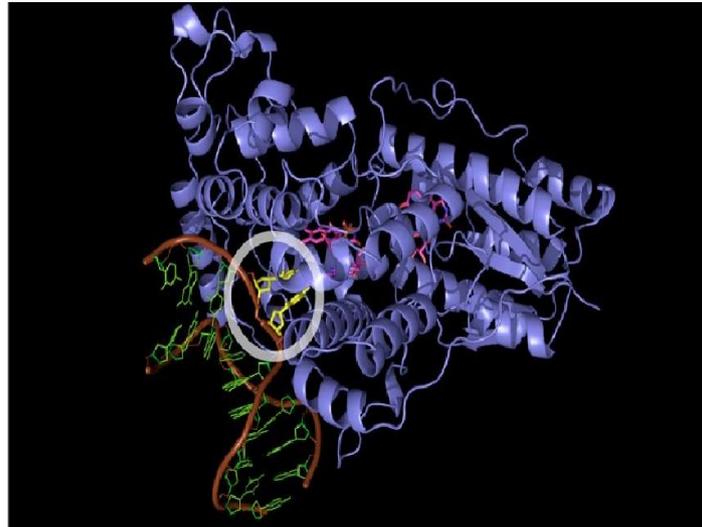


Figure 3.10 : Structure d'une CPD-photolyase avec son substrat. Les deux chromophores sont en mauve. Remarquez le dimère de thymine (entouré, en jaune) qui est basculé à l'extérieur du duplexe d'ADN, dans le site actif.

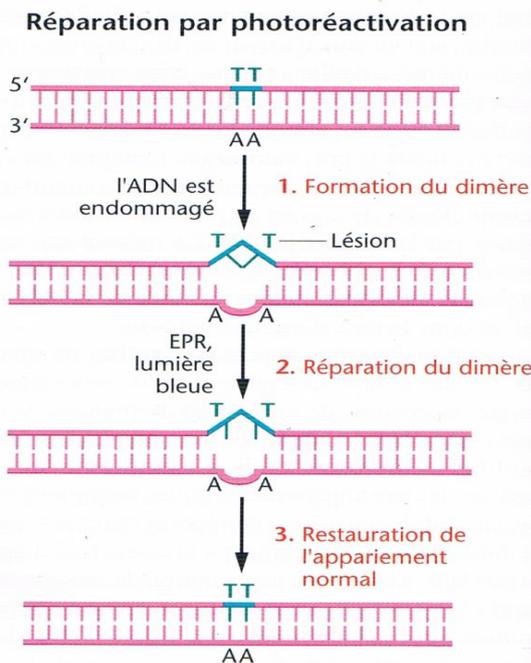


FIGURE 15.15 Réparation des dimères de thymine par photoréactivation. La liaison créant le dimère de thymine clivée par l'enzyme de photoréactivation (EPR), laquelle c être activée par la lumière bleue du spectre visible.

I.b. Déméthylases

On connaît également quelques enzymes qui sont capables de «**déméthyl**er» des bases de l'ADN qui ont été méthylées par des agents alkylants. La principale est **AlkB**, une enzyme bactérienne qui catalyse une la **déméthylation** oxydative de la méthyl-1-**adénine** et de la méthyl-3-**cytosine**

Les positions 1 de l'adénine et 3 de la cytosine correspondent à l'atome d'azote du cycle qui est impliqué dans la formation d'une liaison hydrogène dans l'appariement Watson-Crick. Cette méthylation empêche donc la formation de cet appariement.

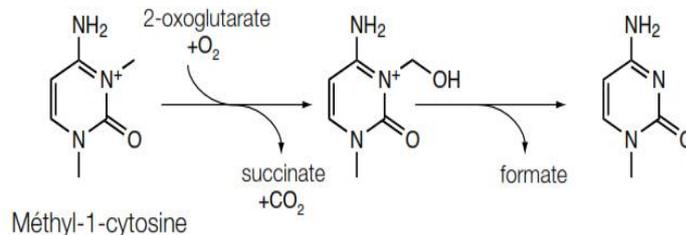


Figure 3.11 : Mécanisme de déméthylation du m¹C par AlkB.

AlkB n'enlève pas directement le méthyle mais l'hydroxyle pour faciliter son départ du cycle sous forme de formate.

L'enzyme couple cette hydroxylation à la transformation de 2-oxoglutarate en succinate, suivant le schéma indiqué sur la figure au dessus. La base initiale (A ou C) est régénérée à l'issue de la réaction.

II. Réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de base est un processus qui permet de remplacer dans l'ADN une base endommagée. La BER se charge de réparer les uraciles (dU) produits par **désamination** des cytosines, les purines méthylées ainsi que les bases ayant subi des **lésions oxydatives** (8-oxo-G et T-glycol). Elle permet aussi de réparer les sites abasiques produits par exemple par **dépuration**

Mécanisme

La réparation par excision de base se déroule en **quatre étapes**, la première est spécifique du type de lésion et les trois suivantes sont communes, quel que soit le type de lésion :

- **Excision** de la base modifiée.
- **Coupure** de la chaîne phosphodiester en 5'.
- **Polymérisation** par une ADN polymérase spécifique
- **Suture** de la chaîne phosphodiester par une ADN ligase

Excision

La première étape est la reconnaissance de l'altération. Chaque type d'altération possède un système de reconnaissance qui lui est propre. Ainsi par exemple la présence d'un uracile dans le DNA, qui résulte de la désamination d'une cytosine, est reconnue par l'**uracile-ADN N-glycosylase** qui l'excise. Il existe ainsi des dizaines de glycosylases capables de détecter la plupart des altérations. Elles se répartissent en deux types; celles du premier type se contentent de retirer la base sans altérer ni le désoxyribose ni la liaison phosphodiester entre le désoxyribose et le phosphate (coupure

de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose). Ce sont les **glycosylases classiques** qui, en générale reconnaissent les bases alkylées mais **pas** les bases oxydées. Ces derniers (les lésions oxydatives (8-oxo-G, T-glycol) sont reconnues par un second type de glycosylases qui possèdent en plus une **activité lyase**, la quelle réalise une coupure entre le sucre et le phosphate en 3' du désoxyribose qui a perdu sa base (la coupure est réalisée entre un carbone et un oxygène et non entre un oxygène et un phosphate d'où l'appellation lyase et non endonucléases), il en résulte un sucre altéré avec un réarrangement des liaisons et une réduction du désoxyribose.

