

N° Ordre : 3338

de la thèse

THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : *DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1*

MENTION : BIOLOGIE

par

Christophe ROUILLON

Equipe d'accueil : Laboratoire de Microbiologie des environnements extrêmes, UMR 6197,
IFREMER, centre de Brest

Ecole doctorale : Université de Rennes1, Vie-Agro-Santé (VAS)

Composante universitaire : Sciences de la Vie et de l'Environnement

**LA REPLICATION DE L'ADN CHEZ L'EURYARCHAEA
PYROCOCCUS ABYSSI : MISE EN PLACE ET DYNAMIQUE DU
COMPLEXE**

Soutenu le 19 juin 2006 devant la commission d'examen :

COMPOSITION DU JURY :

| | |
|---|--------------------|
| Professeur Daniel BOUJARD, Université de Rennes 1 | Président |
| Professeur Patrick FORTERRE, Université d'Orsay | Rapporteur |
| Docteur Robert FUCHS, IBSM Marseille | Rapporteur |
| Docteur Jean-Paul RAFFIN, UMR6197 Plouzané | Directeur de thèse |
| Docteur Gilbert SALBERT, Université de Renne 1 | Examineur |
| Docteur Joël QUERELLOU, UMR6197 Plouzané | Examineur |

REMERCIEMENTS

Nous sommes tous bons quand nous donnons notre bon fond
A mes collègues, amis, famille, voisins, passants...
A l'océan...



MERCI !

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATIONS..... | 8 |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 9 |
| I | |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE..... | 12 |
| LES ARCHAEA : | 13 |
| <i>I. Troisième règne du monde vivant</i> | 13 |
| <i>II. Les grands groupes</i> | 15 |
| <i>III. Les thermococcales</i> | 15 |
| III.1. Le genre <i>Pyrococcus</i> : | 15 |
| III.2. <i>Pyrococcus abyssi</i> | 16 |
| <i>IV. Caractères communs aux archées et aux eucaryotes</i> | 16 |
| <i>V. Intérêt biotechnologique des archées thermophiles</i> | 18 |
| <i>VI. Thermostabilité et thermophilie</i> | 20 |
| LA REPLICATION DE L'ADN : | 24 |
| <i>I. Notion de réplisomes</i> : | 24 |
| <i>II. Le réplisome du bactériophage T4</i> : | 25 |
| <i>III. Le réplisome du procaryote bactérien Escherichia coli</i> : | 26 |
| <i>IV. Le réplisome eucaryote</i> : | 28 |
| <i>V. Le réplisome archéen</i> : | 29 |
| <i>VI. Facteurs intervenant dans la phase d'élongation</i> : | 32 |
| VI.1. Les ADN polymérase | 32 |
| VI.1.1. Motifs et structures : | 33 |
| VI.1.2. Interactions : | 34 |
| VI.2. Le facteur de réplication PCNA : | 35 |
| VI.2.1. Structure : | 35 |
| VI.2.2. Fonctions du PCNA : | 36 |
| VI.2.3. Interactions : | 38 |
| VI.3. Le facteur de réplication RF-C : | 39 |
| VI.3.1. Fonctions du RF-C : | 39 |
| VI.3.2. Structure : | 40 |
| VI.3.3. Interactions : | 42 |
| VI.4. Le facteur de stabilisation de l'ADN simple brin (RP-A) | 44 |
| VI.4.1. Fonctions du RP-A : | 44 |
| VI.4.2. Organisation structurale et fixation sur l'ADN simple brin : | 46 |
| <i>VII. Etudes effectuées sur les facteurs intervenant dans la phase d'élongation du réplisome des euryarchées : (tableau 2)</i> | 49 |

| | |
|--|-----------|
| MATERIELS ET METHODES..... | 53 |
| PROTEINES RECOMBINANTES : CONSTRUCTIONS GENETIQUES ET MATERIEL PROTEIQUE | 54 |
| I. Les ADN polymérase : | 54 |
| I.1. Les ADN polymérase B et D :..... | 54 |
| I.2. Les ADN polymérase Δ PIP :..... | 54 |
| I.2.1. Conditions utilisées pour la mutagenèse dirigée..... | 55 |
| I.2.2. Production et purification des protéines mutantes :..... | 56 |
| I.2.3. Révélation par Western Blot (figure 26) : | 57 |
| I.2.4. Production de l'ADN polymérase B Δ PIP par transcription/traduction in vitro : | 58 |
| II. Les PCNAs : (30 kDa/monomère) | 60 |
| II.1. Le PCNA sauvage (PCNAwt) : | 60 |
| II.2. Le PCNA(ded) : | 60 |
| II.2.1. Conditions de mutagenèse dirigée (tableau 4)..... | 60 |
| II.2.2. Contrôle et transformation en cellules d'expression | 60 |
| II.2.3. Production et purification de la protéine recombinante..... | 61 |
| II.3. Les PCNAs phosphorylables (ph-PCNAwt et ph-PCNA(ded)) : | 66 |
| II.3.1. Constructions génétiques | 66 |
| II.3.2. Production et purification de la protéine recombinante ; bilan : | 67 |
| III. Le RF-C : | 68 |
| IV. Le RP-A: | 68 |
| TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE | 69 |
| I. Culture de <i>Pyrococcus abyssi</i> (souche GE5) | 69 |
| II. Cultures d'<i>E. coli</i> et souches utilisées | 69 |
| III. Conditions de PCR..... | 69 |
| III.1. PCR sur ADN génomique :..... | 69 |
| III.2. PCR de contrôle sur clones : | 70 |
| IV. Extraction de l'ADN | 70 |
| IV.1. Extraction de l'ADN total de <i>P. abyssi</i> :..... | 70 |
| IV.1.1. Préparation du culot bactérien | 70 |
| IV.2. Extraction d'ADN plasmidique en petit volume (2 ml) et grand volume (50 ml) :..... | 72 |
| V. Coupure de l'ADN par des enzymes de restriction : | 72 |
| VI. Clonage en vecteur d'expression : | 72 |
| VI.1. Linéarisation du vecteur ; création des sites de clonage :..... | 72 |
| VI.2. Préparation des inserts : | 72 |
| VI.3. Ligature des inserts digérés et du vecteur linéarisé par la T4-ADN ligase :..... | 73 |
| VII. Transformation en cellules compétentes | 73 |
| VII.1. Transformation en cellule de maintenance | 73 |
| VII.2. Transformation en cellules d'expression | 73 |
| VIII. Mutagenèses dirigées..... | 74 |
| IX. Visualisation de l'ADN sur gel d'agarose..... | 74 |
| X. Séquençage de l'ADN | 75 |
| XI. Linéarisation de la matrice M13mp18 simple brin circulaire | 75 |
| TECHNIQUES DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES | 77 |
| I. Expressions de protéines recombinantes | 77 |
| I.1. Expressions en petits volumes : | 77 |
| I.2. Expression en grands volumes : | 77 |

| | |
|--|---------------|
| I.3. Expression par un système de transcription/traduction <i>in vitro</i> | 77 |
| II. Visualisation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) | 78 |
| II.1. Préparation des échantillons : | 78 |
| II.2. Migration : | 79 |
| II.3. Révélation et séchage des gels : | 79 |
| III. Purification..... | 79 |
| IV. Dosage des protéines : | 79 |
| V. Obtention de séquences peptidiques | 80 |
| V.1. Séquençage N-terminal par la méthode d'Edman : | 80 |
| V.2. Spectrométrie de masse..... | 80 |
| VI. Analyse par chromatographie en phase liquide à haute pression | 80 |
| VII. Test d'activité des ADN polymérases : | 81 |
| VII.1. Matrice d'ADN utilisée : | 81 |
| VII.2. Réaction : | 81 |
| VII.3. Comptage : | 81 |
| METHODES DE BIOCHIMIE FONCTIONNELLE ET INTERACTIONS | 82 |
| I. Chargement du PCNA par réaction de pontage au glutaraldéhyde : | 82 |
| I.1. Principe (figure 39) : | 82 |
| I.2. Phosphorylation du PCNA : | 82 |
| I.3. Préparation de la matrice d'ADN amorcée : | 83 |
| I.4. Chargement et visualisation du complexe ADN/PCNA : | 83 |
| I.4.1. Réaction de chargement | 83 |
| I.4.2. Electrophorèse et révélation | 83 |
| II. Synthèse d'ADN <i>in vitro</i> : (figure 40)..... | 84 |
| II.1. Matrice d'ADN amorcé : | 84 |
| II.2. Réaction d'élongation : | 84 |
| II.3. Gel alcalin : | 85 |
| II.3.1. Préparation du gel : | 85 |
| II.3.2. La migration : | 85 |
| II.3.3. Séchage et révélation : | 85 |
| II.3.4. Marqueur de taille | 85 |
| III. Interactions des protéines avec un ADN simple brin amorcé | 86 |
| III.1. Visualisation par western blot : | 86 |
| III.1.1. principe (figure 41)..... | 86 |
| III.1.2. Matrice d'ADN utilisée | 86 |
| III.1.3. Utilisation de billes magnétiques streptavidinées | 87 |
| III.1.4. Ajout des protéines : | 87 |
| III.1.5. Western Blot et révélation par anticorps : | 87 |
| III.2. Résonance plasmonique de surface : | 88 |
| III.2.1. Principe de la résonance plasmonique de surface | 88 |
| III.2.2. Principe de fonctionnement de l'appareillage utilisé (Biacore X) | 89 |
| III.2.3. Expériences réalisées | 89 |
| RESULTATS | 91 |
| I. Etude du chargement du PCNA : | 92 |
| I.1. Le PCNA de <i>P. abyssi</i> se charge sur l'ADN en absence de RF-C : | 92 |
| I.2. Importance de la structure trimérique du PCNA..... | 94 |
| I.2.1. Obtention d'un PCNA mutant incapable de former un trimère : | 94 |

| | |
|---|------------|
| I.2.2. Le PCNA(ded) ne forme pas de trimère en solution :..... | 96 |
| I.2.3. Le marquage du PCNA(ded) est plus efficace que celui du PCNA sauvage | 97 |
| I.2.4. Le PCNA(ded) n'interagit pas avec l'ADN..... | 97 |
| I.3. Stœchiométrie fonctionnelle du RF-C | 98 |
| I.4. Quantification de l'intensité du signal de chargement | 99 |
| I.5. Le RF-C est-il un facteur de déchargement ?..... | 101 |
| I.6. Stabilité du complexe PCNA/ADN : | 103 |
| I.7. L'ADN polymérase B stimule le chargement du PCNA | 104 |
| I.8. Visualisation d'un complexe fonctionnel | 106 |
| I.8.1. Elongation de l'amorce par l'ADN polymérase B..... | 106 |
| I.8.2. Importance de la nature de l'amorce | 107 |
| | |
| II. Etude de la synthèse d'ADN par les ADN polymérases B et D en présence des facteurs accessoires | 108 |
| II.1. Temps d'incubation en présence de l'ADN polymérase B :..... | 108 |
| II.2. Le PCNA : facteur de processivité pour l'ADN polymérase B | 109 |
| II.3. Le RF-C déstabilise le complexe PCNA/ADN polymérase B :..... | 110 |
| II.4. Le RF-C n'a pas d'influence sur l'activité du complexe PCNA/ADN polymérase D : | 112 |
| | |
| III. Importance des motifs d'interaction avec le PCNA | 114 |
| | |
| IV. Les ADN polymérases Δ PIP | 115 |
| IV.1. La synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B Δ PIP n'est plus stimulée par le PCNA | 115 |
| IV.2. L'ADN polymérase D Δ PIP interagit physiquement avec le PCNA..... | 116 |
| IV.3. Le chargement spontané du PCNA est aboli en présence de l'ADN polymérase B Δ PIP..... | 117 |
| | |
| V. Visualisation par pull-down des complexes au niveau d'un ADN simple brin amorcé : | 118 |
| V.1. Affinité du PCNA pour l'ADN et influence de la température | 118 |
| V.1.1. Affinité : | 118 |
| V.1.2. Influence de la température :..... | 119 |
| V.2. Le complexe RF-C/PCNA | 121 |
| V.2.1. Devenir du RF-C après chargement :..... | 121 |
| V.2.2. Formation d'un complexe ADN-indépendant :..... | 122 |
| V.3. Présence des ADN polymérases au niveau de l'ADN simple brin amorcé | 124 |
| V.3.1. Reconnaissance de l'amorce et recrutement sur le PCNA : | 124 |
| V.3.2. Déplacement de l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B :..... | 124 |
| V.4. Stabilité du complexe RF-C/PCNA en présence des ADN polymérases | 128 |
| V.4.1. Influence de l'ADN polymérase B :..... | 128 |
| V.4.2. Influence de l'ADN polymérase D : | 128 |
| | |
| DISCUSSION | 131 |
| | |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 142 |
| CONCLUSIONS | 143 |
| PERSPECTIVES | 144 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 145 |

| | |
|--|------------|
| ANNEXES..... | 163 |
| ANNEXE 1 : TRAVAUX EFFECTUES SUR LE RP-A | 164 |
| <i>I. Obtention des constructions plasmidiques portant les gènes du RP-A :</i> | 164 |
| I.1. Sélection et amplification : | 164 |
| I.2. Clonage en vecteur d'expression : | 164 |
| <i>II. Expression des protéines recombinantes :</i> | 166 |
| II.1. Obtention d'une protéine RP-A1 tronquée : | 166 |
| II.2. Obtention de la protéine RP-A2 : | 168 |
| II.3. La protéine RP-A3 n'est pas exprimée : | 169 |
| II.4. Expression de l'opéron RP-A : | 169 |
| <i>III. Coexpression des trois sous unités du RP-A</i> | 170 |
| III.1. Purification de l'extrait protéique sur colonne d'ADN simple brin : | 171 |
| III.2. Analyse par spectrométrie de masse : | 171 |
| <i>IV. Travaux en cours et perspectives :</i> | 173 |
| ANNEXE 2 : TAMPONS..... | 174 |
| <i>I. Milieux de culture</i> | 174 |
| <i>II. Tampons d'électrophorèse SDS-Page :</i> | 175 |
| <i>III. Tampons de lyse cellulaire</i> | 175 |
| <i>IV. Tampons de purification</i> | 176 |
| ANNEXE 3 : FICHES D'IDENTITE DES PROTEINES | 177 |
| <i>I. PabPol B</i> | 177 |
| <i>II. PabPol D</i> | 178 |
| <i>III. PabPCNA</i> | 179 |
| <i>IV. PabRF-C</i> | 179 |

Abréviations

ADN : Acide DesoxyRiboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adenosine TriPhosphate

BER : Base Excision Repair

Cdk : Cyclin dependant kinase

Ctf1 : Chromosome transmission fidelity factor

dNTP : desoxyribo Nucleotide Tri Phosphate

DSBR : Double strand Break Repair

ERCC : Excision Repair Cross-Complementing

Fen-1 : Flap Endonuclease

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

Gadd: Growth Arrest and DNA Damage

LUCA : Last universal common ancestor

MCM : Mini Chromosome Maintenance

MMR : MisMatch Repair

MyD : Myeloid Differentiation

NER : Nucleic Excision Repair

ORC : Origin Recognition Complex

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIP : PCNA Interacting Protein

Pol : ADN polymérase

RP-A : Replication Protein A

RP-C : Replication Factor C

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SSB : Single Strand Binding Protein

XP : *Xeroderma Pigmentosum*

INTRODUCTION GENERALE



Inroduction générale :

La réplication de l'ADN est un événement métabolique essentiel qui permet la transmission de l'information génétique présente chez tous les organismes vivants. Peu après la mise en évidence de la structure moléculaire de l'ADN, il y a plus de 50 ans (Watson et Crick 1953a; Watson et Crick 1953b), les premiers travaux de caractérisation de l'activité d'une ADN polymérase ont été amorcés (Kornberg *et al.* 1955). Les études effectuées depuis ont révélé que les ADN polymérases répliquatives sont assistées par des facteurs accessoires qui leur confèrent un caractère processif lors de la phase d'élongation. Le complexe protéique actif, mis en place aux origines de réplication, est appelé réplisome. Un des constituants majeurs est le PCNA (anneau β chez *E. coli*), protéine circulaire capable de coulisser librement le long de l'ADN. Ce facteur est souvent assimilé à une plate-forme avec laquelle interagissent les protéines intervenant dans les mécanismes liés à l'intégrité et à la transmission de l'information génétique. Le PCNA est chargé sur l'ADN par le facteur RF-C (complexe γ chez *E. coli*) de manière ATP dépendante. Lors de la réplication de l'ADN, le chargement du PCNA est l'étape précédant le recrutement de l'ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire, tandis que l'ADN simple brin est stabilisé par le facteur RP-A (SSB chez *E. coli*). Ces facteurs sont fonctionnellement et structurellement très conservés chez les trois règnes du monde vivant, et particulièrement entre les eucaryotes et les euryarchées, phylum du domaine Archaea.

La mise en évidence, dans les années 70 (Woese et Fox 1977), de la lignée Archaea, troisième domaine du monde vivant, est d'un grand intérêt pour qui s'intéresse à l'évolution cellulaire, car elle présente des caractères communs avec la lignée eucaryote, en particulier en ce qui concerne les métabolismes liés à l'ADN. De plus, l'étude de certains microorganismes archées, possédant des caractéristiques extrêmophiles, permet l'isolation de protéines valorisables, en particulier les enzymes thermostables.

Le travail de thèse a porté sur la caractérisation du réplisome de l'euryarchée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*, et plus précisément sur l'étude de la phase d'élongation, comprenant le chargement du PCNA, et la synthèse d'ADN.

Les quatre principaux facteurs intervenant dans ces étapes ont été isolés, d'après la séquence complète du génome de *P. abyssi* (<http://www.genoscope.cns.fr/Pab/>), puis caractérisés au laboratoire ; à savoir (annexe 3) :

- (i) Une ADN polymérase monomérique de la famille B (Gueguen *et al.* 2001)
- (ii) Une ADN polymérase dimérique de la famille D (Gueguen *et al.* 2001)
- (iii) Un PCNA homologue trimérique (Henneke *et al.* 2002)
- (iv) Un RF-C homologue de stœchiométrie indéterminée (Henneke *et al.* 2002)

Afin de disposer de l'intégralité des facteurs, montrés comme intervenant dans la phase d'élongation (figure 1), le clonage des gènes et l'expression des protéines correspondant au facteur RP-A ont été mis en œuvre. Devant les difficultés rencontrées pour obtenir l'ensemble des trois sous-unités, le travail de caractérisation du complexe réplcatif a été effectué avec les quatre protéines disponibles citées ci-dessus.

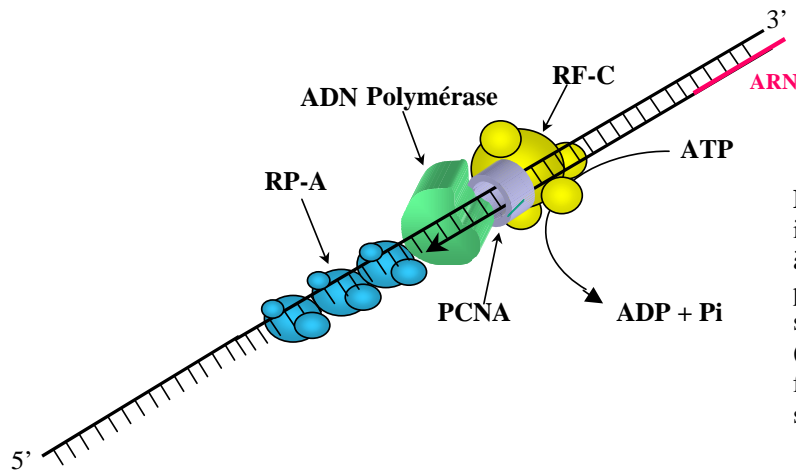


Figure 1 : Complexe de réplication intervenant dans la phase d'élongation à partir de l'amorce synthétisée par la primase. Il se compose de protéines de stabilisation de l'ADN simple brin (RP-A), d'une ADN polymérase, d'un facteur de processivité (PCNA) et de son facteur de chargement (RF-C)

Les premiers travaux de caractérisation du complexe de réplication chez *Pyrococcus abyssi* ont montré, par chromatographie sur perméation de gel, que le RF-C peut être de forme pentamérique ou hexamérique. L'hydrolyse de l'ATP, siégeant essentiellement au niveau des petites sous-unités, est stimulée par le PCNA et n'est pas dépendante de l'ADN. Le PCNA stimule également la synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase D (Henneke *et al.* 2002).

L'étude, présentée ici, est introduite par des données bibliographiques sur les archées, puis sur la réplication de l'ADN avec une partie détaillée sur les facteurs intervenant dans la phase d'élongation. Le chapitre suivant, « matériels et méthodes », s'agence en quatre parties (cf. introduction de matériels et méthodes). Le chapitre résultats présente les données obtenues lors de la caractérisation fonctionnelle du complexe de réplication étudié. Tous les travaux d'obtention de protéines recombinantes sont présentés dans la première partie de matériels et méthodes et les travaux en vue d'obtenir le facteur RP-A sont disponibles dans l'annexe 1. Il apparut plus judicieux de présenter dans le chapitre « Résultats » uniquement l'aspect fonctionnel des recherches effectuées.

En accord avec les études précédentes, effectuées chez *P. abyssi* et, en tenant compte des résultats antérieurs disponibles dans la bibliographie, un modèle dynamique de la fourche de réplication est proposé après discussion des résultats.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



Les Archaea :

I. Troisième règne du monde vivant

Les Archaea (ou archées), troisième domaine du monde vivant, ont été mises en évidence en 1977 (Woese et Fox 1977) par le biais des ARN ribosomiques. En effet, l'étude des molécules d'ARNr 16S et 18S permet, de par leur fonction inchangée bien qu'elles aient subi des mutations au cours de l'évolution, de calculer les distances génétiques entre organismes vivants (Cowan 1992). Ainsi un groupe de micro-organismes, jusque là classés dans le domaine procaryote, s'avérait appartenir à une phylogénie différente ; il est depuis représenté par les Archaea (Woese *et al.* 1990). Aujourd'hui, le monde vivant est classé suivant trois domaines (figure 2) ; un domaine étant défini comme le plus haut niveau de division taxonomique.

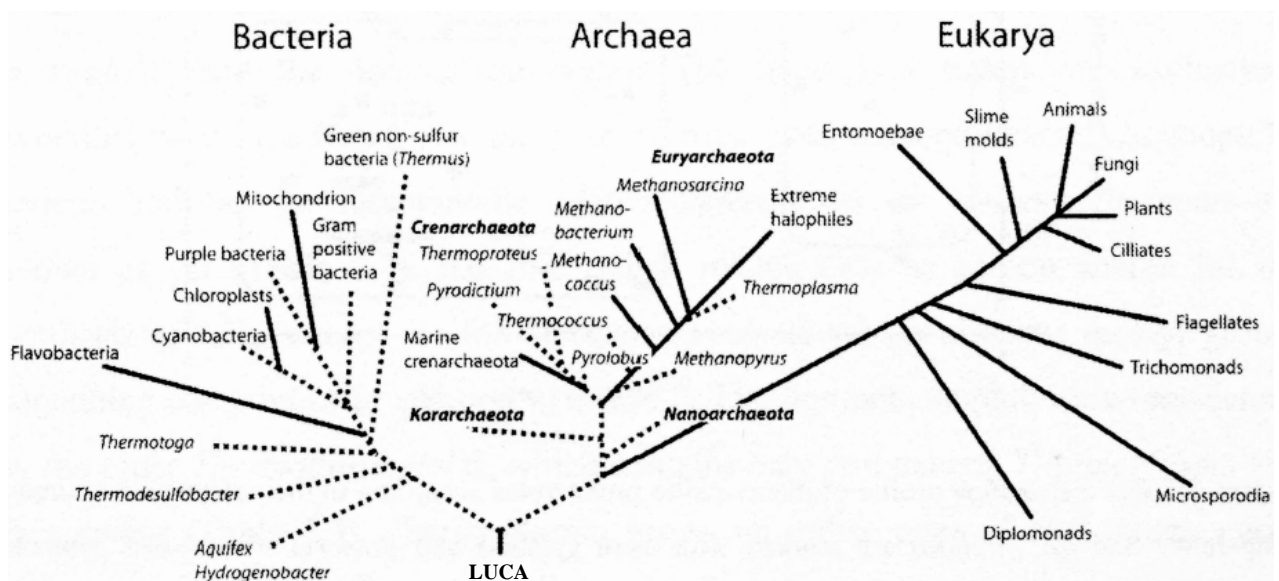


Figure 2 : Arbre phylogénétique enraciné, issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Au niveau de la racine se trouve LUCA (Last Universal Common Ancestor), l'ancêtre supposé commun aux procaryotes (Bacteria et Archaea) et aux eucaryotes (Eukarya). D'après (Madigan *et al.* 2003).

Les archées, toujours associées aux procaryotes, car il s'agit de cellules sans noyau, sont très diverses aussi bien en morphologie qu'en physiologie. En plus de leurs séquences de gènes codant pour les ARN ribosomiques, elles se distinguent des deux autres règnes de part de nombreux points concernant la structure et la chimie de la paroi, la structure des lipides membranaires (van de Vossenberg *et al.* 1998) et certaines voies métaboliques. D'un point de vue nutritionnel, elles vont des chimiolithoautotrophes aux organotrophes et ont été initialement associées aux habitats terrestres et aquatiques restreints ou spécialisés dits extrêmes, tels que les environnements hypersalins ou de température élevée. Elles sont depuis retrouvées dans de nombreuses niches écologiques moins extrêmes comme les sols, les sédiments ou les tubes digestifs d'animaux. Des études ont montré que ce domaine est quantitativement largement représenté

car il peut constituer jusqu'à 20% de la biomasse totale terrestre (DeLong et Pace 2001). En raison de leur intérêt fondamental et économique, 44 génomes archéens avaient été séquencés ou étaient en cours de séquençage en 2005 (Allers et Mevarech 2005).

Les espèces d'archées cultivables ont été classées dans deux grands sous-domaines (ou phylum) sous les termes de Crenarchaeota (Burggraf *et al.* 1997) et d'Euryarchaeota (Woese *et al.* 1990), du fait d'un nombre important de différences génétiques (Matte-Tailliez *et al.* 2002; Brochier *et al.* 2004). Un ensemble d'archées non cultivables, qui ne se regroupait pas avec ces deux sous-domaines, a été classé dans un troisième phylum appelé Korarchaeota (Barns *et al.* 1996) ; toutefois, ce groupe semble être artefactuel (Forterre *et al.* 2002).

Récemment, une nouvelle espèce archéenne, *Nanoarchaeum equitans*, a été décrite comme représentant la plus petite cellule vivante (Huber *et al.* 2002). Elle possède le plus petit génome cellulaire connu (480 kb) et vit comme symbiote obligatoire à la surface de la crénarchée hyperthermophile *Ignicoccus* sp (Huber *et al.* 2003). Le séquençage de son génome a mis en évidence des gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes informationnels (réplication, réparation, cycle cellulaire), mais les gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, nucléotides, lipides et cofacteurs ne sont pas présents. Cette capacité limitée à la biosynthèse et au catabolisme indique que *N. equitans* a une relation de parasite avec *Ignicoccus*, faisant de cet organisme le premier parasite archée connu (Waters *et al.*, 2003). Au niveau phylogénétique, les études faites sur les séquences ribosomiques de ce micro-organisme supposent qu'il se trouve à la base de l'évolution archéenne, avant la divergence des deux sous-domaines Crenarchaeota et Euryarchaeota (figure 3). Il a été proposé que cette nouvelle espèce soit considérée comme représentative d'un très ancien phylum archéen nommé Nanoarchaeota (Huber *et al.* 2002).

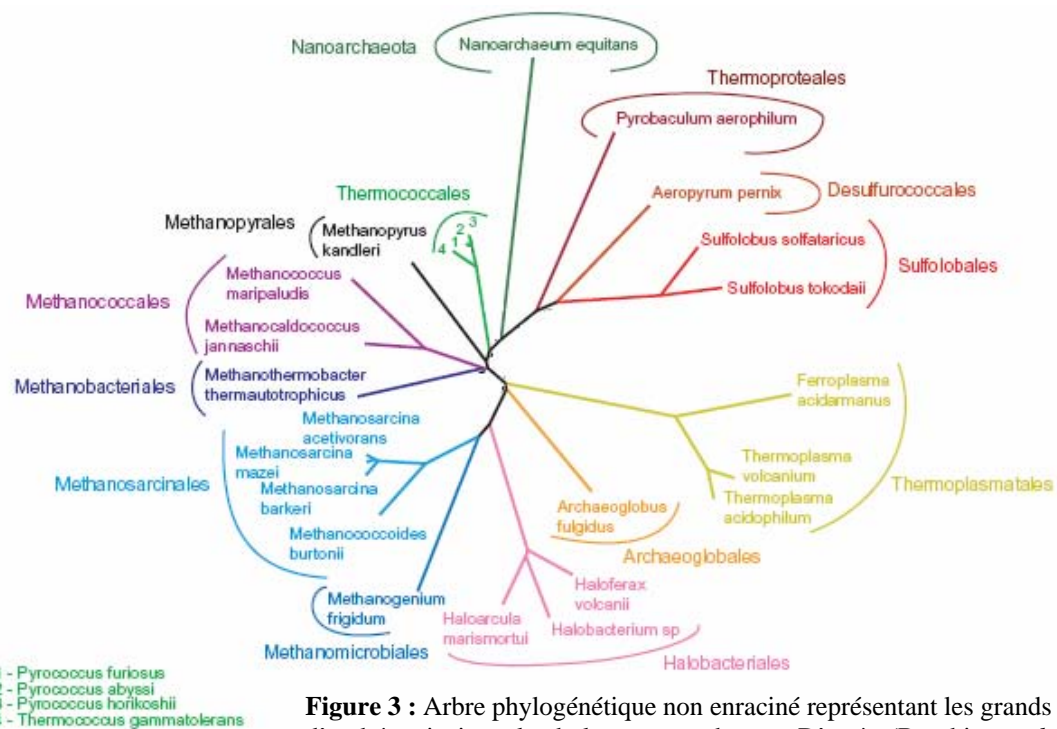


Figure 3 : Arbre phylogénétique non enraciné représentant les grands groupes d'archées ainsi que le phylum nanoarchaeota. D'après (Brochier *et al.* 2005)

II. Les grands groupes

Le règne des archées peut être divisé en cinq groupes principaux (figure 3) : les méthanogènes, les halophiles extrêmes, les réductrices de sulfates, les archaea sans paroi et les thermophiles extrêmes métabolisant le soufre.

Le phylum Crenarcheota est composé essentiellement d'espèces thermophiles et hyperthermophiles, et de quelques espèces mésophiles, voire psychrophiles, colonisant des niches terrestres ou marines de tempérées à froides (Schleper *et al.* 1998). Certaines crénarchées sont récemment supposées être présentes dans l'intestin humain (Rieu-Lesme *et al.* 2005).

Le phylum Euryarcheota est essentiellement composé de méthanogènes, halophiles extrêmes ainsi que de certains thermophiles extrêmes.

III. Les thermococcales

Cet ordre appartient au sous-domaine Euryarchaeota (Zillig *et al.* 1981) et rassemble les genres *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus*, dont un grand nombre est utilisé comme modèle dans les études fondamentales en biochimie de par leurs caractères communs aux eucaryotes (cf. IV.). Ces micro-organismes sont également source d'enzymes thermostables valorisables au niveau biotechnologique (cf. V.).

Hyperthermophiles, les membres de cet ordre ont un métabolisme anaérobie et hétérotrophe avec des températures de croissance comprises entre 70 et 105°C. Beaucoup ont été isolés dans des zones hydrothermales peu profondes à très profondes (jusqu'à 4000 m), et quelques uns dans des sources chaudes terrestres. Depuis 2002, 19 espèces caractérisées sont recensées dans le manuel de bactériologie systématique (Garrity et Holt 2002), incluant 15 espèces du genre *Thermococcus* et 4 espèces du genre *Pyrococcus*. Toutefois, de nombreuses séquences apparentées à cet ordre sont retrouvées dans les isolats, lors de l'étude de la diversité microbienne des sources hydrothermales (Lepage *et al.* 2004).

III.1. Le genre *Pyrococcus* :

Le genre *Pyrococcus* comprend quatre espèces d'hyperthermophiles très étudiées : *P. furiosus* (Fiala et Stetter 1986), *P. woesei* (De Wachter *et al.* 1989), *P. abyssi* (Erauso *et al.* 1993) et *P. horikoshii* (Gonzalez *et al.* 1998). Ce sont des coques de 1 à 2 µm de diamètre possédant pour certains un ou plusieurs flagelles leur conférant une motilité.

Une étude comparative a été effectuée sur les trois génomes de *P. abyssi*, *P. horikoshii* et *P. furiosus* (Lecompte *et al.* 2001; Cohen *et al.* 2003) dont les séquences complètes sont disponibles et annotées. Cette étude s'est focalisée sur l'organisation chromosomique, les distances génétiques, ainsi que les gènes présents chez ces trois espèces proches. Il apparaît que les génomes de *P. abyssi* et *P. horikoshii* sont plus proches au niveau de leurs séquences en acides aminés avec 77% d'identité contre 72% entre *P. furiosus* et *P. abyssi* et 73% entre *P. furiosus* et *P. horikoshii*. De plus, le génome de *P. furiosus* présente un

nombre de cadres ouverts de lecture plus important que les deux autres organismes. Prises ensemble, ces observations montrent une grande divergence au sein de ce même genre malgré le nombre de protéines homologues au niveau des mécanismes de génétique informationnelle.

III.2. *Pyrococcus abyssi*

P. abyssi, euryarchée hyperthermophile, a été isolée à partir d'une source hydrothermale océanique profonde (3500 m) du bassin Nord-Fidgien. C'est une espèce hétérotrophe qui se développe de manière optimale à une pression de 200 atmosphères, entre 80 et 100 degrés, dans des conditions d'anaérobiose stricte. C'est un coque flagellé, possédant un génome circulaire de plus de 1,7 Mb, ainsi qu'un plasmide de 3,4 kb ; la teneur en GC est de 44,7 %. Après annotation de la séquence chromosomique (Cohen *et al.* 2003), près de 1800 cadres ouverts de lecture ont été mis en évidence. A 51 % d'entre eux a pu être assigné un rôle biologique (14% comme protéines informationnelles et 37% comme opérationnelles).

IV. Caractères communs aux archées et aux eucaryotes

Les études effectuées sur les métabolismes de l'ADN montrent que, chez les eucaryotes, les protéines qui y sont impliquées sont plus apparentées aux systèmes archées que bactériens. Ce point représente un des grands intérêts fondamentaux de l'étude des archées.

Une des questions soulevées est l'adoption, par les cellules eucaryotes, de systèmes informationnels apparentés aux archées plutôt qu'aux bactéries. Depuis les travaux de Carl R. Woese proposant, d'après les séquences d'ARN ribosomiques, un arbre phylogénétique avec deux lignées divergeant de LUCA, l'une menant au règne bactérien et l'autre aux règnes archéen et eucaryote (Woese *et al.* 1990), de nombreuses hypothèses sur l'origine et l'évolution des systèmes cellulaires ont été débattues. Aujourd'hui, la plus récente des hypothèses est basée sur le fait que LUCA possédait un génome à ARN. L'origine des cellules à ADN tiendrait au fait que de l'ADN viral a été intégré au sein de cette cellule à ARN. Les lignées archée et eucaryote seraient issues du transfert d'ADN viraux semblables tandis que la lignée bactérienne serait apparue par le transfert d'un ADN viral plus éloigné (Forterre 2006).

Concernant les protéines, la première observation montrant des similitudes entre archées et eucaryotes a été faite lors de l'étude des ARN polymérase ADN dépendantes (Huet *et al.* 1983). Bien que les régulations transcriptionnelles archées soient proches du système bactérien (Aravind et Koonin 1999), la protéine centrale de ce processus, l'ARN polymérase, est apparentée à son homologue eucaryote. De même pour la traduction, l'initiation chez les archées et eucaryotes se fait en utilisant la méthionine, tandis que le système bactérien utilise la N-formyl-méthionine.

Comme chez les eucaryotes, il existe des histones également retrouvés chez certaines archées (White et Bell 2002). Ces ensembles de protéines permettent la condensation de l'ADN par la formation de nucléosomes, constituant ainsi un premier niveau d'organisation nucléique. Il en découle la présence d'autres facteurs protéiques nécessaires à la décondensation de l'ADN pour la transcription des gènes ou

l'ouverture de la double hélice aux origines de réplication ; ces facteurs sont retrouvés chez les eucaryotes et les euryarchées.

De part leur lieu de vie souvent extrêmes, il paraissait évident que les archées puissent réparer leur ADN (DiRuggiero *et al.* 1999). L'étude des génomes archées ont depuis mis en évidence de nombreuses séquences correspondant à des protéines homologues avec celles impliquées dans les mécanismes de réparation chez les bactéries et les eucaryotes. Au moins quatre mécanismes permettent de réparer l'ADN endommagé : excision d'un nucléotide ou d'une base endommagée (NER : nucleotide excision repair et BER : base excision repair), excision d'un nucléotide mal incorporé (MMR : mismatch repair) et recombinaison dans le cas de cassures simple brin ou double brin.

La plupart des archées possèdent des homologues du système NER eucaryote tels que les nucléases XPF et XPG (Fen 1), les hélicases XPB et XPD et le facteur de stabilisation de l'ADN simple brin RP-A. Les protéines de reconnaissance du dommage XPA et XPC ne sont pas présentes mais ne semblent pas cruciales car elles sont également absentes chez certains végétaux supérieurs (Kelman et White, 2005).

Le système de réparation BER fait intervenir une ADN glycosylase spécifique du dommage avant l'action combinées d'une AP lyase et d'une AP endonucléase. Ces enzymes ont été mises en évidence, par des tests d'activité et analyse de séquence, chez la plupart des archées et présentent des homologies avec celles des bactéries et des eucaryotes (Seitz 2001).

Les phénomènes de mésappariement de bases apparaissent lors de la réplication, de la recombinaison ou par désamination de la 5-méthylcytosine ; le système MMR permet de réparer ces erreurs en faisant intervenir des protéines similaires entre bactéries et eucaryotes. Chez *E. coli*, trois protéines sont requises (MutH, MutL et MutS) tandis que chez l'eucaryote *S. cerevisiae*, six protéines homologues à MutS interviennent (MSH1 à 6). Au niveau de quelques archées sont retrouvées des séquences s'apparentant à MutS et MutL (Grogan 2004) (Rossolillo and Albertini 2001).

La recombinaison homologue de l'ADN est un moyen essentiel pour réparer les cassures d'ADN et fait intervenir plus de 25 facteurs. Bien que ce mécanisme soit fondamentalement similaire chez les bactéries et les eucaryotes, les protéines qui y sont impliquées diffèrent. Pour la plupart, les protéines identifiées chez les archées sont structurellement plus proches de celles du domaine eucaryote que bactérien. C'est le cas d'une topoisomérase de type II de *Sulfolobus shibatae* (Bergerat *et al.*, 1997) montrant des similitudes avec le facteur Spo11, du complexe Mre11/Rad50 dont la structure de la nucléase Mre11 est connue chez *P. furiosus* (Hopfner *et al.*, 2001), ainsi que du facteur Rad51 (RecA chez *E. coli*), dont l'étude de la structure chez *P. furiosus*, a permis l'acquisition de données applicables à la prédiction d'interactions fonctionnelles au niveau du système de réparation par recombinaison homologue chez les eucaryotes (Shin *et al.* 2003).

Les similitudes les plus importantes entre les eucaryotes et les archées, démontrées à ce jour, se trouvent probablement au niveau des mécanismes de la réplication de l'ADN, qui montrent la présence de protéines structurellement semblables à celles retrouvées chez les eucaryotes. Les protéines de réplication des archées ne semblent pas être apparues à partir d'une évolution graduelle du système bactérien, mais par l'adoption d'un système global différent. A titre d'exemple, l'ADN hélicase du système réplcatif bactérien

(DnaB) est processive dans une direction opposée (de 5' vers 3') à celle de l'hélicase des archées et des eucaryotes (MCM).

Le système d'information génétique archéen apparaît donc, au niveau fondamental, comme un système eucaryote simplifié, ce qui en fait un bon modèle pour la compréhension du fonctionnement des systèmes eucaryotes. Chez les eucaryotes évolués, de nombreuses protéines additionnelles interviennent, en particulier au niveau des mécanismes de réparation et dans la régulation du cycle cellulaire couplée à la réplication de l'ADN. D'autres événements, du type modifications post-traductionnelles, sont présents essentiellement chez les eucaryotes. De ce fait, au niveau du métabolisme de l'ADN, l'archée peut être considérée comme un modèle ancestral à l'eucaryote et, ainsi, une étude approfondie des structures et fonctions des protéines, très conservées entre ces deux règnes, est d'un intérêt fondamental au niveau de la compréhension des mécanismes de base.

Cette approche peut également être d'une grande utilité pour la recherche d'inhibiteurs de la réplication avec des applications ciblées en cancérologie. Il est intéressant d'étudier, chez les archées, les protéines très conservées comme des cibles potentielles pour inhiber la réplication des cellules tumorales eucaryotes.

V. Intérêt biotechnologique des archées thermophiles

Les premières explorations étaient avant tout orientées vers la recherche de composés valorisables au niveau biotechnologique, essentiellement de type enzymes. Depuis, le nombre de composés valorisables ou potentiellement valorisables a considérablement augmenté, de par les nombreuses souches d'archées disponibles. Le choix des modèles étudiés, dans le cadre de ces recherches appliquées, est ciblé sur des archées présentant des traits extrêmophiles (van den Burg 2003) tels que la résistance aux hautes températures, aux fortes salinités, à des conditions de pH acides ou basiques, ainsi que la capacité à s'adapter à des milieux chimiquement hostiles. Le marché des enzymes et composés organiques, issus d'organismes extrêmophiles, était estimé à 17 milliards de dollars en 2004 ; les enzymes thermostables se plaçant au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique à haute valeur ajoutée.

Au niveau industriel, sont principalement recherchées les activités thermostables d'hydrolyse de composés protéiques, glucidiques et lipidiques ; une température élevée augmente la biodisponibilité et la solubilité des composés organiques et abaisse leur viscosité. Ainsi, de nombreux procédés comportent des étapes enzymatiques réalisées à des températures pouvant aller jusque 110°C. Un grand nombre d'enzymes thermostables ont été isolées à partir de bactéries thermophiles. Cependant, la plupart présentent des activités optimales à des températures inférieures à 80°C ; à part celles issues du genre *Thermotoga*, seules les enzymes d'archées hyperthermophiles peuvent répondre à certains besoins.

Le secteur industriel le plus demandeur en enzymes thermostables est l'industrie de l'amidon. L'amidon, par hydrolyse, est transformé en sirops de glucose, maltose et oligosaccharides, qui permettront

de produire une variété de composés chimiques comme l'éthanol, la lysine ou l'acide citrique, par fermentation, ou du fructose par isomérisation. Les procédés de transformation de l'amidon s'effectuent à des températures comprises entre 55 et 110°C, à des pH variant de 4,2 à 5,5. Ils font intervenir des enzymes, pouvant être disponibles à partir de microorganismes archéens, comme les α et β -amylases (Dong *et al.* 1997a), les glucoamylases (Bauer *et al.* 1998), les pullulanases (Brown et Kelly 1993; Dong *et al.* 1997b) ainsi que les xylose isomérases.

La synthèse de produits chimiques à grande échelle peut avoir recours à des enzymes issues d'archées qui permettent des mécanismes réactionnels régiosélectifs ou stéréosélectifs. Dans ce cadre, ont été isolées et caractérisées, une β -glucosidase (Kengen *et al.* 1993) et une estérase (Ikeda et Clark 1998) chez *Pyrococcus furiosus*, ainsi qu'une aldolase (Buchanan *et al.* 1999) et un cytochrome P450 (McLean *et al.* 1998) chez *Sulfolobus solfataricus*.

D'autres procédés industriels peuvent faire intervenir des enzymes thermostables. La cellulose est la source de carbone non fossile renouvelable sur terre la plus abondante, et peut être un composé de base pour l'obtention de produits tels que l'éthanol (Coughlan 1990), après une dégradation à haute température par des cellulases. Le blanchiment du papier requiert également des enzymes de type endoxylanase, actives à haute température. Cependant, les enzymes thermostables disponibles pour ces procédés proviennent essentiellement de bactérie thermophiles du genre *Thermotoga*, l'exploration des enzymes d'archée n'ayant pas été fructueuse (Rolland *et al.* 2002).

Les enzymes thermostables issues d'archées trouvent largement leurs applications comme outils dans le secteur de la biologie moléculaire. Beaucoup font l'objet de dépôts de brevets, comme les ADN polymérases, utilisées dans les techniques de PCR. Le clonage et l'expression, chez *E.coli*, du gène codant pour l'ADN polymérase *Taq*, issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Lawyer *et al.* 1989), a permis l'obtention de quantités de protéines recombinantes nécessaires au développement de la PCR. Depuis, un grand nombre d'ADN polymérases, issues d'archées, ont été valorisées pour cette application (Perler *et al.* 1996), toutes étant des ADN polymérases monomérique de la famille B. Bien que l'ADN polymérase *Taq* soit toujours la plus utilisée pour le séquençage ou la mise en évidence de la présence d'un gène, les enzymes d'archées hyperthermophiles s'avèrent plus fidèles grâce à leur fonction exonucléase 3'-5' permettant de corriger les erreurs d'incorporation. Elles sont de ce fait des enzymes de choix dans le cadre d'amplifications géniques pour la recherche de mutations en diagnostique, et pour le clonage de gène en recherche, dans le cadre de caractérisations biochimiques fonctionnelles. Face aux nombreuses exigences techniques liées à certaines amplifications géniques, des ADN polymérases mutantes ou chimériques ont été produites de manière à bénéficier des avantages de deux ADN polymérases distinctes (Loh et Loeb 2005).

D'autres enzymes hyperthermophiles trouvent une application en génie génétique, comme la ligation de fragments d'ADN par les ADN ligases, mais aussi dans les techniques impliquant la coupure spécifique ou non de protéines, comme le séquençage peptidique ou le clivage de certains acides aminés.

Aujourd'hui, la liste de nouvelles enzymes issues d'archées est sans cesse alimentée par la découverte de nouvelles souches cultivables, et l'obtention de séquences génomiques dont le nombre

augmente de manière exponentielle. Il est intéressant de noter, qu'en plus des protéines possédant une activité enzymatique, les recherches en terme d'applications biotechnologiques se focalisent de plus en plus sur les protéines accessoires qui s'associent aux enzymes pour les rendre plus performantes ; c'est surtout le cas de protéines couplées à l'activité des ADN polymérase. A titre d'exemple, la protéine de stabilisation de l'ADN simple brin, intervenant au niveau de la réplication et de la réparation chez *Sulfolobus solfataricus*, augmente la spécificité de l'hybridation ADN-ADN (Guagliardi *et al.* 1997). D'autres travaux ont également montré que les protéines accessoires de la réplication de l'ADN, le RF-C et le PCNA, chez *Archaeoglobus fulgidus*, sont capables de stimuler la réaction de PCR effectuée par l'ADN polymérase de la famille B de ce même organisme (Motz *et al.* 2002). Une meilleure compréhension des mécanismes de la réplication chez les archées peut permettre, en plus de l'approche fondamentale citée précédemment, d'optimiser, voire de créer, de nouveaux outils de biologie moléculaire.

VI. Thermostabilité et thermophilie

L'intérêt que suscitent les protéines thermostables vient bien entendu de leur capacité à résister à des températures élevées. Cependant, malgré de nombreuses études effectuées sur la thermostabilité, dans les années 90, il n'en ressort pas de lois d'organisation. En général, les protéines d'organismes hyperthermophiles sont intrinsèquement thermostables bien que certaines protéines intracellulaires acquièrent leur thermostabilité par le biais d'autres facteurs intracellulaires comme les sels, des substrats, des activateurs ou des stabilisateurs telle que la thermamine (Vieille et Zeikus 2001). On a pensé pendant longtemps que la thermostabilité pouvait être corrélée avec la composition en acides aminés de la protéine, mais les premières analyses comparatives de génomes ne confirment pas cette hypothèse (Bohm et Jaenicke 1994). A part les variations d'ordre phylogénétique, ce qui différencie les protéines hyperthermophiles des protéines mésophiles, est principalement l'intervalle de température pour lequel elles sont stables et actives. Sinon, elles sont très similaires, car les séquences entre protéines homologues hyperthermophiles et mésophiles sont conservées entre 40 à 85% et leurs structures tridimensionnelles sont superposables.

Une des hypothèses générales, retenue pour expliquer la thermostabilité, est que les protéines hyperthermophiles seraient plus rigides que leurs homologues mésophiles, à des températures identiques, par le fait que moins de protons sont échangés au niveau des groupements amines (Zavodszky *et al.* 1998). A haute température, ces derniers permettent la création de nombreuses liaisons hydrogènes stables tout en conférant à la protéine une certaine flexibilité, ainsi que son activité s'il s'agit d'une enzyme. Certaines enzymes, issues d'organismes hyperthermophiles, sont également actives à 37°C, suggérant que leurs structures se composent d'un site catalytique flexible, et d'un core rigide lui conférant sa thermostabilité (Merz *et al.* 1999).

Au niveau des forces d'interaction, l'hydrophobicité est considérée comme la force majeure conduisant au repliement des protéines. Elle permet à la protéine de former une structure native qui est régie

par un ensemble de forces, telles que les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques et les forces électrostatiques (Dill 1990). Etant donné le rôle central de ces forces dans la création de la structure protéique, elles contribuent également à sa stabilité. Au niveau des protéines hyperthermophiles, il apparaît qu'il n'y a pas de mécanismes simples conduisant à une stabilité additionnelle. Un nombre de changements, impliquant principalement une augmentation de ces forces, est observé entre protéines mésophiles et thermophiles homologues, mais sans véritable concordance entre protéines hétérologues (Vieille et Zeikus 2001).

| | Bactériophages T4 | Procaryotes : <i>E. coli</i> | Eucaryotes | Archées | |
|---|---|---|---|--|---|
| | | | | crénarchées | eurýarchées |
| Origines de réplication Reconnaissance de l'origine Chargement de l'hélicase Helicase réplivative | Une - gp59 gp41 | Une DnaA, IHF, HU, FIS DnaC DnaB ₆ | Plusieurs orc ₁₋₆ Cdc6 Dna2, MCM ₂₋₇ | Une ou deux ORC/Cdc6 _{1 ou 2} ORC/Cdc6 _{1 ou 2} Dna2, MCM ₁₂ | Une ORC/Cdc6 _{1 ou 2} ORC/Cdc6 _{1 ou 2} MCM ₆ |
| Stabilisation de l'ADNss | gp32 | SSB ₄ | RP-A ₁₋₃ | SSB/RP-A _{1 ou 4} | RP-A ₁₋₃ |
| Initiation Primase | gp61 | DnaG | Complexe ADN polymérase α_{1-4} | Homologue eucaryote ₁₋₂ | Homologue eucaryote ₁₋₂ |
| Elongation ADN polymérase Facteur de processivité Facteur de chargement | gp43 gp45 ₃ gp44 _{4/62} | $\alpha\varepsilon\theta$ β_2 $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ | δ_4 et ε_1 PCNA ₃ RF-C ₁₋₅ | B PCNA _{3 ou 1-3} RF-C ₁₊₄ | B et D ₁₋₂ PCNA ₃ RF-C _{1+4 ou 2+4} |
| Maturation des fragments d'Okazaki Excision du primer Ligature des fragments | - - | ADN polymérase I ADN ligase | Dna2, Fen-1 ADN ligase I | RnaseHII, Fen-1 ADN ligase I | RnaseHII, Fen-1 ADN ligase I |

Tableau 1 : Protéines requises lors des étapes principales de la réplication de l'ADN chez le bactériophage et les trois règnes du monde vivant.

le nombre de sous-unités de chaque protéine est indiqué en indice : 4 indique qu'il y a quatre sous-unité identiques ; 1-6 indique qu'il y a six sous-unités différentes ; 1+4 indique qu'il y a quatre sous-unités identiques et une différente.

La réplication de l'ADN :

Bien que le principe de base de la réplication soit à la fois élégant et simple à l'image d'une réaction de PCR, le mécanisme réel qui permet d'effectuer cette copie dans la cellule est complexe et implique un ensemble de protéines spatialement et temporellement coordonnées. D'un organisme à l'autre, le nombre de protéines impliquées, ainsi que leur mode de fonctionnement, présente des différences remarquables. Toutefois, la réaction fondamentale de ce mécanisme est réalisée une ADN polymérase qui catalyse l'addition d'un nucléotide à l'extrémité du brin néosynthétisé. De par la structure unique des desoxyribonucléotides, exhibant un groupement triphosphate en 5', la synthèse d'ADN est directionnelle et se fait de 5' vers 3'. Etant donné la structure de l'ADN, formée de deux brins antiparallèles, la synthèse se fait de manière continue pour l'un des brins et de manière discontinue pour l'autre. La synthèse discontinue se fait avec formation de courts fragments, appelés fragments d'Okazaki, mis en évidence dans le laboratoire de Reiji Okazaki (Kurosawa *et al.* 1975).

Chez les organismes cellulaires, un grand nombre de protéines, en plus des ADN polymérases, interviennent au niveau de la fourche de réplication. A l'exception de protéines requises lors de l'initiation, certains virus utilisent uniquement la machinerie répliquative de la cellule hôte, tandis que d'autres comme les bactériophages T4 ou T7, possédant un grand génome à ADN double brins se répliquant en mode symétrique, ont atteint un haut niveau de complexité et codent pour des protéines analogues à celle de la réplication cellulaire eucaryote.

I. Notion de réplisomes :

La réplication de l'ADN génomique dans les trois règnes du monde vivant (Bacteria, Eukarya et Archaea) se fait avec le recrutement de nombreuses protéines dont certaines présentent de fortes homologies d'un règne à l'autre, d'un point de vue structural et fonctionnel.

Après reconnaissance d'une ou plusieurs origines de réplication, de séquences spécifiques, par des protéines d'initiation, une hélicase permettant la séparation des deux brins, est mise en place au niveau de la bulle de réplication. Ainsi il va se créer un assemblage moléculaire protéique appelé réplisome, permettant la synthèse d'ADN. Cette synthèse se fait par l'action concertée d'hélicases, de primases (constituant le primosome), de protéines de stabilisation de l'ADN simple brin et d'au moins deux ADN polymérases pour la synthèse du brin continu et du brin discontinu. Ces ADN polymérases sont couplées à un facteur de processivité, préalablement chargé autour de l'ADN par un facteur de chargement. La synthèse du brin discontinu se fait par formation de fragments d'Okazaki, amorcés par le primosome, et dont la maturation (excision de l'amorce ARN et ligature des fragments ADN) nécessite la fonction exonucléase de l'ADN polymérase I et une ADN ligase chez *E. coli*, le recrutement d'endonucléases (Dna2 et Fen-1) et de l'ADN ligase I chez l'eucaryote. Chez les archées, la maturation s'effectue avec l'intervention de l'endonucléase

Fen-1 et de l'ADN ligase I homologues aux facteurs eucaryotes ainsi que de la ribonucléase RNaseHIII unique aux archées. Le tableau 1 présente ces facteurs, isolés chez les trois règnes du monde vivant, ainsi que chez le bactériophage.

Certaines protéines, comme le facteur de processivité, son facteur de chargement, ainsi que l'ADN ligase présentent, d'un règne à l'autre, de fortes similarités au niveau des séquences, mais aussi au niveau structural, avec des repliements uniques conservés. Ainsi, il a été montré que des facteurs de processivité euryarchées pouvaient interagir fonctionnellement avec l'ADN polymérase eucaryote δ (Henneke *et al.* 2000; Ishino *et al.* 2001) ainsi qu'avec le facteur de chargement humain (Henneke *et al.* 2002).

II. Le réplisome du bactériophage T4 :

Comme évoqué précédemment, les bactériophages possèdent des protéines de réplication et une organisation du réplisome similaire aux eucaryotes (Baker et Bell 1998). Chez le bactériophage T4, un ensemble de huit protéines est nécessaire pour reconstituer une fourche de réplication *in vitro* (figure 4). La partie active, permettant la synthèse d'ADN, est représentée par l'holoenzyme, constituée de l'ADN polymérase gp43, du facteur de processivité gp45 et de son facteur de chargement gp44/62. Pour amorcer la synthèse du brin avancé et celle des fragments d'Okazaki, une hélicase (gp41), son facteur de chargement (gp59), une primase (gp61) et des protéines de stabilisation de l'ADN simple brin (gp32), constituent le primosome.

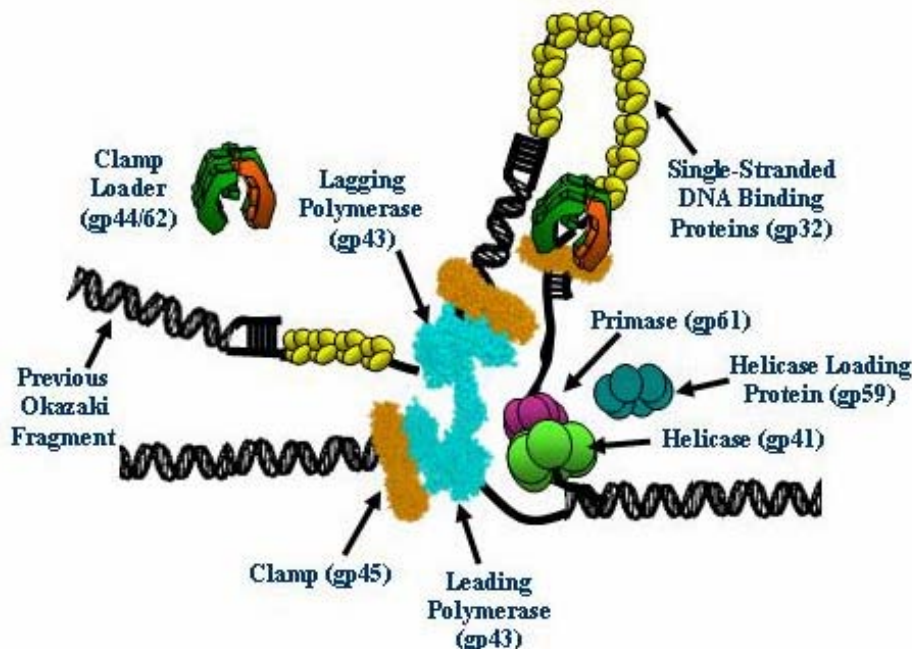


Figure 4 : modèle proposé pour la réplication de l'ADN du bactériophage T4.

D'après le site internet de l'équipe de Stephen J. Benkovic ; <http://research.chem.psu.edu/sjbgrou/>

III. Le réplisome du procaryote bactérien *Escherichia coli* :

En comparaison avec les bactériophages T4 et T7, la réplication chez *E. coli* est trois fois plus rapide, certainement due au nombre de protéines recrutées (Trakselis *et al.* 2003). Chez *E. coli*, en plus du primosome, la machinerie répliquative se présente sous la forme d'un complexe protéique, l'holoenzyme ADN polymérase III, comprenant au moins 10 protéines distinctes (Onrust *et al.* 1995b). Ce complexe est organisé en trois modules fonctionnels comprenant (i) l'ADN polymérase III possédant les activités polymérase (sous-unité α) et exonucléase (sous-unité ϵ), (ii) le facteur de processivité β et (iii) le complexe DnaX (sous-unités τ , γ , δ , δ' , χ et ψ), assurant le chargement du facteur de processivité de manière ATP-dépendante (figure 5).

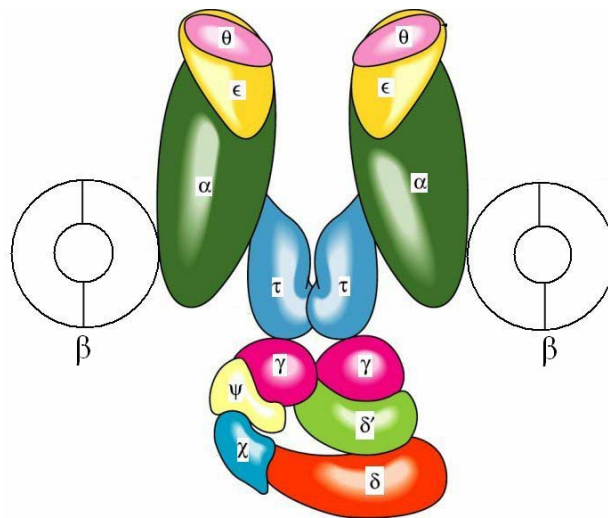


Figure 5 : vue schématique de l'ADN polymérase III de *E. coli*, constituée des domaines d'activité ADN polymérase et exonucléase (α , ϵ et θ), du facteur de processivité (β) et du facteur de chargement (τ , γ , δ , δ' , χ et ψ).

Le complexe répliquatif contient deux cores-enzymes Pol III (α , ϵ et θ) pour la synthèse du brin avancé et du brin retard. Ces derniers sont reliés par un dimère de sous-unités τ (Studwell-Vaughan et O'Donnell 1991). Au sein du complexe DnaX, seules les sous-unités τ , γ , δ et δ' sont nécessaires pour le chargement du facteur de processivité β (Onrust et O'Donnell 1993; Onrust *et al.* 1995a). La sous-unité γ étant une version tronquée de τ , le facteur de chargement minimal de composition $\tau_2\gamma_1\delta_1\delta'_1$ est communément appelé complexe γ . Ce dernier, occupant une place centrale au sein du complexe répliquatif, liant un facteur de processivité de part et d'autre, définit l'ADN polymérase III holoenzyme comme un complexe répliquatif dimérique et asymétrique (Glover et McHenry 2001). La composition stœchiométrique du complexe est définie ainsi : $\alpha_2\epsilon_2\theta_2\tau_2\gamma_1\delta_1\delta'_1\chi_1\psi_1$ (Onrust *et al.* 1995b). Le facteur θ stimule l'activité

exonucléase de ϵ , et le facteur χ se lie au facteur de fixation à l'ADN simple brin, appelé SSB (Single Strand Binding protein). Le facteur ψ fait la jonction entre χ et γ .

La réplication de l'ADN de *E. coli* est initiée par la fixation du facteur DnaA au niveau de séquences spécifiques (DnaA boxes) présentes au niveau de l'origine *oriC* (Fuller *et al.* 1984). Ces séquences riches en AT sont ouvertes par le facteur DnaA, permettant ainsi la fixation d'un complexe DnaB-DnaC à chaque fourche de réplication. Le facteur DnaC charge l'hélicase DnaB de manière ATP dépendante sur l'ADN simple brin stabilisé par le facteur SSB, puis se dissocie du complexe, ce qui confère à DnaB son activité hélicase (Sutton *et al.* 1998). La primase DnaG, interagissant avec l'hélicase, synthétise une amorce ARN sur chaque brin, avant le recrutement de l'holoenzyme III pour la synthèse des brins complémentaires (figure 6). L'activité hélicase de DnaB est largement stimulée par une interaction physique avec la sous-unité τ de l'holoenzyme (kim *et al.* 1996).

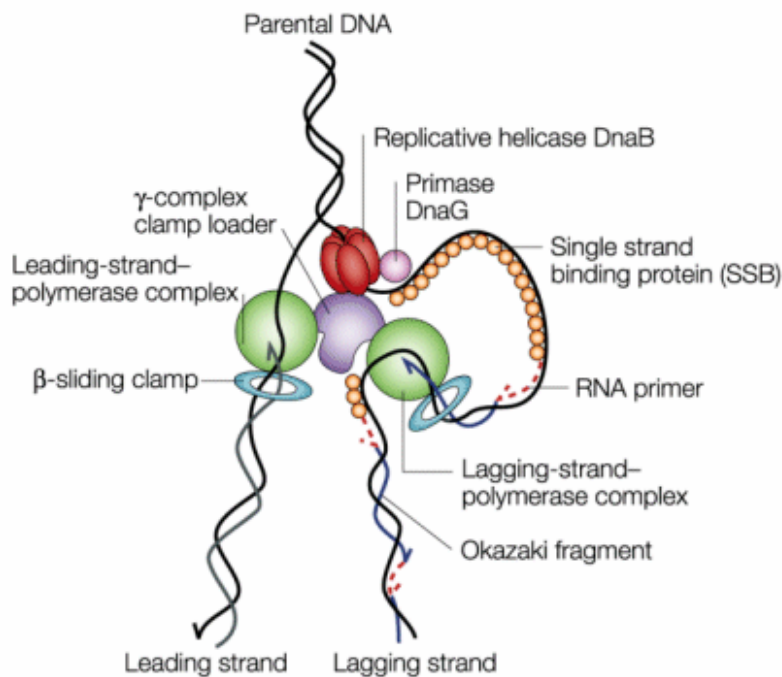


Figure 6 : Vue schématique de la réplication de l'ADN chez *Escherichia coli*. D'après (McGlynn et Lloyd 2002)

Au niveau du brin retardé, lorsque le core enzyme rejoint l'amorce du fragment précédent, l'ADN polymérase I et l'ADN ligase sont recrutées pour ligaturer les deux fragments. Simultanément un anneau β en solution est chargé par le complexe γ sur l'amorce du futur fragment avec lequel va à nouveau interagir la sous-unité α . En interaction permanente avec l'hélicase DnaB, la primase DnaG synthétise une amorce ARN tous les 1,5-2 kb ; son action est modulée par DnaB et le facteur SSB (Corn et Berger 2006 ; Benkovic *et al.* 2001).

