



THESE / UNIVERSITE DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST
Mention : Biochimie - Microbiologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par
Benoît Castrec

Préparée à l'Unité Mixte de recherche (UMR 6197)
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes
Equipe Maintenance génomique chez les Archaea

« Les ADN polymérases
B et D de l'Archaea
hyperthermophile
Pyrococcus abyssi :
contribution à l'étude des
relations structure-
fonction »

Thèse soutenue le 6 Novembre 2009

devant le jury composé de :

Vianney Pichereau
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Président*

Ulrich Hübscher
Professeur, Institute of Veterinary Biochemistry and Molecular Biology, University of
Zürich-Irchel / *rapporteur*

Giuseppe Villani
Directeur de recherche Inserm, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale-
Toulouse / *rapporteur*

Daniel Thomas
Directeur de recherche CNRS, Université de Rennes1 / *Examinateur*

Ghislaine Henneke
Chargée de recherche, Ifremer Brest / *Examinatrice*

Mohamed Jebbar
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Directeur de thèse*

Jean-Paul Raffin
Chargé de recherche CNRS, Ifremer Brest / *Invité*

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes avec le soutien financier de la Région Bretagne. Ont participé également à la réalisation de ce projet l'UBO, l'IFREMER et le CNRS.

J'exprime ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail : Ulrich Hübscher, Professeur à l'Université de Zürich-Irchel, Giuseppe Villani, Directeur de Recherche à l'Inserm, Vianney Pichereau, Professeur à l'UBO, Daniel Thomas, directeur de recherche CNRS, Mohammed Jebbar, Professeur à l'UBO et Ghislaine Henneke, chargée de recherche à l'IFREMER.

Je remercie tout d'abord Jean-Paul Raffin pour son encadrement inconditionnel durant ces 3 années. Tu m'as sans cesse encouragé, fait confiance, donné confiance et laissé grandir tout au long de ce doctorat. Merci aussi pour toutes ces discussions multiples et variées qui ont permis de travailler dans une ambiance sereine et conviviale. Le passage de témoin est désormais lancé !

Je tiens à remercier Joël Querellou, Daniel Prieur et Anne Godfroy pour leur accueil au sein du laboratoire et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Ghislaine Henneke, merci pour ta rigueur, ton perfectionnisme et pour ton humour parfois caché mais réel. Ces remerciements vont également à Didier Flament qui m'a initié notamment à la SPR. J'ai apprécié ton calme, ta rigueur et ton esprit chambreur. C'était un vrai plaisir de pouvoir discuter et de travailler avec vous deux. J'essaierai de m'inspirer à l'avenir de votre style.

Je remercie également Audrey Le Goaziou et sa bonne humeur (dépendante du temps !). Merci pour ta générosité et ton aide technique. Tu as toujours réussi à rendre l'atmosphère chaleureuse et agréable au sein du labo. Merci aussi à Sophie Schmitt pour ta gentillesse et ta « nonchalance contrôlée ». Je n'oublie pas Eloïse Delage pour toutes nos discussions délirantes.

Je remercie aussi Julien Briffoteaux, j'ai toujours été envieux de ton apparente décontraction. Ton âme de voyageur m'inspire ! Ces remerciements vont aussi à mon compagnon de route, Adeline Palud. J'ai beaucoup apprécié ta gentillesse, ton dynamisme et ton expertise scientifique. Je ne garderai que de bons souvenirs de nos conversations et de nos fous rires en tout genre.

Merci encore à Christophe Rouillon pour ton accueil en Ecosse, pour tes conseils en tout genre et surtout pour notre collaboration fructueuse. Merci aussi à Christophe Crézé pour ton apport de compétences et ta sympathie. Finalement, les structuralistes sont des personnes normales et tout à fait appréciables ! Aussi, Sébastien Laurent, merci pour ton coup de pouce en SPR et pour ton dynamisme apporté sur la fin de ce doctorat.

Je n'oublie pas mes stagiaires, Marine Ridoux et Thibaut Herrou, merci pour votre aide et d'avoir servi de cobaye durant ces quelques mois de manip ! En espérant vous avoir donné une bonne image de la recherche.

Un petit message aux autres stagiaires « répliquants » : Caroline, Erwan, Léna, Florian et Sven. Merci aussi à Ann-Shu, Melissa et Rupeesh qui ont prouvé que le rire et le sourire étaient universels.

Un grand merci à Christine Lamy, bien plus qu'une secrétaire. Merci pour ta compétence, ton dynamisme et ta bonne humeur quotidienne.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité qui ont fait de ces 3 années à l'IFREMER, un beau séjour qui restera pour moi impérissable.

Merci à Laurent Toffin pour tes conseils avisés et tes impressions en tout genre que ce soit dans le monde scientifique, les loisirs vététistes ou la confection de mets japonais. Merci aussi à Stéphane L'haridon, l'homme qui arrive à dire bonjour à 30 personnes en moins de 9 secondes et 58 centièmes. Merci pour ton dynamisme et de m'avoir sauvé la vie avec la souche de XL1-gold !

J'ai une pensée pour Valentin Crépeau, nos discussions métaphysico-vietnamo-ramboesque-dubosquéennes alliées à diverses techniques de combat vont énormément me manquer ! Tu verras quand tu seras en 3^{ème} année : Trucks !!!!! Merci à Erwan G. Roussel et Anne-Laure Sauvadet pour votre enthousiasme et nos discussions en tout genre. C'était « choutette », en revanche je ne sais pas à qui transmettre le flambeau F.M. !

Je n'oublie pas Cassandra Lazar. On est arrivé presque en même temps au LMEE, un peu perdu au début et on fini presque en même temps, peut-être toujours aussi perdu. Tes éternels mécontentements vont me manquer. Merci aussi à Benjamin Klein (un gars du sud), Matthieu Guri (un futur manager « girouette »), Lucile Durand (une fille de Paris), Marie Roumagnac (une fille du sud), Cyrielle Jan (une autre fille du sud), Mathilde Le Roy (une fille qui voyage beaucoup). Bonne continuation dans vos vies respectives et encore désolé d'être allé trop souvent à la piscine !

Je tiens à remercier le variable Mode Imager Typhoon 9400. Durant 3 ans, tu as été la première « personne » que je côtoyais tous les matins, merci pour toutes ces satisfactions et ces déconvenues.

J'exprime mes remerciements à Pascal Trouvé, du laboratoire de « Génétique moléculaire et génétique épidémiologique », pour m'avoir permis de manipuler sur le biacore. Je n'oublie pas évidemment, la camarade Nathalie Benz : merci pour ton chaleureux accueil dans ton labo ; grâce à toi, j'ai passé de bons moments durant les manip de SPR. Aussi, un message spécial à tous tes collègues thésards.

Je remercie Mr Wroblewski (Rennes 1), pour m'avoir donné l'envie d'étudier les protéines. Je remercie aussi Mr Hubert et Mme Raguènes-Nicol (Rennes 1) et l'équipe FIPL (INRA de Nantes) pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

Enfin un grand merci aux amis, toujours présents, à Virginie, merci pour tout, et aussi à la famille, des plus petits à la plus grande et évidemment à mes parents pour leur soutien inconditionnel durant ces longues études et sans qui je ne serais pas là.

Valorisation scientifique de ce doctorat

Ce travail a fait l'objet de publications et de colloques scientifiques :

Publications

Benoît Castrec, Christophe Rouillon, Ghislaine Henneke, Didier Flament, Joël Querellou and Jean-Paul Raffin. Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA Replication Requires Two PIP Motifs for DNA Polymerase D and One PIP Motif for DNA Polymerase B. *Journal of Molecular Biology*. Sous presse

Benoît Castrec, Ghislaine Henneke, Didier Flament and Jean-Paul Raffin. The glycine-rich motif of *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase D is critical for protein stability. *Journal of Molecular Biology*. Soumis

Posters

Benoît Castrec, Christophe Rouillon, Didier Flament, Ghislaine Henneke, Joël Querellou and Jean-Paul Raffin. « *Pyrococcus abyssi* replicative DNA polymerases: importance of consensus binding motifs to *PabPCNA* ». « Molecular Biology of Archaea » 19-21 Août 2008 à l'Université de St-Andrews, Grande-Bretagne.

Benoît Castrec, Christophe Rouillon, Didier Flament, Ghislaine Henneke, Joël Querellou et Jean-Paul Raffin. « Interaction entre les ADN polymérase B et D et leur facteur de processivité, le PCNA, chez l'Archaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* ». Congrès annuel de la SFBBM, 27-29 Août 2009 à Nancy, France.

Sommaire

ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES FIGURES.....	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. LES ARCHAEA.....	19
I.1. DECOUVERTE DES ARCHAEA.....	19
I.2. CARACTERISTIQUES DES ARCHAEA.....	20
I.3. PHYLA DES ARCHAEA.....	21
I.4. L'ORDRE DES THERMOCOCCALES.....	23
I.5. <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i>	24
I.6. RELATION DES ARCHAEA AVEC LES DEUX AUTRES DOMAINES DU VIVANT.....	25
I.7. NOTIONS DE THERMOSTABILITE.....	26
I.8. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES.....	27
I.8.1. <i>Les Divers domaines d'application</i>	27
I.8.2. <i>Processus liés à l'ADN</i>	28
I.8.3. <i>Autres potentialités</i>	29
II. LA REPLICATION DE L'ADN.....	30
II.1. INTRODUCTION.....	30
II.2. LA PHASE D'INITIATION.....	32
II.2.1. <i>La reconnaissance de l'origine de réplication</i>	32
II.2.2. <i>Chargement et activité de l'hélicase réplivative</i>	32
II.3. LA PHASE D'ELONGATION.....	33
II.3.1. <i>Stabilisation de l'ADN simple brin</i>	33
II.3.2. <i>Création de l'amorce ARN</i>	34
II.3.3. <i>Elongation</i>	35
II.3.4. <i>Maturation des fragments d'Okazaki</i>	35
II.4. LES ADN POLYMERASES.....	37
II.4.1. <i>Distribution au sein des trois domaines du vivant</i>	37
II.4.2. <i>L'ADN polymérase B</i>	39
II.4.3. <i>L'ADN polymérase D</i>	40
II.5. LE RF-C (REPLICATION FACTOR C).....	42
II.5.1. <i>Description dans les trois domaines du vivant</i>	42
II.5.2. <i>Hydrolyse de l'ATP</i>	43
II.5.3. <i>Interaction avec le PCNA</i>	44
II.5.4. <i>Autres fonctions du RF-C</i>	44
II.6. LE PCNA (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN).....	45
II.6.1. <i>Fonctions</i>	45
II.6.2. <i>Structure</i>	47
II.6.3. <i>Dynamique du PCNA</i>	48
II.6.4. <i>Motifs d'interactions au PCNA</i>	49
II.6.5. <i>Domaines d'interactions avec le PCNA</i>	50
III. PRESENTATION DE L'ETUDE.....	52
RESULTATS ET DISCUSSION.....	55
CHAPITRE 1 - INTERACTIONS ENTRE LE PCNA ET LES ADN POLYMERASES B ET D.....	57
I. INTRODUCTION.....	59
II. ARTICLE.....	61
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	82

III.1. INTERACTION ENTRE LE PCNA ET LES SOUS-UNITES DE L'ADN POLYMERASE D	82
III.2. INTERACTION DES ADN POLYMERASES D ET B AVEC LES PCNA MUTES EN PRESENCE DU PEPTIDE PIPD	83
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	86
CHAPITRE 2 - ETUDE DU COMPLEXE ADN POLYMERASE/RF-C/PCNA.....	89
I. INTRODUCTION.....	91
II. RESULTATS.....	92
II.1. EFFETS DU RF-C SUR L'EXTENSION D'AMORCE DES ADN POLYMERASES D ET B SAUVAGES ET ΔPIP.....	92
II.2. ETUDE DES INTERACTIONS PHYSIQUES, EN PRESENCE D'ADN, ENTRE LE PCNA, LE RF-C ET LES ADN POLYMERASES D SAUVAGE ET ΔPIP.....	95
II.3. EXTENSION D'AMORCE DES ADN POLYMERASES D SAUVAGE ET ΔPIP, EN PRESENCE DU PCNA ET DU RF-C SAUVAGE OU ΔPIP	96
II.4. ETUDE DU CHARGEMENT DU PCNA SUR L'ADN, EN PRESENCE DU RF-C OU DU RF-CΔPIP.....	97
III. DISCUSSION	99
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	102
CHAPITRE 3 - ETUDE D'UN MOTIF RICHE EN GLYCINES DE L'ADN POLYMERASE D DE PYROCOCCLUS ABYSSI.....	103
I. INTRODUCTION.....	105
II. ARTICLE.....	106
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	127
III.1. ACTIVITE 3'→5' EXONUCLEASIQUE DE PABPOL D, PABPOL DMUT1 ET PABPOL DMUT2	127
III.2. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LES SOUS-UNITES DP1 ET DP2 : IMPORTANCE POUR L'ACTIVITE 3'→5' EXONUCLEASIQUE.....	128
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
CHAPITRE 4 - TRAVAUX PRELIMINAIRES EN SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	131
I. INTRODUCTION.....	133
II. RESULTATS	134
II.1. ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE.....	134
II.1.1. PCNA marqué par un groupement fluorescent.....	135
II.1.2. PCNA marqué -L211C/V46C.....	135
II.1.3. Liaison du PCNA à l'ADN L34 hybridé à différentes amorces.....	136
II.1.4. Liaison du PCNA à l'ADN, à différentes températures	137
II.1.5. Liaison à l'ADN du complexe PCNA/RFC	138
II.1.6. Liaison à l'ADN des ADN polymérase D mutées au niveau du motif PYF box.....	138
II.2. UTILISATION DU PEPTIDE PIPB.....	139
II.3. UTILISATION D'UNE SONDE DE POLARITE : LE NILE RED	142
III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	143
CONCLUSION GENERALE.....	145
MATERIELS ET METHODES.....	147
I. TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	149
I.1. CULTURE D'ESCHERICHIA COLI	149
I.2. PCR.....	149
I.3. EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE.....	149
I.4. VISUALISATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.....	149
I.5. COUPURE DE L'ADN PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION.....	150
I.6. CLONAGE DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION	150
I.6.1. Vecteur d'expression	150
I.6.2. Préparation des inserts et des plasmides	150
I.6.3. Ligature du vecteur linéarisé et des inserts digérés.....	151
I.7. TRANSFORMATION DANS DES CELLULES COMPETENTES	151

1.7.1. Cellules de stabilisation	151
1.7.2. Cellules d'expression	151
I.8. MUTAGENÈSES DIRIGÉES	151
1.8.1. Stratégies de clonage	151
1.8.2. Conditions de PCR.....	155
I.9. SÉQUENÇAGE DE L'ADN	156
II. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE.....	157
II.1. TECHNIQUES DE PRODUCTION DES PROTÉINES RECOMBINANTES	157
II.1.1. Expression des protéines par un système de traduction <i>in vitro</i> (RTS).....	157
II.1.2. Expression des protéines recombinantes en grand volume.....	157
II.1.3. Expression des protéines recombinantes en petit volume	158
II.2. PURIFICATION DES PROTÉINES RECOMBINANTES	158
II.2.1. Purification de protéines exprimées par RTS	158
II.2.2. Purification des ADN polymérase.....	160
II.3. DOSAGE DES PROTÉINES	166
II.4. SÉPARATION ET VISUALISATION DES PROTÉINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	167
II.4.1. Gels SDS-PAGE.....	167
II.4.1.1. Préparation des échantillons.....	167
II.4.1.2. Migration	167
II.4.2. Gels natifs	167
II.4.2.1. Préparation des échantillons.....	167
II.4.2.2. Migration :	167
II.4.3. Coloration/décoloration des gels d'électrophorèse.....	167
II.5. TECHNIQUE DE WESTERN BLOT	168
II.6. PEPTIDES SYNTHÉTIQUES	168
II.7. SUBSTRATS NUCLEIQUES	169
II.7.1. Présentation.....	169
II.7.2. Préparation d'une matrice d'ADN amorcée.....	170
II.8. TECHNIQUES DE SYNTHÈSE D'ADN.....	171
II.8.1. Test d'activité des ADN polymérase par incorporation de [³ H]dTTP	171
II.8.2. Réactions d'extension d'amorce	172
II.8.3. Réaction 3'→5' exonucléasique	173
II.9. CAPTURES DE PARTENAIRES PAR PULL-DOWN SUR BILLES MAGNÉTIQUES.....	173
II.10. ÉTUDE D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE PAR RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR).....	174
II.10.1. Principe.....	174
II.10.2. Expériences réalisées.....	176
II.11. EMSA (ELECTROPHORESIS MOBILITY-SHIFT ASSAY).....	176
II.12. ÉTUDE DU CHARGEMENT DU PCNA SUR UN ADN (CROSS-LINKING)	176
II.13. MESURES DE LA THERMOSTABILITÉ DES ADN POLYMERASES.....	177
II.14. ÉTUDES EN FLUORESCENCE	177
II.14.1. Analyse spectrale	177
II.14.2. Anisotropie d'émission de fluorescence.....	178
II.14.2.1. Principe	178
II.14.2.2. Expériences réalisées lors de cette étude.....	179
II.14.2.3. Traitement des données.....	179
II.14.3. Utilisation d'une sonde de polarité: le Nile Red.....	179
II.14.4. Obtention d'un PCNA marqué par un fluorophore.....	180
II.14.5. Utilisation de la fluorescence intrinsèque du peptide PIPB	180
II.15. NUMÉROS D'ACCESSION AUX SÉQUENCES	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183
ANNEXES.....	199
RÉSUMÉ.....	202
ABSTRACT	202

