

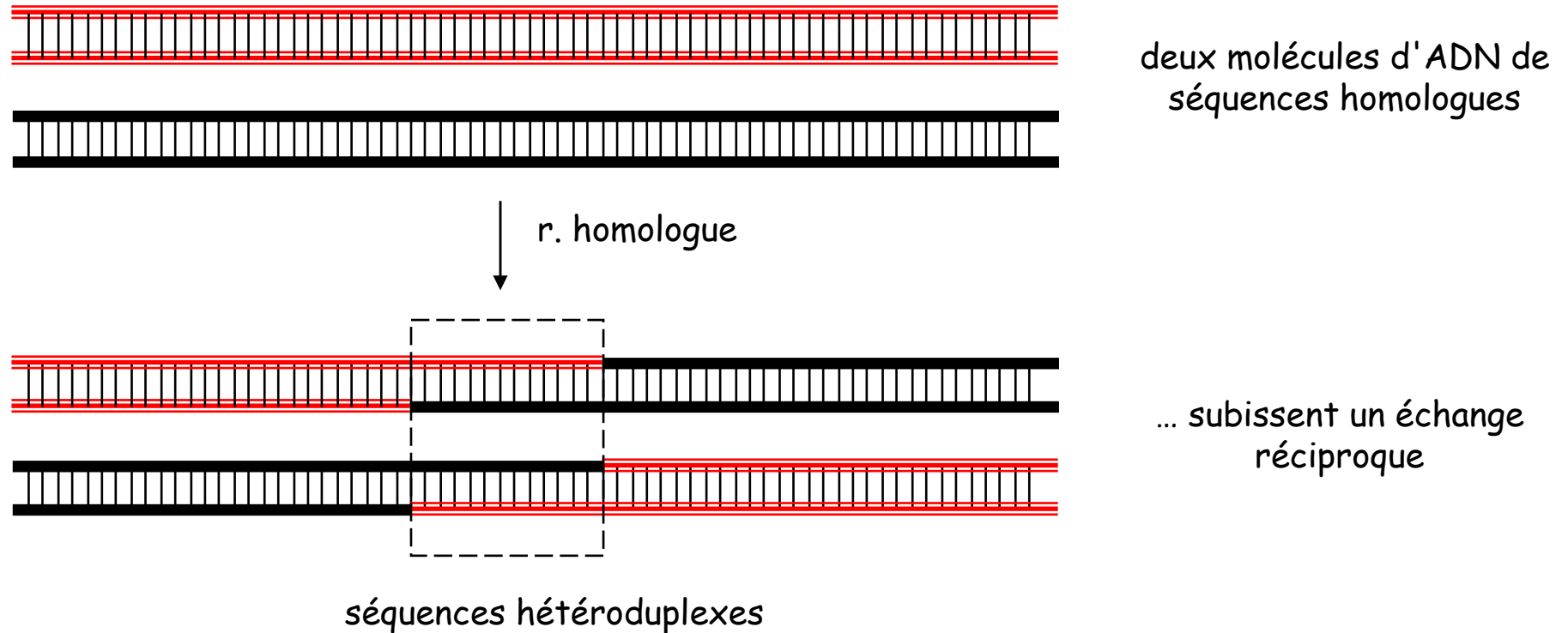
3. La recombinaison homologue

3.1 Généralités

- recombinaison = formation de nouvelles associations de molécules d'ADN (implique coupure - ligature de l'ADN par des enzymes) ⁽¹⁾
- grande variété (ex. transposition) dont la recombinaison homologue (= r. générale, r. par "crossing-over")
- deux fonctions essentielles de la recombinaison homologue : préservation de l'intégrité du génome (par réparation des coupures accidentelles de l'ADN) & évolution du génome (brassage des allèles, duplication par recombinaison inégale, ...).
- la recombinaison homologue existe chez tous les organismes cellulaires et est très probablement apparue au tout début de l'évolution des premières bactéries

⁽¹⁾: techniques de génie génétique = "techniques de l'ADN recombinant", ou "techniques de recombinaison in vitro"

la recombinaison homologue se produit entre deux molécules homologues d'ADN et peut éventuellement mener à un échange réciproque (\Rightarrow brassage génétique) :

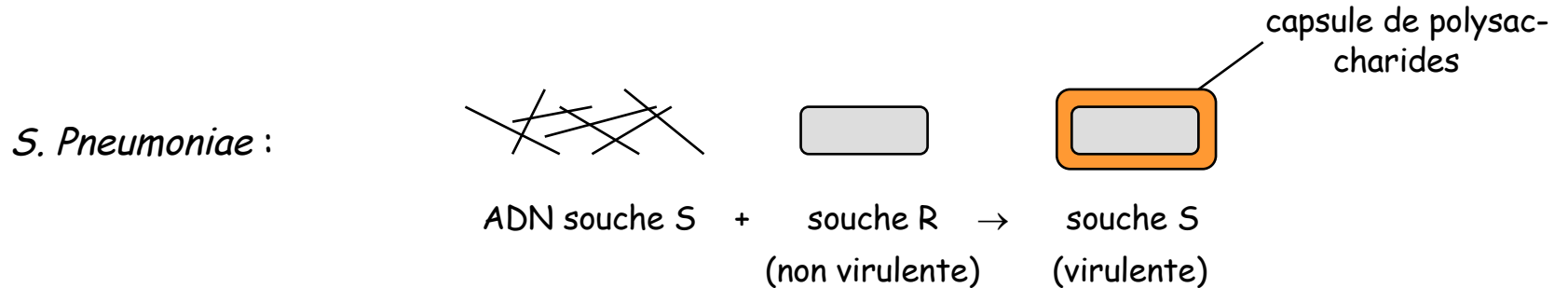


cette recombinaison implique des événements de coupure - ligature de l'ADN, et fait apparaitre des zones hétéroduplexes