Quelle que soit le type de glycosylase utilisée, le résultat est l'excision de la base altérée qui conduit à un **site abasique AP** (pour APurinique ou APyrimidinique).

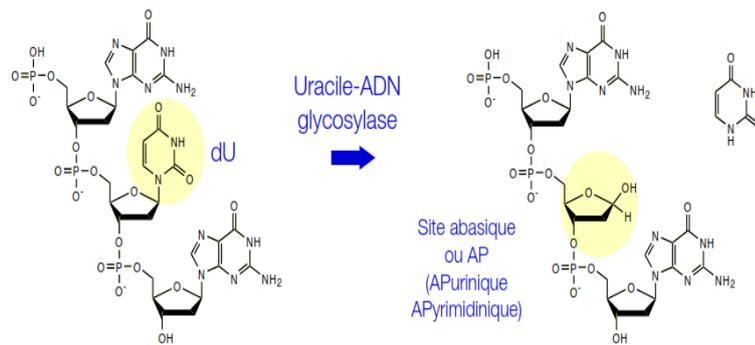


Figure 3.12 : Excision d'un uracile par l'uracile-ADN glycosylase.

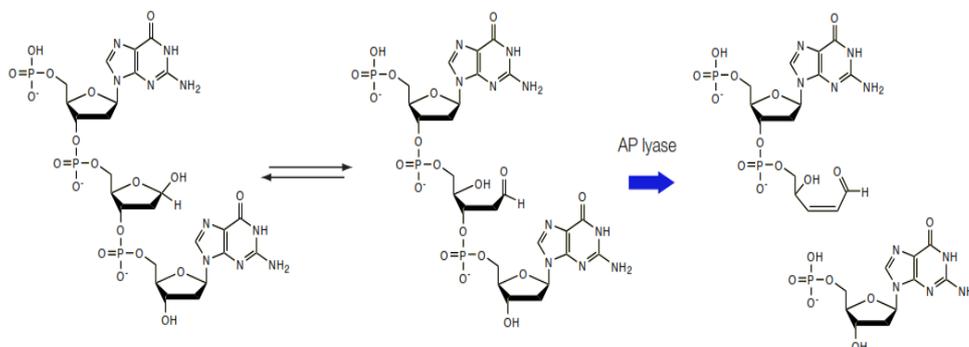


Figure 3.13 : Activité AP lyase portée par certaines ADN glycosylases

Coupure

La chaîne phosphodiester est coupée en 5' du site abasique. Cette étape est réalisée par l'**AP endonucléase**. Si le site abasique (ou AP) a été généré par une ADN glycosylase possédant aussi une activité lyase, ceci aboutit à l'excision du désoxyribose qui portait la base modifiée puisque la lyase a déjà clivé du côté 3'. Dans le cas contraire le désoxyribose reste attaché au brin situé en aval de la coupure. Dans tous les cas, l'AP endonucléase libère une extrémité 3'-OH juste en amont du site abasique.

Lors de la réaction catalytique, l'AP endonucléase reconnaît le désoxyribose qui bascule hors de l'hélice, comme dans le cas des CPD-photolyases. Le caractère flexible et dynamique de la double hélice que nous avons vu est donc un élément déterminant des mécanismes de réparation.

Polymérisation

L'étape de polymérisation permet de resynthétiser le nucléotide manquant en utilisant la séquence du brin non-endommagé comme matrice. L'extrémité 3'-OH libérée par l'AP endonucléase sert de point de démarrage à la polymérisation. Ceci permet d'utiliser les mécanismes classiques de synthèse d'ADN dans le cadre du processus de réparation.

Deux voies sont possibles, la synthèse **courte** (pour réparer les sites abasiques créés par glycosylase classique) ou la synthèse **longue** (pour réparer les sites abasiques créés par glycosylase avec activité lyase). Le type de voie dépend de la nature de l'ADN polymérase qui est recrutée sur la lésion. Dans la première voie, le sucre abasique est éliminé grâce à l'activité exonucléase de l'ADN polymérase β . Il en résulte une brèche d'un nucléotide qui est comblée par la même polymérase. L'ADN polymérase β est peu processive et synthétise donc un segment d'ADN très court, souvent un seul nucléotide, correspondant à la lésion.

Dans la seconde voie, c'est la polymérase répliquative (**ADN polymérase δ**) qui prend charge la synthèse. Celle-ci étant processive, il y a synthèse d'une dizaine de nucléotides avec déplacement du brin en aval de la coupure créée par l'AP endonucléase. Ce déplacement crée une structure appelée flap avec une région partiellement simple-brin. Ce flap est ensuite excisé par une nucléase spécifique, l'endonucléase de flap