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	Pol DNcut : ADN polymérase D dépourvue de son extrémité N-terminale (motif PIP)
ADNr : ADN ribosomique	Orc : Origin recognition complex
ARN : Acide ribonucléique	OriC : Origine de répllication chromosomale
ATP : Adénosine triphosphate	PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
ATPγS : analogue non hydrolysable de l'ATP	Pab : <i>Pyrococcus abyssi</i>
BLAST : Basic local alignment search tool	pb : Paires de bases
Da : Dalton	PDB : Protein data bank
DMSO : diméthyl sulfoxyde	PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
dNTP : Desoxyribonucleotide triphosphate	PCR : Polymerase chain reaction
DP1 : Petite sous-unité de l'ADN polymérase D	Pfu : <i>Pyrococcus furiosus</i>
DP2 : Grande sous-unité de l'ADN polymérase D	Pho : <i>Pyrococcus horikoshii</i>
DO : Densité optique	PIP : PCNA interacting protein
DTT : Dithiothreitol	PIPB : Peptide synthétique correspondant à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase B
ECL : Enhanced chemiluminescence	PIPD : Peptide synthétique correspondant à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase D
EDTA : Acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique	Pol : ADN polymérase
EMSA : Electrophoresis mobility-shift assay	PVDF : Polyvinylidène difluoride
FEN-1 : Flap endonuclease	PYF : Motif riche en glycine de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D
FPLC : Fast protein liquid chromatography	RF-C : Replication factor C
HBS : Hepes buffer saline	RPA : Replication protein A
HRP : Horseradish peroxydase	rpm : Tour par minute
IDCL : Interdomain connecting loop	RTS : Rapid translation system
IPTG : Isopropyl- β -D-galactoside	SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
kDa : Kilo Dalton	SPR : Résonance plasmonique de surface
kpb : Kilo paires de bases	SSB : Single strand binding protein
LB : Luria-Bertani (milieu liquide ou gélosé)	TCA : Trichloro acetic acid
Mbp : Million de paires de bases	TBE : Tris/Borate/EDTA
MCM : Mini chromosome maintenance	TBS : Tris buffered saline
mer : Nucléotide	TBST : TBS additionné de Tween 20
MOPS : 3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid	TEMED : Peptide synthétique correspondant à la séquence 83-203 de l'ADN polymérase D
Nter1 : Peptide synthétique correspondant à l'extrémité N-terminale (1-15) de l'ADN polymérase D	Δpip : Motif PIP tronqué d'une protéine
Nter2 : Peptide synthétique correspondant à l'extrémité N-terminale (15-29) de l'ADN polymérase D	

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Comparaison de la réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 2 : Protéines interagissant avec le PCNA chez les Archaea.</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 3 : Mutations réalisées au niveau du motif PIP box, situé à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase B et de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D.</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 4 : Mutations réalisées au niveau du motif PYF box de l'ADN polymérase D</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 5 : Mutation réalisée au niveau du motif PIP box situé de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D.</i>	<i>153</i>
<i>Tableau 6 : Mutations réalisées au niveau de la poche hydrophobe (IDCL et C-terminus) du PCNA.....</i>	<i>155</i>
<i>Tableau 7 : Conditions de PCR utilisées pour l'obtention des plasmides portant les gènes codant pour les versions mutées de l'ADN polymérase D et du PCNA.....</i>	<i>156</i>
<i>Tableau 8 : Peptides synthétiques utilisés durant cette étude.....</i>	<i>169</i>
<i>Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés durant cette étude.</i>	<i>170</i>

Liste des figures

Figure 1 : Photo d'un fumeur noir prise au niveau du site hydrothermal Logatchez.....	19
Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné, déterminé à partir de l'analyse comparative des gènes ribosomiques ADNr 16S.....	20
Figure 3 : Répartition de la vie en fonction de la température.....	21
Figure 4 : Arbre phylogénétique représentant les différents groupes des Archaea pour lesquelles les séquences des génomes sont disponibles.....	22
Figure 5 : Photo de <i>Pyrococcus abyssi</i> prise à partir d'un microscope électronique à balayage.....	25
Figure 6 : Structure des protéines intervenant dans l'initiation de la réplication de l'ADN.....	33
Figure 7 : Structure de SSB de <i>S. solfataricus</i>	34
Figure 8 : Structure de la primase de <i>P. horikoshii</i>	35
Figure 9 : Structure des protéines intervenant dans la maturation des fragments d'Okazaki.....	36
Figure 10 : Schéma représentatif de la fourche répllicative chez les Archaea et de ses principaux facteurs protéiques.....	37
Figure 11 : Structure de l'ADN polymérase B1 de <i>S. solfataricus</i> contenant « l'uracil pocket ».....	39
Figure 12 : Structure de l'ADN polymérase B de <i>Thermococcus gorgonarius</i>	40
Figure 13 : Modèle représentant les interactions entre les sous-unités de la Pol D de <i>P. horikoshii</i> et son possible repliement.....	41
Figure 14 : Structure de la petite sous-unité du RF-C chez <i>P. furiosus</i>	42
Figure 15 : Chargement du PCNA par le RF-C chez les eucaryotes.....	43
Figure 16 : Schéma représentant les sites d'ATP du RF-C chez les eucaryotes (A) et du complexe γ (B) chez les procaryotes.....	44
Figure 17 : Protéines interagissant avec le PCNA chez les eucaryotes.....	45
Figure 18 : (A) Structure du monomère du PCNA humain.(B) Structure du PCNA de <i>P. furiosus</i>	48
Figure 19 : Vues de côté et de haut de la dynamique du PCNA humain sur l'ADN double brin.....	49
Figure 20 : Domaines d'interaction au niveau du PCNA.....	50
Figure 21 : Interaction entre le PCNA et les sous-unités de l'ADN polymérase D.....	82
Figure 22 : Extension d'amorce par PabPol D et PabPol D Δ pip, en présence du PCNA sauvage ou muté, et en présence ou non des peptides compétiteurs.....	85
Figure 23 : Extension d'amorce par PabPol B, en présence des PCNA sauvage ou mutés, et en présence ou non des peptides compétiteurs.....	86
Figure 24 : Liaison des ADN polymérases B et D au PCNA.....	87
Figure 25 : Extension d'amorce par PabPol D et PabPol D Δ pip et en présence ou non de PCNA et de RF-C.....	93
Figure 26 : Extension d'amorce, par PabPol D et PabPol D Δ pip et PabPol B et PabPol B Δ pip, en présence ou non de PCNA et de RF-C et d'ATP.....	94
Figure 27 : Retard sur gel des différents complexes formés par le RF-C, le PCNA et la Pol D et la Pol D Δ pip sur l'ADN.....	95
Figure 28 : Extension d'amorce par la Pol D et la Pol D Δ pip en présence ou non de RF-C ou de RF-C Δ pip.....	96
Figure 29 : Chargement du PCNA sur l'ADN, en présence ou en absence du RF-C sauvage ou du RF-C Δ pip, et en absence d'ATP.....	98
Figure 30 : Chargement du PCNA sur l'ADN en présence ou en absence du RF-C sauvage ou du RF-C Δ pip, et en présence d'ATP.....	99
Figure 31 : Schéma hypothétique du chargement du RF-C.....	101
Figure 32 : Activité 3'→5' exonucléasique des ADN polymérases D sauvage et mutées dans le motif PYF box... ..	127
Figure 33 : Activité 3'→5' exonucléasique de la petite sous-unité DP1 de PabPol D, reconstituée avec la grande sous-unité DP2, de PabPol D, PabPol Dmut1 ou PabPol Dmut2.....	128
Figure 34 : Liaison du PCNA à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.....	135
Figure 35 : Liaison du PCNA à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.....	136
Figure 36 : Liaison du PCNA à différents ADN amorcés mesurée par anisotropie de fluorescence.....	137
Figure 37 : Liaison du PCNA à l'ADN à différentes températures mesurée par anisotropie de fluorescence.....	137
Figure 38 : Liaison du PCNA et du RF-C à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.....	138
Figure 39 : Liaison de PabPol Dmut1 et mut2 à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.....	139
Figure 40 : Spectre de fluorescence du peptide PIPB en présence du PCNA sauvage (A), du PCNA PR245 (B) et du PCNA E1E120 (C).....	140

<i>Figure 41 : Représentation théorique d'un quenching statique ou dynamique (A). Relation de Stern-Volmer et rapport de la fluorescence initiale sur la fluorescence en fonction de la concentration en quencheur [Q] (B).....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 42 : Représentation du quenching obtenu après ajout croissant du PCNA sauvage (A), du PCNA muté PR245 (B) et du PCNA muté EIE120 (C)</i>	<i>142</i>
<i>Figure 43 : Stratégie de clonage pour la construction du gène codant pour l'ADN polymérase DNcut.....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 44 : Construction de l'ADN polymérase DNcut.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 45 : Système RTS Proteomaster 500.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 46 : Analyse par SDS-PAGE 12% (A) et par PAGE (B) des PCNA mutés produits par RTS.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 47 : Purification du PCNA marqué au TMR.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 48 : Purification de l'ADN polymérase Dmut1.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 49 : Profil de purification de la Pol Dmut1 par analyse en SDS-PAGE à 12 %.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 50 : Purification de l'ADN polymérase DΔpip.....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 51 : Suivi de purification de l'ADN polymérase DΔpip par analyse en SDS-PAGE.....</i>	<i>163</i>
<i>Figure 52 : Purification de la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 53 : Suivi de purification de la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D par analyse en SDS-PAGE 12 %.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 54 : Expression des sous-unités DP2 de la Pol D, Pol Dmut1 et Pol Dmut2.....</i>	<i>165</i>
<i>Figure 55 : Purification de l'ADN polymérase DNcut.</i>	<i>166</i>
<i>Figure 56 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par le kit DC protein assay (Bio-Rad).....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 57 : Purification des ADN marqués à la fluorescéine.....</i>	<i>171</i>
<i>Figure 58 : Schéma représentant la réaction d'extension d'amorce.</i>	<i>173</i>
<i>Figure 59 : Sensorgramme illustrant une association entre un analyte et un ligand fixé sur le biocapteur.....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 60 : Schéma présentant le principe de la résonance plasmonique de surface.</i>	<i>175</i>
<i>Figure 61 : Schéma représentant la configuration de la mesure d'anisotropie de fluorescence.....</i>	<i>178</i>

Introduction bibliographique

I. Les Archaea

I.1. Découverte des Archaea

En 1977, l'exploration des fonds marins a permis la découverte des cheminées hydrothermales en eau profonde où règnent des conditions extrêmes de température et de pression. Depuis, de nouvelles voies de recherche ont été lancées, grâce notamment à l'existence de bactéries autotrophes autour des fumeurs noirs qui font irruption au niveau des dorsales océaniques (Figure 1).



Figure 1 : Photo d'un fumeur noir prise au niveau du site hydrothermal Logatchev, dans l'atlantique (Université de Brème, 2004).

Dès lors, les connaissances sur l'origine et la limite de la vie ont sans cesse été remises en question et débattues. En effet, la découverte d'Archaea hyperthermophiles anaérobies, appartenant aux Thermococcales (Martinson *et al.*, 1995), a repoussé les limites de la vie, même si encore de nos jours de nombreuses questions subsistent concernant la détermination de l'ancêtre commun. Plusieurs travaux démontreraient que, l'ancêtre commun, LUCA (last universal common ancestor), était un organisme hyperthermophile autotrophe utilisant le CO₂ comme source de carbone (Stetter, 1996). Ce sont des analyses phylogénétiques, basées sur la séquence de l'ADNr 16S, qui ont permis d'offrir de nouvelles perspectives pour déterminer la taxonomie biologique et l'origine des espèces (Woese & Fox, 1977). Ainsi, en 1990, Carl Woese propose de diviser le vivant en trois domaines : Bacteria, Eucarya et Archaea (Archaeobacteria) (Figure 2). L'adaptation des organismes se reflète également dans le métabolisme. De ce fait, il a été démontré que les Archaea étaient proches des pathogènes bactériens obligatoires, formant ainsi un groupe de procaryotes adaptés aux environnements extrêmes, à la base de l'arbre (Aguilar *et al.*, 2004).

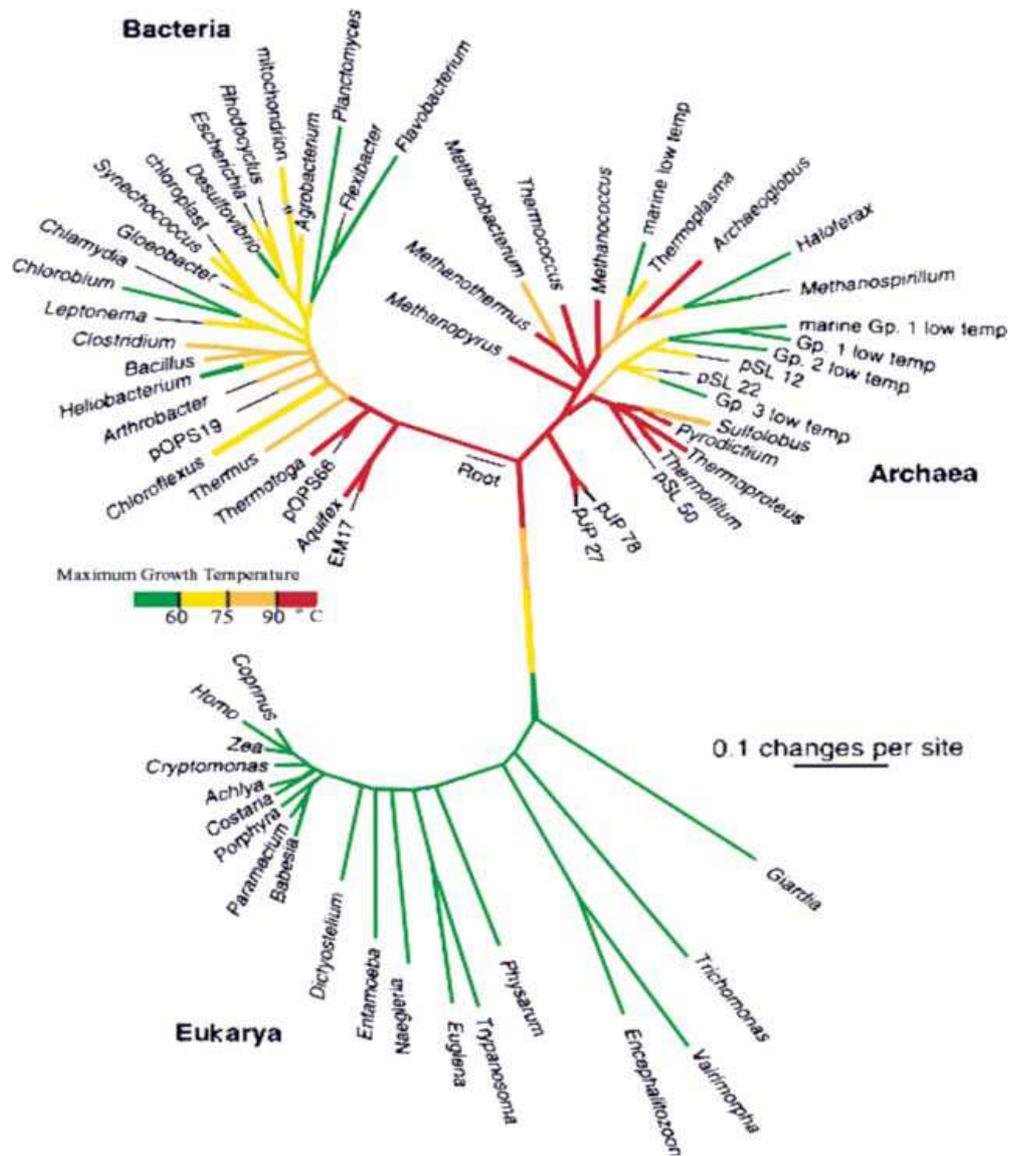


Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné, déterminé à partir de l'analyse comparative du gène ADNr 16S. D'après Schwartzman & Lineweaver, 2004.

I.2. Caractéristiques des Archaea

Les Archaea ont un métabolisme et une structure cellulaire similaire à ceux des bactéries. Elles sont, d'ailleurs considérées comme des procaryotes, étant donné qu'elles sont dépourvues de noyaux. De plus, les Archaea possèdent une diversité phénotypique comparable à celle des bactéries mais sont uniques du point de vue moléculaire (Forterre *et al.*, 2002). Même si les connaissances actuelles sont incomplètes du fait du nombre important de cellules non-cultivables, les Archaea se distinguent des bactéries sur de nombreux points, notamment au niveau de leur membrane et l'absence d'espace périplasmique. Les hyperthermophiles sont définis comme étant des microorganismes vivant à des températures optimales de croissance

pouvant aller au-delà de 80°C et supplantent les eucaryotes, dont la limite est située à environ 60°C (Figure 3). Les thermophiles ont une température de croissance comprise entre 50 et 80 °C. Par ailleurs, seules les Archaea sont capables de vivre à des températures allant jusqu'à 95°C, voire 113°C (Huber *et al.*, 2000).