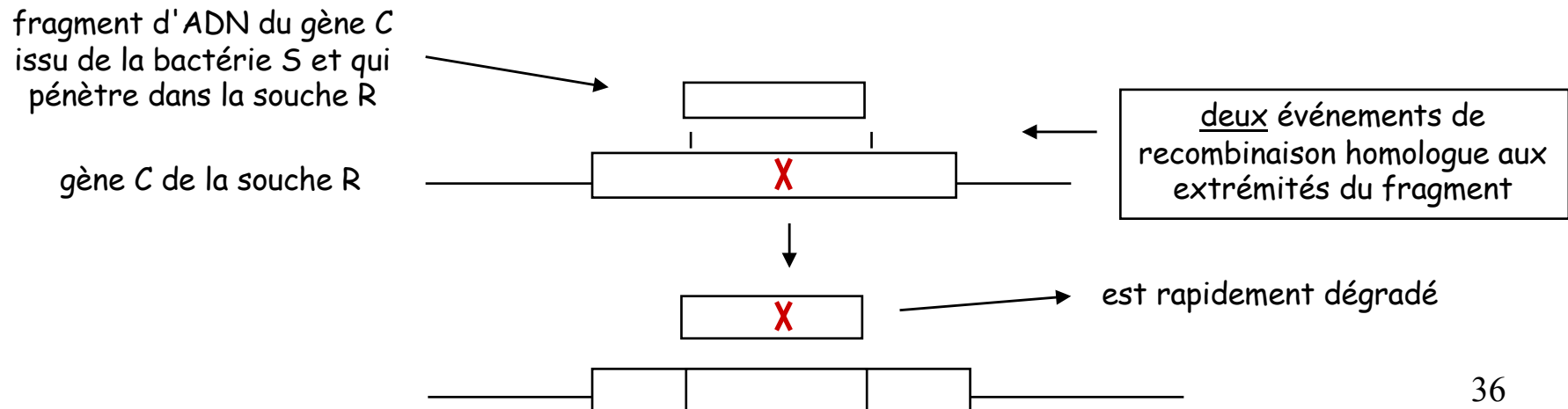
3.2 Mise en évidence chez les bactéries

Ce sont notamment des observations sur les bactéries qui ont mis en évidence l'existence de la r.h. et qui ont permis d'en étudier les mécanismes moléculaires

Ex. le phénomène de transformation (rappel)



l'explication : le gène C mutant (→ capsule) de la souche R a recombiné avec le gène C sauvage provenant de la souche S

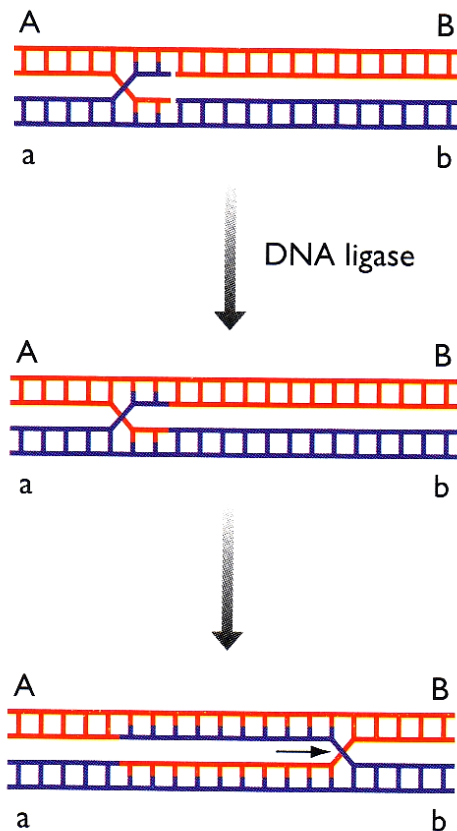


3.3 Mécanisme de la recombinaison homologue



R. Holliday

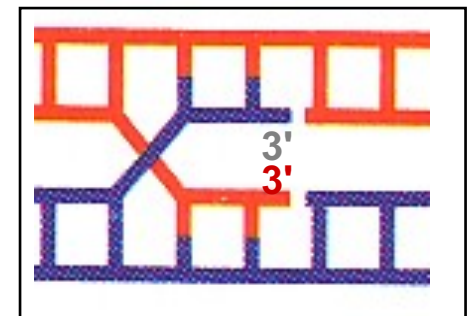
3.3.1 Le modèle initial de Robin Holliday (1964)



- recombinaison initiée par deux coupures monobrin identiques (au même endroit de chaque molécule d'ADN)

- désappariement des brins monocaténaire se terminant par l'extrémité 3', croisement et réappariement hétéroduplexe

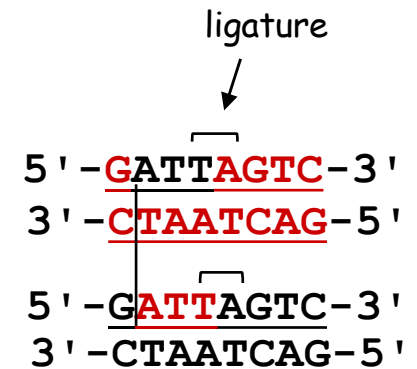
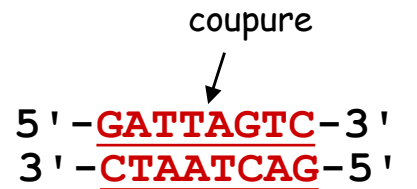
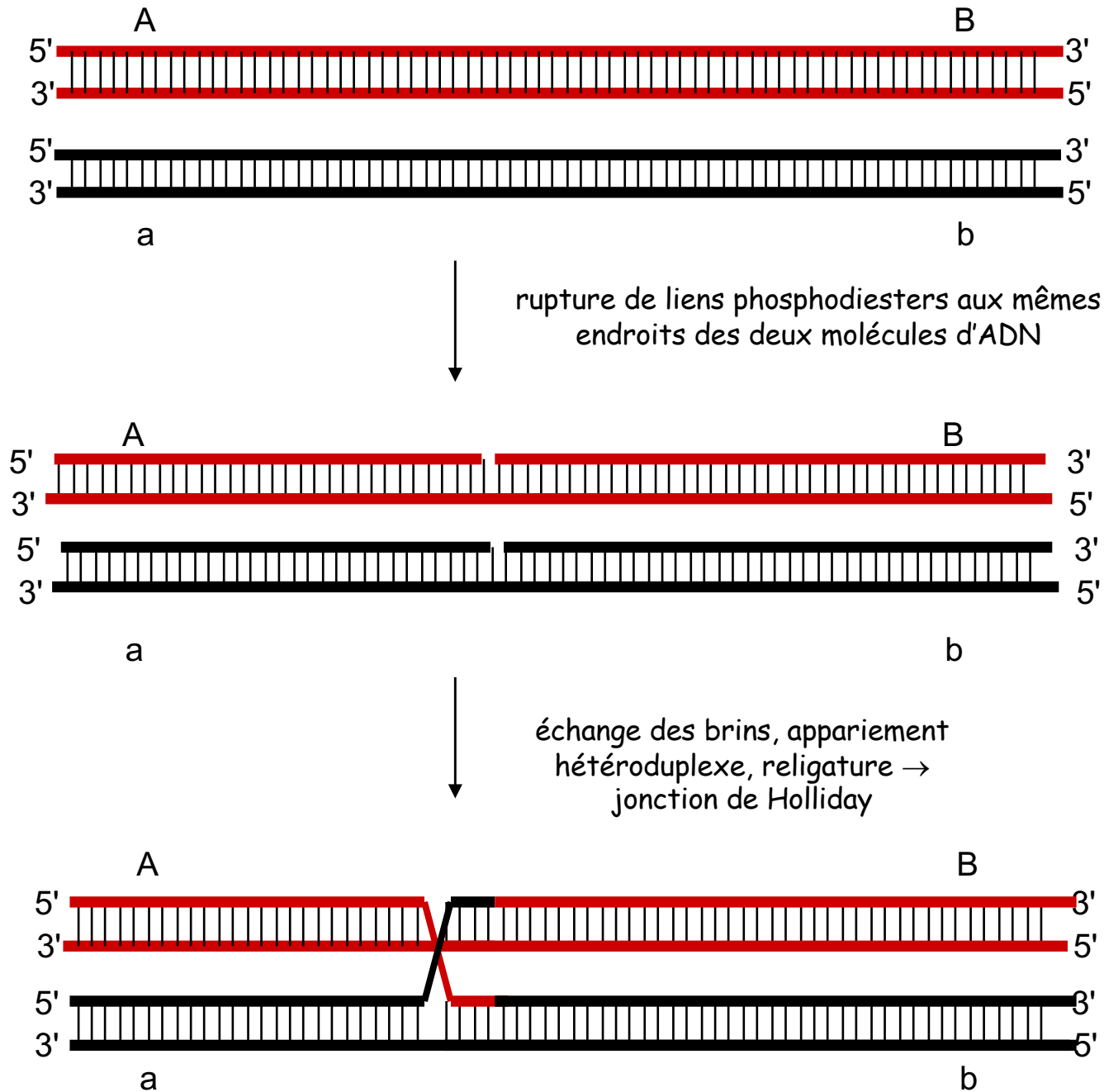
- ligation > "jonction de Holliday" avec zone hétéroduplexe



