

3. ALTERATIONS ET MECANISMES DE REPARATION DU GENOME BACTERIEN

1) LES MUTATIONS

- 1.1. **Définition** : Modification de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène,
• soit **spontanément** lors de la division cellulaire (réPLICATION),
• soit sous l'influence d'agents extérieurs appelés **mutagènes** = mutation **induite**. Ce gène ainsi modifié est transmis aux cellules filles. 2 grandes classes de mutations :

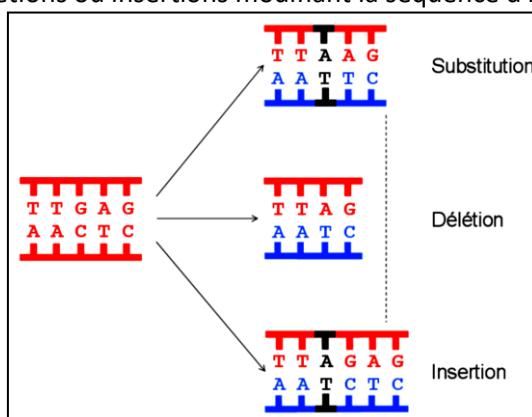
- **mutation ponctuelle** = *changement touchant un seul endroit du gène. Elle provoque un changement correspondant dans la protéine codée par ce gène.*
- **réarrangement** touche une région étendue. Les réarrangements les plus simples sont les *insertions de matériel génétique supplémentaire ou les délétions d'une partie du gène.*

1.2. Les causes des mutations

- **Spontanées** (erreurs de copie de l'ADN polymérase au cours de la réPLICATION) :

- Une base mal copiée : **mutation par substitution** (A à la place de T...)
- les **transitions** : purine remplacée par une purine (A<->G) ou pyrimidine par une pyrimidine (T<->C)
- les **transversions** : pyrimidine remplacée par une purine ou l'inverse (ex : A<->C).
- Une base oubliée : **mutation par délétion**
- Une base ajoutée : **mutation par insertion** Ces accidents ne concernent qu'une seule base et constituent des mutations ponctuelles.

- Induites : les agents physiques ou chimiques peuvent **altérer** les bases (désamination d'un C, altération de dimères de T, lacune dans un brin). Ces anomalies structurales de l'ADN conduiront, en l'absence de réparation de l'ADN, à des mutations, délétions ou insertions modifiant la séquence d'ADN lors de la réPLICATION qui suivra.



1.3. Classification selon la conséquence

Si la mutation se produit au niveau d'un gène, l'ARNm transcrit à partir de ce gène sera également modifié. Toute mutation sur une partie d'ADN qui s'exprime entraîne automatiquement un changement au niveau du codon. On examine les différentes mutations possibles en raisonnant au niveau du codon, donc de l'ARNm. Selon le cas, la protéine synthétisée sera plus ou moins différente de la protéine initialement codée par le gène non muté. On distingue :