IV. Le réplisome eucaryote :

Les d'études de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes sont effectuées sur les organismes tels que les levures, l'humain, le xenope et certaines plantes. En comparaison avec les procaryotes, un nombre plus important de protéines intervient dans ce mécanisme. La réplication de l'ADN est largement couplée aux protéines du cycle cellulaire, en particulier lors de la mise en place du complexe pré-répliatif et du passage vers le complexe répliatif. Bien qu'il soit difficile d'établir un schéma précis du réplisome, les connaissances acquises permettent toutefois de proposer des modèles pour certaines étapes.

Contrairement aux bactéries, où une seule origine de réplication est généralement mise en évidence, le génome des cellules eucaryotes est répliqué à partir de nombreuses origines, les séquences pouvant être différentes. La création de bulles de réplication se fait de manière coordonnée, durant la phase S, par des mécanismes de contrôle qui demeurent peu connus. Toutefois, les origines de réplication précoces tendent à être associées à un environnement de gènes activement transcrits et les origines tardives à un environnement de gènes réprimés (Diller et Raghuraman 1994). Après reconnaissance d'une origine de réplication par le complexe ORC, l'hélicase MCM est chargée par le facteur Cdc6 de manière ATP-dépendante (Tanaka *et al.* 1997).

Après ouverture de la double hélice, l'initiation de la réplication peut se faire avec le recrutement des protéines constituant le primosome. Il est supposé que le premier facteur requis est le RP-A qui permet la stabilisation de l'ADN simple brin ; celui-ci serait nécessaire au chargement du complexe Pol α / primase, constitué de quatre sous-unités : l'ADN polymérase α , la sous-unité polymérase B ainsi que deux sous-unité primase Pri1 et Pri2. (Walter et Newport 2000). Après synthèse d'une amorce ARN-ADN, ce complexe serait déplacée par le facteur de chargement RF-C (Maga *et al.* 2000), qui charge le facteur de processivité PCNA sur la jonction amorce-matrice.

L'étape suivante est le recrutement d'une ADN polymérase afin d'effectuer l'extension de l'amorce synthétisée par la primase. Chez les eucaryotes, deux ADN polymérases répliatives (δ et ϵ) ont été mises en évidence, dans le sens où elles sont capables d'effectuer une synthèse d'ADN en présence du RF-C et du PCNA. Il a longtemps été supposé que seule l'ADN polymérase δ était requise au niveau de la fourche de réplication et qu'elle pouvait synthétiser le brin avancé et les fragments d'Okazaki (Hübscher *et al.* 2002). Aujourd'hui, la question du rôle respectif de ces protéines au sein du réplisome reste posée ; les modèles récents proposent que chaque ADN polymérase serait spécifique de la synthèse d'un des deux brins (Fukui *et al.* 2004). Dans ce cas, deux réplisomes distincts peuvent être envisagés (figure 7).

Du fait qu'aucun réplisome entier n'ait pu être isolé de cellules eucaryotes, il est difficile de modéliser efficacement la dynamique du complexe répliatif en connaissant uniquement les interactions fonctionnelles *in vitro* et en les reliant aux renseignements obtenus *in vivo*. A titre d'exemple, il a été montré, chez la levure, que l'ADN polymérase ϵ pouvait être présente, au niveau de l'origine de réplication, en interaction avec les facteurs pré-répliatifs, avant le recrutement de l'ADN polymérase α (Masumoto *et*

al. 2000). Cette ADN polymérase pourrait donc être présente sur l'ADN en absence de son facteur de processivité PCNA.

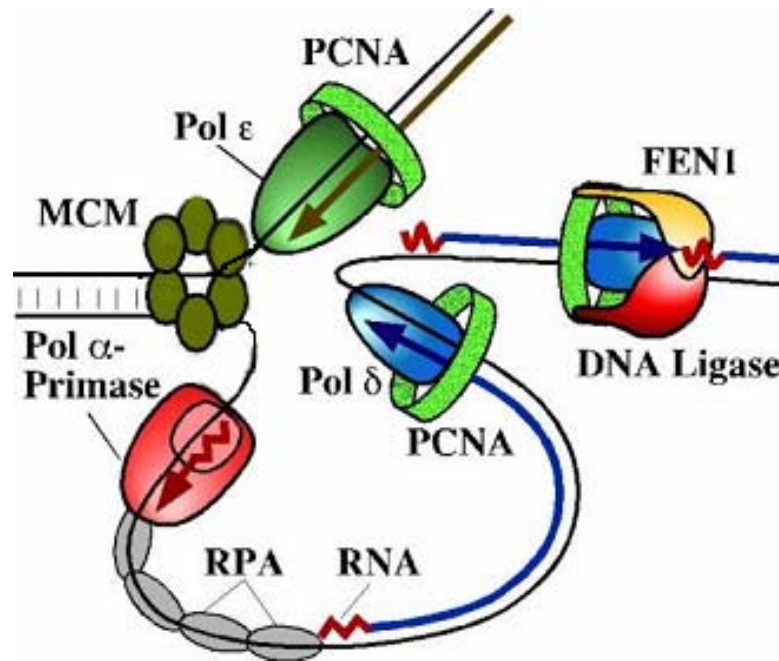


Figure 7 : Modèle de la réplication de l'ADN chez l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*.
D'après le site web <http://biochem.wustl.edu/~burgersw3/>

V. Le réplisome archéen :

Comme mentionné précédemment, les archées possèdent des protéines du complexe répliatif présentant des similitudes eucaryotes. Il faut toutefois distinguer deux familles au sein desquelles les homologies sont plus ou moins flagrantes : les crenarchées et les euryarchées. Le génome des archées est généralement composé d'un ADN circulaire, avec une seule origine de réplication mise en évidence pour les euryarchées, tandis qu'il en existe plus d'une chez les crenarchées (Robinson *et al.* 2004). La reconnaissance de l'origine se fait par l'intermédiaire de facteurs qui, par leur séquence, sont homologues à ceux des eucaryotes ; ils sont associés à la famille Cdc6/orc1p (Uemori *et al.* 1997) (Edgell et Doolittle 1997). Ces facteurs permettent le recrutement d'une hélicase répliatrice homologue au MCM des eucaryotes, en particulier dans le genre *Pyrococcus*, où les séquences sont hautement conservées (Myllykallio et Forterre 2000). Après ouverture de la double hélice, l'ADN simple brin est stabilisé, chez les euryarchées, par un facteur homologue au RP-A des eucaryotes. Le facteur de stabilisation de l'ADN simple brin présent chez les crenarchées présente, quant à lui, des similitudes avec le RP-A des eucaryotes et le facteur SSB bactérien.

La primase, recrutée pour synthétiser l'amorce ARN, possède des sous-unités homologues à celles de la primase des eucaryotes, aussi bien chez les crénarchées que chez les euryarchées.

Comme mentionné précédemment, le facteur de processivité et son facteur de chargement sont des protéines hautement conservées, d'un règne à l'autre, structurellement et fonctionnellement. Chez les archées, le PCNA et le RF-C ont été isolés et identifiés en tant qu'homologues de ceux trouvés dans les cellules eucaryotes. Une étude a montré que le RF-C des euryarchées pouvait interagir fonctionnellement avec le PCNA humain (Henneke *et al.* 2002).

Après chargement du facteur de processivité, une ADN polymérase répliquative est recrutée pour synthétiser le brin complémentaire. Chez les crénarchées, plusieurs polymérases, issues de la famille B, impliquées dans la réplication, ont été identifiées et caractérisées. Les euryarchées possèdent également une ADN polymérase de la famille B, en plus d'une ADN polymérase associée à une nouvelle famille, la famille D, absente pour l'instant chez les autres organismes. Comme pour les cellules eucaryotes, la question du rôle de chacune de ces ADN polymérases répliquatives, de famille différente, a été posée (Henneke *et al.* 2005). Les études concernant la réplication des archées étant récentes, les données sont fragmentaires et ne permettent pas d'établir un modèle cohérent. Il peut exister un réplisome pour le brin avancé, et un autre pour le brin retardé (figure 8), avec la question de l'implication des ADN polymérases répliquatives sur chaque brin.

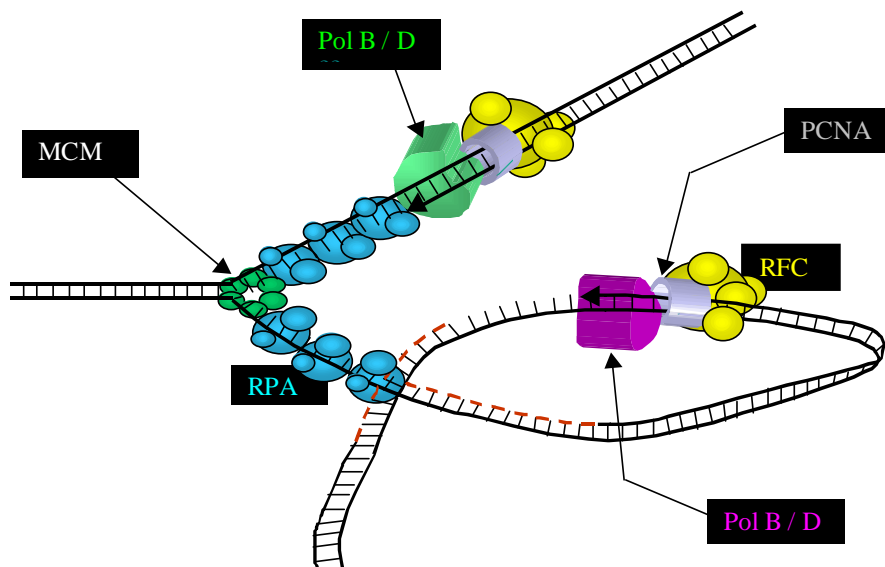


Figure 8 : Modèle de la réplication de l'ADN chez les euryarchaea avec la possibilité d'un réplisome pour chacun des brins.

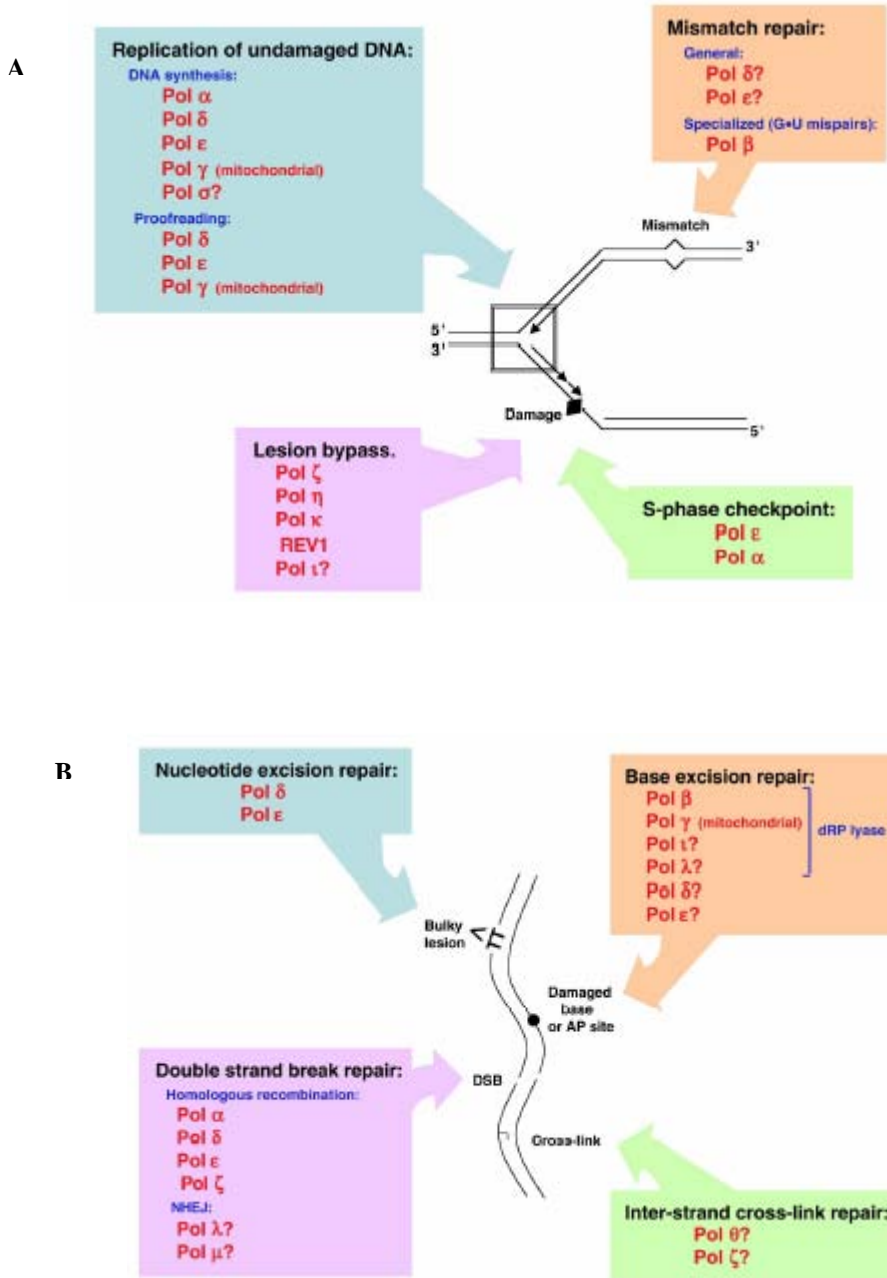


Figure 9 : **A.** implication des ADN polymérases eucaryotes au niveau de la réplication **B.** implication des ADN polymérases eucaryotes au niveau de la réparation

D'après (Shcherbakova *et al.* 2003)

VI. Facteurs intervenant dans la phase d'élongation :

VI.1. Les ADN polymérases

La fonction majeure des ADN polymérases répliquatives est de répliquer de manière fidèle l'enchaînement des nucléotides constituant l'ensemble d'un génome. Cette tâche est complexe du fait que l'ADN est sans cesse soumis à une variété d'agents endogènes ou exogènes capables d'induire des dommages. Les dommages induisent des mutations qui peuvent bloquer la fourche de réplication ou modifier l'information génétique. Lorsque les dommages apparaissent dans un contexte non réplcatif, ils peuvent affecter l'expression de gènes, qui peuvent conduire au dysfonctionnement de nombreux processus cellulaires.

Depuis la découverte de la première ADN polymérase, la Pol I de *E. coli* (Kornberg *et al.* 1955), de nombreuses ADN polymérases ont été caractérisées, en particulier chez les eucaryotes. La synthèse d'ADN durant la phase d'élongation de la réplication de l'ADN génomique est effectuée par l'holoenzyme Pol III chez *E. coli* et par Pol α , Pol δ et Pol ϵ chez les eucaryotes. Les autres ADN polymérases, exceptée Pol γ requise pour la réplication de l'ADN mitochondrial eucaryote, sont spécifiquement impliquées dans les mécanismes de réparation dans un contexte réplcatif ou non. Les ADN polymérases répliquatives interviennent également dans des mécanismes de réparation comme les systèmes NER ou DSB (figure 9).

Chez les eucaryotes, une quinzaine d'ADN polymérases sont connues et classées suivant une nomenclature récemment acceptée (Burgers *et al.* 2001). Elles se regroupent en quatre familles (A, B, X et Y) en fonction de leur structure primaire. La famille A inclut les ADN polymérases homologues de l'ADN polymérase I de *E. coli*, comme la Pol γ (Ropp et Copeland 1996) et la Pol θ (Sharief *et al.* 1999). La famille B est définie par homologie avec l'ADN polymérase II de *E. coli*, et inclut les ADN polymérases α , δ , ϵ et ζ . La famille X comprend les ADN polymérases β (Nagasawa *et al.* 2000), λ (Garcia-Diaz *et al.* 2000), μ (Dominguez *et al.* 2000) et σ (Wang *et al.* 2000). Dernière en date, la famille Y (Ohmori *et al.* 2001) regroupe les ADN polymérases η , ι , et Rev1. La figure 9 illustre l'implication des ADN polymérases eucaryotes au niveau de la réplication et de la réparation de l'ADN.

Chez la bactérie *E. coli*, l'ADN polymérase Pol III, appartenant à la famille C, est largement impliquée dans la réplication (Kelman et O'Donnell 1995), mais intervient également dans la réparation lors de réponses SOS (Cull et McHenry 1995). Les ADN polymérases Pol IV (Wagner *et al.* 1999) et Pol V, apparentées à la famille Y, ont été décrites comme étant impliquées dans le franchissement de lésions (Wagner et Nohmi 2000; Maor-Shoshani *et al.* 2000; Maor-Shoshani *et al.* 2003; Fuchs *et al.*, 2004). Le fait que certaines ADN polymérases bactériennes interviennent, lors de la réplication, pour effectuer des réparations, suggère la déstabilisation de l'holoenzyme III puis sa reconstitution (Sutton et Walker 2001).

Chez les archées, les ADN polymérases décrites comme intervenant au niveau de la réplication sont associées à la famille B et à une nouvelle famille nommée D. Les ADN polymérases B sont retrouvées chez

les crenarchées et les euryarchées, tandis que celles de la famille D sont présentes uniquement chez les euryarchées (Ishino *et al.* 1998). Toutes les deux possèdent une activité exonucléase 3'-5'.

Au niveau de la réparation, une ADN polymérase, apparentée à la famille Y, a été mise en évidence chez la crenarchée *Sulfolobus solfataricus* (Boudsocq *et al.* 2001; Gruz *et al.* 2001).

Le fait qu'aucune autre ADN polymérase n'ai été mise en évidence chez les euryarchées, dont plusieurs génomes ont été complètement séquencés, peut laisser supposer que les ADN polymérases dites répliquatives interviennent dans les mécanismes de réparation, ou que d'autres types d'ADN polymérases possédant des motifs non consensus sont présentes mais non identifiées à ce jour.

VI.1.1. Motifs et structures :

Bien que les ADN polymérases, en fonction de l'organisme dont elles sont issues et de la famille à laquelle elles appartiennent, montrent des variations au niveau structural, plusieurs séquences peptidiques et aspects structuraux sont conservés. Au niveau tridimensionnel, ces protéines adoptent une conformation qui ressemble à une main droite humaine, et sont composées de trois domaines distincts (figure 10) : la paume (Palm : domaine le plus conservé), le pouce (Thumb) et les doigts (Fingers). Six régions hautement conservées, nommée I-VI, ont été identifiées parmi les ADN polymérases des trois règnes. La région I, localisée dans la paume près du pouce, contient deux acides aspartiques nécessaires à l'activité catalytique. Ces deux acides aminés sont conservés dans toutes les ADN polymérases. La région II, au niveau de la paume, et la région III, au niveau des doigts, sont importantes pour la fixation d'un dNTP. La région IV est située au niveau N-terminal et s'étend jusqu'au domaine correspondant au site actif exonucléase 3'→5'. Les deux autres régions, V et VI, sont localisées respectivement au niveau du pouce et des doigts.

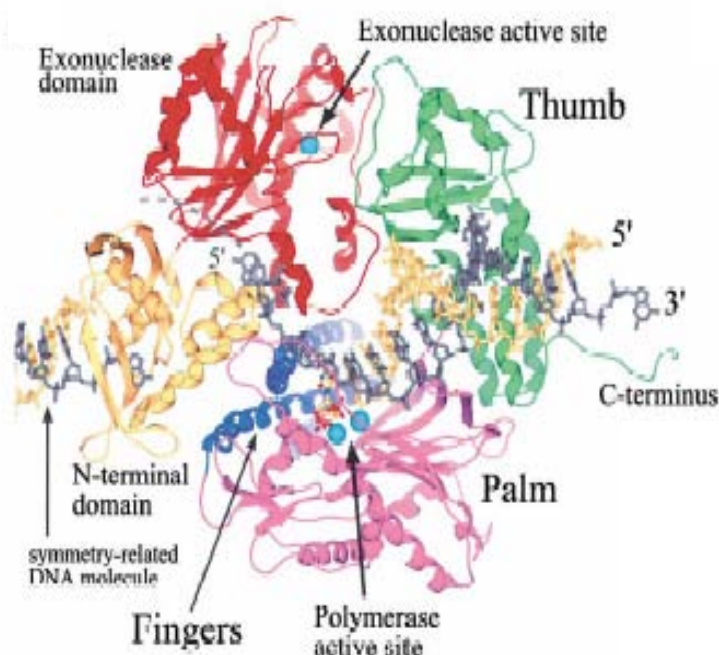


Figure 10 : vue d'un complexe ternaire polymérase-ADN-dNTP. Le domaine N-terminal est représenté en jaune, le domaine exonucléase en rouge, la paume en magenta, les doigts en bleu et le pouce en vert. L'ADN est représenté en gris (matrice) et or (amorçe) (Franklin *et al.* 2001)

VI.1.2. Interactions :

a. Interactions avec l'ADN :

L'incorporation de nucléotides, par les ADN polymérasés, peut être décrite comme suit : fixation de l'enzyme à la jonction matrice simple brin / amorce, puis fixation d'un dNTP qui va être incorporé, en présence de Mg^{2+} , avec la formation d'une liaison phosphodiester et libération d'un pyrophosphate. L'enzyme se déplace ensuite jusqu'au groupement hydroxyle (3'-OH de l'amorce) du dNTP incorporé, et poursuit ainsi l'élongation du brin complémentaire. Les doigts interagissent avec l'ADN simple brin et le nucléotide qui va être incorporé. La paume interagit également avec ce nucléotide, au niveau du site catalytique, tandis que le pouce interagit avec l'ADN double brin formé (Patel et Loeb 2001). Une interaction avec le domaine exonucléase 3'→5' est également proposée, dans le cas de corrections de mésappariements de bases (Steitz 1999).

Les interactions des ADN polymérasés, avec les acides nucléiques, restent toutefois mal connues en ce qui concerne la spécificité de substrat. A savoir : comment une ADN polymérase interagit-elle spécifiquement avec l'ADN, l'ARN ou les différents types d'ADN endommagés ?

b. Interactions protéine-protéine :

L'interaction protéique dominante, associée aux ADN polymérasés (excepté les primases), lors de la phase d'élongation, est celle qui se met en place avec le PCNA. Elle leur confère une processivité, ainsi qu'une stabilité, lors de la synthèse de l'ADN. Cette interaction est également importante lors de la maturation des fragments d'Okazaki, ainsi que dans les mécanismes de la réparation, où les ADN polymérasés interviennent séquentiellement avec d'autres protéines. Toutes les ADN polymérasés, intervenant au niveau de l'élongation, ainsi que la plupart de celles intervenant dans les mécanismes de réparation, interagissent avec le PCNA ; ces interactions mettent généralement en jeu un motif PIP box situé en C-terminal.

Au niveau de la réplication, chez les eucaryotes, des interactions ont été mises en évidence entre l'ADN polymérase ϵ et les protéines du complexe pré-répliatif (Masumoto *et al.* 2000).

Récemment, des interactions, avec des protéines de régulation, ont été observées : l'ADN polymérase λ avec la kinase Cdk2/cyclin A (Frouin *et al.* 2005), ou encore l'ADN polymérase γ avec le suppresseur de tumeur p53 (Achanta *et al.* 2005).

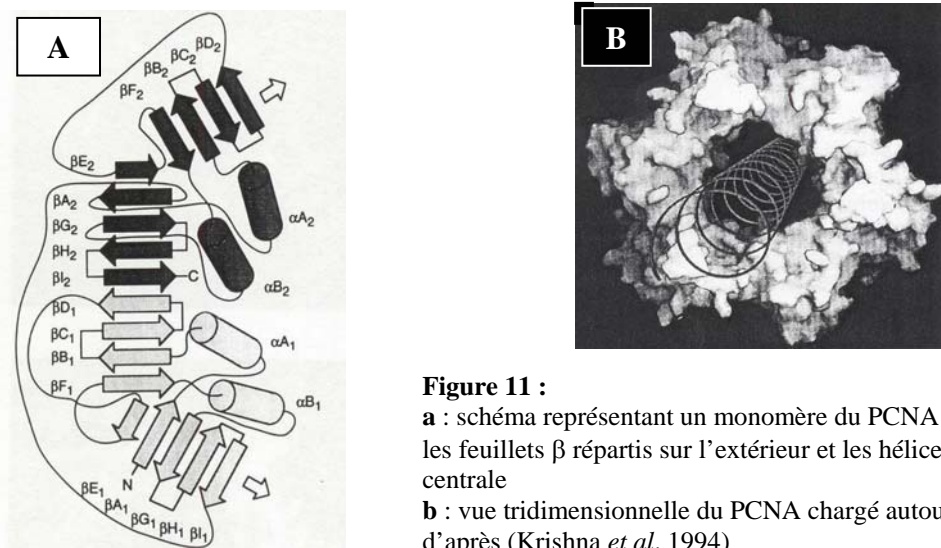
VI.2. Le facteur de réplication PCNA :

Le PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ou facteur de processivité a été initialement décrit lors des études sur le lupus érythémateux, maladie auto-immune, lors duquel des anticorps anti-PCNA sont secrétés, d'où sa dénomination d'antigène (Miyachi *et al.* 1978). Cette protéine nucléaire a, par la suite, été associée à la régulation du cycle cellulaire, à cause de sa concentration plus élevée en phase S (Bravo et Celis 1980; Mathews *et al.* 1984).

A partir des années 90, de nombreuses études ont montré que ce facteur joue un rôle central au niveau des mécanismes génétiques informationnels, étant impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, et les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN.

VI.2.1. Structure :

Le PCNA se présente sous la forme d'un anneau, formé de trois monomères, capable d'être chargé autour de l'ADN double brin. La partie extérieure est composée exclusivement de feuillets β , tandis que la partie centrale, entourant l'ADN, est composée d'hélices α riches en résidus basiques (figure 11A). Cette particularité permet à cette protéine de se placer en « suspension » autour de l'ADN, et ainsi de coulisser librement le long de celui-ci (figure 11B) en présence d'une ADN polymérase.



Les études de cristallographie, effectuées sur le PCNA et son homologue procaryote, la sous-unité β de la polymérase III chez *E. coli*, ont montré que leurs structures étaient superposables, même si leurs

séquences ont peu de similarité (Krishna *et al.* 1994). Le PCNA est un trimère, avec deux domaines similaires par monomère, tandis que le facteur β est un dimère avec trois domaines par monomère.

Au niveau des archées, le PCNA se présente également sous forme trimérique. Les PCNAs de plusieurs espèces ont été étudiés et montrent des similitudes de séquences en acides aminés, de distribution de charges et de structure, avec les PCNAs eucaryotes (Kelman et Hurwitz 1998; Iwai *et al.* 2000a). La structure tridimensionnelle des PCNAs archéens est également superposable à celle du PCNA des eucaryotes et de l'anneau β bactérien.

Si les euryarchées étudiées telles que *Methanobacterium thermoautotrophicus*, (Kelman et Hurwitz 2003), *Archaeoglobus fulgidus* (Seybert *et al.* 2002), *Thermococcus fumicolans* (Henneke *et al.* 2000), *Pyrococcus furiosus* (Matsumiya *et al.* 2002) ou *Pyrococcus abyssi* (Henneke *et al.* 2002), possèdent un seul PCNA, certaines crenarchées en possèdent plusieurs comme chez *Sulfolobus solfataricus* (De Felice *et al.* 1999) et *Sulfurisphaera ohwakuensis* (Iwai *et al.* 2000a). Toutefois, il a été suggéré que les crenarchées possèdent, en fait, un PCNA hétérotrimérique (Dionne *et al.* 2003).

VI.2.2. Fonctions du PCNA :

a. Au niveau de la réplication :

Le PCNA, joue un rôle central dans la réplication, car il permet le recrutement spécifique d'une ADN polymérase de type δ ou ϵ (de la famille B ou D chez les archées), afin d'effectuer l'élongation du brin complémentaire. Ces polymérases ont la particularité d'être beaucoup plus processives en présence du PCNA que le complexe Pol α / primase qui synthétise l'amorce ARN/ADN (Yuzhakov *et al.* 1999; Maga *et al.* 2000). Le RF-C (complexe γ chez la bactérie), ou facteur de chargement, reconnaît cette amorce ARN/ADN, ouvre le PCNA et le fixe sur l'ADN en provoquant le déplacement de la primase (Maga *et al.* 2000).

Au niveau du brin retardé, le PCNA joue également un rôle prépondérant dans la maturation des fragments d'Okazaki. En effet, le fragment se termine lorsque le complexe PCNA/ADN polymérase rencontre l'extrémité 5' de l'amorce ARN, qui est alors déplacée. D'autres protéines sont recrutées afin d'exciser le brin d'ARN (Fen 1, RNase HII), remplir le trou (ADN polymérase) et ligaturer les deux fragments (ADN Ligase 1). Des travaux ont montré que le PCNA stimulait l'activité de Fen 1 (Jonsson *et al.* 1998; Tom *et al.* 2000). Des reconstitutions *in vitro* ont mis en évidence des compétitions entre ADN polymérase, ADN ligase et endonucléase, au niveau de l'interaction avec le PCNA (Yuzhakov *et al.* 1999; Maga *et al.* 2001). Ces observations suggèrent que le PCNA est un acteur central dans la réplication.

b. Au niveau de la réparation :

Plusieurs types de mécanismes peuvent intervenir au niveau de la réparation de l'ADN : réparation par excision de nucléotide (NER), réparation par excision de base (BER), réparation de mésappariements de base (MMR) et réparation de cassures double brin (DSBR).

Les premières études du système NER *in vitro* (Shivji *et al.* 1992) ont montré que le PCNA intervenait, en recrutant une ADN polymérase, dans la phase de synthèse (Aboussekhra *et al.* 1995). D'autres études ont montré qu'il pouvait interagir avec le facteur de reconnaissance XPA (Li *et al.* 1996; Miura and Sasaki 1996) ainsi qu'avec la nucléase XPG (Gary *et al.*, 1997). Cela suggère un rôle additionnel du PCNA, dans les premières étapes de ce mécanisme de réparation.

Des interactions, entre le PCNA et différents facteurs intervenant dans les étapes précédant la synthèse d'ADN, ont également été mises en évidence dans les mécanismes de réparation MMR (Clark *et al.* 2000; Flores-Rozas *et al.* 2000; Kleczkowska *et al.* 2001; Lau et Kolodner 2003) et BER (Dianova *et al.* 2001; Krokan *et al.* 2001; Unk *et al.* 2002).

Au niveau des archées, bien que de nombreuses protéines de réparation homologues à celles du domaine eucaryote soient présentes, aucune interaction avec le PCNA n'a été décrite. Cependant, au sein du laboratoire, une interaction a été observée entre le PCNA et les facteurs Mre11 et Rad 50, intervenant dans la réparation des cassures double brin (Briffotiaux et Flament, communication personnelle).

c. Dans le contrôle du cycle cellulaire :

Le PCNA interagit avec des facteurs impliqués dans les différentes phases du cycle cellulaire (figure 12), et particulièrement la protéine p21, inhibitrice des kinases CDK (Cyclin Dependant kinase), avec laquelle il montre une liaison forte (Gulbis *et al.* 1996; Knibiehler *et al.* 1996). Son interaction directe avec les kinases a également été démontrée (Loor *et al.* 1997; Fukami-Kobayashi et Mitsui 1999; Koundrioukoff *et al.* 2000).

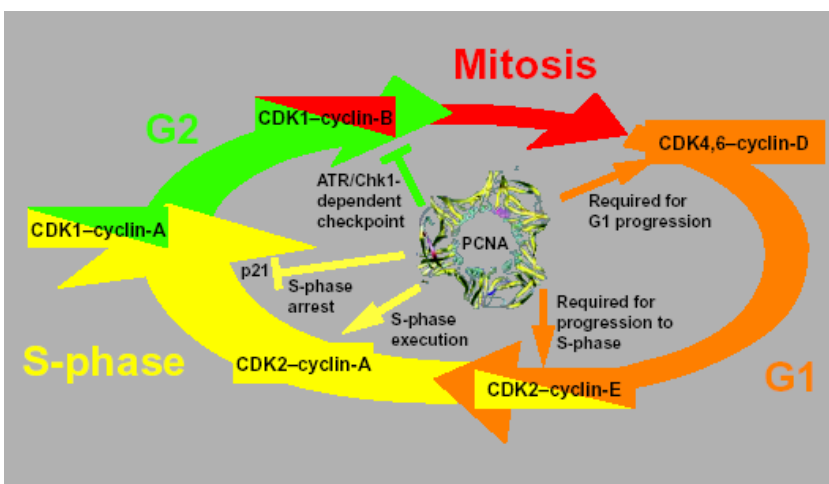


Figure 12 :

Le PCNA interagit avec des composants impliqués dans chaque étape du cycle cellulaire, et particulièrement avec la protéine p21, au cours de la phase S ; d'après (Maga et Hübscher 2003)

d. Autres implications :

Le PCNA semble agir indirectement sur l'expression de gènes, par l'intermédiaire de la méthylase MeCTr (Chuang *et al.* 1997; Iida *et al.* 2002).

Au niveau du phénomène de l'apoptose (mort cellulaire programmée), de nombreuses protéines sont impliquées et certaines d'entre elles, comme Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage) et MyD118 (Myeloid Differentiation), interagissent avec le PCNA (Vairapandi *et al.* 2000). Une autre protéine, appelée ING1, possède un motif PIP-Box (PCNA Interacting Protein) ; lorsque celui-ci est muté, les cellules induites aux ultra-violets n'entrent plus en apoptose (Scott *et al.* 2001).

VI.2.3. Interactions :

Comme décrit précédemment, le PCNA interagit avec des facteurs cellulaires intervenants dans de nombreux mécanismes, et particulièrement ceux liés à la réplication et à l'intégrité (au maintien) de l'information génétique (figure 13).

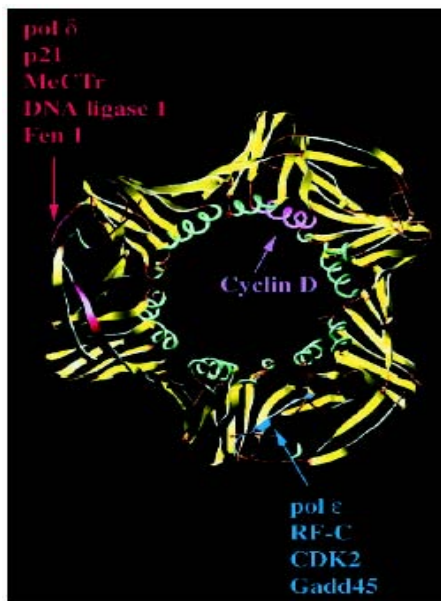


Figure 13 :
Domaines d'interaction au niveau
du PCNA.
D'après (Maga et Hübscher 2003)

La plupart des protéines présentent un motif commun, au niveau de leur séquence en acides aminés, appelé PIP-Box (Jonsson *et al.* 1998; Warbrick 2000) : Q-x-x-(h)-x-x-(a)-(a) où (h) représente un résidu modérément hydrophobe (leucine, isoleucine, méthionine), (a) un résidu aromatique (tyrosine, phénylalanine) et (x) tout type d'acide aminé.

La KA-Box , autre motif de fixation au PCNA, a été trouvé dans quelques protéines interagissant avec ce dernier : K-A-(A/L/I)-(A/L/Q)-x-x-(L/V) (Xu *et al.* 2001) (Xu *et al.*, 2001). Un autre motif, de séquence GX4GX8GX3YFY, a également été montré comme intervenant au niveau de l'interaction entre le PCNA et l'ADN polymérase δ des eucaryotes (Zhang *et al.* 1995), ainsi qu'entre le PCNA et une des ADN polymérases B de la crénarchée *Aeropyrum pernix* (Daimon *et al.* 2002).

L'étude du PCNA humain, en cristallographie, montre que trois acides aminés (M147, F150, Y151) forment une cavité hydrophobe interagissant avec la PIP-Box (Gulbis *et al.* 1996). Chez les PCNAs d'archées, de tels résidus hydrophobes ou aromatiques conservés, semblent également capables de former cette poche hydrophobe (Iwai *et al.* 2000a).

VI.3. Le facteur de réplication RF-C :

VI.3.1. Fonctions du RF-C :

Le RF-C, γ -complexe chez *E. coli*, est encore appelé facteur de chargement, du fait de sa fonction qui est de charger le PCNA sur l'ADN. Cette fonction a été décrite initialement au niveau de la réplication, mais elle est également associée aux mécanismes de réparation et, en général, à tous les mécanismes où intervient le PCNA.

Au niveau de la réplication, le RF-C, tout comme le PCNA, est fonctionnellement conservé dans les trois domaines du monde vivant (Jeruzalmi *et al.* 2002) ; ce fait est renforcé par des expérimentations entre protéines hétérologues humaines et archées *in vitro* (Ishino *et al.* 2001; Henneke *et al.* 2002). Il permet le chargement du PCNA à la jonction amorce/matrice, avant le recrutement d'une ADN polymérase, pour une synthèse processive. Le complexe γ de *E. coli*, en plus de sa fonction de chargement, permet de décharger l'anneau β (Leu *et al.* 2000) ; il en est supposé de même pour le RF-C avec le PCNA archéen (Henneke *et al.* 2002).

Il est intéressant de noter que, chez certaines archées, des études *in vitro* montrent que le PCNA semble se charger seul sur l'ADN, en absence du RF-C (*Pyrococcus abyssi* : (Cann *et al.* 2001) ; *Aeropyrum pernix* : (Daimon *et al.* 2002) ; *Sulfolobus solfataricus* : (De Felice *et al.* 1999; Dionne *et al.* 2003). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les faibles liaisons intermonomères favorisent l'ouverture spontanée du PCNA, à haute température.

Le RF-C fait partie, comme les protéines d'initiation Orc1, Cdc6/Cdc18, ainsi que les hélicases MCM, de la superfamille des protéines AAA+ (ATPase Associated with a variety of cellular Activity). Cette famille regroupe les protéines capables de fixer et d'hydrolyser l'ATP, en donnant lieu à un assemblage ou un désassemblage réactionnel (Neuwald *et al.* 1999). En effet, la fixation de molécules d'ATP induit un changement conformationnel du RF-C, permettant d'ouvrir le PCNA et de le charger (figure 14) ; l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire à la fermeture de l'anneau autour de l'ADN (Davey *et al.* 2002).

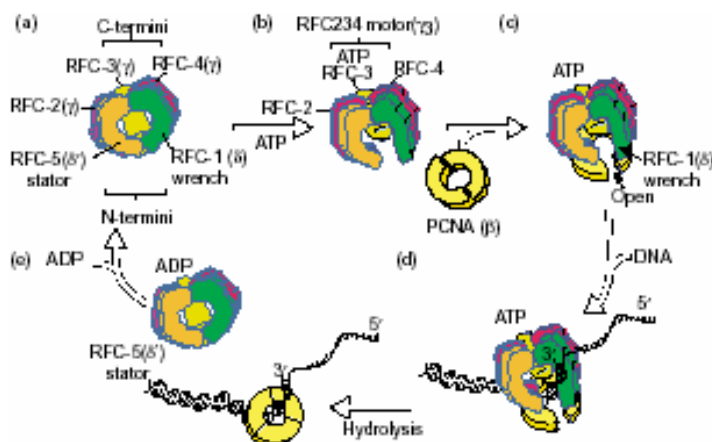


Figure 14 : mécanisme de chargement du facteur de processivité par le RF-C et le complexe γ

Les parties N-terminales du RF-C sont repliées (a) ; la fixation d'ATP (b) entraîne un changement de conformation, lui permettant de fixer le PCNA (ou β) (c) et de le charger sur l'ADN (d). L'hydrolyse de l'ATP redonne sa conformation originelle, rompant son interaction avec le PCNA (ou β), qui se referme ainsi autour de l'ADN. d'après (O'Donnell *et al.* 2001).

L'aspect séquentiel de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP semble essentiel dans le processus de chargement. Un ordre réactionnel a été proposé pour le complexe γ de *E. coli* (Johnson et O'Donnell 2003) et pour le RF-C de l'euryarchée *Archaeoglobus fulgidus* (Seybert et Wigley 2004).

VI.3.2. Structure :

Le facteur de chargement le mieux étudié au niveau de sa structure est celui de *E. coli*. Bien qu'il soit composé de sept sous-unités ($\gamma\tau_2\delta\delta'\chi\psi$), au sein de l'holoenzyme III (Pritchard *et al.* 2000), la partie fonctionnelle essentielle au chargement de l'anneau β se présente sous la forme d'un hétéropentamère ($\gamma\tau_2\delta\delta'$), tout comme le complexe eucaryote RF-C (RFC1 à 5). Au niveau des archées, la majorité des facteurs de chargement étudiés semblent agencés sous forme d'un hétéropentamère (une grande sous-unité et quatre petites identiques), hormis ceux des euryarchées *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Kelman et Hurwitz 2000) et *Methanosarcina acetivorans* (Chen *et al.* 2005), qui se présenteraient respectivement sous forme d'un hétérohexamère (deux grandes sous-unités et quatre petites identiques) et d'un hétéropentamère différent (constitué d'une grande sous-unité, de trois petites identiques et d'une petite différente).

A l'interface de chaque sous-unité se trouve le site de fixation de l'ATP (motif GKT), appelé P-Loop ou Walker A, ainsi qu'un doigt arginine permettant l'hydrolyse (motif SRC) (Yao *et al.* 2003), une sous-unité induisant l'hydrolyse de l'ATP fixé sur la sous-unité voisine.

L'étude du complexe γ met en évidence, par analogie avec un moteur électrique, trois composants principaux (Jeruzalmi *et al.* 2001b) (figure 15), dont les fonctions peuvent être inférées au RF-C des eucaryotes et des archées : (i) le trimère γ (ou RF-C 2, 3 et 4), représentant le moteur (motor), siège de l'hydrolyse de l'ATP ; (ii) La sous-unité δ (ou RF-C 1), dénommée « clef de torsion » (wrench), permet l'ouverture de l'anneau β (PCNA) ; (iii) La sous-unité δ' (ou RF-C 5), appelé stator, modulant l'interaction avec l'anneau β (PCNA).

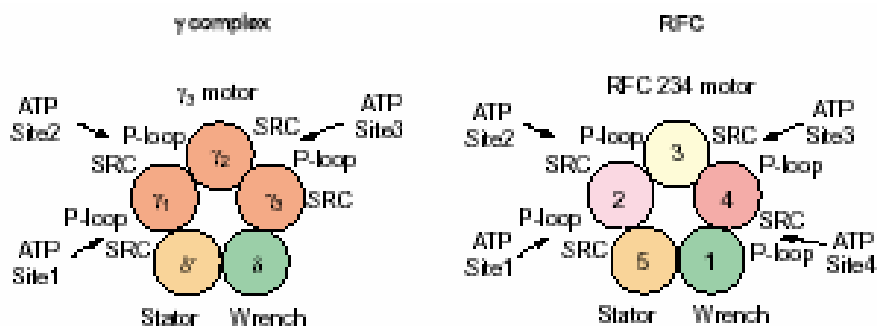


Figure 15 :

Vue schématique du RFC et du complexe γ (facteur de chargement des procaryotes) montrant les sites de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, ainsi que l'organisation fonctionnelle des sous-unités (Motor, Stator et Wrench).

D'après (O'Donnell *et al.* 2001)

La première structure cristallographique d'un facteur de chargement a été celle du complexe γ de *E. coli*, avec un anneau β muté, et en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP (Jeruzalmi *et al.* 2001a). L'analyse de cette structure montre que le complexe γ ouvre l'anneau β , en décalant un des deux monomères. La structure du RF-C, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a également été obtenue, en présence du facteur de processivité et d'un analogue de d'ATP non hydrolysable (Bowman *et al.* 2004). L'analyse de celle-ci a permis de cartographier les sites d'interaction entre le RF-C et le PCNA, et entre le RF-C et l'ADN (figure 16A). Au niveau des archées, aucune structure complète du complexe RF-C n'a pu être obtenue, compte tenu de l'instabilité de la grande sous-unité. Toutefois, des données en microscopie électronique, en association avec la résolution de la structure d'un complexe formé de petites sous-unités (Oyama *et al.* 2001) et la structure connue du PCNA (Matsumiya *et al.* 2001), ont permis de proposer un modèle pour le complexe RF-C/PCNA de *Pyrococcus furiosus* (Miyata *et al.* 2004) (figure 16B).

Les résultats structuraux obtenus, pour le facteur de chargement, dans les trois domaines du vivant, s'accordent sur le fait que celui-ci forme une spirale, en forme de fer à cheval, autour du PCNA, et donc autour de l'ADN.

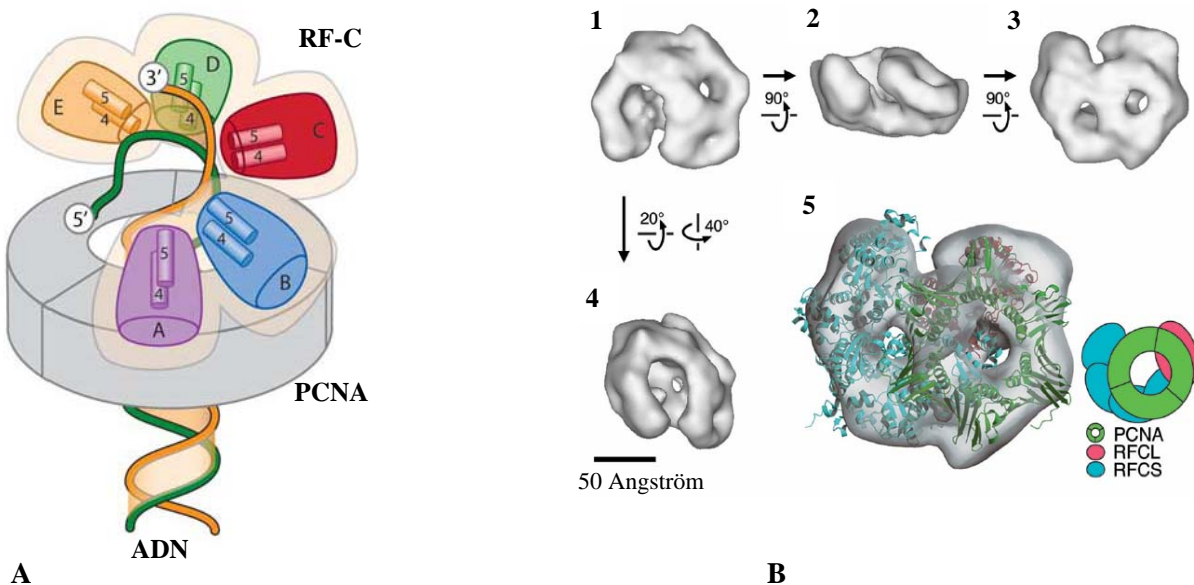


Figure16 :

A. Vue schématique du complexe RF-C/PCNA en présence de l'ADN, d'après les analyses structurales effectuées chez l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*. Les sous-unités 1 à 5 sont notées de A à E. Les cylindres à l'intérieur de chaque sous-unité représentent les hélices α , impliquées dans les interactions avec le PCNA et l'ADN (d'après (Bowman *et al.* 2004)). **B.** (1-4) : Vues, sous différents angles, du complexe RF-C en microscopie électronique. (5) : Vue schématique du complexe RF-C/PCNA, chez l'euryarchée *Pyrococcus furiosus*, d'après les structures connues de la petite sous-unité et du PCNA, couplées aux résultats obtenus sur le complexe RF-C en microscopie électronique. D'après (Miyata *et al.* 2004).

VI.3.3. Interactions :

Au niveau de la séquence en acides aminés, sept boîtes (I à VII), présentant des motifs conservés, ont été mis en évidence chez tous les organismes étudiés, hormis la boîte I (domaine de fixation à l'ADN) uniquement retrouvée sur la grande sous-unité chez les eucaryotes (figure 17). La boîte III contient des séquences connues comme étant des domaines de fixation pour l'ATP (Cann *et al.* 1999), du type Walker A (P-Loop) ou Walker B (DEAD box). Elles sont incluses dans une zone où des motifs de liaison au PCNA ont été décrits.

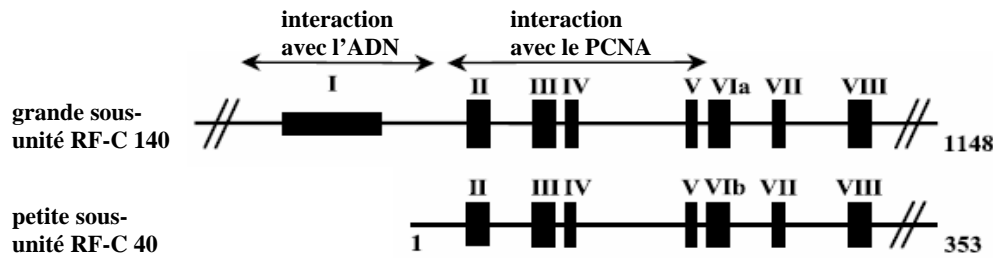


Figure 17 :

Représentation schématique d'une partie des séquences de la grande sous-unité et d'une petite sous-unité du RF-C humain. Les parties noires, à par la I, représentent les boîtes hautement conservées dans les trois règnes du monde vivant. (d'après (Henneke *et al.* 2002).

a. Interactions avec l'ADN :

De manière communément admise, le RF-C déplace la primase, en chargeant le PCNA sur l'amorce ADN/ARN synthétisée (Maga *et al.* 2000). Certaines études montrent que le chargement se ferait par une reconnaissance de la partie 3'-OH de l'amorce (Yao *et al.* 2000; Ason *et al.* 2003), tandis que d'autres supposent, au contraire, que le RF-C aurait une affinité avec la partie 5'-P de l'amorce, par l'intermédiaire de la grande sous-unité (Ellison et Stillman 2003; Lavrik *et al.* 2003). Des travaux récents, sur la structure du complexe γ de *E. coli*, montrent qu'il est plus probable que le PCNA soit chargé au niveau de la région 3'-OH de l'amorce (Goedken *et al.* 2005).

Toutes les sous-unités du RF-C des eucaryotes présentent des résidus lysine et arginine supposés être des motifs de liaison à l'ADN (Bowman *et al.* 2005), mais l'interaction dominante se fait par le biais d'un grand motif situé sur la partie N-terminal de la grande sous-unité (Keller *et al.* 1999). Ce dernier semble être impliqué dans les interactions avec la zone double brin de la zone amorcée, tandis que les autres motifs interagiraient avec la zone simple brin (figure 16A).

Au niveau des procaryotes, le motif d'interaction, correspondant à la boîte I (Figure 17), est absent sur la grande sous-unité. Il a été montré, chez l'euryarchée *Pyrococcus furiosus*, que l'affinité avec l'ADN serait liée à des résidus acides (acides aspartique et glutamique), présents au niveau des petites sous-unités (Ishino *et al.* 2003), contrairement aux petites sous-unités chez les eucaryotes. Chez la bactérie *E. coli*, le γ -complexe n'a pas d'affinité avec l'ADN en absence de l'anneau β (Hingorani et O'Donnell 1998).

b. Interactions avec les protéines :

Etant donné la fonction de chargement du RF-C, son interaction dominante se fait avec le PCNA. Comme la plupart des protéines interagissant avec le facteur de processivité, le RF-C présente également un motif PIP-Box, situé en C-terminal de la grande sous-unité. D'autres interactions se font par le biais des petites sous-unités, mais ne sont pas permanentes ; elles ont été montrées comme étant couplées avec la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, qui régit l'ouverture et la fermeture du PCNA autour de l'ADN (Venclovas *et al.* 2002). Une fois le PCNA chargé, l'interaction se fait uniquement par le biais du motif PIP-Box de la grande sous-unité, les autres sous-unités interagissant avec l'ADN simple brin matriciel et la région 3'-OH de l'amorce.

Les interactions fonctionnelles entre le RF-C et le PCNA se font en présence d'ATP. Des études ont montré, chez les eucaryotes, qu'elles seraient régulées par certaines protéines du cycle cellulaire (CDK), capables de phosphoryler le facteur de chargement (Salles-Passador *et al.* 2003) ; cela suppose une interaction entre ces kinases et le RF-C.

D'autres interactions ont été mises en évidence avec l'ADN ligase des eucaryotes (Levin *et al.* 2004) intervenant dans la maturation des fragments d'Okasaki, ou avec le RP-A, facteur de stabilisation de l'ADN simple brin.

Il est à noter, qu'au niveau de certains mécanismes de réparation, chez les eucaryotes, la grande sous-unité (RF-C1) peut être remplacée par une sous-unité telle que Rad17 (Rad24 chez la levure *S. cerevisiae*) (Green *et al.* 2000). Ce nouvel hétéropentamère peut s'associer avec le complexe Rad 9-Rad1-Hus1, hétérotrimère en forme d'anneau semblable au PCNA, et le charger sur l'ADN (Zou *et al.* 2002). Le complexe formé, qui a été résolu en structure 3D, s'avère peu différent du complexe RF-C/PCNA (Griffith *et al.* 2002). D'autres composants, comme Ctf18 (Hanna *et al.* 2001; Mayer *et al.* 2001) ou Chl12, peuvent également former un hétéropentamère fonctionnel, requis dans le cadre de la cohésion des chromatines sœurs. Il a été montré, *in vitro*, que le complexe Chl12-RF-C pouvait charger le PCNA, mais qu'il inhibait la synthèse d'ADN, contrairement au RF-C (Shiomi *et al.* 2004).

VI.4. Le facteur de stabilisation de l'ADN simple brin (RP-A)

VI.4.1. Fonctions du RP-A :

Les protéines de liaison à l'ADN simple brin interviennent dans de nombreux aspects du métabolisme de l'ADN. Ces protéines (SSB chez les bactéries et les crénarchées, RP-A chez les eucaryotes et les euryarchées) sont indispensables à la réplication de l'ADN, et sont des composantes clés de la recombinaison et de la réparation de l'ADN (Chedin *et al.* 1998; Komori et Ishino 2001).

a. Implication dans la réplication :

Le RP-A, lors de la synthèse du brin précoce, maintient la fourche de réplication ouverte par l'hélicase (Carpentieri *et al.* 2002), permettant aux facteurs de réplication (primase, PCNA, RF-C, polymérase) de se fixer et, ainsi, de synthétiser le brin complémentaire. Il est intéressant de noter que le RP-A peut, *in vitro*, stimuler l'activité de déroulement de l'ADN, sans présence d'hélicase, dans des conditions ioniques faibles. Ce déroulement est stimulé par la phosphorylation de la protéine chez les eucaryotes (Liu *et al.* 2006).

Le RP-A interagit avec l'hélicase, puis avec les sous-unités primase du complexe Pol α / primase, lors de la synthèse de l'amorce de réplication (Wold 1997). Les interactions entre l'amorce et le complexe Pol α / primase semblent stabilisées et les erreurs d'incorporation de la polymérase diminuent (Maga *et al.* 2001).

Au niveau de la synthèse du brin retard, son action a également été démontrée lors de la maturation des fragments d'Okazaki (figure 18) (Hübscher et Seo 2001; MacNeill 2001).

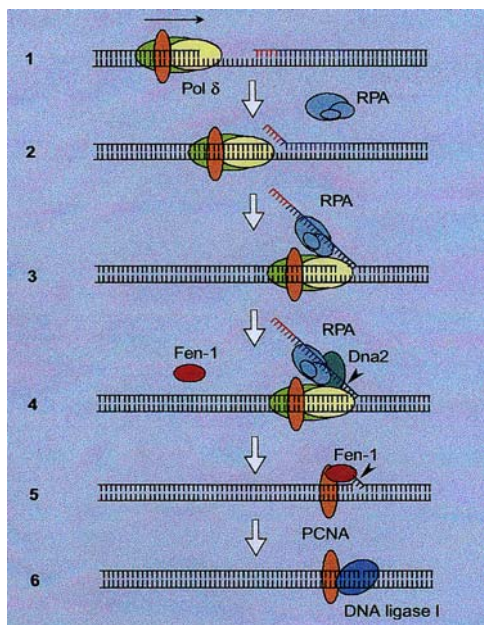


Figure 18: maturation des fragments d'Okazaki chez les eucaryotes. D'après (MacNeill 2001)

- 1 : synthèse du brin retard par l'ADN polymérase δ fixée sur le complexe RF-C/PCNA ;
- 2 : le complexe déplace la partie 5' (amorce ARN) du précédent fragment formé ;
- 3 : une portion simple brin de 8 nucléotides permet au RP-A de se fixer sur l'ADN et de le dérouler pour atteindre un complexe de fixation stable à 30 nucléotides ;
- 4 : le fragment maintenu par le RP-A est excisé par l'endonucléase Dna2 ;
- 5 : la nucléase Fen-1 coupe le petit fragment restant ;
- 6 : la jonction se fait à l'aide d'une DNA ligase, qui se fixe sur le PCNA.

b. Implication dans les mécanismes de réparation :

Le RP-A interagit spécifiquement avec diverses protéines, comme le facteur XPA et la nucléase XPG (Xeroderma Pigmentosum groupe A et G), requises lors de la réparation par excision de nucléotide (NER : Nucleotide Excision Repair) (Wood 1999; Missura *et al.* 2001). Le facteur XPA se lie à l'ADN, après reconnaissance d'un dommage ; cette liaison est stimulée significativement par le RP-A. Les nucléases ERCC1/XPF (Excision Repair Cross-Complementing 1/ Xeroderma pigmentosum groupe F) et XPG se fixent ensuite sur le complexe XPA/RP-A/ADN endommagé et incisent de chaque côté du dommage, provoquant une région simple brin d'environ 30 nucléotides. Le RP-A stabilise cette région jusqu'à ce qu'un brin complémentaire soit synthétisé (Figure 19).

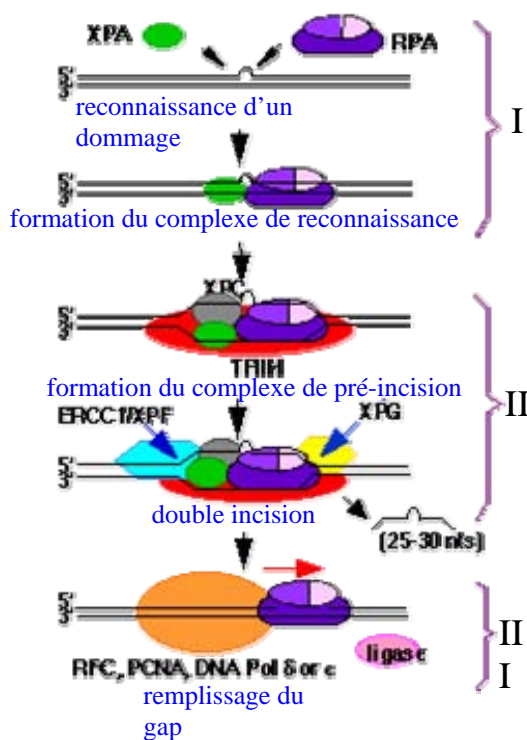


Figure 19: réparation par excision de nucléotide (NER)

I reconnaissance d'une lésion, **II** excision du fragment d'ADN contenant la lésion, **III** synthèse du brin d'ADN manquant.

Le RP-A a également été montré comme étant important dans les mécanismes de réparation intervenant après une cassure double brin (McIlwraith *et al.* 2000; Wang et Haber 2004).

c. Autres fonctions et interactions mises en évidence :

Des interactions ont également été démontrées entre le facteur RP-A et les activateurs transcriptionnels GAL4 et VP16 (He *et al.* 1993), certaines protéines de la recombinaison homologue comme Rad 51 et Rad 52 (Wu *et al.* 2005), mais également avec le suppresseur de tumeur p53 (Abramova *et al.* 1997). L'interaction entre la protéine p53 et le RP-A permet de bloquer la liaison entre l'ADN simple brin et le RP-A.

VI.4.2. Organisation structurale et fixation sur l'ADN simple brin :

Bien que fonctionnellement équivalents, le SSB et le RP-A ont des organisations structurales différentes. En effet, chez les bactéries, un seul gène code pour le SSB et la forme active de la protéine est un homotétramère, dans lequel chaque monomère contient un site de fixation à l'ADN simple brin (figure 20). Chez les Eucaryotes, le RP-A est un complexe formé de trois sous-unités distinctes (RP-A70, RP-A32 et RP-A14 chez l'homme), comprenant au total quatre domaines de fixation à l'ADN (Bastin-Shanower et Brill 2001). Il est intéressant de noter que les sites de fixation à l'ADN simple brin (repliement du type Oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB)), présents dans la séquence du RP-A et du SSB, présentent un niveau significatif d'homologie. D'autre part, il a été montré que la structure tridimensionnelle de ce motif est conservé entre le RP-A et le SSB (Bult *et al.* 1996).

C'est dans le domaine des Archaea que l'on rencontre le plus de diversité au niveau de l'organisation du RP-A. En effet chez *M. jannaschii*, le RP-A est codé par un seul gène, dont le produit est un monomère actif comprenant quatre sites de fixation à l'ADN (Kelly *et al.* 1998), alors que dans le genre *Pyrococcus*, le complexe RP-A est codé par trois sous-unités distinctes, agencées en opéron (figure 20).

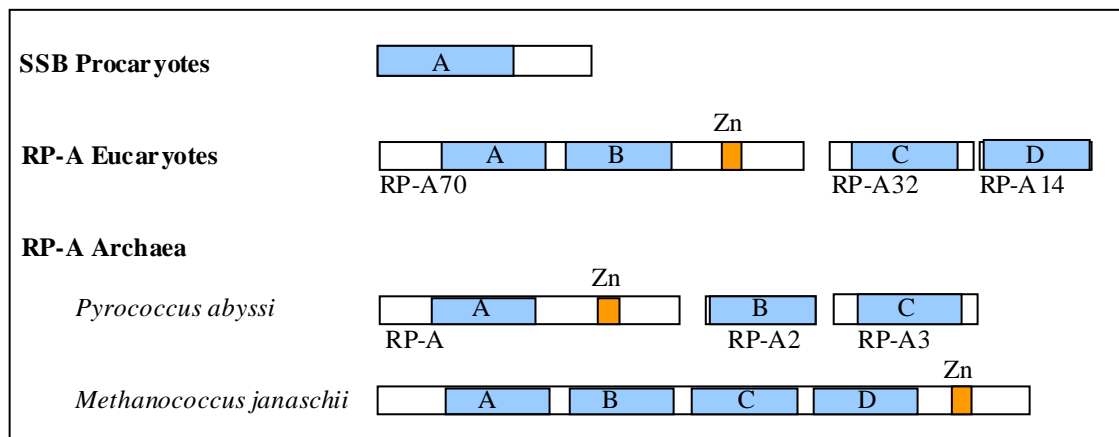


Figure 20 : Comparaison de la structure des protéines de liaison à l'ADN simple brin chez les procaryotes, les eucaryotes et les archaées. Les sites de fixation à l'ADN simple brin apparaissent en bleu ; les domaines putatif en doigt de Zinc sont en orange.

La position des trois sous-unités du RP-A de *P. abyssi* a pu être repérée dans le génome, grâce à la présence de ces domaines de fixation à l'ADN simple brin. La structure primaire de ces domaines est assez proche de celle de leurs homologues humains (Bochkarev *et al.* 1999; Bochkareva *et al.* 2001), notamment au niveau des éléments de structure secondaire (figure 21a). De plus les résidus impliqués dans la fixation de l'ADN sont globalement conservés.