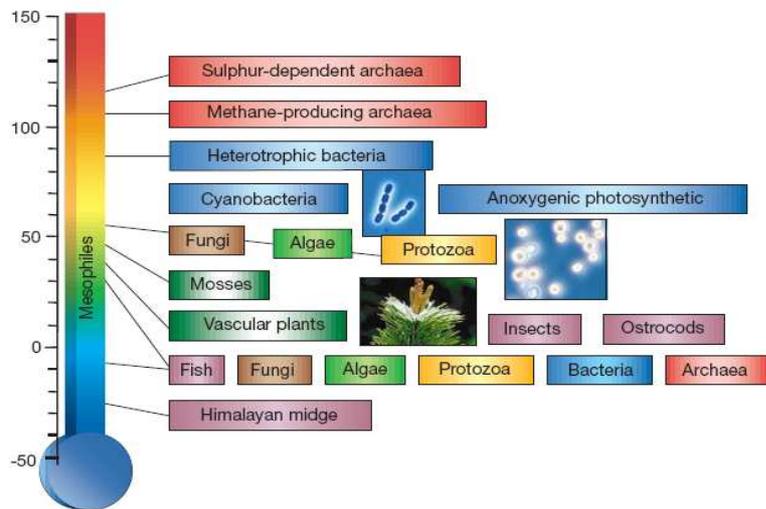


Figure 3 : Répartition de la vie en fonction de la température. D'après Rothschild & Mancinelli, 2001.

Les Archaea extrêmophiles vivent notamment dans les sources chaudes d'origine volcanique et des cheminées hydrothermales, dans le fond des océans. Généralement, il s'agit d'environnements anaérobies très acides ou très basiques. Des études suggèrent une réelle distribution des microorganismes au niveau des cheminées hydrothermales du fait de l'existence de gradients de température, de pH et de la disponibilité de substrats (Harmsen *et al.*, 1997). Les océans restent un écosystème privilégié où l'on retrouve, dans certaines zones, des biomasses importantes, comme par exemple en antarctique (Murray *et al.*, 1998). De ce fait, les organismes procaryotes sont souvent considérés en tant que picoplanctons. Il est alors largement concevable que les Archaea puissent se retrouver en association avec des eucaryotes, comme par exemple *Cenarchaeum symbosium*, localisée dans le tractus digestif de certaines éponges (Webster *et al.*, 2004).

I.3. Phyla des Archaea

Les Archaea ont tout d'abord été subdivisées en deux règnes ; Crenarchaeota et Euryarchaeota (Woese *et al.*, 1990) (Figure 4).

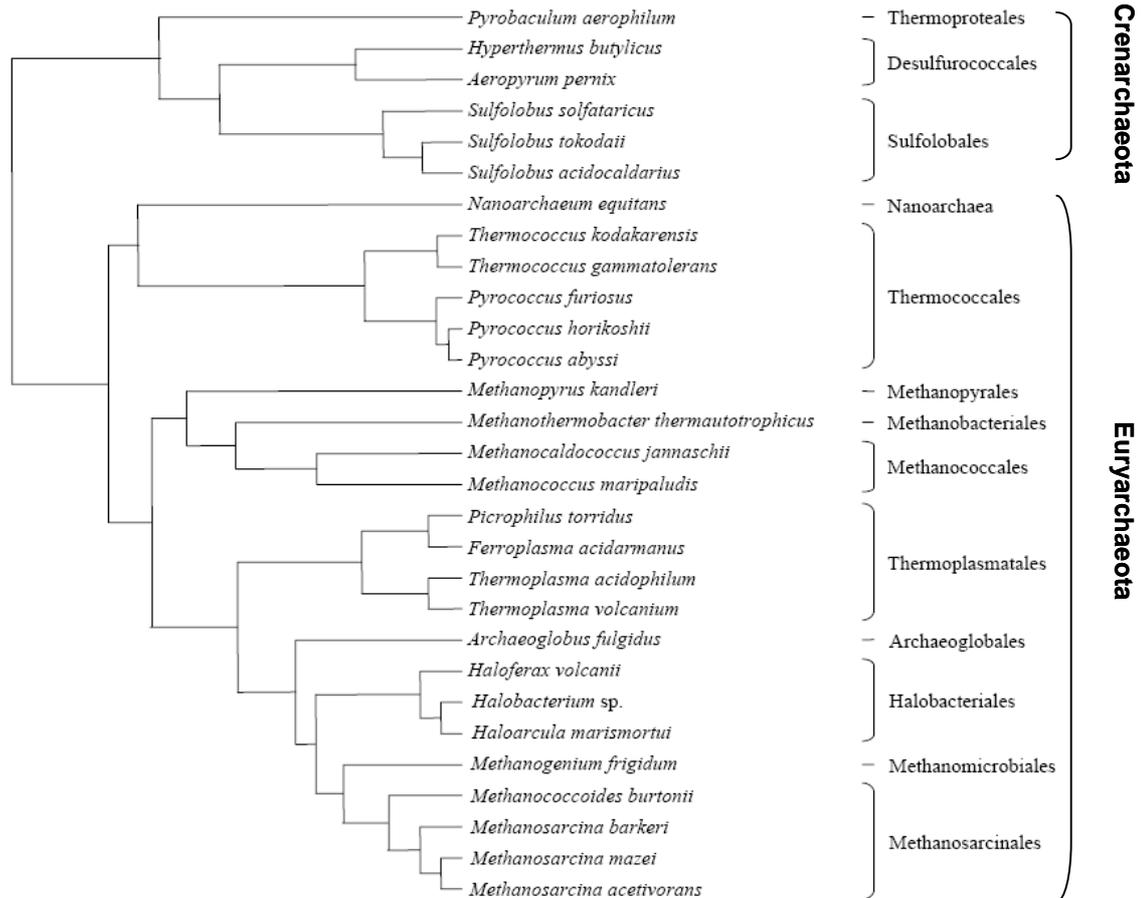


Figure 4 : Arbre phylogénétique représentant les différents groupes des Archaea pour lesquelles les séquences des génomes sont disponibles. D'après Gribaldo & Brochier-Armanet, 2006.

Grâce aux nouvelles explorations des environnements extrêmes, le panel des Archaea s'élargit et est, aujourd'hui, subdivisé en quatre phyla.

Au sein du phylum Crenarchaeota (Burggraf *et al.*, 1997), on retrouve de nombreux hyperthermophiles qui proviennent en majorité des habitats chauds, neutres, ou légèrement acides. Ils colonisent notamment les sources hydrothermales. En revanche, des Crenarchaeota psychrophiles colonisent les eaux froides et les glaces de mer.

Les Euryarchaeota représentent un phylum regroupant des Archaea diverses du point de vue physiologique. On trouve notamment les méthanogènes, qui sont des anaérobies strictes, et des halophiles extrêmes qui sont des aérobies strictes. Ce phylum comprend les genres hyperthermophiles *Thermococcus* et *Pyrococcus*, qui sont physiologiquement semblables. La différence majeure entre ces deux genres concerne la température optimale de croissance, i.e. 70-95°C et 70-106°C respectivement.

Le phylum Nanoarchaeota comprend une seule espèce connue, *Nanoarchaeum equitans*, qui est un petit procaryote parasite. Il pourrait vivre en symbiose avec *Crenarchaeota*

Ignicoccus. Cet organisme est membre d'une nouvelle branche distincte des principaux phyla (Huber *et al.*, 2002), qui a divergé de la branche des Euryarchaeota (Waters *et al.*, 2003). Son génome de 0,49 Mpb est le plus petit génome cellulaire connu. En revanche, il possède toujours les gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus moléculaires centraux, comme la réplication.

Les Korarchaeota ont été découverts pour la première fois au niveau des sources chaudes du parc national de Yellowstone (Barns *et al.*, 1996). Néanmoins, il n'y a aucune culture pure d'organismes appartenant à ce phylum. Des analyses phylogénétiques du gène codant pour l'ARN 16S positionnent les Korarchaeota dans une lignée lointaine ayant une affinité avec les Crenarchaeota (Elkins *et al.*, 2008). Cependant, des études récentes privilégient plutôt la création d'un nouveau phylum, appelé Taumarchaeota, dont l'organisme représentatif est *Cenarchaeum symbiosum* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008).

I.4. L'ordre des Thermococcales

L'ordre des Thermococcales appartient au phylum des Euryarchaeota. Les Thermococcales comportent 3 genres, *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus*. Ce sont des hyperthermophiles qui ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et côtières, de sources thermales continentales, et au niveau des eaux de gisements pétroliers.

Le genre *Pyrococcus* regroupe quatre espèces : *P. woesei* (Zillig *et al.*, 1987), *P. furiosus* (Fiala & Stetter, 1986), *P. abyssi* (Erauso *et al.*, 1993) et *P. horikoshii* (Gonzalez *et al.*, 1998). Trois génomes ont été entièrement séquencés : *P. horikoshii* (Kawarabayasi *et al.*, 1998), *P. furiosus* (DiRuggiero *et al.*, 2000) et *P. abyssi* (Cohen *et al.*, 2003). Ces espèces font d'eux de bons modèles d'étude en raison de la potentialité biotechnologique de leurs protéines et pour la compréhension des mécanismes de réplication.

Les séquences génomiques des trois espèces de *Pyrococcus* ont également été utilisées pour l'analyse de l'évolution des génomes et la détermination de l'origine de réplication (Myllykallio *et al.*, 2000, Zivanovic *et al.*, 2002). Aussi, la comparaison de trois espèces de *Pyrococcus* au niveau protéomique a permis de mettre en valeur un fort taux de délétions et d'insertions de gènes qui permet de vérifier une diversification fonctionnelle entre espèces (Lecompte *et al.*, 2001). Il existe donc bien un polymorphisme entre les trois espèces de *Pyrococcus*, lié aux différentes contraintes environnementales. La grande majorité des protéines de *Pyrococcus* sont de type bactérien alors que celles engagées dans la réplication sont de type eucaryote. De plus, les mécanismes d'évolution génomique chez les Archaea sont similaires à

ceux identifiés chez les bactéries. En effet, les Archaea hyperthermophiles répliquent leur ADN à grande vitesse, de façon bidirectionnelle, et en utilisant une seule origine de réplication, comme chez les bactéries (Lopez *et al.*, 1999, Myllykallio *et al.*, 2000). Par ailleurs, les espèces de *Pyrococcus* sont résistantes aux hautes doses d'irradiation (Gerard *et al.*, 2001), démontrant leur forte capacité à réparer les dommages de l'ADN.

Quelques différences subsistent dans les mécanismes de réplication de l'ADN entre les phyla des Archaea. En effet, chez les Crenarchaeota, il existe deux ou trois PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) homologues (De Felice *et al.*, 1999, Kawarabayasi *et al.*, 1999) et deux ou trois ADN polymérases de la famille B (Edgell *et al.*, 1997, Cann *et al.*, 1999b). Chez les Euryarchaeota, on dénombre seulement un PCNA (Cann *et al.*, 1999a), une ADN polymérase de la famille B (Cann *et al.*, 1998) et une autre de la famille D (Gueguen *et al.*, 2001)*.

I.5. *Pyrococcus abyssi*

P. abyssi a été isolée dans le bassin nord-fidjien à 2000 m de profondeur (Charbonnier *et al.*, 1992). C'est une coque de 0,8 à 2 µm, très mobile grâce à ses flagelles. Elle est Gram négative, anaérobie stricte et chimiohétérotrophe (Figure 5). Sa croissance est possible entre 67°C et 102°C, sous pression atmosphérique, avec un optimum à 96°C (Erauso *et al.*, 1993). C'est une hétérotrophe obligatoire qui fermente des peptides ou des acides aminés et produit de l'acétate, de l'isovalérate, de l'isobutyrate, du propionate, du dihydrogène et du dioxyde de carbone. Elle produit également du sulfure d'hydrogène quand sa croissance a lieu en présence de soufre ou de cystéine. Cette Archaea peut être cultivée en batch ou en culture continue (Godfroy *et al.*, 2000).

P. abyssi est considérée comme un organisme modèle pour des études physiologiques ou enzymologiques et pour des applications biotechnologiques. Le génome de *P. abyssi* a été entièrement séquencé au Génoscope en 1998. C'est d'ailleurs la première Archaea dont l'origine de réplication chromosomique (*oriC*) a été déterminée expérimentalement (Myllykallio *et al.*, 2000, Matsunaga *et al.*, 2001).

* Les mécanismes de la réplication de l'ADN chez les Archaea seront revus plus en détail dans la partie II. Réplication de l'ADN

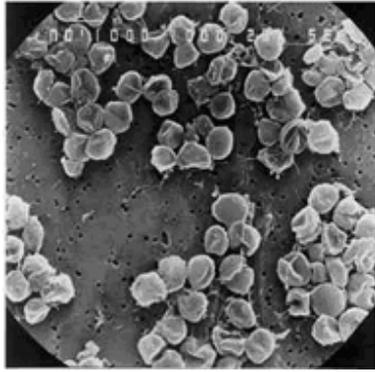


Figure 5 : Photo de *Pyrococcus abyssi* prise à partir d'un microscope électronique à balayage (photo IFREMER)

Bien que le mode de répllication soit de type bactérien, le génome de *P. abyssi* code pour des protéines de type eucaryote, pour les processus informatifs. Par exemple, le RPA (Replication Protein A) contient trois sous-unités, comme chez les eucaryotes (Komori & Ishino, 2001). De plus, on retrouve beaucoup de similitudes avec les eucaryotes au niveau des protéines de la fourche de répllication. En effet, les fragments d'Okazaki ont des tailles similaires chez *P. abyssi* et chez les eucaryotes (environ 150 nucléotides) et sont plus courts que les fragments d'Okazaki bactériens (1-2 kb) (Matsunaga *et al.*, 2003).

I.6. Relation des Archaea avec les deux autres domaines du vivant

Très rapidement, des études ont montré des similitudes du point de vue génétique entre les Archaea et les eucaryotes, d'une part, et les bactéries d'autre part. Les eucaryotes descendraient d'une cellule ancestrale qui aurait acquis des gènes d'Euryarchaeota et de Crenarchaeota *via* des transferts horizontaux de gènes (Yutin *et al.*, 2008). De même, il est fort probable qu'il existe un partage de gènes entre les deux domaines procaryotes, comme par exemple entre *P. abyssi* et les bactéries mésophiles (Cohen *et al.*, 2003). Par ailleurs, les chromosomes des Archaea sont circulaires et similaires à ceux des bactéries. Leur taille est comprise entre 1,5 et 6 Mbp. L'organisation des gènes et le pourcentage de gènes codants chez les Archaea sont également similaires à ceux des bactéries. Plusieurs caractéristiques génomiques sont communes à tous les procaryotes, comme l'organisation des opérons et le motif Shine-Dalgarno nécessaire à l'initiation de la traduction (Karlin *et al.*, 2005).

Les histones qui permettent d'organiser l'ADN dans la cellule et préviennent les possibles condensations de l'ADN, sont aujourd'hui très bien caractérisées chez les Archaea (Sandman & Reeve, 2005). Cependant, elles ne sont présentes que chez les Euryarchaeota et non chez les Crenarchaeota (Reeve *et al.*, 2004). Elles participent largement à la stabilisation de l'ADN en fonction de la température (Nakashima *et al.*, 2003).

De façon similaire aux eucaryotes, le promoteur des Archaea contient l'élément TATA localisé approximativement à 26 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (Reiter *et al.*, 1990). En revanche, le mécanisme de régulation de la transcription est plus proche de celui des procaryotes (Bell, 2005). Les principaux facteurs de transcriptions, tels que le TATA box-binding factor (TFP) et le facteur de transcription B (TFB), ont été caractérisés chez les Archaea (Bartlett, 2005).

Le génome de *Methanococcus jannaschii* a donné des informations sur le fait que les systèmes d'informations avaient plus de similarités avec les protéines des eucaryotes que celles des procaryotes (Olsen & Woese, 1996). En ce qui concerne la transcription, les Archaea sembleraient être des organismes ayant des protéines de type eucaryote dans un mécanisme de type bactérien (Bell & Jackson, 2001). De plus, le séquençage complet de génomes archéens a révélé l'existence d'homologie avec les protéines de réplication des eucaryotes (Bult *et al.*, 1996). En revanche, les processus d'énergie et le domaine de la communication semblent distincts dans chaque domaine du vivant (Andrade *et al.*, 1999). Enfin, les protéines des Archaea impliquées dans les mécanismes métaboliques et les fonctions de régulation sont généralement du type bactérien.

I.7. Notions de thermostabilité

La découverte des microorganismes hyperthermophiles a suscité beaucoup de travaux sur la thermostabilité des protéines. Cette thermostabilité s'explique notamment grâce à la faible surface exposée aux solvants, l'augmentation de la densité de charges qui réduit les cavités dans le cœur hydrophobe, une augmentation de l'hydrophobicité par la longueur réduite des boucles à la surface et aussi du nombre important de liens hydrophobes (Vogt *et al.*, 1997). Par ailleurs, les interactions ioniques jouent également un rôle. En effet, à titre d'exemple, des mutations réalisées sur une glutamate déshydrogénase induisaient une baisse sensible de la stabilité, sans pour autant compromettre les propriétés catalytiques (Vetriani *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été démontré que la réduction de la fréquence des acides aminés thermolabiles (i.e., alanine, histidine, glutamine, thréonine) contribue à la thermostabilité des protéines chez les organismes thermophiles (Singer & Hickey, 2003, Jaenicke & Böhm, 2001).