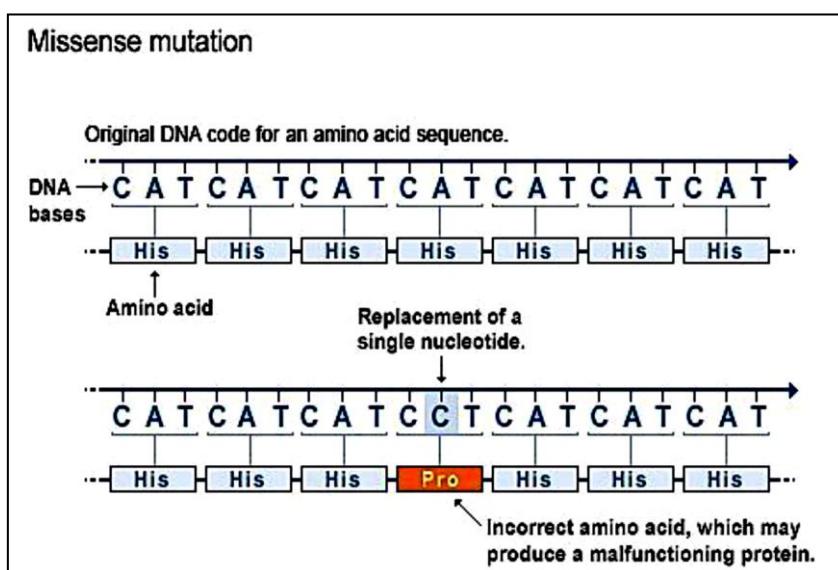
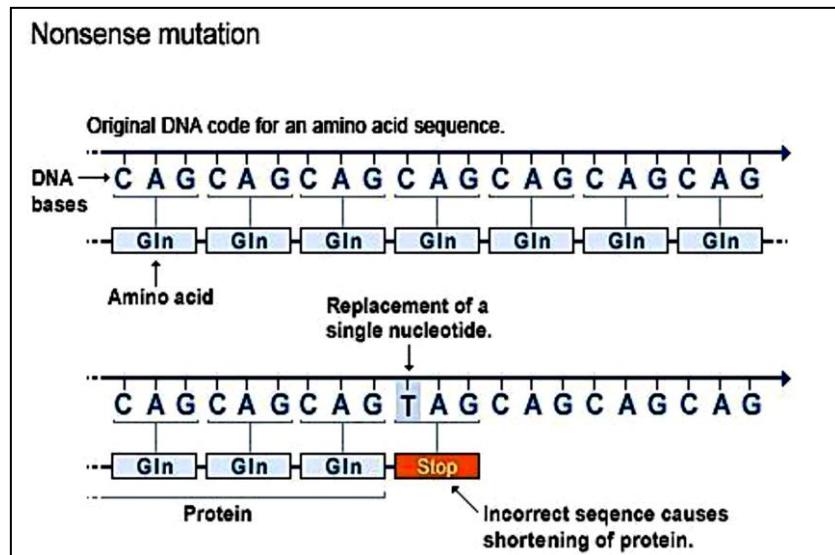
- Les mutations sans changement du cadre de lecture
- Les mutations avec changement du cadre de lecture

	A	T	G	C	C	G	A	T	C	T	A	A	G	C	T
1 ^e cadre de lecture				Met		Pro		Ile		STOP					
2 ^e cadre de lecture					Cys		Arg		Ser		Lys		Ala		
3 ^e cadre de lecture						Ala		Asp		Leu		Lys			

- **Mutations sans changement du cadre de lecture**

- Mutation silencieuse : sans conséquence. Le codon qui en résulte code le même acide aminé. Ex : UAU→UAC : les 2 codent pour Tyr

- Mutation non-sens : transforme un codon codant un aa en un codon stop. Ex : UAU~~U~~UAA. Si l'erreur se produit dès le début de la chaîne peptidique, les conséquences seront évidemment graves. Si l'erreur se produit vers la fin de la chaîne, cela peut être négligeable ou pas (protéine tronquée). Inversement, un codon stop peut être transformé en un codon codant un aa. La protéine sera alors plus longue.
 - Mutation faux-sens : un codon est remplacé par un codon codant pour un aa chimiquement très différent. Ex : AAG (Lys)→GAG (Glu). Lys est un acide aminé basique alors que Glu est un aa acide. Il en résulte une protéine le plus souvent anormale.
 - Mutation conservatrice : un codon codant pour un aa est remplacé par un codon donnant un aa du même groupe. Ex : AAA (Lys)→AGA (Arg). Lys et Arg faisant partie du même groupe d'aa (basiques), cette mutation est le plus souvent sans conséquence.



Lys AAA	Arg AGA	Val GUC	Tyr UAU	Ile AUC	His CAU	Pro CCC	Phe UUU	Séquence sauvage
Lys AAA	Arg AGA	Val GUC	Tyr UAC	Ile AUC	His CAU	Pro CCC	Phe UUU	Mutation silencieuse
Lys AAA	Arg AGA	Val GUC	Stop UAA	Ile AUC	His CAU	Pro CCC	Phe UUU	Mutation non-sens
Lys AAA	Arg AGA	Val GUC	Asp GAU	Ile AUC	His CAU	Pro CCC	Phe UUU	Mutation faux-sens
Arg AGA	Arg AGA	Val GUC	Tyr UAU	Ile AUC	His CAU	Pro CCC	Phe UUU	Mutation sauvage

- **Mutations avec changement du cadre de lecture (frameshift)** Elles sont dues à l'insertion ou à la déletion d'une ou plusieurs bases qui entraînent un décalage dans la lecture des triplets. Ces mutations sont graves si le déphasage se produit dès le début du gène. En effet, on obtient dans ce cas une protéine complètement différente, ou pas de protéine du tout s'il y a des codons stop.

