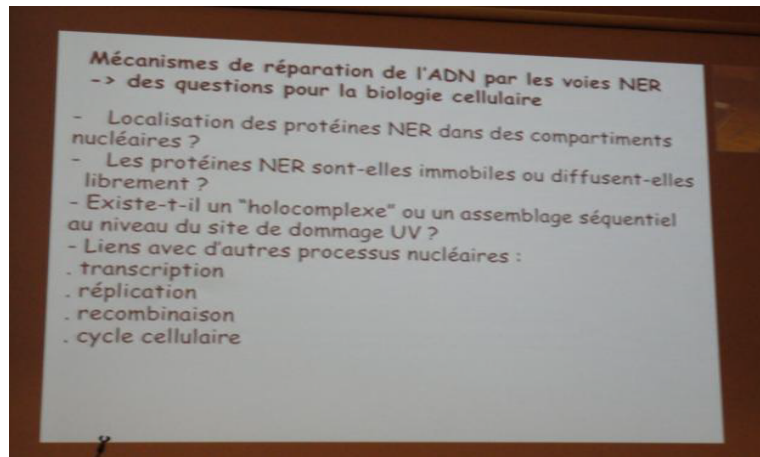


## Point expériences Voie NER

Voici les différentes questions auxquelles on va tenter de répondre



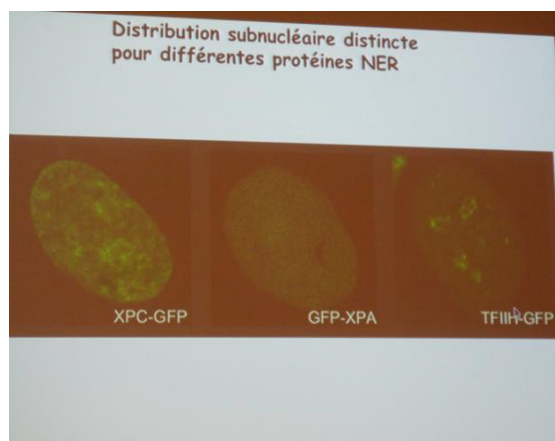
Pour comprendre ces expériences, chacun des acteurs principaux ont été fusionnés à la GFP, afin de les visualiser.

Attention : Lorsqu'on utilise des protéines hybrides X-GFP, il faut au préalable s'assurer de leur **fonctionnalité**, pour cela il existe des tests.

Ils consistent à prendre une cellule de patient, par exemple une cellule mutée pour XPA. Elle est donc incapable de réparer son ADN suite à une irradiation.

On introduit dans cette même cellule un gène hybride XPA-GFP (avec la séquence normal de XPA), et si cette introduction est **suffisante pour réparer** l'exposition aux UV, ça veut dire que XPA-GFP est **fonctionnelle**.

Il faut aussi s'assurer que le **niveau d'expression** de ces protéines hybrides corresponde à peu près au niveau d'expression des protéines naturelles.



On observe au microscope 3 images de **noyau** de cellule.

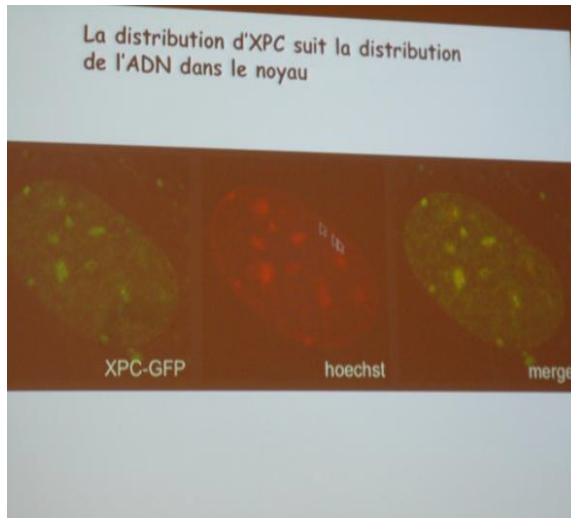
**Sans UV**, on observe que :

- Ces 3 protéines (XPC, XPA et TFIIH) sont dans le noyau
- La **localisation** de chacune de ces protéines dans le noyau est **différente**

➔ Ces 3 protéines ne sont pas toutes dans le même **complexe**

### A) XPC sans UV :

On fait une **co-localisation** (on superpose la fluorescence émise par XPC avec celle émise par le Hoechst) de XPC avec un **marqueur de l'ADN = Hoescht** qui est un colorant et qui se fixe sur les bases A-T de l'ADN.