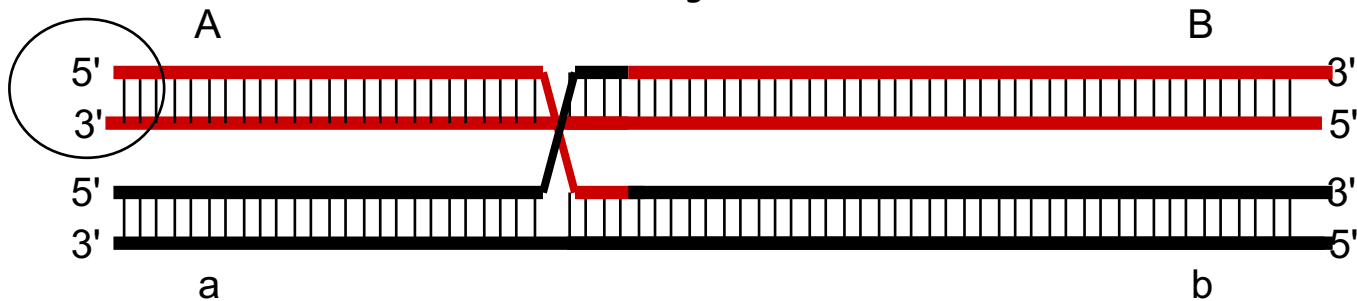
- migration (ou glissement) de la jonction (> allongement de la zone hétéroduplexe)

(voir hXjBGquVrw sur Youtube)

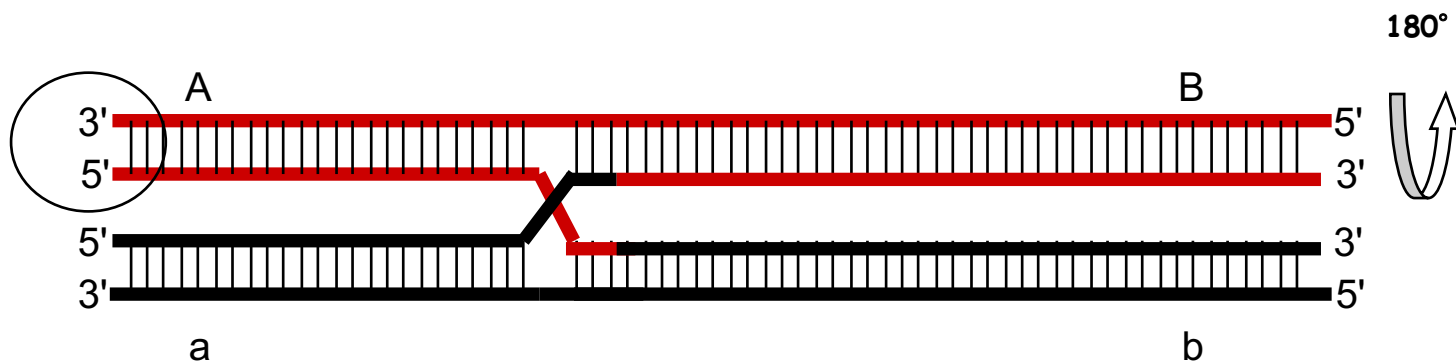
De manière plus détaillée ...



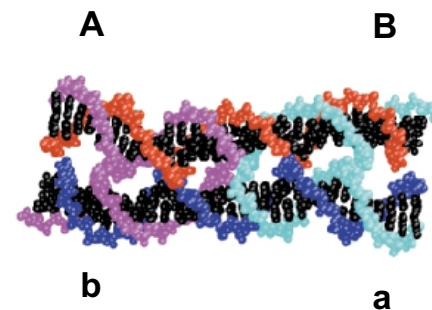
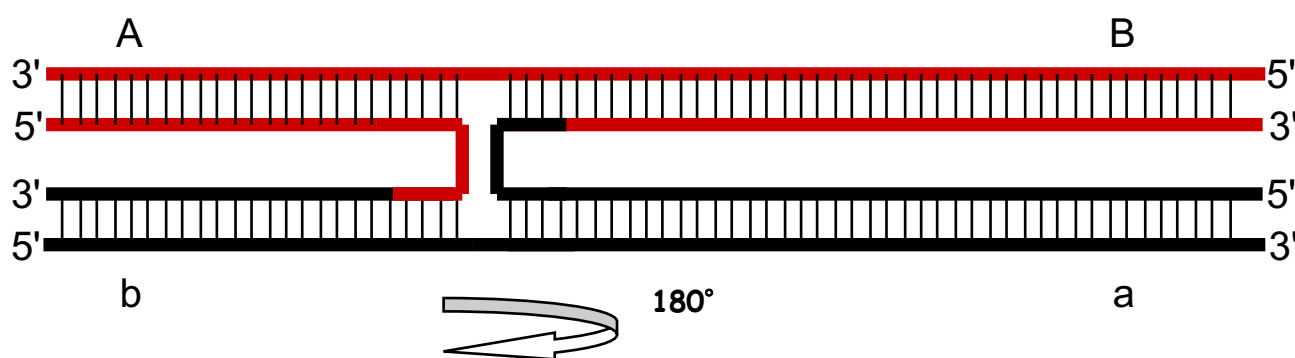
(glissement non illustré ici)