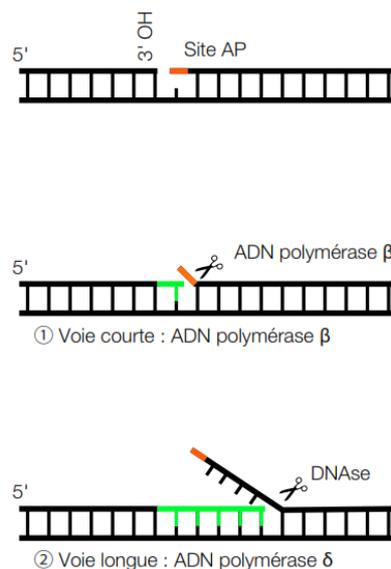
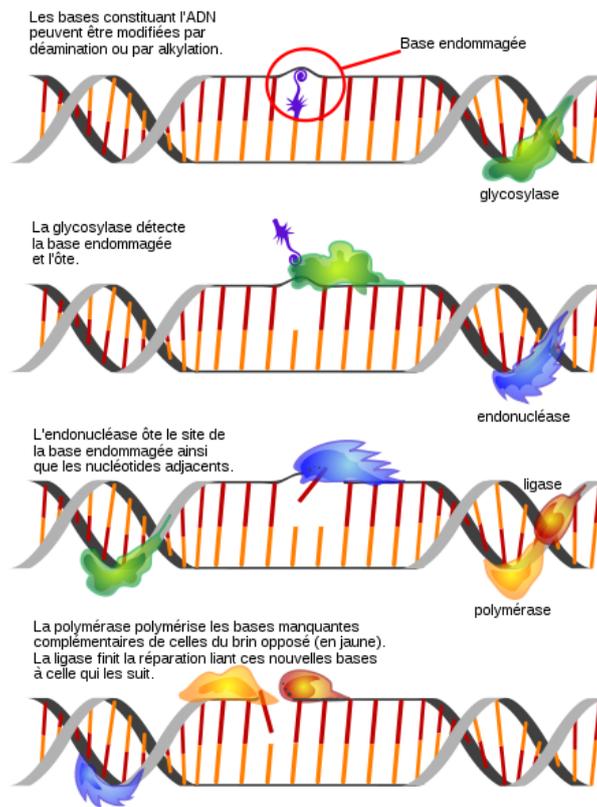


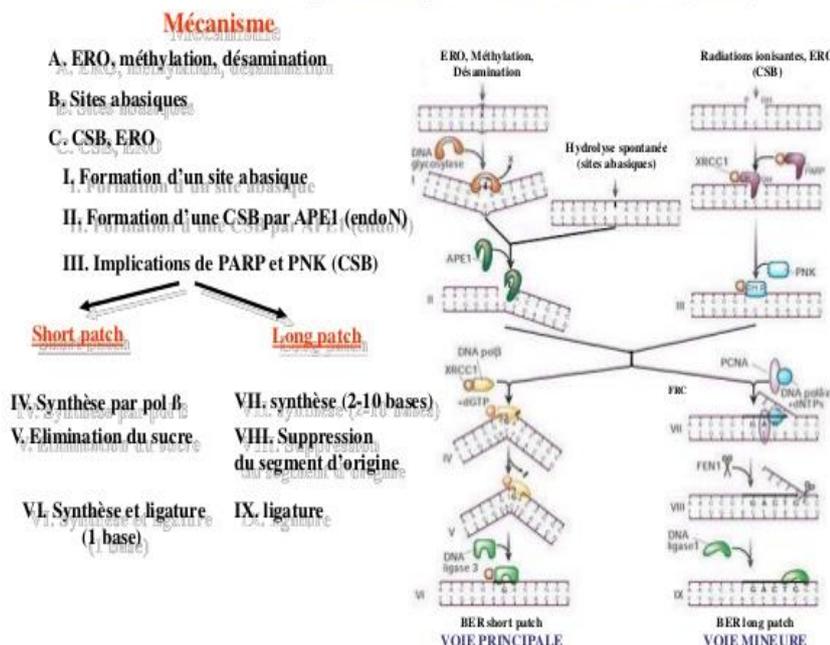
Figure 3.15 : Mécanisme de la BER. En haut, le site abasique après action de l'ADN glycosylase et de l'AP endonucléase. La base a été excisée, il reste le désoxyribose (rouge) et le brin a été clivé juste en amont. Dans la voie courte, la polymérase synthétise juste un nucléotide (en vert), dans la voie longue, une dizaine de nucléotides sont synthétisés et on a formation d'un flap

Ligature (ou suture) des brins

A l'issue de ces étapes, un brin d'ADN contenant la séquence réparée a été produit mais il reste une discontinuité (un trou) dans le squelette phosphodiéster du brin réparé. L'ADN ligase permet de combler ce défaut en suturant les deux cotés du brin. Ce processus est tout à fait analogue à ce qui se passe lors de la réplication pour la jonction des fragments d'Okazaki.