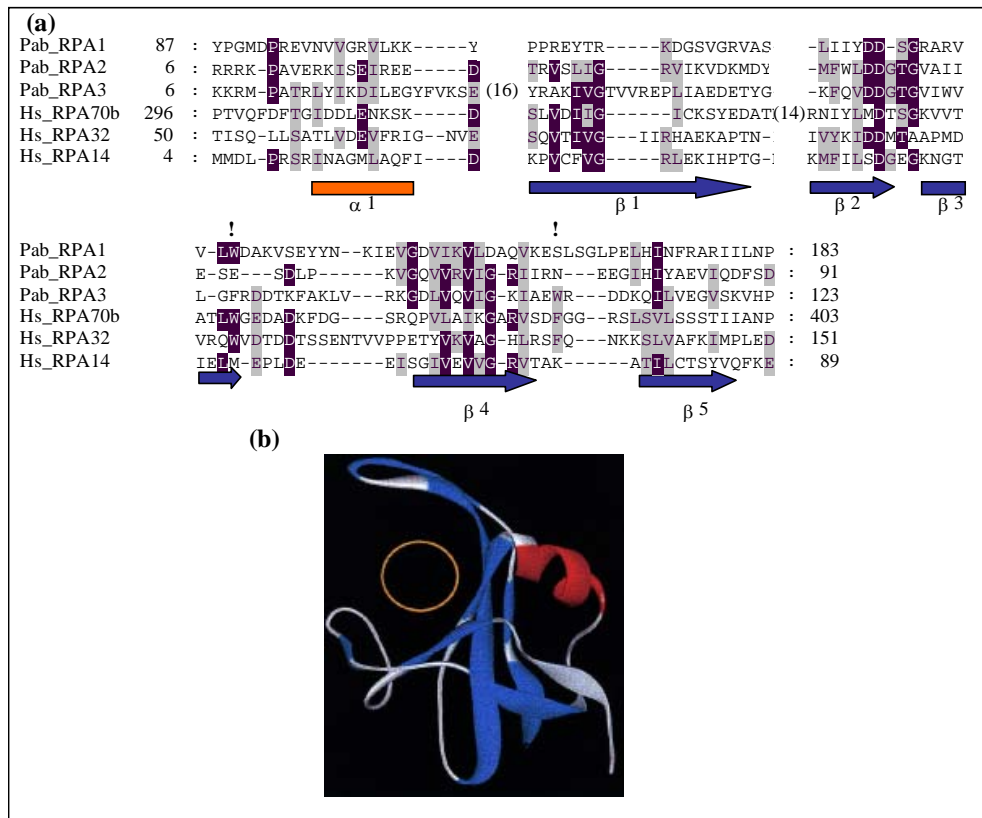


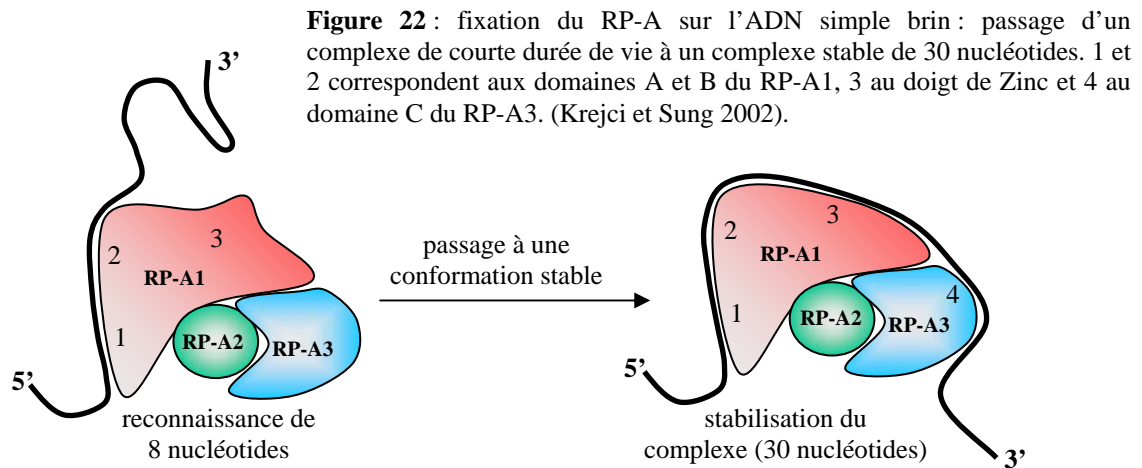
Figure 21 : a. Comparaison de la structure primaire des domaines potentiels de fixation à l'ADN simple brin de *P. abyssi* avec leurs homologues humains. Les résidus identiques apparaissent en blanc sur fond noir, les résidus conservés sont grisés. Les points d'exclamation indiquent la position des résidus qui sont en contact avec l'ADN simple brin, dans la structure du RPA70 humain. Le rectangle vide et les flèches noires indiquent la position des hélices α et des brins β dans la structure de l'OB fold du RPA70 humain. **b.** Structure du domaine de fixation à l'ADN simple brin du RPA70 humain. Le code couleur pour les hélices α et les feuilletts β correspond à celui utilisé pour l'alignement. La structure est montrée de manière à ce que l'axe du tunnel dans lequel vient se fixer l'ADN est perpendiculaire à la figure (l'ADN est représenté sous forme d'un cercle orange). D'après (Chedin *et al.* 1998).

La structure d'un repliement de type OB, de la sous-unité RP-A70 humaine, a été élucidée (Jacobs *et al.* 1999) (figure 21b). La structure observée forme un tunnel, dans lequel va venir se fixer l'ADN simple brin, et les résidus impliqués, dans l'interaction avec l'ADN, se trouvent à la surface de ce tunnel. Il est fort probable que l'organisation structurale globale des domaines de fixation à l'ADN simple brin, du RP-A des *Pyrococcus*, soit similaire à celle de son homologue humain, et que le mécanisme de fixation à l'ADN soit conservé entre ces différents domaines.

Comme l'illustre la figure 22, le RP-A se lie à de courtes régions de 8 nucléotides, grâce à son domaine central (1 et 2) localisé sur la sous unité RP-A1. Ce complexe initial est faible et de durée de vie courte ; un changement conformationnel de RP-A1 permet de présenter un troisième domaine de fixation à l'ADN simple brin, correspondant au doigt de Zinc putatif (3). Cette nouvelle conformation permet de créer

un complexe final stable de 30 nucléotides, renforcé par le domaine de liaison de RP-A3. La sous unité RP-A2 semble être une clef de voûte au sein du complexe.

La création d'une liaison initiale stable RP-A-ADNss favorise ainsi l'association d'autres molécules de RP-A sur les sites adjacents, amenant un déroulement des duplex d'ADN, pouvant aller jusqu'à une dénaturation complète.



VII. Etudes effectuées sur les facteurs intervenant dans la phase d'élongation du réplisome des euryarchées : (tableau 2)

Un réplisome n'a jamais été isolé intact d'une cellule ; la compréhension de sa structure et de sa dynamique doit se faire par le biais de réassemblage *in vitro* de chacun des facteurs. Les protéines, essentiellement les enzymes, ont dans un premier temps été isolées à partir d'extraits cellulaires dans lesquels était recherchée l'activité désirée. Depuis la mise en place de la technique de clonage de gènes, les facteurs peuvent être produits sous une forme recombinante, puis purifiés en vue de leur caractérisation fonctionnelle par des approches biochimiques. La sélection des séquences d'intérêt a également été simplifiée *via* le séquençage de génomes complets, à partir desquels les outils de bioinformatique peuvent mettre en évidence les motifs caractéristiques d'une protéine recherchée (site catalytique, motifs d'interaction, séquences conservées...). L'ensemble des données récoltées permet, comme vu précédemment, de dresser un modèle moléculaire dynamique du réplisome étudié.

Les études effectuées chez les euryarchées sont encore préliminaires car les premières ADN polymérases répliquatives ont été mises en évidence il y a une dizaine d'années. C'est à partir des années 2000 que les premières expérimentations fonctionnelles, associant les ADN polymérases B et D aux facteurs accessoires PCNA et RF-C, ont été effectuées. Les informations obtenues depuis ont permis de dresser des modèles structuraux, avec la mise en évidence de motifs d'interaction ou de sites catalytiques, comme pour le PCNA et le RF-C de *Pyrococcus furiosus* ou pour l'ADN polymérase D de *Pyrococcus horikoshii*. L'aspect fonctionnel des mécanismes intervenant dans la phase d'élongation (chargement du PCNA et synthèse d'ADN) ont particulièrement été étudiés et modélisés, de manière indépendante, chez *Pyrococcus furiosus*, et *Archaeoglobus fulgidus*, cependant que le rôle des ADN polymérases au niveau de la fourche de réplication a récemment été étudié chez *Pyrococcus abyssi*.

A ce jour, aucun modèle dynamique, couplant le chargement du PCNA à la synthèse d'ADN, n'a été proposé pour schématiser la phase d'élongation de la réplication chez les euryarchées.

Tableau 2. Etudes effectuées sur les facteurs intervenant dans la phase d'élongation du réplisome des euryarchées

| Organismes | Facteurs | Etudes | Approches | Résultats | Références |
|----------------------------|---|--|--|---|--------------------------|
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | Pol B | Mise en évidence, caractérisation | Clonage, expression, test d'activité | Etude de la séquence, comparaison | (Uemori et al. 1993) |
| | Pol D | Mise en évidence | Purification partielle | Activité polymérase ; estimation de la masse | (Imamura et al. 1995) |
| | Pol D | Mise en évidence, caractérisation | Clonage, expression, test d'activité | Propriétés biochimiques, organisation génique | (Uemori et al. 1997) |
| | PCNA | Mise en évidence, caractérisation | Clonage, expression et synthèse d'ADN | La synthèse d'ADN des polymérases B et D est stimulée par le PCNA | (Cann et al. 1999) |
| | PCNA | Structure | Cristallographie | Comparaison avec les facteurs de processivité des autres règnes ; étude de la thermostabilité | (Matsumiya et al. 2001) |
| | Pol B | Fonction exonucléase 3'-5' | Expression de mutants, test d'activité, interaction avec l'ADN | Les domaines d'activité polymérase et exonucléase sont structurellement liés. | (Komori and Ishino 2000) |
| | RF-C | Mise en évidence, caractérisation biochimique | Clonage, expression, hydrolyse de l'ATP, interaction avec l'ADN | L'hydrolyse de l'ATP est stimulée par le PCNA et l'ADN ; les deux sous unités interagissent avec l'ADN simple et double brins. | (Cann et al. 2001) |
| | PCNA, hRF-C | Interaction fonctionnelle hétérologue | Synthèse d'ADN | Le PCNA interagit fonctionnellement avec l'ADN polymérase δ humaine. | (Ishino et al. 2001) |
| | RF-C | Structure et organisation des petites sous-unités | Analyse par microscopie électronique | Plusieurs organisations oligomériques sont observées ; les interactions entre petites sous unités sont plus fortes qu'avec la grande. | (Mayanagi et al. 2001) |
| | RF-C | Structure atomique de la petite sous-unité | Etude des données structurales | Sites de fixation à l'ADN, structure d'un hexamère de 6 petites sous unités. | (Oyama et al. 2001) |
| | RF-C | Influence de mutations sur la petite sous-unité | Synthèse d'ADN, interaction avec ADN et PCNA | Les petites sous unités interagissent par la partie Ct ; leur oligomérisation augmente l'affinité avec l'ADN | (Ishino et al. 2003) |
| | PCNA, RF-C | Interaction physique et structurale entre RF-C et PCNA | Cristallographie du PCNA couplé à un peptide PIP box, synthèse d'ADN | Le domaine PIP box du RF-C n'est pas nécessaire pour la stimulation de la synthèse contrairement à celle de Pol B | (Matsumiya et al. 2002) |
| | PCNA | Liaisons entre monomères, structures de mutants | Cristallographie, interaction, synthèse d'ADN | Six acides aminés sont essentiels au maintien de la structure trimérique. | (Matsumiya et al. 2003) |
| | PCNA, RF-C | Chargement du PCNA | Reconstitution <i>in vitro</i> d'un complexe de chargement, microscopie électronique | L'ATP n'est pas nécessaire au chargement mais à la dissociation du RF-C ; proposition d'un modèle structural. | (Miyata et al. 2004) |
| RF-C | Importance de la région C-terminale de la grande sous-unité | Expression de mutants, interaction avec le PCNA | Importance de la région C-terminale du RF-C pour le chargement. | (Nishida et al. 2005) | |

| Organisme | Facteurs | Etudes | Approches | Résultats | Références |
|-----------------------------------|--|---|--|--|--|
| <i>Pyrococcus abyssi</i> | Pol B, Pol D PCNA, RF-C Pol B, Pol D, PCNA | Mise en évidence, caractérisation Mise en évidence, caractérisation, interaction fonctionnelle hétérologue, domaine de liaison Rôle des ADN polymérase en présence de PCNA : spécificité de substrat, déplacement de brin | Clonage, expression, test d'activité Clonage, expression, synthèse d'ADN, hydrolyse de l'ATP Synthèse d'ADN, interaction avec l'ADN, interaction avec le PCNA | Influence cofacteurs, concentration en sels... L'hydrolyse de l'ATP est dépendante de l'ADN ; le RF-C de <i>Pab</i> peut charger le PCNA humain ; le PCNA de <i>Pab</i> stimule les ADN polymérase L'interaction entre polymérase et PCNA est ADN dépendante ; Pol D peut élonguer une amorce ARN et peut effectuer du déplacement de brin | (Gueguen <i>et al.</i> 2001) (Henneke <i>et al.</i> 2002) (Henneke <i>et al.</i> 2005) |
| <i>Pyrococcus horikoshii</i> | Pol D Pol D Pol D, PCNA, RF-C | Mise en évidence ; caractérisation du site catalytique polymérase ; fidélité Cartographie fonctionnelle Cartographie des domaines d'interaction | Clonage, expression ; production de mutants, test d'activité Expression de protéines tronquées, interaction avec l'ADN, synthèse d'ADN, activité exonucléase, thermostabilité Clonage, expression du PCNA et RF-C ; production de Pol D tronquées, interaction par SPR, double hybride en levure | Composée de 2 grandes sous-unités et 2 petites, deux fois plus fidèle que la <i>Taq</i> polymérase, importance des acides aminés D1122 et D1124 pour l'activité polymérase. Proposition d'un modèle structurale comprenant les sites exonucléase, polymérase et les domaines de régulation Proposition d'un modèle regroupant les interactions : entre <i>DPI</i> et la grande sous-unité du RF-C, entre <i>DPI</i> et le PCNA, entre <i>DPI</i> et <i>DP2</i> | (Shen <i>et al.</i> 2001) (Shen <i>et al.</i> 2003) (Tang <i>et al.</i> 2004) |
| <i>Thermococcus fumicolans</i> | Pol B PCNA | Caractérisation Interaction fonctionnelle hétérologue | Clonage, expression, activité, fidélité Clonage, expression ; synthèse d'ADN | Forte thermostabilité, efficace en PCR Le PCNA stimule l'activité de l'ADN polymérase δ humaine | (Cambon Bonavita <i>et al.</i> 2000) (Henneke <i>et al.</i> 2000) |
| <i>Thermococcus kodakaraensis</i> | Pol B, PCNA | Mise en évidence, valorisation biotechnologique, fidélité | Clonage, expression ; synthèse d'ADN, PCR | Le PCNA stimule l'activité de l'ADN polymérase B, augmentation de la sensibilité de la PCR sans altérer la fidélité | (Kitabayashi <i>et al.</i> 2002) |
| <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | RF-C, PCNA, Pol B RF-C, PCNA, Pol B | Mise en évidence, recherche d'interactants, valorisation biotechnologique Caractérisation biochimique du RF-C | Clonage, expression, synthèse d'ADN, double hybride en levure, alignements bioinformatique, PCR Hydrolyse de l'ATP, interaction avec l'ADN et le PCNA, synthèse d'ADN | Représentation graphique des interactions ; stimulation de la Pol B par le PCNA en élongation d'amorce et en PCR ; stimulation de la PCR par le PCNA en présence de RF-C. L'association RF-C/PCNA stimule la synthèse d'ADN de la Pol B ; la fixation de l'ATP stimule le complexe RF-C/PCNA ; la large sous-unité du RF-C contribue largement à cette interaction | (Motz <i>et al.</i> 2002) (Seybert <i>et al.</i> 2002) |

| <i>Archaeoglobus fulgidus</i> (suite) | RF-C, PCNA, Pol B | Chargement du PCNA, fixation et régulation de l'hydrolyse de l'ATP | Expression de RF-C mutants, interaction RF-C/PCNA hydrolyse de l'ATP, synthèse d'ADN | La fixation de l'ATP par le RF-C est dépendante de l'ADN et du PCNA, son hydrolyse est surtout due aux petites sous-unités et permet la libération du RF-C | (Seybert et Wigley 2004) |
|---|-------------------|--|---|--|------------------------------|
| Organisme | Facteurs | Etudes | Approches | Résultats | Références |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | RF-C, PCNA, Pol B | Mise en évidence, caractérisation | Clonage expression, hydrolyse de l'ATP, synthèse d'ADN | Le RF-C est un hexamère composé de deux grandes sous unités et quatre petites ; le RP-A inhibe l'hydrolyse de l'ATP, PCNA et RF-C stimule l'activité de Pol B | (Kelman et Hurwitz 2000) |
| <i>Methanococcus jannaschii</i> | RF-C | Structure des boîtes II à VIII | Clonage expression, cristallographie | Obtention de cristaux ; études préliminaires de diffraction aux rayons X. | (Lee <i>et al.</i> 2002) |
| | Pol D (DP1) | Activité exonucléase de DP1 | Clonage expression, caractérisation de l'activité, utilisation de différents substrats ADN. | DP1 est une exonucléase 3'-5' avec une préférence pour les mésappariements de nucléotides en 3' ; cette sous unité représente l'activité correctrice de Pol D. | (Jokela <i>et al.</i> 2004) |
| <i>Methanosarcina acetivorans</i> | Pol B, RP-A | Mise en évidence, caractérisation | Clonage expression, interaction avec l'ADN, FRET, synthèse d'ADN | Le RP-A stimule la synthèse d'ADN de la Pol B. | (Robbins <i>et al.</i> 2004) |
| | Pol B, RP-A | Importance d'un motif de RP-A 3 | Clonage expression de mutants, interaction avec l'ADN, synthèse. | Une mutation dans un domaine doigt de zinc au niveau du RP-A3 diminue la stimulation de la synthèse d'ADN par polymérase B | (Lin <i>et al.</i> 2005) |
| | RF-C, PCNA | Mise en évidence, caractérisation du RF-C | Clonage expression, hydrolyse de l'ATP, interaction avec l'ADN, synthèse d'ADN | Le RF-C possède deux petites sous unités différentes et une large stœchiométrie non définie ; Le complexe stimule la synthèse d'ADN. | (Chen <i>et al.</i> 2005) |

MATERIELS ET METHODES



La première partie de ce chapitre présente les protéines recombinantes utilisées pour la caractérisation du complexe minimal de réplication de *P. abyssi*. Si la protéine n'était pas disponible, les moyens mis en œuvre afin de l'obtenir sont présentés. Les détails techniques, de points expérimentaux plus précis, sont disponibles dans les parties « Techniques de culture cellulaire et de biologie moléculaire » et « Production et purification de protéines recombinantes ». La dernière partie de ce chapitre décrit les techniques de biochimie fonctionnelle mises au point pour la caractérisation du complexe minimal de réplication.

Protéines recombinantes : Constructions génétiques et matériel protéique

I. Les ADN polymérases :

I.1. Les ADN polymérases B et D : (voir annexe 3)

L'ADN polymérase monomérique de la famille B (Pol B : 89 kDa), utilisée dans les expérimentations, est l'ADN polymérase isolée au laboratoire (Gueguen *et al.* 2001). Elle est commercialisée par Q-BIOgene (MPBiomedicals) sous le nom de IsisTM et nous l'avons obtenue chez ce fournisseur.

L'ADN polymérase dimérique de la famille D (Pol D : 140 kDa + 69 kDa), disponible au laboratoire, est issue d'une production effectuée suivant le protocole mis au point précédemment (Gueguen *et al.* 2001).

I.2. Les ADN polymérases Δ PIP :

Une version mutante des polymérases de *P. abyssi* a été construite de manière à enlever le motif PIP-box intervenant dans l'interaction avec le PCNA. Chacune possède un motif apparenté à une PIP-box qui se situe à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase B et de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D.

Pour ce faire, un codon, correspondant à une lysine, juste avant le motif PIP-box des ADN polymérases B et D, a été muté en codon stop. La technique de mutagenèse dirigée a été mise œuvre sur les plasmides disponibles au laboratoire, portant les gènes sauvages codant pour l'ADN polymérase B et de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D.

Le gène codant pour l'ADN polymérase B a été cloné dans le vecteur pARHRS2 et celui de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D dans le vecteur pET28b(+). La mutagenèse dirigée a été effectuée avec le kit QuikChange II Site-directed Mutagenesis de Stratagene sur le plasmide de 5835 pb portant le gène de l'ADN polymérase B. Le plasmide portant le gène codant pour l'ADN polymérase D étant plus grand, (9176 pb), aucun clone n'était obtenu avec ce kit ; un kit spécial pour les grands fragments

(QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit de Stratagene) a été utilisé afin de mener à bien la réaction.

I.2.1. Conditions utilisées pour la mutagenèse dirigée

La réaction a été effectuée en fonction des recommandations du fournisseur (cf. VII.) Les amorces choisies et les conditions de PCR sont détaillés dans le tableau 3.

| | ADN polymérase B | ADN polymérase D (grande sous-unité) |
|---|--|--|
| Kit | QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) | QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) |
| Amorces (mutations induites en rouge) | 5'GGAGGATTTGAAGTATCAATAAACTA AACAAGTGGGCC3' 5'GGCCCACTTGTTTAGTTTATTGATACT TCAAATCCTCC3' | 5'CAGATGAGAAGCCAAAGTAGAAAAG GGTTATCAGCC3' 5'GGCTGATAACCCTTTTCTACTTTGGCT TCTCATCTG3' |
| Conditions de PCR | 95°C 30s 95°C 30s 55°C 1min x 12 cycles 68°C 15min | 95°C 30s 95°C 30s 55°C 1min x 12 cycles 68°C 22 min |

Tableau 3 : Conditions de mutagenèse dirigée pour l’obtention de plasmides portant les gènes codant pour les ADN polymérases ΔPIP

Les clones obtenus présentent, après contrôle par PCR, les plasmides portant les fragments attendus. La présence de la mutation est contrôlée par séquençage des plasmides, après leur extraction en grand volume. Les plasmides portant les inserts mutants sont ensuite transfectés en cellules d’expression HMS174(DE3) pLysS pour produire les protéines correspondantes. Le plasmide portant la grande sous-unité de l’ADN polymérase D ΔPIP est co-transfecté avec le plasmide pARHRS2 contenant la petite sous-unité; leur présence dans la cellule est vérifiée par une PCR sur clone (figure 23). A partir d’une extraction plasmidique en grand volume, le séquençage de l’insert est effectué.

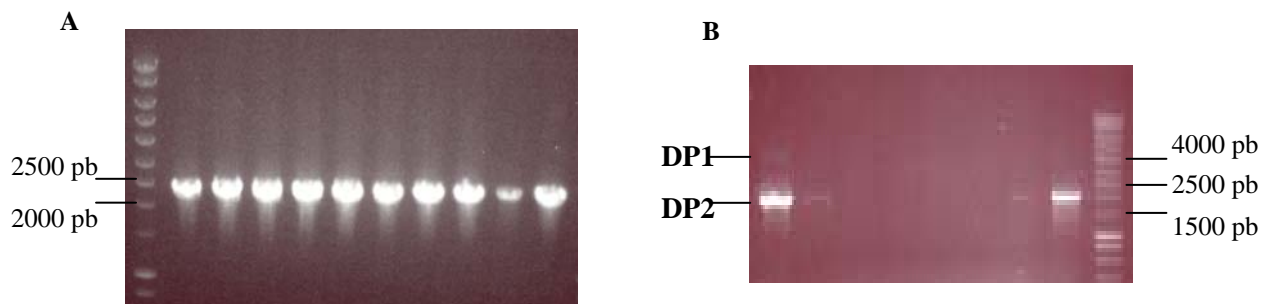


Figure 23 : PCR sur clones de HMS174 transformées par **A.** le plasmide pAHRS2 portant le gène codant pour l’ADN polymérase B ΔPIP et **B.** les plasmides pAHRS et pET28b(+) portant respectivement les gènes codant pour la petite sous-unité *DP1* et la grande sous-unité *DP2* de l’ADN correspondant à l’ADN polymérase D ΔPIP.

I.2.2. Production et purification des protéines mutantes :

L'expression a été réalisée dans des volumes de 500ml pour l'ADN polymérase B Δ PIP et de 6 litres pour l'ADN polymérase D Δ PIP. L'expression a été effectuée pendant 16 heures, après addition de 1 mM d'IPTG à une densité optique de 0,6. Après lyse des cellules par la presse de French et choc thermique (cf. techniques de production et de purification I.), les extraits protéiques sont déposés sur colonne Resource Q (1,6 cm x 10 cm), respectivement équilibrée en tampon R3 ou R5 (cf. annexe tampons) pour la purification de l'ADN polymérase B Δ PIP ou D Δ PIP. Les protéines sont respectivement éluées par un gradient allant du tampon R3 vers R4 ou du tampon R5 vers R6 (cf. annexe tampon). Une seule étape de chromatographie est réalisée pour purifier les ADN polymérases Δ PIP B (figure 24) et D (figure 25). Un test d'activité (cf. techniques de production et de purification VI.) est effectué en sortie de colonne afin de déceler ces protéines difficiles à visualiser sur gel.

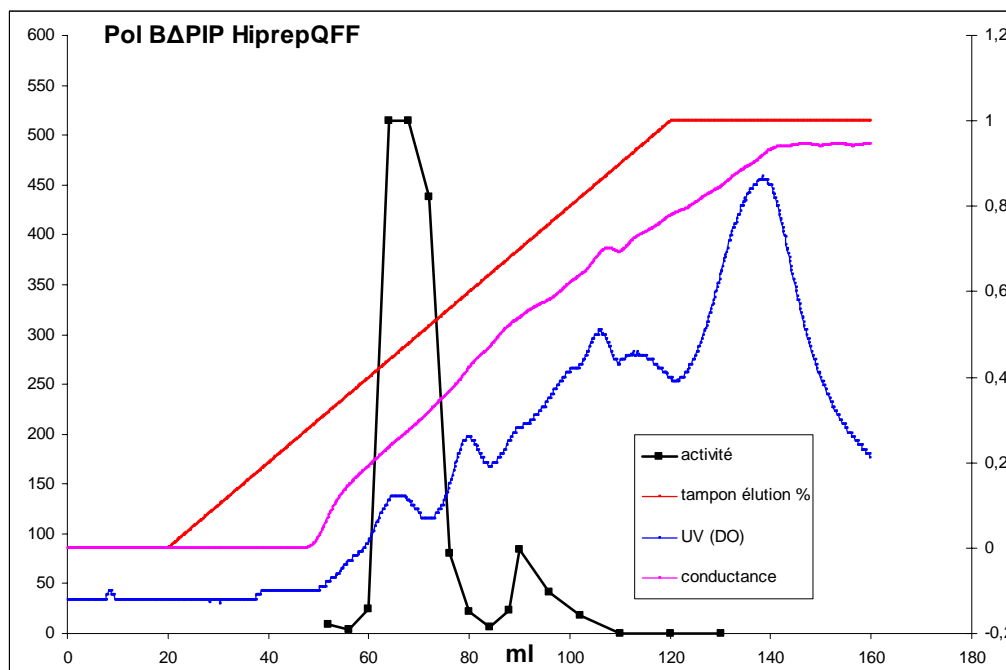


Figure 24. Profil de la purification de l'ADN polymérase B Δ PIP sur colonne Resource Q HiprepQFF (Amersham) ; débit 1 ml/min

L'enzyme a été éluée par un gradient de sel. La courbe théorique du gradient au niveau du mélangeur est indiquée en rouge ; la courbe du gradient au niveau de la colonne est représentée par la conductance en rose. D'après l'activité présente dans les fractions récoltées (courbe noire), l'enzyme est éluée en début de gradient pour une concentration en tampon R4 de 20 à 30%, ce qui correspond à une concentration en NaCl de 100 à 150 mM.

Le test d'activité d'incorporation, effectué sur les fractions en sortie de colonne, a mis en évidence l'ADN polymérase B Δ PIP recherchée en début de gradient (figure 24).

Après avoir regroupé les fractions présentant une forte activité et peu de contaminants, la protéine a été concentrée. Au final, 1,75 mg de protéines sont obtenus.

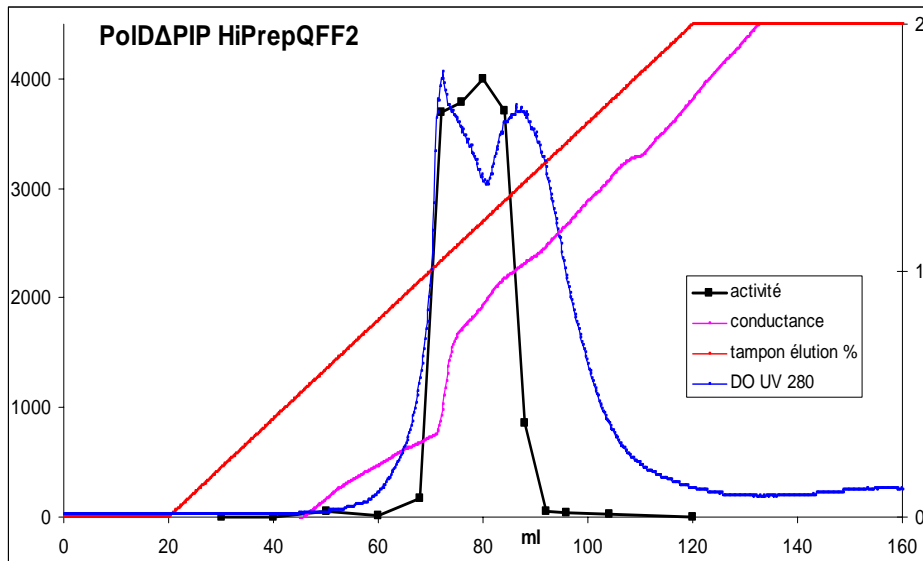


Figure 25. Profil de la purification de l'ADN polymérase D Δ PIP sur colonne Resource Q HiPrepQFF (Amersham) ; débit 1 ml/min
L'enzyme est éluée par un gradient de sel. La courbe théorique du gradient, au niveau du mélangeur, est indiquée en rouge ; la courbe du gradient au niveau de la colonne est représentée par la conductance en rose. D'après l'activité présente dans les fractions récoltées (courbe noire), l'enzyme est éluée pour une concentration en tampon R6 de 25 à 50%, ce qui correspond à une concentration en NaCl de 125 à 250 mM.

Un dosage d'activité de l'ADN polymérase D Δ PIP a été effectué sur les fractions en sortie de colonne. Les fractions où l'activité a été décelée ont été rassemblées, concentrées puis la concentration protéique a été dosée. Au final, 6 mg de protéines sont obtenus.

I.2.3. Révélation par Western Blot (figure 26) :

Les protéines difficiles à observer par coloration sur gel SDS-PAGE sont mises en évidence par révélation avec les anticorps correspondant (cf. méthodes de biochimie fonctionnelle III.1.5.).

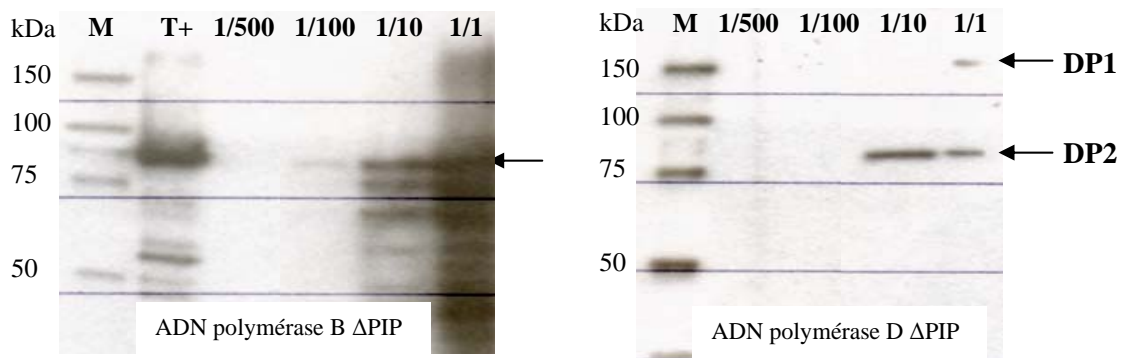


Figure 26 : Visualisation des ADN polymérases Δ PIP par western blot. 10 μ l d'échantillon dilué jusqu'à 1/500 sont déposés.

I.2.4. Production de l'ADN polymérase B Δ PIP par transcription/traduction in vitro :

Une seconde production de l'ADN polymérase B Δ PIP a été réalisée *in vitro* avec le système RTS de Roche (cf. techniques de production et de purification I.3.), à partir du plasmide obtenu après mutagenèse dirigée. Au final, 0,2 mg d'enzyme active ont été obtenus en 24 heures. Bien que le rendement soit faible, et le coût élevé, par rapport à une production en cellules bactériennes, le gain de temps est considérable. La purification se compose uniquement d'une étape de chauffage permettant la précipitation des protéines du lysat bactérien nécessaires à la réaction.

Il est à noter que le fournisseur préconise l'induction de mutation en début de gène pour enlever les structures secondaires de l'ARN en 5' et augmenter l'efficacité de la traduction. Dans notre cas, aucune mutation n'a été induite.

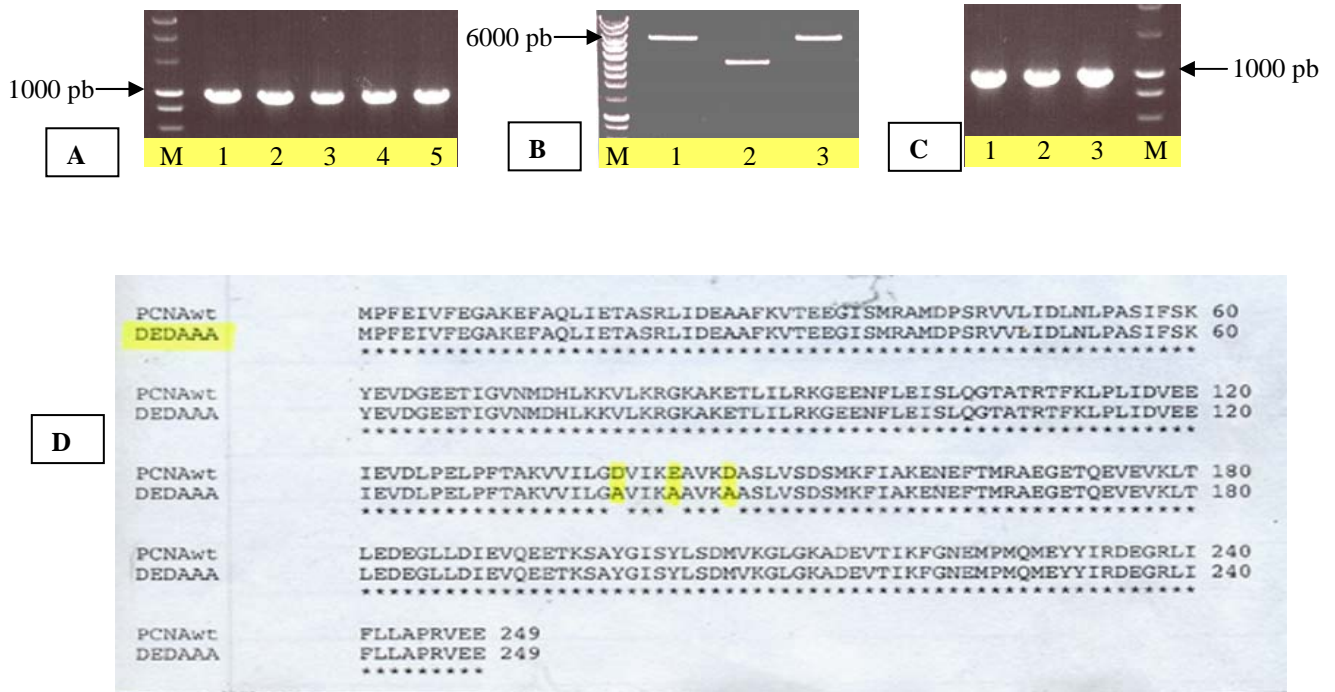


Figure 27. Construction d'un PCNA mutant D139A, E143A, D147A.

A : PCR sur 5 clones de XL1blue transformée par le vecteur pET26b(+) portant le gène PCNA, après mutagenèse dirigée. **B** : Digestion par les enzymes *NdeI* (1) et *SalI* (3) sur les plasmides extraits (2) à partir d'un clone XL1b. **C** : PCR sur 3 clones de HMS174 transformée par le vecteur pET26b(+) et portant le gène codant pour le PCNA muté. **D** : alignement de la séquence mutante avec la séquence sauvage ; les mutations induites sont surlignées en jaune.

M : Etalon de taille 5 µl (SmartLadder, Eurogentec)

II. Les PCNAs : (30 kDa/monomère)

II.1. Le PCNA sauvage (PCNAwt) : (voir annexe 3)

Une production à été réalisée à partir d'une construction disponible laboratoire (Henneke *et al.* 2002) : cellule d'expression HMS174 transformée par le plasmide pET26b(+) portant le gène codant pour le monomère du PCNA. Au final, 5 mg de protéines sont obtenus.

II.2. Le PCNA(ded) :

II.2.1. Conditions de mutagenèse dirigée (tableau 4)

Les trois acides aminés acides (D139, E143 et D147) du PCNA de *P. abyssi* ont été remplacés par des alanines. Ce mutant, incapable de former un trimère a servi de témoin dans les expériences de chargement (voir résultats pages 88-90).

La matrice d'ADN utilisée pour effectuer la réaction est le plasmide pET26b(+), disponible au laboratoire, portant comme insert la séquence correspondant au monomère de PCNA sauvage.

| PCNA | | | | | | | | | | |
|---|---|-------------|-----|-------------|------|-----|------|------|------|-------|
| Kit | QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) | | | | | | | | | |
| Amorces (mutations induites en rouge) | 5'CCTGGGAGCCGTTATTAAGGCCGGCAGTCAAGGCTGCTTCGCTCG3' 5'CCAGCGAAGCAGCCTTGACTGCCGCC TTAATAACGGCTCCCAGG3' | | | | | | | | | |
| Conditions de PCR | <table border="0"> <tr> <td>95°C</td> <td>30s</td> <td rowspan="4"> x 12 cycles</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>30s</td> </tr> <tr> <td>55°C</td> <td>1min</td> </tr> <tr> <td>68°C</td> <td>12min</td> </tr> </table> | 95°C | 30s | x 12 cycles | 95°C | 30s | 55°C | 1min | 68°C | 12min |
| 95°C | 30s | x 12 cycles | | | | | | | | |
| 95°C | 30s | | | | | | | | | |
| 55°C | 1min | | | | | | | | | |
| 68°C | 12min | | | | | | | | | |

Tableau 4. Conditions de mutagenèse dirigée pour l'obtention du plasmide portant le gène codant pour le monomère de PCNA(ded).

II.2.2. Contrôle et transformation en cellules d'expression

Après la réaction de PCR, le vecteur portant l'insert muté est transfecté dans des cellules XL1blue. Une PCR de contrôle, réalisée sur les clones, avec les amorces T7ter T7pro, a montré la présence d'une bande d'environ 950 paires de bases (figure 27.A) correspondant à l'insert (747 pb) et à une partie du vecteur (environ 200 pb) de part et d'autre du gène d'intérêt. Sa présence est confirmée par digestion avec les enzymes de restriction *NdeI* ou *SalI*, les bandes attendues correspondent au vecteur vide (5547 pb) et à l'insert (747 pb) (figure 27.B ; 1 et 3). A partir d'une extraction plasmidique en grand volume, un séquençage de l'insert a été effectué et a permis de confirmer la présence des trois mutations désirées (figure 27.C).

La construction a été introduite par choc thermique dans les cellules d'expression HMS174. Une PCR sur clone a confirmé la présence du gène d'intérêt (figure 27.D).

II.2.3. Production et purification de la protéine recombinante

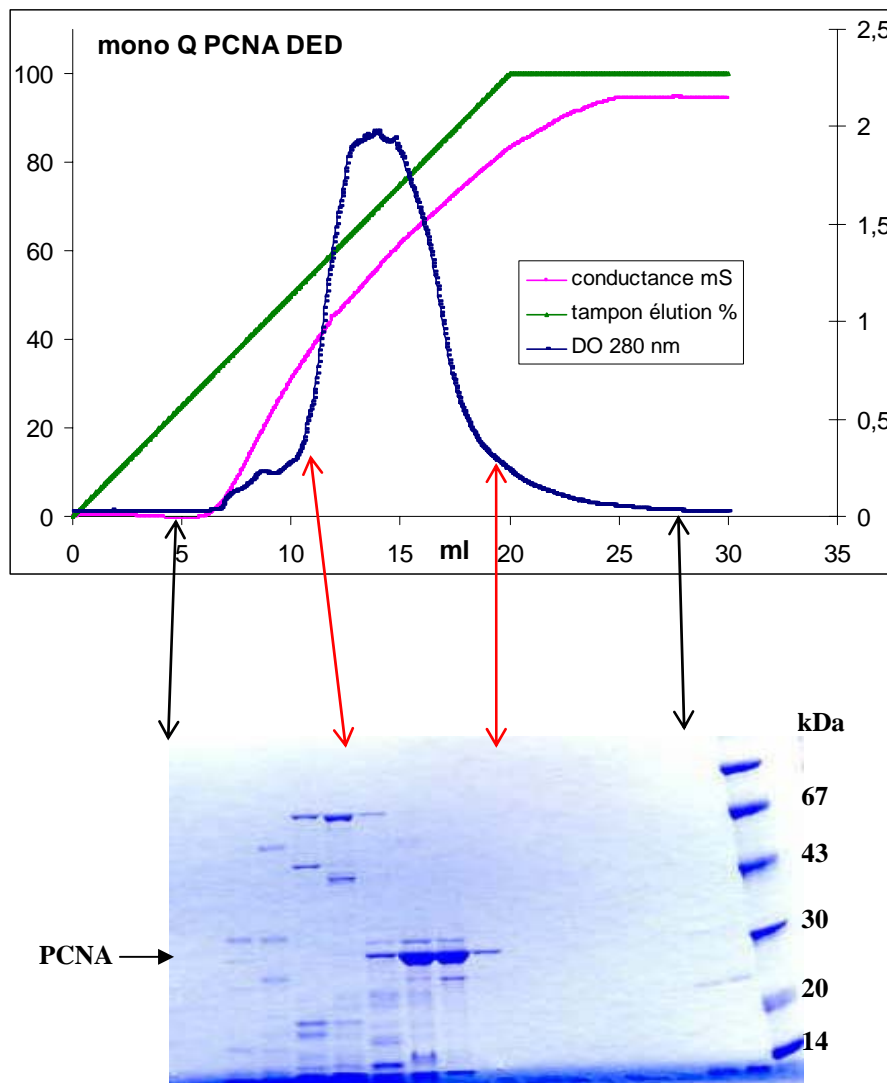
Après expression, en petit volume, pour s'assurer de la présence de la protéine recombinante, une expression en plus grand volume (250ml) est réalisée pour une induction de 5h, après addition de 1 mM d'IPTG, à une DO de 0,685. Après centrifugation, les cellules ont été lysées par presse de French. Un choc thermique de 10 min à 85°C a permis d'éliminer la majorité des protéines de *E. coli*.

La protéine produite est finalement purifiée par chromatographie sur trois types de colonnes. Le protocole de purification est calqué sur celui mis au point pour la protéine sauvage, considérant que le retrait de trois charges négatives n'affecte pas l'affinité de la protéine de manière très significative.

a. Purification sur colonne échangeuse d'anions Resource Q :

Les protéines produites ont été chargées sur une colonne équilibrée avec le tampon R1, puis éluées pendant la nuit, par un gradient de sel, contre le tampon R2 à un débit de 1 ml/min. Des fractions de 2 ml ont été recueillies en sortie de colonne. Une migration sur gel SDS-PAGE des fractions obtenues a permis de localiser le PCNA au niveau du profil d'éluion (figure 28.A ; courbe bleue).

Les fractions, contenant la protéine d'intérêt, ont été regroupées puis dialysées contre le tampon H1 d'équilibration de la colonne d'hydroxyapatite.



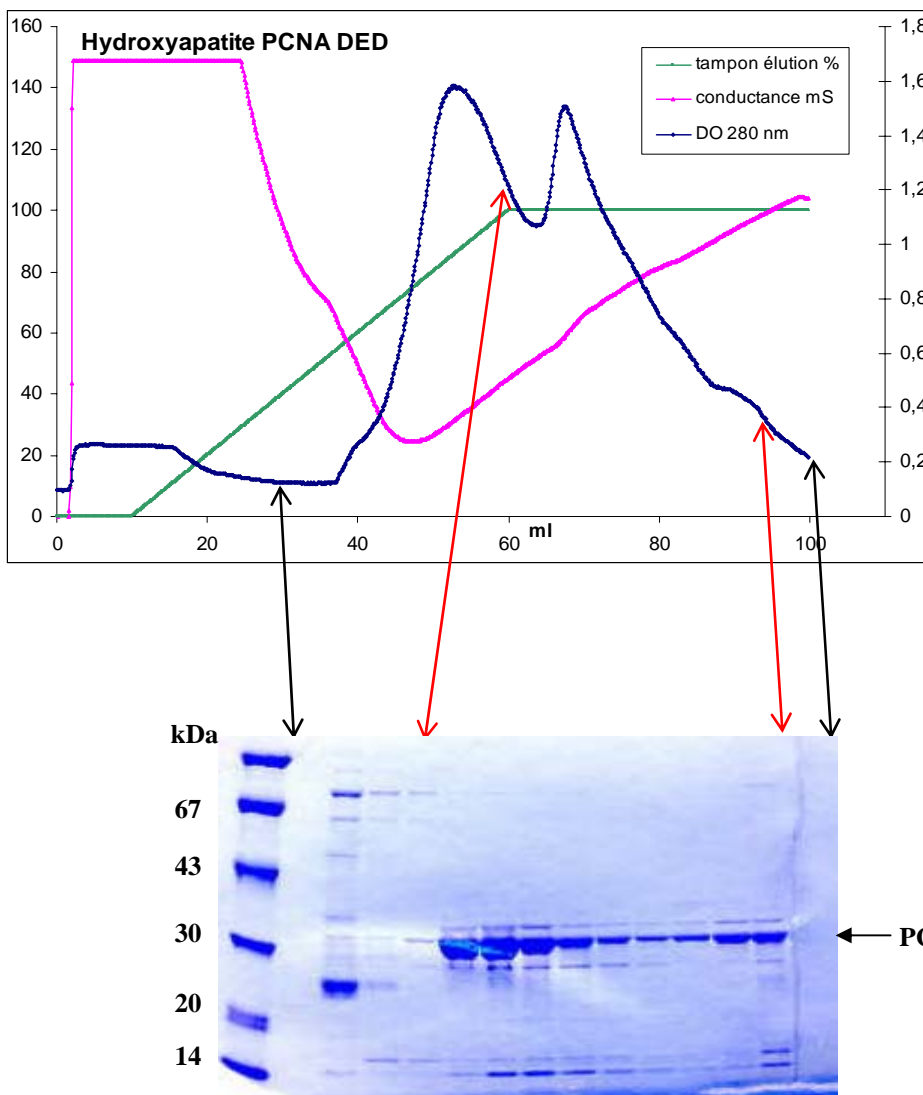
b. Purification sur colonne d'hydroxyapatite :

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium cristallisé qui permet de retenir les protéines par leurs groupements acides *via* le calcium, et par leurs groupement aminés *via* le phosphate.

Les fractions de PCNA(ded) rassemblées ont été déposées sur la colonne équilibrée par le tampon H1.

Après lavage avec le tampon H2, les protéines ont été éluées avec un gradient en phosphate (tampon H3 vers le tampon H4). Le débit était de 0,5 ml/min et les fractions récoltées de 0,5 ml. (figure 29.A)

Les fractions, contenant le PCNA, visualisées, par électrophorèse sur gel d'acrylamide (figure 29.B), ont été regroupées, concentrées puis dialysées contre le tampon E d'équilibration de la colonne d'exclusion stérique.



c. Purification sur colonne d'exclusion stérique Superdex 200 (figure 30) :

Cette étape de purification par filtration sur gel permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. Elle permet d'éliminer les molécules de tailles significativement différentes de celle du PCNA, qui auraient pu avoir le même comportement ionique lors des étapes de purification précédentes. Dans notre cas, cette étape permet essentiellement d'éliminer les débris issus du chauffage.

Les protéines ont été éluées, suivant leur taille, par le tampon E, à un débit de 1 ml/min. Des fractions de 2 ml ont été recueillies en sortie de colonne.

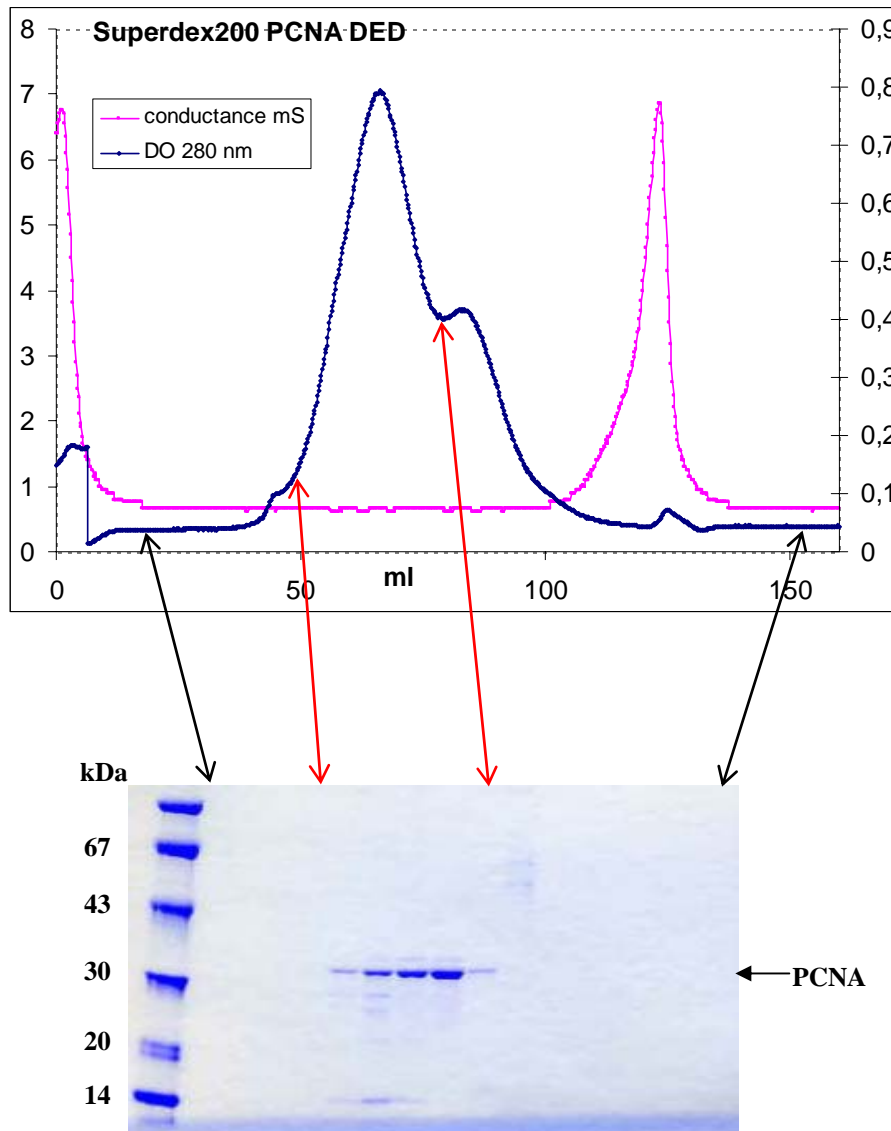


Figure 30. Profil d'éluion du PCNA(ded) sur colonne d'exclusion stérique

A. Profil de purification sur colonne Superdex 200 ; débit 1 ml/min **B.** le PCNA(ded) est retrouvé dans les fractions comprises entre 50 et 75 ml.

Après migration des fractions d'éluion sur gel SDS-PAGE, le PCNA est visualisé au niveau du pic majoritaire. Les fractions regroupées, représentant un volume final de 23 ml, ont ensuite été concentrées.

d. Concentration de la fraction protéique :

La fractions obtenue en sortie de colonne d'exclusion stérique a été concentrée sur une membrane filtrante Centricon, possédant un seuil de coupure de 10 kDa.

e. Bilan de purification

Après concentration 1,5 ml d'une solution à 2,6 mg/ml de protéine a été obtenue. Le bilan de cette purification est illustré par le Tableau 5. Les 4 mg, de protéines concentrées, obtenus sont relativement pur (figure 31 ; puits 8).

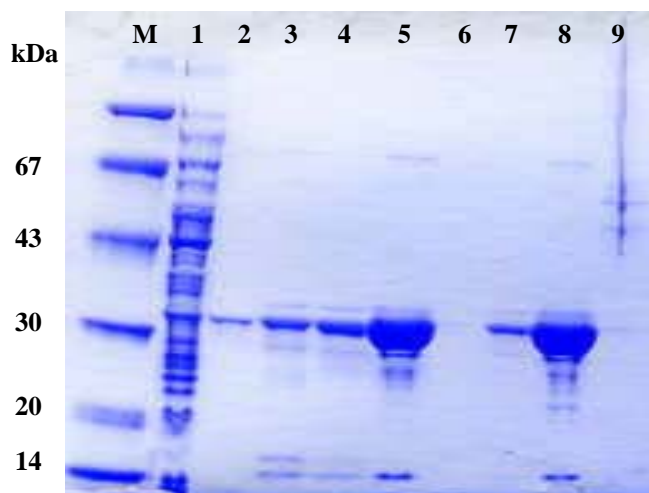


Figure 31. Bilan de purification du PCNA(ded) : migration de 10 μ l d'échantillon sur gel d'acrylamide 12% **1.** Après passage sur la presse de French **2.** Après choc thermique **3.** Fractions rassemblées après passage sur colonne Mono Q **4.** Fractions rassemblées après passage sur colonne d'hydroxyapatite **5.** Concentration Centricon 10K **6.** Filtrat de la concentration **7.** Fractions rassemblées après passage sur colonne de Superdex 200 **8.** Concentration Centricon 10K **9.** Filtrat de la concentration

| | mg/ml | volume (ml) | quantité (mg) | rendement par étapes (%) | rendement total (%) |
|--------------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------------|
| Presse de French | 7,53 | 40 | 301,33 | 100,0 | 100,0 |
| Choc thermique | 1,61 | 38 | 61,05 | 20,3 | 20,3 |
| Resource Q | 0,47 | 24 | 11,28 | 18,5 | 3,7 |
| Hydroxyapatite | 0,58 | 12,5 | 7,29 | 64,6 | 2,4 |
| 1^{ère} concentration | 2,77 | 2 | 5,53 | 75,9 | 1,8 |
| filtrat concentration | 0,15 | 10,5 | 1,61 | | |
| Superdex 200 | 0,17 | 24 | 4,00 | 72,3 | 1,3 |
| 2^{ème} concentration | 2,57 | 1,5 | 3,85 | 96,3 | 1,3 |
| filtrat concentration | 0,01 | 22,5 | 0,30 | | |

Tableau 5. Bilan de purification du PCNA(ded).

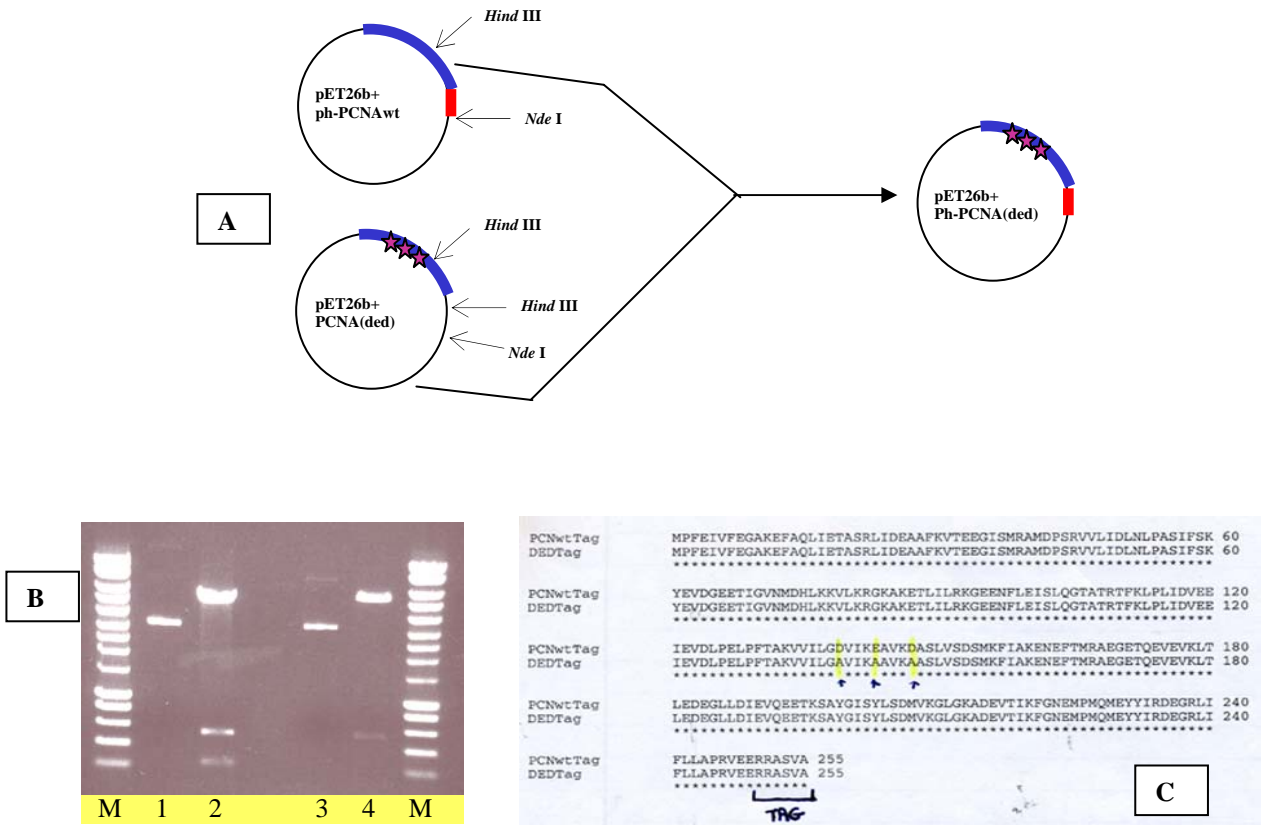


Figure 32. Construction d'un PCNA mutant phosphorylable.

A : schéma présentant la stratégie utilisée avec les enzymes de restriction *HindIII* et *NdeI*. **B :** profils de digestion des plasmides pET26b(+)/ph-PCNAmt (2) et pET26b(+)/ph-PCNAwt (4) ; les fragments d'intérêt sont pointés en rouge. **C :** alignement de la séquence ph-PCNAmt avec ph-PCNAwt.

M : SmartLadder 5 µl

II.3. Les PCNAs phosphorylables (ph-PCNA^{wt} et ph-PCNA^(ded)) :

II.3.1. Constructions génétiques

Le PCNA sauvage phosphorylable a été précédemment construit au laboratoire en insérant une étiquette au niveau C-terminal de la protéine. Une séquence nucléotidique a été intégrée dans le plasmide portant l'insert PCNA sauvage entre l'avant dernier codon, correspondant à l'acide glutamique, et le site de restriction *NdeI* portant le codon stop. Cette séquence correspond à six acides aminés (RRASVA) reconnus par la protéine kinase de cœur de bœuf, qui va phosphoryler la sérine en présence d'ATP. En présence de γ [³²P]ATP, le phosphore lié à la sérine va être radioactif et ainsi permettre la visualisation du PCNA par autoradiographie, lors des expériences de chargement.

Le procédé d'obtention du PCNA^(ded) phosphorylable peut s'apparenter à un système couper/coller, où une partie du plasmide portant le PCNA sauvage et l'étiquette est recombinée avec une partie du plasmide portant le PCNA mutant. Pour ce faire, une cartographie des sites de restriction a été dressée pour les deux plasmides. Le site *NdeI* est unique sur les deux plasmides et l'enzyme *HindIII* coupe le gène d'intérêt en aval de la zone contenant les mutations. Un site *HindIII* est également présent au niveau du vecteur portant l'insert mutant ; ce site de clonage n'est pas retrouvé sur le vecteur portant l'insert sauvage à la suite de l'insertion de l'étiquette. Comme l'illustre la figure 32.A, le fragment de 530 pb portant l'extrémité C-terminale du PCNA ainsi que l'étiquette a été ligaturé avec le fragment de 5245 pb correspondant au vecteur et à la partie N-terminale du PCNA portant les trois mutations.

Les fragments d'intérêt, visibles sur gel d'agarose (figure 32.B), ont été isolés, purifiés, ligaturés puis transfectés en cellules DH5 α . La présence du gène a été vérifiée par PCR sur clone, puis par une double digestion avec les enzymes *BamHI* et *NdeI*, sur une extraction plasmidique en petit volume. L'intégrité du gène est vérifiée par séquençage à partir d'une extraction plasmidique en plus grand volume.

L'alignement de la séquence peptidique de la construction obtenue, contre la séquence du PCNA sauvage phosphorylable, montre la présence des trois mutations et de l'étiquette (figure 32.C).

II.3.2. Production et purification de la protéine recombinante ; bilan :

Le PCNA a été obtenu dans les mêmes conditions que le PCNA mutant sans étiquette. Le procédé de purification a été mené de manière identique ; les profils d'élution ont été sensiblement les mêmes. Au final, 2,2 mg de protéines sont obtenus purs mais avec un faible rendement. (figure 33 et tableau 6)

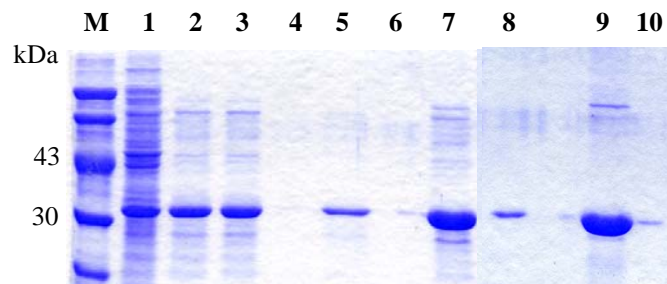


Figure 33. Bilan de purification du PCNA(ded) phosphorylable : migration de 10 μ l sur gel SDS-PAGE 12%
1 : Après passage sur presse de French (50 ml) **2** : Après le premier choc thermique (49 ml) **3** : Après le deuxième choc thermique (49 ml) **4** : lavage après chargement de l'échantillon sur hydroxyapatite **5** : fractions rassemblées après passage sur hydroxyapatite (35 ml) **6** : lavage MonoQ après chargement de l'échantillon **7** : fractions rassemblées après passage sur MonoQ (5 ml) **8** : fractions rassemblées après passage sur Superdex (23 ml) **9** : Après concentration (2,5 ml) **10** : filtrat de la concentration

| | mg/ml | volume (ml) | Quantité (mg) | rendement par étapes (%) | rendement total (%) |
|------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------------|
| Presse de French | 5,17 | 50 | 258,45 | 100,0 | 100,0 |
| Choc thermique | 1,06 | 49 | 51,75 | 20,0 | 20,0 |
| Resource Q | 0,28 | 35 | 9,84 | 19,0 | 3,8 |
| Hydroxyapatite | 1,16 | 5 | 5,79 | 58,8 | 2,2 |
| Superdex 200 | 0,13 | 23 | 2,99 | | |
| Concentration | 0,85 | 2,5 | 2,12 | 79,1 | 0,8 |
| filtrat concentration | 0,02 | 20,5 | 0,40 | | |

Tableau 6. Bilan de purification du PCNA(ded) phosphorylable

III. Le RF-C : (voir annexe 3)

Deux lots de RF-C, lot 1 et lot 2, étaient disponibles au laboratoire. Ils présentaient une oligomérisation différente, les rapports entre la petite et la grande sous-unité étant respectivement de 4 pour 2 et 4 pour 1 (évaluation par quantification sur SDS-PAGE : figure 33b).

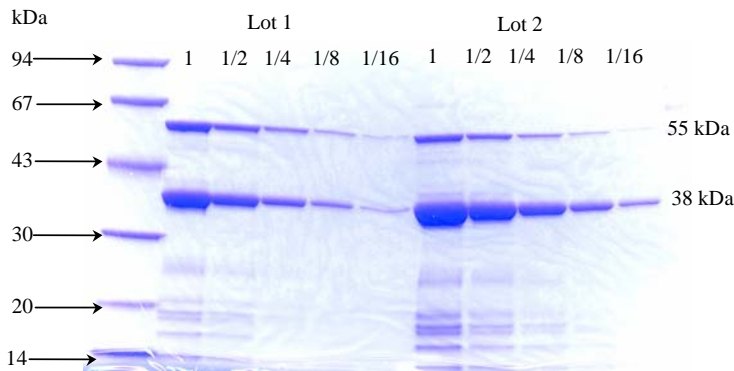


Figure 33b. migration des lots 1 et 2 du RF-C sur gel SDS-PAGE 12%.

Quantification des intensités (Quantity one – Biorad):

L'intensité d'un signal est divisée par le poids moléculaire correspondant à la bande (55 ou 38) puis un rapport moyen entre des intensités entre petites et grandes sous-unités est effectué.