Mutations Frameshift	
Sauvage	... lys.ser.pro.ser.leu.asn.al... ... AAA AGU CCA UCA CUU AAU GCU ... phase de lecture modifiée (-1)
Deletion (-)	... lys.val.his.his.leu.met... ... AAA GUC CAU CAC UUA AUG CU ... phase de lecture modifiée (+1)
Insertion (+)	... lys.ser.thr.ile.thr.stop ... AAA AGU ACC AUC ACU UAA UGC U ...

1.4. Mutations spontanées : Lésions endogènes sans agents exogènes

—Des mauvaises incorporations de bases : association de l'adénine avec la cytosine et de la thymine avec la guanine... (car tautomérisation)

—Des dépurinations et dépyrimidations qui correspondent à des pertes de bases par hydrolyse de la liaison avec l'ose (pH acide). Suite à ces pertes d'informations la polymérase ne sait pas quelle base incorporer, il y a ainsi formation d'un site AP.

—Des désaminations qui correspondent à des pertes de groupement amine sur les bases C, A et G. Les désaminations sont dues à des excès de chaleur.

—Des erreurs de méthylations, (les méthylations sont normales, participent à l'expression du gène et se réalisent souvent au niveau des îlots CpG). Les erreurs de méthylations donnent indirectement des absences de formation de liaisons H entre bases.

1.5. LES AGENTS MUTAGÈNES

Sont des *produits chimiques* ou des *facteurs physiques* qui augmentent considérablement le nombre de changements qui apparaissent dans la séquence de l'ADN, ce qui rend difficile le travail de réparation intrinsèque à la cellule :

Toutes les erreurs ne sont pas réparées, ce qui entraîne une augmentation du nombre de mutations.

Ces agents, qui sont aussi le plus souvent des agents cancérogènes, sont nocifs du fait de leur présence non contrôlée, et parfois non contrôlable, dans l'environnement.

Ils peuvent aussi être utilisés volontairement du fait de leur action mutagène.

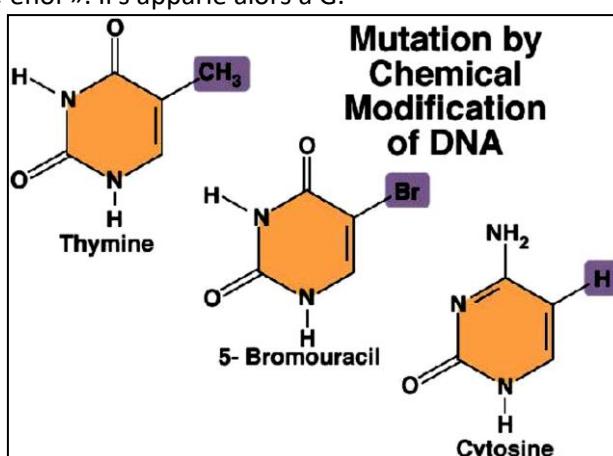
Agent CMR (cancérogène, mutagène ou reprotoxique)

Ex : amiante, arsenic, benzène, chrome...