3.2.1. Réparation par excision des bases (BER)



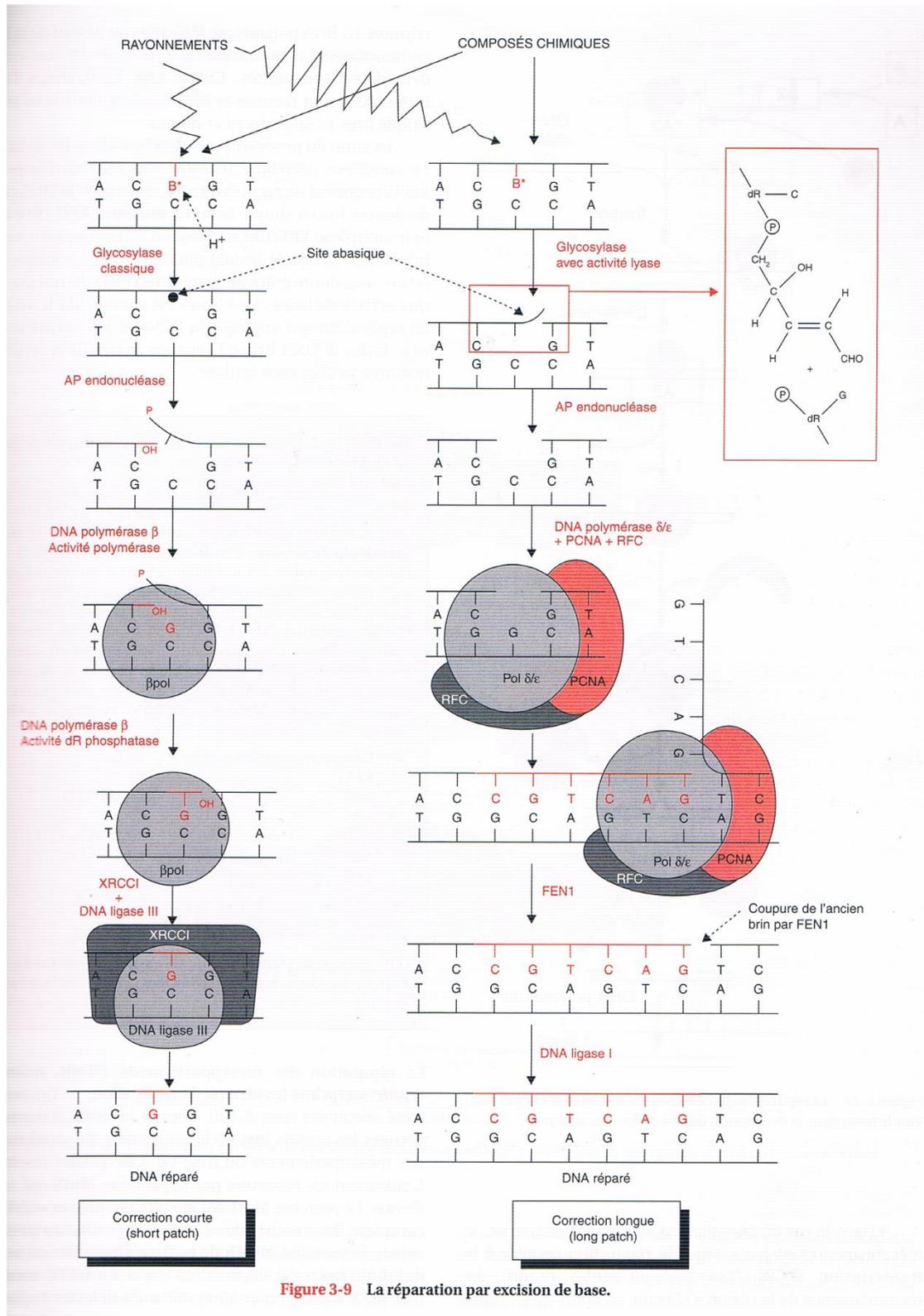
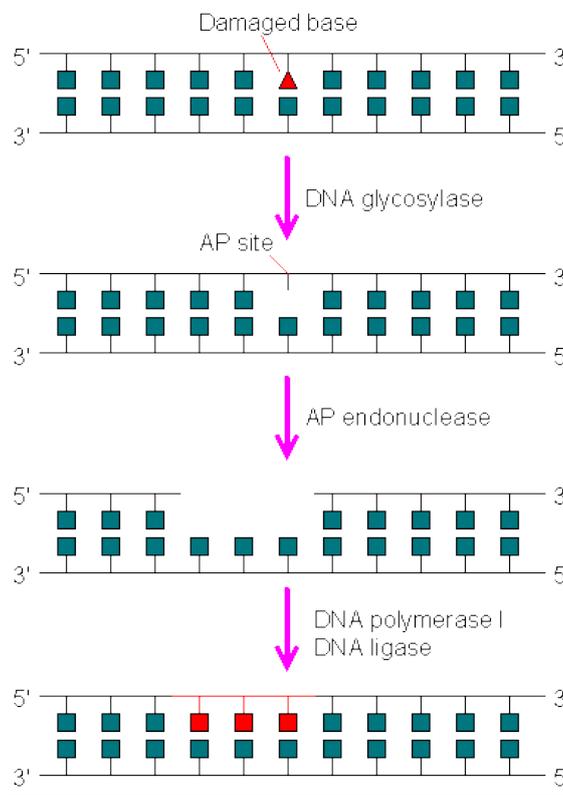
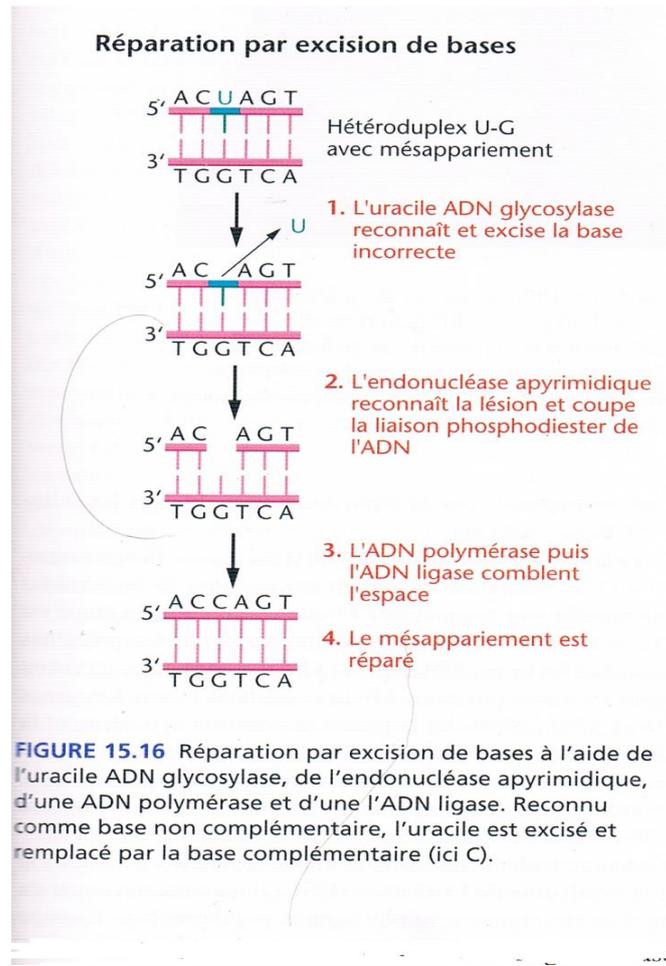


Figure 3-9 La réparation par excision de base.