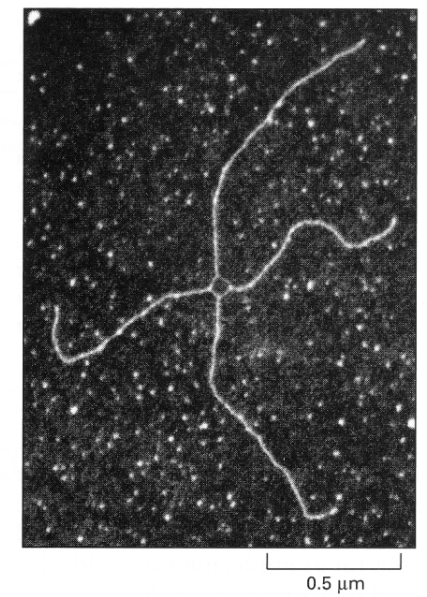
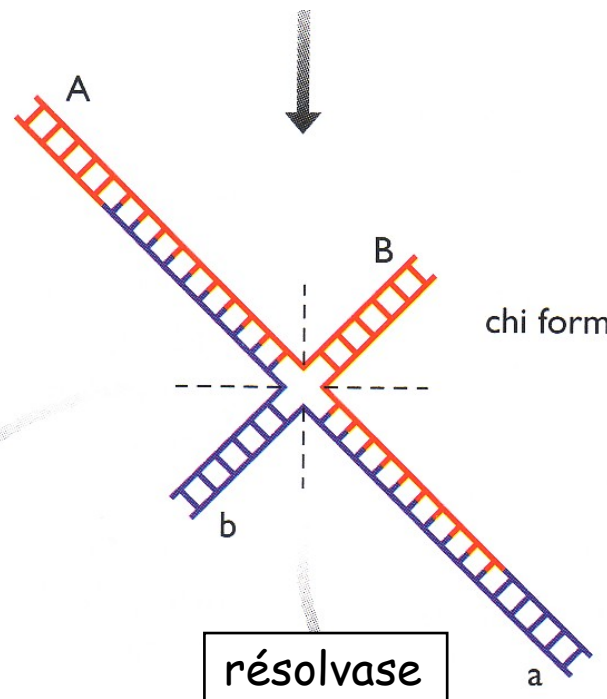
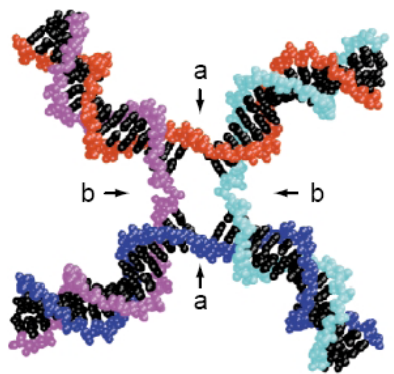


Autres représentations de la jonction de Holliday :



deux rotations de 180°



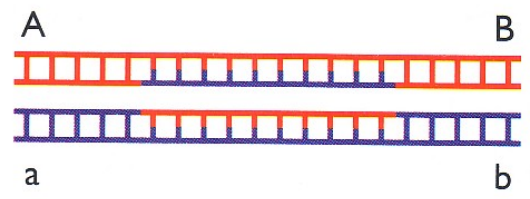


résolution horizontale

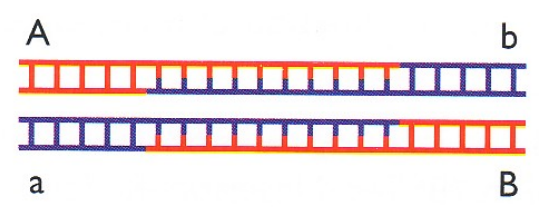
résolvase

résolvase

résolution verticale



pas d'échange réciproque



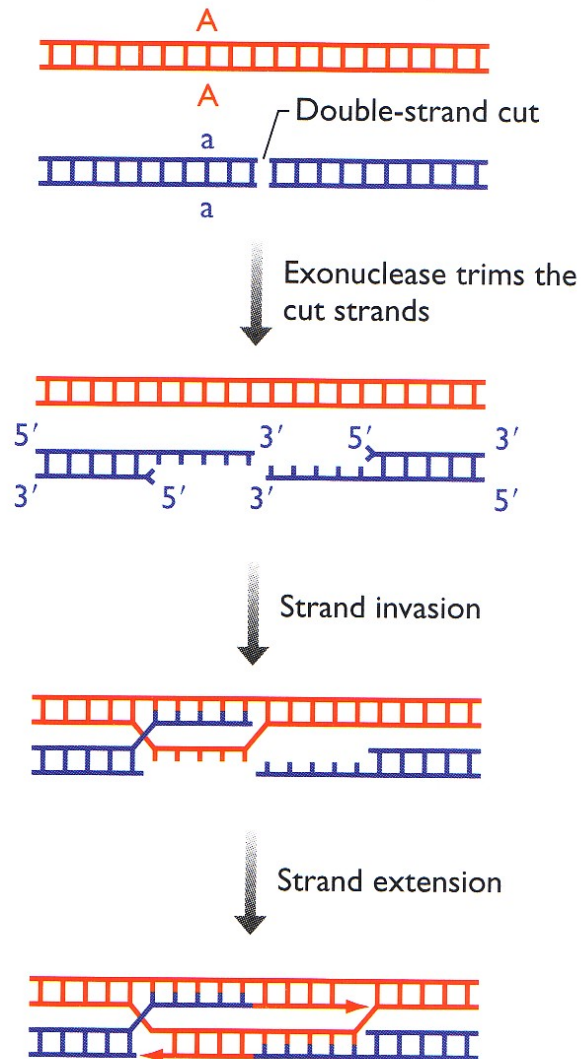
échange réciproque (c/o)

Voir
gQFKdA3VgEg
sur YouTube

dans les deux cas, une zone hétéroduplexe d'ADN apparaît > à l'origine du phénomène de "conversion génique" (cf. chap. III)

3.3.2 Le mécanisme de recombinaison tel qu'il est connu actuellement

rem : la première étape du modèle de Halliday n'a pu être vérifiée (l'enzyme réalisant une coupure identique sur les deux brins d'ADN homologue n'existe pas ..).