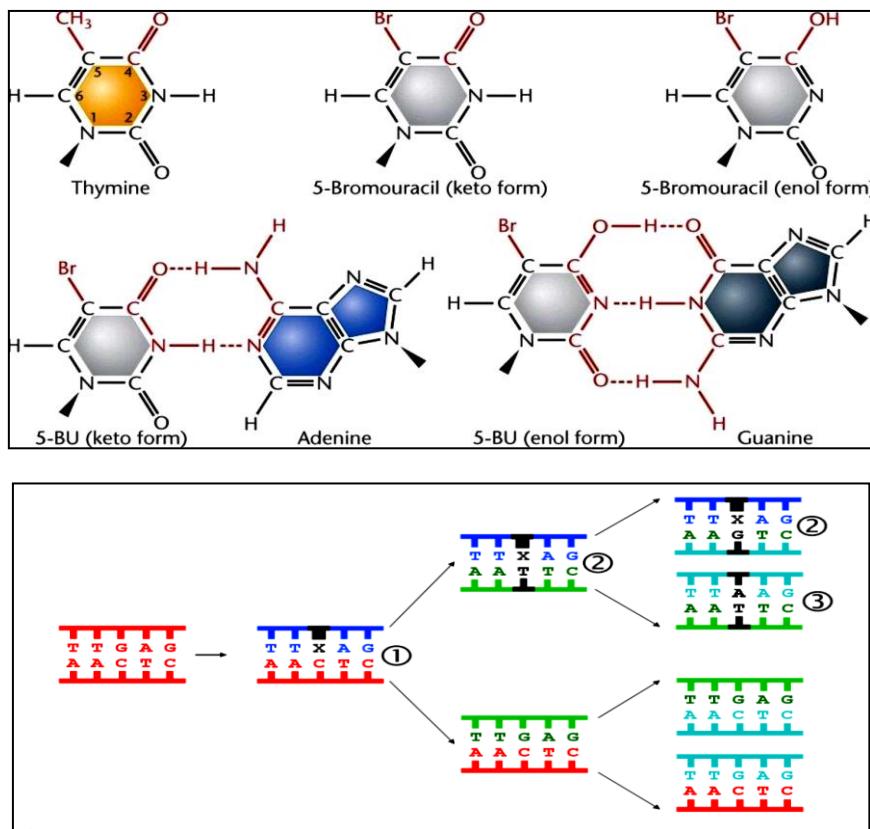
➤ Les mutagènes chimiques

On les distingue par leur mode d'action

• Les analogues des bases : Leur structure chimique rappelle les purines et pyrimidines. Ils peuvent être incorporés à l'ADN lors de la réPLICATION. Le bromo-uracile (BU), semblable à T (Br remplace CH3), s'apparie à A. Il a une forte tendance à se tautomériser en « enol ». Il s'apparie alors à G.



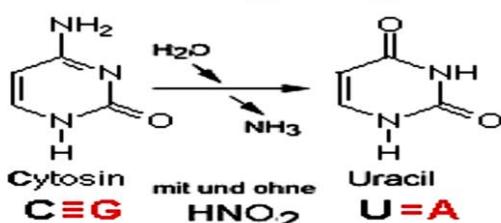
Tautomère = analogue structural avec déplacement H et double liaison, Conséquence = propriétés d'appariement différentes



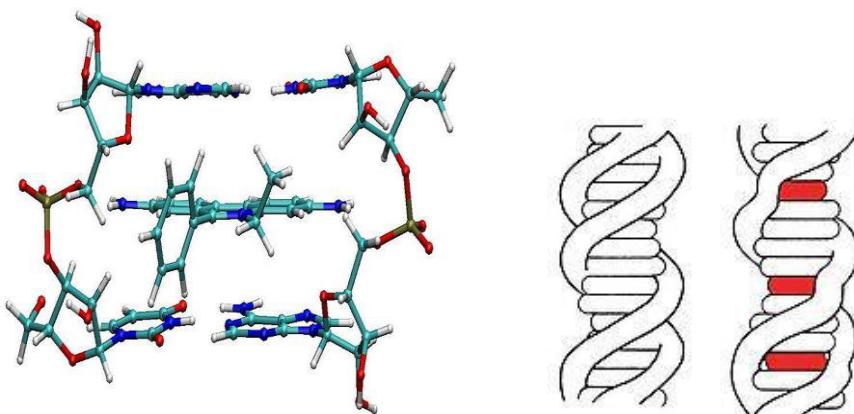
Les substances chimiques altérant la structure et l'appariement des bases :

- L'acide nitreux HNO_2 est à l'origine de **déaminations** (= perte d'un groupe NH_3) (ex : $\text{C} \rightarrow \text{U}$; $\text{meC} \rightarrow \text{T}$ (*dans point chaud CpG*) ; $\text{A} \rightarrow$ hypoxanthine).
- Les agents **alkylants** : la nitrosoguanidine NG, l'éthyl-méthylsulfonate EMS, l'éthyl-éthylsulfonate EES réagissent avec les bases en **ajoutant des groupements méthyl ou éthyl**.

Desaminierung von Cytosin



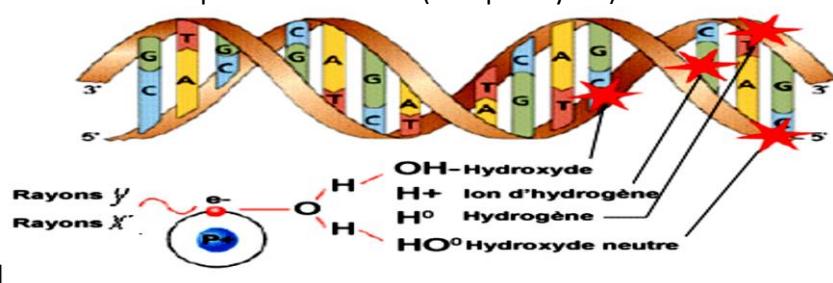
- Les agents intercalants : Acridine, BET sont des molécules qui s'insèrent entre les bases de l'ADN. Ceci entraîne un étirement de l'ADN. La polymérase insère alors une base surnuméraire en face de la molécule étrangère.