III. Réparation des mésappariements (MMR)

Les mésappariements sont des sites de la double hélice d'ADN où les deux nucléotides en vis-à-vis ne forment pas une paire Watson-Crick (A-T ou G-C), le plus souvent par suite d'une erreur de l'ADN polymérase lors de la réplication du chromosome. On a vu précédemment que malgré le mécanisme de correction dont disposent les ADN polymérases répliquatives, le taux d'erreur reste de l'ordre de 10^{-7} , ce qui est insuffisant pour garantir l'intégrité du génome. La cellule doit donc impérativement réparer ces mésappariements.

Reconnaître la copie de l'original ?

Par rapport aux autres lésions, les mésappariements posent un problème très délicat : comment reconnaître le brin où se trouve le défaut ? Dans le cas d'un dommage chimique, on a une base modifiée, comme le dU ou le 8-oxoG qui est facile à distinguer des quatre bases canoniques A, G, C et T. Il est donc simple de reconnaître le brin abîmé pour le réparer. Dans le cas d'un mésappariement, au contraire, il n'y a que deux bases canoniques qui ne sont simplement pas appariées correctement, comme par exemple un A avec un C.

Il serait certes possible de réparer au hasard l'une ou l'autre des deux bases par un mécanisme analogue à la BER mais on aurait alors une chance sur deux d'introduire une mutation, ce qui ne permettrait pas de faire baisser significativement le taux d'erreur du processus de réplication. Il existe donc un mécanisme spécifique qui permet à la cellule de reconnaître le brin d'ADN matrice (l'original) du brin néosynthétisé (la copie). Ce mécanisme est un **marquage de l'ADN par des méthylations des bases** qui sont introduites spécifiquement dans l'ADN, après la réplication. Nous allons voir qu'il permet à la cellule de corriger sélectivement le mésappariement sur le brin recopié et de préserver ainsi l'intégrité du brin original. Ce mécanisme de réparation des mésappariements permet à la réplication d'arriver globalement à un taux d'erreur de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} , soit moins d'une erreur pour un milliard de nucléotides.

L'ADN du génome est méthylé sur des sites spécifiques

Les différents organismes vivants disposent d'**ADN méthyltransférases** qui vont introduire des groupements méthyle à des sites spécifiques sur certaines bases. Par exemple, chez les vertébrés, et donc chez l'homme, les séquences **5'CG3'** peuvent être méthylées sur la position 5 de la cytosine

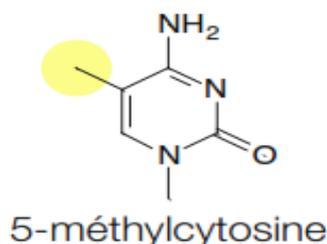


Figure 3.16

Chez *E. coli*, il existe aussi deux méthylases spécifiques : **Dam** qui méthyle en position **N6 les adénosines** présentes dans les séquences 5'GATC3' et **Dcm** qui méthyle en position **5 la deuxième cytosine** des séquences 5'CCAGG et 5 CCTGG3'

Si la séquence des sites spécifiques peut varier d'une espèce à l'autre, le mécanisme général reste le même.

En dehors des phases réplcatives, l'ensemble des deux brins des chromosomes est donc méthylé de place en place. Lors de la phase de réplication, les nucléotides incorporés dans le brin néosynthétisé ne portent initialement pas de méthylation. La méthylation du brin copie n'intervient que plus tard, le temps que les ADN méthyltransférases spécifiques puissent agir après le passage des ADN polymérase). L'ADN qui vient d'être répliqué est donc hémiméthylé.

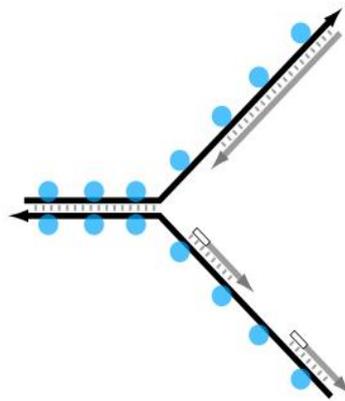


Figure 3.17 : Hémiméthylation de l'ADN après la réplication. L'ADN parental (en noir) a été méthylé par les ADN méthylases cellulaires. Au moment de la réplication, l'ADN polymérase n'introduit que des nucléotides non-modifiés dans le brin néosynthétisé (en gris). Juste en aval de la fourche de réplication, seul le brin parental est donc méthylé.

Réparation du brin néosynthétisé

La machinerie de réparation des mésappariements reconnaît et répare préférentiellement le brin néosynthétisé, grâce à la présence de cette hémiméthylation. La machinerie impliquée a été bien décrite chez *E. coli* et semble assez largement conservée, y compris chez l'homme. Chez les bactéries, l'identification des protéines participant à ce mécanisme vient au départ d'études génétiques, puisque des défauts dans les gènes associés, appelés **gènes mut**, conduisent à un phénotype hypermutateur. Du fait de leur incapacité à réparer correctement les mésappariements, les mutants correspondants accumulent des mutations avec une fréquence beaucoup plus élevée.

Trois protéines principales participent à la réparation des mésappariements chez *E. coli* : **MutL**, **MutS** et **MutH**. La réparation se déroule en cinq étapes :

Reconnaissance du défaut; MutS est une protéine dimérique en forme de pince qui se fixe sur le mésappariement. MutS reconnaît la déformation de l'ADN induite par le défaut d'appariement

Coupeure du brin non méthylé; au niveau d'un site hémiméthylé. La protéine MutL se fixe sur MutS et recrute MutH. MutH est une endonucléase qui clive sélectivement le brin non-méthylé au niveau d'un site de méthylation proche de la lésion.