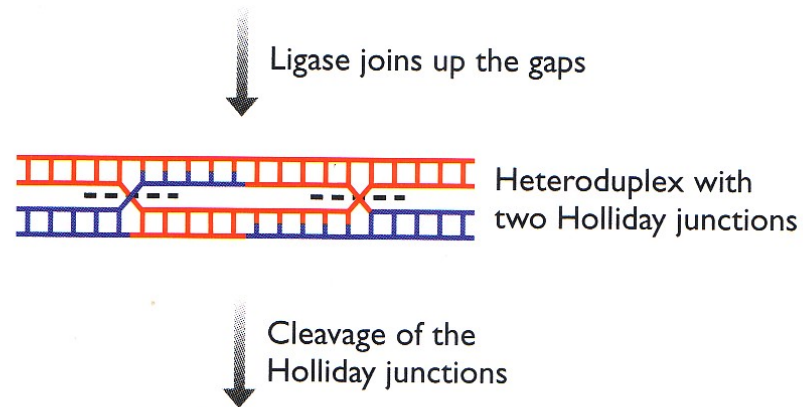


Recombinaison initiée par une coupure double-brin sur une seule molécule d'ADN (accidentelle, ou par une enzyme - ex. Spo11 de la levure)

Un complexe hélicase/5'-exonucléase dépolymérise l'ADN → génération de monobrans d'ADN avec des extrémités 3' protrudentes

Invasion par une fibre monocaténaire de la molécule homologue d'ADN → séparation des deux brins → appariement complémentaire → boucle en "D"

L'extrémité 3' du brin invasif est prolongée par polymérisation, de même que l'autre extrémité 3' (en utilisant le brin de la boucle "D" comme matrice) → donc, les brins d'ADN hydrolysés sont resynthétisés.



Deux ligatures 5' - 3' →
deux jonctions de Holliday,
 qui glissent (non illustré)

- 2 résolutions verticales ou 2 horizontales : pas d'échange réciproque

- 1 résolution verticale et 1 horizontale : échange réciproque (c/o)

;-) cf. animations "plasticine" sur YouTube: 3qgBKrAZCLg ou hpHVryxV4UU

3.4 La "machinerie" moléculaire de la recombinaison homologue

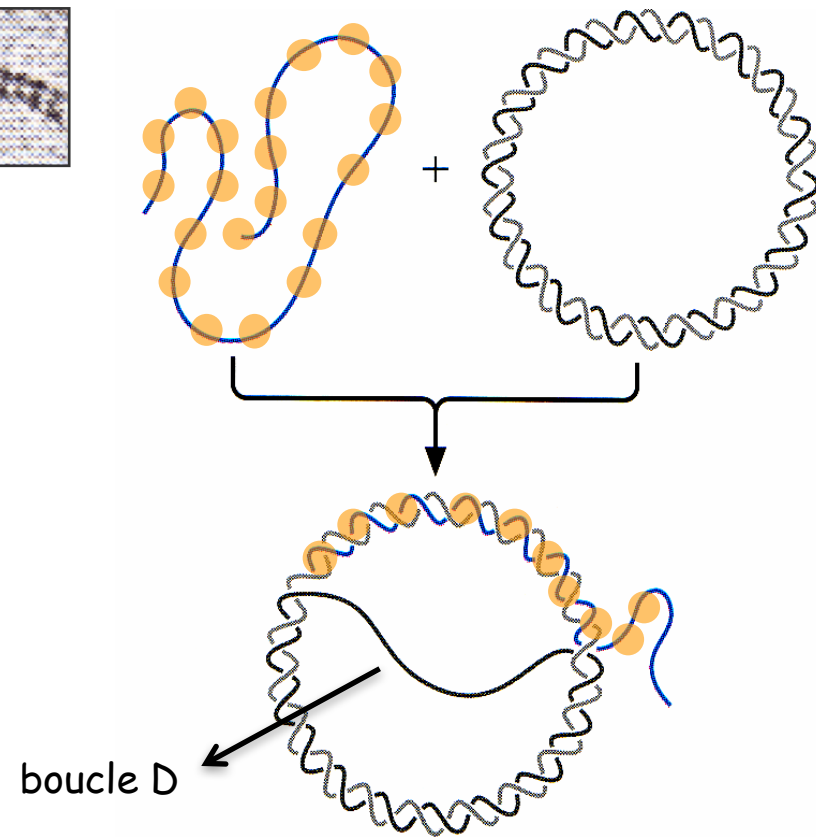
Etape du processus de recombinaison homologue	Protéine(s) intervenant chez E. coli	Protéine(s) intervenant chez les eucaryotes
Coupure double-brin dans l'ADN (endonucléase)	Aucune ⁽¹⁾	Spo11 (méiose)
Génération des fibres monocaténares 3' (hélicase & 5' exonucléase)	RecBCD	Rad50/58/60 (MRX)
Invasion par l'ADN monocaténaire de l'ADN double-brin homologue (recombinase)	RecA (= recombinase)	Rad51 ⁽²⁾ Dmc1 (méiose)
Liaison aux jonctions de Holliday et glissement ("branch migration")	RuvAB	inconnu
Résolution des jonctions de Holliday (résolvase)	RuvC	Yen1 (GEN1)

⁽¹⁾ Un fragment d'ADN qui pénètre dans une bactérie a des extrémités potentiellement invasives

⁽²⁾ Rad : mutants *rad51*, *rad50*, .. de levure : hypersensibles aux radiations ionisantes