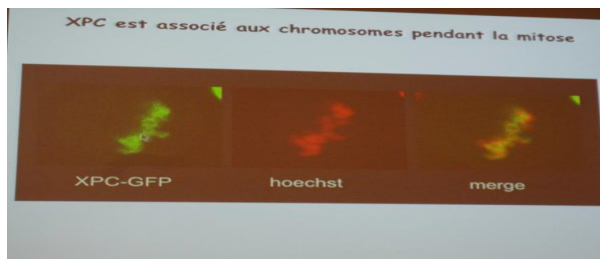
On voit donc **en rouge l'ADN**. On remarque des zones de fortes fluorescences, ça correspond à **l'hétérochromatine**.

**En vert**, c'est **XPC-GFP**.

On effectue un **merge**, c'est-à-dire on superpose les 2 images.

On observe une **fluorescence jaune caractéristique**.

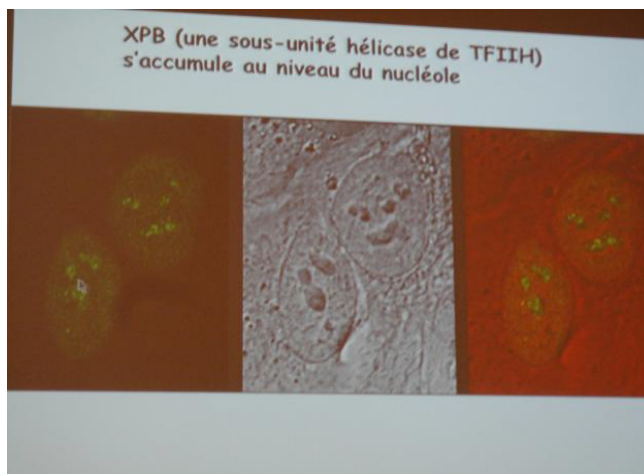
→ **XPC suit la distribution de l'ADN dans le noyau**



Ici, c'est la même chose mais pendant la mitose.

→ On voit que XPC reste attaché à l'ADN.

### B) XPB sans UV



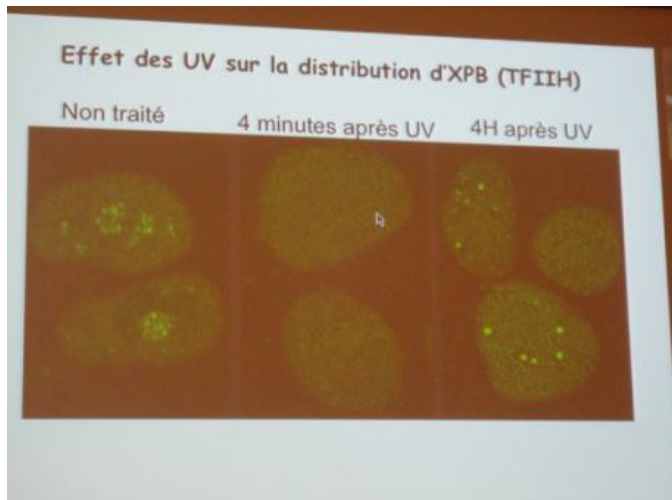
- On a à gauche XPB-GFP, localisé dans des sortes de **foyers**.
- Au milieu, on voit au sur les mêmes cellules en contraste de phase des sortes de clivages caractéristiques du **nucléole**.
- A droite, superposition des 2, où on voit que **XPB se situe dans le nucléole**.