Les agents qui altèrent la structure de l'ADN :

➤ Certaines grosses molécules **se lient** aux bases qui deviennent ainsi « **non codantes** ». D'autres agents causent des **liaisons intra et inter brins** (ex : le psoralène trouvé dans les végétaux et utilisé dans les traitements de la peau).

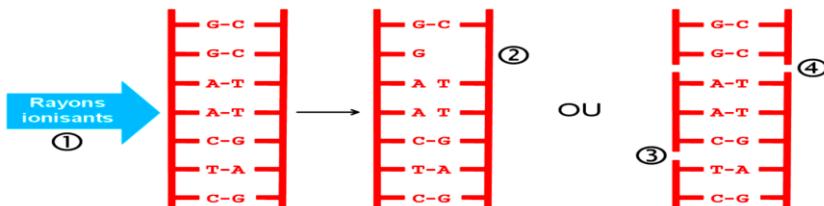
- Des produits chimiques causent des ruptures dans l'ADN (ex : peroxydes).



Les radiations : La fraction **biologiquement active du** spectre électromagnétique est constituée par les UV, les rayons X et gamma.

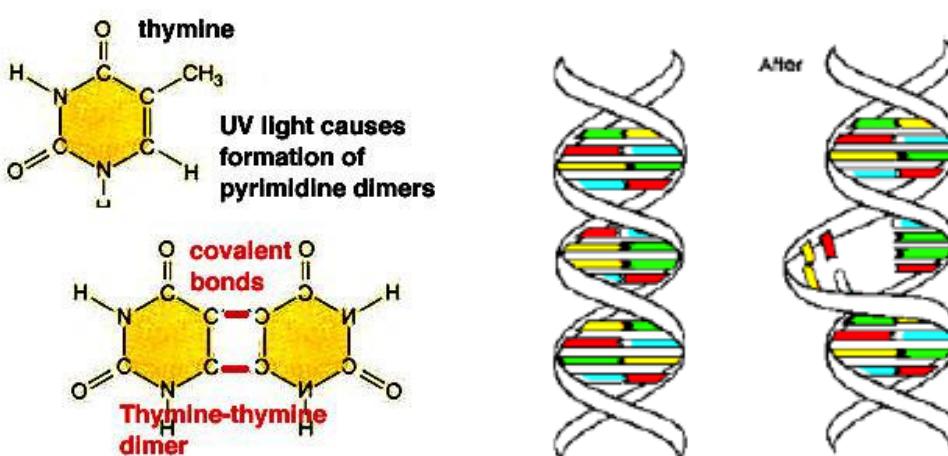
• Les radiations ionisantes : Les rayons X et gamma sont assez énergétiques pour produire des **radicaux libres** (ions possédant électrons non appariés) chimiquement très réactifs notamment avec l'ADN ou peuvent agir par **action directe** sur l'ADN. On parle ainsi de **radiations ionisantes**. On regroupe également sous ce terme les radiations corpusculaires, flux de particules atomiques et subatomiques émises par les éléments radioactifs. Elles sont de deux types : les particules alpha (noyau de l'hélium 2H^+ + 2 neutrons) et les particules bêta (des électrons). Les UV ne sont pas ionisants mais peuvent réagir avec l'ADN ou d'autres molécules biologiques.

• Les effets sur l'ADN des radiations ionisantes : Les **rayons X et gamma** (1) entraînent : - des **altérations ou pertes** de bases (2) ; - des **ruptures** dans l'un (3) ou les deux brins (4) qui peuvent conduire à des réarrangements, délétions, perte de fragments de chromosome, ou la mort de la cellule ; - l'**enchevêtrement** de l'ADN avec lui-même ou avec des protéines. Il y a une relation entre la dose de rayonnement et le taux de mutations car l'effet des radiations est cumulatif.