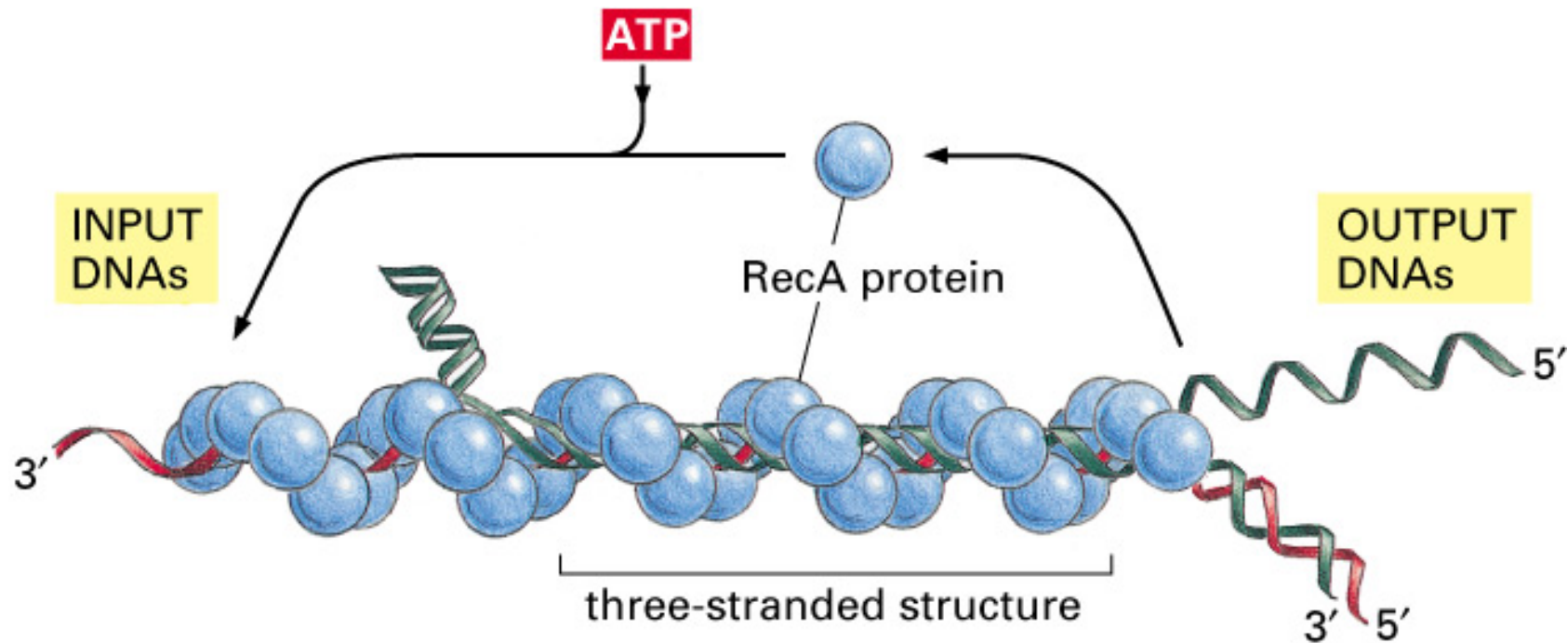


Photographie en microscopie électronique de plasmides dénaturés (simple-brin) partiellement (en bas) ou totalement (en haut) recouverts de protéines RecA. La liaison de RecA allonge de 1,5 fois l'ADN.

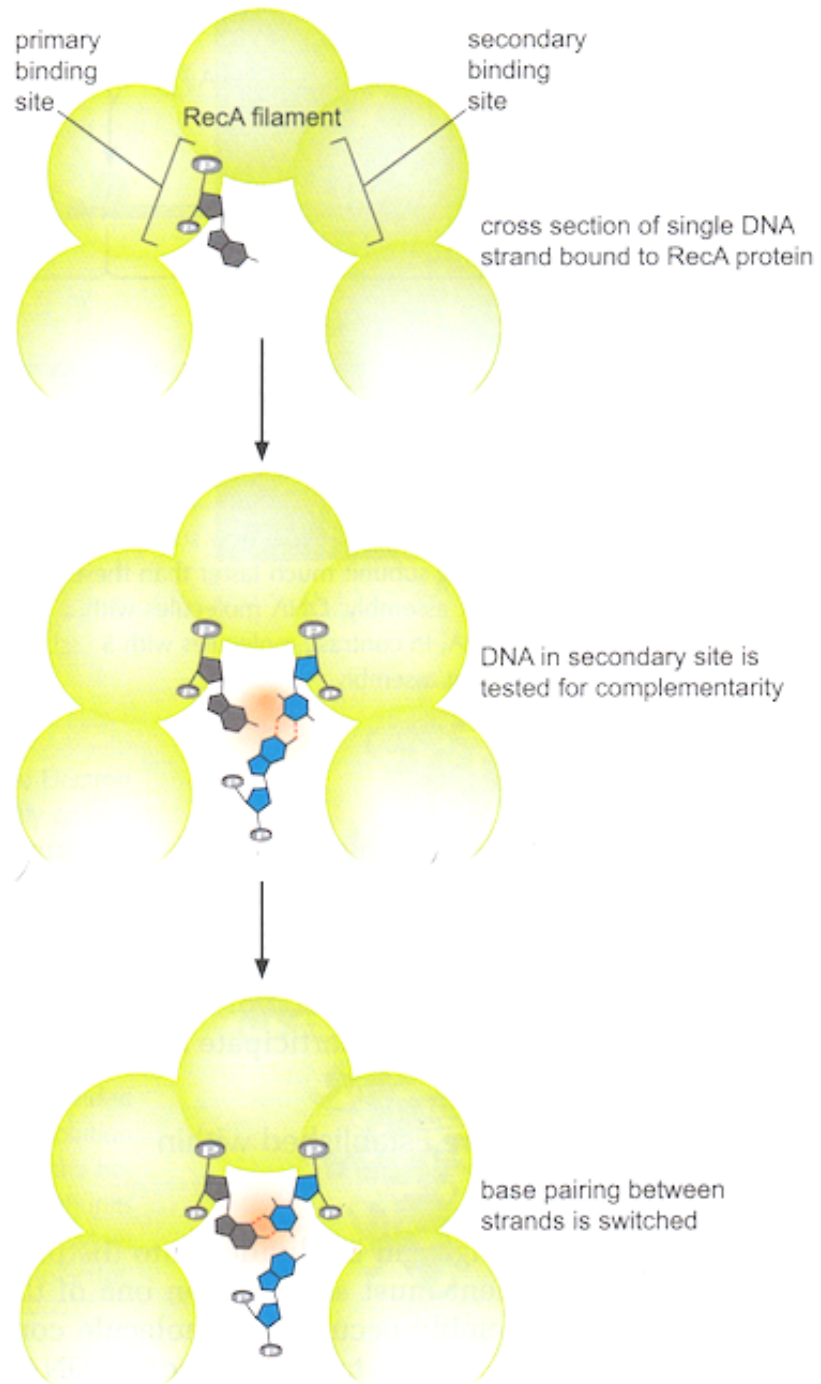


Activités de RecA in vitro:

- RecA se lie à de l'ADN mono-brin (polymère hélicoïdal de RecA)
- si on ajoute une molécule d'ADN homologue, l'ADN mono-brin associé à RecA s'apparie au brin complémentaire, le mono-brin "déplacé" forme la boucle D
- aucune formation de boucle en D si l'ADN double-brin ajouté n'est pas homologue !



- association de protéines RecA à l'ADN monobrin (en rouge) → structure hélicoïdale étendue
- liaison du complexe hélicoïdal RecA-ADN monobrin à l'ADN double-brin (en vert) → structure intermédiaire à trois brins d'ADN
- quand une zone homologue est trouvée, échange de brins d'ADN, suivie de la dissociation de RecA (-> boucle en D)



Filament de RecA lié à l'ADN monobrin invasif (vue transversale de la structure hélicoïdale)

Liaison de l'ADN double-brin (en bleu) > structure à trois brins avec possibilité d'un nouvel appariement (si complémentarité !)