→ **XPB s'accumule dans le nucléole.**

Pourquoi ?

Car XPB fait parti du complexe **TFIIH**. Ce complexe est **indispensable à l'ARN polymérase I**, qui est spécifique de la **transcription** des **ARN ribosomiques dans le nucléole**.

#### C) XPB avec UV :



A Gauche : pas de rayon UV, XPB dans le nucléole.

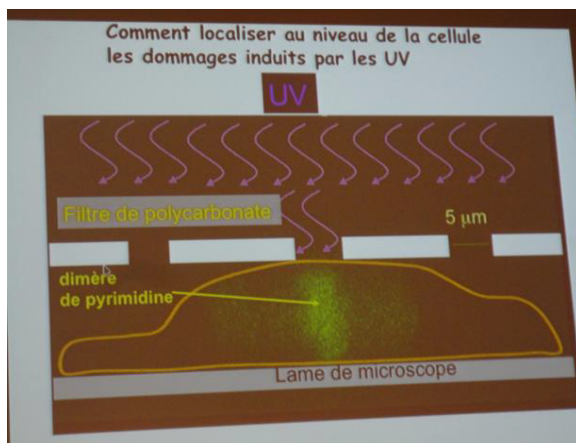
Au milieu : Après 4 min d'irradiation au rayon UV, on n'a plus une répartition que dans le nucléole, XPB est plus **homogène** dans la cellule.

A droite : 4h Après, on voit apparaître une autre logique de localisation avec des **nouveaux foyers qui ne correspondent pas au nucléole**.

⇒ On a une **distribution complète de XPB au cours des processus de réparation** qui part du nucléole vers des foyers spécialisés.

Il semble logique que cette redistribution soit due à l'implication de XPB dans la réparation de l'ADN, mais il faut le prouver !

#### D) Les lésions UV influencent-elles la redistribution de XPB dans le noyau ?



Pour se faire, on concentre les lésions UV à certains endroits seulement.

Procédé : On ajoute un **filtre** de polycarbonates entre les rayons UV et la cellule.

Ce filtre contient des petits trous, par lesquels passent les rayons UV.

On a donc des lésions seulement au niveau des trous.

NB : On peut **localiser les lésions UV** et donc s'assurer qu'elles sont bien au niveau des trous grâce à des **Anticorps** qui reconnaissent spécifiquement les **dimères de**

Donc si on a une **redistribution de XPC et XPB** seulement au niveau des **trous** du filtre : on peut alors **affirmer** qu'il y a une **redistribution** seulement au niveau des ses lésions.

Voici ce qu'on observe au microscope :



XPB et XPC se localisent précisément au niveau des lésions.

On a finalement 2 sortes de **TFIIH** :

- Une partie dans le **nucléole**, c'est sa localisation principale. XPB et XPD vont permettre d'ouvrir l'ADN pour la **transcription** des ARN ribosomiques.
- Une **fraction libre** qui s'associe aux lésions lorsque la cellule est attaquée par les UV.

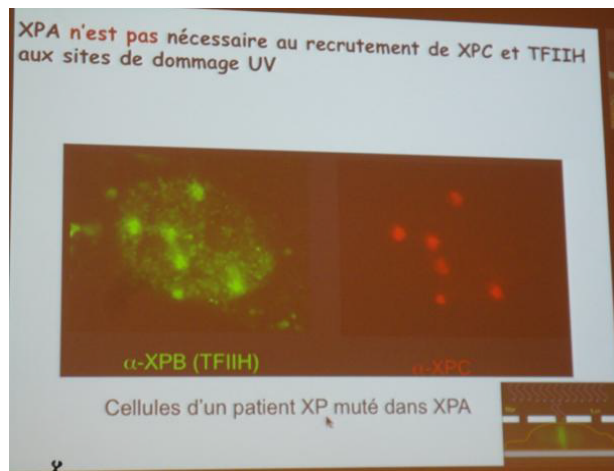
Lorsqu'on irradie la cellule, on change **l'équilibre dynamique entre ces différentes fractions de TFIIH**, et on va le trouver préférentiellement au niveau des lésions.