Lot 1 : rapport moyen : 2,34

Lot 2 : rapport moyen : 4,54

Lors de la caractérisation du RF-C, les profils de filtration sur gel sur une petite colonne (26x10) montraient le RF-C sous forme hexamérique avec un rapport entre petite et grande sous-unité de 4 pour 2 (Henneke *et al.* 2002). Après passage sur une colonne plus grande (35x50), deux pics ont été obtenus ; l'un correspondant à la petite sous-unité et l'autre au complexe pentamérique de rapport 4 pour 1 entre petite et grande sous-unité. L'explication retenue est que la grande sous-unité du RF-C précipite facilement en solution. Lors de la filtration sur la petite colonne, l'hexamère obtenu serait un complexe avec une partie des grandes sous-unités précipitées. Lors du passage sur la grande colonne, la précipitation d'une partie des grandes sous-unités du RF-C n'interfère pas sur la formation d'un complexe pentamérique. De ce fait, un pic de petites sous-unités en excès est observé.

IV. Le RP-A:

Les travaux, effectués en vue d'obtenir les trois sous-unités du facteur RP-A, sont décrits dans l'annexe « travaux effectués sur le RP-A » (voir annexe 1)

Techniques de culture cellulaire et de biologie moléculaire

I. Culture de *Pyrococcus abyssi* (souche GE5)

Les bactéries ont été cultivées à 95°C en fiole, dans des conditions d'anaérobiose stricte. Des précultures en milieu SME, (cf. annexe tampons) de 2ml ont été ensemencées la veille afin d'inoculer des volumes de 50 ml. L'aspect des cellules a été visualisé au cours de la journée sous microscope à contraste de phase. La densité cellulaire a été estimée par comptage direct (cellule de Thoma). L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée en fin de phase exponentielle.

II. Cultures d'*E. coli* et souches utilisées

Les souches d'*E. coli* utilisées étaient les cellules de maintenance DH5 α (Invitrogen) et XL1blue (Stratagene), ainsi que les cellules d'expression Rosetta (Novagen), BL21-(DE3)-Ril (Stratagene) et HMS 174(DE3).

La température d'incubation était de 37°C, sous agitation (150 rpm), pour les cultures en milieux liquides. Les milieux utilisés étaient classiquement du SOC et du Luria Bertani (cf. annexe Tampons). Pour la culture en milieu gélosé, 1,5 % d'agar ont été ajoutés.

Les antibiotiques (marqueurs de sélection) ont été ajoutés après stérilisation, en fonction du vecteur porté par les cellules. Les concentrations, pour chaque antibiotique, étaient les suivantes : ampicilline : 100 μ g/ml, kanamycine : 30 μ g/ml, chloramphénicol : 34 μ g/ml.

III. Conditions de PCR

Toutes les PCR ont été effectuées sur un thermocycler RoboCycler Gradient 96 (Stratagene).

III.1. PCR sur ADN génomique :

La sélection et l'amplification de gènes, à partir d'un ADN génomique, nécessitent l'utilisation d'une ADN polymérase fidèle afin d'obtenir le gène sans mutation. Les gènes RP-A2 et RP-A3 ont été amplifiés avec la polymérase *Pfu*, qui a une activité correctrice d'erreur (exo 3'→5'). N'ayant pas eu de résultat avec la *Pfu*, le gène RP-A1, ainsi que l'opéron RP-A, ont été amplifiés par l'ADN polymérase *Taq* avec un nombre réduit de cycles.

| <u>Mélange</u> | <u>amplification</u> | | |
|--|--|------|------------------------|
| 1 μ l de <i>Pfu</i> (3 UI) ou de <i>Taq</i> (5 UI) | 10 min | 94°C | } <i>Pfu</i> 20 cycles |
| 5 μ l de tampon 10X | 30 sec | 94°C | |
| 1 μ l (100pmol) d'amorce directe | 30 sec | 55°C | |
| 1 μ l (100pmol) d'amorce inverse | 3 min (<i>Pfu</i>) 2 min (<i>Taq</i>) 72°C | | } <i>Taq</i> 12 cycles |
| 2 μ l de dNTPs 20mM | 10 min | 72°C | |
| 1 μ l d'ADN extrait de <i>P. abyssi</i> | H ₂ O QSP 50 μ l | | |

III.2. PCR de contrôle sur clones :

Elle a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques, s'hybridant sur le plasmide de part et d'autre du gène inséré. Une colonie a été re-suspendue dans le mélange PCR après avoir été repiquée à l'aide d'un cure-dent stérile.

Le mélange réactionnel était le même que celui mentionné ci-dessus, et nous avons utilisé la *Taq* polymérase. L'amplification a été réalisée sur 30 cycles, le but étant de vérifier la présence du gène.

| <u>Mélange</u> | <u>amplification</u> | |
|---------------------------------------|----------------------|------|
| 0,5 µl de <i>Taq</i> (5UI) | 10 min | 94°C |
| 2,5µl de tampon 10X | 30 sec | 94°C |
| 0,5µl (50pmol) d'amorce directe T7Pro | 30 sec | 55°C |
| 0,5µl (50pmol) d'amorce inverse T7Ter | 2 min | 72°C |
| 1µl de dNTPs 10mM | 10 min | 72°C |
| suspension d'une colonie | | |
| H ₂ O QSP 25µl | | |

} 30 cycles

IV. Extraction de l'ADN

IV.1. Extraction de l'ADN total de *P. abyssi* :

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée par la méthode classique utilisant le mélange PCI (Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylamique 25/24/1). Elle comprend les étapes de lyse cellulaire, de double extraction d'ADN, d'élimination des ARNs et de précipitation de l'ADN génomique.

IV.1.1. Préparation du culot bactérien

Une culture de 50 ml, ensemencée le matin, est arrêtée en phase exponentielle, puis centrifugée à 8000 g pendant 15 min à 4°. Le culot est repris dans 5 ml tampon de lyse : TE-Na-1X (TRIS 100mM pH8, EDTA 50mM pH8, NaCl 100mM)

a. *Lyse bactérienne et déprotéinisation.*

Les cellules ont été lysées par ajout de 500 µl de Sarkosyl 10% (1% final) comme agent de lyse, 500µl de SDS 10% (1% final), détergent ionique qui rompt les membranes cellulaires et déstabilise les interactions hydrophobes de la plupart des macromolécules dans leur conformation native, et 100 µl de Protéinase K 20 mg/ml (0.4 mg/ml final)

Ce mélange a été incubé à 45°C pendant 3h maximum (à partir de 3 h l'ADN risque de se dégrader), puis centrifugé pendant 5 min à 4800 g.

b. *Extraction de l'ADN génomique*

- Première extraction au PCI (Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylamique 25/24/1) sous hotte :

Un volume de PCI a été ajouté pour un volume de surnageant de lyse ; le mélange a été agité par retournement jusqu'à obtention d'une émulsion. Une centrifugation à 8000 g, pendant 20 min à 4°C, a

permis l'obtention d'une phase organique, d'une phase aqueuse et d'un précipité blanc à l'interface ; la phase aqueuse a été récupérée.

Les ARNs ont été éliminés par ajout de 10 µg/ml de RNase, et incubation pendant 1h à 60°C

- Seconde extraction au PCI.

Un volume de PCI a été ajouté à un volume de phase aqueuse ; le mélange a été agité par retournement jusqu'à obtention d'une émulsion qui a été centrifugée à 8000 g pendant 20 min à 4°C. La phase aqueuse récupérée doit être limpide ; à défaut, il faut procéder à une troisième extraction.

- Troisième extraction.

Un volume de chloroforme/perchlorate de sodium 5M (5/1) est ajouté à un volume de phase aqueuse ; le mélange est centrifugé à 8000 g pendant 20 min à 4°C. La phase aqueuse est récupérée ; une dernière extraction au chloroforme seul doit être ensuite opérée.

c. Précipitation de l'ADN.

L'ADN a été précipité en ajoutant 0,8 volume d'isopropanol à la phase aqueuse ; les tubes ont été placés pendant 1 nuit à -20°C, puis centrifugés à 10000 rpm pendant 30 min à 4°C.

Les culots ont été séchés sous hotte, puis repris avec 200µl de Tris-EDTA 1X

L'ADN obtenu a été observé, après migration sur gel d'agarose (figure 34), puis dosé en microcapillaire à l'aide du spectromètre GenQuant II (Pharmacia Biotech) ; sa pureté a été estimée grâce au rapport de densité optique $DO_{260/280}$. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm, tandis que les contaminants protéiques ont un pic d'absorption à 280 nm. Un rapport DO_{260} / DO_{280} compris entre 1,8 et 2,0 correspond à une pureté de l'ADN satisfaisante. Le rapport de $DO_{260/280}$ de 1,54 obtenu dans notre cas est un peu faible, mais n'a pas empêché le bon fonctionnement de la PCR. Au final, 2,8 mg d'une solution à 333µg/µl ont été obtenus. La migration sur gel montre des bandes plus légères, correspondant à un plasmide porté naturellement par *P. abyssi* (forme enroulée et superenroulée).

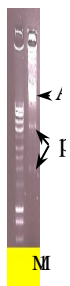


Figure 34. Migration de l'ADN, de la souche GE5 de *P. abyssi*, extrait sur une culture de 50 ml contenant $2,4 \cdot 10^8$ cellules/ml

M: SmartLadder (Eurogentec) 5µl

1 : Produits d'extraction 2µl
Gel d'agarose 0,8%

IV.2. Extraction d'ADN plasmidique en petit volume (2 ml) et grand volume (50 ml) :

Ces manipulations sont destinées à extraire l'ADN plasmidique à partir d'une suspension bactérienne transformée. Elle est basée sur la technique de lyse cellulaire en condition alcaline (1% SDS ; 0,2 M NaOH), suivie d'une précipitation à l'acétate de potassium (3 M ; pH 5,5) (Birnboim et Doly, 1979). Les extractions plasmidiques, basées sur ce protocole, ont été réalisées à l'aide des kits Wizard[®] Plus Miniprep DNA Purification System (Promega) et QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen) pour les petits volumes; et avec le kit QIAfilter[™] Plasmid Midi (Qiagen), pour les grands volumes.

V. Coupure de l'ADN par des enzymes de restriction :

L'ADN peut être coupé en bouts francs ou cohésifs par de nombreuses enzymes reconnaissant spécifiquement une séquence. Ces enzymes sont généralement isolées de bactéries ou de champignons mésophiles et leur activité catalytique est effective à 37°C. A chaque enzyme correspond un tampon étudié pour une activité optimale. Dans le cas du contrôle de la présence d'un gène chez un plasmide extrait, une double digestion est menée en utilisant un tampon correct pour les deux enzymes.

Les enzymes disponibles au laboratoire ont été commandées chez New England Biolabs et ont été utilisées suivant les conseils de ce fournisseur.

VI. Clonage en vecteur d'expression :

Les vecteur utilisés sont les plasmides pET25b(+), pET26b(+), et pET28a(+), de chez Novagen ainsi que le vecteur pARHS conçu chez Eurogentec. Le principe de ces systèmes d'expression repose sur la présence du promoteur fort T7 en amont du gène cloné, reconnu par la T7 ARN polymérase qui peut ainsi le transcrire. Les plasmides possèdent une quinzaine de sites de restriction unique où peut s'effectuer le clonage et un gène de résistance à un antibiotique (marqueur de sélection).

VI.1. Linéarisation du vecteur ; création des sites de clonage :

Le vecteur a été linéarisé par action de deux enzymes de restriction permettant la création de deux extrémités cohésives différentes, entre lesquelles sera inséré le gène d'intérêt. La migration du produit de la digestion a été effectuée sur gel d'agarose 0,8% puis l'ADN plasmidique, après découpage de la bande correspondante, a été extrait à l'aide du kit GeneClean (BIO 101) suivant les recommandations du fournisseur.

VI.2. Préparation des inserts :

Les plasmides de maintenance ont subi une double digestion par les mêmes enzymes de restriction. Le produit de digestion, correspondant au gène d'intérêt, a ensuite purifié été à l'aide du kit QIAquick PCR purification (Qiagen) afin d'éliminer les enzymes en excès ainsi que les petits fragments issus de la digestion. Une digestion de contrôle a été effectuée en parallèle afin de constater l'efficacité des enzymes.

VI.3. Ligature des inserts digérés et du vecteur linéarisé par la T4-ADN ligase :

Mélange :

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 2 µl de tampon 10X | } Incubation pendant une nuit à 16°C |
| 1 µl (3UI) de T4 ADN ligase (Promega) | |
| x µl de plasmides linéarisés | |
| y µl d'inserts digérés | |
| H ₂ O qsp 20 µl | |

Les quantités ont été choisies de manière à obtenir un rapport de 3 entre inserts et plasmides.

VII. Transformation en cellules compétentes

VII.1. Transformation en cellule de maintenance

Le mélange de réaction de ligature a été ajouté à un aliquot de 200 µl de cellules DH5α compétentes, préalablement décongelées sur glace. Le mélange a été incubé pendant 30 min à 4°C, puis le vecteur a été transfecté par un choc thermique de 45 sec à 42°C, suivi d'une incubation de 5 min sur glace. Une incubation de 1 h à 37°C, sous agitation, a été effectuée après ajout de 800 µl de milieu SOC. De 100 et 250 µl ont été étalés sur boîte de Petri 2xYT, contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline). Les boîtes ont été incubées pendant une nuit à 37°C.

Les clones obtenus ont été contrôlés par PCR sur colonie et par extraction plasmidique associée à une double digestion et par séquençage. Les cellules présentant le vecteur portant l'insert désiré ont été stockées à -80°C en milieu LB 20% glycérol.

VII.2. Transformation en cellules d'expression

Entre 100 ng et 1 µg de plasmides issus d'extraction en gros volume ont été intégrés en cellules d'expression, par choc thermique. La transformation des cellules HMS174(DE3) a été effectuée dans les conditions décrites pour les cellules DH5α ; les transformations des cellules Rosetta (Novagen) et BL21-(DE3)-Ril codon plus (Stratagene) ont été effectuées suivant les recommandations des fournisseurs. A noter, dans ces dernières cellules, la présence de plasmides codant pour des ARNs de transfert capables de traduire les codons rares chez *E. coli* (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA), codant pour les acides aminés isoleucine, arginine, leucine, proline et glycine.

VIII. Mutagenèses dirigées

Elles ont été réalisées avec les kits QuickChange II Site-Directed Mutagenesis et QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis de Stratagene.

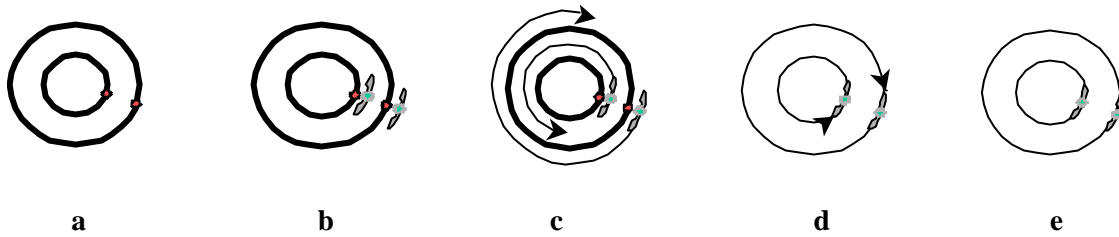


Figure 35 : Schéma illustrant les étapes de la mutagenèse dirigée.

Les mutagenèses dirigées ont été menées suivant les recommandations du fournisseur. Elle peuvent se décomposer en cinq grandes étapes :

- Un ou plusieurs nucléotides sont ciblés dans le but de corriger ou induire une mutation (figure 35.a)
- Le plasmide est dénaturé à haute température et des amorces contenant la mutation à induire sont hybridées sur chaque brin (figure 35.b).
- Par la technique de PCR, les amorces sont élonguées par l'ADN polymérase *Pfu turbo* (figure 35.c).
- Un plasmide partiellement ouvert et contenant la mutation désirée est obtenu après digestion des brins parentaux par l'enzyme de restriction *DnpI*, endonucléase spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé (figure 35.d).
- Le plasmide est transfecté dans des cellules supercompétentes XL1-blue *E. coli*; la machinerie de la cellule permet la ligature de l'ouverture partielle du plasmide ainsi que son amplification (figure 35.e)

Une extraction en gros volume est effectuée pour contrôler la présence du gène, ainsi que son intégrité.

IX. Visualisation de l'ADN sur gel d'agarose

La préparation des gels, le dépôt des échantillons et la lecture sous UV, s'effectuent dans une salle spéciale « BET », suivant le respect des bonnes pratiques de laboratoire ; le BET, intercalant de l'ADN, possédant un pouvoir mutagène.

Le gel est préparé dans un tampon Tris-acétate 1X (TAE : Tris 40 mM, EDTA pH=8 1 mM, Acide acétique glacial 0,1 %), puis déposé dans une cuve électrophorèse contenant du TAE 1X.

Les échantillons, mis dans la solution de dépôt 6X (20 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50% glycérol et 0,07% de bleu de bromophénol) ont été déposés sur le gel soumis à un voltage constant (environ 80V).

La visualisation des fragments d'ADN se fait sous lampe U.V. ; les appareils utilisés étaient les suivants :

- Gel Doc 2000 (Bio-Rad) couplé à une caméra CCD et une imprimante thermique.
- Fluor-STM MultiImager (Bio-Rad) intégrant numériquement les images.

Afin d'estimer la taille et la concentration des fragment, un marqueur de taille a également été déposé sur le gel (SmartLadder – Eurogentec ; figure 36).

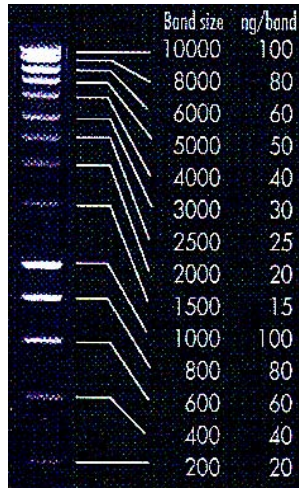


Figure 36 Marqueur de taille « SmartLadder » (Eurogentec).

Les concentrations d'ADN mentionnées en ng par bande sont valables pour un dépôt de 5µl.

X. Séquençage de l'ADN

Après extraction en grand volume, les plasmides ont été envoyés chez Genome Express pour séquençage. Le séquençage est réalisé grâce à des amorces flanquantes au gène.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide des serveurs ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) et EditSeq (www.dnastar.com).

XI. Linéarisation de la matrice M13mp18 simple brin circulaire

Jour 1 : hybridation d'une amorce et coupure par l'enzyme *PstI*

- 125 µl de M13 circulaire à 0.2 mg/ml
- 0,5 µl d'amorce « cut » à 1 mg/ml (5'-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3')
- 125 µl de tampon d'hybridation 2x (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 250 mM NaCl)

Placer 15 min à 70°C puis refroidir lentement sur la paillasse.

Ajouter : 10 µl de Tris-HCl 1 M pH 7.5, 2 µl MgCl₂ 1 M, 2.5 µl de DTT 0.1 M afin d'être dans les conditions de tampon pour l'activité de *PstI*

Ajouter 5 µl d'enzyme *PstI* (Boehringer)

Incuber durant la nuit à 37°C

Jour 2 et 3: Lavage et précipitation de l'ADN

Incuber à 70°C pendant 15 min puis placer tout de suite dans la glace

Ajouter 28 µl d'acétate de Na 1M puis deux volumes d'éthanol absolu froid

Incuber durant la nuit à -20°C

Centrifuger à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C puis ajouter 200 µl d'éthanol 70% froid

Centrifuger à 15 000 rpm pendant 5 min puis enlever le surnageant.

Sécher sous vide pendant 15 min et reprendre le culot dans 100 µl de TE.

Incuber 30 min à 37°C puis durant la nuit à 4°C

Jour 4 : Contrôle de la digestion

Ajouter 2.5 µl Exonucléase VII (Gibco) à 1µg de M13 linéarisé puis incuber 3 h à 37°C

Déposer sur un gel agarose 1% : M13 circulaire, M13 linéaire non traité, M13 circulaire digéré avec Exonucléase VII.

Techniques de production et de purification de protéines recombinantes

I. Expressions de protéines recombinantes

I.1. Expressions en petits volumes :

Les premières expressions ont été effectuées dans des volumes de 3ml.

Une préculture a été réalisée à 37°C, sur la nuit, par un ensemencement des cellules d'expression (Rosetta ou BL21 DE3 Ril / pET25b(+)) / gène d'intérêt) en milieu LB, contenant les antibiotiques de sélection. Le lendemain, un volume de 3 ml a été ensemencé au trentième, puis mis en culture à 37°C sous agitation, jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,6. Un extrait de culture (1,5 ml) ayant atteint la DO voulue a été induit par 1 mM d'IPTG puis incubé à 37°C sous agitation entre 3 et 16h ; le volume restant constituera le témoin non induit.

La culture a été centrifugée pendant 10 min à 12000 rpm sur une petite centrifugeuse de paillasse ; le culot a été repris dans 150 µl de tampon de sonication (cf. annexe Tampons). Une sonication de 4 fois 10 sec a été effectuée sur glace afin de lyser les cellules (sonicateur Vibra Cell 72408 - Bioblock Scientific).

Après une centrifugation de 5 min à 12000 rpm pour sédimenter les débris cellulaires, le surnageant a été chauffé, pendant 15 min à 75°C, entraînant la précipitation d'une grande partie des protéines mésophiles d'*E. coli*, les protéines archées recherchées étant thermostables.

Après une centrifugation de 5 min à 12000 rpm, le surnageant récupéré a été déposé sur gel d'acrylamide SDS-PAGE.

I.2. Expression en grands volumes :

Si la protéine attendue est présente sur le gel, elle peut être produite en grand volume allant jusqu'à 6 litres. Les conditions expérimentales restent les mêmes, exceptées les précultures qui se font en cascades et la lyse des cellules qui se réalise, sous pression, avec une presse de French (Aminco®-SLM Instruments). Trois passages successifs sur la presse de French ont été réalisés à une pression de 1000 psi.

I.3. Expression par un système de transcription/traduction *in vitro*

Plusieurs sociétés proposent maintenant des systèmes de production de protéines *in vitro* "sans cellule". Cette technologie possède plusieurs avantages, comparée aux méthodes de production des protéines classiques nécessitant des organismes vivants. Contrairement aux techniques de production *in vivo*, l'expression des protéines cytotoxiques, ou instables dans les organismes vivants, ainsi que la synthèse des protéines sensibles aux protéases endogènes, est possible. Des compagnies comme Roche Applied Science, IBA, RiNA, Invitrogen et Promega proposent, sur le marché du réactif, différents systèmes de production de protéines *in vitro* "sans cellule" d'origine procaryote ou eucaryote (germe de blé).

À l'heure actuelle, une des technologies les plus abouties repose sur l'utilisation de lysats bactériens optimisés auxquels ont été rajoutés les composants nécessaires à la traduction (ribosomes, substrats énergétiques, ARNts, synthétases, acides aminés, etc.). Cette technologie, qui a vu le jour au début des

années 70 (Zubay 1973), n'a pris son essor que très récemment. La compagnie Roche Applied Science a été la première à développer des kits renfermant un lysat bactérien optimisé (dénommé RTS pour *Rapid Translation System*) et à développer des bioréacteurs, composés d'une chambre thermostatée, compatibles pour la synthèse *in vitro*. Le principe est basé sur un système d'échange continu, à travers une membrane semi-perméable, permettant d'alimenter la réaction de synthèse, en substrats et en composés énergétiques (Baranov et Spirin 1993). De plus, les produits de dégradation issus de la réaction de synthèse pouvant interférer avec celle-ci, sont éliminés par diffusion à travers cette membrane. Ce système d'échange permanent entre deux compartiments permet la traduction, de manière continue, de la protéine d'intérêt et peut produire jusqu'à plusieurs milligrammes de protéines en 24 heures.

La production de l'ADN polymérase B Δ PIP a été effectuée avec le kit RTS 500 (Roche), et le Proteomaster (Roche) qui est un incubateur-agitateur pouvant accueillir les cuves réactionnelles.

Le compartiment réactionnel était composé des produits du kit et de 15 μ g de plasmide pARHS2 portant le gène codant pour l'ADN polymérase B Δ PIP. L'autre compartiment était composé de solutions pour alimenter la réaction et recueillir les déchets.

La cuve est incubée à 30°C dans le Proteomaster, à une agitation de 990 rpm, pendant 24 heures.

II. Visualisation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Le gel de dimension (10 x 8cm) était composé de deux parties (cf. annexe Tampons) :

- un gel de tassement (stacking gel)
- un gel de séparation (running gel)

II.1. Préparation des échantillons :

10 μ l de surnageant protéique ont été ajouté au tampon de chargement Laemli (cf. annexe Tampon). Les protéines ont été dénaturées par un chauffage de 10 min à 100°C avant d'être déposées sur gel.

Un marqueur de taille a également été déposé sur le gel après avoir subi le même traitement. Les marqueurs choisis étaient le Low Molecular Weight (LMW) et High Molecular Weight (HMW) calibration kit for SDS electrophoresis (Amersham Pharmacia) (figure 37).

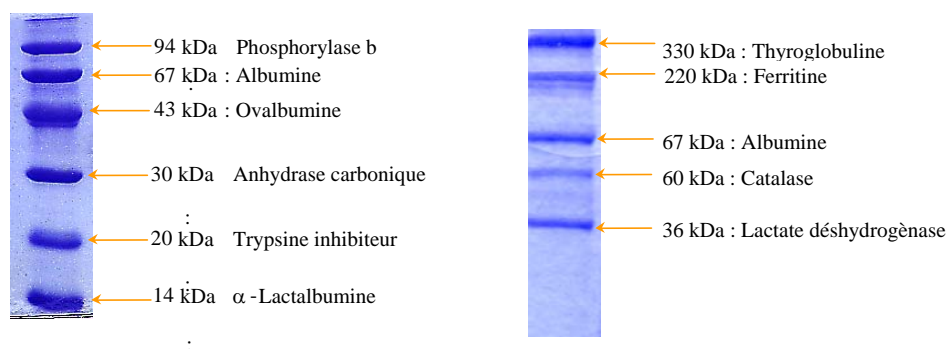


Figure 37. Marqueurs de taille Low Molecular Weight (LMW) et High Molecular Weight (HMW) (Amersham).

II.2. Migration :

Les gels ont été placés dans une cuve (Mini Protean, BioRad) contenant un tampon Tris-Gly (0,3% Tris, 1,4% glycine, 1% SDS). La migration a été effectuée à une intensité constante de 40 mA pendant 1 à 2 heures.

II.3. Révélation et séchage des gels :

Les gels ont été placés, pendant 1 heure sous agitation, dans une solution de bleu de Coomassie à 1g/L dans un mélange acide acétique/éthanol/eau 1/5/4 (v/v/v). Ils ont ensuite été décolorés par des bains successifs d'acide acétique/éthanol/eau 1/3/6 (v/v/v), jusqu'à apparition des bandes protéiques. Les gels peuvent être conservés momentanément dans l'eau ou séché directement. Le séchage a été réalisé, par chauffage sous vide, avec le sècheur Gel Dryer 583 (BioRad) ; les gels ont été placés dans l'appareil entre du papier Watman humide et film plastique type Saran.

III. Purification

Un chauffage à 75°C réalisé après lyse des cellules permet d'éliminer une grande partie des protéines de *E. coli*. La majorité des contaminants protéiques est éliminé grâce à la technique de chromatographie, en utilisant des colonnes adaptées. La colonne est équilibrée avec un tampon contre lequel les extraits protéiques sont dialysés. Après dépôt de l'échantillon, la colonne est lavée, permettant d'éliminer les protéines non fixées. Un gradient d'élution est ensuite effectué ; la protéine recherchée est récupérée puis concentrée après analyse des fractions d'élution (la composition des tampons et les caractéristiques des colonnes sont disponibles dans l'annexe Tampons). L'appareil de chromatographie est un système FPLC Äkta (Amersham Pharmacia).

IV. Dosage des protéines :

Le dosage des protéines a été réalisé sur 25µl d'échantillon avec le kit DC Protein Assay (BioRad), suivant les conseils du fournisseur. Après la réaction, la mesure de la DO à 750 nm, reportée sur une courbe étalon (figure 38), a permis d'estimer la concentration en protéines.

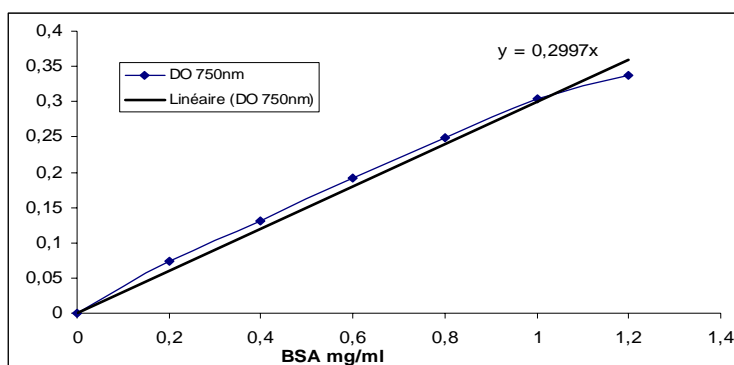


Figure 38. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par le kit DC Protein Assay (BioRad).

V. Obtention de séquences peptidiques

V.1. Séquençage N-terminal par la méthode d'Edman :

Cette technique permet, par un séquençage des 10 premiers acides aminés, de confirmer la présence de la protéine recherchée, observée sur gel SDS-PAGE à la taille attendue. Après transfert sur une membrane PVDF, puis coloration, la bande protéique a été découpée et envoyée au centre commun du séquençage de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (Lyon).

Toutes les solutions ont été filtrées et le travail a été effectué avec des gants. La migration des protéines a été réalisée sur un gel SDS-PAGE 12%, puis celui-ci a été incubé pendant 5 minutes dans le tampon de transfert (10 mM CAPS pH11, 10% méthanol). La membrane de PVDF a été incubée 3 secondes dans du méthanol 100%, 3 seconde dans l'eau puis 15 minutes dans le tampon de transfert.

Le gel a ensuite été mis en contact avec la membrane PVDF et trois feuilles de papier Whatmann imbibées de tampon de transfert ont été ajoutées de part et d'autre. Le tout a été entouré de mousse, puis placé dans la cuve de transfert, avant d'être soumis à une intensité de 0,2 A, pendant 45 min.

Après transfert, la membrane a été lavée trois fois à l'eau pendant 5 minutes, placée 5 minutes en tampon de coloration (0,1% R250, 40% méthanol), puis en tampon de décoloration (50% méthanol) jusqu'à apparition des bandes. Après trois lavages à l'eau pendant 5 minutes, la membrane a été séchée à l'air. Les bandes ont été découpées puis envoyées en tube Ependorf à température ambiante.

V.2. Spectrométrie de masse

Les protéines en suspension dans le tampon de sonication sont envoyées à Innova Proteomics, gestionnaire de la plateforme protéomique de Rennes. L'échantillon est joint avec un profil du gel pour préciser les bandes à séquencer. L'échantillon est analysé en spectrométrie de masse (MALDI-TOF autoflex II – Bruker Daltonics). Les protéines sont digérées par la trypsine, puis les peptides sont ionisés par un laser. Le MALDI-TOF mesure les masses précises des peptides. Une empreinte peptidique expérimentale est constituée pour chaque protéine grâce au logiciel ProteinScape (Bruker Daltonics). Cette empreinte peptidique est comparée aux empreintes peptidiques théoriques des protéines connues et référencées dans des bases de données *via* des moteurs de recherche (Mascot, ProFound...).

VI. Analyse par chromatographie en phase liquide à haute pression

L'état oligomérique des PCNAs sauvage et (ded) ont été observés par HPLC. L'appareillage de chromatographie utilisé a été le Bio-Tek Kontron 520, relié à un détecteur 535 pour mesurer la DO_{280nm} en sortie de colonne Superdex 200 PC (3,2 mm x 30 cm), contenant des particules de 13 μm (Amersham Biosciences). 20 μl d'échantillon ont été injectés, à un débit de 40 $\mu l/min$, dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de DTT et 0,15 M de NaCl.

Les marqueurs de poids moléculaire qui ont été utilisés sont la thyroglobuline (669 kDa), la ferritine (440 kDa), l'aldolase (158 kDa), la ribonucléase A (137 kDa), la BSA (67 kDa) et l'ovalbumine (43 kDa).

VII. Test d'activité des ADN polymérase :

VII.1. Matrice d'ADN utilisée :

La matrice utilisée était un fragment de 1000-1500 bases d'adénine (poly(dA)) hybridé à une amorce de 12-18 bases de thymine (oligo(dT)) dans les conditions suivantes :

250 µl poly(dA) (1.5 mg/ml)

25 µl oligo(dT) (1.5 mg/ml)

233.5 µl 20 mM Tris-HCl pH 8.0

Chauffer 5 min à 65 °C, puis ajouter 16.5 µl de KCl 1 M

VII.2. Réaction :

A 20 µl de tampon ont été ajoutés 1 µl de [³H]dTTP et 1 µl d'enzyme, diluée ou non. Le mélange a été incubé pendant 20 min à 65°C, puis 10 µl ont été déposés sur une rondelle de papier GF/C (Whatman). Les papiers ont ensuite été lavés dans 250 ml TCA 5% / Pyrophosphate de sodium 40 mM (froid) pendant 15 min, lavés 8 fois dans du TCA 5% / Ppi 40 mM froid, puis 2 fois avec de l'éthanol 95% froid. Enfin les rondelles ont été séchées pendant 1h sous lampe.

VII.3. Comptage :

Les rondelles de papier séchées ont été placées dans un tube contenant 3 ml de mélange scintillant Optifluor 0 (Packard). Le comptage des émissions β a été intégré sur une durée comprise entre 1 et 3 min avec un compteur 2000CA (Packard).

Méthodes de biochimie fonctionnelle et interactions

I. Chargement du PCNA par réaction de pontage au glutaraldéhyde :

I.1. Principe (figure 39) :

Cette expérience est destinée à étudier le chargement du PCNA sur l'ADN en mettant en œuvre un PCNA marqué au phosphore ^{32}P . Les interactions protéine-ADN sont « figées » par des pontages intermoléculaires. Les produits de réaction sont séparés sur gel d'agarose ; les molécules libres et le complexe migrent à des tailles différentes. Le PCNA libre et le PCNA chargé sur l'ADN seront donc visibles sur gel.

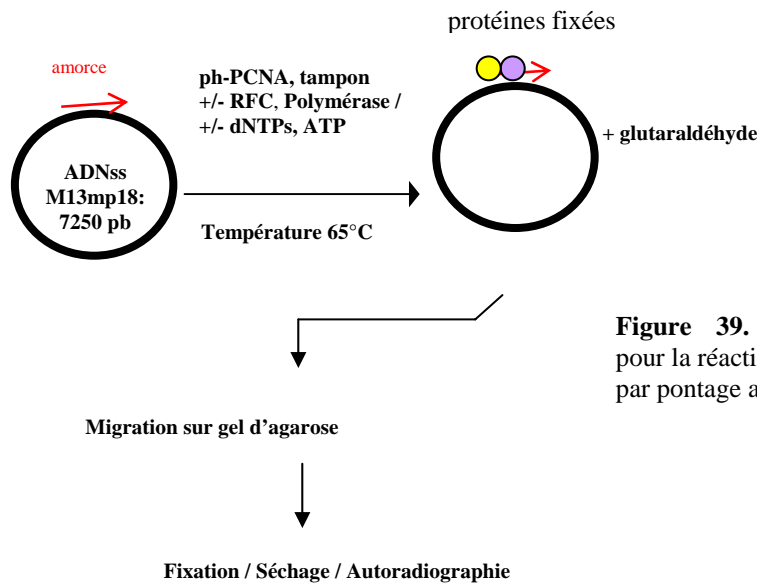


Figure 39. Procédure expérimentale pour la réaction de chargement du PCNA par pontage au glutaraldéhyde.

I.2. Phosphorylation du PCNA :

Le ph-PCNA et ph-PCNA(ded) ont été marqués au ^{32}P , par la protéine kinase HMK, en tampon de phosphorylation (20mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, 12mM MgCl_2 , 0.1M NaCl).

Réaction :

| | |
|---|----------------------|
| Tampon HMK 10X | 3 μl |
| pH-PCNA 0.8mg/ml | 3 μl |
| $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ | 3 μl |
| HMK 5U/ μl | 1.5 μl |
| Eau | QSP 30 μl |

Incuber pendant 1h00-1h30, à 37°C, puis placer sur glace.

Un contrôle de l'efficacité du marquage peut se faire en faisant migrer le PCNA marqué sur gel SDS-PAGE.

I.3. Préparation de la matrice d'ADN amorcée :

La matrice d'ADN utilisée était le vecteur M13mp18 simple brin (Sigma), dérivé du bactériophage filamenteux M13. A ce vecteur simple brin a été hybridée une amorce de 30 paires de bases, qui constitue une zone double brin, sur laquelle est assemblé le complexe de chargement du PCNA.

L'hybridation M13/amorce est effectuée de manière à obtenir un rapport molaire de 1/20.

Réaction :

1 µl primer (soit 200 ng ou 20 pmol)

49 µl M13ss à 50 ng/µl (soit 2450 ng ou 1,03 pmol)

50 µl tampon d'hybridation 2X (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)

Chauffer pendant 10 min à 90°C sur bloc chauffant puis laisser refroidir à 25°C

La concentration finale en ADN est estimée à 25 ng/µl

I.4. Chargement et visualisation du complexe ADN/PCNA :

I.4.1. Réaction de chargement

La réaction a été réalisée dans un volume final de 25 µl, dans le tampon 20mM Hepes/NaOH pH 7.5, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, en présence de 100 ng d'ADN amorcé.

Les protéines ont été ajoutées, de manière séquentielle, dans le mélange réactionnel, en utilisant les quantités suivantes : RF-C, 300 ng ; ph-PCNA, 150 ng ; Pol B, 6 ng ; Pol D, 100 ng. Les substrats ou cofacteurs ont été ajoutés comme suit : dNTPs, 0,4 mM ; ATP ou ATPγS, 1 mM.

Le mélange réactionnel a été incubé à 65°C, sur bloc chauffant, pendant 3 min, avant d'ajouter 2,7 µl de glutaraldéhyde 1%, puis la réaction a été incubée pendant 10 min à 65°C. Le glutaraldéhyde va créer des pontages entre les molécules organiques présentes, figeant ainsi les complexes protéines-protéines et protéines-ADN formés.

I.4.2. Electrophorèse et révélation

La solution de dépôt 6X (20 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50% glycérol et 0,07% de bleu de bromophénol) a été ajoutée au mélange réactionnel, puis les échantillons ont été déposés sur un gel agarose 0,8 % en tampon TBE 0.5X, SDS 0.1%. La migration a été effectuée à 80V constants, durant 1h30-2h00, dans un tampon TBE 0.5X, SDS 0.1%. Après migration, le gel a été fixé, pendant 10 min, dans un bain de TCA 10% (v/v), puis lavé deux fois dans un bain d'acide acétique 10% / méthanol 12%, avant d'être séché sous vide, et à froid, entre du papier Whatman et un film plastique (Saran).

Enfin le gel a été séché puis mis en contact avec un film pendant une nuit à -80°C ; ce dernier a été révélé chimiquement à l'aide d'une développeuse (Hyperprocessor - Amersham). Alternativement, le gel est également mis en contact avec un écran spécial (Imaging Screen K - BioRad) qui a été révélé numériquement avec un système laser (Personal Molecular Imager FX - Biorad).

II. Synthèse d'ADN *in vitro* : (figure 40)

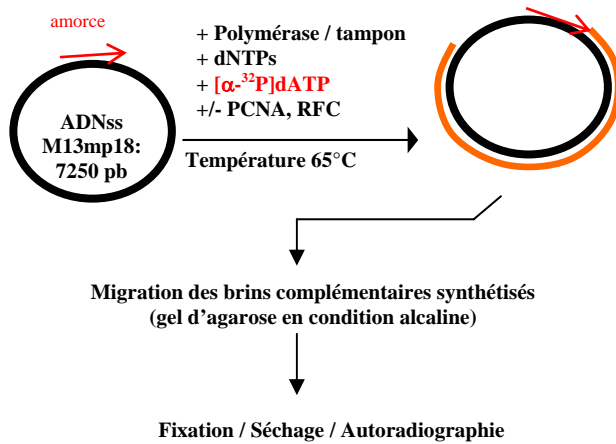


Figure 40. élancement d'amorce

La synthèse a été effectuée pendant 20 minutes,. l'ADN a été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. Cela permet de séparer la matrice d'origine du brin synthétisé marqué. Nous pouvons ainsi observer la taille des fragments produits

II.1. Matrice d'ADN amorcé :

La matrice d'ADN utilisée était la même que celle préparée pour les tests de chargement du PCNA (voir II.1.2.). La quantité d'ADN utilisé était de 125 ng par réaction.

II.2. Réaction d'élancement :

Avec l'ADN polymérase B, la réaction a été effectuée en tampon IsisTM (MP-Bio : 20 mM Tris-HCl pH 9.0, 25 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgSO₄, 0.1% Tween 20, 0.1mg/ml BSA) en présence des dNTPs (0.2 mM final). Avec l'ADN polymérase D, la réaction a été effectuée en tampon Bis-Tris (20 mM Bis-Tris pH 6.5, 1 mM DTT, 0.4 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs).

A chaque réaction, 5 μCi de [α-³²P]dATP ont été ajoutés, afin de visualiser les fragments synthétisés.

Les protéines ont été ajoutées, de manière séquentielle, dans le mélange réactionnel, aux quantités suivantes : RF-C, 200 ng ; PCNA, 100 ng ; Pol B, 6 ng ; Pol D, 100 ng. Les concentrations en ATP ou ATPγS était de 0,5 mM final.

Les réactions ont été incubées à 65°C, pendant 20 min, avant de les placer sur glace. 3 μl de tampon de chargement 10X (500mM NaOH , 10mM EDTA , 25% Ficoll 400 , 0.25% Bleu de bromophénol) ont été ajoutés avant dépôt sur gel alcalin. Un marqueur de taille radioactif a également été déposé sur le gel.

II.3. Gel alcalin :

Nous avons optimisé un protocole, afin de visualiser la synthèse de grands fragments.

II.3.1. Préparation du gel :

Nous avons utilisé un gel d'agarose 1.1% (p/v). L'agarose a été dissous à chaud dans l'eau, mis à refroidir jusqu'à 50-60°C, avant l'ajout de NaOH et d'EDTA (concentrations finales : 50mM NaOH, 5mM EDTA).

II.3.2. La migration :

La migration a été réalisée à 80V constants en tampon dénaturant (0.05X TAE, 15mM NaOH, 0.5mM EDTA), et à basse température (4°C) afin de pallier l'échauffement. Pour ce faire, la cuve de migration a été placée dans la glace ; un bloc de glace emballé a également été placé sur le couvercle de la cuve. La migration dure environ 5-6 heures.

II.3.3. Séchage et révélation :

Après migration, le gel a été séché sous vide à 50°C entre papier Wathman et film Saran puis placé en contact avec un film durant la nuit à -80°C, avant révélation chimique avec la développeuse (Hyperprocessor - Amersham). Alternativement, le gel est également mis en contact avec un écran spécial (Imaging Screen K - BioRad) qui a été révélu numériquement avec un système laser (Personal Molecular Imager FX - Biorad).

II.3.4. Marqueur de taille

Afin d'évaluer la taille des fragments synthétisés, un marqueur de taille radioactif a été produit : il s'agit du bactériophage Lambda, digéré par l'enzyme de restriction *HindIII*, puis marqué à l'aide du fragment de Klenow.

Mélange réactionnel

| | |
|---|---------|
| Lambda digéré <i>HindIII</i> (500ng/μl) | 15 μl |
| Tampon 10X K(P) pH 7.5 (500mM) | 10 μl |
| MgCl ₂ (100mM) | 6.6 μl |
| dGTP (1mM) | 1 μl |
| dCTP (1mM) | 1 μl |
| dTTP (1mM) | 1 μl |
| α[³² P]dATP (3.3mM) | 1.5 μl |
| Klenow (5 U/μl) | 12.5 μl |
| H ₂ O | 58 μl |

Après une heure d'incubation, 10 mM de dNTPs froids ont été ajoutés, puis la réaction a été incubée pendant 30 minutes supplémentaires, à 37°C. L'ADN marqué a été purifié sur une colonne de Sephadex G25 (Amersham) pour éliminer l'enzyme et les nucléotides radioactifs non incorporés. Le marqueur a été conservé à 4°C, jusqu'à décroissance.

III. Interactions des protéines avec un ADN simple brin amorcé

III.1. Visualisation par western blot :

III.1.1. principe (figure 41)

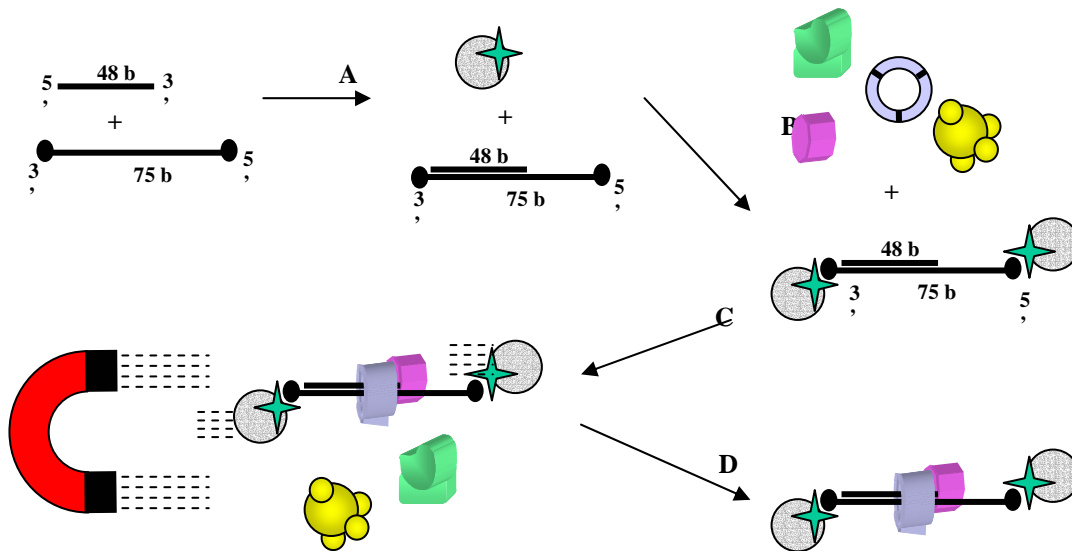


Figure 41. schéma présentant le principe de l'expérience.

Après hybridation de deux fragments d'ADN, dont l'un est doublement biotinylé (A), l'ADN simple brin amorcé est fixé sur des billes magnétique par des liaisons biotin-streptavidine (B) puis mis en contact avec les protéines afin d'étudier leur affinité entre elles ou pour le substrat (C). L'utilisation d'un aimant permet, par des lavages (D), d'éliminer les protéines non fixées. La détection se fait par électrophorèse et révélation par Western-Blot (E).

Chauffage / dépôt sur SDS-PAGE

Transfert sur membrane

Révélation par anticorps

III.1.2. Matrice d'ADN utilisée

La matrice d'ADN utilisée était composée d'un fragment de 75 bases (B1), hybridé à un fragment de 48 bases (A2). En 3' et 5' du grand fragment sont fixées des molécules de biotine qui pourront s'associer à des molécules de streptavidine. Le mélange des deux fragments a été chauffé pendant 10 min, à 90°C, en tampon Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, puis la réaction a été refroidie à 25°C. Le rapport molaire entre les fragments était de 1:1 et la concentration finale choisie, pour l'ADN simple brin amorcé, était de 100 fmol/μl.

B1 : Biotine5'-GAGCTAGATGTCGGACTCTGCCTCAAGACGGGTAGTCAACGTGCACTCGA
GGTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'Biotine

A2 : 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGACCTCGAGTGCACGTTGACTACCCGT-3'

III.1.3. Utilisation de billes magnétiques streptavidinées

Les billes peuvent fixer l'ADN biotinylé *via* la streptavidine et être attirées par un aimant en raison de leur composition en fer. Cela permet d'étudier l'affinité des protéines avec l'ADN, en effectuant des lavages entre les étapes désirées.

D'après le fournisseur (Dynal Biotech), 1 µg de billes fixent jusqu'à 200 fmol d'ADN simple brin. Dans un tube Ependorf de 2 ml, 20 µg de billes lavées ont été mis en contact avec 300 fmol d'ADN, puis incubées pendant 20 min sur un système rotatif à température ambiante. Le mélange a été lavé trois fois avec le tampon Tris-EDTA-NaCl, puis avec le tampon de réaction (20mM Hepes/NaOH pH 7.5, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). Pour les témoins négatifs, 9 pmol de biotine ont été incubées à la place de l'ADN.

III.1.4. Ajout des protéines :

Les protéines ont été ajoutées, de manière séquentielle, dans les quantités suivantes : 20 ng de PCNA, 50 ng de RF-C, 60 ng de Pol D et 20 ng de Pol B. La réaction a été effectuée sur un bloc chauffant, à 65°C. Après incubation, les billes ont été lavées 3 fois avec 2 ml de tampon Tris-EDTA-NaCl, puis remises en suspension dans le tampon de chargement avant d'être soumises à une électrophorèse.

III.1.5. Western Blot et révélation par anticorps :

Après électrophorèse sur gel SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF.

Le gel de polyacrylamide a été incubé pendant 30 min dans le tampon de transfert TBS (10mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150mM NaCl) ; la membrane PVDF a été incubée quelques secondes dans du méthanol puis pendant 3 min dans le tampon de transfert. Le gel a ensuite été mis en contact avec la membrane et trois feuilles de papier Whatmann imbibées de tampon de transfert ont été ajoutées de part et d'autre. Le tout a été entouré de mousse, puis placé dans la cuve de transfert, avant d'être soumis à une tension de 100 V, pendant 45 min et à 4°C.

Après transfert, les sites libres de la membrane ont été saturés par incubation dans le tampon TBST (10mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 0,05% de TWEEN 20) contenant 5% (p/v) de lait en poudre écrémé.

La membrane a ensuite été incubée en tampon TBST, pendant une nuit à 4°C, avec l'anticorps primaire, spécifique de la protéine recherchée. La quantité d'anticorps ajoutée a été estimée par une titration préalable. Les anticorps utilisés ont été produits chez le lapin, par la société Eurogentec, à partir de peptides spécifiques des protéines recherchées, sauf ceux spécifiques de l'ADN polymérase B qui ont été produits à partir de la protéine.

Après 3 lavages de 15 min en tampon TBST, la membrane a été incubée, pendant 1 heure, avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin, conjugué à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP) (fournisseur). La membrane, après 3 lavages tampon TBST, a été incubée avec les composés chimiques de révélation.

Le kit de révélation ECL+ (Enhanced Chemiluminescence - Amersham) a été utilisé. Il permet, grâce à la peroxydase et de l' H_2O_2 , la formation enzymatique d'un ester d'acridinium à partir du luminol, lequel est dégradé en un composé excité qui libère de l'énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde maximale de 430 nm.

Ce type de révélation permet de détecter jusqu'au picogramme d'antigène ; la réaction est effectuée suivant les recommandations du fournisseur.

Pour finir, la membrane a été mise en contact pendant quelques secondes avec un film qui est immédiatement révélé (développeuse : Hyperprocessor - Amersham) ou est scannée numériquement par un appareillage possédant le laser de longueur d'onde désirée (Typhoon 9400- Amersham).

III.2. Résonance plasmonique de surface :

III.2.1. Principe de la résonance plasmonique de surface

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du faisceau, toute la lumière peut être réfléchi. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface, sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent.

Si une couche fine de métal, riche en électrons libres, est déposée à l'interface, ceux-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident ; ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface (Le nuage électronique du métal est appelé plasmon). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé avec une barrette de diodes, présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent (figure 42).

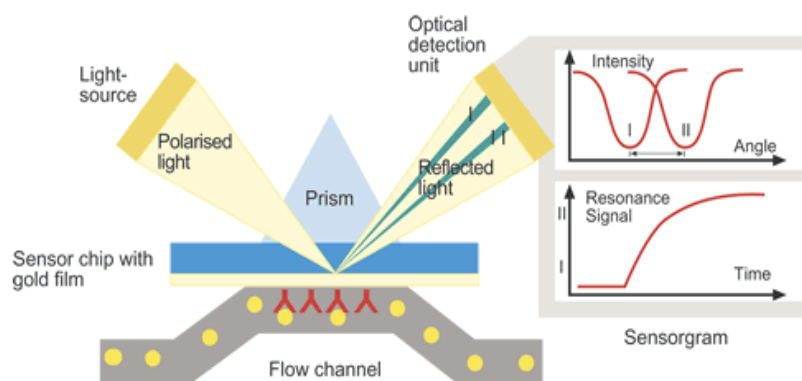


Figure 42. vue schématique de la résonance plasmonique de surface : l'onde lumineuse émise est réfractée suivant un angle variable en fonction du milieu présent dans le champ évanescent.

III.2.2. Principe de fonctionnement de l'appareillage utilisé (Biacore X)

Le Biacore a pour fonction de visualiser, en temps réel, des interactions entre biomolécules non marquées, dans un débit continu de tampon. Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur une interface appelée sensor chip (biocapteur). Les biocapteurs, les plus fréquemment utilisés, sont constitués d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé. Sur ces surfaces seront immobilisés, de façon covalente, des ligands hydrosolubles dans un milieu hydrophile (protéines, acides nucléiques, ...). Les autres partenaires, les analytes, sont injectés à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface.

L'analyte, dilué dans un tampon, circule à flux constant à la surface du biocapteur. Les changements de masse, induits par l'association ou la dissociation des complexes, modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de 0,1 degré, ainsi qu'à une fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface. L'enregistrement de ce signal s'appelle un sensorgramme (figure 43).

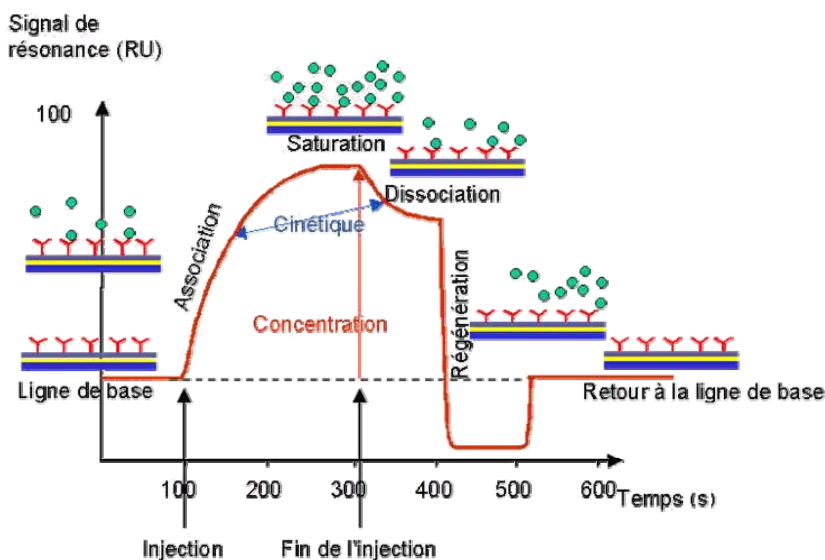


Figure 43. Exemple de sensorgramme obtenu après injection d'analytes sur un biocapteur recouvert de ligands.

La courbe est composée d'une phase d'association, d'une phase de saturation et d'une phase de dissociation

III.2.3. Expériences réalisées

Le biocapteur utilisé (puce SA, Biacore) est recouvert de molécules de streptavidine, auxquelles peuvent se lier des fragments d'ADN biotinyllé. L'ADN fixé est le fragment B1 de 75 bases, utilisé dans les expériences avec les billes, mais uniquement biotinyllé en 5'. B1 a été injecté dans le tampon HBS-P (10 mM Hepes pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 0,005% P20) ; sa fixation a été observée en temps réel. L'hybridation de l'amorce A2 de 48 bases a également été observée après son injection.

Les expériences sur le chargement du PCNA et les interactions physiques des ADN polymérases ont été réalisées avec cette matrice. Les quantités de protéines injectées, en tampon HBS-P, étaient

respectivement de 6 pmoles pour le PCNA et de 1,4 pmoles pour les ADN polymérase B ou D (sauvages ou Δ PIP). Le débit de tampon circulant sur le biocapteur et de 30 μ l/min.

Entre chaque expérience, le biocapteur a été lavé avec une solution de 10 mM de NaOH. Ceci permet de décrocher les protéines fixées mais également l'amorce A2. Pour chaque nouvelle expérience, l'oligonucléotide A2 est hybridé avant l'injection des protéines.

RESULTATS



I. Etude du chargement du PCNA :

Le chargement du PCNA de *Pyrococcus abyssi* a été étudié, en utilisant comme matrice d'ADN le phage M13 simple brin de 7250 bases, hybridé à une amorce de 42 bases (cf matériels et méthodes IV.1.). La matrice circulaire a été choisie afin d'éviter un chargement non spécifique par l'extrémité libre de l'ADN. La température de réaction est de 65°C, inférieure à la température de dénaturation de l'amorce. Après incubation, les complexes ADN protéines sont fixés par le glutaraldéhyde, un agent réticulant induisant la formation de pontages entre les molécules organiques.

Afin de visualiser le chargement, le PCNA est marqué au ^{32}P . Le PCNA sauvage phosphorylable (Ph-PCNA) a été précédemment obtenu au laboratoire en insérant une étiquette au niveau C-terminal de la protéine. Une séquence nucléotidique a été intégrée dans le plasmide portant l'insert sauvage entre l'avant dernier codon, correspondant à l'acide glutamique, et le site de restriction *NdeI* portant le codon stop. Cette séquence correspond à six acides aminés (RRASVA), reconnus par une kinase qui va phosphoryler la sérine en présence de $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$, ce qui va permettre la visualisation du PCNA par autoradiographie, lors des expériences de chargement par la technique de pontage au glutaraldéhyde.

I.1. Le PCNA de *P. abyssi* se charge sur l'ADN en absence de RF-C :

Des études ont montré, chez certaines archées thermophiles, que le PCNA pouvait stimuler les ADN polymérases en absence du RF-C (De Felice *et al.* 1999; Cann *et al.* 2001; Daimon *et al.* 2002; Dionne *et al.* 2003), ce qui pourrait s'expliquer par un autochargement du PCNA sur l'ADN. Ce fait a toujours été déduit indirectement, par le biais d'études centrées sur la synthèse d'ADN, mais n'a jamais été prouvé expérimentalement. La première expérience de chargement décrite ici montre, qu'en effet, le PCNA de *P. abyssi* est capable de se charger seul sur l'ADN (figure 44 ; puits 2).

Une explication possible est que les interactions inter monomères du PCNA archéen, donnant à la protéine sa structure en forme d'anneau, sont moins stables que celles des PCNA eucaryotes. L'étude du PCNA eucaryote a mis en évidence huit régions permettant des liaisons hydrogène entre monomères (Krishna *et al.* 1994; Gulbis *et al.* 1996). Chez l'euryarchée *P. furiosus*, l'interaction entre monomère se fait par le biais de six acides aminés (Matsumiya *et al.* 2001).

Deux bandes sont observées sur le gel au niveau du chargement du PCNA seul (figure 44 ; puits 2). Le gel d'agarose permet, lors de la migration, de séparer des fragments d'ADN en fonction de leurs tailles, les protéines n'ayant pas d'influence. Dans ce cas, les deux bandes observées correspondent probablement à deux formes de complexes. Le même type d'expérience, effectuée avec l'ADN simple brin circulaire amorcé et le PCNA marqués avec deux fluorochromes différents, montre que les signaux obtenus sont superposables, indiquant que le PCNA est visualisé au niveau de l'ADN (figure 45). Dans cette dernière expérience, l'amorce de la matrice d'ADN est marquée en 5' par la fluorescéine et le PCNA est marqué par la tetramethylrhodamine-5-maleimide. Afin de pouvoir marquer le PCNA, une leucine a été mutée en

cystéine (L211C) ; la séquence peptidique du PCNA ne possédant pas de cystéine et la réaction de marquage nécessitant un groupement thiol.

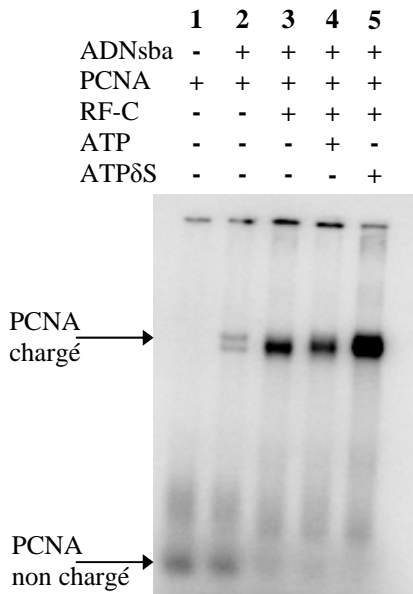


Figure 44. chargement du PCNA sur 100 ng d'ADN circulaire simple brin amorcé (ADNsba).
 PCNA : 150 ng ; RF-C : 300 ng
 Gel d'agarose 0,8%
 Autoradiographie : une nuit à -80°C

Quantification :

En prenant le signal le plus intense (puits 5) comme étant égal à 100% et le bruit de fond comme étant égal à 0%.
 1 : 0 % ; 2 : 19 % ; 3 : 65 % ; 4 : 64 % ; 5 : 100 %

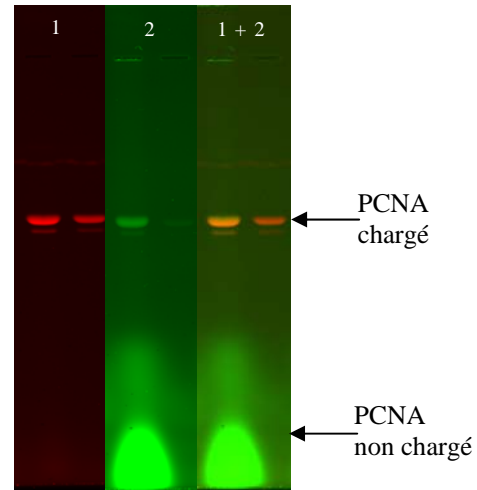
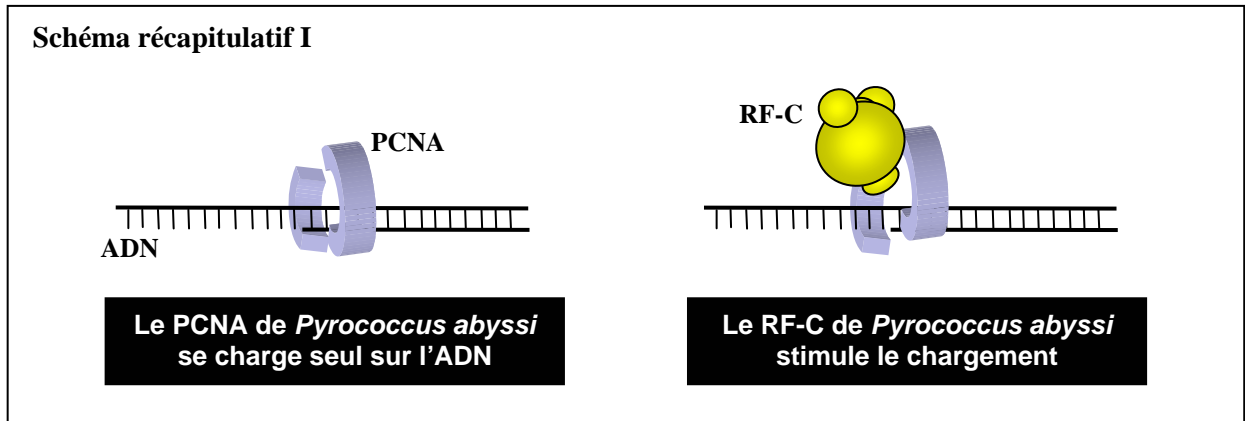


Figure 45 Visualisation du PCNA chargé par fluorescence sur gel d'agarose 0,8%.
 1. ADN circulaire simple brin hybridé à une amorce marquée en 5' par la fluorescéine.
 2. PCNA(L211C) marqué par la tetramethylrhodamine-5-maleimide (Molecular Probes)
 3. Intégration des deux signaux
 Révélation par le scanner Typhoon 9400 (d'après Ghislaine Henneke)

La présence de RF-C, en concentration équimolaire par rapport au PCNA, favorise le chargement, avec ou sans ATP (figure 44 ; puits 3 à 5). Le signal le plus fort est observé en présence d'ATPγS, analogue non hydrolysable de l'ATP (figure 44. ; puits 5), ce qui corrobore les études effectuées sur d'autres organismes et qui montrent que la fixation de l'ATP favorise les interactions RF-C/PCNA (Seybert *et al.* 2002). Il peut être cependant surprenant de constater que le RF-C stimule également le chargement en absence d'ATP, et pratiquement aussi bien qu'en présence d'ATP. Ce fait avait été indirectement observé en synthèse d'ADN, lors de l'étude du RF-C de *P. furiosus* (Cann *et al.* 2001) ; il fut supposé que les dNTPs, présents dans la réaction, pouvaient servir de substitut à l'ATP. Dans notre cas, n'ayant aucune molécule portant un triphosphate dans la réaction, cela suppose que l'ATP n'est pas nécessaire pour le chargement du PCNA, et donc pour les interactions PCNA/RF-C.