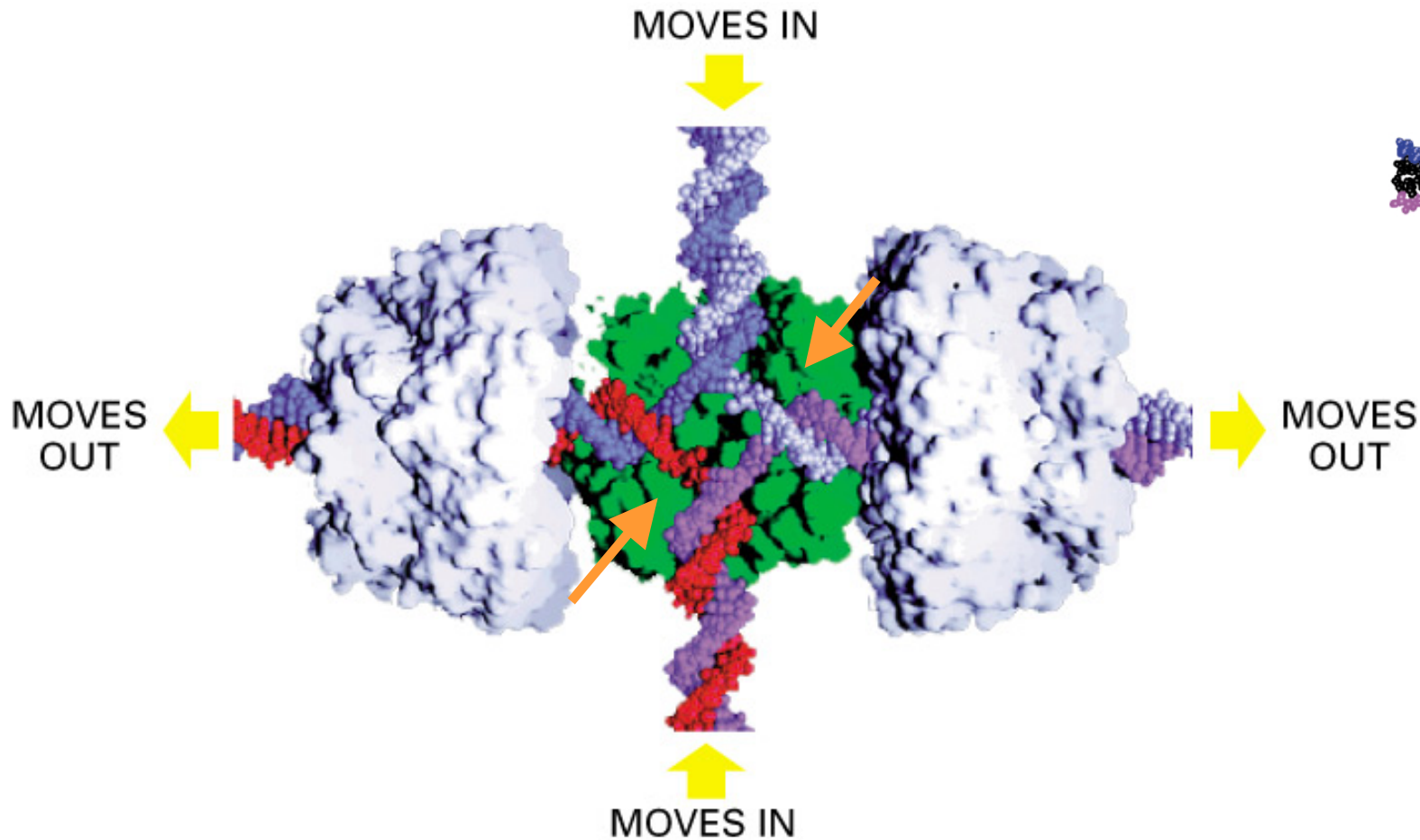
Le nouvel appariement entre le mono-brin invasif (gris) et son complémentaire (bleu) "libère" l'autre mono-brin (bleu)

<u>Etape du processus de recombinaison homologue</u>	<u>Protéine(s) intervenant chez E. coli</u>	<u>Protéine(s) intervenant chez les eucaryotes</u>
Coupure double-brin dans l'ADN (endonucléase)	Aucune ⁽¹⁾	Spo11 (méiose)
Génération des fibres monocaténares 3' (hélicase & 5' exonucléase)	RecBCD	Rad50/58/60 (MRX)
Invasion par l'ADN monocaténaire de l'ADN double-brin homologue (recombinase)	RecA (= recombinase)	Rad51 ⁽²⁾ Dmc1 (méiose)
Liaison aux jonctions de Holliday et glissement ("branch migration")	RuvAB	inconnu
Résolution des jonctions de Holliday (résolvase)	RuvC	Mus81 ?