Eu égard à la forte stabilité des protéines issues d'organismes hyperthermophiles, le terme d'hyperstabilité est parfois employé. Les enzymes provenant des organismes hyperthermophiles, connues sous le nom de thermozymes, se caractérisent par des interactions plus nombreuses (liens hydrophobes, interactions électrostatiques, interactions hydrophobiques,

ponts disulfures, et fixation au métaux) et également par une structure conformationnelle (plus rigide, une efficacité d'empaquetage plus élevée, une entropie de dépliement réduite, et une stabilité des hélices α) (Li *et al.*, 2005). Il a été proposé que la rigidité excessive pourrait expliquer pourquoi les enzymes hyperthermophiles sont souvent inactives à basse température (Beaucamp *et al.*, 1997). Cependant, des études ont démontré que l'activité et la thermostabilité se régulaient de manière indépendante et pouvaient être optimisées, séparément, dans la même enzyme (Giver *et al.*, 1998). Finalement, beaucoup de questions restent en suspens sur l'importance de la rigidité et de la flexibilité d'une protéine ainsi que, sur la thermostabilité, l'activité, et la relation entre ces deux caractéristiques. Par ailleurs, des études portant sur *Pyrococcus furiosus*, ont démontré l'existence de protéines chaperonnes qui permettent de stabiliser les protéines durant un stress thermique (Shockley *et al.*, 2003).

I.8. Applications biotechnologiques

Les enzymes issues des Archaea thermophiles ont une meilleure stabilité vis-à-vis de la chaleur, mais également de la pression, des détergents et des solvants organiques, comparées à leurs homologues bactériens. De plus, elles ont souvent une plus forte tolérance aux hautes pressions et aux métaux lourds. Ainsi, la purification par traitement à hautes températures en est facilitée. Grâce à tous ces avantages, les thermozymes sont attractives pour l'industrie (Vieille & Zeikus, 2001). Elles sont considérées comme étant un outil performant dans les processus industriels de biotransformation. Des bénéfices qui en découlent sont également une baisse des risques de contamination, une faible viscosité, et la haute solubilité des substrats (Egorova & Antranikian, 2005).

I.8.1. Les Divers domaines d'application

Les enzymes thermostables sont particulièrement utilisées dans l'industrie de l'amidon. L'intérêt des procédés de dégradation de l'amidon est la production de glucose, de fructose ou de dextrans. Les hydrolyses catalytiques nécessaires requièrent des hautes températures, d'où l'intérêt de l'utilisation d'enzymes thermostables (amylases, pullulanases) (Leveque *et al.*, 2000). De plus, grâce au potentiel des extrêmozymes, des perspectives s'ouvrent pour la production de nouvelles molécules (Gupta *et al.*, 2003).

La cellulose est un des biopolymères organiques les plus abondants dans la nature. Il y a ainsi un marché assez important au niveau des procédés de dégradation de cette molécule. La cellulose est hydrolysée en glucose par des endo- et exo-glucanases. Des enzymes de ce type ont

été découvertes chez *P. horikoshii* (Kashima *et al.*, 2005). Ici aussi, de nombreuses perspectives sont offertes et la production de nouveaux oligosaccharides est possible, grâce à l'utilisation de beta-glucosidases (Schiraldi & De Rosa, 2002).

Très récemment, de nombreuses enzymes, pouvant dégrader la chitine, ont été découvertes. C'est notamment le cas d'enzymes de *Thermococcus kodakaraensis* ayant une activité déacétylase et exo-beta-D-glucosaminase (Tanaka *et al.*, 2004).

I.8.2. Processus liés à l'ADN

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est un procédé nécessitant l'utilisation de protéines thermostables. Lors de ce processus, il est très important de réduire les erreurs d'amplifications ; c'est pour cela que l'utilisation d'ADN polymérase à haute fidélité devient essentielle. L'ADN polymérase I de *Thermus aquaticus*, la *Taq* polymérase, (Chien *et al.*, 1976) fut la première ADN polymérase thermostable utilisée spécialement pour la PCR. Cependant, elle ne possède pas d'activité exonucléase 3'→5' et n'est, par conséquent, pas capable de corriger les erreurs d'appariement. Les ADN polymérase des espèces hyperthermophiles, telles que *Thermococcus* et *Pyrococcus*, sont connues comme ayant de grandes capacités de relecture. Les ADN polymérase de la famille B sont très largement utilisées et proviennent de diverses Archaea. D'ailleurs, les Thermococcales sont la principale source d'ADN polymérase commercialisées pour les applications en PCR (Majernik *et al.*, 2004). C'est le cas notamment de l'ADN polymérase *Pwo* de *P. woesei* (Dabrowski & Kur, 1998), l'ADN polymérase *Pfu* de *P. furiosus* (Lundberg *et al.*, 1991) et l'ADN polymérase Isis de *P. abyssi* (Dietrich *et al.*, 2002). Le principal désavantage de la plupart des ADN polymérase des Archaea est leur vitesse, largement plus faible que celle de la *Taq* polymérase, 9 à 25 s⁻¹ contre 47 à 61 s⁻¹, respectivement. En conséquence, cette dernière n'a jamais vraiment été remplacée. En revanche, l'ADN polymérase recombinante KOD1 provenant de *Thermococcus kodakaraensis* propose de nouvelles perspectives car elle possède des taux d'erreurs très faibles, en plus d'une haute processivité (Takagi *et al.*, 1997). Afin d'améliorer ces deux paramètres, de nouvelles stratégies voient le jour et consistent notamment à la création d'ADN polymérase mutantes (Biles & Connolly, 2004). Une autre voie explorée est la création de produits consistant en des mélanges d'ADN polymérase thermostables archéennes et bactériennes (Cline *et al.*, 1996). Une autre voie de recherche consiste à caractériser les facteurs accessoires des ADN polymérase, afin d'améliorer leur processivité et leur fidélité. Des recherches sur l'obtention de complexes protéiques *in vitro* ont déjà été menées (Motz *et al.*, 2002).

D'autres applications importantes en biologie moléculaire, comme la ligature de l'ADN et le séquençage de l'ADN, trouvent également leurs sources dans les extrêmozymes. A titre d'exemple, la carboxypeptidase de *Sulfolobus solfataricus* est utilisée pour le séquençage en C-terminal car elle a la spécificité de libérer, à la fois, les résidus acides, mais aussi basiques et aromatiques (Colombo *et al.*, 1992). Aussi, l'ADN ligase de *P. furiosus* (Nishida *et al.*, 2005b) est d'ores et déjà commercialisée et utilisable pour la ligature de l'ADN, et également les réactions en chaîne de ligatures (LCR).

I.8.3. Autres potentialités

Tout comme les enzymes, les lipides portent un intérêt biotechnologique. Ils forment des liposomes qui sont notamment utilisés en médecine en tant que systèmes de livraison de drogues ou de gènes (Patel & Sprott, 1999, Jacquemet *et al.*, 2009). En effet, les liposomes des Archaea, appelés archaesomes sont très stables au stress oxydatif, à la température et au pH alcalin, grâce aux lipides qui les composent. De la même façon, les polysaccharides des Archaea possèdent des potentialités exploitables. Etant tolérants aux fortes salinités, températures et pH, ils sont par conséquent de bons agents émulsifiants (Oren, 2002).

II. La réplication de l'ADN

II.1. Introduction

La réplication de l'ADN est un mécanisme fonctionnellement conservé dans les organismes des trois domaines du vivant : Bacteria, Eukarya, Archaea (Kelman & O'Donnell, 1994, Forterre *et al.*, 2004). Même si le mécanisme de la réplication de l'ADN doit être fidèle afin d'assurer la propagation de l'information génétique, des erreurs peuvent être tolérées. Ainsi, les générations peuvent se diversifier et des processus d'évolution et de sélection entrent en vigueur. Néanmoins, une réplication inappropriée peut avoir de réelles conséquences au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme. Ainsi, la réplication de l'ADN participe à la maintenance de l'intégrité du génome (Touaille & Hübscher, 2004).

Durant ce processus, les deux brins de l'ADN parental se séparent avant la mise en place de l'ADN polymérase qui permettra la synthèse d'un nouveau brin complémentaire au brin matrice. Ainsi, à l'issue de la réplication, les deux molécules d'ADN formées sont constituées d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé. Par conséquent, la réplication est dite semi-conservative. C'est un mécanisme complexe qui nécessite la coordination parfaite entre différents facteurs protéiques (Waga & Stillman, 1998). Une analyse des génomes archéens a permis l'identification d'homologies avec les facteurs accessoires eucaryotes, le PCNA et le RF-C. Diverses études ont montré que les protéines provenant des Archaea et celles des eucaryotes pouvaient interagir fonctionnellement entre elles, ce qui indique que ces protéines sont fonctionnellement conservées à travers l'évolution. Ainsi, l'interaction entre la FEN-1 (Flap endonucléase 1) de *P. furiosus* et le PCNA humain a été démontrée (Hosfield *et al.*, 1998). Toujours chez cette même espèce, le PCNA interagit fonctionnellement avec la Pol δ et également avec le RF-C humain en augmentant son activité ATPasique (Ishino *et al.*, 2001). De même, le PCNA de *Thermococcus fumicolans* interagit fonctionnellement avec le RF-C humain (Henneke *et al.*, 2000). Malgré cette relation entre les protéines de réplication des eucaryotes et des Archaea, les mécanismes mis en jeu diffèrent souvent sensiblement, en partie parce que le réseau des protéines de la réplication de l'ADN chez les Archaea est plus simple que chez l'homologue eucaryote. Il a en quelque sorte moins de sous-unités protéiques impliquées.

Le tableau 1 nous présente les principales protéines impliquées dans la réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant.

Etapes	Fonctions	Bacteria	Eukarya	Archaea
Initiation	Reconnaissance de l'origine	DnaA (monomère)	ORC (hétérohexamère, Orc1-6)	ORC/cdc6 (1 à 2 sous-unités)
	Chargement de l'hélicase	DnaC/DnaI (1 sous-unité)	Cdc6 (1 sous-unité) et Cdt1	ORC/cdc6 (1 à 2 sous-unités)
	Hélicase réplivative	DnaB/DnaC (homo-hexamère)	MCM (hétérohexamère, MCM 2-7)	MCM (homo-hexamère)
Elongation	Stabilisation de l'ADN simple brin	SSB (homodimère)	RPA (hétérotrimère)	SSB ou RPA (homodimère ou hétérotrimère)
	Création de l'amorce d'ARN	DnaG (monomère)	Pol α /primase (hétérotétramère)	Primase (hétérodimère)
	Activité polymérase	Pol III Noyau : α , ϵ , θ (3 sous-unités) Dimère : $2(\alpha, \epsilon, \theta) + 2 \tau$	ADN Polymérase de la famille B	Pol B (monomère)
			Pol δ (3 ou 4 sous-unités)	Pol D (hétérodimère)
			Pol ϵ (4 sous-unités)	
	Activité 3'→5'	Sous-unité α et ϵ de Pol III	Sous domaines de Pol δ et Pol ϵ	Sous domaine de Pol B et DP1 de Pol D
	Facteur de chargement	Complexe γ (hétéropentamère)	RF-C (hétéropentamère, RF-C 1-5)	RF-C (hétéropentamère ou hétérohexamère)
Facteur de processivité	2 sous-unités β	PCNA (homotrimère)	PCNA (hétérotrimère ou homotrimère)	
Maturation des fragments d'Okazaki	Excision des amorces d'ARN	Pol I, RNase H (1 sous-unité)	FEN-1 (1 sous-unité), RNase H (1 sous-unité)	FEN-1 (1 sous-unité), RNase H (1 sous-unité)
	Ligature des fragments d'Okazaki	DNA ligase (1 sous-unité)	DNA ligase I (1 sous-unité)	DNA ligase I (1 sous-unité)

Tableau 1 : Comparaison de la réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant. D'après Grabowski & Kelman, 2003 et Bohlke *et al.*, 2002.

La réplication de l'ADN se déroule en plusieurs étapes dont nous décrivons la mise en place en les illustrant par les divers facteurs protéiques impliqués. Ensuite, les ADN polymérases, ainsi que ses facteurs accessoires, le RF-C (Replication factor C) et le PCNA, sur lesquels se sont basés les travaux de ce doctorat, seront présentés plus en détail dans les trois domaines du vivant.

II.2. La phase d'initiation

II.2.1. La reconnaissance de l'origine de réplication

La réplication de l'ADN débute par une phase d'initiation durant laquelle une origine de réplication est reconnue par Cdc6 et l'hélicase MCM (Minichromosome maintenance complex) qui seront définies dans le paragraphe suivant. Même si les séquences de l'origine de réplication varient énormément selon les organismes, il s'agit en général de séquences riches en A-T. Alors que *P. abyssi* possède une seule origine de réplication chromosomale (*oriC*) (Myllykallio *et al.*, 2000, Matsunaga *et al.*, 2001), plusieurs origines sont présentes chez d'autres espèces. En effet, deux origines sont prédites chez différentes espèces de *Halobacterium* (Kennedy *et al.*, 2001), tout comme chez *S. solfataricus* (Robinson *et al.*, 2004) et jusqu'à trois origines chez *Sulfolobus* (Lundgren *et al.*, 2004). Enfin, il est possible qu'une multitude d'origines soit présente chez *Methanococcus jannaschii* (Maisnier-Patin *et al.*, 2002). La présence de plusieurs origines de réplication pourrait refléter l'expression différente des protéines selon les conditions environnementales. Les éléments de séquences, appelés ORB (origin recognition box), sont également conservés chez les Archaea, mais ce n'est que récemment qu'ils ont été démontrés expérimentalement (Majernik & Chong, 2008).

II.2.2. Chargement et activité de l'hélicase répllicative

Durant la réplication, l'ADN doit pouvoir servir de matrice et rendre disponible les bases pour l'appariement avec les dNTPs qui formeront le brin néosynthétisé. La double hélice formée des deux brins d'ADN doit, par conséquent, être déroulée. Cette étape est réalisée par une hélicase, qui se fixe au niveau de l'origine de réplication.

Le processus d'initiation est mal connu chez les Archaea. L'analyse des séquences génomiques ont révélé que les Archaea possédaient des homologies avec les facteurs impliqués dans l'initiation, chez les eucaryotes, comme le MCM (Carpentieri *et al.*, 2002) ou Cdc6 (De Felice *et al.*, 2003) (Figure 6). En revanche, des homologues des protéines eucaryotes comme

Cdt1 n'ont pas été retrouvées, bien qu'il soit probable qu'une protéine, ayant les mêmes fonctions que Cdt1, existe chez les Archaea (Barry & Bell, 2006).

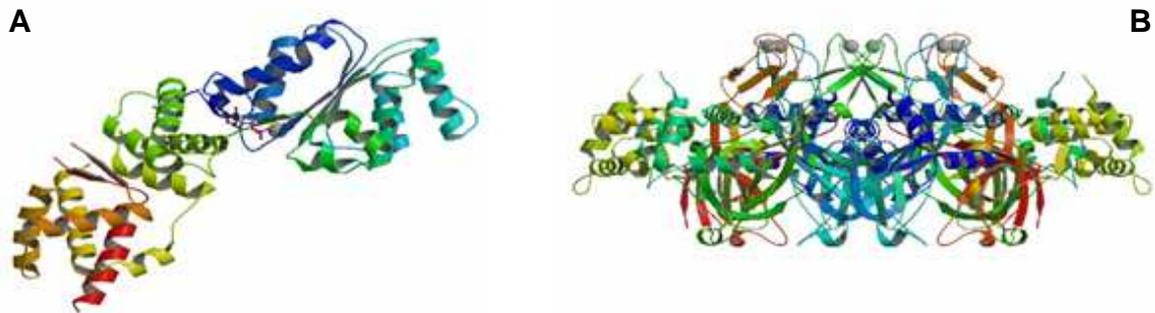


Figure 6 : Structure des protéines intervenant dans l'initiation de la réplication de l'ADN. Les codes PDB sont donnés entre parenthèses. A) Cdc6 de *Pyrobaculum aerophilum* (1FNN). D'après Liu *et al.*, 2000 ; B) MCM de *S. solfataricus* (2VL6). D'après Liu *et al.*, 2008.

Des travaux chez *Sulfolobus solfataricus* ont démontré que Cdc6 reconnaissait l'origine de réplication et se liait à l'ADN simple ou double brin, de façon ATP-indépendante (Robinson *et al.*, 2004). Chez ce même organisme, Cdc6 interagit avec le MCM et stimule son chargement sur l'ADN (De Felice *et al.*, 2004). De plus, chez *Methanobacter thermoautotrophicus*, ce serait l'interaction Cdc6-MCM qui jouerait un rôle important dans l'activité hélicase (Kasiviswanathan *et al.*, 2005).