Digestion du brin non-méthylé; A partir du site coupé par MutH, une hélicase sépare les brins d'ADN et une exonucléase dégrade le brin non-méthylé jusqu'en amont de la lésion.

Polymérisation du brin; Une ADN polymérase synthétise à nouveau la région qui comportait une erreur de réplication en utilisant le brin méthylé comme matrice.

Ligature; Le brin réparé est scellé par une ADN ligase, comme dans le cas de la BER ou de la suture des fragments d'Okazaki.

Ce mécanisme permet à la cellule de prendre appui sur les sites hémiméthylés pour reconnaître le brin à réparer, puis de dénuder à partir de ce point la région d'ADN que la polymérase devra refaire.

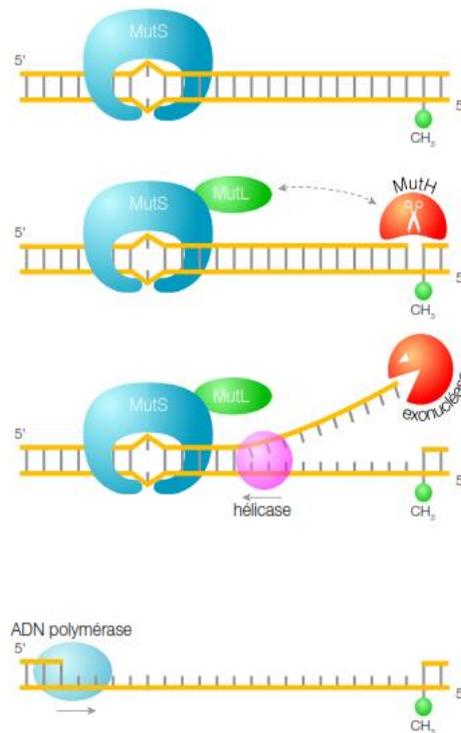
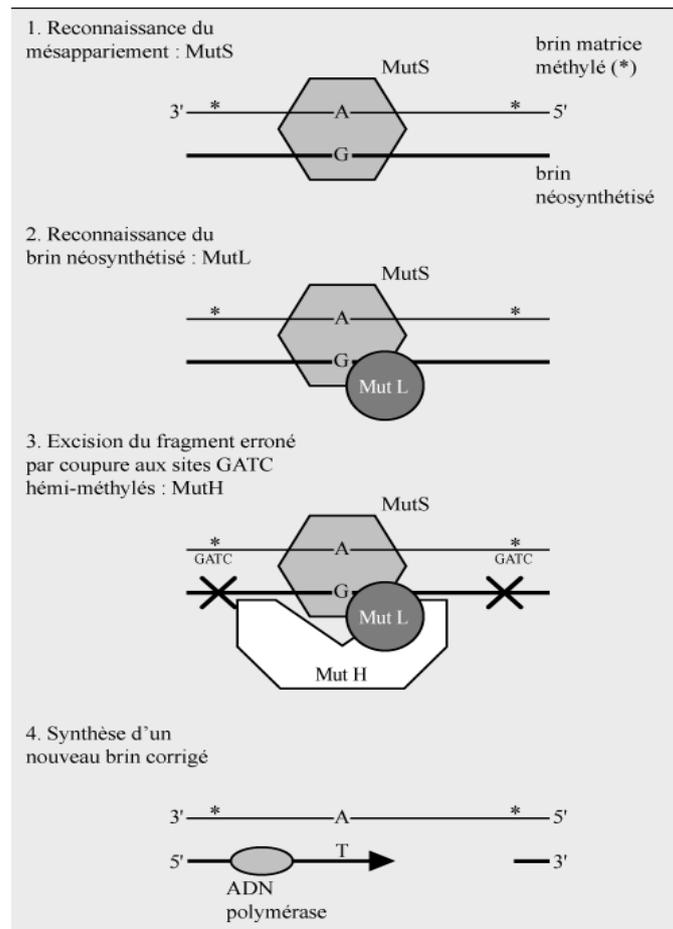
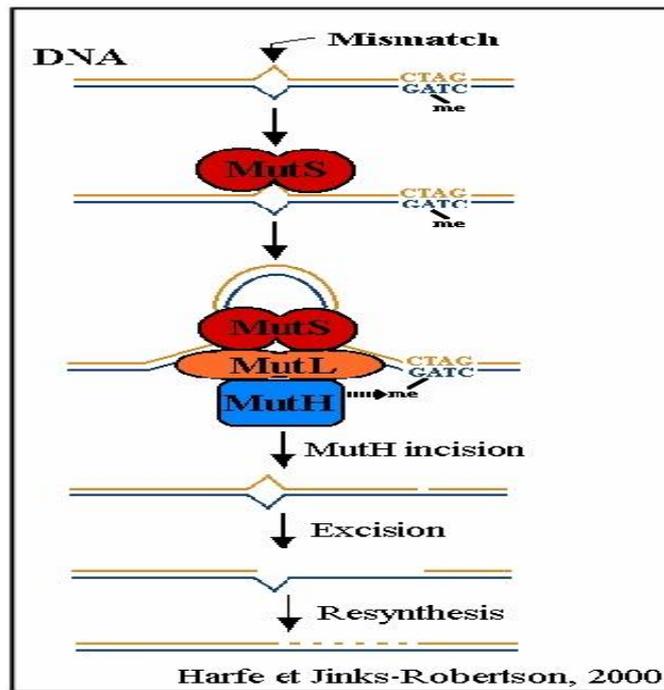
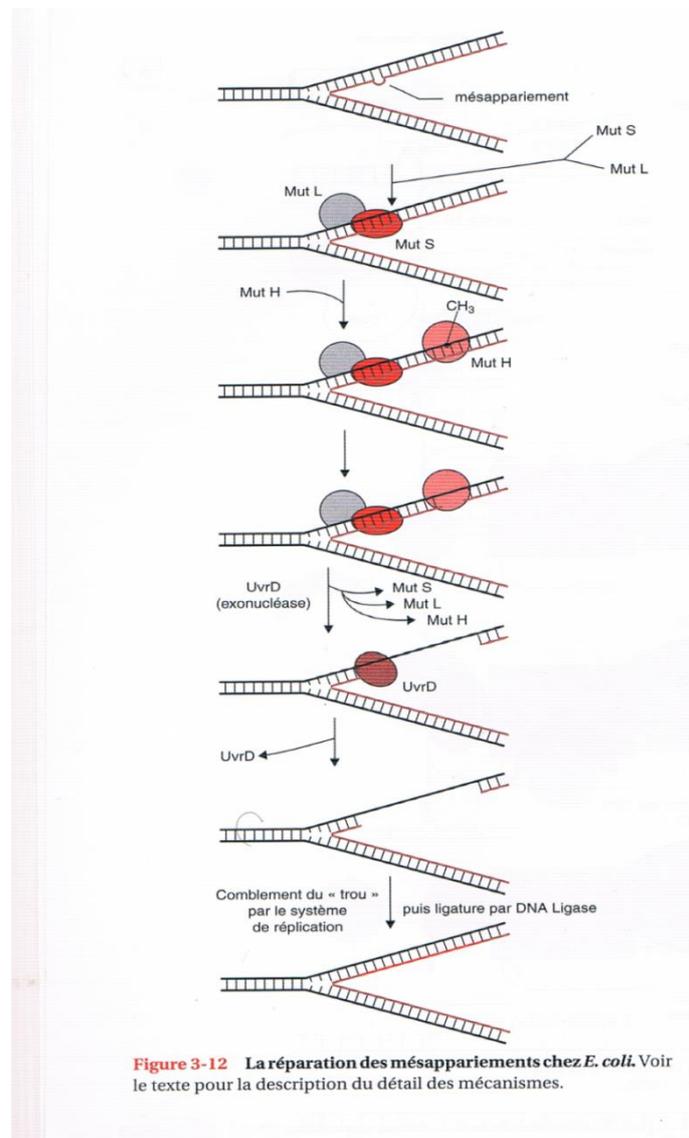