• Les effets des UV : Ils ne sont pas parmi les plus énergétiques et ne sont pas ionisants, mais leurs longueurs d'onde sont **absorbées préférentiellement** par des bases de l'ADN et par les acides aminés aromatiques des protéines. On distingue parmi les UV : · les UV-C (180 - 290 nm) : les plus énergétiques. Ils sont létaux mais absorbés par la couche d'ozone. ·

les UV-B (290 - 320 nm) : ils peuvent être létaux. Ils constituent le rayonnement mutagène de la lumière solaire. · les UV-A (320 - visible) : ils ont des effets délétères parce qu'ils créent des radicaux oxygénés mais ils produisent peu de dimères de la pyrimidine. La plupart des lésions sont des **dimères entre bases pyrimidiques (T-T ou T-C)** dans l'ADN. Ces dimères bloquent la transcription et la réPLICATION.



2) LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN Les dommages à l'ADN intervenant spontanément et résultant d'agents de l'environnement existant en permanence, la plupart des organismes possèdent des **capacités à réparer leur ADN**. La réparation de l'ADN intervient à 2 niveaux différents :

- Lors de la réPLICATION, de façon à éviter les erreurs lors de la « copie » qui ont lieu malgré la fidélité et la précision de l'ADN polymérase,
- Suite à des lésions de l'ADN consécutives à l'action d'agents qui peuvent être internes (peroxydes) ou environnementaux (UV, substances chimiques mutagènes...).

➤ Réparation par réversions des lésions :

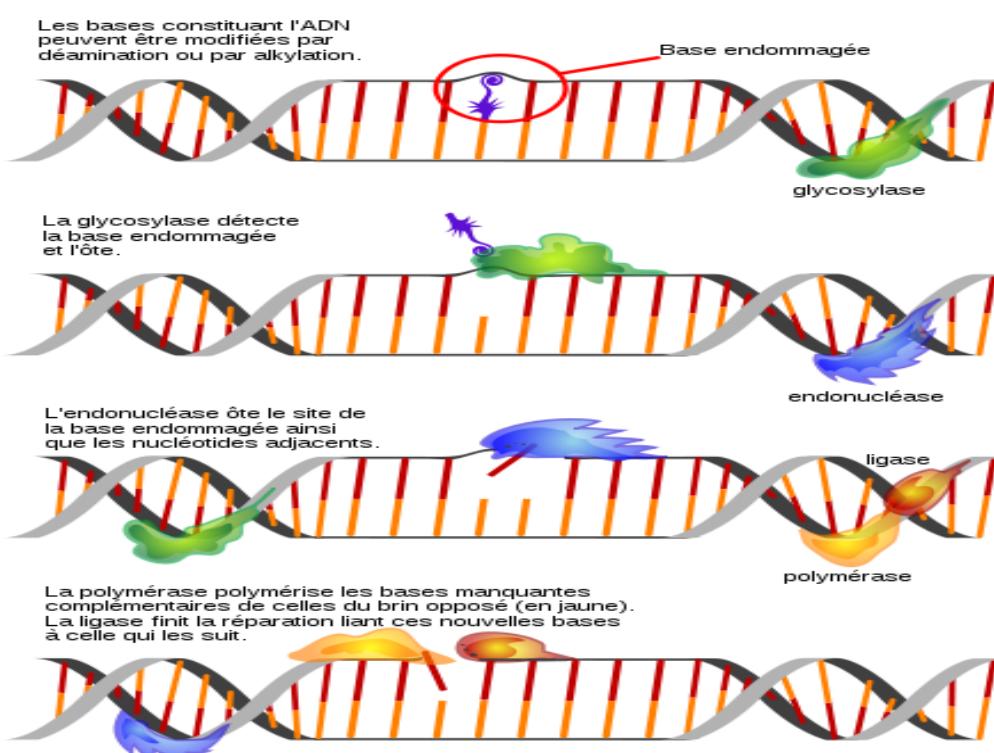
Ce type de réparation utilise très peu de protéines et restore immédiatement les liaisons.

- **Photo-réactivation** : les photolyases sont des enzymes activées par l'énergie lumineuse et qui participent à la réparation de l'ADN par coupure des liaisons covalentes au niveau des dimères de thymine.
- **Réversion de coupure simple brin** : par une ADN ligase lorsqu'il n'y a pas de pertes de bases.
- **Réversion de dépurination par une purine insertase** : restore la liaison osidique, enzyme spécifique d'une base.