Il a été démontré que le MCM séparait les deux brins dans les deux directions, même si le mécanisme de déroulement reste encore mal connu. Le MCM est généralement un double homohexamère, dont la structure en forme d'anneau se déforme et se reforme autour de l'ADN, comme chez *M. thermoautotrophicus* (Gomez-Llorente *et al.*, 2005). Néanmoins, chez le même organisme, il pourrait former un anneau heptamérique qui perdrait une sous-unité quand il se lie à l'ADN (Yu *et al.*, 2002). Toujours chez *M. thermoautotrophicus*, le MCM se lie à l'ADN simple brin, en présence ou en absence d'ATP, mais peut également se lier à un ADN double brin (Fletcher *et al.*, 2003). Son activité d'hélicase se fait dans le sens 3'→5' (Grabowski & Kelman, 2003), c'est-à-dire qu'il serait positionné sur le brin avancé.

II.3. La phase d'élongation

II.3.1. Stabilisation de l'ADN simple brin

A l'issue de cette étape de déroulement, les brins d'ADN sont séparés et constituent la fourche de réplication où se positionneront les protéines permettant la synthèse d'ADN. Tout

d'abord, le SSB (single-strand binding proteins) chez les bactéries ou le RPA chez les eucaryotes, se lie avec une forte affinité à l'ADN simple brin afin de le protéger de l'attaque des nucléases et des modifications chimiques (Figure 7). Chez les Archaea, le RPA est composé de trois sous-unités différentes RPA41, RPA14 et RPA32 notamment chez les espèces du genre *Pyrococcus*, mais est également retrouvé sous forme dimérique chez d'autres Euryarchaeota (Robbins *et al.*, 2005). En revanche, la forme homotétramérique de type bactérien est retrouvée chez les Crenarchaeota (Kerr *et al.*, 2003). Les RPA interagissent avec les protéines impliquées dans la réplication (ADN polymérase, primase, PCNA et RF-C) et aussi celles impliquées dans la recombinaison (Komori & Ishino, 2001). Ils seraient également en relation avec les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation comme chez *S. solfataricus* (Cubeddu & White, 2005). Chez les Archaea, peu de données sont disponibles sur les RPA, même si des études, notamment en anisotropie de fluorescence, permettent d'accroître nos connaissances sur leur activité de liaison à l'ADN (Kernchen & Lipps, 2006).

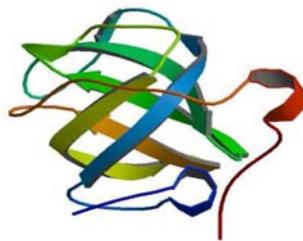


Figure 7 : Structure de SSB de *S. solfataricus*. Code PDB : 1O7L. D'après Kerr *et al.*, 2003.

II.3.2. Création de l'amorce ARN

Les ADN polymérase sont incapables d'initier la synthèse d'ADN non amorcé. Ainsi, le complexe ADN polymérase/primase amorcera la synthèse par un brin ADN/ARN avant que l'ADN polymérase n'élongue l'amorce appariée pour former le brin néosynthétisé. La primase a la particularité d'être beaucoup moins processive que les ADN polymérase chez les eucaryotes (Yuzhakov *et al.*, 1999). Chez les Archaea, il n'existe pas d'équivalent de Pol α mais elles possèdent les homologues eucaryotes de la petite sous-unité (PriS) et de la grande (PriL) de l'ARN polymérase. En effet, des analyses génomiques, chez plusieurs espèces d'Euryarchaeota, ont démontré que la primase était un hétérodimère composé d'une petite sous-unité catalytique p41 et une grande sous-unité p46 (Makarova *et al.*, 1999) (Figure 8). La petite sous-unité de la primase, chez *S. solfataricus* et *P. abyssi*, synthétise des amorces ARN et ADN (Lao-Sirieix & Bell, 2004, Le Breton *et al.*, 2007). Des travaux chez *P. furiosus*, ont montré que la grande sous-unité stabiliserait p41 sur l'ADN (Bocquier *et al.*, 2001). De plus, elle jouerait un rôle de régulation, étant donné qu'elle accroît l'activité ARN polymérase et décroît l'activité ADN

polymérase de *P. furiosus* (Liu *et al.*, 2001). Elle pourrait ainsi être impliquée dans la synthèse des amorces ARN lors de la formation des fragments d'Okazaki.

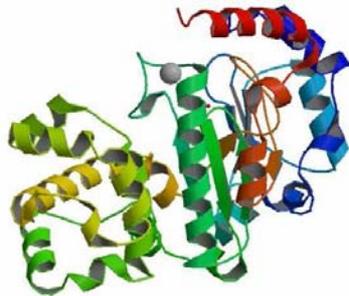


Figure 8 : Structure de la primase de *P. horikoshii*. Code PDB : 1V33. D'après Ito *et al.*, 2003.

II.3.3. Elongation

La reconnaissance de cette amorce ARN/ADN se fait par l'intermédiaire du RF-C (facteur de réplication C) ou facteur de chargement, qui ouvre le PCNA, le fixe sur l'ADN, et provoque le déplacement de la primase (Maga *et al.*, 2000). L'ADN polymérase peut alors se lier à l'ADN et enclencher la synthèse d'ADN.

Une des principales caractéristiques de la réplication de l'ADN est que les deux brins sont antiparallèles. Les ADN polymérases ajoutent les bases du nouveau brin dans le sens 5'→3'. Pour le brin dit brin avancé, l'ADN polymérase n'a besoin que d'une amorce d'ARN qui s'apparie sur le brin parental orienté 3'→5'. La synthèse est par conséquent continue. En revanche, la difficulté vient de la formation de l'autre brin, dit brin retardé. Dans ce cas, le brin est élongué de façon discontinue à partir d'amorces d'ARN qui s'apparient périodiquement au brin parental. L'élongation de ces amorces, appariées dans le sens 5'→3', forme des fragments d'Okazaki qui sont de type eucaryote (Matsunaga *et al.*, 2003).

II.3.4. Maturation des fragments d'Okazaki

Sur le brin retardé, l'amorce d'ARN est ensuite excisée par FEN-1 et RNaseHII. FEN-1 a une activité 5'-flap endonucléase et a été identifiée biochimiquement et structurellement chez plusieurs Archaea, dont *P. horikoshii* (Matsui *et al.*, 1999) et *M. jannashii* (Hwang *et al.*, 1998). RNaseHII possède une activité d'excision d'amorce ARN démontrée notamment chez *Archaeoglobus fulgidus* (Chapados *et al.*, 2001). Chez *M. jannaschii*, elle serait structurellement proche de son homologue eucaryote (Lai *et al.*, 2000). Chez *P. furiosus*, une coopération entre FEN-1 et RNase HII a été observée (Sato *et al.*, 2003). En effet, alors que RNaseHII dégraderait la région amorcée d'ARN grâce à son activité ARN exonucléasique, FEN-1 exciserait le dernier ribonucléotide au niveau de la jonction ARN-ADN. Toutefois, chez les eucaryotes, un autre

mécanisme est proposé, durant lequel FEN-1 couperait le brin d'ADN libre engendré par le déplacement de brin effectué par l'ADN polymérase (Rossi *et al.*, 2006). Au niveau du brin retardé, le PCNA joue 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. Des travaux, chez *S. solfataricus*, ont démontré l'interaction entre le PCNA et FEN-1 (Dore *et al.*, 2006). Ce complexe pourrait ainsi agir comme une exonucléase (Hosfield *et al.*, 1998). A l'issue de cette réaction, l'amorce d'ARN excisée laisse un creux qui est comblé par une chaîne d'ADN synthétisée par l'ADN polymérase et allant jusqu'au prochain fragment d'Okazaki situé en aval.

Enfin, la ligature de ces différents fragments est réalisée par l'ADN ligase. Chez les Archaea, seule l'ADN ligase I a été découverte. Elle est, comme chez les eucaryotes, ATP-dépendante chez *Thermococcus kodakaraensis* (Nakatani *et al.*, 2000) et également chez *Sulfolobus shibatae* (Lai *et al.*, 2002). Elle serait beaucoup plus tolérante aux erreurs d'appariement en 5' et débiterait son activité de ligature en 5' (Nakatani *et al.*, 2002). Durant cette étape de ligature, le PCNA jouerait également un rôle important. En effet, à titre d'exemple, chez *S. solfataricus*, il a été démontré une interaction entre l'ADN ligase I et le PCNA suite à d'importants changements conformationnels et d'une flexibilité des deux protéines (Pascal *et al.*, 2006). La figure 9 présente la structure des protéines impliquées dans la maturation des fragments d'Okazaki.

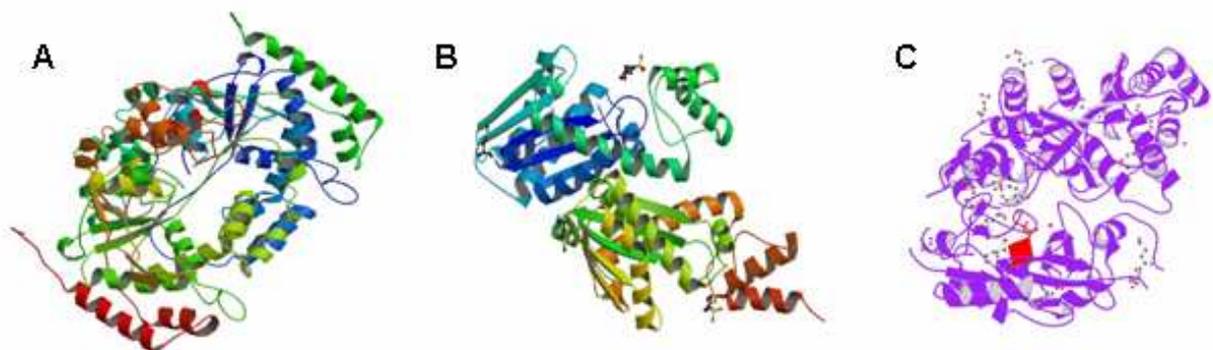


Figure 9 : Structure des protéines intervenant dans la maturation des fragments d'Okazaki. A) FEN-1 de *P. furiosus* (1B43). D'après Hosfield *et al.*, 1998 ; B) RNase HII de *Methanococcus jannaschii* (1EKE). D'après Lai *et al.*, 2000 ; ADN ligase I de *P. furiosus* (2CFM). D'après Nishida *et al.*, 2006. Les codes PDB sont entre parenthèses.

De nombreux travaux ont permis d'améliorer nos connaissances au niveau de la réplication de l'ADN même si évidemment, de nombreuses questions subsistent. La figure 10 propose un modèle d'architecture de la fourche de réplication de l'ADN chez les Archaea.

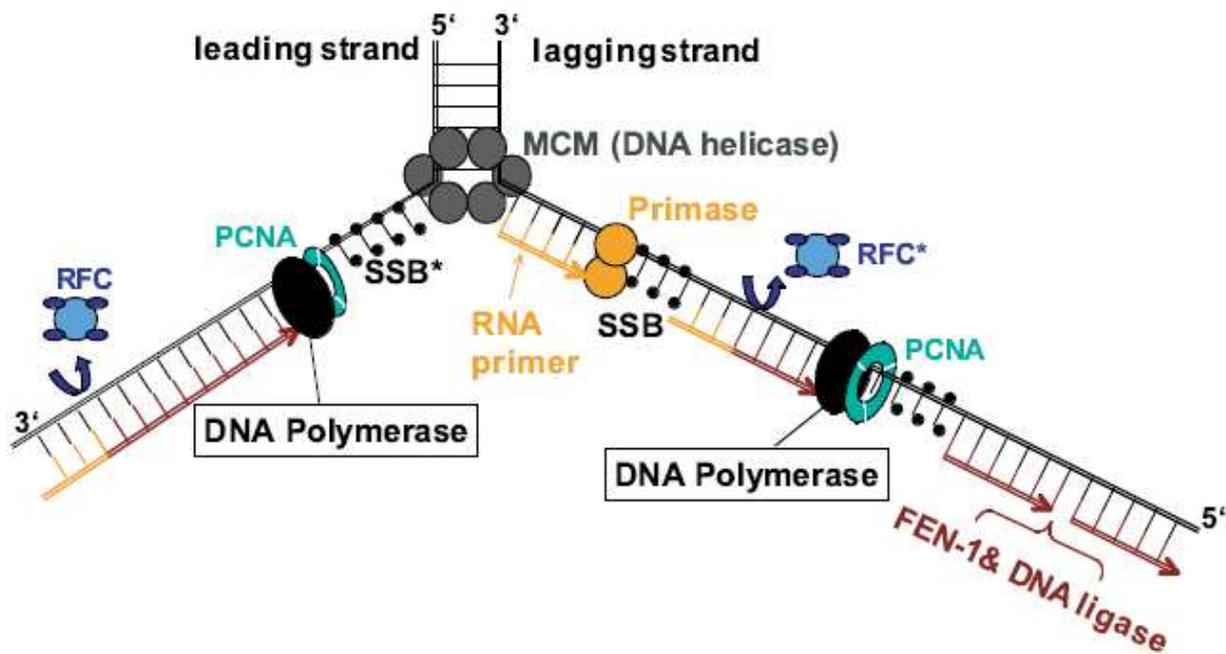


Figure 10 : Schéma représentatif de la fourche répliquative chez les Archaea et de ses principaux facteurs protéiques. D'après Bohlke *et al.*, 2002.

II.4. Les ADN Polymérases

II.4.1. Distribution au sein des trois domaines du vivant

Les ADN polymérases ont pour principale fonction la synthèse d'ADN. Elles achèvent la réplication de l'ADN en incorporant des bases (A, T, C et G) afin de former le brin complémentaire de la matrice. Elles sont retrouvées dans les trois domaines du vivant et constituent une large gamme de complexes qui diffèrent dans leur composition polypeptidique et leurs propriétés catalytiques. Les ADN polymérases sont classées suivant leur structure primaire en six familles : A, B, C, D, X et Y (Rothwell & Waksman, 2005).

Chez les bactéries, les ADN polymérases I et II, appartenant respectivement aux familles A et B, sont impliquées dans les mécanismes de réparation, tandis que l'ADN polymérase III est la réplique chromosomique. Cette dernière est un complexe multipolypeptidique appartenant à la famille C, incluant les deux facteurs protéiques τ et γ , en plus des sous-unités α , ϵ et θ du cœur de la polymérase (O'Donnell *et al.*, 2001, Johnson & O'Donnell, 2005). Le noyau est formé de la Pol α qui possède l'activité polymérasique, la Pol ϵ dotée de l'activité 3'→5' exonucléasique (Kelman & O'Donnell, 1995) et les sous-unités θ qui stimuleraient l'activité exonucléase (Slater *et al.*, 1994). Les sous-unités τ permettent la connexion entre le noyau et le facteur de chargement, appelé complexe γ (Blinkova *et al.*, 1993) et également l'hélicase Dna B (Kim *et*

al., 1996). L'ADN polymérase III est sous forme dimérique ($2 \times (\alpha, \epsilon, \theta) + 2\tau$) mais plus récemment, une étude a montré qu'elle pouvait être considérée comme une réplicase trimérique (McInerney *et al.*, 2007).

Chez les eucaryotes, trois ADN polymérases, appartenant toutes à la famille B, sont impliquées dans la réplication de l'ADN. Alors que le complexe primase/Pol α a pour rôle la formation de l'hybride ARN/ADN, deux réplicases, appelées Pol δ et ϵ , assurent la copie fidèle du génome entier. L'ADN polymérase δ est composée de trois sous-unités, chez *Saccharomyces Cerevisiae* (Burgers & Gerik, 1998), et quatre sous-unités chez *Schizosaccharomyces pombe* et chez l'humain (Zuo *et al.*, 2000, Podust *et al.*, 2002). Chez la levure, la sous-unité catalytique est appelée Pol 3 et les trois autres petites sous-unités Cdc1, Cdc27 et Cdm1. Chez l'homme notamment, les sous-unités sont appelées p125 (sous-unité catalytique), p50, p68 et p12 ; p68 et p12 permettraient de stabiliser le complexe grâce à leur interaction avec le PCNA (Li *et al.*, 2006). L'ADN polymérase ϵ est, quant à elle, active en tant qu'hétérotétramère chez tous les eucaryotes (Chilkova *et al.*, 2003). Les sous-unités la composant sont appelées Pol 2 (sous-unité catalytique), Dpb2, Dpb3 et Dpb4 (Hamatake *et al.*, 1990). Les ADN polymérases δ et ϵ sont essentielles pour la réplication de l'ADN et la survie des cellules (Blank *et al.*, 1994) ; (Feng & D'Urso, 2001). En plus de leur activité ADN polymérasique, les Pols δ et ϵ possèdent une activité 3'→5' exonucléase, dont le domaine catalytique est situé au niveau de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité (Hübscher *et al.*, 2002). Même si leur rôle n'est pas encore clairement identifié, l'ADN polymérase δ pourrait être impliquée dans la synthèse des fragments d'Okazaki sur le brin retardé, alors que l'ADN polymérase ϵ faciliterait la synthèse du brin avancé (Fukui *et al.*, 2004).