I.2. Importance de la structure trimérique du PCNA

I.2.1. Obtention d'un PCNA mutant incapable de former un trimère :

Le PCNA mutant de *P. abyssi* a été construit en tenant compte d'une étude structurale effectuée sur le PCNA de *P. furiosus*, où la recherche des liaisons inter-monomères a mis en évidence six acides aminés indispensables (Matsumiya *et al.* 2003). Trois acides aminés basiques, une arginine et une lysine sur une zone comprise entre le feuillet βG_1 et l'hélice αB_1 et une arginine sur le feuillet βI_1 , interagissent avec trois acides aminés acides situés sur l'hélice αA_2 (deux acides aspartiques et un acide glutamique) par des liaisons hydrogène (figure 46.A).

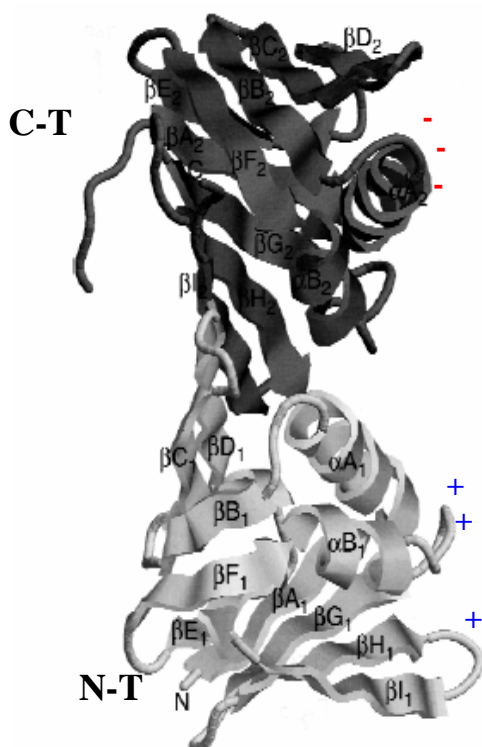


Figure 46.A. Monomère du PCNA de *P. furiosus* avec la localisation des charges permettant l'interaction inter-monomère. D'après (Matsumiya *et al.* 2001).

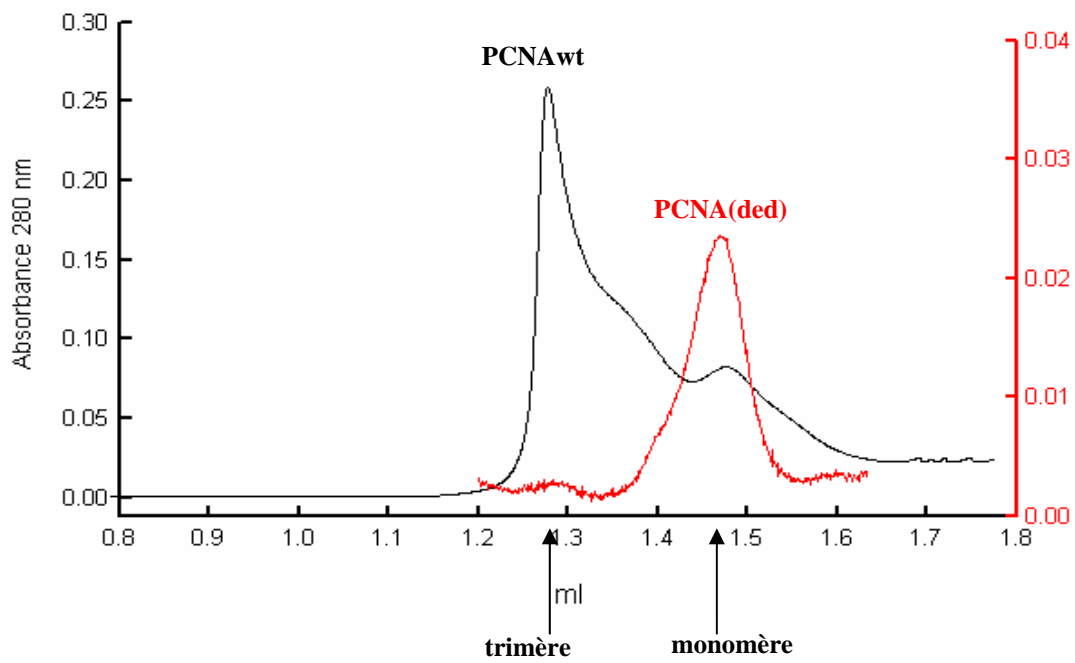


Figure 47. Filtration sur gel par HPLC ; colonne Superdex 200
 Le profil correspondant au PCNA sauvage est en noir et celui correspondant au PCNA(ded) est en rouge.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Pfu      MPFEIVFEGAKEFAQLIDTASKLIDEAAFKVTEDEGISMRAMDPSRVVLDLNLPSIFSK 60
Pab      MPFEIVFEGAKEFAQLIETASRLIDEAAFKVTEEGISMRAMDPSRVVLDLNLPASIFSK 60
*****:***:*****:*****:*****

Pfu      YEVEPETIGVNMDHLKILKRGKAKDTLILKKEENFLEITIQGTATRTFRVPLIDVEE 120
Pab      YEVDGEETIGVNMDHLKVLKRGKAKETLILKKEENFLEISLQGTATRTFKLPLIDVEE 120
***      *****:***:***:*****:*****:*****

Pfu      MEVDLPELPFTAKVVVLGKAVKDAASLVSDSIKFIARENEFIMKAEGETQOEVEIKLT 180
Pab      IEVDLPELPFTAKVVILGDVIKAVKDAASLVSDSMKFIARENEFTMRAEGETQOEVEVKLT 180
:*****:***:***:*****:*****:*****

Pfu      LEDEGLLDIEVQEETKSAYGVSYSLSDMVKGLGKADEVTIKFGNEMPMQMEYYIRDEGRLT 240
Pab      LEDEGLLDIEVQEETKSAYGISYSLSDMVKGLGKADEVTIKFGNEMPMQMEYYIRDEGRLI 240
*****:***:*****:*****:*****