La cellule donne priorités à ses réparations avant ses synthèses internes, car sinon, les synthèses pourraient être dysfonctionnelles.

A ce stade, on peut se poser d'autres questions :

- Est-ce qu'on retrouve dans les expériences l'ordre des événements comme ils se feraient normalement dans la cellules ?
- Est-ce que certaines étapes que je suis capable de voir au microscope peuvent se faire dans les cellules de patients ?

E) Est-ce que XPA est nécessaire au recrutement de XPC et XPB ?



On prend des cellules de patients mutées pour XPA.

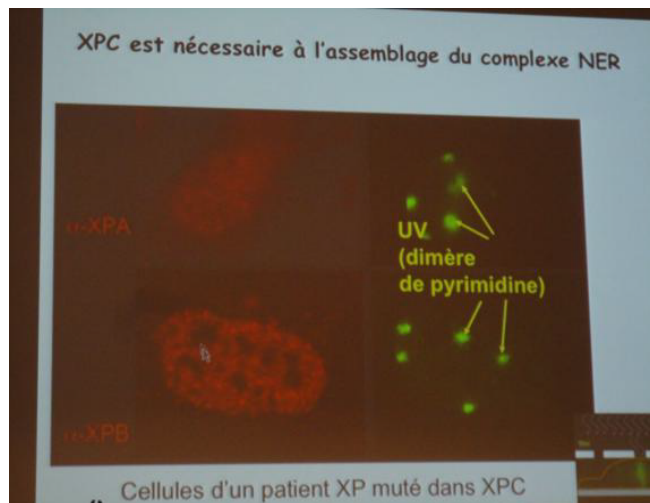
On tente ensuite de localiser XPB-GFP et XPC-GF après avoir irradié aux UV à travers le filtre.

→ On voit alors que chacun des **foyers** correspond à un **trou** du filtre, que **XPB et XPC** se **localisent au niveau des lésions**.

### Conclusion :

**XPA n'est pas nécessaire au recrutement de XPC.**  
**XPA agit sur une étape ultérieure à XPC.**

F) Est-ce que XPC est nécessaire à l'assemblage de XPB et XPA au niveau de la lésion ?



On prend les cellules d'un patient XPC et on regarde si XPA et XPB peuvent se localiser au niveau des lésions (au niveau des trous du filtre).

On observe que XPA et XPB ne se **relocalise pas**.

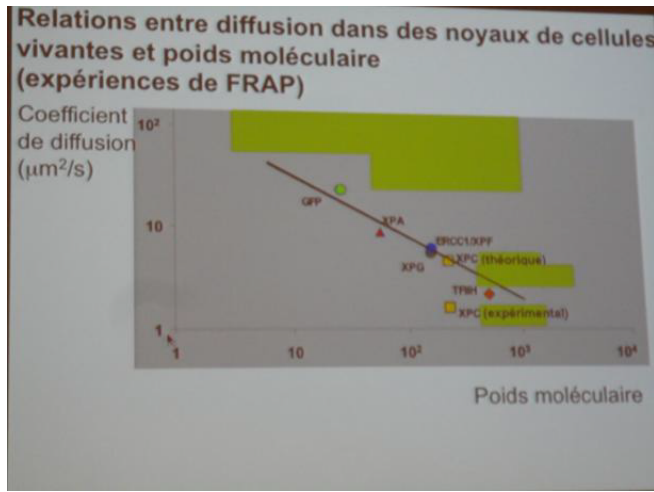
Conclusion : XPA et XPB sont incapables de se diriger vers les lésions en l'absence de XPC.

Pour s'assurer qu'il y a bien des lésions et qu'on n'a pas juste un problème avec XPA ou XPB, on utilise la **technique d'immunofluorescence indirecte** avec les **anticorps** qui reconnaissent les dimères de thymine (photo de droite).



Ces protéines XP se redistribuent donc la cellule, ainsi, on va vouloir mesurer leur coefficient de diffusion et leur vitesse.