Au sein du domaine des Archaea, il a été établi qu'une divergence significative existait dans les principaux phyla, c'est-à-dire les Crenarchaeota et les Euryarchaeota. Les Crenarchaeota possèdent généralement entre deux et trois ADN polymérases monomériques de la famille B (Cann *et al.*, 1999b, Iwai *et al.*, 2000). Chez les Sulfolobales, genre qui appartient aux Crenarchaeota, une analyse génétique a permis de déterminer l'existence de trois ADN polymérases B1, B2 et B3 (Edgell *et al.*, 1997). Les Euryarchaeota possèdent, elles, une ADN polymérase de la famille B, proche de l'ADN polymérase I de *Escherichia coli* (Komori & Ishino, 2000), et une ADN polymérase hétérodimérique appartenant à une nouvelle famille D (Cann *et al.*, 1998, Ishino *et al.*, 1998, Gueguen *et al.*, 2001). La Pol D a longtemps été considérée comme restreinte à ce phylum, avant d'être détectée chez *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* (Elkins *et al.*, 2008), *Nanoarchaeum* (Waters *et al.*, 2003) et *Cenarchaeum symbosium* (Hallam *et al.*, 2006). Ces assemblages démontrent comment les composants

protéiques ont distinctement évolué chez les Archaea. Enfin, il est intéressant de noter que la nouvelle famille Y est présente dans les trois domaines du vivant (Ohmori *et al.*, 2001, Boudsocq *et al.*, 2001). Les ADN polymérases, appartenant à ce dernier groupe, sont peu fidèles en présence d'ADN non endommagé, et sont capables de franchir divers types de lésions ; cette tolérance vis-à-vis des dommages de l'ADN est appelée translésion ou synthèse translésionnelle.

II.4.2. L'ADN polymérase B

Etant largement représentée dans les deux phyla des Archaea, l'ADN polymérase B a rapidement été caractérisée biochimiquement (Cann *et al.*, 1999b, Cambon-Bonavita *et al.*, 2000). En plus de l'activité polymérasique 5'→3', l'ADN polymérase B possède également l'activité 3'→5' exonucléasique correctrice d'erreurs (Pisani *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2006). Cette capacité de relecture a été déterminée chez plusieurs organismes, dont *S. solfataricus* (Lou *et al.*, 2004) et *Pyrobaculum islandicum* (Kahler & Antranikian, 2000). Chez *P. abyssi*, il a été clairement démontré que l'ADN polymérase B synthétisait le brin avancé (Henneke *et al.*, 2005). Elle pourrait également participer dans les processus de réparation. En effet, elle reconnaît les bases uraciles qui apparaissent après une désamination de la cytosine (Greagg *et al.*, 1999). La reconnaissance de cette base uracile se produirait exclusivement chez les Archaea (Wardle *et al.*, 2008). De plus, des travaux ont pu déterminer structurellement le mode de liaisons, notamment chez *S. solfataricus* (Savino *et al.*, 2004) et *T. gorgonarius* (Firbank *et al.*, 2008). Ainsi, une poche dénommée « uracil pocket », située au niveau du N-terminus, permettrait à l'ADN polymérase B de se positionner au niveau de la mutation sur l'ADN (Fogg *et al.*, 2002) (Figure 11).

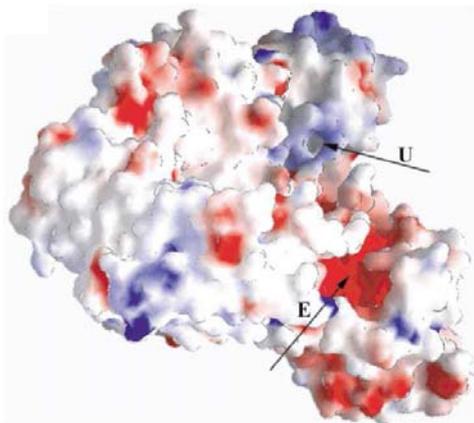


Figure 11 : Structure de l'ADN polymérase B1 de *S. solfataricus* contenant « l'uracil pocket ». Le « U » indique l'uracil pocket, située dans le sous-domaine N-terminal. Le « E » indique le site actif exonucléasique. D'après Savino *et al.*, 2004.

La structure de l'ADN polymérase B a été déterminée chez de nombreuses Archaea ; à titre d'exemple, *S. solfataricus* (Pisani *et al.*, 1996), *T. gorgonarius* (Hopfner *et al.*, 1999) et *P. furiosus* (Kim *et al.*, 2008). Cette enzyme est monomérique et se caractérise par deux domaines présentant les deux activités catalytiques polymérasique et exonucléasique (Figure 12). La configuration générale est celle d'une main où le domaine appelé Palm (paume) contient le site catalytique, le domaine appelé Fingers (doigts) sert à la reconnaissance des nucléotides, tandis que le domaine appelé Thumb (pouce) sert à la liaison à l'ADN.

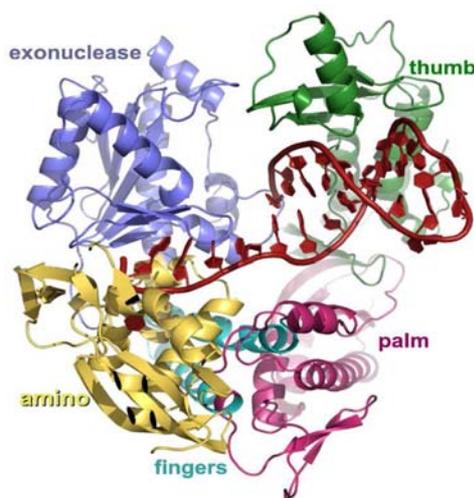


Figure 12 : Structure de l'ADN polymérase B de *Thermococcus gorgonarius*. L'ADN, en complexe avec la protéine, est représenté en rouge. Le domaine N-terminal est représenté en jaune ; le domaine exonucléasique est en violet et les sous-domaines appelés Thumb et Palm sont respectivement en vert et magenta. D'après Firbank *et al.*, 2008.

II.4.3. L'ADN polymérase D

L'ADN polymérase D, appelée parfois Pol II, est la seule représentante de la famille D. En plus d'assurer l'activité de déplacement de brin d'ARN/ADN (Henneke *et al.*, 2005), l'ADN polymérase D est capable d'élonguer une amorce ARN. Elle serait donc impliquée dans la synthèse du brin retardé (Henneke *et al.*, 2005). La Pol D pourrait également participer à la recombinaison étant donné qu'elle interagit avec RadB, l'homologue de la protéine eucaryote Rad51, connue pour son implication dans ce processus (Hayashi *et al.*, 1999).

L'ADN polymérase de la famille D, est composée de deux sous-unités DP1 et DP2 (Cann *et al.*, 1998). La petite sous-unité, appelée DP1, a une forte homologie avec la petite sous-unité des ADN polymérases eucaryotes α , δ et ϵ (Aravind *et al.*, 1998). La grande sous-unité, appelée DP2, est la sous-unité catalytique (Uemori *et al.*, 1997). L'ADN polymérase D possède, également, en plus de son activité ADN polymérasique (Shen *et al.*, 2001), une activité exonucléasique 3'→5' (Tang *et al.*, 2004). Cette activité serait plus élevée sur un ADN simple

brin et au niveau des nucléotides mesappariés (Jokela *et al.*, 2004). De plus, cette capacité de relecture serait stimulée par la grande sous-unité DP2 (Ishino *et al.*, 1998, Shen *et al.*, 2004a).

Le PCNA, chez *P. furiosus*, interagit fortement avec la sous-unité DP2 et très faiblement avec la sous-unité DP1 (Cann *et al.*, 1999a). Chez *P. horikoshii*, le PCNA interagit de façon directe avec la sous-unité DP1 (Shen *et al.*, 2003), et plus particulièrement dans la région N-terminale (acides aminés 1-200) (Tang *et al.*, 2004). Toujours selon le même auteur, la DP1 interagirait avec la grande sous-unité du RF-C.

Aucune structure de la Pol D n'a été déterminée jusqu'à présent. En revanche, les travaux de Tang *et al.*, 2004 permettent de donner une idée sur le repliement du complexe formé par les deux sous-unités DP1 et DP2 (Figure 13).

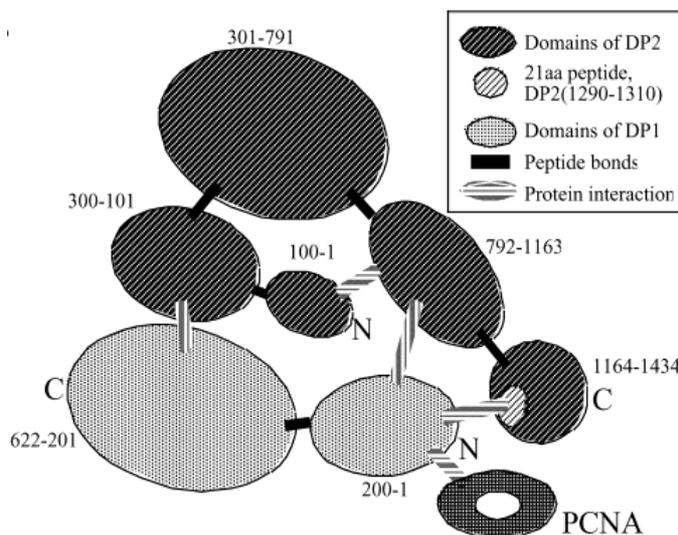


Figure 13 : Modèle représentant les interactions entre les sous-unités de la Pol D de *P. horikoshii* et son possible repliement. D'après Tang *et al.*, 2004.

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont démontré que les deux ADN polymérases B et D étaient requises pour la réplication de l'ADN chez les Archaea, mais beaucoup de zones d'ombres subsistent encore quant à leur rôle respectif. Néanmoins, chez *P. abyssi*, des travaux récents ont montré que la Pol D et la Pol B interagiraient séquentiellement en présence du PCNA (Rouillon *et al.*, 2007). Par ailleurs, ces deux ADN polymérases seraient bloquées par les sites apuriques lors de la réplication (Palud *et al.*, 2008).

II.5. Le RF-C (Replication Factor C)

II.5.1. Description dans les trois domaines du vivant

Chez les eucaryotes, le RF-C ou facteur de chargement, tout comme le complexe γ chez les bactéries, permet de catalyser l'assemblage du PCNA autour de l'ADN amorcé. Le RF-C reconnaît spécifiquement les matrices amorcées en 3' et charge le PCNA sur ces sites de façon ATP-dépendante. Il a été démontré que le RF-C était le principal facteur, en plus de la longueur de l'amorce d'ARN, pour permettre la substitution de la Pol α par les ADN polymérases répliquatives (Mossi *et al.*, 2000). Néanmoins, le RF-C est capable de se lier à un ADN simple brin, sans préférence particulière entre les extrémités 3' et 5', au niveau des transitions simple-double brin (Keller *et al.*, 1999).

Chez les Archaea, le RF-C pourrait exister sous différentes conformations. En effet, chez *S. solfataricus*, le RF-C formerait un hétéropentamère avec une grande sous-unité et quatre petites (Pisani *et al.*, 2000), tandis que chez *P. furiosus*, le RF-C consisterait soit à un hétéropentamère avec une grande sous-unité et quatre petites soit à un hétérohexamère avec deux grandes sous-unités et quatre petites (Cann *et al.*, 2001). Cette forme hexamérique a été décrite chez *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Kelman & Hurwitz, 2000). Par ailleurs, alors que chez les Archaea, le RF-C ne possède que deux types de sous-unités différentes (Seybert *et al.*, 2002), chez les eucaryotes, le RF-C est composé de cinq sous-unités différentes (RFC 1 à 5) (O'Donnell *et al.*, 1993, Yao *et al.*, 2003, Cullmann *et al.*, 1995). Cependant, le RF-C de *Methanosarcina acetivorans* possède trois sous-unités (Chen *et al.*, 2005). Le facteur de chargement chez les bactéries, le complexe γ , est également composé de cinq sous-unités $\gamma_3\delta\delta'$ (Jeruzalmi *et al.*, 2001). Des études structurales ont été menées sur le RF-C des eucaryotes (Bowman, 2004) et sur la petite sous-unité du RF-C d'Archaea (Oyama *et al.*, 2001) (Figure 14).

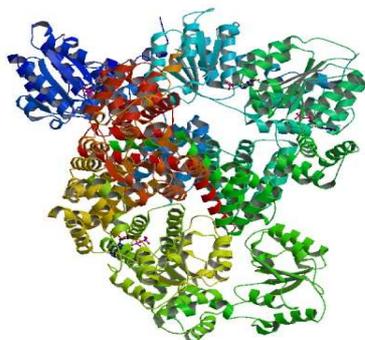


Figure 14 : Structure de la petite sous-unité du RF-C chez *P. furiosus*. Code PDB : 1IQP. D'après Oyama *et al.*, 2001.

II.5.2. Hydrolyse de l'ATP

L'hydrolyse de l'ATP est requise pour le chargement du PCNA autour de l'ADN chez les eucaryotes (Gomes & Burgers, 2001), et chez les bactéries (Tsuchihashi & Kornberg, 1989). En revanche, chez certaines Archaea, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas requise (Henneke *et al.*, 2002). Chez les eucaryotes, la structure du RF-C a une forme de U composée de deux doigts permettant d'attacher le PCNA. Après hydrolyse de l'ATP, la structure du RF-C s'adapte pour permettre d'encercler le PCNA autour de l'ADN (Shiomi *et al.*, 2000). La sous-unité RF-C 1 n'est pas requise pour l'ouverture du PCNA, contrairement aux sous-unités RF-C 2 et 5 qui se lient directement au PCNA. De plus, ce serait plus particulièrement la sous-unité RF-C 5 qui ouvrirait le PCNA (Yao *et al.*, 2006). La figure 15 présente le mode de chargement du PCNA sur l'ADN par le RF-C chez les eucaryotes. Toutefois, elle peut également illustrer le mécanisme qui existe chez les bactéries et les Archaea.

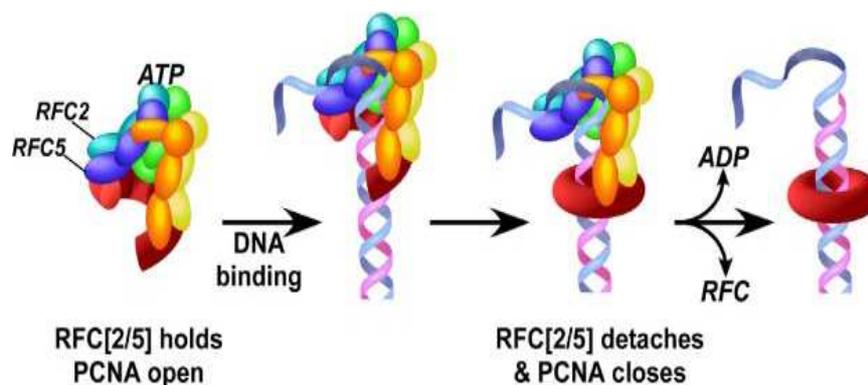


Figure 15 : Chargement du PCNA par le RF-C chez les eucaryotes. D'après Yao *et al.*, 2006.

Chacune des cinq sous-unités contient des éléments AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) que l'on retrouve dans de nombreuses ATPases (Ogura & Wilkinson, 2001). Les arginines d'une sous-unité seraient en contact avec la sous-unité adjacente (Yao *et al.*, 2003) et il a été suggéré que l'activité ATPasique se propageait séquentiellement au travers des cinq sous-unités (Neuwald, 2005). Chez les bactéries, un important changement conformationnel des cinq sous-unités du RF-C a également lieu (Hingorani & O'Donnell, 1998). Cependant, seule la sous-unité γ hydrolyserait l'ATP, même si les autres sous-unités possèdent également les éléments AAA+ (Tsuchihashi & Kornberg, 1989). La figure 16 illustre les différents modèles proposés chez les eucaryotes et les bactéries.

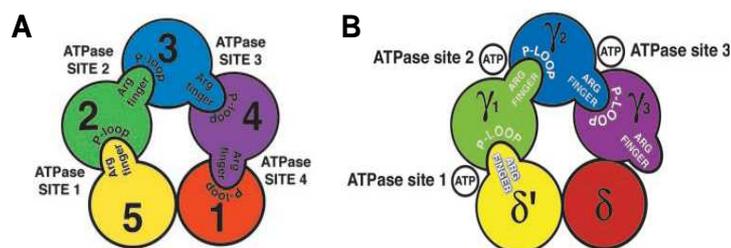


Figure 16 : Schéma représentant les sites d'ATP du RF-C chez les eucaryotes (A) et du complexe γ (B) chez les procaryotes. D'après Yao *et al.*, 2003.

Chez *Archaeoglobus fulgidus*, alors que l'hydrolyse de l'ATP par la grande sous-unité permet le chargement du PCNA, celle effectuée par les petites sous-unités est nécessaire pour le déchargement du RFC (Seybert & Wigley, 2004).

II.5.3. Interaction avec le PCNA

Chez les Archaea, le RF-C possède, au niveau de son extrémité C-terminale, le motif PIP box (PCNA interacting protein box)[†]. Ce motif est très conservé dans la plupart des protéines interagissant avec le PCNA. De façon très caractéristique, au sein des grandes sous-unités des RF-C des Archaea, le PIP box est relié à la chaîne polypeptidique par une longue chaîne chargée et composée environ de 70 résidus, principalement acide glutamique et lysine. Des études structurales ont montré que le peptide correspondant au motif PIP box de la grande sous-unité du RF-C se liait spécifiquement au PCNA et pouvait jouer un rôle dans la stabilisation du PCNA sur l'ADN (Matsumiya *et al.*, 2002). Cependant, selon les mêmes auteurs, le motif PIP box ne serait pas essentiel pour la stimulation de l'activité de l'ADN polymérase par le PCNA.