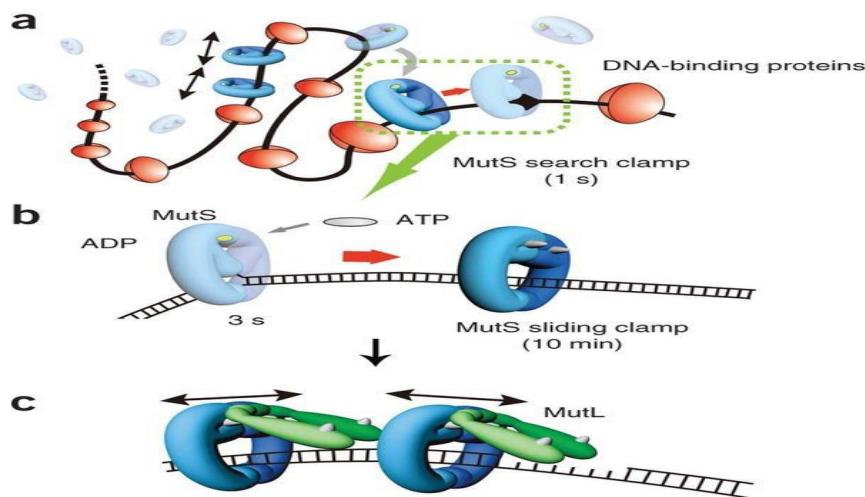
➤ La réparation par excision de bases : (système BER)

La **base** inappropriée est détachée de sa liaison avec le sucre et remplacée. Ce sont des **glycosylases** qui rompent la liaison. La base est alors **excisée** et une **nouvelle base** est insérée par la polymérase en utilisant le deuxième brin comme matrice. *Les mutants qui ont une absence de ces glycosylases ont un taux élevé de mutations*

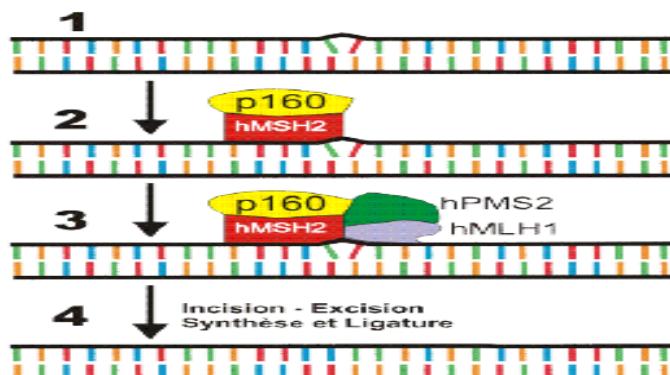


➤ La réparation des mauvais appariements : système MMR

- Ce processus intervient après la réPLICATION de l'ADN à la manière d'un "correcteur orthographique".
- Il est réalisé par un groupe de protéines qui peuvent "scanner" l'ADN et détecter les paires de bases incorrectes ou mal appariées.
- Le nucléotide incorrect est **supprimé** et l'ADN -polymérase opère un deuxième passage pour **rétablissement la séquence** convenable.
- Le mécanisme nécessite la reconnaissance du brin néosynthétisé de l'ADN grâce aux méthylations du brin anciennement synthétisé de l'ADN.



Les gènes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) codent les enzymes de réparation des mésappariements de l'ADN. Le schéma ci-dessous explique la réparation de l'ADN après erreur de mésappariement.



En [1], on note deux mésappariements.

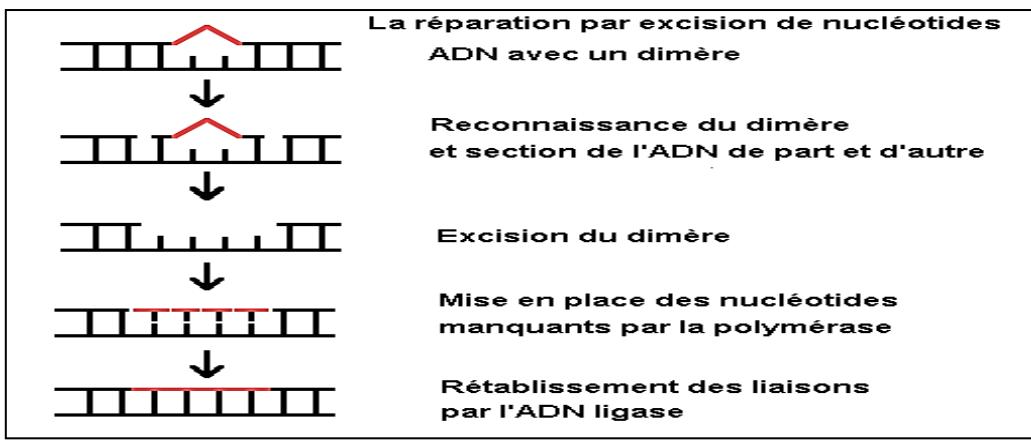
En [2], les protéines repèrent le site et se fixent sur ce site.