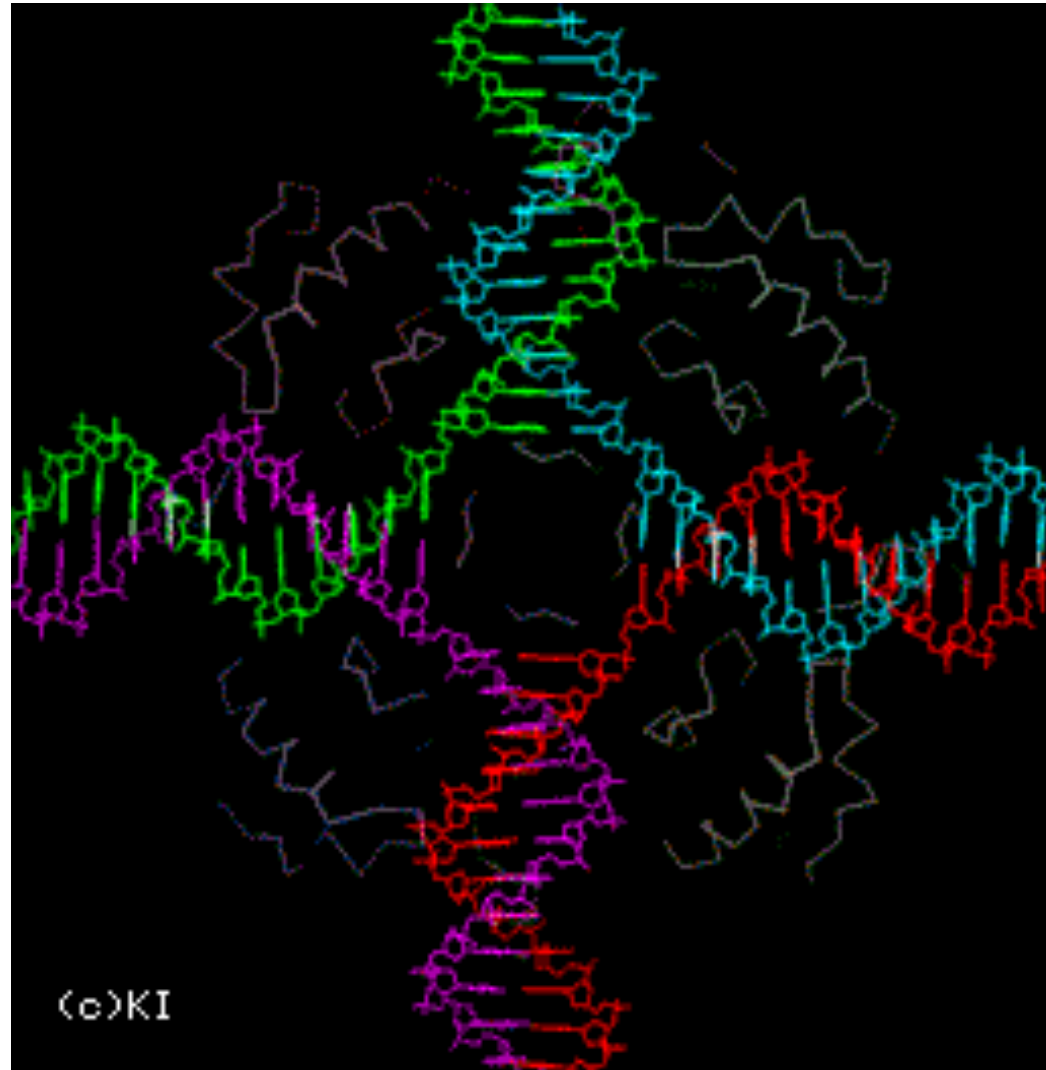
dernières étapes



Glissement et résolution de la jonction de Holliday :

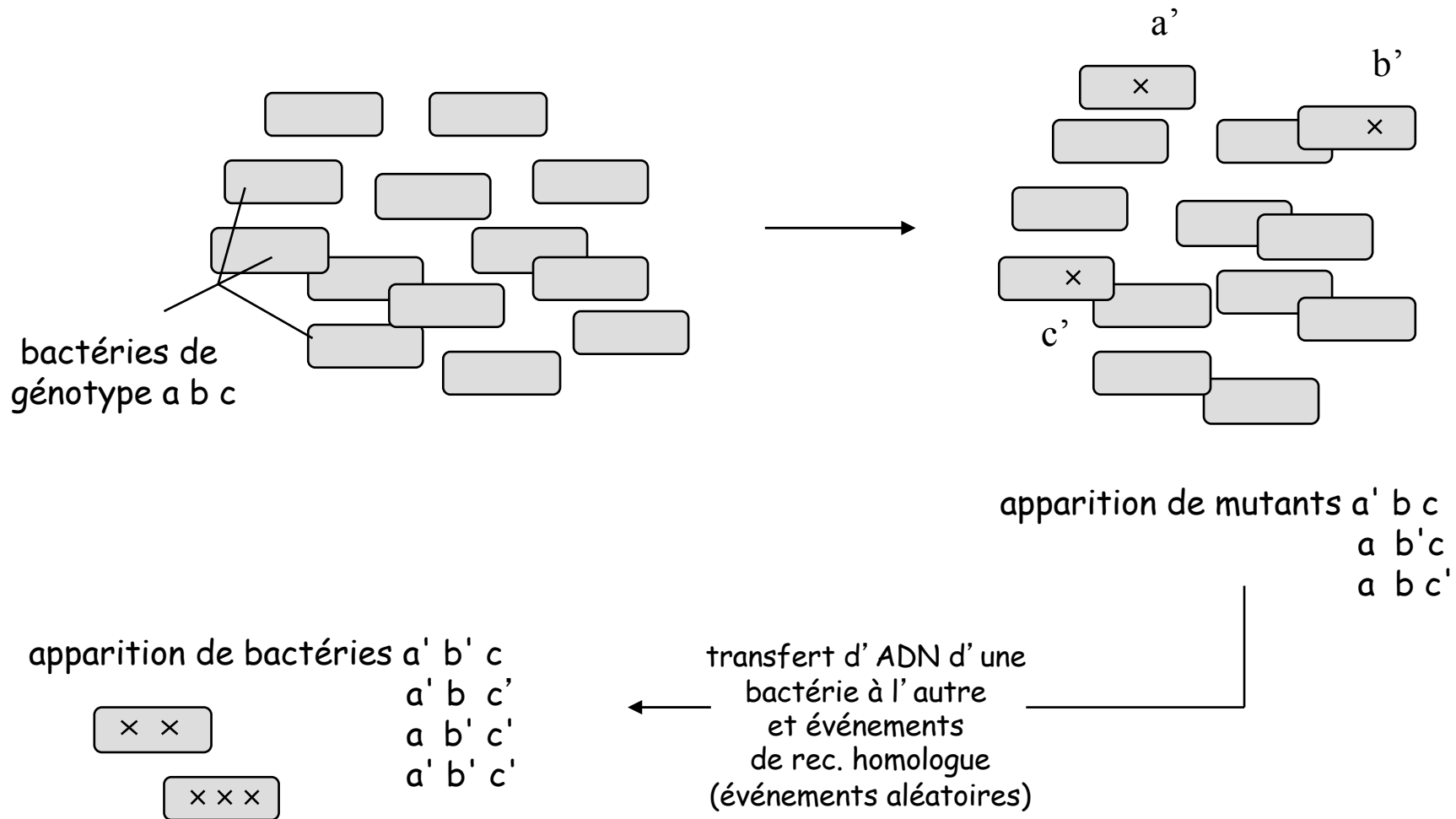


Modèle moléculaire du tétramère RuvA (en vert) lié à la jonction de Holliday (4 brins d'ADN). Les protéines RuvA recrutent les hexamères RuvB. L'ADN au coeur des complexes RuvB migre ("moves out"), cela est couplée à l'hydrolyse d'ATP (-> glissement de la jonction de H.) . Après migration, la protéine RuvC (un dimère **résolvase**, non montré) se lie à RuvA et clive l'ADN (ex. flèches oranges, mais le clivage peut se produire perpendiculairement aussi)



3.5 Rôles de la recombinaison homologue

3.5.1 Brassage génétique



-> accroissement de la diversité génétique au sein de l'espèce

3.5.2 Réparation de l'ADN lors de coupures double-brin

Le principe : pour que les extrémités de l'ADN sectionné puissent se réassocier, une de ces extrémités est prolongée à son extrémité 3' en utilisant comme matrice une molécule homologue d'ADN. Une fois cette extension réalisée (en pointillé rouge), l'extrémité 3' est capable de se réassocier à l'autre extrémité, par simple complémentarité.

Le mécanisme: les premières étapes (dépolymérisation, invasion d'un brin 3', polymérisation en 3') sont similaires à celles de la rec. homologue. Mais l'ADN invasif prolongé par polymérisation se réassocie à son brin complémentaire d'origine plutôt que de former une jonction de Holliday, et la boucle " D " se réapparie à son brin complémentaire d'origine également. Aucune jonction de Holliday n'est donc formée.

Hypothèse: le mécanisme de r.h. permettant de brasser les allèles serait apparu au cours de l'évolution à partir de ce mécanisme (plus simple) de réparation des coupures double-brin