II.5.4. Autres fonctions du RF-C

En plus de charger le PCNA sur l'ADN, le RF-C et le complexe γ , respectivement chez les eucaryotes et les bactéries, sont également capables de décharger le PCNA en présence d'ATP (Yao *et al.*, 1996). Par ailleurs, chez les eucaryotes, le RF-C n'interagit pas avec la Pol δ , une fois le PCNA chargé sur l'ADN (Podust *et al.*, 1998). Au contraire, chez *P. furiosus*, il pourrait stimuler l'activité de la Pol B et de la Pol D en présence de PCNA (Cann *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré, chez cet organisme, que la stimulation de la Pol B par le PCNA était améliorée en présence de la petite sous-unité seule du RF-C (Mayanagi *et al.*, 2001). Le RF-C est capable d'interagir avec d'autres protéines impliquées dans la réplication. En effet, des études menées chez *S. solfataricus*, ont montré que la petite

[†] Le motif PIP box sera plus largement défini dans la partie II.6.4. Motifs d'interaction au PCNA

sous-unité du RF-C interagissait fortement avec la sous-unité catalytique de la primase, au niveau de son extrémité N-terminale, tout en réduisant son affinité pour l'ADN (Wu *et al.*, 2007). De plus, chez l'homme, le RF-C interagirait directement avec l'ADN ligase I, démontrant ainsi son implication dans la maturation des fragments d'Okazaki (Levin *et al.*, 2004). Dès lors, nous pouvons imaginer que le facteur de chargement peut être impliqué dans différentes fonctions, tel un checkpoint durant la phase S (Majka & Burgers, 2004), ou dans les processus de réparation suite à des dommages sur l'ADN (Kafer & Chae, 2008).

II.6. Le PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

II.6.1. Fonctions

Le facteur de processivité, appelé PCNA, joue un rôle central dans de nombreux mécanismes cellulaires et particulièrement ceux destinés à la réplication et à l'intégrité de l'information génétique. Dans chaque domaine du vivant, le PCNA interagit étroitement avec les facteurs intervenant dans le bon fonctionnement du complexe de réplication. Chez les eucaryotes, de nombreuses études ont permis d'établir un large catalogue de ces interactions qui illustre pourquoi le PCNA est considéré comme une plate-forme en perpétuel mouvement (Figure 17).

Activities	Proteins
DNA polymerases	Pol δ , Pol ϵ , Pol η , Pol ι , Pol κ , Pol ζ , Pol λ , Pol β , Rev1
Clamp loader	Rfc1, Rfc3, Rfc4
Flap-endonuclease	FEN-1
DNA ligase	DNA Ligase 1
Topoisomerase	Topo II α
Replication licensing factor	Cdt1
E3 ubiquitin ligases	Rad18, Rad5
E2 SUMO-conjugating enzyme	Ubc9
Helicases, ATPases	Srs2, Rrm3, Mgs1, WRN, RECQ5
Mismatch repair enzymes	Msh3, Msh6, Mlh1, EXO1
Base excision repair enzymes	UNG2, MPG, NTH1, hMYH, APE1, APE2, XRCC1
Nucleotide excision repair enzyme	XPG
Poly (ADP-ribose) polymerase	PARP-1
Histone chaperone	CAF-1
Chromatin remodeling factor	WSTF
Histone acetyltransferase	p300
Histone deacetyltransferase	HDAC1
DNA methyltransferase	DNMT1
Sister-chromatid cohesion factors	Eco1, Chl1, Ctf18
Protein kinases	CDK2, EGF Receptor
Cell-cycle regulators	p21, p57, Cyclin D1
Apoptotic factors	Gadd45, ING1b, p53

Figure 17 : Protéines interagissant avec le PCNA chez les eucaryotes. Les protéines en orange contiennent le motif PIP box interagissant au niveau de la poche hydrophobe, symbolisée par l'étoile orange sur le PCNA. D'après Moldovan *et al.*, 2007.

Plus généralement, le PCNA est un régulateur des protéines liées aux 3 R (réplication, réparation, recombinaison). C'est avant tout un facteur de processivité qui augmente

considérablement les performances des ADN polymérase répliquatives (Kelman & O'Donnell, 1995). Le PCNA joue notamment un rôle dans le recrutement des enzymes impliquées dans la modification de l'ADN (Tsurimoto, 1999). Aussi, le PCNA ne possède pas d'activité enzymatique connue.

Chez les Archaea, l'interaction entre le PCNA et diverses enzymes impliquées dans les mécanismes liés à l'ADN a pu être démontrée selon diverses méthodes (Tableau 2). Néanmoins, beaucoup de zones d'ombre existent encore quant à ces interactions.

Protein	Effects of interactions with PCNA	Methods by which interactions were demonstrated
DNA replication		
<i>Elongation</i>		
DNA polymerase B (Pol B)	Stimulation of polymerase activity	Co-IP, functional assay in vitro, GST pull-down
DNA polymerase D (Pol D)	Stimulation of polymerase activity	Co-IP, functional assay in vitro
Replication factor C (RFC)	Loading of PCNA onto DNA	Co-IP, yeast two-hyb, functional assay in vitro, gel filtration, three-dimensional structure, molecular modeling
<i>Okazaki fragment maturation</i>		
DNA ligase	Stimulation of polymerase activity	GST pull-down
Flap endonuclease (Fen-1)	Stimulates Fen-1 activity	GST pull-down, yeast two-hyb, functional assay in vitro
RNase HII		Yeast two-hyb
DNA repair and recombination		
DNA polymerase Y1 (Pol Y1)	Stimulation of polymerase activity	Functional assay in vitro
Radiation-sensitive mutant 2 (RAD2)		Yeast two-hyb
Uracil DNA glycosylase (UDG)		GST pull-down
XPF	Stimulation of XPF nuclease activity	Functional assay in vitro, GST pull-down

Tableau 2 : Protéines interagissant avec le PCNA chez les Archaea. D'après Vivona & Kelman, 2003.

Chez les Archaea, comme dans les autres domaines du vivant, le PCNA est en étroite coordination avec les ADN polymérase et le facteur de chargement, le RF-C. Néanmoins, diverses caractéristiques apparaissent exclusivement chez les Archaea. En effet, le PCNA est notamment capable de se charger spontanément sur l'ADN en absence du RF-C (Cann *et al.*, 1999a). L'auto-chargement du PCNA pourrait s'expliquer par le faible nombre de ponts hydrogène intersubunitaires chez le PCNA de *P. furiosus*, comparé à ceux du PCNA de la levure et de l'homme (Matsumiya *et al.*, 2001). En outre, le PCNA stimule l'ADN polymérase sur un ADN circulaire en absence de RF-C de *P. abyssi* (Henneke *et al.*, 2002). Toutefois, il a été récemment montré que le chargement du PCNA sur l'ADN était renforcé par le RF-C et aussi par l'ADN polymérase B (Rouillon *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que, chez *P. abyssi*, l'interaction directe entre le PCNA et les ADN polymérase D et B est ADN-dépendante (Henneke *et al.*, 2005).

Le PCNA confère également aux ADN polymérase des propriétés nouvelles, comme la capacité de déplacer un brin d'ARN lors de la maturation des fragments d'Okazaki (Maga *et al.*, 2001). Le PCNA interagit également avec des facteurs intervenant dans les mécanismes de réparation par excision de nucléotides (NER) (Sancar *et al.*, 2004), par mésappariement de

base (MMR) (Umar *et al.*, 1996), et également par excision de base (BER). Lors de ce processus, le PCNA interagit notamment avec les ADN polymérases eucaryotes β et λ , qui appartiennent à la famille X (Kedar *et al.*, 2002, Maga *et al.*, 2002). Chez les Crenarchaeota et les Euryarchaeota, l'interaction entre le PCNA et l'UDG-ADN glycosylase (UDG) démontre également son implication dans les mécanismes de réparation (Yang *et al.*, 2002) (Kiyonari *et al.*, 2006). Par ailleurs, le cycle cellulaire serait régulé et coordonné par un complexe formé par le PCNA, la CDK (cyclin-dependent kinase) et p21 (Kontopidis *et al.*, 2005). De plus, la forte affinité du PCNA avec p21 (Gulbis *et al.*, 1996) (Knibiehler *et al.*, 1996) provoque une inhibition de la réplication, mais pas des processus de réparation de l'ADN (Li *et al.*, 1996). Des reconstitutions *in vitro* ont mis en évidence des compétitions entre l'ADN polymérase δ et le RF-C, au niveau de l'interaction avec le PCNA (Yuzhakov *et al.*, 1999, Maga *et al.*, 2001). Contrairement au chargement du PCNA sur l'ADN par le RF-C, la stimulation du PCNA pour la Pol δ et l'activité ATPasique du RF-C sont inhibées suite à une compétition entre p21, Pol δ et le RF-C, pour la liaison au PCNA (Oku *et al.*, 1998). Des travaux ont montré que le PCNA stimulait l'activité de FEN-1 (Jónsson *et al.*, 1998, Tom *et al.*, 2000). L'ADN ligase I humaine est impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN par l'intermédiaire de son interaction avec le PCNA (Levin *et al.*, 2000), qui la stabilise au niveau du site de ligature (Tom *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que, chez *E. coli* notamment, le PCNA est capable de stimuler des ADN polymérases translésionnelles appartenant à la famille Y (Bunting *et al.*, 2003).

II.6.2. Structure

Des études cristallographiques ont montré que les PCNA de levure et de l'homme (Krishna *et al.*, 1994, Gulbis *et al.*, 1996) ainsi que la sous-unité β d'*E. coli* (Kong *et al.*, 1992), et la protéine gp45 des bactériophages T4 et RB69 (Shamoo & Steitz, 1999), avaient une structure tridimensionnelle superposable, même si leurs séquences ont peu de similarité (Krishna *et al.*, 1994). Plusieurs études ont montré des similitudes de distribution de charges et de structure tridimensionnelle avec les PCNA des eucaryotes (Iwai *et al.*, 2000, Kelman & Hurwitz, 1998). Le monomère du PCNA possède deux domaines globulaires, similaires et joints entre eux par une boucle appelée IDCL (Interdomain connecting loop) (Figure 18). En revanche, le facteur de processivité bactérien est un dimère avec trois domaines par monomère. Ainsi, la structure est composée de six domaines répétés dans une symétrie d'ordre six. Le monomère est composé de feuilletts β dans la partie externe, et d'hélices α dans la partie interne. Le trimère se présente ainsi sous la forme d'un anneau pouvant s'enrouler

autour de l'ADN. Les extrémités N et C-terminales du PCNA humain sont très importantes pour la structure tertiaire de la protéine (Fukuda *et al.*, 1995). De plus, des études structurales ont démontré que des liaisons hydrogènes s'établissaient entre les domaines en N- et C-terminaux de deux monomères adjacents (Matsumiya *et al.*, 2003). Les interfaces intermoléculaires, au sein du PCNA, sont stabilisées par la formation de feuillets β antiparallèles qui créent des liens hydrophobes. Ceci suggère que la protéine possède une grande flexibilité (Emberly *et al.*, 2004).

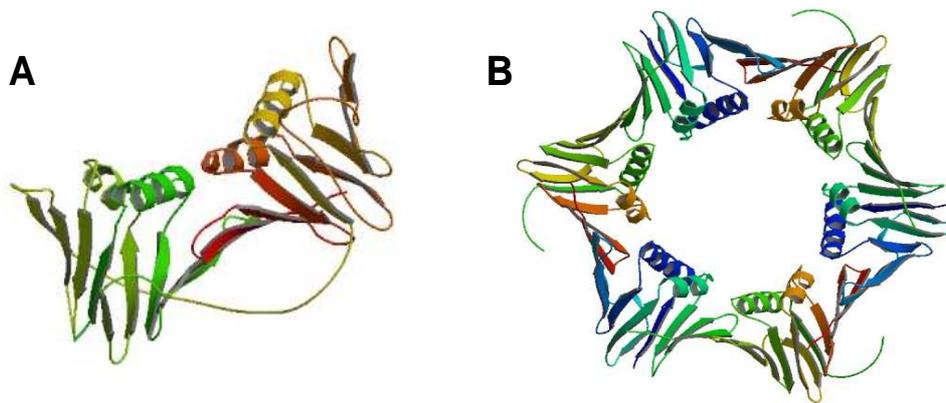


Figure 18 : (A) Structure du monomère de PCNA humain. Code PDB : 1W60. D'après Kontopidis *et al.*, 2005 ; (B) Structure du PCNA de *P. furiosus*. Code PDB : 1GE8. D'après Matsumiya *et al.*, 2001.

Un seul PCNA a été identifié chez les Euryarchaeota, comme *P. abyssi* (Henneke *et al.*, 2002), alors que jusqu'à trois PCNA homologues ont été trouvés chez les Crenarchaeota (De Felice *et al.*, 1999, Daimon *et al.*, 2002), formant un hétérotrimère *in vivo* (Dionne *et al.*, 2003). Chez *S. solfataricus*, l'organisation est hétérogène et le monomère 1 aurait un rôle prépondérant (Williams *et al.*, 2006). Cependant, des études chez les Crenarchaeota, ont montré une certaine diversité dans les interactions entre les différents monomères et leur distribution dans la formation du trimère (Imamura *et al.*, 2007, Lu *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été démontré, dans les cellules de mammifères, que le PCNA existait sous la forme d'un double homotrimère (Naryzhny *et al.*, 2005).

II.6.3. Dynamique du PCNA

Comme mentionné précédemment, la molécule de PCNA est très flexible. Des simulations de dynamique moléculaire, au niveau du PCNA des eucaryotes et des Archaea, suggèrent que seulement une interface intermoléculaire, à l'intérieur du PCNA, pouvait être ouverte durant le chargement (Kazmirski *et al.*, 2005). Ceci a été confirmé pour le PCNA de

S. solfataricus (Dionne *et al.*, 2008). Même si les interactions entre le PCNA et d'autres protéines sont bien étudiées, les mécanismes d'interactions du PCNA avec l'ADN sont peu connus. Grâce à sa structure sous forme d'anneau, le PCNA possède un trou central ayant un diamètre suffisant pour pouvoir encercler l'ADN (Gulbis *et al.*, 1996). De plus, les hélices α , au niveau de la surface interne, sont chargées positivement, donnant la capacité d'interagir avec les liaisons phosphodiester de l'ADN, ce qui donne à l'ensemble une dynamique importante (Ivanov *et al.*, 2006) (Figure 19). Récemment, une analyse structurale a permis de démontrer la position inclinée du PCNA sur l'ADN simple brin (Georgescu *et al.*, 2008). Le complexe β , chez les bactéries, et le PCNA, chez les eucaryotes, sont capables de traverser des structures secondaires du type boucle, au sein d'un simple brin, ou d'une bulle, au sein d'un double brin de petite taille (Yao *et al.*, 2000).

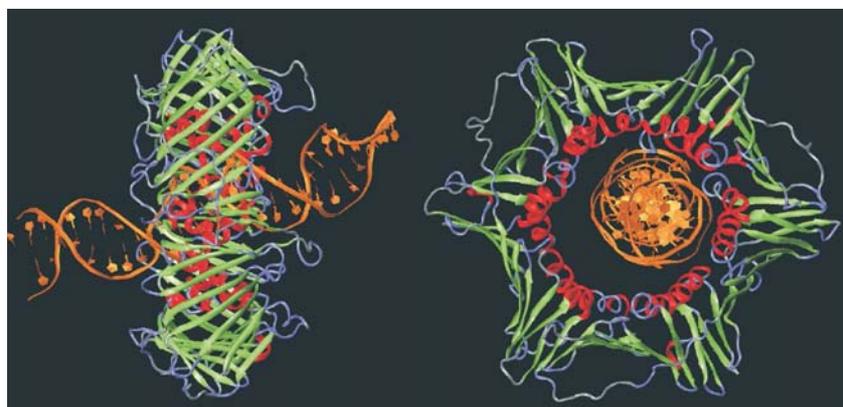


Figure 19 : Vues de côté et de haut de la dynamique du PCNA humain sur l'ADN double brin. D'après Ivanov *et al.*, 2006.

II.6.4. Motifs d'interactions au PCNA

Une grande partie des facteurs interagissant avec le PCNA, notamment les ADN polymérases, présentent un motif commun au niveau de leur séquence en acides aminés, appelé PIP box (PCNA Interacting Protein) (Warbrick, 1998). Ce motif se présente ainsi : 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. Un grand nombre de protéines impliquées dans la réplication et la réparation possèdent le motif consensus PIP box (Ducoux *et al.*, 2001, Maga *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que la délétion ou la substitution de résidus conservés au niveau du motif PIP box pouvait supprimer les interactions du PCNA *in vivo* et *in vitro* (Eissenberg *et al.*, 1997, Jónsson *et al.*, 1998, Stucki *et al.*, 2001, Zheleva *et al.*, 2000). Néanmoins, des études récentes ont montré que le motif PIP box n'était pas toujours suffisant pour expliquer

les interactions avec le PCNA, et suggèrent qu'une région proche du domaine N-terminal est nécessaire (Pohler *et al.*, 2005). Aussi, un motif (HhH), helix-hairpin-helix, important pour la liaison de l'ADN polymérase λ à l'amorce d'ADN, est impliqué dans les interactions avec le PCNA (Maga *et al.*, 2004). En étudiant une bibliothèque de peptides aléatoires, un nouveau motif de liaison au PCNA (KA box) a été identifié (Xu *et al.*, 2001). Egalement, la liaison de l'ADN polymérase δ au PCNA pourrait être médiée par une région riche en glycines (GX4GX8GX3YFY) (Zhang *et al.*, 1995). Enfin, la région C-terminale de l'ADN polymérase δ , non apparentée au motif PIP box, a été décrite comme étant un motif de liaison au PCNA, lié à l'activité de régulation de la nucléotidyltransférase (Shimazaki *et al.*, 2005). Par conséquent, les partenaires du PCNA, et en particulier les ADN polymérases, se lient au facteur de processivité au travers d'une large gamme de motifs qui n'ont pas toujours de relation avec le motif PIP box.