En [3], d'autres protéines de réparation se fixent sur le site

En [4], une incision – excision, une nouvelle synthèse et une ligature permettent la restitution ad integrum.

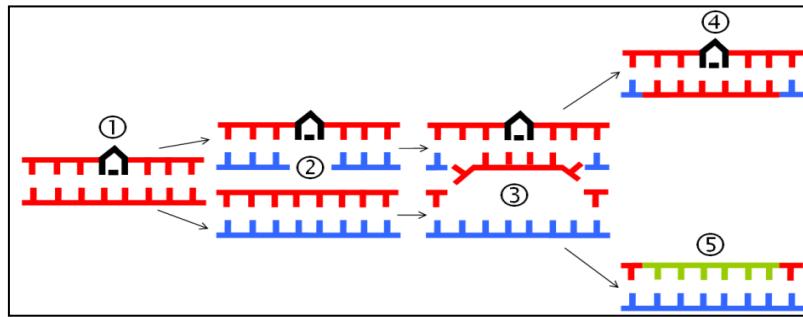
➤ La réparation par excision de nucléotides : (système NER)

- Pour les dommages importants de l'ADN qui créent des blocages de la réPLICATION et de la transcription (tels que les dimères induits par les UV et des produits chimiques). Sont reconnus par la distorsion de la double hélice qu'ils engendrent.
- **clivage du brin d'ADN** de chaque côté de la liaison par des endonucléases. La polymérase complète ensuite la zone manquante. Des mutants qui ne peuvent mettre en place ce type de réparation ont été isolés : ils sont sensibles au UV et aux produits chimiques agissant comme les UV.



➤ Réparation par recombinaison de molécules filles (homologue)

Tous les dommages de l'ADN ne peuvent être réparés immédiatement. Certains persistent. Si un oeil de réPLICATION contient des altérations (par exemple un dimère de thymine (1)), il y a normalement blocage de la réPLICATION.



La réparation par recombinaison correspond à la **synthèse translésionnelle (TLS)** qui consiste à poursuivre la réPLICATION de l'ADN au niveau d'une lésion du brin matriciel de l'ADN ne permettant aucun appariement. Elle se réalise en même temps que la réPLICATION.

L'ADN-polymérase II a un rôle important dans la reprise de la synthèse d'ADN après la lésion, l'ADN-polymérase III est alors transitoirement expulsée pour que la réPLICATION puisse continuer.

L'ADN-polymérase III arrive au niveau d'une erreur et est éjectée par les enzymes de la TLS qui remplacent la base erronée ou alors qui permet la poursuite de la réPLICATION un peu plus loin.

➤ Le système SOS

Le système SOS regroupe un ensemble de gènes (env. 30) qui est impliqué dans la réPLICATION de l'ADN, dans la réparation de l'ADN et dans la division cellulaire et dont l'expression est contrôlée par une altération de l'ADN.

Le système SOS fonctionne comme un système de type opérateur, on se trouve face à deux états, qui utilisent ou non les protéines **Rec A** qui sont les protéines clé de la recombinaison procaryote :

- Un **état non induit**, sans Rec A, durant lequel Lex A se lie aux opérateurs en réprimant la synthèse des protéines impliquées dans la réponse SOS de la cellule, les gènes ne sont donc pas exprimés.
- Un **état induit**, avec Rec A qui est toujours présent dans la cellule mais en petites quantités. Lors d'une altération les protéines Rec A activent leurs propres synthèses en clivant les protéines Lex A qui inhibaient jusqu'alors la transcription des gènes du système SOS dont celui de Rec A.

Les différents gènes participant au système SOS forment un **régulon** qui est un groupe de gènes dont l'expression est contrôlée par une même protéine.