Pfu      FLLAPRVEE 249
Pab      FLLAPRVEE 249
*****
    
```

Figure 46.B. Alignement des séquences peptidiques des PCNAs de *P. furiosus* et de *P. abyssi*. Les charges sont conservées au niveau des acides aminés montrés comme essentiels à la trimérisation du PCNA de *P. furiosus*. En rouge les acides aminés portant les charges négatives et en bleu les charges positives.

L'alignement de la séquence du PCNA de *P. abyssi* avec la séquence du PCNA de *P. furiosus* révèle une grande conservation ; les acides aminés intervenant dans la trimérisation sont conservés, en terme de charge, entre les deux espèces (figure 46.B).

Afin d'avoir une probabilité plus forte d'obtenir un PCNA non trimérisable, les trois liaisons hydrogène essentielles doivent être éliminées. Pour ce faire, il faut ôter, soit les charges positives aux positions 82, 84 et 108, soit les charges négatives aux positions 139, 143 et 147 de la séquence peptidique. Le choix s'est orienté vers l'abolition des trois charges négatives qui sont proches au niveau de la séquence primaire. Les trois mutations peuvent ainsi être induites en même temps lors d'une seule mutagenèse dirigée. Les trois acides aminés acides (D,E et D) du PCNA de *P. abyssi* ont été remplacés par des alanines. Le PCNA mutant produit et purifié est appelé PCNA(ded) (cf matériel et méthodes I.2.3.2).

I.2.2. Le PCNA(ded) ne forme pas de trimère en solution :

La taille du PCNA(ded) est déterminée par une chromatographie sur gel d'exclusion stérique non dénaturant (figure 47). Les profils d'élution montrent que le PCNA sauvage migre majoritairement à une taille correspondant à la forme trimérique. Le PCNA(ded) migre à une taille correspondant à la forme monomérique. Les trois mutations engendrées empêchent le PCNA de s'assembler sous forme d'anneau.

Une protéine PCNA(ded) phosphorylable a été produite à l'aide d'un système couper/coller (enzymes de restriction/ligase), où une partie du plasmide portant le PCNA sauvage et l'étiquette est recombinée avec une partie du plasmide portant le PCNA(ded) (cf. matériels et méthodes ; protéines recombinantes II.3.1.).

I.2.3. Le marquage du PCNA(ded) est plus efficace que celui du PCNA sauvage

Le marquage des ph-PCNAs est observé par autoradiographie après migration sur gel d'acrylamide dénaturant (figure 48). Le PCNA(ded) apparaît mieux marqué que le sauvage. Le fait qu'il soit sous forme monomérique favorise probablement l'accessibilité de la sérine par la kinase.

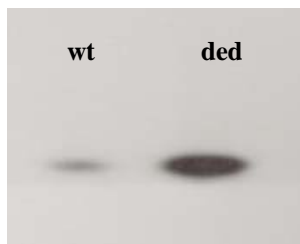


Figure 48. Marquage des PCNA sauvage (wt) et mutant (ded).
100 ng de PCNA ont été migrés, sur gel SDS-PAGE 12%, après marquage au $[\gamma^{32}\text{P}]\text{dATP}$ par la protéine kinase HMK.
Autoradiographie : 4 heures

I.2.4. Le PCNA(ded) n'interagit pas avec l'ADN

Si l'expérience de chargement est effectuée en présence du PCNA(ded), incapable de former un trimère en solution, aucun chargement n'est observé (figure 49 ; puits 6), montrant l'importance de la structure trimérique du PCNA lors de son interaction avec l'ADN. Le fait qu'aucun chargement ne soit observé, en présence de RF-C (figure 49 ; puits 7-9), prouve également que le signal, observé avec le PCNA sauvage, n'est pas du à une interaction non spécifique de monomères avec l'ADN, mais bien un chargement du PCNA.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ADNsba | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCNA | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| PCNA ^{ded} | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| RF-C | - | - | + | + | + | - | - | + | + |
| ATP | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| ATP δ S | - | - | - | - | + | - | - | - | + |

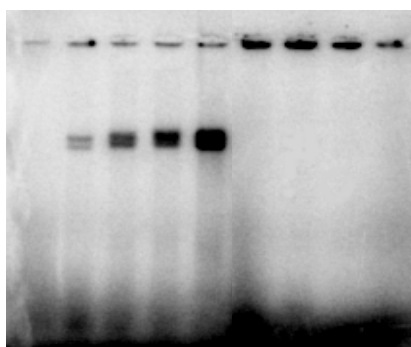


Figure 49. chargement des PCNAs sauvage et mutant sur 100 ng d'ADN circulaire simple brin amorcé (ADNsba).

PCNA^{wt} ou ^{ded} : 150 ng ; RF-C : 300 ng
Gel d'agarose 0,8%
Autoradiographie : une nuit à -80°C

Quantification :

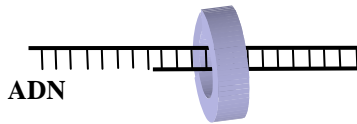
En prenant le signal le plus intense (puits 5) comme étant égal à 100% et le bruit de fond comme étant égal à 0%.

1 : 0 % ; 2 : 19 % ; 3 : 41 % ; 4 : 60 % ; 5 : 100 %
6-9 : 0 %

Schéma récapitulatif II

PCNA

La forme trimérique du PCNA de *Pyrococcus abyssi* est nécessaire pour interagir avec l'ADN



I.3. Stœchiométrie fonctionnelle du RF-C

Lors de la caractérisation fonctionnelle du RF-C, la stœchiométrie de celui-ci n’était pas déterminée de manière fiable ; deux formes de complexes apparaissaient après filtration sur gel correspondant apparemment à un hexamère et un trimère (Henneke *et al.* 2002). Cette observation laissait envisager que le RF-C de *P. abyssi* était un hexamère comme chez *M.thermoautotrophicum* (Kelman and Hurwitz 2000).

Au niveau des archées, il est souvent difficile d’estimer précisément la stœchiométrie du RF-C car la grande sous unité présente souvent des problèmes de solubilité. Les approches par filtration sur gel ou pour l’obtention de cristaux se sont souvent confrontées à une précipitation de la grande sous-unité (Cann *et al.* 2001; Chen *et al.* 2005). De plus, le complexe n’est stable qu’à des concentrations élevées en sel (0,5M). La seule structure du complexe RF-C archéen disponible a été obtenue à partir de la cristallographie de la petite sous-unité associée à la microscopie électronique du complexe (Oyama *et al.* 2001; Miyata *et al.* 2004). Au niveau des eucaryotes, une structure a été publiée, mais avec une grande sous-unité tronquée (Bowman *et al.* 2004).

En plus de l’hexamère putatif, un deuxième lot de RF-C était disponible au laboratoire. La quantification après migration sur gel indiquait qu’il s’agissait plutôt d’un pentamère (voir matériels et méthodes page 62). Ces deux types de RF-C ont été testés pour le chargement du PCNA. La forme active, utilisée dans les expériences citées précédemment, s’avère être le pentamère constitué d’une grande et de quatre petites sous-unités (figure 50 ; puits 3 à 5). La petite sous-unité seule n’a aucune influence sur le chargement (figure 50 ; puits 9 à 11). Il en est de même pour l’hexamère (figure 50 ; puits 6 à 8).

De manière intéressante, lorsque le RF-C de rapport 4:2 (petites:grandes) est supplémenté en petites sous-unités, de manière à atteindre un rapport théorique de 4:1, le chargement est à nouveau observé (figure 50 ; puits 12 à 14). Cela montre un équilibre dynamique entre les différentes formes.

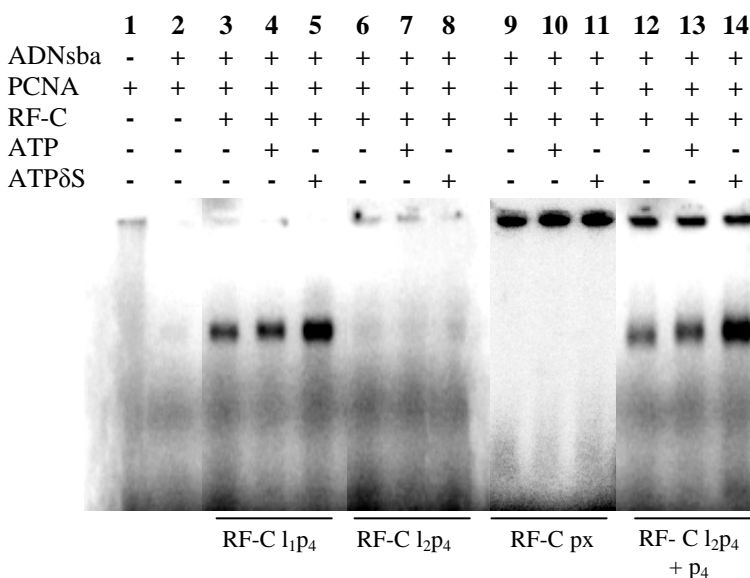


Figure 50. Chargement du PCNA sur un ADN circulaire simple brin amorcé en présence de différentes formes de RF-C.

La stœchiométrie de la molécule est indiqué par les lettres l et p affectées d’un indice. L et p correspondent respectivement à petite sous-unité et à grande sous-unité.

PCNA : 150 ng ; RF-C : 300 ng
 Gel d’agarose 0,8%
 Autoradiographie : une nuit à -80°C

Ce résultat est en accord avec des études de diffraction au rayon X menées en collaboration avec Francesco Spinozin de l'Université de la Marche à Ancona (Italie). Cette technique permet d'estimer de manière précise la taille après traitement des données de diffraction par un modèle mathématique. Une enveloppe moléculaire est également obtenue après calcul. La masse estimée du RF-C est de 206 ± 1 kDa, ce qui correspond à la masse du pentamère (une grande et 4 petites sous-unités) (figure 51.A). De plus, la structure pentamérique proposée place la grande sous-unité au centre d'un carré avec une petite sous-unité à chaque angle (figure 51.B).

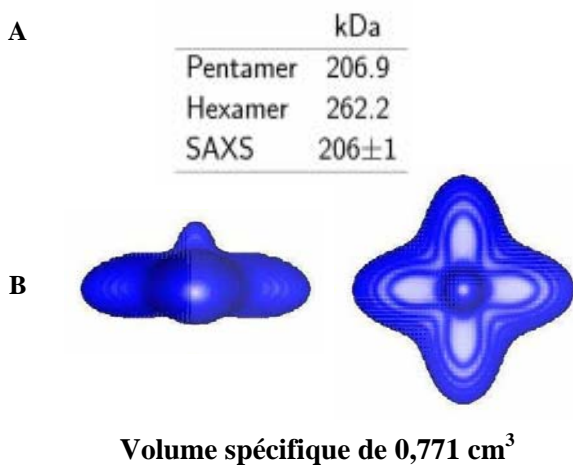
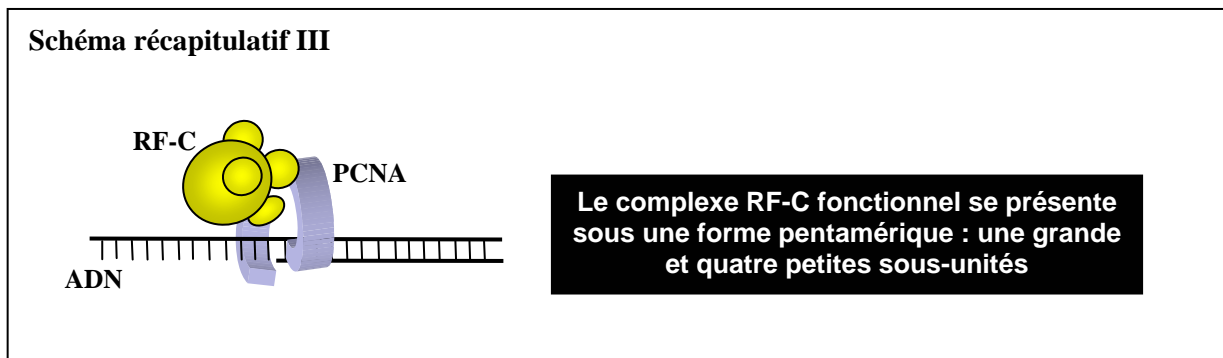


Figure 51. Détermination de la masse molaire du RF-C et estimation de l'enveloppe de sa structure

- A.** Masse du complexe RF-C en solution par la méthode de SAXS (Small Angle X-ray Scattering : diffraction de rayon X aux petits angles)
- B.** Estimation de l'enveloppe et du volume **1.** vue latérale ; **2.** vue d'en haut.



I.4. Quantification de l'intensité du signal de chargement

Les expériences de chargement effectuées montrent, d'un gel à l'autre, une bonne reproductibilité, dans le sens où l'autochargement du PCNA est le plus faible signal observé, et le PCNA en présence de RF-C et d'ATP γ S représente le plus fort signal. Toutefois, en présence d'ATP, l'intensité ne semble pas toujours reproductible, en comparaison avec l'intensité des autres réactions (figures 44, 49 et 50). Afin de disposer d'un intervalle de confiance sur les intensités obtenues, une quantification est effectuée, en utilisant le logiciel Quantity One (BioRad).

La quantification de chaque réaction est effectuée sur six gels en soustrayant le bruit de fond du gel. Chaque valeur est ensuite traduite en pourcentage par rapport à la plus forte intensité considérée comme 100% (réaction contenant du PCNA, du RF-C et de l'ATP γ S). Pour chaque série de valeurs, l'écart type de

la moyenne, noté $S_{\bar{x}}$, est calculé avec la formule suivante : $S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}}$ où S_x est l'écart type des valeurs (x représente l'ensemble des six valeurs de x_1 à x_6), \bar{x} la moyenne des valeurs, n le nombre de valeurs.

Le nombre de valeurs étant faible, l'intervalle de confiance de la moyenne, pour de petits échantillons, est défini par : $\bar{X} \pm t_{\alpha/2} S_{\bar{x}}$ où α est le degré d'imprécision avec lequel la moyenne est connue, fixé ici à 5%, et $t_{\alpha/2}$ est la valeur critique d'une loi de Student à $n-1$ degrés de liberté, correspondant à un seuil de probabilité de α (Scherrer 1984).

Chaque série est donc définie par sa moyenne affectée d'un intervalle de confiance (tableau 7) :

| | Moyenne (en pourcentage) | Ecart type de la moyenne | Intervalle de confiance |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| PCNA | 16 | 0,69 | 2,2 |
| PCNA/RF-C | 43 | 1,48 | 4,7 |
| PCNA/RF-C/ATP | 58 | 3,89 | 12,3 |
| PCNA/RF-C/ATP δ S | 100 | 0,00 | 0,0 |

Tableau 7. Calcul de l'intervalle de confiance des intensités de chargement mesurés sur six gels.

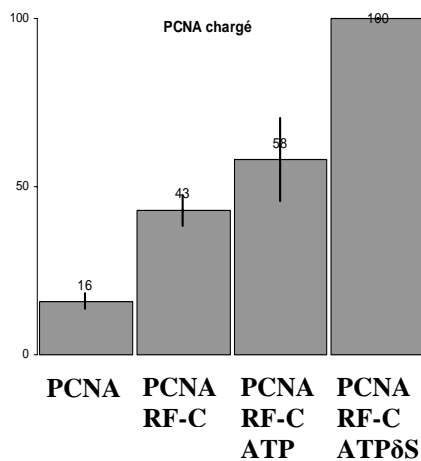


Figure 52. Quantification moyenne du signal, et intervalle de confiance, correspondant au PCNA chargé, sur six gels différents.

Tenant compte de la durée de l'autoradiographie et de la décroissance de la radioactivité, il est impossible d'établir un intervalle de confiance pour la quantification de chaque signal sur différents gels.

Pour chaque gel, le bruit de fond est soustrait, puis les signaux sont convertis en pourcentage, en prenant le signal le plus intense comme 100% (réaction contenant du PCNA, du RF-C et de l'ATP γ S).

L'intervalle de confiance, comme il était supposé, est plus important dans le cas où le PCNA est chargé en présence de RF-C et d'ATP (tableau 7 et figure 52). Les valeurs n'étant pas asymétriques, il s'agit d'une variation de signal d'une réaction à l'autre. Ce point est abordé dans le paragraphe suivant.

I.5. Le RF-C est-il un facteur de déchargement ?

La dynamique moléculaire admise communément pour le RF-C, met en jeu une interaction avec le PCNA après fixation de molécules d'ATP à l'interface de chaque sous-unité. Les molécules d'ATP fixées sont hydrolysées de manière séquentielle, induisant un ensemble de changements conformationnels qui permet au RF-C d'ouvrir le PCNA et de le charger sur l'ADN. Après le chargement, le RF-C serait libéré du complexe, laissant le PCNA seul sur l'ADN, pour le recrutement des ADN polymérases.

Comme vu précédemment, le RF-C de *P. abyssi* ne nécessite pas d'ATP pour charger le PCNA. Cependant un signal fort est observé en présence d'ATP γ S, montrant que l'ATP a un rôle dans le processus. Afin d'estimer l'influence de l'ATP sur la formation du complexe RF-C/PCNA, la réaction de chargement est réalisée suivant différents temps, entre une minute et vingt minutes (classiquement la réaction est incubée pendant trois minutes) (figure 53).

En présence d'ATP γ S, la quantité de PCNA, chargé par le RF-C, augmente en fonction du temps (figure 53 ; puits 1 à 5), ce qui n'est pas le cas en présence d'ATP (figure 53 ; puits 6 à 10).

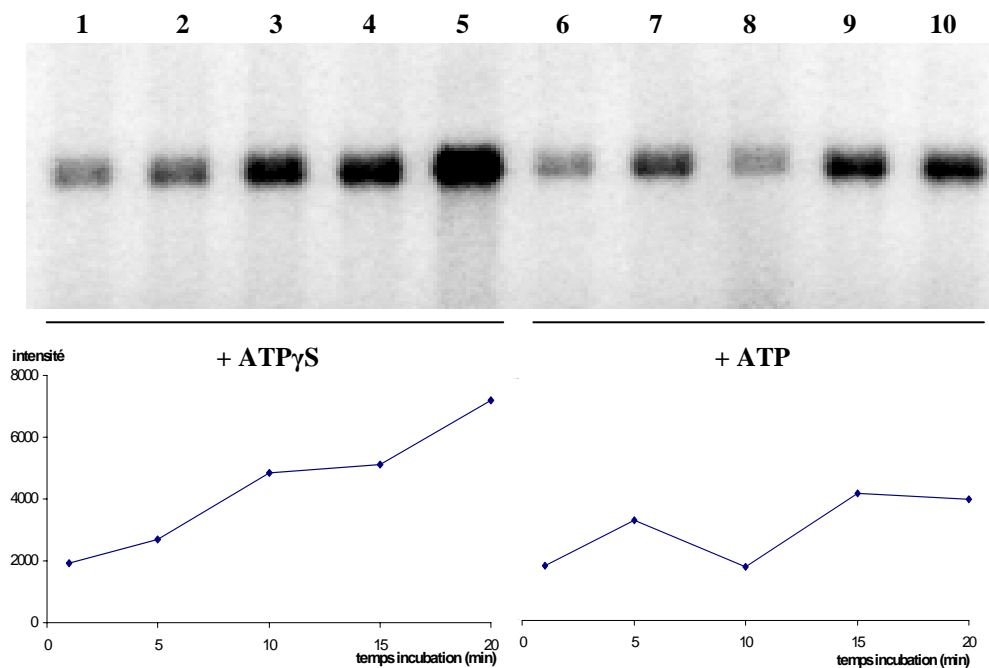


Figure 53. Chargement du PCNA par le RF-C en fonction du temps d'incubation, en présence d'ATP ou d'ATP γ S sur une matrice d'ADN circulaire simple brin amorcée.
1, 6. 1 min ; **2, 7.** 5 min ; **3, 8.** 10 min ; **4, 9.** 15 min ; **5, 10.** 20 min.

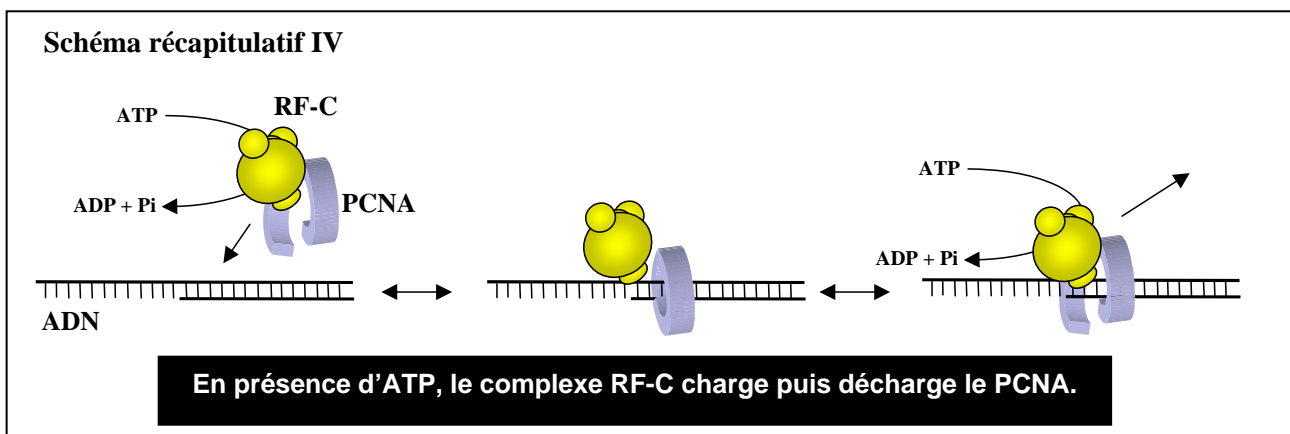
Dans le premier cas de figure, en présence d'ATP γ S, une augmentation du signal est visible en fonction du temps d'incubation, laissant supposer que les molécules de PCNA sont chargées sur l'ADN de manière irréversible. Cette hypothèse est en accord avec les études montrant que la fixation de l'ATP favorise les interactions RF-C/PCNA, tout en rendant stable le complexe formé.

Le fait que le signal obtenu dans le deuxième cas de figure n'augmente pas en fonction du temps, montre l'importance de l'hydrolyse de l'ATP sur la stabilité du complexe sur l'ADN. Une des hypothèses

serait l'existence d'une réaction dynamique entre chargement et déchargement du PCNA, lorsqu'il y a hydrolyse de l'ATP.

Cependant, entre l'étape de chargement et l'étape de déchargement, deux cas de figure peuvent être proposés : (i) le RF-C se dissocie du PCNA après chargement puis se réassocie pour le décharger de manière ATP dépendante ou (ii) le chargement suivi du déchargement s'effectue sans dissociation entre le RF-C et le PCNA. Dans le premier cas de figure, la fixation d'ATP favoriserait la formation du complexe RF-C/PCNA au niveau de la jonction amorce/matrice, dans un premier temps, puis, dans un second temps, l'hydrolyse de l'ATP entraînerait le relargage du RF-C. Le déchargement du PCNA s'effectuerait également avec hydrolyse de l'ATP. Dans le deuxième cas de figure, une interaction permanente entre le RF-C et le PCNA aurait lieu, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP permettant les changements conformationnels nécessaires au chargement et au déchargement du PCNA par le RF-C.

La réaction de déchargement du facteur de processivité n'est actuellement pas clairement élucidée chez les procaryotes et les eucaryotes. Le RF-C humain a été montré comme étant capable de décharger le PCNA d'un ADN amorcé de manière ATP dépendante (Cai *et al.* 1996 ; Yao *et al.* 1996). La réaction de chargement déchargement ne constitue pas un véritable équilibre car, lors du chargement, le facteur de chargement doit refermer l'anneau autour de l'ADN, ce qui n'est pas le cas lors du déchargement où l'anneau est relargué en solution (Yao *et al.* 2006). De plus, il a également été proposé que le PCNA pouvait être déchargé par d'autres complexes comme Ctf18/RF-C2-5 lorsque le réplisome rencontre un site de cohésion ou Rad17/RFC2-5 dans le cas de dommages apparaissant durant la réplication (Bylund et Burgers 2005). Chez *E. coli*, l'anneau β peut être déchargé par la sous-unité δ seule aussi rapidement que par le complexe γ (Leu *et al.* 2000). La plupart des travaux proposent que le facteur de processivité et le facteur de chargement se dissocient après hydrolyse de l'ATP, mais il a est également été proposé que le RF-C peut faire partie du complexe lors de la synthèse d'ADN (Yuzhakov *et al.* 1999).



I.6. Stabilité du complexe PCNA/ADN :

Afin d'estimer la stabilité des complexes formés, du PCNA froid (non marqué) est ajouté au bout de 3 minutes de réaction et le tout est incubé pendant 2 minutes supplémentaires. Deux tests ont été effectués, avec pour l'un, une quantité de PCNA froid équivalente à celle du PCNA marqué (figure 54 ; puits 6, 8, 10), et pour l'autre une quantité de PCNA froid deux fois supérieure à celle du PCNA marqué (figure 54 ; puits 7, 9, 11).

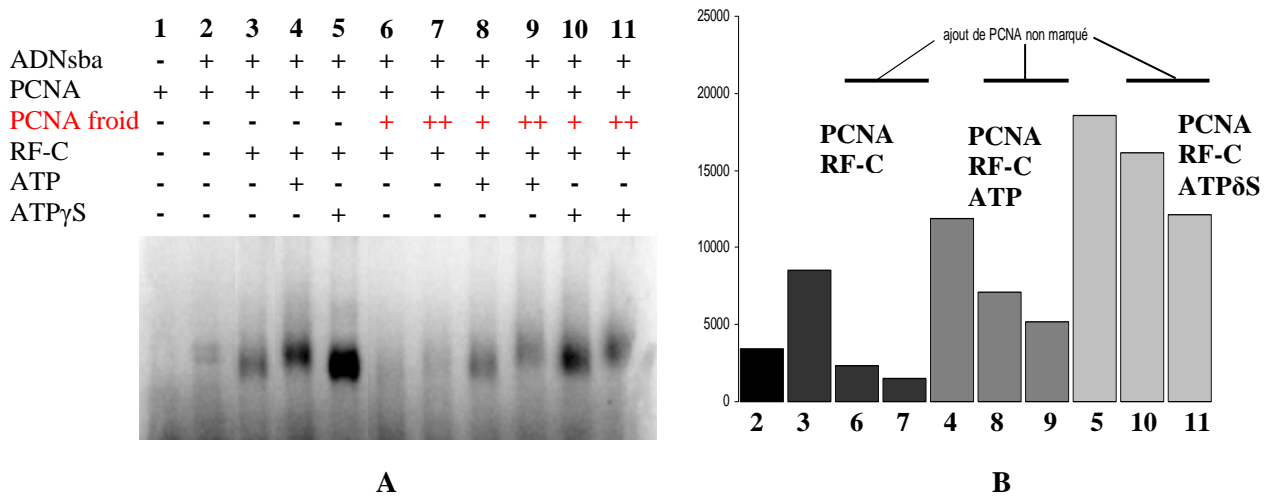


Figure 54. Stabilité du PCNA chargé sur un ADN circulaire simple brin amorcé. Les milieux réactionnels ont été incubés durant 5 minutes

PCNA : 150 ng ; RF-C : 300 ng

Gel d'agarose 0,8% ; Autoradiographie : une nuit à -80°C

150 (+) ou 300 (++) ng de PCNA froid est ajouté au bout de 3 minutes de réaction (puits 6 à 11)

A. gel ; **B.** quantification du signal observé

En absence d'ATP, le PCNA marqué est complètement déplacé par une concentration équimolaire de PCNA froid (figure 54 ; comparer puits 3 et 6) indiquant un chargement peu stable. En présence d'ATP ou d'ATP γ S, le complexe est plus stable.

En présence d'ATP, une réaction de chargement et de déchargement peut s'effectuer avec le PCNA marqué et le PCNA froid. La quantification des bandes montre une diminution de la moitié du signal lorsque le PCNA froid est ajouté en rapport équimolaire (figure 54 ; comparer les puits 4 et 8), et de plus de la moitié lorsqu'il y a plus de PCNA froid que de PCNA chargé (figure 54 ; comparer les puits 4 et 9).

En présence d'ATP γ S, le complexe est plus stable. Le signal observé avec autant de PCNA marqué que de PCNA froid est relativement élevé (figure 54 ; comparer puits 5 et 10) indiquant que les complexes préalablement chargés demeurent stables sur l'ADN. Lorsqu'il y a deux fois plus de PCNA froid que de PCNA marqué, le signal diminue de manière plus significative (figure 54 ; comparer puits 5 et 11). Malgré la stabilité du complexe, favorisée par la fixation de l'ATP, une compétition par une molécule de même affinité a lieu.

I.7. L'ADN polymérase B stimule le chargement du PCNA

Dans le cadre de la réplication de l'ADN, l'étape qui suit le chargement du PCNA est le recrutement d'une ADN polymérase pour effectuer la synthèse du brin complémentaire.

Lorsque l'ADN polymérase B est ajoutée dans la réaction, à une quantité équimolaire au PCNA, le chargement est augmenté de manière significative (figure 55.A ; comparer les puits 2 et 6). Le chargement observé est spécifique car aucun signal n'est observé en présence du PCNA(ded) (figure 55.A ; puits 10). Lorsque le RF-C est présent dans la réaction, le signal est légèrement augmenté, en présence ou en absence d'ATP. L'ADN polymérase ne semble pas avoir d'influence sur le chargement quand le PCNA est en présence de RF-C et d'ATP γ S ; le chargement, dans ce cas, peut-être entièrement dû au RF-C.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| ADNsba | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| PCNA(ded) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| ADN Pol | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| RF-C | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - |
| ATP | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| ATP δ S | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |

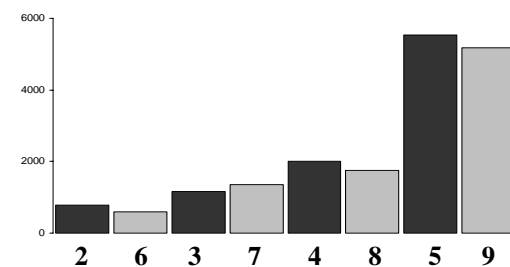
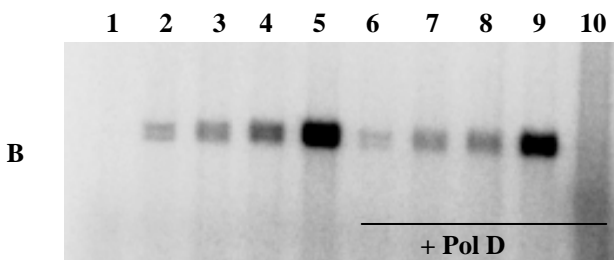
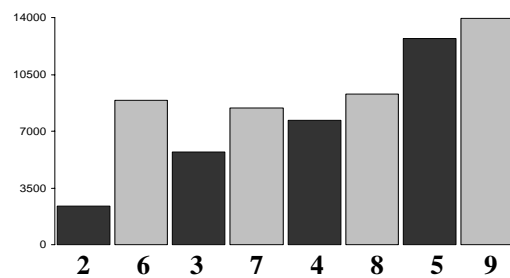
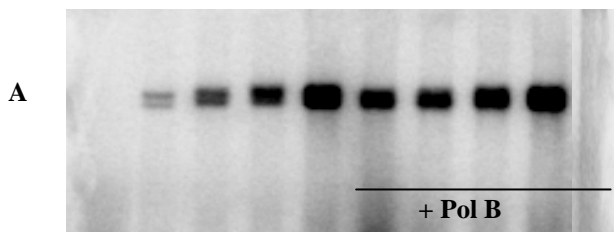


Figure 55. Influence des ADN polymérases sur le chargement du PCNA.

A. influence de l'ADN polymérase B

B. influence de l'ADN polymérase D

Les tableaux de quantification comparent le signal de chargement obtenu en absence (bâtons gris foncés) ou en présence d'ADN polymérase (bâtons gris clairs)

PCNA : 150 ng ; RF-C : 300 ng ; Pol B : 100 ng ; Pol D : 300 ng

Gel d'agarose 0,8%

Contrairement à l'ADN polymérase B, l'ADN polymérase D ne stimule pas le chargement du PCNA (figure 55.B ; puits 6). Les ADN polymérases D et B de *P. abyssi* interagissent physiquement avec le PCNA

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| ADNsb | - | - | + | + | - | - | + |
| ADNsba | - | + | - | - | + | + | - |
| PCNA | + | + | + | + | + | + | + |
| Pol B | - | - | - | + | + | + | + |
| dNTPs | - | - | - | - | - | + | + |

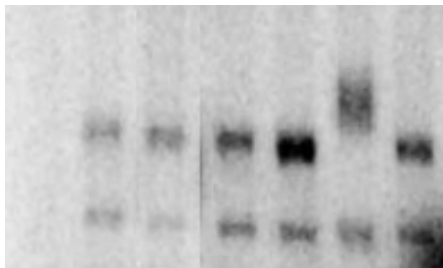
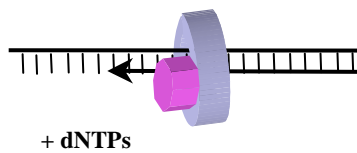


Figure 56. Visualisation d'un complexe PCNA/ADN polymérase B productif.

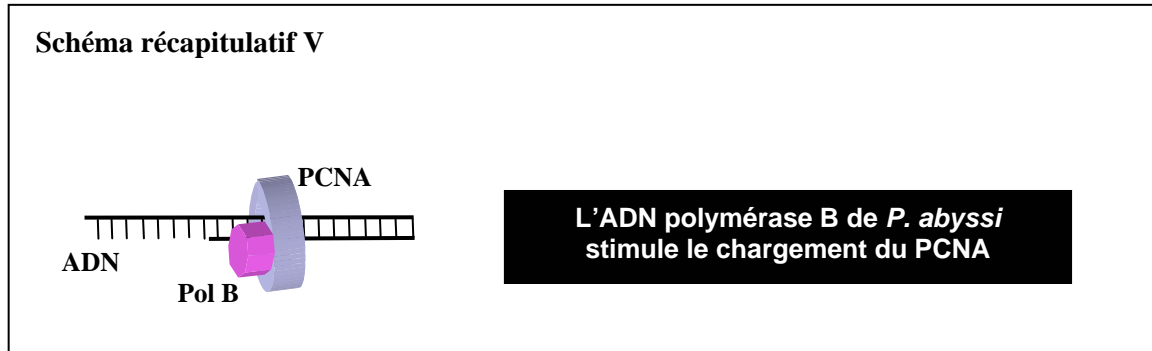
PCNA : 150 ng ; RF-C : 300 ng ; Pol B : 100 ng ; dNTPs 10 mM
Gel d'agarose 1,5%

Schéma récapitulatif VI



Le complexe chargé PCNA /ADN polymérase B de *P. abyssi* est fonctionnel

(Henneke *et al.* 2005) de manière ADN dépendante. Les résultats obtenus ci-dessus montreraient que l'ADN polymérase D interagit avec le PCNA préalablement chargé tandis que l'ADN polymérase B interagit avec le PCNA au niveau de l'ADN tout en favorisant son chargement.



I.8. Visualisation d'un complexe fonctionnel

I.8.1. Elongation de l'amorce par l'ADN polymérase B

Dans le but de s'assurer que le complexe de chargement est fonctionnel, des dNTPs sont ajoutés dans la réaction en présence de l'ADN Polymérase B. Afin d'avoir une résolution plus précise, les produits de réaction sont migrés sur un gel d'agarose plus concentré (1,5% au lieu de 0,8%). Comme abordé précédemment, deux bandes sont observées ; le gel résolutif permet de les séparer efficacement (figure 56). Nous supposons que ces deux bandes correspondent à deux complexes différents obtenus après pontage au glutaraldéhyde.

En présence d'une matrice d'ADN sans amorce, un chargement quasiment équivalent est observé (figure 56 ; comparer les puits 2 et 3). De ce fait, il est difficile de savoir, lorsque l'ADN est amorcé, si le PCNA est chargé au niveau de l'amorce, ou au niveau d'une structure secondaire que peut former l'ADN simple brin.

Lorsque l'ADN amorcé est mis en présence de PCNA, d'ADN polymérase et de dNTPs, une trace (smear), synonyme d'une synthèse d'ADN, est observée au niveau de la bande supérieure (figure 56 ; puits 6). Lorsque la matrice d'ADN n'est pas amorcée (figure 56 ; puits 7), aucune trace relative à une synthèse n'est observée. Le PCNA est donc chargé de manière fonctionnelle au niveau de la jonction amorce-matrice.

Au niveau de la bande inférieure le complexe n'est pas fonctionnel. Dans ce cas, la matrice d'ADN peut-être sous forme plus compacte, ne permettant pas au complexe de se déplacer le long de l'ADN. Le fait que l'ADN polymérase n'augmente pas ou très peu le signal de cette bande peut également s'expliquer par un problème d'accessibilité.

I.8.2. Importance de la nature de l'amorce

Les travaux récents, explorant les propriétés des ADN polymérases de *P. abyssi*, ont montré que l'ADN polymérase D était capable d'effectuer une synthèse à partir d'une amorce ARN (Henneke *et al.* 2005) contrairement à l'ADN polymérase B. L'expérience de chargement a également été effectuée en présence d'une amorce ARN (figure 57) et en présence de l'ADN polymérase B.

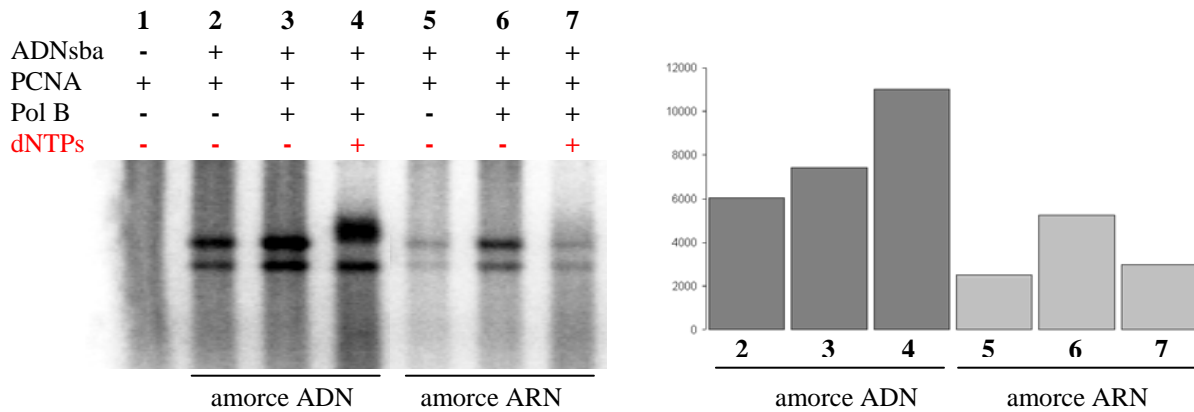


Figure 57. Importance de la nature de l'amorce pour la stabilité du complexe PCNA / Pol B en présence de dNTPs. Chargement du PCNA sur un ADN circulaire simple brin hybridé à une amorce ADN ou ARN

PCNA : 150 ng ; Pol B : 100 ng ; dNTPs 10 mM
Gel d'agarose 1,5%

En présence d'une amorce ARN, le PCNA peut se charger seul, mais plus faiblement qu'en présence d'une amorce ADN (figure 57 ; comparer les puits 2 et 5). La présence de l'ADN polymérase favorise également le chargement du PCNA sur ce type d'amorce (figure 57 ; puits 6). Par contre, après ajout des dNTPs, aucune synthèse n'est observée sur ce substrat. De plus, cela suggère que la stimulation du chargement par l'ADN polymérase B n'est plus présente. L'addition de dNTPs, dans un environnement à ARN, déstabilise le complexe PCNA/ADN polymérase B.

II. Etude de la synthèse d'ADN par les ADN polymérases B et D en présence des facteurs accessoires

Dans le cadre de cette étude, l'ADN du phage M13 amorcé est utilisé comme matrice. Les fragments d'ADN synthétisés sont visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturantes, grâce à l'incorporation de dNTPs radioactifs [α -³²P]dATP (cf matériels et méthodes page 76).

N.B. : La processivité d'une ADN polymérase, dans son sens canonique, est définie par le nombre de nucléotides qu'elle incorpore sans se détacher de la matrice d'ADN (Kelman et al. 1998). Les expériences suivantes ne donnent des informations que sur la quantité d'ADN synthétisée ainsi que la taille des fragments produits. Lorsque le terme de processivité est employé ici, il se réfère aux connaissances acquises concernant l'effet du PCNA sur les ADN polymérases.

II.1. Temps d'incubation en présence de l'ADN polymérase B :

Le but de cette expérience est de déterminer un temps d'incubation, afin d'observer les fragments synthétisés. Sur matrice circulaire, aucun signal n'est observé pour une incubation inférieure à 2 minutes, tandis que sur matrice linéaire (voir préparation de l'ADN linéaire page 69), un signal fort, correspondant à la synthèse du brin complet, est observé au bout de 30 secondes (figure 58).

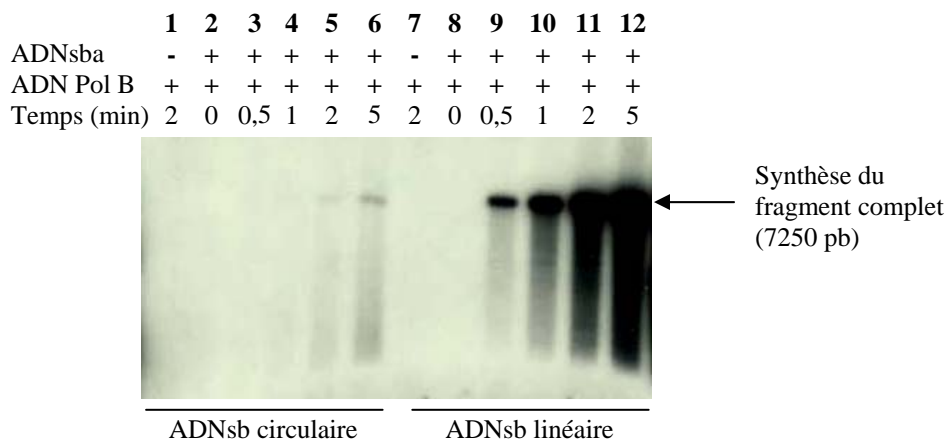


Figure 58. Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B sur 125 ng d'ADN simple brin amorcé circulaire ou linéaire. Variation du temps d'incubation

Pol B : 100 ng

Gel d'agarose dénaturant 1,2%

Ceci peut s'expliquer par la forme plus compacte qu'adopte la matrice circulaire en favorisant la formation de structures secondaires. En effet, l'utilisation de temps d'incubation plus long, sur la matrice M13 circulaire amorcée, montre la présence de pauses (pausing), en début de synthèse et vers 500 bases (figure 59 ; puits 3 à 5).

La synthèse sur matrice circulaire semble ne pas être plus efficace pour des temps d'incubation supérieurs à 20 minutes (figure 59 puits 3 à 5). Nous avons donc utilisé un temps d'incubation de 20 minutes pour la suite des expérimentations sur de l'ADN circulaire.

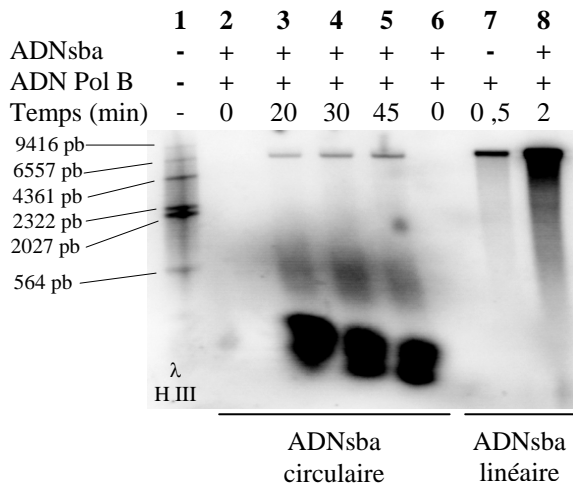


Figure 59. Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B sur 125 ng d'ADN simple brin amorcé (ADNsba) circulaire ou linéaire, à différents temps d'incubation

Pol B : 100 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

1 : Marqueur de taille : phage Lambda digéré par *Hind* III et marqué par des [α -³²P]ATP incorporés aux fragments de Klenow

II.2. Le PCNA : facteur de processivité pour l'ADN polymérase B

L'ADN polymérase B a été incubée, en présence de PCNA, pendant deux minutes en présence d'ADN linéaire ou vingt minutes en présence d'ADN circulaire. Sur le brin linéaire, le PCNA sauvage ne stimule pas la synthèse, tandis que sur brin circulaire, celui-ci augmente considérablement la processivité de l'ADN polymérase.

Le PCNA phosphorylable sauvage, utilisé dans les expériences de chargement, stimule également la synthèse sur brin circulaire (figure 60), contrairement au PCNA(ded) phosphorylable (figure 60). Cela confirme le chargement d'un complexe productif au niveau de la zone double brin de la matrice, comme il a été évoqué précédemment.

Le PCNA de *Pyrococcus abyssi* est donc capable de stimuler la synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B sur brin circulaire, en absence du facteur de chargement.

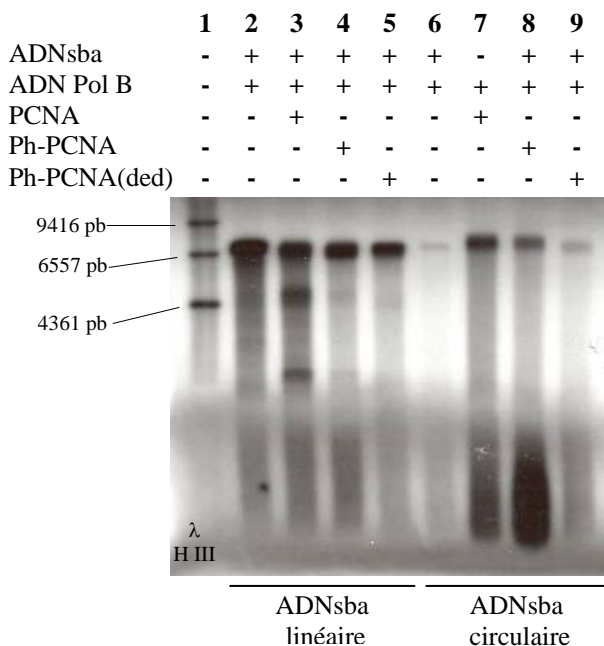


Figure 60. Synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B sur 125 ng d'ADN simple brin amorcé circulaire ou linéaire en présence du PCNA sauvage ou mutant. Les PCNA phosphorylables utilisés en expérience de chargement sont notés Ph-PCNA et sont utilisés sous leur forme non marquée.

Pol B : 100 ng ; PCNA : 200 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

1 : Marqueur de taille : phage Lambda digéré par *Hind* III et marqué par des [α -³²P]ATP incorporés aux fragments de Klenow

II.3. Le RF-C déstabilise le complexe PCNA/ADN polymérase B :

Chez les eucaryotes et les bactéries, les études de synthèse d'ADN, en présence des facteurs accessoires de la réplication, ont montré que le RF-C était nécessaire au complexe pour obtenir une synthèse d'ADN. Chez l'archée *Pyrococcus furiosus*, il est également montré que le RF-C stimule la synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B en présence de PCNA, même si le PCNA seul est suffisant pour la stimuler dans une moindre mesure (Ishino *et al.* 2003).

Nous avons montré précédemment que le PCNA de *Pyrococcus abyssi* peut se charger seul sur de l'ADN amorcée, de manière productive, en favorisant une synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B.

Lorsque le RF-C est présent dans la réaction, la synthèse d'ADN de l'ADN polymérase B, stimulée par le PCNA, est largement inhibée (figure 61 ; comparer le puits 10 aux puits 7 à 9). Aucun signal correspondant à la synthèse du brin total n'est observé. Cette inhibition est moins marquée en présence d'ATP (figure 61 ; puits 8). Ce résultat surprenant est en accord avec la visualisation du complexe productif dans les expériences de chargement, montrant que l'ajout du RF-C semble inhiber la synthèse d'ADN

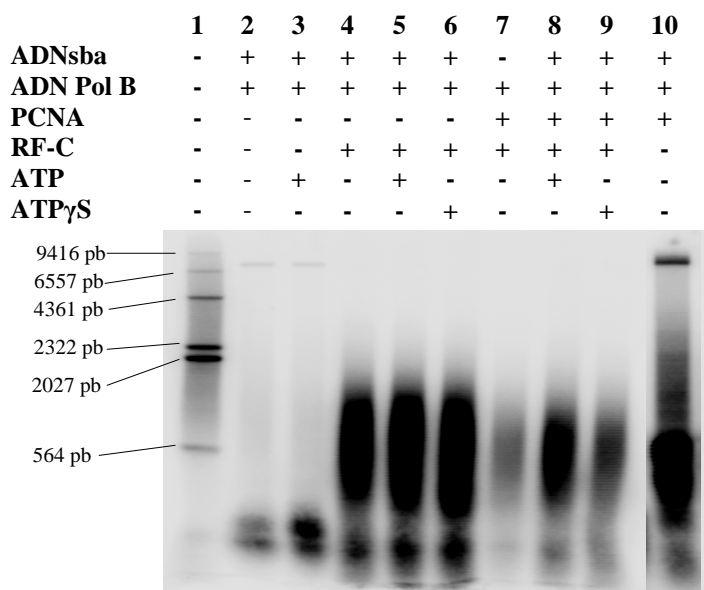


Figure 61. Influence du RF-C sur la synthèse effectuée par l'ADN polymérase B sur ADN circulaire amorcé

Pol B : 100 ng ; RF-C : 400 ng ;
PCNA : 200 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

1 : Marqueur de taille : phage Lambda digéré par *Hind* III et marqué par des [α -³²P]ATP incorporés aux fragments de Klenow

Il est à noter que le RF-C seul est capable de stimuler fortement la synthèse de fragments inférieurs à 2000 bases (figure 61 ; puits 4 à 6).

Si une quantité croissante de RF-C est ajoutée en présence de l'ADN polymérase B (figure 62), la synthèse de fragments inférieurs à 2000 bases est augmentée. Cette stimulation, indépendante de l'ATP, suggère une action non spécifique du RF-C, comme la stabilisation de l'ADN simple brin évoquée chez l'eucaryote (Keller *et al.* 1999).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------|---|---|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ADNsba | - | - | + | + | + | + | - | + | + |
| ADN Pol B | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RF-C (ng) | 0 | 0 | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 300 | 400 |

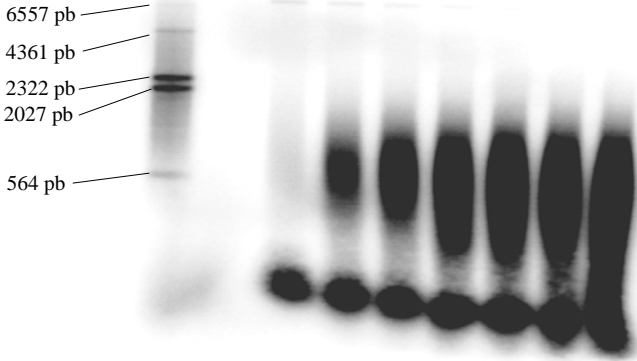


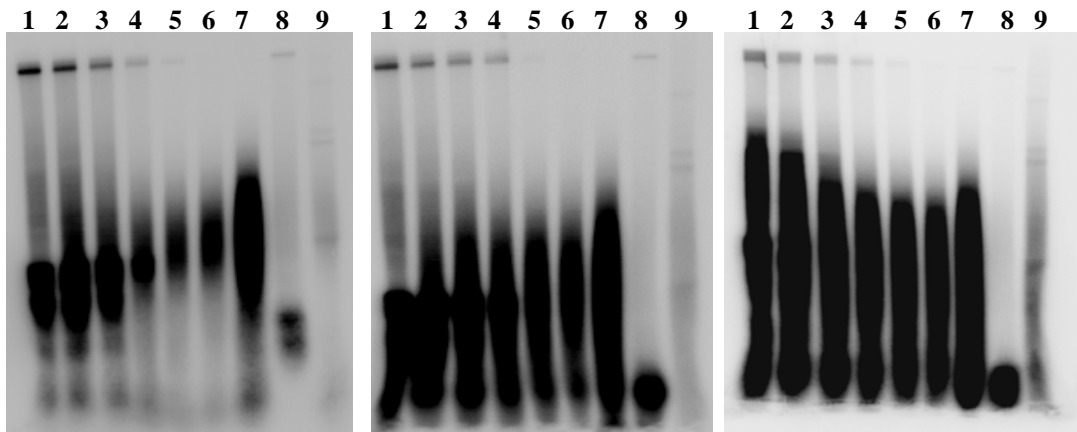
Figure 62. Influence de la quantité de RF-C sur la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B en absence d'ATP.

Pol B : 100 ng ; PCNA : 200 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

1 : Marqueur de taille : phage Lambda digéré par *Hind* III et marqué par des [α - 32 P]ATP incorporés aux fragments de Klenow

Dans les expérimentations décrites précédemment, les protéines ont été ajoutées de manière séquentielle dans la réaction en conformité avec le modèle suivant : (i) reconnaissance de la jonction amorce par le RF-C, (ii) chargement du PCNA et (iii) recrutement d'une ADN polymérase pour effectuer la synthèse du brin complémentaire. Dans les expériences qui suivent, le RF-C a été ajouté en cours de réaction, c'est à dire après l'ADN le PCNA (figure 63).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------|---|---|----|----|----|----|----|---|---|
| ADNsba | - | + | + | + | + | + | - | + | - |
| ADN Pol B | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCNA | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| RF-C (min) | - | 5 | 10 | 15 | 18 | 20 | 20 | - | - |



A : sans ATP

B : avec ATP

C : avec ATP γ S

Figure 63. Effet du RF-C sur la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B, en présence du PCNA, sur matrice circulaire simple brin amorcé.

Le RF-C est ajouté en cours de réaction. L'incubation totale est de 20 minutes ; le RF-C est présent dans la réaction entre 5 et 20 minutes avec le PCNA (puits de 2 à 6).

Pol B : 100 ng ; PCNA : 200 ng ; Gel d'agarose dénaturant 1,2%

Le RF-C s'avère avoir très rapidement un effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase B.

Il est intéressant de noter que les pauses observées en début de synthèse, en présence du PCNA (figure 63 ; puits 1) disparaissent en fonction du temps de présence du RF-C dans la réaction.

II.4. Le RF-C n'a pas d'influence sur l'activité du complexe PCNA/ADN polymérase D :

Le PCNA confère également une forte processivité à l'ADN polymérase D. Le RF-C seul stimule faiblement sa synthèse. Cette stimulation se fait principalement, comme pour l'ADN polymérase B, pour des fragments inférieurs à 2000 bases. Cependant, la synthèse du fragment complet peut être observée à faible intensité (figure 64).

Contrairement à ce qui est observé pour l'ADN polymérase B, le RF-C n'inhibe pas la synthèse en présence de PCNA, avec ou sans ATP. Les pauses importantes observées vers 500 bases avec le PCNA seul sont également retrouvées ici, en présence de RF-C.

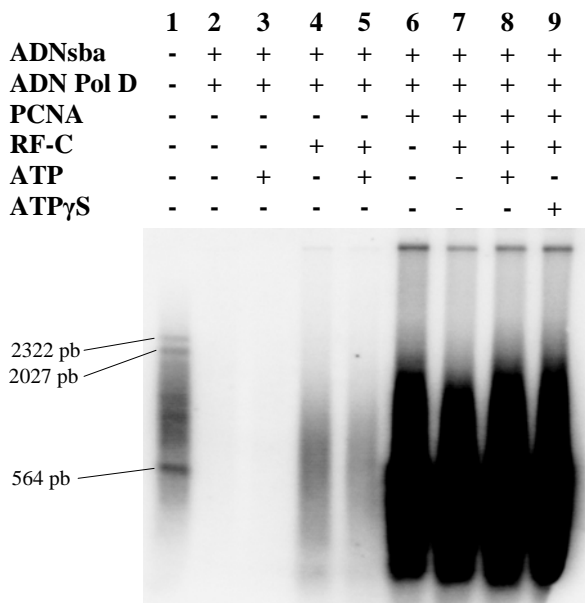


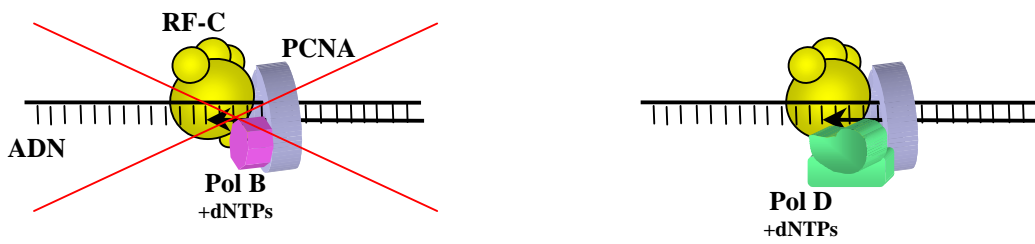
Figure 64. Synthèse d'ADN par la polymérase D sur ADN circulaire simple brin amorcé

Pol D : 500 ng ; RF-C : 400 ng ; PCNA : 200 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

1 : Marqueur de taille : phage Lambda digéré par *Hind* III et marqué par des [α -³²P]ATP incorporés aux fragments de Klenow

Cette expérience montre que l'hypothèse d'une interaction non spécifique du RF-C au niveau de l'ADN, évoquée lors de l'étude avec l'ADN polymérase B, n'est pas confirmée lors de l'étude avec l'ADN polymérase D. Le RF-C montre donc un « comportement » différent selon l'ADN polymérase recrutée sur le PCNA.

Schéma récapitulatif VII



Le complexe RF-C/PCNA/Pol B n'est pas processif lors de la synthèse d'ADN contrairement au complexe RF-C/PCNA/Pol D

III. Importance des motifs d'interaction avec le PCNA

La majorité des protéines interagissant avec le PCNA possèdent un motif PIP-Box (Warbrick 1998). Dans le cas des protéines étudiées ici, il se trouve aux extrémités C-terminales de l'ADN polymérase B et des grandes sous-unités du RF-C et de l'ADN polymérase D (annexe 3). En comparant les séquences des motifs PIP-box de ces trois protéines, il apparaît que celles du RF-C et de l'ADN polymérase B sont plus apparentées au motif consensus décrit (Warbrick 2000) que celui de l'ADN polymérase D, surtout si l'on considère que la glutamine est un acide aminé important.

| | |
|--------------------|-----------------------|
| PIP-Box | Qxx(h)xx(a)(a) |
| RF-C large | QVTLDFFI |
| Pol B | QVGLGAWLKF |
| Pol D large | VISLEEFF |

L'ADN polymérase B et le RF-C peuvent entrer en compétition au niveau du même site de fixation sur le PCNA et cette compétition peut se faire par le biais de leur motif PIP-Box, comme cela a été décrit entre la protéine p21 et l'ADN polymérase Pol δ (Podust *et al.* 1995b). Une telle compétition n'a pas lieu avec l'ADN polymérase D.

Suivant les résultats présentés dans le paragraphe précédent, deux hypothèses sont possibles pour expliquer que le RF-C inhibe la synthèse effectuée par l'ADN polymérase B et pas celle effectuée par l'ADN polymérase D : (i) le motif PIP-Box décrit pour l'ADN polymérase D présente une affinité plus forte avec le PCNA que la PIP-Box du RF-C ou (ii) l'ADN polymérase D peut se fixer au PCNA par le biais d'un autre motif permettant la fixation du RF-C sans induire de compétition pouvant inhiber la synthèse d'ADN.

Afin d'estimer l'importance du motif PIP-Box putatif des deux ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi*, des protéines mutantes ont été produites. Elles sont tronquées en C-Terminal, respectivement avant la glutamine pour la polymérase B et avant la valine pour la grande sous-unité de la polymérase D (cf. matériels et méthodes ; protéines recombinantes I.2.). Ces ADN polymérases tronquées de leur motif PIP-Box sont appelées ADN polymérases Δ PIP.

IV. Les ADN polymérases Δ PIP

IV.1. La synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B Δ PIP n'est plus stimulée par le PCNA

Nous avons tout d'abord vérifié, par des expérimentations en SPR sur Biacore, que les ADN polymérases sauvages et Δ PIP reconnaissent un ADN amorcé.

La synthèse d'ADN est effectuée sur la matrice M13 circulaire simple brin amorcée utilisée précédemment.

La synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B Δ PIP n'est plus stimulée par le PCNA (figure 65.A), montrant l'importance de ce motif dans l'acquisition de la processivité. L'ADN polymérase D Δ PIP, par contre, est toujours stimulée (figure 65.B), montrant que sa PIP-Box putative n'est pas un motif essentiel pour lui conférer une processivité en présence du PCNA.

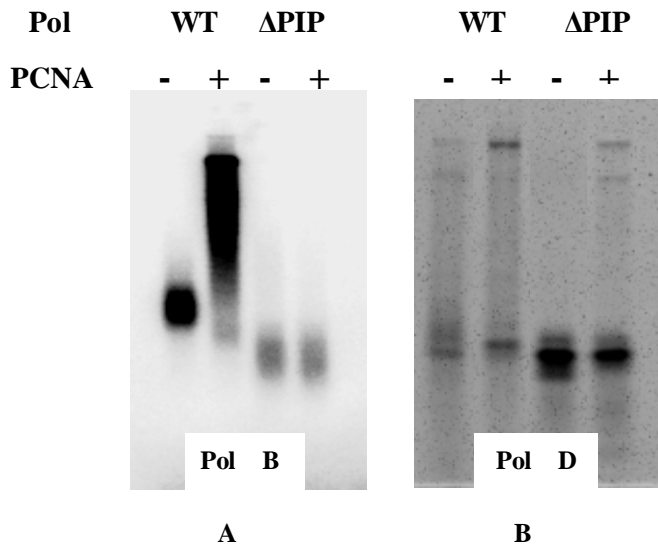


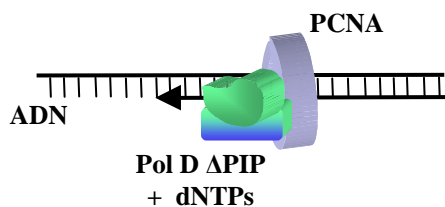
Figure 65. Synthèse d'ADN par les ADN polymérases B et D sauvages (wt) et Δ PIP sur un ADN M13 circulaire amorcé, en présence du PCNA.

A. avec l'ADN polymérase B
Incorporation de dATP marqué radioactivement

B. avec l'ADN polymérase D
Extension d'amorce marquée à la fluorescence

Pol B : 100 ng ; Pol D : 500 ng ;
PCNA : 200 ng
Gel d'agarose dénaturant 1,2%

Schéma récapitulatif VIII



La synthèse par l'ADN polymérase D mutante Δ PIP est toujours stimulée par le PCNA, contrairement à celle de l'ADN polymérase B mutante Δ PIP.

IV.2. L'ADN polymérase D Δ PIP interagit physiquement avec le PCNA

De récents travaux effectués au laboratoire ont montré que les ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* interagissent physiquement avec le PCNA de manière ADN-dépendante (Henneke *et al.* 2005).

Les interactions, entre le PCNA et les ADN polymérase, sauvages et Δ PIP, ont été testées sur un ADN amorcé, par la technique de résonance plasmonique de surface (cf. matériels et méthodes ; méthodes de biochimie fonctionnelle et interactions III.2.). L'ADN polymérase D sauvage interagit avec le PCNA (figure 66 ; courbe 1) mais également l'ADN polymérase D Δ PIP (figure 66 ; courbe 2). L'ADN polymérase B sauvage interagit avec le PCNA (figure 66 ; courbe 3) tandis que l'ADN polymérase B Δ PIP ne montre aucune interaction (figure 66 ; courbe 4).

Cette expérience montre clairement qu'il y a des interactions physiques conservées entre le PCNA et l'ADN polymérase D Δ PIP.

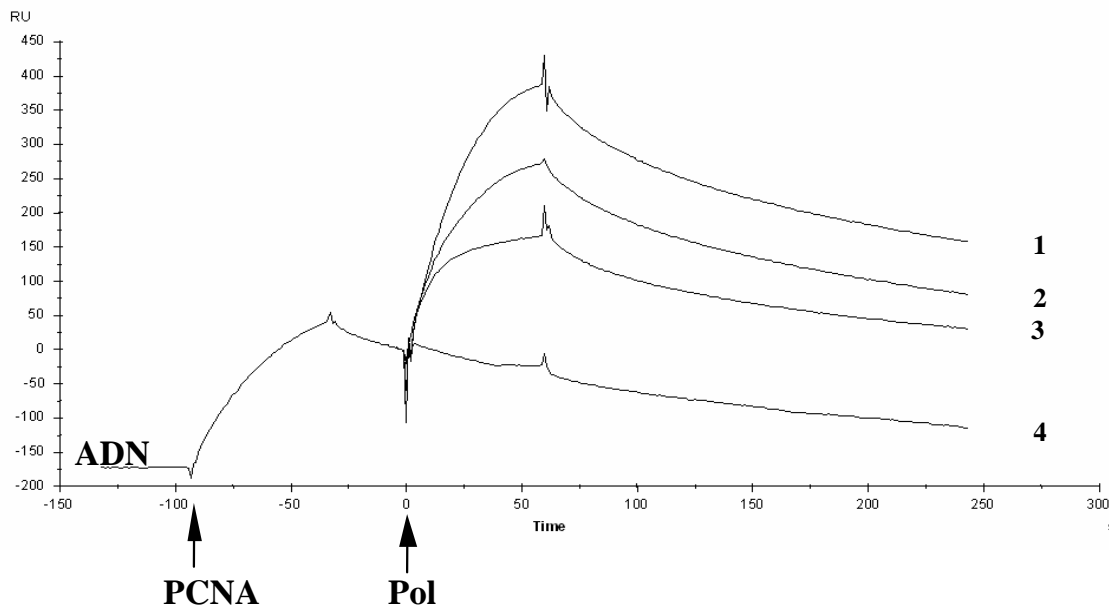


Figure 66. Interaction des ADN polymérase Δ PIP avec le PCNA sur ADN amorcé par la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore 2000).

Le PCNA est injecté au temps 0 sur une matrice d'ADN amorcée ; une courbe d'interaction correspondant au chargement spontané est observée. A 75 secondes, les ADN polymérase sont injectées.

1. ADN polymérase D sauvage ; **2.** ADN polymérase D Δ PIP ; **3.** ADN polymérase B sauvage ; **4.** ADN polymérase B Δ PIP.

Cette étude montre l'importance d'un motif unique de type PIP-Box pour l'interaction entre l'ADN polymérase B et le PCNA. Cette interaction permet à l'ADN polymérase B d'acquies une forte processivité en présence du PCNA lors de la synthèse d'ADN. Nos études suggèrent également que ce motif favorise le chargement du PCNA sur l'ADN.

L'ADN polymérase D présente au moins deux domaines pouvant interagir avec le PCNA. Le fait d'enlever le motif PIP-Box, diminue l'interaction avec le PCNA mais celle-ci demeure présente. Au niveau fonctionnel, l'absence de ce motif altère peu la synthèse.

IV.3. Le chargement spontané du PCNA est aboli en présence de l'ADN polymérase B Δ PIP

Nous avons montré, par la méthode de pontage au glutaraldéhyde, que l'ADN polymérase B stimule considérablement le chargement du PCNA. Avec la même technique, nous observons non seulement, que l'ADN polymérase B Δ PIP ne stimule pas le chargement, mais aussi que le signal correspondant au chargement du PCNA seul est totalement aboli (figure 67.A). Le motif PIP-Box est donc essentiel pour stabiliser le complexe PCNA/ADN polymérase B au niveau de l'ADN. Lorsque ce motif est absent, l'ADN polymérase B n'interagit plus avec le PCNA et semble avoir une affinité plus forte pour l'ADN que le PCNA.

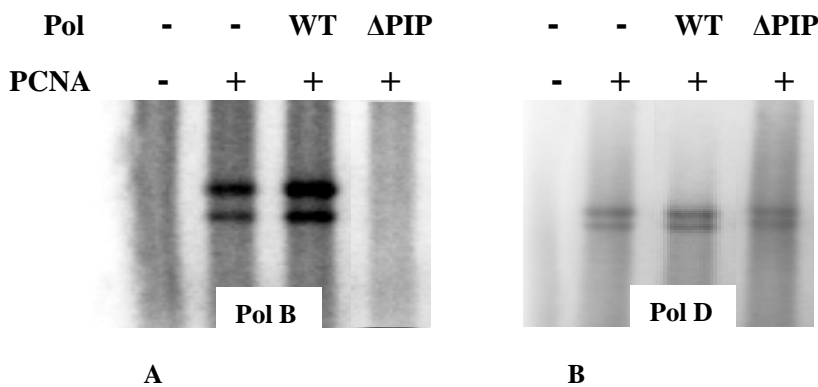


Figure 67. Influence des ADN polymérases sauvages (wt) et Δ PIP sur le chargement du PCNA.

A. l'ADN polymérase B

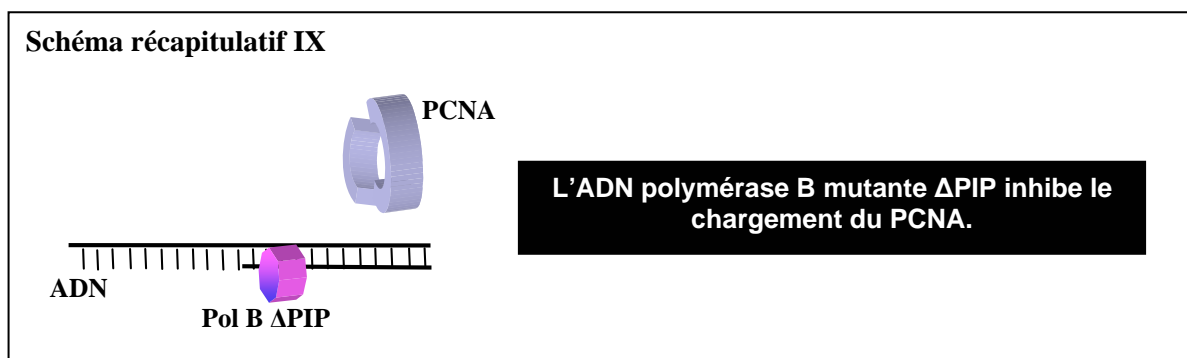
B. l'ADN polymérase D

PCNA : 150 ng ; Pol B : 100 ng ;

Pol D : 300 ng

Gel d'agarose 1%

Si la même expérience est effectuée avec l'ADN polymérase D Δ PIP, le chargement du PCNA est toujours observé (figure 67.B). Ce chargement est équivalent à celui du PCNA seul ou en présence de l'ADN polymérase D sauvage.



V. Visualisation par pull-down des complexes au niveau d'un ADN simple brin amorcé :

Une matrice d'ADN, composée d'un fragment de 75 bases hybridé à un fragment de 48 bases, a été fixée sur des billes magnétiques streptavidinées. Cet ADN a été doublement biotinylé (en 3' et en 5') afin de créer, au niveau des interactions, un substrat analogue à une matrice circulaire.

L'avantage de cette technique, en comparaison avec la méthode de pontage au glutaraldéhyde utilisée dans l'étude du chargement du PCNA, est la possibilité d'effectuer des lavages. La révélation se faisant par anticorps, il est possible, suivant le choix des anticorps, de visualiser les différentes protéines présentes sur l'ADN simple brin amorcé.

V.1. Affinité du PCNA pour l'ADN et influence de la température

V.1.1. Affinité :

Le chargement du PCNA a été visualisé sur une matrice d'ADN simple brin, ainsi que sur la matrice d'ADN simple brin amorcée. Un chargement est observé sur les deux matrices mais celui-ci est beaucoup plus important lorsqu'il y a une zone double brin (figure 68).

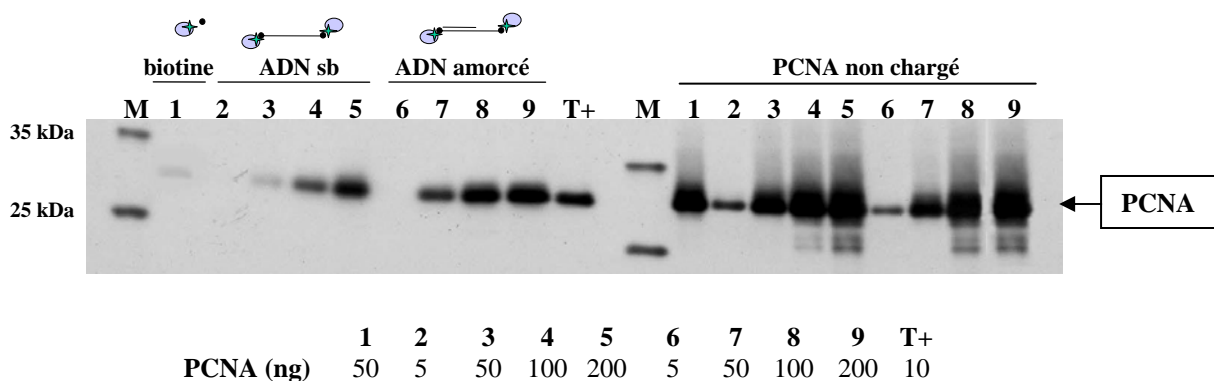
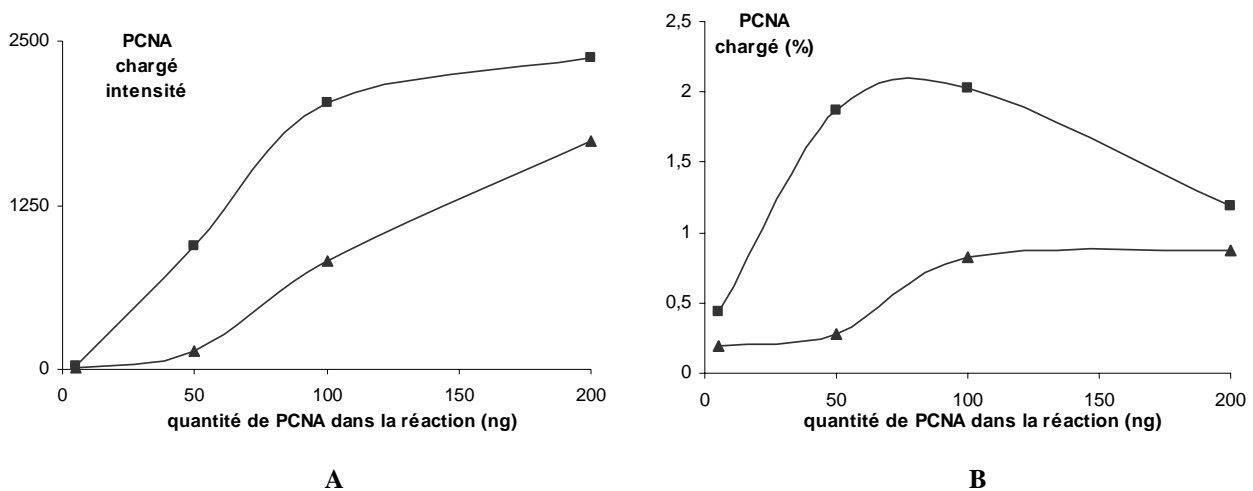


Figure 68. Interaction du PCNAwt sur ADN simple brin et ADN amorcé. Révélation par Western Blot.

M. marqueur de taille ; **1.** Témoin négatif : 50 ng de PCNA sur billes équilibrées à la biotine ; **T+.** Témoin positif : 10 ng de PCNA ; **PCNA non chargé.** Migration de la moitié du mélange réactionnel avant lavage. Après incubation du milieu réactionnel, les tubes sont placés sur un portoir aimanté. Les billes portant l'ADN et les protéines fixées sont retenues sur la paroi pendant que le mélange réactionnel est retiré.

Le signal observé sur l'ADN amorcé est croissant en fonction de la quantité de PCNA présent dans la réaction, jusqu'à 100 ng, après quoi il semble se stabiliser (figure 69.A). Cependant, comme observé dans les puits correspondant au PCNA non chargé, la plus grande quantité de PCNA n'est pas fixée.



L'approche quantitative, lorsque le signal est retranscrit en pourcentage, permet de voir que très peu de PCNA est chargé. Moins de 1% du PCNA présent dans la réaction est chargé sur l'ADN simple brin tandis que le chargement sur ADN amorcé atteint les 2% (figure 69.B). Le maximum, sur l'ADN amorcé, est obtenu lorsque la quantité de PCNA dans la réaction est comprise entre 50 et 100 ng. La quantité de PCNA choisie pour les expérimentations suivantes est de 50 ng.

En considérant qu'à chaque bille, dans le milieu réactionnel, est fixée une molécule d'ADN, 4 pmol d'ADN sont présents dans la réaction (cf. matériels et méthodes ; méthodes de biochimie fonctionnelle III.1.3.). D'après la quantification du signal, obtenu avec 50 ng de PCNA dans le milieu réactionnel, et en comparaison avec le témoin positif, 1 ng de PCNA est fixé sur l'ADN simple brin amorcé, ce qui représente 11 fmol. Il y a donc une molécule de PCNA fixée pour environ 400 molécules d'ADN disponibles. L'estimation de ce rapport quantitatif peut cependant être critiquable car elle ne tient pas compte des problèmes d'accessibilité liés aux conformations que l'ADN peut adopter.

V.1.2. Influence de la température :

Le chargement du PCNA a été visualisé à 37 et de 65°C. L'ajout d'un compétiteur non biotinylé dans le mélange réactionnel permet de s'assurer de la spécificité du chargement (figure 70). Celui-ci est ajouté en concentration équivalente à l'ADN fixé sur les billes. Après lavage, une partie du PCNA fixée sur le compétiteur est éliminée.

Le chargement est beaucoup plus efficace à 65°C (figure 70). L'ajout du compétiteur non fixé aux billes diminue largement le signal obtenu, confirmant la fixation du PCNA sur la matrice d'ADN.

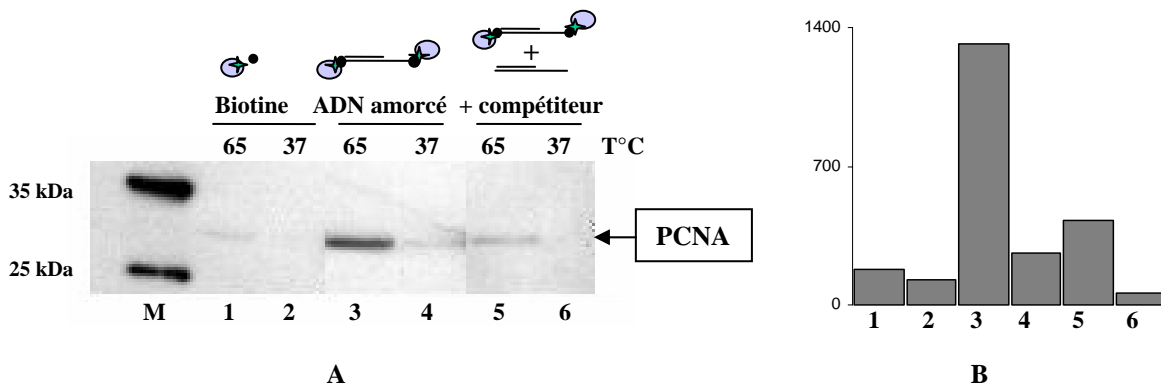


Figure 70. Spécificité du chargement et influence de la température.
A. visualisation du PCNA chargé sur hétéroduplex. **B.** quantification du signal
 PCNA : 50 ng

V.2.Le complexe RF-C/PCNA

V.2.1. Devenir du RF-C après chargement :

Les expériences de chargement du PCNA, par pontage au glutaraldéhyde, nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une réaction de chargement/déchargement du PCNA par le RF-C en présence d'ATP. Cependant, en proposant cette réaction dynamique, une question restait en suspend : l'interaction entre le RF-C et le PCNA est-elle permanente ou non ? (cf. résultat ; I.5.)

L'expérience, présentée ici, montre qu'en présence d'ATP ou d'ATPγS, le RF-C augmente considérablement la quantité de PCNA fixé (figure 71 ; puits 5 et 6), confirmant l'importance de ce facteur dans le chargement du PCNA de *Pyrococcus abyssi*. Il permet de charger environ 20% du PCNA contenu dans la réaction, ce qui représente dix fois plus que le chargement spontané. Le rapport molaire, entre PCNA fixé et ADN disponible, est dans ce cas de 1 pour 40.

L'observation du signal correspondant au RF-C fixé au niveau de l'ADN simple brin amorcé indique que celui-ci est présent au niveau du complexe en présence d'ATPγS (figure 71 ; puits 5). Lorsqu'il y a hydrolyse de l'ATP, le facteur de chargement n'est que très faiblement observé, supposant que ce dernier se dissocie du PCNA chargé (figure 71 ; puits 6).

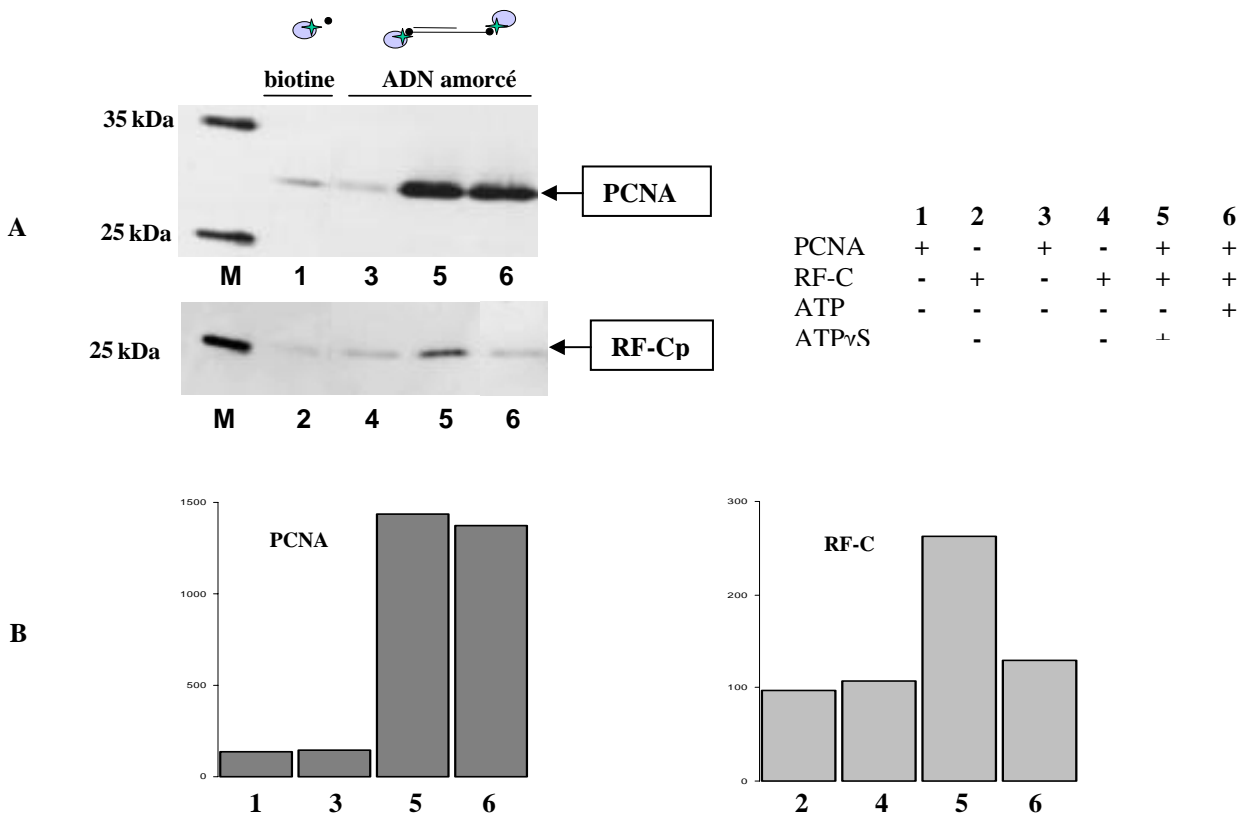
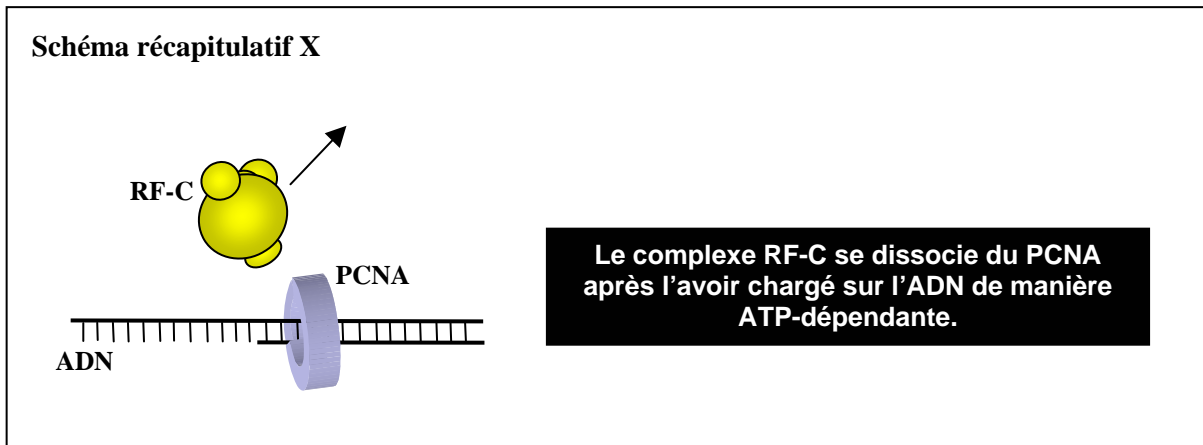


Figure 71. Etude du complexe RF-C PCNA en présence de fixation d'ATP ou de fixation puis hydrolyse au niveau de l'hétéroduplex.

PCNA : 50 ng ; RF-C : 100 ng

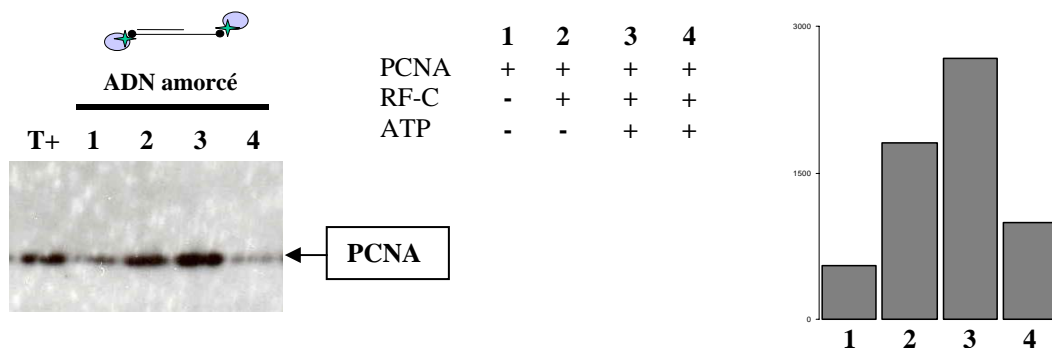


V.2.2. Formation d'un complexe ADN-indépendant :

Des études ont particulièrement portées sur la reconnaissance par le RF-C de la région amorcée (Yao *et al.* 2000; Ason *et al.* 2003; Ellison et Stillman 2003; Lavrik *et al.* 2003). Au niveau des eucaryotes, celui-ci déplace la primase et se fixe au niveau de la région 5' de l'amorce avant le recrutement du PCNA (Maga *et al.* 2000).

Afin de voir si ce processus est conservé avec les facteurs accessoires de *Pyrococcus abyssi*, le chargement est effectué en opérant un lavage avant l'ajout du PCNA dans le milieu réactionnel (figure 72 ; puits 4). Le PCNA est ajouté en présence d'ATP afin de conserver dans la réaction la même concentration d'ATP que dans le témoin sans lavage.

La révélation du PCNA dans ce contexte montre un chargement très faible correspondant au chargement spontané. L'effet stimulateur du RF-C n'est pas retrouvé, présumant que celui-ci ne se fixe pas sur la région amorcée avant le recrutement du PCNA. Afin qu'il y ai chargement du facteur de processivité, le RF-C et le PCNA doivent être présents ensemble pour interagir avec l'ADN amorcé.



La technique de résonance plasmonique de surface permet de détecter les interactions protéine-ADN ou protéine-protéine, en fixant l'ADN ou une protéine sur une puce. Le PCNA de *Pyrococcus abyssi* a été fixé sur la puce par le biais d'une étiquette histidine, puis une solution contenant du RF-C et de l'ATP est injectée sur celle-ci. Le RF-C interagit fortement avec le PCNA (figure 73) montrant que l'interaction RF-C/PCNA n'est pas dépendante de l'ADN.

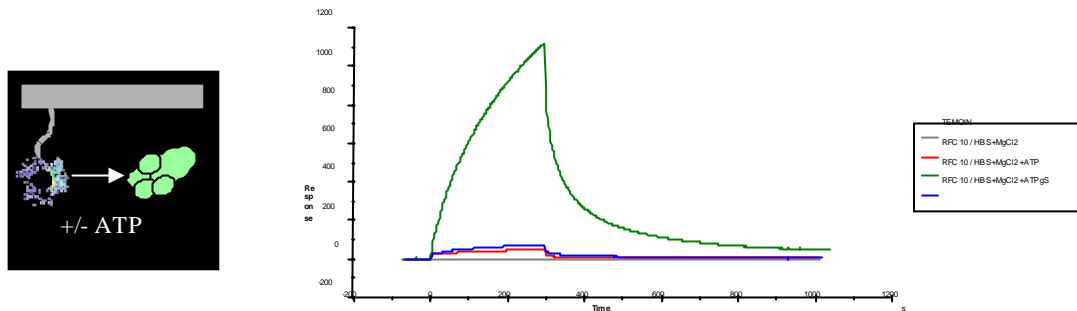
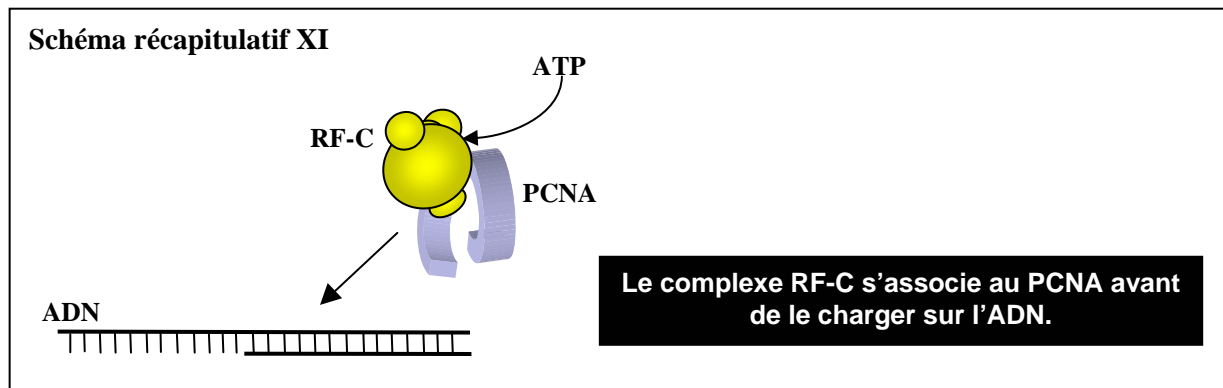


Figure 73. Interaction du RF-C avec le PCNA fixé sur une puce par la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore 2000) ; d'après Didier Flament.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent l'hypothèse d'une reconnaissance de l'amorce par le complexe RF-C/PCNA et non par le RF-C qui recruterait le PCNA par la suite.

Ce résultat peut être confirmé par pull-down, en absence d'ADN. Dans ce cas, le PCNA portant une étiquette histidine est immobilisé sur les billes magnétiques (utilisation des billes Dynabeads® Talon™ de Invitrogen)



V.3. Présence des ADN polymérases au niveau de l'ADN simple brin amorcé

Après chargement du PCNA, une ADN polymérase répliquative est recrutée. L'interaction des ADN polymérases, au niveau de l'ADN simple brin amorcé, en présence des facteurs accessoires, a été étudiée (figure 74).

V.3.1. Reconnaissance de l'amorce et recrutement sur le PCNA :

Les deux ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi* interagissent avec l'ADN simple amorcé (figure 74 et 75 ; réactions 7 et 8), synonyme d'une reconnaissance de la région 3'-OH de l'amorce.

Le PCNA interagit également de manière spontanée avec la matrice (figure 74-75 réactions 6) et l'ADN polymérase B stimule cette interaction (figure 74 et 75 réaction 10), ce qui confirme les précédents résultats. De plus, l'augmentation du chargement en présence de l'ADN polymérase B s'accompagne d'un fort recrutement de cette dernière (figure 74 et 75 comparer les puits 7 et 10).

L'ADN polymérase D ne stimule pas le chargement du PCNA et n'est pas plus recrutée au niveau de la matrice en présence de PCNA (figure 74-75 comparer les puits 8 et 11).

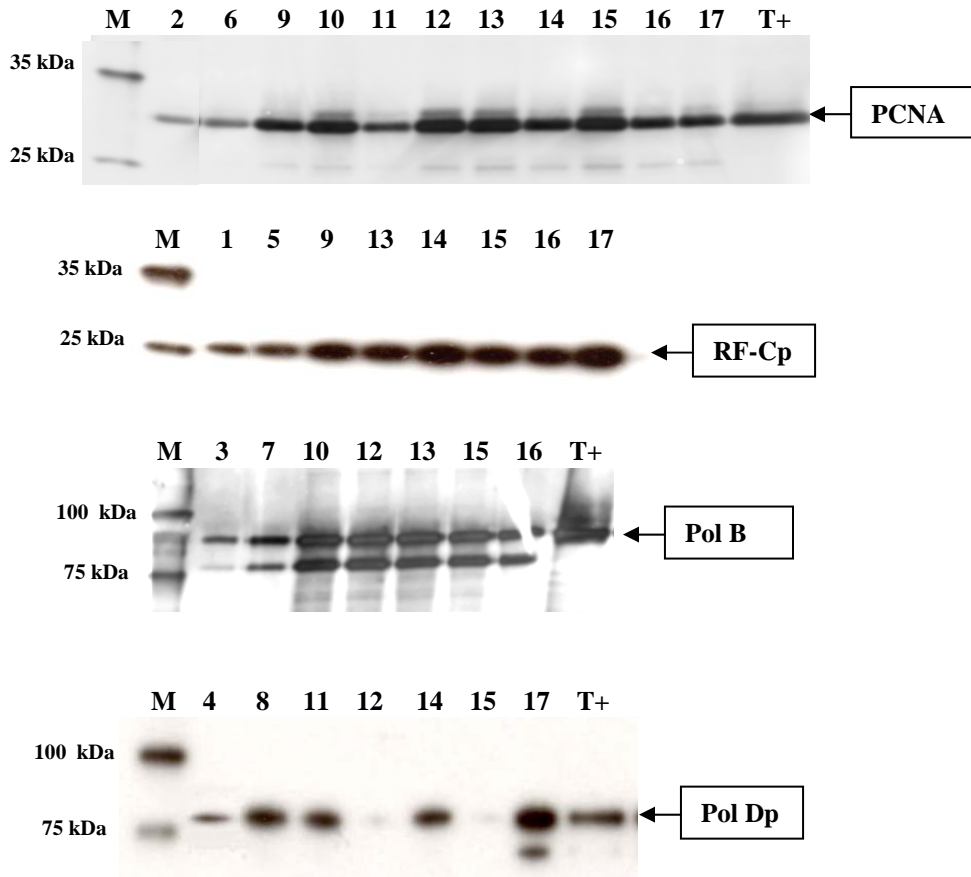
En présence de RF-C, il est surprenant de constater que la quantité d'ADN polymérase B n'est pas diminuée de manière significative. Les résultats précédents supposaient une compétition, entre le RF-C et l'ADN polymérase B, au niveau des sites de fixation sur le PCNA. Les résultats montrent ici que ces trois protéines sont présentes au niveau de la matrice, suggérant que la formation d'un complexe RF-C/PCNA/ADN polymérase B soit possible. Celui-ci s'avère toutefois non productif d'après les résultats de synthèse d'ADN obtenus.

V.3.2. Déplacement de l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B :

Lorsque les deux ADN polymérases sont présentes dans le milieu réactionnel, seule l'ADN polymérase B demeure au niveau du complexe (figure 74 et 75 ; comparer les puits 12 et 15). Le résultat obtenu est le même suivant l'ordre dans lequel sont ajoutées les ADN polymérases dans la réaction. Ce déplacement est également observé en présence du RF-C.

Malgré la possibilité pour l'ADN polymérase D d'interagir avec le PCNA par un autre motif que la PIP-Box putative décrite, celle-ci est déplacée par l'ADN polymérase B, qui n'a que ce motif pour interagir avec le PCNA.

Cette observation sous-entend que l'ADN polymérase B a plus d'affinité que l'ADN polymérase D pour le PCNA.



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ADNsba | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCNA | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RF-C/ATP | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + |
| ADN Pol B | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - | + | + | - | + | + | - |
| ADN Pol D | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + |

Figure 74. Visualisation du complexe RF-C/PCNA/ADN polymérase au niveau de l'hétéroduplex
 PCNA : 50 ng ; RF-C : 100 ng ; Pol B : 40 ng ; Pol D : 120 ng

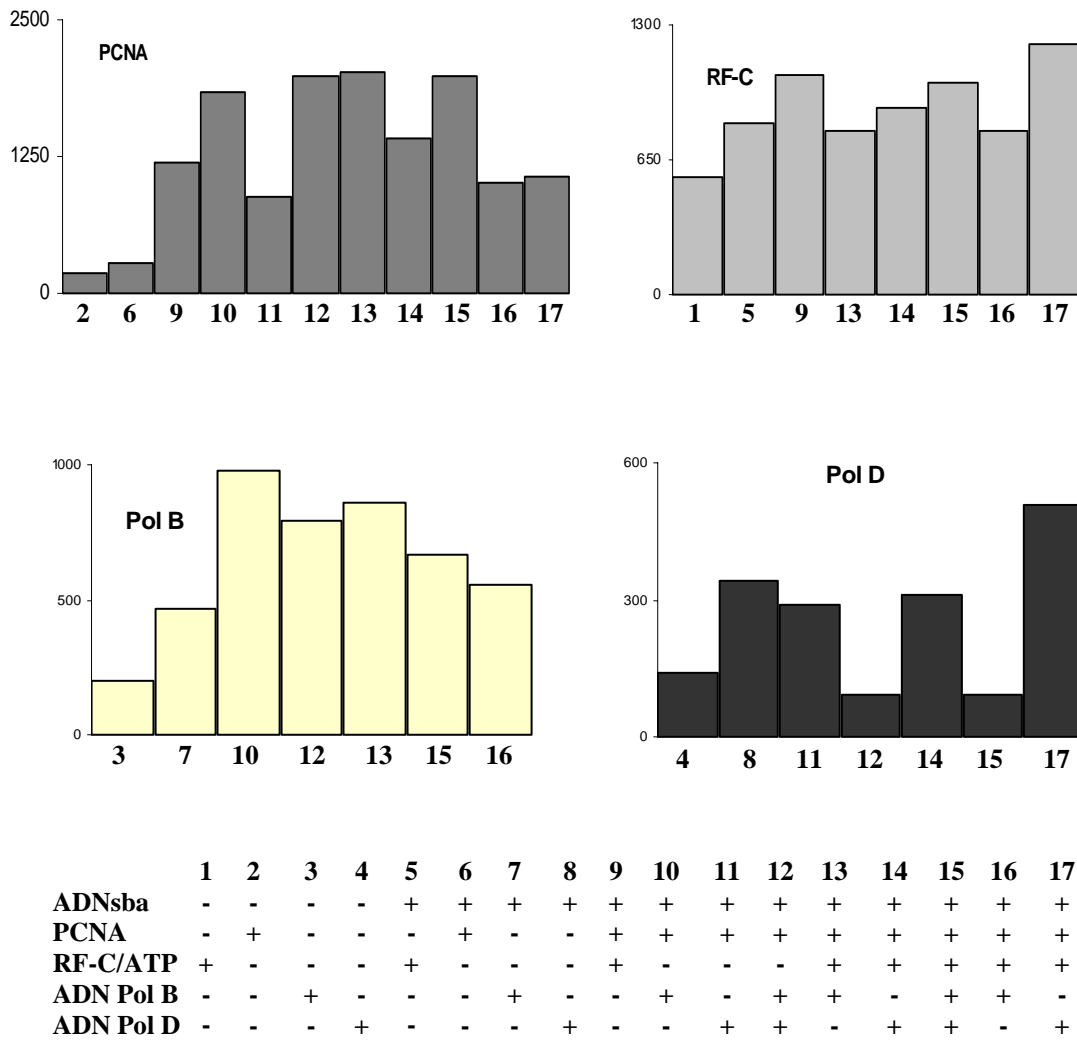
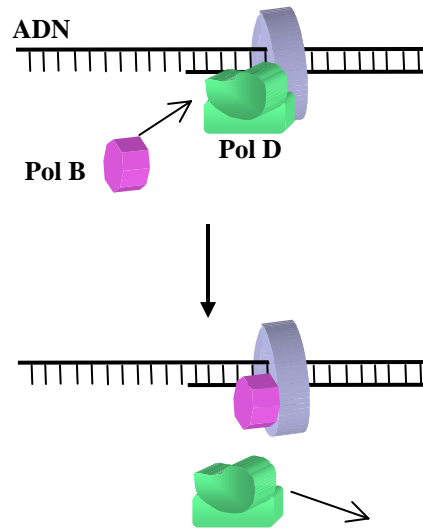


Figure 75. Quantification des bandes observées sur la figure 74. Les axes des ordonnées correspondent aux valeurs d'intensité obtenues en utilisant le logiciel QuantityOne (Biorad).

Schéma récapitulatif XII

L'ADN polymérase B déplace l'ADN polymérase D fixée sur le PCNA.



V.4. Stabilité du complexe RF-C/PCNA en présence des ADN polymérases

Lors de l'expérience précédente, nous observons que la quantité de RF-C fixé au niveau de la matrice varie peu. L'ajout des ADN polymérases n'a pas d'influence remarquable. Afin d'explorer de manière plus détaillée la possibilité d'un déplacement du RF-C par une ADN polymérase, une quantité croissante d'ADN polymérase est ajoutée en cours de réaction (figure 76).

V.4.1. Influence de l'ADN polymérase B :

En contradiction avec l'expérience précédente (figure 74-75), nous observons ici que l'ajout de l'ADN polymérase B dans le mélange réactionnel favorise le déplacement du RF-C, pour une concentration molaire identique (figure 76-77 ; puits 9). Cependant, pour une quantité deux fois supérieure, la quantité de RF-C fixé augmente (figure 76-77 ; puits 10). Ce point semble erroné car, pour une quantité trois ou quatre fois supérieure d'ADN polymérase B ajoutée, la quantité de RF-C diminue (figure 76-77 ; puits 11 et 12). L'expérience n'a pas été renouvelée pour une question de temps.

Il est à noter que une augmentation de la quantité d'ADN polymérase B au delà de 40 ng n'augmente pas le chargement du PCNA, bien qu'elle se fixe de manière plus importante au niveau de la matrice (figure 76 et 77 ; puits 10, 11 et 12). Ainsi, la fixation de plusieurs molécules d'ADN polymérase B au niveau d'un PCNA peut être envisagée, de même que le déplacement du RF-C. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour conforter cette hypothèse.

V.4.2. Influence de l'ADN polymérase D :

L'ajout de l'ADN polymérase D en molarité équivalente au RF-C n'a pas d'influence sur ce dernier. Cependant, lorsque la molarité de l'ADN polymérase D, dans la réaction, est deux fois supérieure au facteur de chargement, la quantité de RF-C présent au niveau de la matrice est diminuée de la moitié. Dans ce cas, nous observons également une augmentation de la quantité d'ADN polymérase D fixée (figure 76 et 77 ; puits 14). Pour des concentrations trois ou quatre fois supérieures, la quantité d'ADN polymérase D fixée reste identique (figure 76 et 77 ; puits 15 et 16). Ces observations sous-entendent la possibilité d'un complexe RF-C/PCNA/ADN polymérase D si chaque protéine est en concentration molaire équivalente. Lorsque l'ADN polymérase D est ajoutée à des concentrations molaires plus élevées, la quantité fixée augmente et le RF-C semble déplacé. La fixation de plusieurs ADN polymérase D sur un même PCNA peut dans ce cas être envisagée.

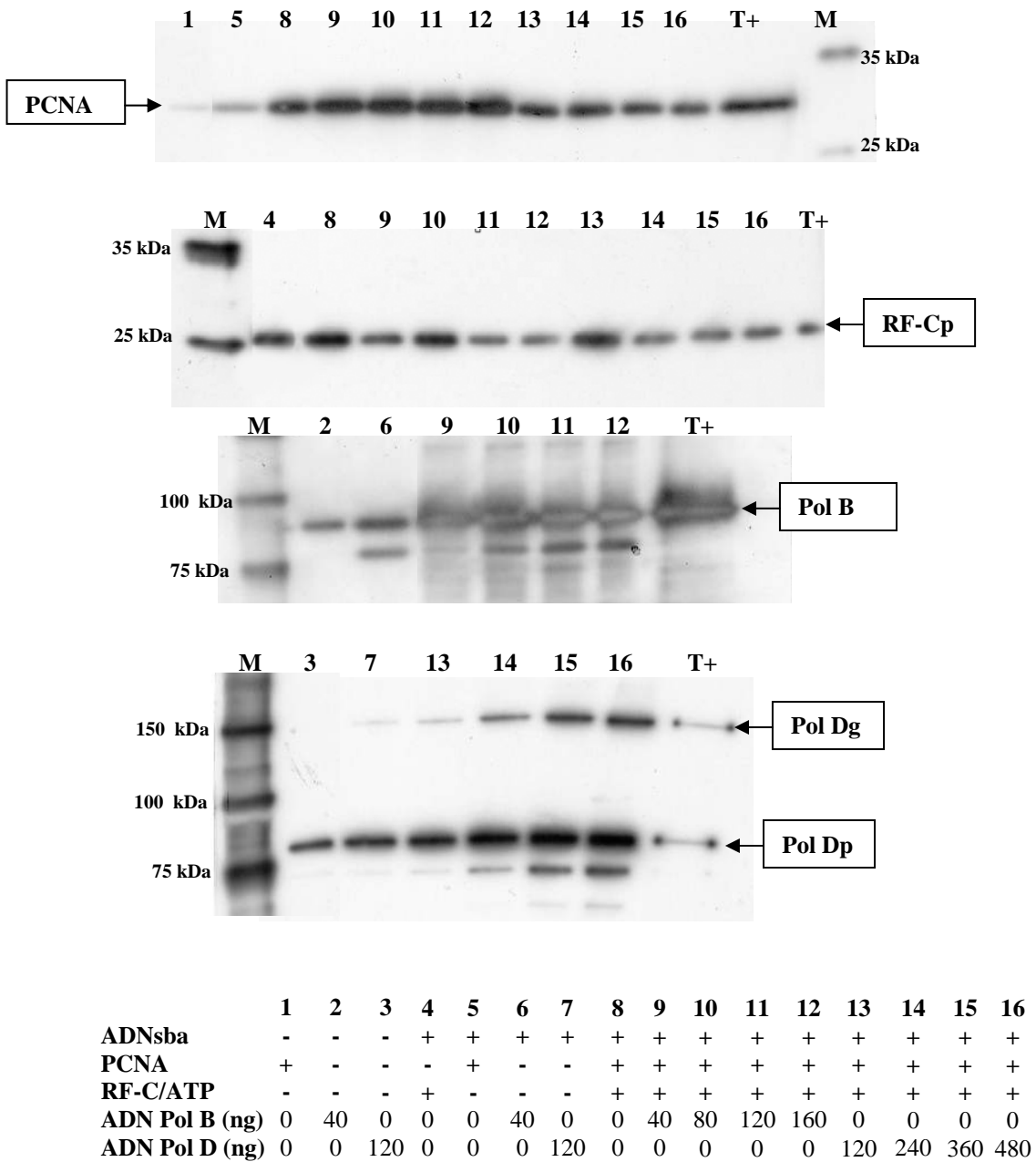
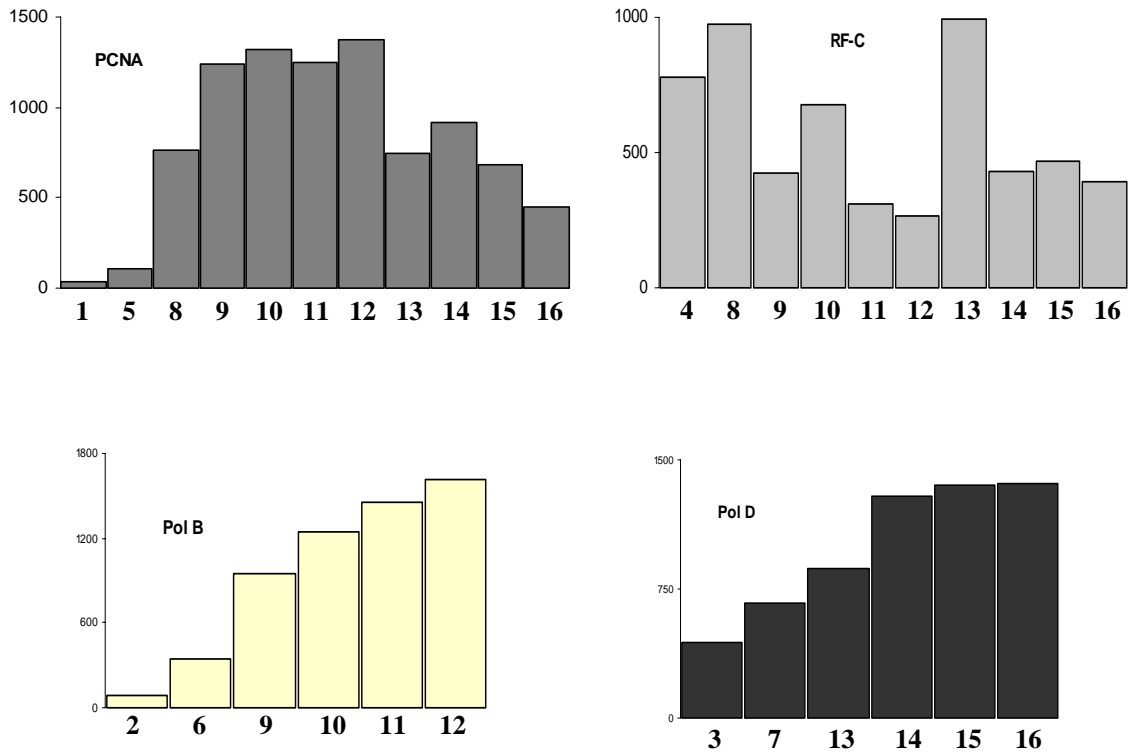


Figure 76.. Visualisation du complexe RF-C/PCNA/ADN polymérase au niveau de l'hétéroduplex
 PCNA : 50 ng ; RF-C : 100 ng ; Pol B : de 40 à 160 ng ; Pol D : de 120 à 480 ng



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|-----------------------|---|----|-----|---|---|----|-----|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ADNsba | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCNA | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RF-C/ATP | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ADN Pol B (ng) | 0 | 40 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 40 | 80 | 120 | 160 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ADN Pol D (ng) | 0 | 0 | 120 | 0 | 0 | 0 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 120 | 240 | 360 | 480 |

Figure 77. Quantification des bandes observées sur la figure 76. Les axes des ordonnées correspondent aux valeurs d'intensité obtenues en utilisant le logiciel QuantityOne (Biorad).

DISCUSSION



Les apparences sont belles dans leur vérité momentanée

Octavio Paz

La réplication de l'ADN est mieux comprise grâce à de nombreuses études fonctionnelles en association avec des approches structurales. Le processus par lequel les ADN polymérase acquièrent leur processivité est conservé chez les eucaryotes, bactéries et archées, *via* l'interaction avec une protéine en forme d'anneau capable de coulisser le long de l'ADN (la sous unité β de l'holoenzyme ADN polymérase III de *E. coli*; la protéine gp45 chez le bactériophage T4; le PCNA chez les eucaryotes et les archées). Le facteur de chargement (γ complexe chez *E. coli*; gp44/62 chez le bactériophage T4; RF-C chez les eucaryotes et les archées), sous l'influence de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, charge le PCNA sur la zone d'ADN amorcée par la primase. L'ADN polymérase répliquative recrutée pour la synthèse est la polymérase III de *E. coli*, les polymérase δ et ϵ chez les eucaryotes, trois polymérase B chez les crenarchées et les polymérase B et D chez les euryarchées. Lorsque plus d'une ADN polymérase répliquative est présente, les questions à propos de leurs implications sur le brin précoce ou retardé sont discutées (Waga et Stillman 1998; Hübscher *et al.* 2002; Shcherbakova *et al.* 2003; Fukui *et al.* 2004). La situation concernant les ADN polymérase chez les euryarchées a été récemment étudiée chez *Pyrococcus abyssi* (Henneke *et al.* 2005). Beaucoup d'informations biochimiques sont disponibles pour les ADN polymérase euryarchées de la famille B, de part leurs applications en PCR (Perler *et al.* 1996), cependant que les informations concernant les ADN polymérase de la famille D sont encore parcellaires.

L'étude, menée ici, a porté sur le chargement du PCNA de *Pyrococcus abyssi* par le RF-C, couplé à la synthèse d'ADN des ADN polymérase B et D. Des expériences additionnelles d'interaction, au niveau d'un ADN simple brin amorcé, ont également permis de comprendre la dynamique du complexe de réplication. L'utilisation, dans les tests fonctionnels, de facteurs mutants, tels que le PCNA(ded) et les ADN polymérase Δ PIP, a précisé l'importance de certains motifs au niveau de l'assemblage du complexe répliquatif.

Le PCNA de *P. abyssi* se charge spontanément sur l'ADN en un complexe fonctionnel :

Grâce à la technique de pontage au glutaraldéhyde, précédemment utilisée chez l'humain (Podust *et al.* 1995a), il est observé que le PCNA de *Pyrococcus abyssi* est capable de se charger seul, sur différents types de matrices. Le chargement est particulièrement important lorsque la matrice est totalement double brins, ce qui est en accord avec la structure du PCNA (résultats non montrés). Quant au chargement observé sur ADN simple brin, il est certainement dû à la présence de structures secondaires et de l'amorce, lorsqu'elle est présente.