#### G) Coefficients de diffusion et vitesses des protéines XP.



Un **FRAP** a été réalisé pour chaque protéine XP afin de mesurer leur coefficient de diffusion en **absence de rayon UV**.

On remarque que ce coefficient est **inversement proportionnel au poids moléculaire de la protéine**.

➔ Plus la protéine est grosse, moins elle diffuse facilement.

Chaque protéine a un **coefficient de diffusion propre** qui correspond à sa possibilité de diffusion seulement limitée à sa **taille**.

La GFP diffuse donc très rapidement.

C'est le cas pour toutes les protéines **sauf XPC**.

- XPC a un coefficient de diffusion théorique bien plus élevé que le réel que l'on peut mesurer lors d'un FRAP. Autrement dit, XPC diffuse pas bien malgré sa taille pas trop importante.
- De plus, XPC se trouve au niveau de l'ADN.

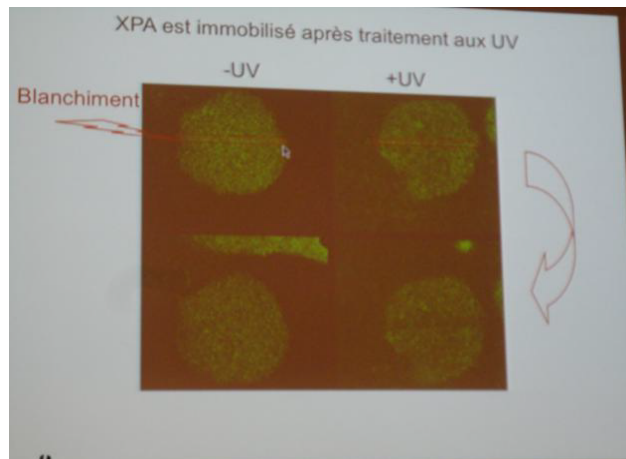
➔ Sans UV, XPC est associé à l'ADN, ce qui limite énormément sa diffusion dans les 3 dimensions !

On peut ensuite mesurer par un FRAP le temps d'immobilisation des protéines quand on irradie la cellule.

#### H) Temps d'immobilisation des protéines XP suite à une irradiation aux rayons UV de la cellule.

Rappel :

- Si la protéine est immobile, pas de retour « recovery » de la fluorescence.
- Si elle est complètement mobile on retrouve complètement la fluorescence.
- Puis cas intermédiaire avec fraction libre/fraction mobile.



On prend 2 cellules : une traitée au UV, l'autre sans UV.  
Ensuite, on photoblanchit une bande en travers du noyau de la cellule.

Sans traitement : La fluorescence revient rapidement  
→ **XPA est très mobile en absence d'UV**

Avec traitement : On a une partie où il y a moins de fluorescence  
→ **Une fraction de XPA n'est pas libre et ne diffuse pas.**

Grâce à la technique du FRAP, a pu mesurer le **temps d'immobilisation** des protéines au niveau des sites de dommages d'UV.

- **XPC a un temps d'immobilisation très court (1.30 min)**, ce qui est logique puisque c'est l'initiateur, il reconnaît la lésion puis repart assez rapidement.
- **CSB** a elle aussi un **temps d'immobilisation plutôt court**.
- **TFIIH** reste un peu plus longtemps, **4 min**, puisque en apportant les 2 hélicases il permet d'ouvrir l'ADN.
- **PCNA**, qui est un facteur auxiliaire de la réplication, reste très longtemps immobilisée : **entre 20 et 25 min**.  
→ L'étape de la re-synthèse prend énormément de temps !!

### Conclusions

- chaque protéine NER présente une distribution subnucléaire spécifique -> *pas d'holocomplexe NER*
- La mobilité intranucléaire des facteurs s'effectue par diffusion passive en fonction du PM
- Assemblage rapide et séquentiel des facteurs au site de dommage
- Localisation nucléolaire de TFIIH -> couplage transcription / réparation

Avantages pour la cellule : Flexibilité, efficacité, multifonctionnalité, coordination et régulation multiple