Figure 3.18 : Mécanisme de la réparation des mésappariements chez *Escherichia coli*.

On a trouvé plusieurs homologues de MutS et MutL chez l'homme, qui sont codés par les gènes MSH (MutS Humain) et MLH (MutL Humain). Par contre, il n'y a pas d'homologue identifié de MutH, on ignore donc par quel mécanisme se fait la reconnaissance du site hémiméthylé et la coupeure du brin néosynthétisé.





IV. La réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotide est un mécanisme de réparation complexe, à spectre très large, dont la fonction est de réparer tous les dommages qui déforment l'ADN de manière importante et en particulier toutes les lésions encombrantes. La NER répare en particulier :

- ❖ **Les adduits ou alkylations** des bases avec des composés encombrants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- ❖ Les lésions étendues couvrant plusieurs nucléotides.
- ❖ Les distorsions importantes dans la double hélice, tels que les dimères de thymine.

La NER suit un mécanisme général qui présente un certain nombre de points communs avec ceux qui ont été décrits plus haut, avec deux voies alternatives, soit la **réparation classique**, soit la **réparation couplée avec la transcription**. Du fait de leur caractère encombrant, les lésions réparées par la NER vont en effet en général bloquer non seulement la réplication mais aussi la

progression de l'ARN polymérase lorsqu'elle transcrit des ARN messagers. Le schéma de la NER est le suivant :

- ▶ Reconnaissance de la lésion
- ▶ Fixation d'un complexe multiprotéique au site endommagé
- ▶ Incision du brin endommagé, en amont et en aval de la lésion, puis élimination du brin d'ADN lésé.
- ▶ Polymérisation d'un nouveau brin par une ADN polymérase
- ▶ Suture par l'ADN ligase

La plupart des protéines spécifiques impliquées dans la voie NER sont codées par les gènes dont la mutation provoque des pathologies graves le Xeroderma pigmentosum ou le syndrome de Cocayne. Pour cette raison, elles portent des noms commençant par **XP** ou **CS**.

Mécanisme

La première partie de la voie NER classique commence par la reconnaissance de la lésion par la protéine **XPC**. Celle-ci va ensuite permettre le recrutement de **XPB** et **XPD** qui sont deux hélicases qui vont ensuite ouvrir le duplexe, l'une vers l'amont de la lésion et l'autre vers l'aval. Ces deux hélicases font partie d'un complexe appelé **TFIIH**, un des facteurs de transcription de l'**ARN polymérase II** et qui est également impliqué dans la réparation par excision de nucléotides. TFIIH est un oligomère comportant de nombreuses sous-unités qui maintient l'ADN ouvert, Après ouverture du duplexe, le complexe recrute **RPA** et **XPA** qui participent également au maintien de l'ADN sous forme ouverte.

XPA déplace aussi XPC de la lésion. A ce stade, on obtient une région en «bulle» ouverte autour de la zone à réparer. Enfin, le système recrute **XPG**, une endonucléase, du côté 3' de la lésion.