Les expériences effectuées avec le système de billes magnétiques ont permis de confirmer le chargement du PCNA seul. Cependant, une quantification des molécules fixées sur la matrice montre que moins de 2% des protéines présentes dans la réaction sont chargées. De plus, ce chargement est dépendant de la température. Comme évoqué précédemment, le PCNA est une molécule structurellement très conservée d'un règne à l'autre. Cependant, le PCNA des archées hyperthermophiles a un nombre de liaisons

hydrogène inférieur à celui de l'humain ou de la levure (Matsumiya *et al.* 2001). Cela peut expliquer le chargement spontané à température élevée, qui pourrait favoriser *in vitro* la déstabilisation des liaisons entre monomères et de ce fait permettre une ouverture spontanée de l'anneau. Toutefois, la température de 65°C, choisie pour ne pas dénaturer l'ADN, est inférieure de 30°C à la température optimale de *P. abyssi* ; il serait intéressant de pouvoir étudier ce mécanisme à 95°C, particulièrement en ce qui concerne le rendement de chargement.

Aucun chargement n'est observé avec le mutant PCNA(ded). Suivant les observations faites chez *P. furiosus* (Matsumiya *et al.* 2001; Matsumiya *et al.* 2003), le mutant a été construit pour être démuné de trois acides aminés essentiels à la trimérisation ; son incapacité à former un trimère est démontrée par filtration sur gel. Ce PCNA(ded) n'a également pas d'effet stimulateur sur la processivité des ADN polymérases, contrairement à la protéine recombinante sauvage, qui, pour les deux ADN polymérases, stimule considérablement la synthèse d'ADN de fragments complets. Prises ensemble, ces données suggèrent une synthèse d'ADN processive après le chargement spontané du PCNA trimérique sur matrice d'ADN amorcée avant recrutement d'une ADN polymérase.

Le RF-C : facteur de chargement et de déchargement :

Le RF-C de *P. abyssi* stimule près de dix fois le chargement du PCNA, confirmant sa fonction de facteur de chargement. Sa forme active s'apparente à un complexe formé de quatre petites sous-unités et une grande. Le rendement maximal de chargement est observé en présence de RF-C et d'ATP γ S, analogue non hydrolysable de l'ATP, ce qui est consistant avec les études montrant que la fixation de l'ATP au RF-C stimule les interactions RF-C/PCNA. Toutefois, un bon chargement est observé en absence d'ATP, suggérant que l'interaction RF-C/PCNA existe en absence de ce cofacteur. Lorsque l'ATP est fixé, puis hydrolysé, le signal aléatoire, obtenu en fonction du temps, présume un équilibre entre chargement et déchargement du PCNA, tandis qu'en présence d'un analogue de l'ATP non hydrolysable, une quantité croissante de PCNA chargé est observée.

L'ADN polymérase B stimule le chargement du PCNA

Il a été montré que l'ADN polymérase B stimule le chargement du PCNA, ce qui n'est pas observé en présence de l'ADN polymérase D. Le signal obtenu est proche de celui observé avec le facteur de chargement RF-C en présence d'ATP. Comme il est observé chez le bactériophage T4, entre la protéine gp45 et l'ADN polymérase gp43 (Yao *et al.* 1996), l'ADN polymérase B stabiliserait le PCNA sur la région d'ADN double brin. Ces observations naturellement soulèvent la question concernant la fonction du RF-C en présence de l'ADN polymérase B. Le chargement du PCNA est augmenté de dix fois en présence de RF-C, mais le signal le plus important est observé en présence de l'ADN polymérase B, même en présence de

RF-C ou d'ADN polymérase D. Lorsque des dNTPs sont ajoutés dans l'expérience de chargement du PCNA, en présence de l'ADN polymérase B, une synthèse d'ADN est observée montrant la présence d'un complexe productif au niveau de l'amorce de l'ADN simple brin circulaire. Cette observation est confirmée par les expérimentations de synthèse d'ADN, sur la même matrice, où le PCNA seul stimule considérablement la quantité des fragments produits.

Le RF-C inhibe la synthèse d'ADN effectuée par le complexe ADN polymérase B / PCNA

Lorsque le RF-C est présent dans la réaction, la synthèse d'ADN est considérablement réduite. De même, lorsque le RF-C est ajouté en cours de réaction, une inhibition de la synthèse est mise en évidence. Ce phénomène est observé avec ou sans ATP. Une des hypothèses à émettre est que le RF-C se fixe sur l'ADN, de manière aspécifique, et empêche la processivité du complexe. Il a été montré que le RF-C humain a une grande affinité pour l'ADN (Lee et Hurwitz 1990; Tsurimoto et Stillman 1991). Une approche par microscopie électronique a révélé que le RF-C de la drosophile ou de l'humain se fixe sur l'ADN simple brin (Keller *et al.* 1999). Cette affinité forte et non spécifique est due à la partie N-terminale de la grande sous-unité du RF-C, où un domaine de fixation à l'ADN a été identifié (Burbelo *et al.* 1993; Fotedar *et al.* 1996). L'addition de RF-C humain dans une expérience de synthèse d'ADN, où le PCNA est déjà présent, provoque une inhibition de cette synthèse, contrairement à un mutant RF-C tronqué en N-terminal, qui n'a aucun effet (Podust *et al.* 1998). Cependant, cette séquence manque au niveau des grandes sous-unités des RF-C archées ; cela a été physiquement confirmé chez *P. abyssi* à l'aide d'anticorps (Henneke *et al.* 2002). Par ce fait, l'hypothèse d'une fixation forte et non spécifique du RF-C à l'ADN est peu probable, même si d'autres motifs de fixation pour la reconnaissance de la matrice ADN ne sont pas exclus. Il a été montré, chez *Pyrococcus furiosus*, que le complexe RF-C se lie à l'ADN *via* les petites sous-unités (Cann *et al.* 2001), en contraste avec l'humain où la grande sous-unité est nécessaire (Uhlmann *et al.* 1997).

Cependant, si le RF-C de *Pyrococcus abyssi* interagit de manière non spécifique, en inhibant la synthèse d'ADN effectuée par le complexe PCNA/ADN polymérase B, cet effet n'est pas retrouvé en présence du complexe PCNA/ADN polymérase D. Le RF-C a donc un « comportement » différent en fonction de l'ADN polymérase présente dans la réaction de synthèse. Ces observations suggèrent d'autres mécanismes mettant en œuvre les sites de fixation présents sur le PCNA.

Domaines et motifs permettant les interactions avec le PCNA

A présent, trois domaines, dans le PCNA eucaryote, sont connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine (Jónsson et Hübscher 1997; Maga et Hübscher 2003). Le principal site d'interaction est une boucle de connexion entre deux domaines, se caractérisant par une structure enroulée sur le côté du PCNA. Cette boucle est reconnue par des protéines telles que pol δ , p21, Fen1, et ADN Ligase I. D'autres séquences importantes sont situées dans la partie N-terminale, comprenant des hélices α à

l'intérieur de l'anneau, et formant un site de fixation pour la cycline D, ainsi que la partie en C-terminale qui est importante pour la fixation de l'ADN polymérase ϵ et du RF-C (Maga and Hübscher 2003).

D'un autre côté, les protéines habilitées à fixer le PCNA possèdent des séquences peptidiques connues pour être des motifs de fixation au PCNA. Le principal motif, appelé PIP-Box (PCNA Interacting Protein), est retrouvé chez beaucoup de protéines intervenant dans les mécanismes de réplication, réparation et contrôle du cycle cellulaire (Warbrick 1998). Le motif PIP-Box est apparenté à la séquence consensus Q-xx-(h)-xx-(a)-(a) ; beaucoup d'études fonctionnelles effectuées chez des protéines eucaryotes ont démontré son importance lors de l'interaction avec le PCNA (Maga et Hübscher 2003). Ce motif PIP-Box a été identifié chez les protéines homologues archées (Warbrick 2000), présumant le même mode de fixation au PCNA. Un autre motif consensus, GX4GX8GX3YFY, trouvé chez l'ADN polymérase δ (Zhang *et al.* 1995) (Zhang *et al.* 1999) ainsi que chez l'ADN polymérase B du crenarchaeon *Aeropyrum pernix* (Daimon *et al.* 2002), a été proposé pour être important dans la fixation au PCNA. Un autre motif, appelé KA-Box, est également proposé pour les interactions avec le PCNA (Xu *et al.* 2001).

La grande sous-unité du RF-C possède, au niveau C-Terminal, le motif QVTLFDFI décrit comme une PIP-Box, tout comme l'ADN polymérase B qui présente le motif QVGLGAWLKF en C-Terminal. De manière surprenante, l'ADN polymérase D possède en C-terminal une séquence (VISLEEFF) pouvant être apparenté à une PIP-Box, ainsi que la séquence GX3GX6GX4YF en C2-Terminal proche de la séquence précédemment décrite (Zhang *et al.* 1995; Daimon *et al.* 2002) (annexe 3).

Plusieurs motifs permettent à l'ADN polymérase D d'interagir avec le PCNA

L'importance de la PIP-Box des ADN polymérases a été démontrée en utilisant, dans les tests fonctionnels, des ADN polymérases tronquées de ce motif. La synthèse d'ADN effectuée par l'ADN polymérase B Δ PIP n'est plus stimulée par le PCNA, contrairement à celle de l'ADN polymérase D. Le chargement, largement stimulé par l'ADN polymérase B sauvage, ne l'est pas en présence de l'ADN polymérase B Δ PIP. De plus, le signal correspondant au chargement du PCNA seul n'est plus observé. Par contre, en présence d'ADN polymérase D Δ PIP, le chargement correspondant au PCNA seul est encore observé. L'ADN polymérase B de *Pyrococcus abyssi*, comme il est montré pour l'ADN polymérase des bactériophages (Berdis et Benkovic 1996; Shamoo et Steitz 1999), est processive en présence du PCNA *via* sa partie C-terminale. Les expériences par résonance plasmonique de surface ont confirmé l'absence d'interaction entre l'ADN polymérase B Δ PIP et le PCNA préalablement chargé. Par contre, une interaction entre l'ADN polymérase D Δ PIP et le PCNA est observée. Ces résultats montrent que l'ADN polymérase D possède au moins deux motifs pour interagir avec le PCNA. D'autres travaux sont à envisager pour confirmer que le motif GX3GX6GX4YF intervient bien dans ces interactions.

Mise en évidence d'un motif PYF-Box chez les ADN polymérase des archées

La recherche du motif GX3GX6GX4YF, chez les ADN polymérase des archées, a permis de le mettre en évidence chez les ADN polymérase B1 et B3 des crénarchées ainsi que chez l'ADN polymérase D des euryarchées. L'alignement des séquences peptidiques met en évidence une boîte très conservée constituée d'une proline et de deux acides aminés aromatiques (PYF) (figure 78). D'après l'analyse de ces séquences, nous proposons que ce motif putatif de liaison au PCNA soit redéfini par la séquence (L/I/V)X4GX6GX4PYF et nous suggérons qu'il soit appelé PYF-Box.

| | | |
|-------------------|---|------------------------------------|
| P.occultum_B1 | : | VAAAKIYDDRN-GIVYVYFDRTGYM-PYFLT-- |
| P.occultum_B3 | : | PVVILWGITLD-GKRVVLLDHR--FRPYFYA-- |
| S.ohwakuensis_B1 | : | KAICKLYDKET-KKIYILYDNTGH-KPYFLT-- |
| S.ohwakuensis_B3 | : | PVIYIIVVIDKE-GNRVLLLEKKF--RPYFYA-- |
| A.pernix_B1 | : | KAVLMLYDPSS-GSLVKWADRTGH-KPYFLT-- |
| A.pernix_B3 | : | PVIILWGRGAD-GSR-VVVF-YGEFRPYFYV-- |
| S.solfataricus_B1 | : | KAVCKLFDKETQKIYALY-DNTGH-KPYFLV-- |
| S.sulfolobus_B3 | : | PLVYIWSVDDE-GNSSVVIDNN--FRPYFYI-- |
| P.abysssi_D | : | TSAGIVGRII--GFVDALV---GYAHPYFHA-- |
| P.furiosus_D | : | TSAGIVGRIFTIGFVDALV---GYAHPYFHA-- |
| P.Horikoshi_D | : | TSAGIVGRII--GFVDALV---GYAHPYFHA-- |
| Human_p125 | : | PVLRAFGVTDG-GF-SVCCHIHG-FAPYFYT-- |

Figure 78. Alignement des séquences peptidiques, des ADN polymérase archées, de motif GX3GX6GX4YF, supposé interagir avec le PCNA. Mise en évidence d'une boîte PYF très conservée.

De plus, la plupart des ADN polymérase B des crénarchées possèdent un motif PIP-Box de séquence consensus Q-xx(h)-xx(a)-(a), tandis que certaines présentent un motif plus court (tableau 8). Chez les euryarchées, l'ADN polymérase B possède la séquence consensus décrite alors que l'ADN polymérase D présente un motif plus court. Il serait intéressant de savoir quels liens pourraient exister entre certaines ADN polymérase B des crénarchées et l'ADN polymérase D des euryarchées, quant à leur implication au niveau de la fourche de réplication.

Il est à noter qu'aucune ADN polymérase B2 de crénarchée ne possède de motif PIP-Box, ni de motif PYF-Box de liaison au PCNA. Ces ADN polymérase ne possédant pas d'activité exonucléase (Iwai *et al.* 2000b) ne doivent pas intervenir dans les mécanismes de réplication. Il a d'ailleurs été montré, chez *Pyrobaculum aerophilum*, que l'ADN polymérase B2 intervient dans les systèmes de réparation suite à un mésappariement de bases (Sartori et Jiricny 2003).

| | PYF-Box | PIP-Box |
|---------------------------|---------|----------|
| <i>P. occultum</i> B1 | + | LxxFF |
| <i>P. occultum</i> B3 | + | QxxLxxFF |
| <i>S. ohawakuensis</i> B1 | + | QxLxxFG |
| <i>S. ohawakuensis</i> B2 | - | - |
| <i>S. ohawakuensis</i> B3 | + | QxxLxxFF |
| <i>A. pernix</i> B1 | + | QxLxxFG |
| <i>A. pernix</i> B2 | - | - |
| <i>A. pernix</i> B3 | + | QxxLxxFF |
| <i>S. solfataricus</i> B1 | + | QxLxxFG |
| <i>S. solfataricus</i> B2 | - | - |
| <i>S. solfataricus</i> B3 | + | LxxFF |
| <i>P. abyssi</i> B | - | QxxLxxWL |
| <i>P. abyssi</i> D | + | LxxFF |
| <i>P. furiosus</i> B | - | QxxLxxWL |
| <i>P. furiosus</i> D | + | LxxFF |
| <i>P. horikoshii</i> B | - | QxxLxxWI |
| <i>P. horikoshii</i> D | + | LxxFF |
| <i>H. sapiens</i> p125 | + | AxxFY |

Tableau 8. Mise en évidence de la présence des motifs PYF et PIP sur les séquences peptidiques des ADN polymérase d'archées.

Fixation de plusieurs partenaires sur le PCNA

Comme le PCNA présente plusieurs domaines pouvant lier des protéines, la possibilité que plus d'un partenaire se fixe au PCNA n'est pas exclue. Il a été montré, chez le bactériophage RB69, que l'ADN polymérase ne fixe qu'un seul site sur le PCNA par sa PIP-Box (Shamoo et Steitz 1999), les deux autres restant libres pour la fixation de protéines additionnelles. Cette hypothèse soulève bien entendu la question de l'accessibilité des sites. Chez *E. coli*, il avait été supposé que plusieurs protéines pourraient interagir avec le PCNA car celui présente deux faces (Kong *et al.* 1992). Il a, par la suite, été démontré que le facteur de chargement et l'ADN polymérase interagissent au niveau de la même face (Naktinis *et al.* 1996). De plus, il a été montré par cristallographie du peptide correspondant à la partie C-Terminal de l'ADN polymérase du bactériophage RB69, que les cristaux obtenus présentent plusieurs conformations. Ce peptide, contenant le motif PIP-Box, permettant l'interaction avec l'anneau gp45, peut être supposé comme un connecteur flexible (Shamoo et Steitz 1999). Cette propriété pourrait favoriser, par un mouvement de la protéine fixée sur le PCNA, l'accessibilité aux autres sites libres pour une autre protéine. Il a également été montré que la protéine p21 inhibe fortement la synthèse de l'ADN polymérase δ en présence du PCNA, mais n'inhibe pas le chargement du PCNA par le RF-C (Podust *et al.* 1995b) ; il pourrait donc y avoir deux sites ou motifs d'interaction différents pour la fixation du RF-C et de l'ADN polymérase δ . De plus, des études ont proposé que le RF-C reste lié au PCNA lorsque l'ADN polymérase δ s'y fixe, suggérant que le RF-C reste fixé au PCNA pendant la phase d'élongation de l'ADN par l'ADN polymérase δ (Yuzhakov *et al.* 1999). L'ADN polymérase D de *Pyrococcus abyssi* possède la sous-unité *DPI*, décrite pour avoir des similarités avec la

petite sous unité de l'ADN polymérase δ (Böhlke *et al.* 2002). Les gènes *DPI* ont été groupés en une nouvelle famille, associée avec la partie non catalytique des ADN polymérases eucaryotes de la famille B (α , δ et ϵ), supposant que leurs fonctions, et certaines de leurs interactions, pourraient être conservées (Makiniemi *et al.* 1999).

Des études ont montrées, chez *Pyrococcus horikoshii*, que la sous-unité *DPI* de l'ADN polymérase D interagit physiquement avec la grande sous-unité du RF-C (Tang *et al.* 2004). Au niveau C-Terminal du RF-C de *Pyrococcus abyssi*, juste avant le motif PIP-Box, se trouve une séquence de 56 acides aminés contenant 43 lysines ou acides glutamiques (voir annexe 3). Cette séquence pauvrement structurée, retrouvée uniquement dans le genre *Pyrococcus*, peut-être évoquée comme étant un connecteur flexible entre le motif PIP-Box et le reste de la grande sous-unité du RF-C. Des études, chez *Pyrococcus furiosus*, ont montré que la partie terminale de cette région participe aux interactions avec le PCNA (Nishida *et al.* 2005), même si ces interactions se font principalement *via* le motif PIP-Box. Après discussion avec des structuralistes et des spécialistes du repliement des protéines, il en ressort que cette séquence peut être structurée, après interaction avec un autre facteur protéique. Ainsi, l'ADN polymérase D de *Pyrococcus abyssi* pourrait interagir avec le RF-C.

Les expériences d'interaction sur l'ADN simple brin amorcé, en présence du RF-C de *Pyrococcus abyssi*, du PCNA et des ADN polymérases, montrent que le RF-C peut être présent sur le PCNA avec l'ADN polymérase B ou l'ADN polymérase D. En couplant cette information avec les résultats de synthèse d'ADN, il peut être supposé que la fonction de facteur de déchargement du RF-C est conservée en présence de l'ADN polymérase B mais pas en présence de l'ADN polymérase D.

Modulation des interactions : différence d'affinité et importance de l'environnement nucléique

Le PCNA joue un rôle central et médiateur au niveau des mécanismes dans lesquels il intervient. Durant la phase d'élongation de la réplication de l'ADN, seuls le RF-C, le RP-A et les ADN polymérases semblent être mis en jeu. Par contre, au niveau de la maturation des fragments d'Okazaki et des mécanismes de réparation, de nombreuses protéines interviennent. La maturation des fragments d'Okazaki met en jeu deux endonucléases (RnaseHIII et FenI), une ADN ligase et certainement une ADN polymérase ainsi que le facteur RF-C, afin de décharger le PCNA en fin de réaction. Toutes ces protéines ont été décrites comme ayant une affinité pour le PCNA chez les trois règnes du monde vivant, et possèdent toutes un motif PIP-Box. Les études effectuées sur le réplisome de *E. coli* montrent que les motifs PIP-Box ont des affinités différentes, ce qui permet une modulation du réplisome en fonction des facteurs nécessaires au mécanisme en cours (Lopez de Saro *et al.* 2004). De plus, il est également montré que l'affinité de certains facteurs pour le PCNA varie en fonction de l'environnement, comme la structure ou la nature de l'acide nucléique (Leu *et al.* 2003).

Chez *Pyrococcus abyssi*, des études faites au laboratoire montrent que l'ADN polymérase D est capable d'effectuer l'extension de l'amorce ARN et de déplacer le brin d'ARN, contrairement à l'ADN polymérase B (Henneke *et al.* 2005). Quand le chargement du PCNA, en présence de l'ADN polymérase B, est mesuré sur une matrice hybridée à amorce ARN, celui-ci est stimulé. Cependant, lorsque des dNTPs sont ajoutés, l'ADN polymérase B se dissocie du PCNA. Cette expérience confirme l'importance de l'environnement nucléique, en présence de dNTPs, sur l'affinité d'une ADN polymérase avec son facteur de processivité.

La différence d'affinité pour le PCNA, entre deux protéines, dans un même environnement nucléique, a été montré lors du déplacement de l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B. L'ADN polymérase B ne possédant que la PIP-Box comme motif d'interaction avec le PCNA, le déplacement de l'ADN polymérase D se fait par l'intermédiaire de ce motif. Le deuxième motif permettant à l'ADN polymérase D de se fixer sur le PCNA n'est pas suffisant pour que l'ADN polymérase D reste fixée sur le PCNA en présence de l'ADN polymérase B.

Proposition de modèles

Le fait que seule l'ADN polymérase D soit capable de faire de la synthèse d'ADN, à partir d'une amorce ARN, suggère qu'elle soit la première ADN polymérase recrutée après le chargement du PCNA. Concernant le complexe primase archéen, nous ne savons pas encore aujourd'hui si celui-ci synthétise uniquement de l'ARN pour amorcer la synthèse ou de l'ARN/ADN comme chez les eucaryotes. Le modèle proposé ici tient compte des études sur la primase de *S. solfataricus* menées chez Steve Bell. D'après cette équipe, la primase synthétiserait uniquement de l'ADN (Lao-Sirieix *et al.* 2005).

D'après le modèle proposé pour les eucaryotes (Fukui *et al.* 2004) et les comparaisons de séquences peptidiques, l'ADN polymérase B monomérique serait plus proche de l'ADN polymérase ϵ monomérique et serait impliquée dans la synthèse du brin avancé tandis que l'ADN polymérase D dimérique, plus proche de l'ADN polymérase δ tétramérique serait principalement impliquée dans la synthèse du brin retardé (Henneke *et al.* 2005).

Comme le RF-C n'inhibe pas la synthèse d'ADN du complexe PCNA/ADN polymérase D, nous pouvons supposer que :

- (i) le RF-C et l'ADN polymérase D sont fixés sur le PCNA durant la synthèse du brin retardé. L'ADN polymérase D étant la seule à pouvoir faire du déplacement de brin d'ARN, elle pourrait agir seule sur le brin retardé jusqu'à la jonction des fragments d'Okasaki (Henneke *et al.* 2005).
- (ii) le RF-C et l'ADN polymérase D sont fixés sur le PCNA durant le début de la synthèse du brin avancé, avant le recrutement de l'ADN polymérase B qui déplace l'ADN polymérase D. La synthèse

d'ADN du brin avancé pourrait être exécuté en une étape par l'ADN polymérase B qui stabilise le PCNA. Dès que l'ADN polymérase B est recrutée, le RF-C n'est plus présent sur le PCNA pour une synthèse efficace.

En résumé, le PCNA de *Pyrococcus abyssi* seul est suffisant pour servir de facteur de processivité aux ADN polymérases et le facteur RF-C n'est pas présent de manière permanente au niveau du complexe processif, mais peut l'être à partir des étapes de chargement jusqu'au recrutement de l'ADN polymérase B et certainement pour le recyclage du PCNA après la synthèse.

Les résultats obtenus durant ces trois ans passés, couplés à ceux précédemment obtenus, et au contexte bibliographique, sont suffisants pour dresser un modèle moléculaire de la fourche de réplication chez l'euryarchée *Pyrococcus abyssi* (figure 79).

La question dominante, dans ce modèle, est le devenir du RF-C. Il a été montré, lors de cette étude, que le RF-C de *Pyrococcus abyssi* n'interagit plus avec le PCNA après le chargement, si ce n'est pour le décharger. Supposant une interaction entre le RF-C et l'ADN polymérase D sur le PCNA, nous proposons que le RF-C soit déplacé en même temps que l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B.

Aujourd'hui, aucun modèle structural du complexe répliatif eucaryote et archée n'est disponible. Chez la bactérie *E. coli*, les études ont montré que le réplisome est structuré en un seul complexe, pour la synthèse des brins avancé et retardé, avec des éléments modulables en fonction des affinités, de l'environnement nucléique et des événements liés à la réparation. Au niveau euryarchée et eucaryote, deux complexes répliatifs indépendants sont possibles, depuis la mise en évidence d'ADN polymérases répliatives différentes. De plus, aucune information sur la possibilité d'un complexe global n'est physiquement montrée. L'étude menée ici conforte l'idée de deux complexes avec des ADN polymérases différentes. La synthèse d'ADN du brin avancé serait amorcée par l'ADN polymérase D puis poursuivie par l'ADN polymérase B, tandis qu'au niveau du brin retardé, seule l'ADN polymérase D y serait impliquée.

Même si le déplacement, sur le PCNA, de l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B est significatif, celui-ci ne semble pas être possible au niveau du brin retardé. Un fragment d'Okazaki étant estimé à 120 paires de bases chez *P. abyssi* (Matsunaga *et al.* 2003) le déplacement ne peut certainement pas se faire en considérant que l'incorporation de nucléotides est proche de 1000 à la seconde. De plus, il a été montré que l'ADN polymérase B de *P. abyssi* était incapable d'élonguer une amorce ADN si 100 bases en aval se trouve une amorce ARN (Henneke *et al.* 2005). Ces deux observations présument une implication de l'ADN polymérase D seule au niveau du brin retardé.

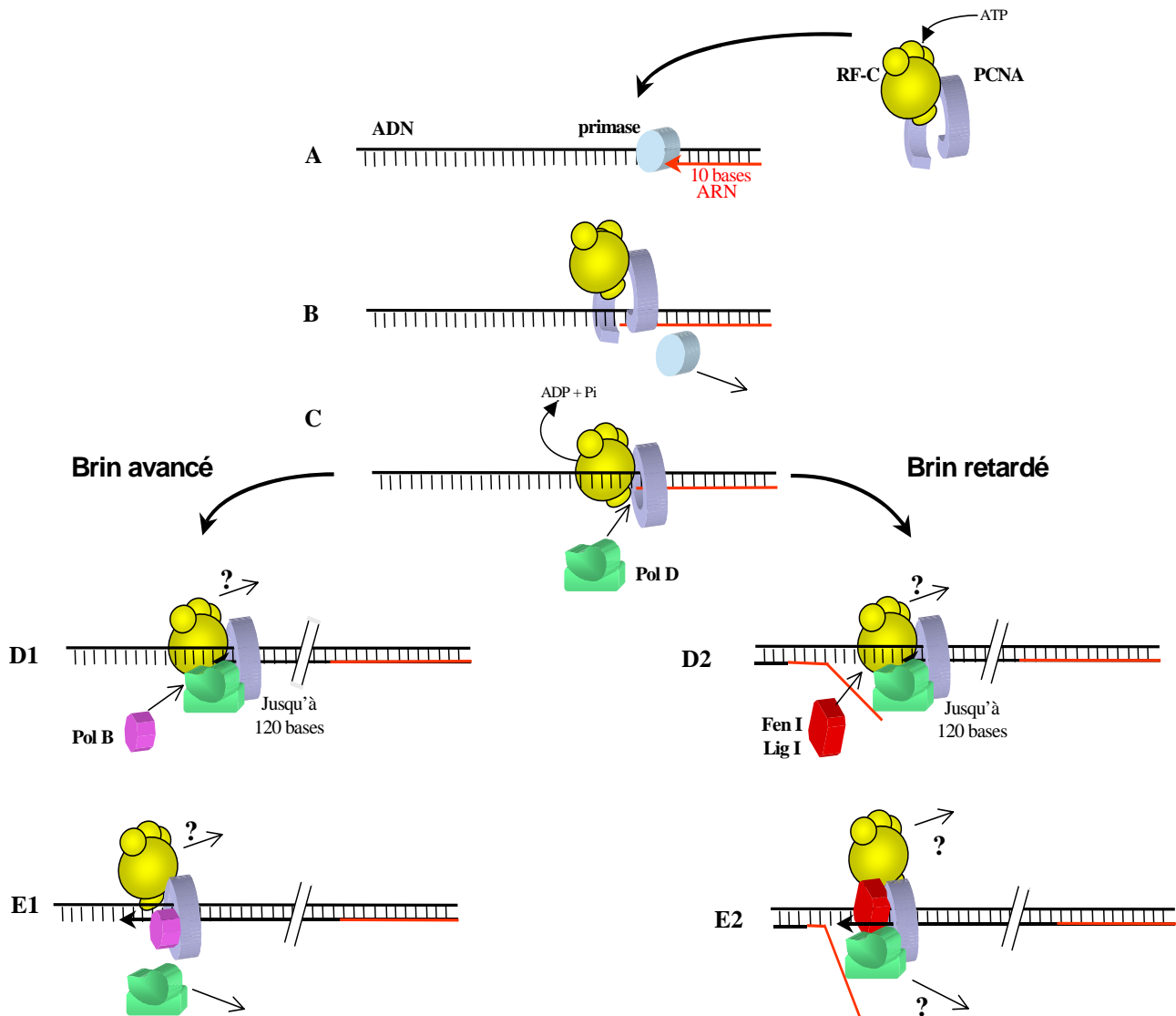


Figure 79. Proposition d'un modèle pour la phase d'élongation de la réplication chez les euryarchées

- A.** La primase synthétise une amorce ARN de 10 bases (Matsunaga *et al.* 2003).
- B.** La primase est déplacée par le complexe RF-C/PCNA, préalablement assemblé.
- C.** Seule l'ADN polymérase D est capable de faire de l'extension d'ARN ; c'est sans doute la première ADN polymérase recrutée (Henneke *et al.* 2005).
- D1.** Au niveau du brin avancé, l'ADN polymérase D est déplacée du PCNA par l'ADN polymérase B
- E1.** La synthèse complète du brin avancé peut ensuite se faire en une étape par l'ADN polymérase B qui stabilise son facteur de processivité. Pour une bonne synthèse, le RF-C ne fait plus partie du complexe.
- D2.** Au niveau du brin retardé, l'ADN polymérase peut synthétiser les 120 bases ADN, constituant la longueur d'un fragment d'Okazaki (Matsunaga *et al.* 2003), jusqu'à l'amorce ARN qu'elle déplace (Henneke *et al.* 2005). Le RF-C peut faire partie du complexe processif.
- E2.** Le recrutement des protéines impliquées dans la maturation des fragments d'Okazaki permet l'excision de l'amorce ARN et la ligature des fragments d'ADN.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Conclusions

A la suite de ce travail de thèse, plusieurs résultats concernant la mise en place et la dynamique du complexe de réplication de *Pyrococcus abyssi* ont été obtenues :

Pour la première fois **le chargement spontané d'un PCNA euryarchée est directement observé**. Cette observation avait toujours été déduite à partir d'expériences de synthèse d'ADN. Ce chargement est spécifique (utilisation d'un PCNA mutant) et s'avère fonctionnel en présence d'une ADN polymérase et de dNTPs.

Le chargement du PCNA est stimulé par l'ADN polymérase B ; ce chargement est aussi efficace qu'en présence de RF-C, ce qui pourrait soulever la question du rôle du RF-C lorsque cette ADN polymérase est présente. Cependant, **le complexe PCNA/ADN polymérase B est déstabilisé en présence d'une amorce ARN et de dNTPs**.

Un **déplacement de l'ADN polymérase D par l'ADN polymérase B sur le PCNA** a été mis en évidence et suggère, d'un point de vue dynamique, une action coordonnée des ADN polymérases au niveau de la fourche de réplication de *P. abyssi*.

Le RF-C inhibe la synthèse d'ADN effectuée par le complexe PCNA/ADN polymérase B mais pas celle effectuée par le complexe PCNA/ADN polymérase D. Ce résultat, couplé à l'étude bibliographique, suppose qu'**une interaction entre le RF-C et l'ADN polymérase D a lieu sur le PCNA**.

L'étude fonctionnelle des ADN polymérases délétées de leur motif PIP-Box a montré que **l'ADN polymérase D possède au moins deux sites de fixation au PCNA** tandis que **la PIP-Box de l'ADN polymérase B est nécessaire pour l'interaction avec le PCNA**.

Ces résultats, associés à ceux obtenus au laboratoire, et alimentés par la bibliographie concernant le sujet, ont permis de proposer un **modèle moléculaire pour illustrer la dynamique de la fourche de réplication chez les euryarchées**. Ce modèle porte sur la mise en place du complexe répliatif et les phases d'élongation des brin direct et retardé. **Deux hypothèses sont formulées concernant la synthèse du brin retardé**.

Certains points restent cependant à confirmer voire à démontrer ; ils sont repris dans la partie perspectives.

Perspectives

Consolider le modèle explicatif de la fourche de réplication euryarchée

Analyser les rôles respectifs de la PIP-Box et de la PYF-Box

Le motif d'interaction PIP-Box, présent chez la majorité des protéines interagissant avec le PCNA, a été très étudié chez tous les organismes. Le motif, que nous avons appelé PYF-Box, a été initialement mis en évidence chez l'ADN polymérase δ humaine puis chez la crénarchées *A. pernix*. Les travaux préliminaires, de recherches et d'alignement de séquences peptidiques, que nous avons mené sur quelques ADN polymérases archées, suggèrent que ce motif soit mieux étudié. Dans un premier temps, il faudrait confirmer, grâce à l'utilisation de protéines mutantes, que celui-ci intervient bien dans les interactions entre l'ADN polymérase D et le PCNA de *P. abyssi*. Par la suite, il serait intéressant de savoir quelle est l'importance de cette interaction au sein des réplisomes euryarchée et crénarchée.

Etudier l'interaction possible entre le RF-C et l'ADN polymérase D

L'interprétation des résultats obtenus en synthèse d'ADN nous a orienté vers l'hypothèse d'une interaction entre l'ADN polymérase D et le RF-C. Cette hypothèse a été renforcée par les résultats de double hybrides en système levure obtenus chez *P. horikoshii*. De plus, le domaine riches en charges, situé à l'extrémité C-terminale du RF-C avant la PIP-Box (voir annexe 3), pourrait se structurer lors d'une interaction protéine-protéine au niveau du PCNA. Afin d'obtenir des informations complémentaires, il serait intéressant de poursuivre les expériences de pull-down et d'y inclure des RF-C mutés dans le domaine chargé.

Obtention du facteur RP-A

Le facteur RP-A n'a pas été obtenu dans son intégralité. L'avancée des travaux fut positive en ce qui concerne la petite et la grande sous-unité. Cependant, la sous-unité intermédiaire n'a jamais été décelée. Intégrer ce facteur dans les tests de caractérisation fonctionnel peut nous aider à enrichir le modèle proposé. Il faut poursuivre ce travail en fonction des nouveaux outils disponibles sur le marché.

Valorisation biotechnologique :

Les facteurs accessoires des enzymes répliquatives thermostables présentent un intérêt important pour l'optimisation ou la création de techniques en biologie moléculaire. Dans ce contexte, des essais de PCR longue distance ont été effectués, avec l'ADN polymérase B en présence du PCNA (résultats non montrés), mais ne se sont pas avérés concluants.

En parallèle, notre partenaire industriel, MP Biomedicals, dans le cadre du programme européen RepBiotech, a travaillé avec les protéines accessoires RF-C et PCNA associées aux ADN polymérases, produites au laboratoire, et possède aujourd'hui des résultats prometteurs. Les connaissances fondamentales, acquises au laboratoire, ont été une aide importante pour ces recherches appliquées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protic, M., Hübscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**: 859-868.
- Abramova, N.A., Russell, J., Botchan, M., and Li, R. 1997. Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7186-7191.
- Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J.S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M.J., and Huang, P. 2005. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo J* **24**: 3482-3492.
- Allers, T., and Mevarech, M. 2005. Archaeal Genetics - The third way. *Nature Rev Genet* **6**: 58-73.
- Aota, S., Gojobori, T., Ishibashi, F., Maruyama, T., and Ikemura, T. 1988. Codon usage tabulated from the GenBank Genetic Sequence Data. *Nucleic Acids Res* **16**: r315-402.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. 1999. DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* **27**: 4658-4670.
- Ason, B., Handayani, R., Williams, C.R., Bertram, J.G., Hingorani, M.M., O'Donnell, M., Goodman, M.F., and Bloom, L.B. 2003. Mechanism of loading the Escherichia coli DNA polymerase III beta sliding clamp on DNA. Bona fide primer/templates preferentially trigger the gamma complex to hydrolyze ATP and load the clamp. *J Biol Chem* **278**: 10033-10040.
- Baker, T.A., and Bell, S.P. 1998. Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* **92**: 295-305.
- Baranov, V.I., and Spirin, A.S. 1993. Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol* **217**: 123-142.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., and Pace, N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9188-9193.
- Bastin-Shanower, S.A., and Brill, S.J. 2001. Functional analysis of the four DNA binding domains of replication protein A. The role of RPA2 in ssDNA binding. *J Biol Chem* **276**: 36446-36453.
- Bauer, M.W., Driskill, L.E., and Kelly, R.M. 1998. Glycosyl hydrolases from hyperthermophilic microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 141-145.
- Benkovic, S.J., Valentine, A.M., and Salinas F. 2001. Replisome-mediated DNA replication. *Annu Rev Biochem* **70**: 181-208.
- Berdis, A.J., and Benkovic, S.J. 1996. Role of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis in the assembly of the bacteriophage T4 DNA replication holoenzyme complex. *Biochemistry USA* **35**: 9253-9265.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414-417.
- Bochkarev, A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A.M. 1999. The crystal structure of the complex of replication protein A subunits RPA32 and RPA14 reveals a mechanism for single-stranded DNA binding. *Embo J* **18**: 4498-4504.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bochkareva, E., Belegu, V., Korolev, S., and Bochkarev, A. 2001. Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. *Embo J* **20**: 612-618.
- Böhlke, K., Pisani, F.M., Rossi, M., and Antranikian, G. 2002. Archaeal DNA replication: spotlight on a rapidly moving field. *Extremophiles* **6**: 1-14.
- Bohm, G., and Jaenicke, R. 1994. Relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins. *Int J Pept Protein Res.* **43**: 97-106.
- Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R. 2001. *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta. *Nucleic Acids Res* **29**: 4607-4616.
- Bowman, G.D., Goedken, E.R., Kazmirski, S.L., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 2005. DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS Lett* **579**: 863-867.
- Bowman, G.D., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 2004. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**: 724-730.
- Bravo, R., and Celis, J.E. 1980. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* **84**: 795-802.
- Brinkmann, U., Mattes, R.E., and Buckel, P. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**: 109-114.
- Brochier, C., Forterre, P., and Gribaldo, S. 2004. Archaeal phylogeny based on proteins of the transcription and translation machineries: tackling the *Methanopyrus kandleri* paradox. *Genome Biol* **5**: R17.
- Brochier, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., and Forterre, P. 2005. Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol* **6**: R42.
- Brown, S.H., and Kelly, R.M. 1993. Characterization of Amylolytic Enzymes, Having Both alpha-1,4 and alpha-1,6 Hydrolytic Activity, from the Thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2614-2621.
- Buchanan, C.L., Connaris, H., Danson, M.J., Reeve, C.D., and Hough, D.W. 1999. An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates. *Biochem J* **343 Pt 3**: 563-570.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., et al. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.
- Burbelo, P.D., Utani, A., Pan, Z.Q., and Yamada, Y. 1993. Cloning of the large subunit of activator 1 (replication factor C) reveals homology with bacterial DNA ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11543-11547.
- Burgers, P.M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C., Hanaoka, F., Hinkle, D.C., et al. 2001. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem* **276**: 43487-43490.
- Burggraf, S., Huber, H., and Stetter, K.O. 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 657-660.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bylund G.O., and Burgers, P.M.J. 2005. Replication Protein A-Directed Unloading of PCNA by the Ctf18 Cohesion Establishment Complex. *Mol Cell Biol* **25**: 5445-5455.
- Cai, J., Uhlmann, F., Gibbs, E., Flores-Rozas, H., Lee, C. G., Phillips, B., Finkelstein, J., Yao, N., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. 1996. Reconstitution of human replication factor C from its five subunits in baculovirus-infected insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 12896-12901.
- Calderone, T.L., Stevens, R.D., and Oas, T.G. 1996. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **262**: 407-412.
- Cambon Bonavita, M.A., Schmitt, P., Zieger, M., Flaman, J.M., Lesongeur, F., Raguene, G., Bindel, D., Frisch, N., Lakkis, Z., Dupret, D., et al. 2000. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles* **4**: 215-225.
- Cann, I.K., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. 1999. Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J Bacteriol* **181**: 6591-6599.
- Cann, I.K., Ishino, S., Yuasa, M., Daiyasu, H., Toh, H., and Ishino, Y. 2001. Biochemical analysis of replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**: 2614-2623.
- Carpentieri, F., De Felice, M., De Falco, M., Rossi, M., and Pisani, F.M. 2002. Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* **277**: 12118-12127.
- Chedin, F., Seitz, E.M., and Kowalczykowski, S.C. 1998. Novel homologs of replication protein A in archaea: implications for the evolution of ssDNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **23**: 273-277.
- Chen, Y.H., Kocherginskaya, S.A., Lin, Y., Sriratana, B., Lagunas, A.M., Robbins, J.B., Mackie, R.I., and Cann, I.K. 2005. Biochemical and mutational analyses of a unique clamp loader complex in the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J Biol Chem* **280**: 41852-41863.
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G., and Li, B.F. 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**: 1996-2000.
- Clark, A.B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R.K., and Kunkel, T.A. 2000. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J Biol Chem* **275**: 36498-36501.
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Querellou, J., Ripp, R., et al. 2003. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**: 1495-1512.
- Corn, J.E., and Berger, J.M. 2006. Regulation of bacterial priming and daughter strand synthesis through helicase-primase interactions. *Nucleic Acids Res* **34**: 4082-4088.
- Coughlan, M.P. 1990. Cellulose degradation by fungi. In *Microbial enzymes and biotechnology*, Elsevier Applied Science ed. (ed. W.M.F.a.C.T. Kelly), pp. 1-36, London.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cowan, D.A. 1992. Biochemistry and molecular biology of extremely thermophilic archaeobacteria. In *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. (eds. R.A. Herbert, and R.J. Sharp), pp. 1-43. Blackie & Son Ltd, Glasgow.
- Cull, M.G., and McHenry, C.S. 1995. Purification of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme. *Methods Enzymol* **262**: 22-35.
- Daimon, K., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Sako, Y., and Ishino, Y. 2002. Three proliferating cell nuclear antigen-like proteins found in the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*: interactions with the two DNA polymerases. *J Bacteriol* **184**: 687-694.
- Davey, M.J., Jeruzalmi, D., Kuriyan, J., and O'Donnell, M. 2002. Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 826-835.
- De Felice, M., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M., and Pisani, F.M. 1999. Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* **291**: 47-57.
- De Wachter, R., Willekens, P., and Zillig, W. 1989. Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA of the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Nucleic Acids Res* **17**: 5848.
- DeLong, E.F., and Pace, N.R. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**: 470-478.
- Dianova, II, Bohr, V.A., and Dianov, G.L. 2001. Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry USA* **40**: 12639-12644.
- Dill, K.A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry USA* **29**: 7133-7155.
- Diller, J.D., and Raghuraman, M.K. 1994. Eukaryotic replication origins: control in space and time. *Trends Biochem Sci* **19**: 320-325.
- Dionne, I., Robinson, N.P., McGeoch, A.T., Marsh, V.L., Reddish, A., and Bell, S.D. 2003. DNA replication in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem Soc Trans* **31**: 674-676.
- DiRuggiero, J., Brown, J.R., Bogert, A.P., and Robb, F.T. 1999. DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor? *J Mol Evol* **49**: 474-484.
- Dominguez, O., Ruiz, J.F., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M.A., Kirchhoff, T., Martinez, A.C., Bernad, A., and Blanco, L. 2000. DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *Embo J* **19**: 1731-1742.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., and Zeikus, J.G. 1997a. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3569-3576.
- Dong, G., Vieille, C., and Zeikus, J.G. 1997b. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3577-3584.
- Edgell, D.R., and Doolittle, W.F. 1997. Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* **89**: 995-998.
- Ellison, V., and Stillman, B. 2003. Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol* **1**: E33.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Erauso, G., Reysenbach, A.L., Godfroy, A., Meunier, J.R., Crump, B., Partensky, F., Baross, J.A., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N.R., et al. 1993. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch Microbiol* **160**: 338-349.
- Fiala, G., and Stetter, K.O. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch Microbiol* **145**: 56-61.
- Flores-Rozas, H., Clark, D., and Kolodner, R.D. 2000. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nat Genet* **26**: 375-378.
- Forterre, P. 2006. Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3669-3674.
- Forterre, P., Brochier, C., and Philippe, H. 2002. Evolution of the Archaea. *Theor Popul Biol* **61**: 409-422.
- Fotedar, R., Mossi, R., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Maga, G., Brickner, H., Messier, H., Kasibhatla, S., Hübscher, U., and Fotedar, A. 1996. A conserved domain of the large subunit of replication factor C binds PCNA and acts like a dominant negative inhibitor of DNA replication in mammalian cells. *Embo J* **15**: 4423-4433.
- Franklin, M.C., Wang, J., and Steitz, T.A. 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* **105**: 657-667.
- Frouin, I., Toueille, M., Ferrari, E., Shevelev, I., and Hübscher, U. 2005. Phosphorylation of human DNA polymerase lambda by the cyclin-dependent kinase Cdk2/cyclin A complex is modulated by its association with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res* **33**: 5354-5361.
- Fuchs, R.P., Fujii, S., Wagner, J. 2004. Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv Protein Chem* **69**: 229-264.
- Fukami-Kobayashi, J., and Mitsui, Y. 1999. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res* **246**: 338-347.
- Fukui, T., Yamauchi, K., Muroya, T., Akiyama, M., Maki, H., Sugino, A., and Waga, S. 2004. Distinct roles of DNA polymerases d and e at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* **9**: 179-191.
- Fuller, R.S., Funnell, B.E., and Kornberg, A. 1984. The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell* **38**, 889-900
- Garcia-Diaz, M., Dominguez, O., Lopez-Fernandez, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Parraga, M., Garcia-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., et al. 2000. DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* **301**: 851-867.
- Garrity, G.M., and Holt, J.G. 2002. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, R.D. Boone and R. W. Castenholz ed. Springer, New York, pp. 211-355.
- Glover, B.P., and McHenry, C.S. 2001. The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell* **105**: 925-934.
- Goedken, E.R., Kazmirski, S.L., Bowman, G.D., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 2005. Mapping the interaction of DNA with the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp loader complex. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 183-190.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gonzalez, J.M., Masuchi, Y., Robb, F.T., Ammerman, J.W., Maeder, D.L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J., and Kato, C. 1998. *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130.
- Green, C.M., Erdjument Bromage, H., Tempst, P., and Lowndes, N.F. 2000. A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Cur. Biol.* **10**: 39-42.
- Griffith, J.D., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. 2002. Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy. *J Biol Chem* **277**: 15233-15236.
- Grogan, D.W. 2004. Stability and repair of DNA in hyperthermophilic Archaea. *Curr Issues Mol Biol* **6**: 137-144.
- Gruz, P., Pisani, F.M., Shimizu, M., Yamada, M., Hayashi, I., Morikawa, K., and Nohmi, T. 2001. Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C. *J Biol Chem* **276**: 47394-47401.
- Guagliardi, A., Napoli, A., Rossi, M., and Ciaramella, M. 1997. Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein. *J Mol Biol* **267**: 841-848.
- Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J.P., and Dietrich, J. 2001. Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem* **268**: 5961-5969.
- Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 1996. Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* **87**: 297-306.
- Hanna, J.S., Kroll, E.S., Lundblad, V., and Spencer, F.A. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **21**: 3144-3158.
- He, Z., Brinton, B.T., Greenblatt, J., Hassell, J.A., and Ingles, C.J. 1993. The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell* **73**: 1223-1232.
- Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J., and Raffin, J.P. 2005. The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J Mol Biol* **350**: 53-64.
- Henneke, G., Gueguen, Y., Flament, D., Azam, P., Querellou, J., Dietrich, J., Hübscher, U., and Raffin, J.P. 2002. Replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* does not need ATP hydrolysis for clamp-loading and contains a functionally conserved RFC PCNA-binding domain. *J Mol Biol* **323**: 795-810.
- Henneke, G., Raffin, J.P., Ferrari, E., Jonsson, Z.O., Dietrich, J., and Hübscher, U. 2000. The PCNA from *Thermococcus fumicolans* functionally interacts with DNA polymerase delta. *Biochem Biophys Res Commun* **276**: 600-606.
- Hingorani, M.M., and O'Donnell, M. 1998. ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **273**: 24550-24563.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P., and Tainer J.A. 2001. Structural Biochemistry and Interaction Architecture of the DNA Double-Strand Break Repair Mre11 Nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105**: 473-485.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., and Stetter, K.O. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Huber, H., Hohn, M.J., Stetter, K.O., and Rachel, R. 2003. The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res Microbiol* **154**: 165-171.
- Hübscher, U., Maga, G., and Spadari, S. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163.
- Hübscher, U., and Seo, Y.S. 2001. Replication of the lagging strand: a concert of at least 23 polypeptides. *Mol Cells* **12**: 149-157.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A., and Zillig, W. 1983. Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *Embo J* **2**: 1291-1294.
- Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, C., and Tsurimoto, T. 2002. PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* **7**: 997-1007.
- Ikeda, M., and Clark, D.S. 1998. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng* **57**: 624-629.
- Imamura, M., Uemori, T., Kato, I., and Ishino, Y. 1995. A non-alpha-like DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biol Pharm Bull* **18**: 1647-1652.
- Ishino, S., Oyama, T., Yuasa, M., Morikawa, K., and Ishino, Y. 2003. Mutational analysis of *Pyrococcus furiosus* replication factor C based on the three-dimensional structure. *Extremophiles* **7**: 169-175.
- Ishino, Y., Komori, K., Cann, I.K., and Koga, Y. 1998. A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J Bacteriol* **180**: 2232-2236.
- Ishino, Y., Tsurimoto, T., Ishino, S., and Cann, I.K. 2001. Functional interactions of an archaeal sliding clamp with mammalian clamp loader and DNA polymerase delta. *Genes Cells* **6**: 699-706.
- Iwai, T., Kurosawa, N., Itoh, Y.H., and Horiuchi, T. 2000a. Phylogenetic analysis of archaeal PCNA homologues. *Extremophiles* **4**: 357-364.
- Iwai, T., Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Kimura, N., and Horiuchi, T. 2000b. Sequence analysis of three family B DNA polymerases from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfurisphaera ohwakuensis*. *DNA Res* **7**: 243-251.
- Jacobs, D.M., Lipton, A.S., Isern, N.G., Daughdrill, G.W., Lowry, D.F., Gomes, X., and Wold, M.S. 1999. Human replication protein A: global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *J Biomol NMR* **14**: 321-331.
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 2001a. Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of E-coli DNA polymerase III. *Cell* **106**: 429-441.
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 2002. Clamp loaders and sliding clamps. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 217-224.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y.X., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., M, O.D., and Kuriyan, J. 2001b. Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of E-coli DNA polymerase III. *Cell* **106**: 417-428.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. 2003. Ordered ATP hydrolysis in the gamma complex clamp loader AAA+ machine. *J Biol Chem* **278**: 14406-14413.
- Jokela, M., Eskelinen, A., Pospiech, H., Rouvinen, J., and Syvaaja, J.E. 2004. Characterization of the 3' exonuclease subunit DP1 of *Methanococcus jannaschii* replicative DNA polymerase D. *Nucleic Acids Res* **32**: 2430-2440.
- Jonsson, Z.O., Hindges, R., and Hübscher, U. 1998. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *Embo J* **17**: 2412-2425.
- Jónsson, Z.O., and Hübscher, U. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* **19**: 967-975.
- Keller, R.C., Mossi, R., Maga, G., Wellinger, R.E., Hübscher, U., and Sogo, J.M. 1999. Electron microscopic analysis reveals that replication factor C is sequestered by single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **27**: 3433-3437.
- Kelly, T.J., Simancek, P., and Brush, G.S. 1998. Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14634-14639.
- Kelman, Z., and Hurwitz, J. 1998. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci* **23**: 236-238.
- Kelman, Z., and Hurwitz, J. 2000. A unique organization of the protein subunits of the DNA polymerase clamp loader in the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH. *J Biol Chem* **275**: 7327-7336.
- Kelman, Z., and Hurwitz, J. 2003. Structural lessons in DNA replication from the third domain of life. *Nat Struct Biol* **10**: 148-150.
- Kelman, Z., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. 1998. Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure* **6**: 121-125.
- Kelman, Z., and White, M. F. 2005. Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* **8**: 669-676.
- Kelman, Z., and O'Donnell, M. 1995. Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res* **23**: 3613-3620.
- Kengen, S.W., Luesink, E.J., Stams, A.J., and Zehnder, A.J. 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur J Biochem* **213**: 305-312.
- Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., and Marians, K. J. 1996. Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* **84**: 643-650
- Kitabayashi, M., Nishiya, Y., Esaka, M., Itakura, M., and Imanaka, T. 2002. Gene cloning and polymerase chain reaction with proliferating cell nuclear antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2194-2200.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kleczkowska, H.E., Marra, G., Lettieri, T., and Jiricny, J. 2001. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes Dev* **15**: 724-736.
- Klink, T.A., Vicentini, A.M., Hofsteenge, J., and Raines, R.T. 2001. High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif* **22**: 174-179.
- Knibiehler, M., Goubin, F., Escalas, N., Jonsson, Z.O., Mazarguil, H., Hübscher, U., and Ducommun, B. 1996. Interaction studies between the p21Cip1/Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by surface plasmon resonance. *FEBS Lett* **391**: 66-70.
- Komori, K., and Ishino, Y. 2000. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'→5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Protein Eng* **13**: 41-47.
- Komori, K., and Ishino, Y. 2001. Replication protein A in *Pyrococcus furiosus* is involved in homologous DNA recombination. *J Biol Chem* **276**: 25654-25660.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. 1992. Three-dimensional structure of the β subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Kornberg, A., Lieberman, I., and Simms, E.S. 1955. Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosylpyrophosphate. *J Biol Chem* **215**: 389-402.
- Koundrioukoff, S., Jonsson, Z.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., and Hübscher, U. 2000. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem* **275**: 22882-22887.
- Krejci, L., and Sung, P. 2002. RPA not that different from SSB. *Structure* **10**: 601-602.
- Krishna, T.S.R., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M., and Kuriyan, J. 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**: 1233-1243.
- Krokan, H.E., Otterlei, M., Nilsen, H., Kavli, B., Skorpen, F., Andersen, S., Skjelbred, C., Akbari, M., Aas, P.A., and Slupphaug, G. 2001. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**: 365-386.
- Kurosawa, Y., Ogawa, T., Hirose, S., Okazaki, T., and Okazaki, R. 1975. Mechanism of DNA chain growth. XV. RNA-linked nascent DNA pieces in *Escherichia coli* strains assayed with spleen exonuclease. *J Mol Biol* **96**: 653-664.
- Lao-Sirieix, S.H., Pellegrini, L., and Bell, S.D. 2005. The promiscuous primase. *Trends Genet* **21**: 568-572.
- Lau, P.J., and Kolodner, R.D. 2003. Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mismatched bases in DNA. *J Biol Chem* **278**: 14-17.
- Lavrik, O.I., Khlimankov, D., and Khodyreva, S.N. 2003. [The eukaryotic replication complex and its affinity modification analysis]. *Mol Biol (Mosk)* **37**: 563-572.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D.H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* **264**: 6427-6437.
- Lecompte, O., Ripp, R., Puzos-Barbe, V., Duprat, S., Heilig, R., Dietrich, J., Thierry, J.C., and Poch, O. 2001. Genome evolution at the genus level: comparison of three complete genomes of hyperthermophilic archaea. *Genome Res* **11**: 981-993.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lee, I., Lokanath, N.K., Min, K., Ha, S.C., Kim, D.Y., and Kim, K.K. 2002. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of RFC boxes II-VIII of replication factor C from *Methanococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 519-521.
- Lee, S.H., and Hurwitz, J. 1990. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5672-5676.
- Lepage, E., Marguet, E., Geslin, C., Matte-Tailliez, O., Zillig, W., Forterre, P., and Tailliez, P. 2004. Molecular diversity of new Thermococcales isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1277-1286.
- Leu, F.P., Georgescu, R., and O'Donnell, M. 2003. Mechanism of the E. coli tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol Cell* **11**: 315-327.
- Leu, F.P., Hingorani, M.M., Turner, J., and O'Donnell, M. 2000. The delta subunit of DNA polymerase III holoenzyme serves as a sliding clamp unloader in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 34609-34618.
- Levin, D.S., Vijayakumar, S., Liu, X., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., and Tomkinson, A.E. 2004. A conserved interaction between the replicative clamp loader and DNA ligase in eukaryotes: implications for Okazaki fragment joining. *J Biol Chem* **279**: 55196-55201.
- Li, R., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. 1996. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr Biol* **6**: 189-199.
- Lin, Y., Robbins, J.B., Nyannor, E.K., Chen, Y.H., and Cann, I.K. 2005. A CCCH zinc finger conserved in a replication protein a homolog found in diverse Euryarchaeotes. *J Bacteriol* **187**: 7881-7889.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., and Melendy, T. 2006. Phosphorylation of replication protein A by S-phase checkpoint kinases. *DNA Repair (Amst)* **5**: 369-380.
- Loh, E., and Loeb, L.A. 2005. Mutability of DNA polymerase I: implications for the creation of mutant DNA polymerases. *DNA Repair (Amst)* **4**: 1390-1398.
- Loor, G., Zhang, S.J., Zhang, P., Toomey, N.L., and Lee, M.Y. 1997. Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res* **25**: 5041-5046.
- Lopez de Saro, F., Georgescu, R.E., Leu, F., and O'Donnell, M. 2004. Protein trafficking on sliding clamps. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 25-30.