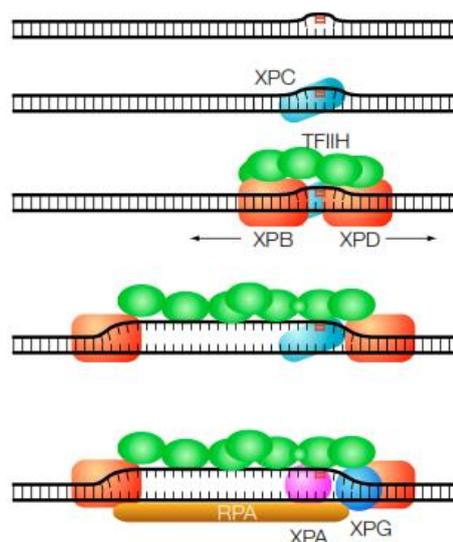


Figure 3.19 : Première partie de la voie NER classique.

L'autre voie de déclenchement de la NER est activée dans les régions qui sont activement transcrites en ARN. Dans ce cas la, la lésion n'est pas détectée par XPC mais par l'ARN polymérase, qui se trouve bloquée. L'ARN polymérase bloquée déclenche le recrutement de deux protéines spécifiques CSA et CSB, ensuite, l'ARN polymérase quitte le complexe et on a le recrutement des hélicases XPB et XPD ainsi que le facteur de transcription TFIIH, qui vont ouvrir l'ADN comme pour le NER classique non transcriptionnelle. En fin, après recrutement de RPA, XPA et XPG, on obtient le même complexe que ci-dessus.

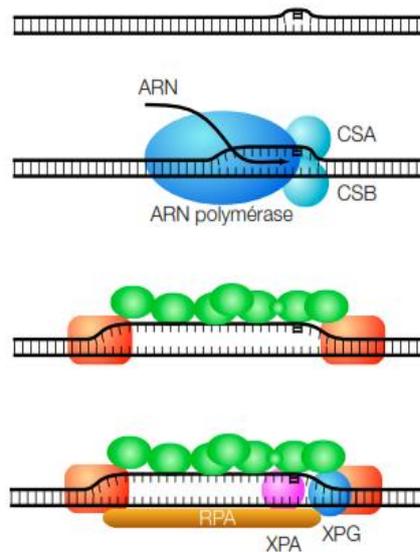


Figure 3.20 : Première partie de la voie NER transcriptionnelle

A ce stade, que la lésion ait été initialement reconnue via XPC ou l'ARN polymérase, la NER continue par un mécanisme commun pour exciser la lésion. Au niveau de l'extrémité 5' de la bulle ouverte dans l'ADN, le système recrute une seconde endonucléase composée de deux sous-unités : XPF / ERCC1, Il y a alors coupure du brin lésé, 15 à 24 nucléotides en amont coté 5' par XPF/ERCC1 et 2 à 8 nucléotides en aval coté 3' par XPG. Le segment de brin coupé est largué et les différents facteurs quittent le complexe. Le segment d'ADN simple brin est alors utilisé comme matrice par une ADN polymérase et enfin suturé par une ADN ligase, comme pour les autres voies de réparation qui ont déjà été évoquées.

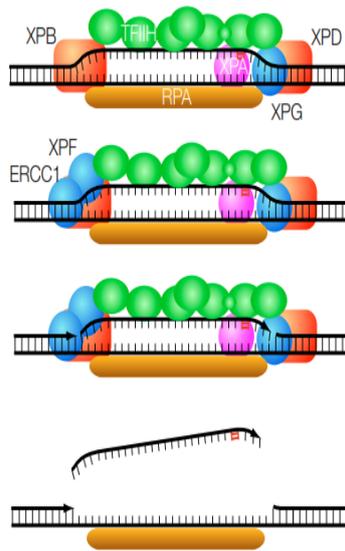


Figure 3.21 : Deuxième partie de la réparation par excision de nucléotides. Coupure amont et aval du brin endommagé par les deux endonucléases (en bleu). Le brin excisé est largué.

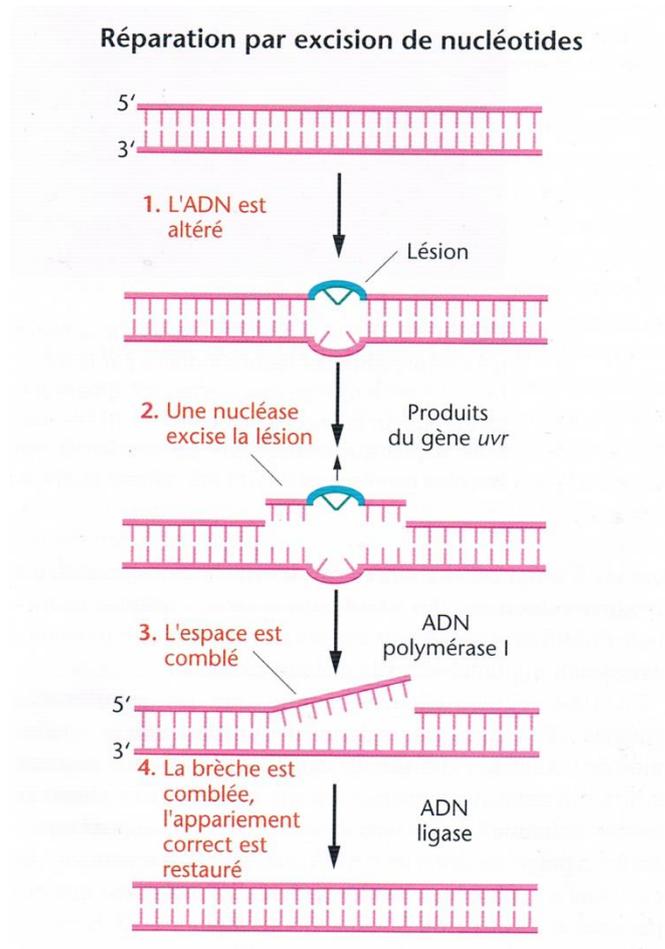


FIGURE 15.17 Réparation par excision de nucléotides (REN) d'un dimère de thymine induit par les UV. Pendant la réparation, 13 bases sont excisées chez les procaryotes et 28 chez les eucaryotes.