- MacNeill, S.A. 2001. DNA replication: partners in the Okazaki two-step. *Curr Biol* **11**: R842-844.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-hall International, New Jersey, USA.
- Maga, G., and Hübscher, U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* **116**: 3051-3060.
- Maga, G., Stucki, M., Spadari, S., and Hübscher, U. 2000. DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol* **295**: 791-801.
- Maga, G., Villani, G., Tillement, V., Stucki, M., Locatelli, G.A., Frouin, I., Spadari, S., and Hübscher, U. 2001. Okazaki fragment processing: modulation of the strand displacement activity of DNA polymerase delta by the concerted action of replication protein A, proliferating cell nuclear antigen, and flap endonuclease-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14298-14303.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Makiniemi, M., Pospiech, H., Kilpelainen, S., Jokela, M., Vihinen, M., and Syvaaja, J.E. 1999. A novel family of DNA-polymerase-associated B subunits. *Trends Biochem Sci* **24**: 14-16.
- Maor-Shoshani, A., Ben-Ari, V., and Livneh, Z. 2003. Lesion bypass DNA polymerases replicate across non-DNA segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14760-14765.
- Maor-Shoshani, A., Reuven, N.B., Tomer, G., and Livneh, Z. 2000. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 565-570.
- Masumoto, H., Sugino, A., and Araki, H. 2000. Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 2809-2817.
- Mathews, M.B., Bernstein, R.M., Franza, B.R., Jr., and Garrels, J.I. 1984. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* **309**: 374-376.
- Matsumiya, S., Ishino, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. 2002. Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*. *Genes Cells* **7**: 911-922.
- Matsumiya, S., Ishino, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. 2003. Intermolecular ion pairs maintain the toroidal structure of *Pyrococcus furiosus* PCNA. *Protein Sci* **12**: 823-831.
- Matsumiya, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. 2001. Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci* **10**: 17-23.
- Matsunaga, F., Norais, C., Forterre, P., and Myllykallio, H. 2003. Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep.* **4**: 1-5.
- Matte-Tailliez, O., Brochier, C., Forterre, P., and Philippe, H. 2002. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. *Mol Biol Evol* **19**: 631-639.
- Mayanagi, K., Miyata, T., Oyama, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. 2001. Three-dimensional electron microscopy of the clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *J Struct Biol* **134**: 35-45.
- Mayer, M.L., Gygi, S.P., Aebersold, R., and Hieter, P. 2001. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **7**: 959-970.
- McGlynn, P., and Lloyd, R.G. 2002. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859-870.
- McIlwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. 2000. Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* **304**: 151-164.
- McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., and Sligar, S.G. 1998. Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 166-172.
- Merz, A., Knochel, T., Jansonius, J.N., and Kirschner, K. 1999. The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J Mol Biol* **288**: 753-763.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hübscher, U., Kasparikova, J., Brabec, V., and Naegeli, H. 2001. Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *Embo J* **20**: 3554-3564.
- Miura, M., and Sasaki, T. 1996. Effect of XPA gene mutations on UV-induced immunostaining of PCNA in fibroblasts from *xeroderma pigmentosum* group A patients. *Mutat Res* **364**: 51-56.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., and Tan, E.M. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* **121**: 2228-2234.
- Miyata, T., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. 2004. The clamp-loading complex for processive DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 632-636.
- Motz, M., Kober, I., Girardot, C., Loeser, E., Bauer, U., Albers, M., Moeckel, G., Minch, E., Voss, H., Kilger, C., et al. 2002. Elucidation of an archaeal replication protein network to generate enhanced PCR enzymes. *J Biol Chem* **277**: 16179-16188.
- Murby, M., Uhlen, M., and Stahl, S. 1996. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **7**: 129-136.
- Myllykallio, H., and Forterre, P. 2000. Mapping of a chromosome replication origin in an archaeon: response. *Trends Microbiol* **8**: 537-539.
- Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, A., and Nakanishi, M. 2000. Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta-related enzyme. *J Biol Chem* **275**: 31233-31238.
- Naktinis, V., Turner, J., and O'Donnell, M. 1996. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Cell* **84**: 137-145.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43.
- Nishida, H., Ishino, S., Miyata, T., Morikawa, K., and Ishino, Y. 2005. Identification of the critical region in replication factor C from *Pyrococcus furiosus* for the stable complex formation with proliferating cell nuclear antigen and DNA. *Genes Genet Syst* **80**: 83-93.
- O'Donnell, M., Jeruzalmi, D., and Kuriyan, J. 2001. Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Curr Biol* **11**: R935-946.
- Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., et al. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* **8**: 7-8.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Naktinis, V., Turner, J., Fang, L., and O'Donnell, M. 1995a. Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. I. Organization of the clamp loader. *J Biol Chem* **270**: 13348-13357.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Turner, J., Naktinis, V., and O'Donnell, M. 1995b. Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. III. Interface between two polymerases and the clamp loader. *J Biol Chem* **270**: 13366-13377.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Onrust, R., and O'Donnell, M. 1993. DNA polymerase III accessory proteins. II. Characterization of delta and delta'. *J Biol Chem* **268**: 11766-11772.
- Oyama, T., Ishino, Y., Cann, I.K., Ishino, S., and Morikawa, K. 2001. Atomic structure of the clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *Mol Cell* **8**: 455-463.
- Patel, P.H., and Loeb, L.A. 2001. Getting a grip on how DNA polymerases function. *Nat Struct Biol* **8**: 656-659.
- Perler, F.B., Kumar, S., and Kong, H.M. 1996. Thermostable DNA polymerases. In *Advances in Protein Chemistry*. (ed. M.W.W. Adams), pp. 377-435. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495.
- Podust, L.M., Podust, V.N., Sogo, J.M., and Hübscher, U. 1995a. Mammalian DNA polymerase auxiliary proteins: analysis of replication factor C-catalyzed proliferating cell nuclear antigen loading onto circular double-stranded DNA. *Mol Cell Biol* **15**: 3072-3081.
- Podust, V.N., Podust, L.M., Goubin, F., Ducommun, B., and Hübscher, U. 1995b. Mechanism of Inhibition of Proliferating Cell Nuclear Antigen-Dependent DNA Synthesis by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21. *Biochemistry USA* **34**: 8869-8875.
- Podust, V.N., Tiwari, N., Stephan, S., and Fanning, E. 1998. Replication factor C disengages from proliferating cell nuclear antigen (PCNA) upon sliding clamp formation, and PCNA itself tethers DNA polymerase delta to DNA. *J Biol Chem* **273**: 31992-31999.
- Pritchard, A.E., Dallmann, H.G., Glover, B.P., and McHenry, C.S. 2000. A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of deltadelta' with DnaX(4) forms DnaX(3)deltadelta'. *Embo J* **19**: 6536-6545.
- Rieu-Lesme, F., Delbes, C., and Sollelis, L. 2005. Recovery of partial 16S rDNA sequences suggests the presence of Crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Curr Microbiol* **51**: 317-321.
- Robbins, J.B., Murphy, M.C., White, B.A., Mackie, R.I., Ha, T., and Cann, I.K. 2004. Functional analysis of multiple single-stranded DNA-binding proteins from *Methanosarcina acetivorans* and their effects on DNA synthesis by DNA polymerase BI. *J Biol Chem* **279**: 6315-6326.
- Robinson, N.P., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V.L., Bernander, R., and Bell, S.D. 2004. Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell* **116**: 25-38.
- Rolland, J.L., Gueguen, Y., Flament, D., Pouliquen, Y., Street, P.F., and Dietrich, J. 2002. Comment on "The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* strain AN1": evidence that the unique N-terminal sequence proposed comes from a maltodextrin phosphorylase. *Extremophiles* **6**: 349-350.
- Ropp, P.A., and Copeland, W.C. 1996. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* **36**: 449-458.
- Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W., and Zubay, G. 1993. Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol* **175**: 716-722.
- Rossolillo, P., and Albertini, A.M. 2001. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *yshD* gene, a *mutS* paralogue. *Mol Gen Genet* **264**: 809-818.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Salles-Passador, I., Munshi, A., Cannella, D., Pennaneach, V., Koundrioukoff, S., Jaquinod, M., Forest, E., Podust, V., Fotedar, A., and Fotedar, R. 2003. Phosphorylation of the PCNA binding domain of the large subunit of replication factor C on Thr506 by cyclin-dependent kinases regulates binding to PCNA. *Nucleic Acids Res* **31**: 5202-5211.
- Sartori, A.A., and Jiricny, J. 2003. Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem* **278**: 24563-24576.
- Scherrer, B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin éditeur, Montréal, pp. 850.
- Schleper, C., DeLong, E.F., Preston, C.M., Feldman, R.A., Wu, K.Y., and Swanson, R.V. 1998. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J Bacteriol* **180**: 5003-5009.
- Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F.M., Young, D., Bazett-Jones, D.P., and Riabowol, K. 2001. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3455-3462.
- Seetharam, R., Heeren, R.A., Wong, E.Y., Bradford, S.R., Klein, B.K., Aykent, S., Kotts, C.E., Mathis, K.J., Bishop, B.F., Jennings, M.J., et al. 1988. Mistranslation in IGF-1 during over-expression of the protein in *Escherichia coli* using a synthetic gene containing low frequency codons. *Biochem Biophys Res Commun* **155**: 518-523.
- Seitz, E. M., Haseltine, C. A., and Kowalczykowski S. C. 2001. DNA Recombination and Repair in the Archaea. *Adv Appl Microbiol* **50**:101-169
- Seybert, A., Scott, D.J., Scaife, S., Singleton, M.R., and Wigley, D.B. 2002. Biochemical characterisation of the clamp/clamp loader proteins from the euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nucleic Acids Res* **30**: 4329-4338.
- Seybert, A., and Wigley, D.B. 2004. Distinct roles for ATP binding and hydrolysis at individual subunits of an archaeal clamp loader. *Embo J* **23**: 1360-1371.
- Shamoo, Y., and Steitz, T.A. 1999. Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* **99**: 155-166.
- Sharief, F.S., Vojta, P.J., Ropp, P.A., and Copeland, W.C. 1999. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics* **59**: 90-96.
- Shcherbakova, P.V., Bebenek, K., and Kunkel, T.A. 2003. Functions of eukaryotic DNA polymerases. *Sci Aging Knowledge Environ* **2003**: RE3.
- Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawarabayashi, Y., and Matsui, I. 2001. Invariant Asp-1122 and Asp-1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem* **276**: 27376-27383.
- Shen, Y., Tang, X.F., and Matsui, I. 2003. Subunit interaction and regulation of activity through terminal domains of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem* **278**: 21247-21257.
- Shin, D.S., Pellegrini, L., Daniels, D.S., Yelent, B., Craig, L., Bates, D., Yu, D.S., Shivji, M.K., Hitomi, C., Arvai, A.S., et al. 2003. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *Embo J* **22**: 4566-4576.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shiomi, Y., Shinozaki, A., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., and Tsurimoto, T. 2004. The reconstituted human Chl12-RFC complex functions as a second PCNA loader. *Genes Cells* **9**: 279-290.
- Shivji, K.K., Kenny, M.K., and Wood, R.D. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**: 367-374.
- Spanjaard, R.A., Chen, K., Walker, J.R., and van Duin, J. 1990. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). *Nucleic Acids Res* **18**: 5031-5036.
- Steitz, T.A. 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* **274**: 17395-17398.
- Studwell-Vaughan, P.S., and O'Donnell, M. 1991. Constitution of the twin polymerase of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **266**: 19833-19841.
- Sutton, M.D., and Walker, G.C. 2001. Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8342-8349.
- Sutton, M.D., Carr, K.M., Vicente, M., and Kaguni J.M. 1998. *Escherichia coli* DnaA Protein The N-Terminal domain and loading of DnaB helicase at the *E. coli* chromosomal origin. *J Biol Chem* **273**: 34255-34262.
- Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. 1997. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell* **90**: 649-660.
- Tang, X.F., Shen, Y., Matsui, E., and Matsui, I. 2004. Domain topology of the DNA polymerase D complex from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry USA* **43**: 11818-11827.
- Tom, S., Henricksen, L.A., and Bambara, R.A. 2000. Mechanism whereby proliferating cell nuclear antigen stimulates flap endonuclease 1. *J Biol Chem* **275**: 10498-10505.
- Trakselis, M.A., Roccasecca, R.M., Yang, J., Valentine, A.M., and Benkovic, S.J. 2003. Dissociative properties of the proteins within the bacteriophage T4 replisome. *J Biol Chem* **278**: 49839-49849.
- Tsurimoto, T., and Stillman, B. 1991. Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* **266**: 1950-1960.
- Uemori, T., Ishino, Y., Toh, H., Asada, K., and Kato, I. 1993. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **21**: 259-265.
- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., and Ishino, Y. 1997. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus* : gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells* **2**: 499 - 512.
- Uhlmann, F., Cai, J., Gibbs, E., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. 1997. Deletion analysis of the large subunit p140 in human replication factor C reveals regions required for complex formation and replication activities. *J Biol Chem* **272**: 10058-10064.
- Unk, I., Haracska, L., Gomes, X.V., Burgers, P.M., Prakash, L., and Prakash, S. 2002. Stimulation of 3'-->5' exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities of yeast apn2 by proliferating cell nuclear antigen. *Mol Cell Biol* **22**: 6480-6486.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A.G., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. 2000. Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* **275**: 16810-16819.
- van de Vossenbergh, J.L., Driessen, A.J., and Konings, W.N. 1998. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**: 163-170.
- van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* **6**: 213-218.
- Venclovas, C., Colvin, M.E., and Thelen, M.P. 2002. Molecular modeling-based analysis of interactions in the RFC-dependent clamp-loading process. *Protein Sci* **11**: 2403-2416.
- Vieille, C., and Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 1-43.
- Waga, S., and Stillman, B. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **67**: 721-751.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R.P., and Nohmi T. 1999. The *dinB* Gene Encodes a Novel *E. coli* DNA Polymerase, DNA Pol IV, Involved in Mutagenesis. *Mol. Cell* **4**: 281-286.
- Wagner, J., and Nohmi, T. 2000. *Escherichia coli* DNA Polymerase IV Mutator Activity: Genetic Requirements and Mutational Specificity. *J Bacteriol* **182**: 4587-4595.
- Walter, J., and Newport, J. 2000. Initiation of eukaryotic DNA replication: Origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase α . *Mol. Cell* **5**: 617-627.
- Wang, X., and Haber, J.E. 2004. Role of *saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol* **2**: E21.
- Wang, Z., Castano, I.B., De Las Penas, A., Adams, C., and Christman, M.F. 2000. Pol kappa: A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion. *Science* **289**: 774-779.
- Warbrick, E. 1998. PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays* **20**: 195-199.
- Warbrick, E. 2000. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22**: 997-1006.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Söll, D., Stetter, K. O., Short, J. M. and Noordewier M. 2003. The genome of Nanoarchaeum equitans: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12984-12988.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. 1953a. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**: 964-967.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. 1953b. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738.
- White, M.F., and Bell, S.D. 2002. Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends Genet* **18**: 621-626.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5088-5090.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579.
- Wold, M.S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**: 61-92.
- Wood, R.D. 1999. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* **81**: 39-44.
- Wu, X., Yang, Z., Liu, Y., and Zou, Y. 2005. Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. *Biochem J* **391**: 473-480.
- Xu, H., Zhang, P., Liu, L., and Lee, H. 2001. A novel PCNA-binding motif identified by the fanning of a random peptide display library. *Biochemistry USA* **40**: 4512-4520.
- Yao, N., Coryell, L., Zhang, D., Georgescu, R.E., Finkelstein, J., Coman, M.M., Hingorani, M.M., and O'Donnell, M. 2003. Replication factor C clamp loader subunit arrangement within the circular pentamer and its attachment points to proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **278**: 50744-50753.
- Yao, N., Johnson, A., Bowman, G., Kuriyan, J., and O'Donnell, M. 2006. Mechanism of PCNA clamp opening by RF-C. *J Biol Chem* **281**: 17528-17539.
- Yao, N., Leu, F.P., Anjelkovic, J., Turner, J., and O'Donnell, M. 2000. DNA structure requirements for the Escherichia coli gamma complex clamp loader and DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **275**: 11440-11450.
- Yao, N., Turner, J., Kelman, Z., Stuckenberg, P.T., Dean, F.B., Shechter, D., Pan, Z.Q., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. 1996. Clamp-loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, *E. coli* and T4 replicases. *Genes to Cells* **1**: 101-113.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. 1999. Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *Embo J* **18**: 6189-6199.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, and Petsko, G.A. 1998. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7406-7411.
- Zhang, P., Mo, J.Y., Perez, A., Leon, A., Liu, L., Mazloum, N., Xu, H., and Lee, M.Y. 1999. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem* **274**: 26647-26653.
- Zhang, S.J., Zeng, X.R., Zhang, P., Toomey, N.L., Chuang, R.Y., Chang, L.S., and Lee, M.Y. 1995. A conserved region in the amino terminus of DNA polymerase delta is involved in proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem* **270**: 7988-7992.
- Zillig, W., Tu, J., and Holz, I. 1981. Thermoproteales--a third order of thermoacidophilic archaeobacteria. *Nature* **293**: 85-86.
- Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S.J. 2002. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* **16**: 198-208.
- Zubay, G. 1973. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet* **7**: 267-287.

ANNEXES

ANNEXE 1 : travaux effectués sur le RP-A

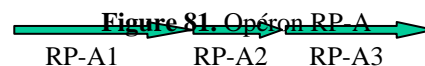
L'analyse de la séquence du génome de *Pyrococcus abyssi* (souche GE5 / Orsay) a permis de localiser les trois gènes du facteur RP-A agencés en opéron (figure 81) et codant pour les trois sous-unités protéiques. Ces gènes sont référencés sous les numéros d'accèsion PAB 2163, PAB 2164 et PAB 2165 pour RP-A1, RP-A2 et RP-A3.

L'analyse de la séquence nucléotidique (ORF, motifs,...) a permis de déterminer la taille de chaque gène et la masse molaire des protéines correspondantes :

RP-A1 : 1074 pb (358 AA) ; 39 kDa

RP-A2 : 352 pb (117 AA) ; 13 kDa

RP-A3 : 804 pb (268 AA) ; 29 kDa



I. Obtention des constructions plasmidiques portant les gènes du RP-A :

I.1. Sélection et amplification :

Les gènes correspondants aux sous unités du RP-A ainsi qu'à l'opéron entier ont été isolés et amplifiés par PCR sur l'ADN génomique de *P. abyssi*. L'ADN polymérase *Pfu* a été utilisé pour son activité correctrice d'erreurs mais n'a pas permis d'obtenir une amplification du gène RP-A1 et de l'opéron. Une amplification avec l'ADN polymérase *Taq* a donc été réalisée ; le nombre de cycles a été réduit à douze afin de limiter les erreurs d'incorporation (figure 82).

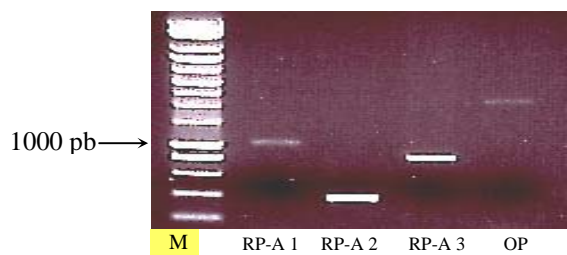


Figure 82. migration des produits de PCR purifiés sur gel d'agarose 0,8 %

M : SmartLadder 5 μ l

RP-A1 : amplification Taq 12 cycles 5 μ l

RP-A2 : amplification Pfu 20 cycles 5 μ l

RP-A3 : amplification Pfu 20 cycles 5 μ l

OP : amplification Pfu 20 cycles 5 μ l

I.2. Clonage en vecteur d'expression :

Les produits de PCR RP-A2 et 3 ont été clonés en vecteur de stabilisation TOPO Blunt ; les produits de PCR RP-A1 et opéron n'ont pu être intégrés en vecteur de stabilisation et ont été directement insérés dans un vecteur d'expression. Les produits de PCR ou les inserts extraits du vecteur de stabilisation ont été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nde*I. Ils ont ensuite été insérés par ligature en vecteur pET25b(+) puis transfectés en stock ; la présence des inserts a été vérifiée par PCR sur clone (figure 83).

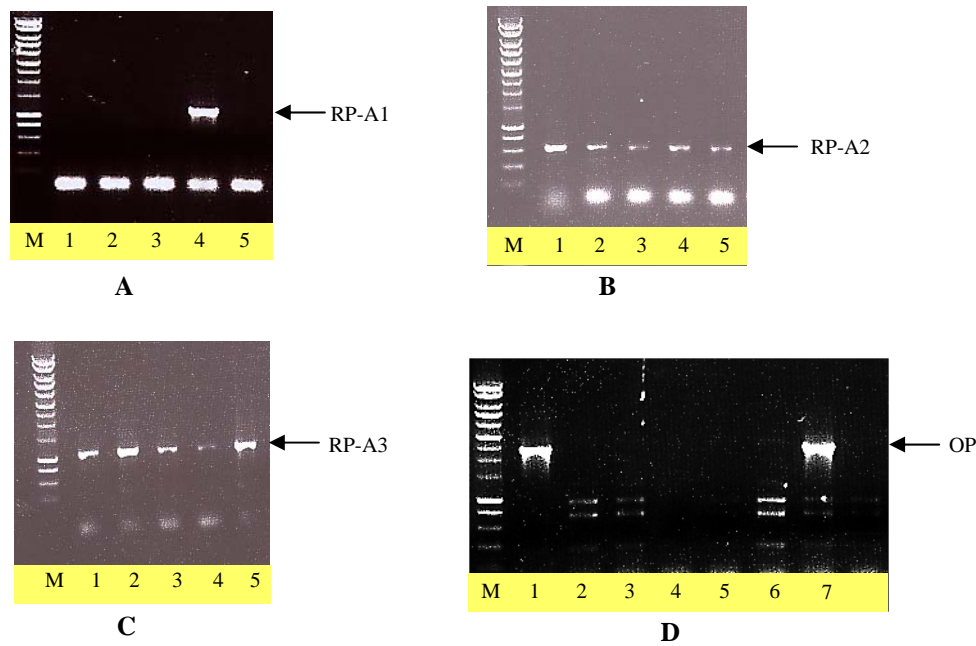


Figure 83. migration de 5 μ l des produits de la PCR effectuée sur **A** : 5 clones RP-A1, **B** : 5 clones RP-A2, **C** : 5 clones, **D** : 7 clones OP, avec les amorces entourant l'insert sur le vecteur pET25b(+) en cellule DH5 α
M : SmartLadder 5 μ l

Les clones possédant les inserts RP-A2 et 3 ont été aisément obtenus, cependant que un seul clone contenant l'insert RP-A1 et seulement deux contenant l'opéron ont été obtenus après de nombreuses tentatives.

Un deuxième contrôle par digestion avec les enzymes de restriction adéquates a permis de vérifier la présence des fragments de taille attendue sur gel (figure 84).

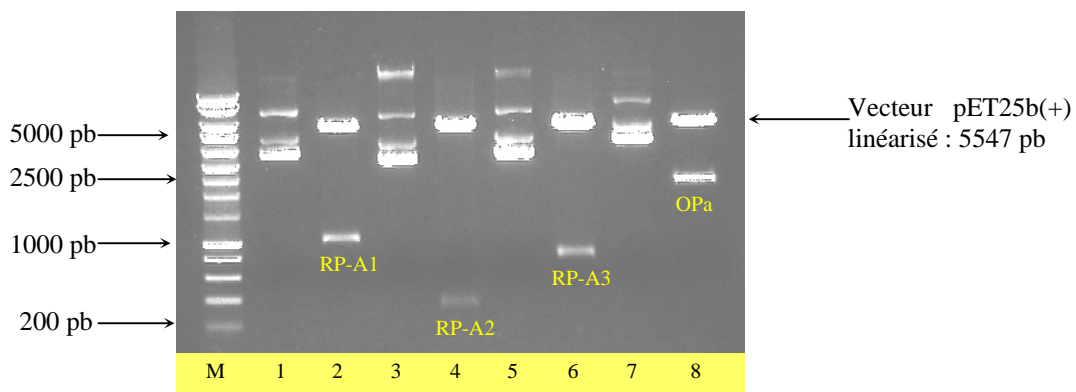


Figure 84 migration sur gel d'agarose 0,8% des plasmides pET25b(+) extraits et digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nde*I.

M : Smart ladder 5 μ l

1 : vecteur pET25b(+) portant RP-A1 avant digestion 5 μ l / **2** : après digestion 10 μ l

3 : vecteur pET25b(+) portant RP-A2 avant digestion 5 μ l / **4** : après digestion 10 μ l

5 : vecteur pET25b(+) portant RP-A3 avant digestion 5 μ l / **6** : après digestion 10 μ l

7 : vecteur pET25b(+) portant OPa avant digestion 5 μ l / **8** : après digestion 10 μ l

Le contrôle par séquençage a permis de valider l'intégrité des gènes codant pour les protéines RP-A2 et 3. Par contre, une mutation a été mise en évidence au début du gène RP-A1, et deux autres mutations au milieu de l'opéron (à la fin du gène RP-A1).

II. Expression des protéines recombinantes :

Le choix des cellules d'expression a été orienté par la présence, dans la séquence des trois sous-unités, de codons arginine AGA et AGG, très rares chez *E. coli* (Aota *et al.* 1988). Les souches utilisées (BL21-CodonPlus (DE3)-Ril de Stratagene et Rosetta de Novagen) permettent l'expression de gènes portant des codons rares pour *E. coli*. Elles sont également préconisées pour atténuer les problèmes de faible niveau d'expression (Brinkmann *et al.* 1989), de changement du cadre de lecture (Spanjaard *et al.* 1990), d'arrêt prématuré de la traduction (Rosenberg *et al.* 1993) ou de mauvaises incorporations d'acides aminés (Seetharam *et al.* 1988; Calderone *et al.* 1996).

Les résultats présentés sont issus des tests effectués à partir de l'induction des cellules BL21-DE3-Ril (Stratagene). L'expression en cellules Rosetta, donne des résultats semblables après induction à l'IPTG.

II.1. Obtention d'une protéine RP-A1 tronquée :

Après induction à l'IPTG 1mM pendant 5 heures des cellules d'expression BL21-DE3-Ril (Stratagene) portant le vecteur pET25b(+) avec l'insert RP-A1, deux bandes sont observées sur gel (figure 85). Ces bandes correspondent probablement à la sous-unité 1 du RP-A de *P. abyssi*, car elles ne sont pas visibles sur les profils des témoins sans insert. Cependant, leurs masses de 32 et 36 kDa environ sont plus faibles que la protéine de 39 kDa attendue.

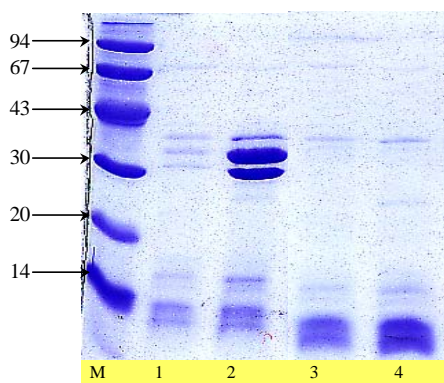


Figure 85. Expression de RP-A1

Gel SDS-PAGE 12% : Migration, après choc thermique, de 10 μ l de l'extrait cellulaire d'*E. coli* DE3-Ril transformé par le vecteur pET25b(+) portant le gène codant pour la protéine RP-A1

M : Marqueur LMW en kDa ; **1 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A1 non induit ; **2 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A1 induit 5 h, IPTG 1mM ; **3 :** Témoin DE3-Ril/pET25b(+) sans insert non induit ; **4 :** Témoin DE3-Ril/pET25b(+) sans insert induit 5h, IPTG 1mM

La lyse des cellules induites a été effectuée avec un tampon contenant des antiprotéases et le même profil est obtenu : il ne s'agit probablement pas d'une lyse protéolytique. Les travaux effectués sur

l'expression du RP-A1 de *P. furiosus* montre également deux bandes, dont une à la taille attendue (Komori et Ishino 2001) mais aucune interprétation n'est fournie sur la seconde dans la publication.

Le séquençage du gène RP-A1 a mis en évidence la présence d'une mutation de type délétion au niveau de l'amorce SU1-1. Cette mutation provoque un décalage de la phase ouverte de lecture, engendrant la présence de deux codons stop, 30 nucléotides en aval du codon ATG initiateur. De ce fait, le prochain codon ATG se trouve 54 nucléotides en aval sur le gène (figure 86) ; cela correspond à 18 acides aminés ayant un poids moléculaire de 2,1 kDa. Ajouté aux 36 kDa observés, cela correspond à une protéine proche des 39 kDa attendus.

Le séquençage peptidique en N-terminal des protéines obtenues a donné la séquence MSREEI, confirmant qu'il manque les 18 premiers acides aminés.

En ce qui concerne la plus petite des deux bandes, il pourrait s'agir d'un arrêt prématuré de la traduction au niveau des zones riches en codons rares AGA et AGG entre les positions 864 et 984 (figure 86). Bien qu'ayant choisi les cellules d'expression en fonction de cette particularité ; il se peut que les ARNt-codons rares sollicités pour cette traduction soit exprimés en quantité insuffisante par rapport au nombre de protéines produites.

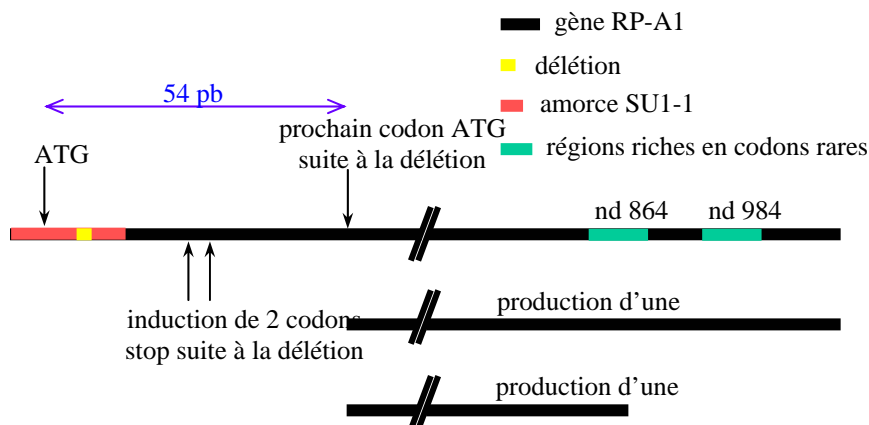


Figure 86. conséquence de la mutation de type délétion localisée chez la sous-unité RP-A1 après séquençage

La délétion étant localisée en début de gène, au niveau de la zone correspondant à l'amorce, l'hypothèse d'une mauvaise synthèse de l'oligonucléotide pouvait être envisagée. Cependant après avoir effectué une mutagenèse dirigée afin de réinsérer le nucléotide manquant, le seul clone obtenu présentait une nouvelle délétion en début de gène (figure 87.3).

Le RP-A étant un facteur de réplication qui se lie à l'ADN simple brin, il est possible qu'il soit toxique pour la cellule transfectée. Même si le promoteur T7 sur le plasmide est réprimé en l'absence d'IPTG, une expression basale (figure 85 ; puits 1) suffit à produire une protéine toxique pour *E. coli*. Cela

explique la difficulté à obtenir des clones et la délétion induite au niveau de la séquence du seul clone obtenu.

- 1 ATG ACG GTG TTG ACG AAG GAT AGG
- 2 ATG ACG GTG TTG XCG AAG GAT AGG
- 3 ATG ACG GTG TTG ACG AAG GXT AGG
- 4 ATG ACG GTG GTG ACG AAG GAT AGG
- 5 ATG ACA GTX TTG XCG AAG GAT AGG
- 6 ATG ACA GTA TCG ACG AAG GAT AGG

Figure 87. zone critique où sont localisées les mutations

1. séquence intègre désirée ; 2. Séquence du premier clone obtenu après transformation en cellule DH5 α ; 3. Après mutagenèse dirigée et transformation en cellule XL1blue ; 4. Après mutagenèse dirigée et transformation en cellule SURE2 ; 5, 6. Après mutagenèse dirigée et transformation en cellule DH5 α

Cependant, au cours d'une série de mutagenèses dirigées, deux clones ne présentant pas de délétion ont été obtenus, mais une mutation de type transition (figure 87.4 et 6) : la leucine en position 4 était mutée en valine ou en sérine.

Après transformation en cellule d'expression, une induction a été réalisée mais n'a pas permis la production de protéine recombinante. Une extraction plasmidique avant et après induction révèle une perte de plasmide.

II.2. Obtention de la protéine RP-A2 :

Les tests d'induction réalisés sur les cellules DE3-Ril, portant le vecteur pET25b(+) avec l'insert RP-A2, ont été satisfaisants. La protéine a été obtenue de manière reproductible, en forte concentration, et migre à la taille attendue de 13 kDa (figure 88 ; puits 2). Son séquençage peptidique en N-terminal, par la méthode d'Edman, indique l'enchaînement MEVQVRR, correspondant à la séquence protéique attendue.

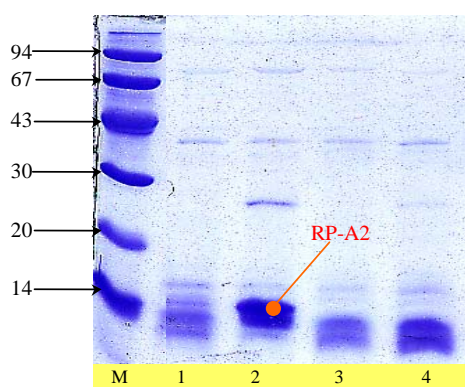


Figure 88. Expression de RP-A2

Gel SDS-PAGE 12% : Migration, après choc thermique, de 10 μ l de l'extrait cellulaire d'*E. coli* DE3-Ril transformé par le vecteur pET25b(+) portant le gène codant pour la protéine RP-A1

M : Marqueur LMW en kDa ; **1** : DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A2 non induit ; **2** : DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A2 induit 5 h, IPTG 1mM ; **3** : Témoin DE3-Ril/pET25b(+) sans insert non induit ; **4** : Témoin DE3-Ril/pET25b(+)sans insert induit 5h, IPTG 1mM

II.3. La protéine RP-A3 n'est pas exprimée :

Les tests d'expression réalisés en vue d'obtenir la protéine RP-A3 de 29 kDa n'ont pas été concluants. La migration des extraits cellulaires n'a pas mis en évidence la bande protéique recherchée avec les deux souches d'expression utilisées. L'observation, par microscopie en contraste de phase, des cultures induites a révélé la présence de corps d'inclusion réfringents aux extrémités polaires des bacilles. Cette observation suggère que la protéine est bien exprimée mais sous forme insoluble et qu'elle se concentre sous forme d'agrégats dans la cellule, empêchant ainsi sa solubilisation dans le tampon lors de la lyse cellulaire. Une analyse, par SDS-PAGE, des protéines contenues dans le culot n'a cependant pas permis de la mettre en évidence.

A partir de la littérature évoquant les problèmes liés à l'expression de protéines recombinantes (Murby *et al.* 1996; Klink *et al.* 2001), plusieurs essais ont été effectués. La température d'incubation a été diminuée jusqu'à 20°C afin d'augmenter la solubilité des protéines, différents temps d'induction en présence de concentration variables d'IPTG ont été testés, mais sans succès. Le tampon de sonication a été optimisé par ajout de MgCl₂ et de Triton-X100 (détergent non ionique permettant la solubilisation de certains composés membranaires) ; en présence ou non d'anti-protéases, aucune protéine de 29 kDa n'est révélée sur SDS-PAGE.

II.4. Expression de l'opéron RP-A :

Le profil d'expression de la construction portant le gène opéron met également en évidence des bandes correspondant à la protéine RP-A2 et à la protéine RP-A1. Une autre bande, de taille correspondant à la protéine RP-A3 est également observée (figure 89). Cependant, le séquençage peptidique de cette bande ne confirme pas la présence de la protéine recherchée.

En comparaison avec le profil de l'expression du gène *RP-A1* seul, la bande protéique supérieure, correspondant à l'expression de RP-A1 observée au niveau du profil d'expression de l'opéron migre à la taille attendue. Cependant le séquençage peptidique met toujours en évidence une protéine tronquée des 18 premiers acides aminés, malgré l'intégrité du début du gène *RP-A1*. Un remaniement de type délétion, au niveau de la zone critique, précédemment évoquée, a pu se produire lors de la mise en culture et de l'induction des cellules d'expression portant le gène opéron.

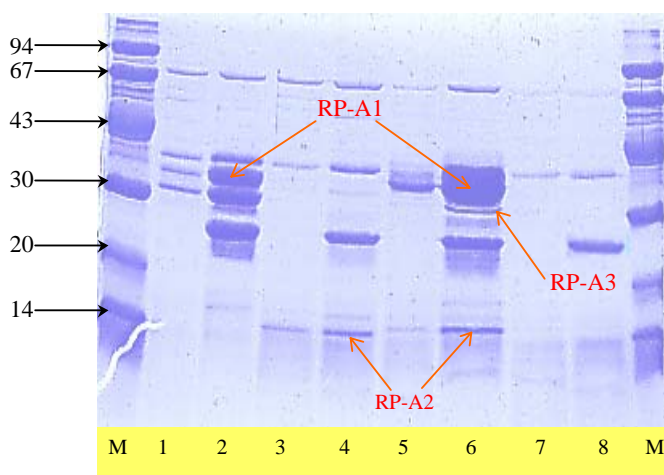


Figure 89. Expression de l'opéron

Gel SDS-PAGE 12% : Migration de l'extrait cellulaire d'*E. coli* DE3-Ril transformé par le vecteur pET25b(+)/OP

M : Marqueur LMW en kDa ; **1 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A1 non induit ; **2 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A1 induit 5 h, IPTG 1mM ; **3 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A2 non induit ; **4 :** DE3-Ril/pET25b(+)/RP-A2 induit 5 h, IPTG 1mM ; **5 :** DE3-Ril/pET25b(+)/OP non induit ; **6 :** DE3-Ril/pET25b (+)/OP induit 5 h, IPTG 1mM ; **7 :** Témoin DE3-Ril/pET25b(+) sans insert non induit ; **8 :** Témoin DE3-Ril/pET25b(+)sans insert induit 5h, IPTG 1mM

III. Coexpression des trois sous unités du RP-A

Afin de résoudre les problèmes de perte du plasmide portant l'insert RP-A1 et l'absence d'expression du gène *RP-A3*, une nouvelle construction génétique a été menée avec Jean-Paul Raffin.

Ainsi, les plasmides pET26b(+) portant le gène *RP-A1* avec une mutation et pET28b(+) portant les gènes *RP-A2* et *RP-A3* ont été transfectés dans une cellule d'expression DE3-Ril. Le gène *RP-A1* choisi est celui portant la transition de la leucine en valine. Nous avons supposé que l'absence d'un carbone ne devait pas affecter les caractéristiques fonctionnelles de la protéine tandis que le groupement hydroxyle polaire porté par la sérine peut avoir plus d'influence.

Après vérification de la présence des plasmides dans les cellules d'expression, une induction a été réalisée à 37°C pendant 16 heures en présence de 1 mM d'IPTG.

Après trois passages sur la presse de French et choc thermique, le profil protéique a été observé sur gel SDS-PAGE. La production d'une protéine RP-A1(L4V), à la taille attendue, est observée lorsque le plasmide correspondant est coexprimé avec celui portant les gènes RP-A2 et 3 (figure 90). Une faible bande correspondant à la protéine RP-A2 est observée ainsi qu'une bande pouvant être la protéine RP-A3. Une autre bande, beaucoup plus difficile à voir sur cette figure, est également observée autour de 30 kDa.

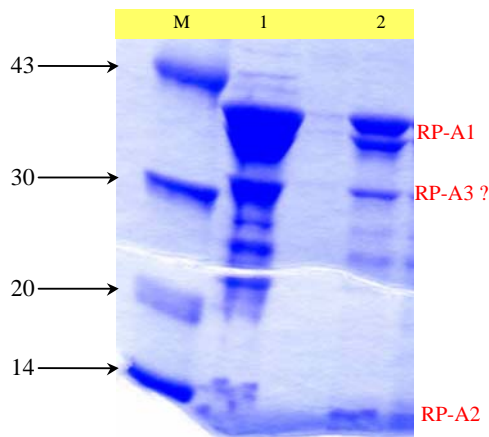


Figure 90. Coexpression des trois sous-unités RP-A1, 2 et 3.

Gel SDS-PAGE 12% : Migration de l'extrait cellulaire d'*E. coli* DE3-Ril transformé par les vecteurs pET25b(+)/RP-A1(L4V) et pET28b(+)/RP-A2+RP-A3. Induction IPTG 1 mM pendant 16 heures

M : Marqueur LMW en kDa ; **1** : dépôt de 10 µl ; **2** : dépôt de 10 µl 1/10

III.1. Purification de l'extrait protéique sur colonne d'ADN simple brin :

La particularité du RP-A étant de se lier à l'ADN simple brin, une purification a été effectuée sur une colonne de cellulose couplé à de l'ADN simple brin et équilibrée en tampon C1. L'éluion a été effectuée par un gradient de NaCl.

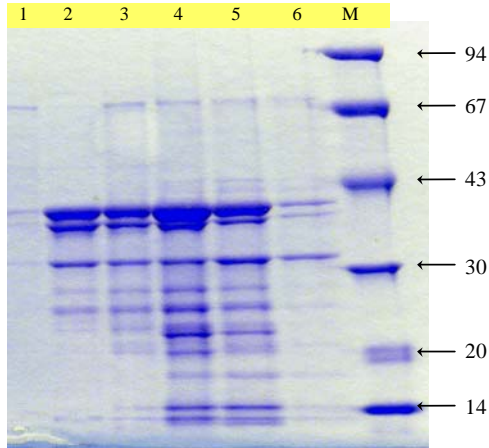


Figure 91. Purification sur colonne DNA-Cellulose (Amersham)

1. lavage de la colonne avec le tampon C1 après avoir déposé les protéines.

2-6 Elution avec le tampon C1 avec respectivement 250, 500, 750, 1000 et 1250 mM de NaCl.

Les profils d'éluion montrent que le RP-A est décroché de la colonne à partir de 250 mM de concentration en sel (figure 91 ; puits 2). La fraction contenant le plus de protéines est visualisée pour une concentration de 750 mM en NaCl. Un nombre important de bandes protéiques, à part la BSA, est observé au niveau des profils d'éluion, laissant supposer qu'un grand nombre de protéines peut se fixer sur la résine.

L'échantillon, correspondant à la fraction 4, a été analysé, afin d'obtenir les séquences de quatre protéines en spectrométrie de masse.

III.2. Analyse par spectrométrie de masse :

L'échantillon a été envoyé à Innova Proteomics, société gestionnaire de la plate-forme protéomique de Rennes. Quatre bandes ont été sélectionnées afin de séquencer les protéines par spectrométrie de masse ; deux bandes pouvant correspondre à la sous-unité RP-A1 (figure 92 ; 01 et 02) et deux bandes à la sous-unité RP-A3 (figure 92 ; 03 et 04).

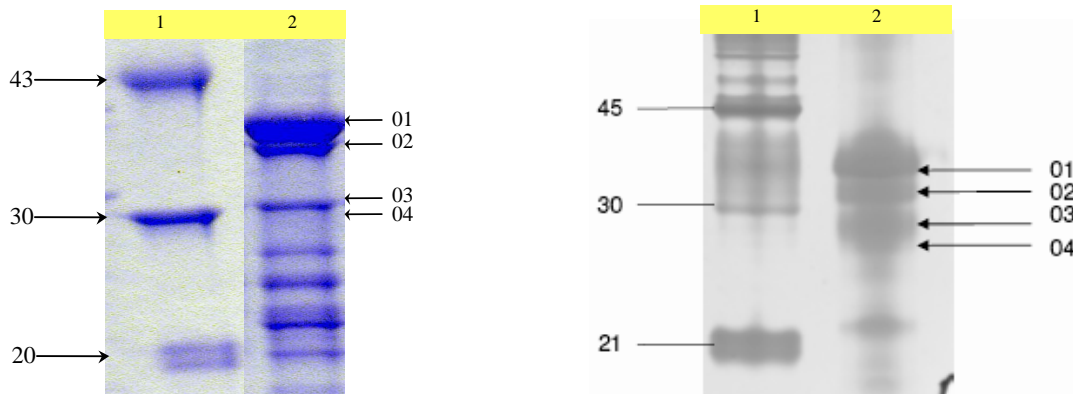


Figure 92. Sélection des protéines destinée au séquençage par spectrométrie de masse (01-04).

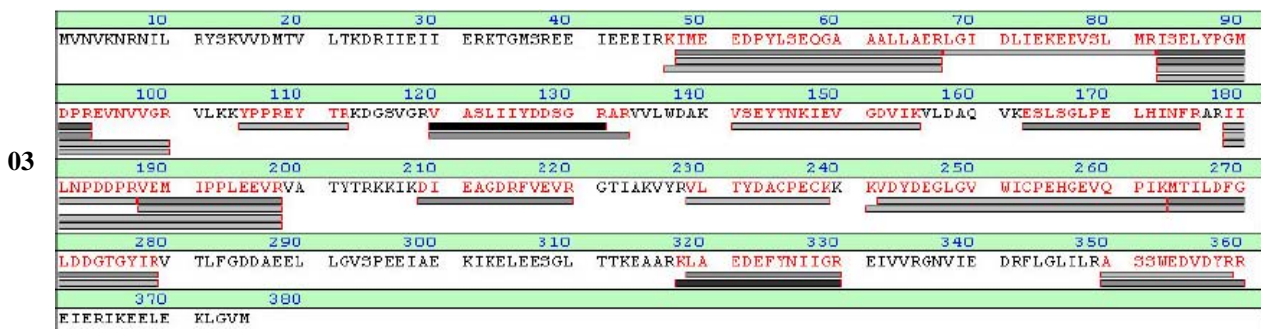
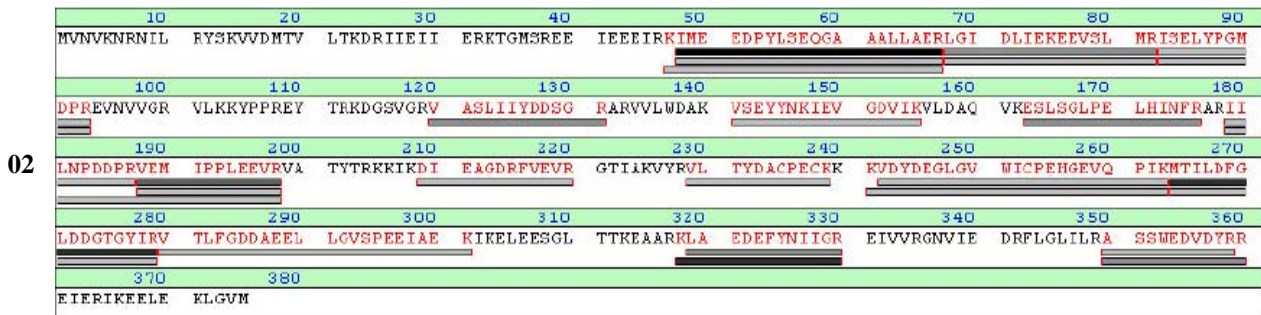
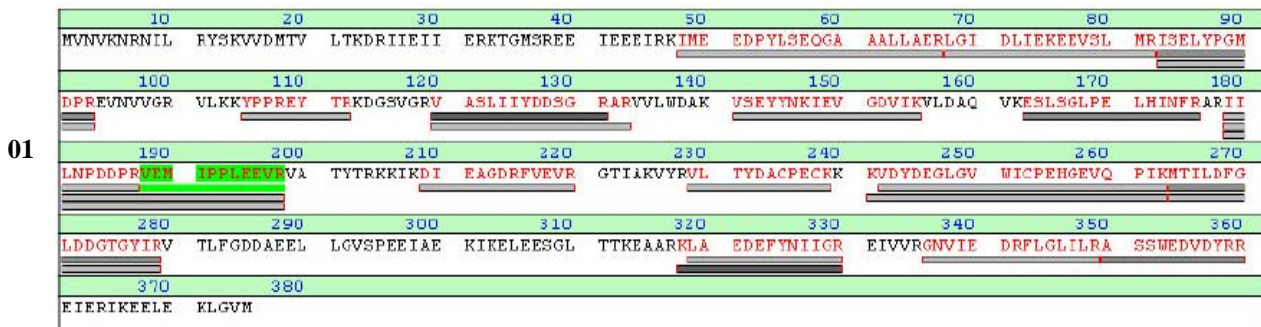
A. Gel SDS-PAGE effectué au laboratoire. 1 : marqueur LMW (Amersham) ; 2 : fraction 4 de la figure (détail)

B. Gel SDS-PAGE effectué chez Innova Proteomics (plate-forme génomique de Rennes).

Après analyse, seule la protéine RP-A1 est mise en évidence dans les quatre bandes sélectionnées (tableau 9). Cependant, le profil sur gel, fourni par Innova Proteomics, n'est pas réellement le même que celui que nous obtenions. Leur gel est moins résolusif.

| | Protéine décelée | Score | Nombre de peptides retrouvés |
|----------|------------------|-------|------------------------------|
| Bande 01 | RP-A1 | 205 | 23 |
| Bande 02 | RP-A1 | 217 | 25 |
| Bande 03 | RP-A1 | 248 | 28 |
| Bande 04 | RP-A1 | 221 | 25 |

Tableau 9. protéines mises en évidence dans les quatre bandes protéiques sélectionnées pour le séquençage en spectrométrie de masse.



| | | | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| | MVNVKRNRL | FYSKVVDHTV | LTKDRIIEII | ERKTGMSREE | IEEEIRKIME | EDPYLSEOGA | AALLAERLGI | DLIEKEEVSLS | MRISELYPGM |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| | DPREUNVVGR | VLKKYPPREY | TEKDGSGVGRV | ASLIYYDDSG | RARVVLMDAK | VSEYVNRKIEV | GOVIRVLDLQ | VKESLSGLPE | LHINFRARTI |
| 04 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| | LNPDDPRVEM | IPPLEEVVVA | TYTRKRIKDI | EAQDRFVEVR | GTIARVYRVL | TYDACPECKK | KVDYDEGLGV | WICPEHGEVQ | PIKMTILDFG |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| | LDDGTGYIRV | TLFGDDAEEL | LGVSPPEIAE | KIKELEE3GL | TTKAAARLA | EDEFYNIIGR | EIVVRGNVIE | DRFLGLILRA | SMWEDVDYRR |
| | 370 | 380 | | | | | | | |
| | ETIRIKKEELE | KLGVM | | | | | | | |

Figure 93. : Alignement des séquences peptidiques obtenues en spectrométrie de masse avec la séquence peptidique de la sous-unité RP-A1. **01-04** : numéros des bandes sélectionnées sur gel SDS-PAGE.

Un alignement des séquences peptidiques avec la séquence du gène *RP-A1* a été réalisé (figure 93). L'ensemble des séquences peptidiques obtenues recouvre la séquence de la protéine, hormis les 47 premiers et 15 derniers acides aminés. La technique de spectrométrie de masse ne permet pas toujours d'obtenir l'intégralité de la séquence peptidique analysée. Cependant, comme la séquence N-terminale n'est pas retrouvée, nous pouvons avoir des doutes au sujet de sa présence, du fait des difficultés rencontrées précédemment.

IV. Travaux en cours et perspectives :

Actuellement, des travaux ont été initiés avec le système RTS pour obtenir le complexe RP-A et plus particulièrement la sous-unité RP-A3 que nous n'avons jamais obtenue.

L'obtention du complexe RP-A permettra de l'inclure dans les études fonctionnelles de caractérisation du complexe de réplication chez *P. abyssi*. Ce serait la première fois que ce complexe pourrait être inclus dans l'approche fonctionnelle de la réplication chez les euryarchées.

En effet, bien que le RP-A de *P. furiosus* ait été caractérisé (Komori et Ishino 2001), il n'a jamais été inclus dans d'autres travaux jusqu'à présent.

Lorsque nous disposerons de ce complexe de manière intègre, des expérimentations pourront être envisagées avec les protéines RP-A1 mutantes obtenues. En effet, nous avons mis en évidence une zone critique de 18 acides aminés qui semble importante à sa fonction car elle induit une toxicité au niveau cellulaire.

ANNEXE 2 : tampons

I. Milieux de culture

Milieu SME modifié :

Pour une fiole de 1 litre :

| | | | |
|--------------------|----------|------------|---------|
| NaCl | 30 g/L | Solution A | 1 ml/L |
| Extrait de levure | 1 g/L | Solution B | 1 ml/L |
| Peptone | 2 g/L | Solution C | 1 ml/L |
| PIPES | 6.05 g/L | Solution D | 1 ml/L |
| Solution magnésium | 10 ml/L | Résazurine | 0.5ml/L |
| soufre | 5 g/L | | |

- tyndaliser le milieu 2 fois (100°C 30 min) pour élimination d'éventuelles spores car à plus de 100°C
- répartir dans l'enceinte en ajoutant 20 ml/L de Na₂S 2.5% et 0.5 ml/L de vitamines

solutions "mères" :

Solution de magnésium

| | |
|--|---------|
| MgSO ₄ , 7 H ₂ O | 180 g |
| MgCl ₂ , 6 H ₂ O | 140 g |
| eau distillée | qsp 1 L |

Solution de résazurine

| | |
|---------------|--------|
| résazurine | 1 g |
| eau distillée | qsp 1L |

Solution A

| | |
|--|---------|
| MnSO ₄ , 4 H ₂ O | 9 g |
| ZnSO ₄ , 7 H ₂ O | 2.5 g |
| NiCl ₂ , 6 H ₂ O | 2.5 g |
| AlK(SO ₄) ₂ , 12 H ₂ O | 0.3 g |
| CoCl ₂ , 6 H ₂ O | 0.3 g |
| CuSO ₄ , 5 H ₂ O | 0.15 g |
| eau distillée | qsp 1 L |

Solution B

| | |
|--|---------|
| CaCl ₂ , 2 H ₂ O | 56 g |
| NaBr | 25 g |
| KCl | 16 g |
| KI | 10 g |
| SrCl ₂ , 6 H ₂ O | 4 g |
| eau distillée | qsp 1 L |

Solution C

| | |
|---|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 50 g |
| H ₃ BO ₃ | 7.5 g |
| Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O | 3.3 g |
| Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O | 0.15 g |
| Na ₂ SeO ₃ | 0.005 g |
| eau distillée | qsp 1 L |

Solution de vitamines

| | |
|--------------------------|--------|
| Biotine | 40 mg |
| Acide folique | 40 mg |
| Pyridoxine-HCl | 200 mg |
| Thiamine HCl | 100 mg |
| Riboflavine | 100 mg |
| Acide nicotinique | 100 mg |
| DL. Calcium pantothenate | 100 mg |
| Vitamine B12 | 2 mg |
| Acide lipoïque | 100 mg |
| éthanol 50 % | qsp 1L |

Solution D

| | |
|--|--------|
| FeCl ₂ , 4 H ₂ O | 10 g |
| Hydrochloric acid 1M | qsp 1L |

Milieu SOC (liquide)

| | |
|--------------------------|--------|
| Tryptone | 2 % |
| Extrait de levure | 0,5 % |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| Autoclaver puis ajouter | |
| MgCl ₂ filtré | 10 mM |
| MgSO ₄ filtré | 10 mM |
| Glucose filtré | 20 mM |

Milieu Luria-Bertani (liquide) :

| | |
|-------------------|--------------------|
| Tryptone | 10 g |
| Extrait de levure | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| NaOH 1N | 1 ml |
| H ₂ O | qsp 1 L |
| (solide) | + 1,5 % agar (p/v) |
| Autoclaver | |

II. Tampons d'électrophorèse SDS-Page :**tampon de séparation pH 8,8**

| | |
|-----------------------------|------------|
| Tris | 22,69 g |
| TEMED | 125 µl |
| SDS | 0,5 g |
| H ₂ O | qsp 100 ml |
| Ajuster le pH avec de l'HCl | |

tampon de tassement pH 6.8

| | |
|-----------------------------|------------|
| Tris | 22,69 g |
| TEMED | 125 µl |
| SDS | 0,5 g |
| H ₂ O | qsp 100 ml |
| Ajuster le pH avec de l'HCl | |

tampon de chargement

| | |
|---------------------|----------|
| Tris/HCl pH 6,8 | 125 mM |
| Glycérol | 10 % |
| β-Mercaptoéthanol | 5 % |
| SDS | 0,16 g |
| bleu de bromophénol | 0,8 mg |
| H ₂ O | qsp 8 ml |

Laemli tampon de migration Tris-Gly

| | |
|------------------|-------------|
| Tris | 3,027 g |
| Glycine | 14,41 g |
| SDS | 1 g |
| H ₂ O | qsp 1 litre |

III. Tampons de lyse cellulaire

PCNA : Tris/HCl (8,8) 50mM ; NaCl 0,1M ; EDTA (8) 0,1mM ; β-Mercapto 2mM ; glycérol 10% ; 1 tablette de complete

ADN polymérase B : 50 mM NaP pH 7.6 ; 1mM EDTA ; 10mM β-Mercapato. ; 200µg/ml lysozyme

ADN polymérase D : 50 mM TrisHCl pH 8 ; β mercaptoethanol 2 mM ; + 2 tablettes de complete

RP-A : 50 mM TrisHCl pH 7,5 ; β mercaptoethanol 2 mM ; EDTA 0,5 mM ; NaCl 50 mM ; glycérol 10%

Complete (Roche) : cocktail d'inhibiteur des protéases.

IV. Tampons de purification

| Protéine | Colonne utilisée | Dimensions | tampons |
|-----------------|---|-------------------|-----------------------|
| PCNAs | Ressource Q : HiPrep 16/10 FF | 16 mm x 10 cm | R1, R2 |
| | Hydroxyapatite : Econo-Pac CHT-II Cartridge | 5 ml | H1, H2, H3, H4 |
| | Exclusion stérique: Superdex 200 prep grade | 16 mm x 50 cm | E |
| Pol B mt | Ressource Q : HiPrep 16/10 FF | 16 mm x 10 cm | R3, R4 |
| Pol D mt | Ressource Q : HiPrep 16/10 FF | 16 mm x 10 cm | R5, R6 |
| RP-A | DNA-cellulose | 5ml | C1 |

C1 (équilibration) : 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercapto-éthanol, 10 % glycérol, 100 μ g/ml BSA.

E : 50mM Tris/HCl pH 8, 1mM DTT, 0,2mM EDTA, 10% Glycérol, 300 mM NaCl

H1 (équilibration) : 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 5% glycérol

H2 (lavage) : 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 1 M $MgCl_2$, 5% glycérol

H3 (dépôt) : 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 5% glycérol

H4 (élution) : 10 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 5% glycérol, 250 mM K_2PO_4

R1 (équilibration) : 20 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5% glycérol

R2 (élution) : 20 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, 5% glycérol

R3 (équilibration) : 50 mM Tris/HCl, pH 8

R4 (élution) : 50 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl

R5 (équilibration) : 50 mM K_2PO_4 pH 6.5, 2 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol

R6 (élution) : 50 mM K_2PO_4 pH 6.5, 2 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 500 mM NaCl

ANNEXE 3 : fiches d'identité des protéines

I.PabPol B

(Voir Gueguen *et al.* 2001)

Nombre de sous-unité : une

Poids moléculaire : 84,8 kDa

Activité exonucléase : 3'-5'

5'-3' non détectée

Migration sur gel SDS-PAGE :

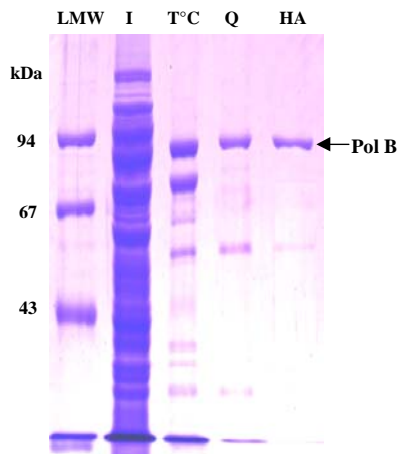


Figure 94. : Purification de Pol B ; migration sur gel SDS-PAGE 12%.

I : après lyse cellulaire

T°C : après choc thermique 15 min à 80°C

Q : après passage sur colonne Mono Q

HA : après passage sur colonne d'hydroxyapatite

Séquence peptidique (771 aa) :

MIIDADYITEDGKPIIRIFKKEKGEFKVEYDRTFRPYIYALLKDDSAIDEVKKITAERHGKIVRITEVEKVQ
 KKFLGRPIEVWKLYLEHPQDVPAIREKIREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLTPMEGNEELTFLAVDIE
 TLYHEGEEFGKGIIMISYADEEGAKVITWKSIDLPHYVEVSSSEREMIKRLVKVIREKDPDVIITNGDNF
 DFPYLLKRAEKLGIKPLGRDNSEPKMQRMGDSLAVEIKGRIHFDLFPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGK
 SKEKVYAHEIAEAWETGKGLERVAKYSMEDAKVTFELGKEFFPMEAQLARLVGQPVDVSRSTGNL
 VEWFLLRKAYERNELAPNKPDEREYERRLRESYEGGYVKEPEKGLWEGIVSLDFRSLYPSIIITHNVSPD
 TLNRENCKEYDVAPQVGHFRCKDFPGFIPSLGNLLEERQKIKKRMKESKDPVEKKLLDYRQRAIKILA
 NSYYGYYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIDLVRRELESRGFKVLYIDTDGLYATIPGAKHEEIKEK
 ALKFVEYINSKLPGLLELEYEGFYARGFFVTKKKYALIDEEGKIVTRGLEIVRRDWSEIAKETQAKVLEA
 ILKHGNVDEAVKIVKEVTEKLSKYEIPPEKLVIIYEQITRPLSEYKAIGPHVAVAKRLAAKGVKVKPGMVI
 GYIVLRGDGPISKRAIAIEEFDPKKHKYDAEYYIENQVLPVERILRAFGYRKEDLKYQ**KTKQVGLGAWLKF**

Légende : **QVGLGAWLKF** : PIP-box putative portée par DP2

K : acide aminé muté pour obtenir une ADN polymérase B tronquée (PolBΔPIP)

II. PabPol D

(Voir Gueguen *et al.* 2001)

Sous-unité : deux sous-unités : une grande DP2 et une petite DP1.

Poids moléculaire : DP1 : 68,1 kDa ; DP2 : 139,7 kDa

Activité exonucléase : 3'-5' par DP1

5'-3' non détectée

Migration sur gel SDS-PAGE :

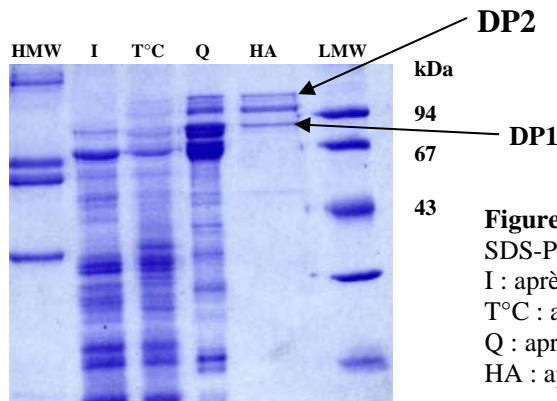


Figure 95. : Purification de Pol D ; migration sur gel SDS-PAGE 12%.
 I : après lyse cellulaire
 T°C : après choc thermique 15 min à 80°C
 Q : après passage sur colonne Mono Q
 HA : après passage sur colonne d'hydroxyapatite

Séquences peptidiques :

DP1 (619 aa)

MRWYPWLRPDFEKLVASIQAGRGHALLIQALPGMGDDALIYALSRYLCCQQPQG
 HKSCGHCRGCQLMQAGTHPDYYTLAPEKGNKTLGVDAVREVTEKLNEHARLGGAK
 VVWVTDAALLTDAANALLKTLEPPAETWFFLATREPERLLATLRSRCLHLYLAPP
 PEQYAVTWLSREVTMSQDALLAALRLSAGSPGAALALFQGDNWQARETLCQALAY
 SVPSGDWYSLAALNHEQAPARLHWLTLMDALKRHHGAAQVTNVDVPGLVAEL
 ANHLSPSRLQAILGDVCHIREQLMSVTGINRELLITDLLLRIEHYLQPGVVLPVPHL

DP2 (1270 aa)

MELPKEMEYFEMLQREIDKAYEIAKKARAQKDPKSLDVEIPQATDMAGRVESLVGPPGVAKRIRELV
 KEYGKEIAALKIVDEIIEGKFGDLGSREKYAEQAVRTALAILTEGIVSAPIEGIANVKIKRNTWADNSEYL
 ALYYAGPIRSSGGTAQALSVLVDYVRRKLGDRFKPSEKHIERMVEEVDLYHRAVTRLQYHPSPEEV
 RLAMRNIPIETGEATDDVEVSHRDVPGVETNQLRGGAILVLAEGVLQAKKLVKYIDKMGIEGWEL
 KEFVEAKEKGPKEEGKEESLAESTLEETKVEVDMGFYYSLYQKFKEEIAPSKDYAKEVIGGRPLFSDPS
 KPGGFRLRYGRSRASGFATWGINPATMILVDEFIAGTQLKTERPGKGAVVTPVTIEGPIVKLKDGSVL
 RVDDYNLALKVREDVEEILYLGDAVIAFGDFVENNQTLIPANYCEEWWILEFVKALKEIYEVHLEPFTE
 NEEESIEEASDYLEIDPEFLKEMLRDPLRVKPPVELAIHFSEVLGIPLHPYTYLYWNSVEPKDVEKLWRL
 KNYAEIEWSNFRGIKFAKKIVISQEKLGDSKRTLELLGLPHTVRDGNVIVDYPWAAALLTPLGNLNWEF
 MAKPLYATIDIINENNEIKLRDRGISWIGARMGRPEKAKERKMKPPVQVLFPIGLAGGSSRDIKAAEEG
 KVAEVEIAFFKCPKCGHVGPEHLCPNCGTRKELLWVCPRCNAEYPESQAEGYNYTCPKCNVKLRPYAK
 RKIRPSELLNRAMENVKVYGVDKLKGVMGMTSGWKMPPELEKGLLRANDVYVFKDGTIRFDATDA
 PITHFRPREIGVSVEKLRELGYTHDFEGKPLVSEDQIVELKPDILSKEAGRYLLKVAKFVDDLLEKFGY
 LPRFYNAEKMEDLIGHLVIGLAPHTSAGIVGRIGFVDALVGYAHPYFHA AKRRNCFPGDTRILVQIDGV
 PQKITLRELYELFEDERYENMVYVRKKPKREIKVYSIDLETGKVVLTDIEDVIKAPATDHLIRFELEDGRS
 FETTVDHPVLVYENGRFIEKRAFEVKEGDKVLVSELELVEQSSSQDNPKNENLGSPEHDQLLEIKNIKY
 VRANDDFVFSLNAKKYHNVIINENIVTHQC DGEDAVMLLLDALLNFSRYLPEKRGKMDAPLVIT
 RLDPREVDSEVHNMDIVRYYPLEFYEATYELKSPKELVGVIERVEDRLGKPEMYGYLKFTHDTHDIALG
 PKMSLYKQLGDMEEKVRRQLEVAKRIRAVDEHGVAEKILNSHLIPDLRGNLRSFTRQEFRCVKCNTKF

RRPPLNGKCPVCGGKIVLTVSKGAIKYLGTAKMLVTEYNVKNYTRQRIKCLTERDIDSLFENVFPETQLT
LIVNPNDICQRLVMARTGEVKNKSGLLENLSNGSKKTEKA EKA EKP R K K S D E **K** P K K K R **VISLEEFFSRKS**
K

Légende : **VISLEEFFSRKSK** : PIP-box putative portée par DP2

FIEKRAFEVKEG : une intéine sur la séquence peptidique de la grande sous-unité

GRIIGFVDALVGYAHPYF : PYF-Box putative

K : acide aminé muté pour obtenir une ADN polymérase D tronquée (PolD Δ PIP)

III. PabPCNA

Sous-unité : trois sous-unités identiques

Poids moléculaire : 28,5 kDa par monomère

Migration sur gel SDS-PAGE :

Voir bilan de purification page 58 et 60

Séquence peptidique d'une sous-unité :

MPFEIVFEGAKEFAQLIETASRLIDEAAFVKVTEEGISM RAMDPSRVVLIDLNL PASIFSKYEVDGEETIGV
NMDHLKKVLKRGKAKETLILRKGEENFLEISLQGTATRTFKLPLIDVEEIEVDLPELPFTAKVVILGDVIK
EAVKDASLVSDSMKFI AKENEFTMRAEGETQEVEVKLTLEDEGLLDIEVQEETKSAYGISYLSDMVKGL
GKADEVTIKFGNEMPMQMEYYIRDEGRILIFLLAPRVEE

IV. PabRF-C

Sous-unité : une grande sous-unité (RF-Cg) et quatre petites (RF-Cp)

Poids moléculaire : RF-Cg : 55 kDa ; RF-Cp : 38 kDa

Hydrolyse de l'ATP : voir (Henneke *et al.* 2002)

Migration sur gel SDS-PAGE :

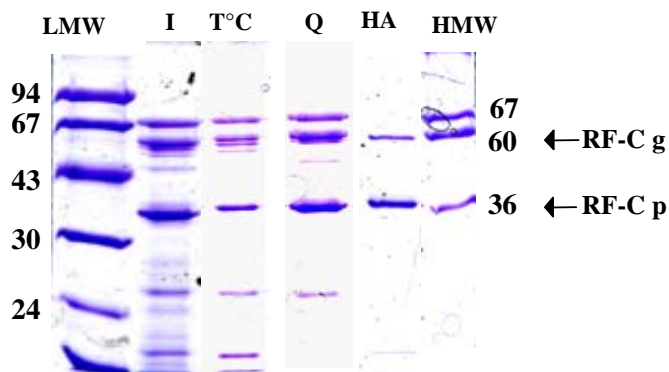


Figure 96. : Purification du RF-C ; migration sur gel SDS-PAGE 12%.
I : après lyse cellulaire
T°C : après choc thermique 15 min à 80°C
Q : après passage sur colonne Resource Q
HA : après passage sur colonne d'hydroxyapatite

Séquences peptidiques :

RF-Cg

MPEVPWVEKYRPRRLSEIINQEDAIKVKAWIEAWLHGNPPKKKALLLAGPPGSGKTTTVYALAREYN
 FEVIELNASDERTYDKIARYVQAAYTMDILGKRRKIIFLDEADNIEPSGAPEIAKLIDRARNPIIIMAANHY
 WEVPKEIRDRAELVEYKRLTQRDVINALVRILKREGITVPKEVLVEIAKRASGDLRAAINDLQTVVAGG
 YEDARYVLAYRDVEKTVFQALGLVFASDNAKRAKLAMMNLDMSPDEFLLWIDENIPHMYLKPEEMA
 RAYEAIKADIYLGRAQRTGNYSYLWRYAIDMMTAGVAVAGTKKRGFAKFYPPNTLKMLAESKEERST
 RNSIHKIMSEMHSKLEAIETMKIITIFEKNLDAAHFTVFLGLSEKEVEFLAGRENAGTIWKGALAIR
 RKLKKEEEKIRKERKEEEKVEVREEKPEEKVEEKREERETKKEKEKKEEKKAEEKKGKQVTLFDFIKK

RF-Cp

MRDMEEVREVKVLEKPWVEKYRPQKLEEVGQEHIVKRLKHYVKTGSMPHLLFAGPPGVGKCLTGDA
 KVIANGELTTIGELVERISNGKLGPTVVRGLTVLGIDEDGKLVLPVEYVYKDKTSELVKIRTRLGRELK
 VTPYHPLLVNRNRNGKIEWVKAEELKPGDRLAIPSFLPAMLNDNPLAEWLGYFFGNGYTDSEERVVFES
 KSKELRKRFMELTRKLFQDAEIKEDSGKVYVSSSEVKRLVKSLNKDSIPEQAWKGLRSFLRAYFDCNAE
 IKDKIIVSTAGKEIAEQISYALAGLGIVAEDDKGSVIISDPENVSRLDEIGFSVEEKKEEAKALIKKSTLN
 LGIYVDKELISYVREKLLSFYENETMWSPEKAREIAWKLMEIYYRLDELERFKKALSXSVIDWSEVE
 KKKEEISEKTGISVNEILEYAKGKRKPSLEEYVKIAKALGVLEKETLEAIFTGKKYLYGYSIDEIETLEE
 RKEELKRLKELLNDEKLLKGVAYLIFLAQNELLWDEIIEVEKLGDFVIYDLHVPKYHNFIGNLPTVL
 HNTTAALALARELFGENWRHNFLELNASDERGINVIREKVKFEFARTKPIGGASFKIIFLDEADALTQDAQ
 QALRRTMEMFSSNVRFILSCVTGDTKVYTPDEREVKIRDFMNYFENGLIKEVSNRIGRDTVIAAVSFNSR
 IVGHPVYRLTLESGRIIEATGDHMFLLTPEGWKQTYDIKEGSEVLVKPTLEGTPYEPDPRVIIDIKEFYNFLE
 KIEREHLNKLPLKEAKTFRELITKDKKILRRALELRAEIENGLTKREAEILELISADTWIPRAELEKKARIS
 RTRLNQILQRLEKKGYIERRIEGRKQFVRKIRNGKILRNAMDIKRILEEEFGIKISYTTVKLLSGNVDGM
 AYRILKEVKEKWLVRDYDDEKAGILARVVGFIKLDGHLARNGRIWFNNSKEELEMLANDLRKLGLKPS
 IERDSSSEIQGRKVKGRIYMLYVDNAAFHALLRFWKVEVGNKTKKGYTVPEWIKKGNLFVKREFLRGL
 FGADGTPCGKRYNFGIKLEIRAKKESLERTVEFLNDVADLLREFDVDSKITVSPTEGFIIRLIVTPND
 ANYLNFLTRVGYAYAKDTYARLVGEYIRIKLAYKNIILPGIAEKAIELATVTNSTYAAKVLGVSDFVV
 NRLKGTQIGITRDFMTFEFEMKERVNLNGYVIEKVIKKEKGLYLDVYDVTCARDHSFISNGLVSHNCNYS
 SKIIEPIQSRCAIFRFRPLNDEDIKRLRYIAENEGLELTEGLQAILYIAEGDMRRRAINILQAAAALDRKIT
 DENVFLVASRARPEDIREMMLLALKGNFLKAREKLRILLKQGLSGEDVLVQMHREVFNLPIDEPMKV
 YLADKIGEYNFRLVEGANEMIQLLEALLAQTFLIGKKK

Légende : QVTLFDFIKK : PIP-box du RF-C

DAEIKEDSGK : deux intéines sur la séquence peptidique de la petite sous-unité

RKEEEKVEVR : domaine non structuré

V.PabRP-A

Sous-unité : une grande grande (RP-A41), une moyenne (RP-A32), et une petite (RP-A14)

Poids moléculaire : 41, 32 et 14 kDa

Migration sur gel SDS-PAGE :

Voir annexe 1

Séquences peptidiques :

RP-A41

MVNVKNRNILRYSKVVDMTVLTKDRIIEIERKTGMSREEIEEIEIRKIMEEDPYLSEQGAAALLAERLGID
LIEKEEVSLMRISELYPGMDPREVNVVGRVLLKKYPPREYTRKDGSVGRVASLIYDDSGRARVVLWDA
KVSEYYNKIEVGDVIKVLDAQVKESLSGLPELHINFRARIILNPDDPRVEMIPPLEEVRVATYTRKKIKDI
EAGDRFVEVRGTIAKVYRVLTYDACPECKKKVDYDEGLGVVICPEHGEVQPIKMTILDFGLDDGTGYI
RVTLFGDDAEELLGVSPEEIAEKIKELEESGLTTKEAARKLAEDEFYNIIGREIVVRGNVIEDRFLGLILRA
SSWEDVDYRREIERIKEELEKLGVM

RP-A32

MVIEMKKRMPATRLYIKDILEGYFVKSEGDFEPNYLITKYARKVYRAKIVGTVVREPLIAEDETGYGKFQ
VDDGTGVIWVLGFRDDTKFAKLVRKGDVQVIGKIAEWRDDKQILVEGVSKVHPNMWILHRYETLKE
KIEHIKKAKIALEIYNQYGITAKSKVIAKNKGIEELLEVIDELYGIMMEERSIEEPMEELLEEEIPEEKEEN
ELLEKAKEDILNLRQKRTAISRYILKKGDKYDEETIDDAITELLAQGEIYEPETGYKLL

RP-A14

MEVQVRRRKPAVERKISEIREEDTRVSLIGRVIKVDKMDYMFWLDDGTGVAIISESIDLKVGQVVRVI
GRIIRNEEGIHIAEVIQDFSDADLEALEEIRELERKLLPRLEGEIVW

Légende : **MVNVKNRN** : zone où apparaissent des mutations de type délétion durant le clonage.

La replication de l'ADN se fait par le biais d'un complexe protéique appelé réplisome. La compréhension des aspects structuraux et dynamiques nécessite sa reconstitution *in vitro* à partir des sous-unités individuelles. Chez tous les organismes vivants, la phase d'élongation de l'ADN, effectuée par les ADN polymérase, met en jeu un facteur de processivité (PCNA) qui est chargé sur l'ADN par un facteur de chargement (RF-C). Généralement, les protéines des archées, impliquées dans la réplication de l'ADN, ont plus de similitudes avec leurs homologues eucaryotes que bactériens.

L'étude présentée ici a porté sur les mécanismes de chargement du PCNA et de synthèse d'ADN chez l'Euryarchaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*. Afin de mieux cerner certaines interactions protéine-protéine et protéine-ADN, des versions mutantes du PCNA et des ADN polymérase (Pol B et Pol D) ont été produites.

Il a été montré que le PCNA est capable de se charger spontanément sur l'ADN ; ce chargement est stimulé par le RF-C mais également par la Pol B qui stabilise son facteur de processivité par un motif essentiel. D'un autre côté, le complexe PCNA/Pol B est déstabilisé en présence d'ARN et de dNTPs.

De plus, il a été montré que la Pol D présente plus d'un motif de liaison au PCNA. Malgré ce motif additionnel, la Pol D est déplacé du PCNA par la Pol B

Ces résultats, couplés à ceux précédemment obtenus, permettent de proposer un modèle moléculaire dynamique de la fourche de réplication pour le phylum Euryarchaea

Mots Clés : ADN polymérase ; PCNA ; RF-C ; chargement du PCNA ; synthèse d'ADN ; interaction ; modèle

ABSTRACT

DNA replication occurs through a large protein complex assembly called replisome. An understanding of its structure and function requires its *in vitro* reassembly from individual subunits. In all living organisms, the elongation of a primed DNA template by DNA polymerase, with high processivity, requires the accessory protein DNA sliding clamp (PCNA) that is loaded onto DNA by the clamp loader (RF-C). Generally, the archaeal proteins involved in DNA replication are more similar to those of the higher organisms (Eukarya) rather than to those from Bacteria.

This study have focussed on the PCNA loading mechanism and on the DNA synthesis in the hyperthermophilic Euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. To investigate the importance of some protein-protein and protein-DNA interactions, mutants of PCNA and of the two DNA polymerases (Pol B and Pol D) have been made.

PCNA have been shown to be able to load by itself on primed DNA; this loading is increased by the RF-C but also by the Pol B which stabilizes the clamp on primed DNA *via* an essential motif. On the other hand, on an RNA-primed heteroduplex, the complex PCNA/Pol B is destabilized in the presence of dNTPs.

Moreover, Pol D have been shown to exhibit more than one PCNA interacting motif. In spite of this additional motif, Pol D is displaced from the PCNA by Pol B.

These results, twinned to those previously obtained, are sufficient to draw up, for the Euryarchaea phylum, a molecular model of the replication fork.

Key words: DNA polymérase; PCNA; RF-C; PCNA loading; DNA synthesis; interaction; model