II.6.5. Domaines d'interactions avec le PCNA

Au sein du PCNA, la boucle de connexion entre deux domaines (IDCL) constitue un site d'interactions majeur, car elle est reconnue par différentes enzymes, comme la Pol δ , l'ADN ligase I ou FEN-1, impliquées dans la réplication de l'ADN, et également p21 qui joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Maga & Hübscher, 2003) (Figure 20). Selon les mêmes auteurs, la partie C-terminale serait, en revanche, impliquée dans les interactions avec le RF-C et la Pol ϵ , lors de la réplication de l'ADN.

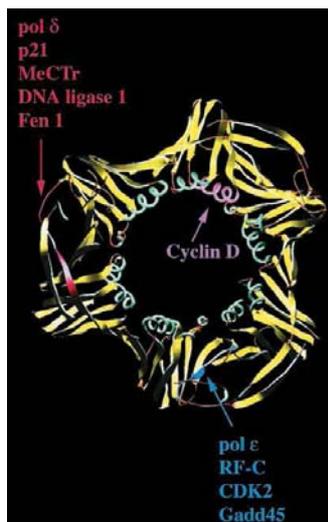


Figure 20 : Domaines d'interaction au niveau du PCNA. D'après Maga et Hübscher, 2003.

La stimulation de FEN-1 par le PCNA peut se faire grâce à un changement conformationnel de leurs régions C-terminales, créant une interface sous forme de feuillets β

(Chapados *et al.*, 2004). Aussi, une mutation au niveau de la partie C-terminale du PCNA de *S. cerevisiae* inhibe l'interaction entre le PCNA et la Pol ϵ (Eissenberg *et al.*, 1997). Par ailleurs, chez les eucaryotes, en plus de la région C-terminale et de l'IDCL, l'extrémité N-terminale du PCNA, serait requise pour les interactions avec le RF-C et la Pol δ (Ola *et al.*, 2001).

Etant donné que le PCNA est un trimère, il pourrait se lier, théoriquement, à plus d'une protéine à la fois. Des études ont montré que le motif PIP box formait une hélice 3_{10} , ce qui lui permet de s'accrocher à la poche hydrophobe formée sous l'IDCL (Gulbis *et al.*, 1996, Bruning & Shamoo, 2004). A titre d'exemple, comme l'ADN polymérase δ interagit au niveau de l'IDCL (Eissenberg *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1998), il est tout à fait envisageable que FEN-1 et la Pol δ puissent se lier simultanément au PCNA, et ainsi être capable de fonctionner de manière coordonnée. Récemment, des études ont montré que chaque monomère du PCNA humain pouvait se lier avec une molécule de FEN-1 différente (Sakurai *et al.*, 2005). Chez les eucaryotes, chaque monomère du PCNA pourrait être engagé avec une sous-unité de la Pol δ . Ainsi, les sous-unités p50, p66 et p125 pourraient agir de façon concomitante avec le facteur de processivité (Riva *et al.*, 2004). Chez la levure, le PCNA interagit avec la Pol δ , plus particulièrement au niveau de la sous-unité catalytique (Brown & Campbell, 1993, Johansson *et al.*, 2004), mais aussi au niveau de la petite sous-unité p50 (Lu *et al.*, 2002).

Aussi, il est possible que les différentes zones de la poche hydrophobe jouent un rôle distinct. En effet, le motif PIP box de cdc9 (ADN ligase I) de *S. cerevisiae* établit des contacts fonctionnels et physiques avec l'IDCL, et également avec le domaine C-terminal de PCNA (Vijayakumar *et al.*, 2007). Chez *E. coli*, les ADN polymérases δ , α et IV interagissent dans la même zone, au niveau de la poche hydrophobe, et peuvent ainsi être en compétition (Burnouf *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les différentes zones de la poche hydrophobe pourraient jouer, alternativement, plusieurs rôles. En absence d'ADN, FEN-1 interagit au niveau de l'IDCL, et lorsque le PCNA encercle l'ADN, FEN-1 pivote au niveau de l'extrémité C-terminale (Gomes & Burgers, 2000). Tout comme pour FEN-1, la liaison initiale de l'Apn2 au PCNA, en absence d'ADN, est effectuée *via* l'interaction entre son motif PIP box avec l'IDCL du PCNA, alors que la stimulation de leur activité nucléasique requiert l'interaction avec le domaine C-terminal du PCNA (Gomes & Burgers, 2001, Unk *et al.*, 2002).

III. Présentation de l'étude

Nous avons vu que les protéines impliquées dans les processus informatifs, dont la réplication de l'ADN, sont proches de leurs homologues eucaryotes. De ce fait, *Pyrococcus abyssi* est un bon modèle d'étude de la réplication de l'ADN chez les Archaea. Depuis moins d'une dizaine d'année, les travaux, réalisés au sein du « Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes », ont permis de caractériser les principales protéines impliquées dans la maintenance génomique. Les ADN polymérase B et D (Gueguen *et al.*, 2001), le RF-C et le PCNA (Henneke *et al.*, 2002, Rouillon *et al.*, 2007) ou plus récemment la primase (Le Breton *et al.*, 2007), sont encore aujourd'hui des sujets d'études fonctionnelles. D'autres protéines sont, d'ores et déjà, disponibles au sein du laboratoire, comme FEN-1 ou le RPA, et constituent d'autres axes de recherche futurs. Nos connaissances s'élargissent au même titre que le réseau d'interactions au niveau de la maintenance génomique.

Néanmoins, le replisome ne se résume pas, aux protéines citées ci-dessus. De plus, il reste de nombreuses questions, non élucidées à ce jour, concernant la mise en place du complexe réplcatif. Ainsi, durant ce doctorat, il était intéressant de se focaliser sur différents axes d'études qui nous permettaient d'améliorer nos connaissances sur le rôle de plate-forme du PCNA, la mécanistique élaborée par la présence des deux ADN polymérase B et D, dont le complexe formé par les deux sous-unités de la Pol D, et la fonctionnalité du RF-C.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions entre le PCNA et les ADN polymérase B et D. Il était, en effet, nécessaire de connaître le plus finement possible les mécanismes d'interactions entre les différents acteurs jouant un rôle dans la réplication de l'ADN. Les zones d'interactions, au sein du PCNA, et les motifs d'interactions des ADN polymérase au PCNA, ont été déterminés. Ce travail nous a permis de compléter nos connaissances sur le rôle exact des deux ADN polymérase.

Ensuite, nos travaux se sont portés sur le RF-C qui a la particularité de posséder, au niveau de son extrémité C-terminale, un motif PIP box très flexible. Le rôle de ce motif a été étudié, de même que l'approche fonctionnelle du complexe formé par les ADN polymérase avec leurs facteurs accessoires.

Dans une troisième partie, nous nous sommes focalisés sur un nouveau motif au sein de l'ADN polymérase D. Ce travail nous a permis de nous interroger sur une des particularités des protéines provenant des Archaea, à savoir la thermostabilité des protéines. Dans l'ensemble, ces travaux nous ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la Pol D, enzyme brevetée, mais au niveau de laquelle, subsistent de nombreuses interrogations.

Enfin, sont présentés, dans un quatrième chapitre, des travaux préliminaires effectués en spectroscopie de fluorescence, qui consistent en une mise au point nécessaire aux futurs projets du laboratoire.

Résultats et Discussion

Chapitre 1

Interactions entre le PCNA et les ADN polymérases B et D

I. Introduction

Comme il a été dit précédemment, un des rôles prépondérants du PCNA est d'améliorer la processivité des ADN polymérases. La plupart des interactions au PCNA sont médiées au travers de motifs communs dont le plus conservé est le motif PIP box (PCNA interacting Protein). Des travaux récents ont démontré l'importance de ces motifs PIP box chez les ADN polymérases d'Archaea pour la liaison au PCNA (Tori *et al.*, 2007). En revanche, alors qu'en grande majorité le siège des interactions au PCNA eucaryote et bactérien se situe au niveau de la poche hydrophobe, se formant entre l'IDCL et le C-terminus, les zones d'interaction au niveau du PCNA sont méconnues chez les Archaea.

Il est important de noter que le PCNA des Archaea est identique au PCNA eucaryote du point de vue structural. Nous pouvons ainsi imaginer des similitudes quant aux motifs et domaines d'interactions. De plus, il a été déjà prouvé que le PCNA stimulait les ADN polymérases D et B chez *P. abyssi* (Henneke *et al.*, 2002). Néanmoins, beaucoup de questions restent en suspens sur l'interaction entre le facteur de processivité et les ADN polymérases chez les Archaea. Ainsi, le but de cette étude est de répondre le plus finement possible aux questions relatives aux interactions entre le PCNA, *PabPol D* et *PabPol B*. Aussi, la recherche de motifs d'interaction au PCNA nous permet d'améliorer notre compréhension des mécanismes du système répliatif des Archaea.

A mon arrivée au laboratoire, il avait été démontré, par la méthode de SPR (Résonance Plasmonique de Surface), que le motif PIP box, situé au niveau de l'extrémité C-terminale de la grande sous-unité de *PabPol D*, n'était pas essentiel dans la liaison au PCNA, contrairement à celui de *PabPol B*. Ainsi, durant ce doctorat, il fallait tout d'abord valider ce résultat, fonctionnellement par des tests d'extension d'amorce. De plus, une étude utilisant des peptides compétiteurs, correspondant à la structure primaire des motifs PIP box situés aux extrémités C-terminale des ADN polymérases B et D, a été effectuée, afin de valider nos interprétations. Ensuite, une série de mutagenèses dirigées, au niveau de la poche hydrophobe du PCNA, a été réalisée et nous a permis d'appréhender plus finement les zones d'interactions au niveau du facteur de processivité.

La publication "Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA Replication Requires Two PIP Motifs for DNA Polymerase D and One PIP Motif for DNA Polymerase B", parue dans *Journal of Molecular Biology*, est exposée à la page suivante. Elle nous expose les principaux résultats de l'étude. Elle est ensuite complétée par des travaux préliminaires sur les interactions physiques du PCNA avec les deux sous-unités de l'ADN polymérase D. Enfin,

cette étude a été complétée par des travaux plus spécifiques sur les interactions du motif PIP box avec la poche hydrophobe du PCNA.

II. Article

Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA Replication Requires Two PIP Motifs for DNA Polymerase D and One PIP Motif for DNA Polymerase B

Benoît Castrec^{2,3}, Christophe Rouillon^{2,3}, Ghislaine Henneke^{2,3}, Didier Flament^{2,3}, Joël Querellou^{2,3} and Jean-Paul Raffin^{1,3}

Submitted at *Journal of Molecular Biology*. In press

¹CNRS, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

²Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

³IFREMER, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

Corresponding author: Jean-Paul RAFFIN, Ifremer, EEP/LM2E, B.P. 70, 29280 Plouzané, France; Tel.: +33 2 98 22 45 39; Fax: +33 2 98 22 47 57;
E-mail: jpraffin@ifremer.fr

Running title: PCNA-binding Motifs of Archaeal Replicases

Keywords: DNA replication; DNA polymerases; PCNA-binding motifs; PIP box; Archaea

* Present address: Biomedical Sciences Research complex, North Haugh, University of St Andrews; St Andrews, Fife Scotland, U.K., KY16 9ST.

ABSTRACT

Replicative DNA polymerases possess a canonical C-terminal proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding motif termed the PIP box. We investigated the role of the PIP box on the functional interactions of the two DNA polymerases, (family B) *PabPol B* and (family D) *PabPol D*, from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*, with its cognate PCNA. The PIP box was essential for interactions of *PabPol B* with PCNA, as shown by surface plasmon resonance and primer-extension studies. In contrast, binding of *PabPol D* to PCNA was affected only partially by removing the PIP motif. We identified a second palindromic PIP box motif at the N-terminus of the large subunit of *PabPol D* that was required for the interactions of *PabPol D* with PCNA. Thus, two PIP motifs were needed for *PabPol D* for binding to *PabPCNA*. Moreover, the C-terminus of *PabPCNA* was essential for stimulation of *PabPol D* activity but not for stimulation of *PabPol B* activity. Neither DNA polymerase interacted with the *PabPCNA* interdomain connecting loop. Our data suggest that distinct processes are involved in *PabPol D* and *PabPol B* binding to PCNA, raising the possibility that Archaea require two mechanisms for recruiting replicative DNA polymerases at the replication fork.

Abbreviations

IDCL, interdomain connector loop of PCNA; *Pab*, *Pyrococcus abyssi*; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; *PabPCNA*, *Pyrococcus abyssi* PCNA; *PabPol B*, *Pyrococcus abyssi* family B DNA polymerase; *PabPol D*, *Pyrococcus abyssi* family D DNA polymerase; *PabPol B* Δ pip and *PabPol D* Δ pip, DNA polymerases lacking the C-terminal PIP box motif; M13ssc, single-stranded circular M13mp18 DNA; *PabPol D*Ncut, *PabPol D* lacking the N-terminus of the large subunit; *Pfu*, *Pyrococcus furiosus*; RF-C, Replication Factor C.

INTRODUCTION

DNA replication is a functionally conserved mechanism that ensures genome stability in all organisms, including Bacteria, Eukarya, Archaea, and viruses.^{1,2,3} In general, DNA replication involves a protein triad, composed of a DNA polymerase holoenzyme with two accessory factors, plus the sliding clamp and the clamp-loader. In *E. coli*, the chromosomal replicase is a DNA polymerase III complex comprising two protein factors in addition to the polymerizing

core subunits.^{4,5} Recently, O'Donnell and co-workers suggested that three Pol III complexes could assemble to form a triple replisome.⁶

There is a fascinating relationship between eukaryal and archaeal DNA replication proteins in that informational proteins in Archaea are more closely related to their eukaryotic counterparts than to their bacterial counterparts. In eukaryotes, two family B replicases ensure faithful reproduction of the entire genome. DNA polymerase δ is composed of three⁷ to four^{8,9} essential subunits, while DNA polymerase ϵ is active as a heterotetramer.¹⁰ Recent genetic studies suggest strongly that DNA polymerases δ and ϵ are essential for eukaryotic DNA replication: DNA polymerase δ might be responsible for Okazaki fragments synthesis on the lagging strand, while DNA polymerase ϵ is likely to perform leading strand synthesis.^{11,12} Interestingly, the functional interaction between eukaryotic DNA polymerase δ and the archaeal accessory factors proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and replication factor C (RF-C) has been conserved throughout evolution.^{13,14} However, the archaeal replication factors from thermococcales have unique functional properties. While ATP hydrolysis is required for clamp-loading in eukaryotes,¹⁵ in archaeons the RF-C complex can load PCNA without ATP hydrolysis.¹⁶ In addition, PCNA stimulates family B and D DNA polymerase activity on a circular DNA template in the absence of RF-C,¹⁷ and spontaneous loading of PCNA from *Pyrococcus abyssi* (*PabPCNA*) can be enhanced not only by RF-C, but also by Pol B.¹⁸ There is marked evolutionary divergence within the main subdomains of Archaea, i.e. Euryarchaea and Crenarchaea. Indeed, in Crenarchaea there are up to three PCNA homologues^{19,20} that can form a heterotrimer *in vivo*,²¹ while in Euryarchaea there is a single PCNA homologue that forms a homotrimer. Cellular DNA polymerases are also highly divergent within these subdomains. Crenarchaea generally have up to three family B monomeric DNA polymerases,^{22,23} while Euryarchaea have one monomeric family B DNA polymerase and one heterodimeric family D DNA polymerase that first appeared to be restricted to this subdomain.²⁴⁻²⁶ However, Pol D has been detected in the genomes of *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*,²⁷ *Nanoarchaeum equitans*,²⁸ and *Cenarchaeum symbiosum*.²⁹

Generally, replicative DNA polymerases need the sliding clamp to act rapidly and processively.³⁰ Interactions of proteins with the sliding clamp are mediated through common motifs, such as the PCNA-interacting protein (PIP) box.³¹ The PIP box is defined as Qxx(h)xx(a)(a), where “x” is any amino acid, “h” is a hydrophobic residue (I, L, or M), and “a” is an aromatic residue (F, Y, or W). A large number of replication and repair proteins,

including error-prone DNA polymerases, contain this consensus PIP motif.^{32,33} The PIP box is not always sufficient for protein interaction with PCNA and a region proximal to the core-conserved domain contributes to the interaction with PCNA.³⁴ Consistent with this, a helix-hairpin-helix (HhH) motif, important for DNA primer binding to DNA polymerase λ , also physically interacts with PCNA.³³ In addition, a C-terminal PCNA-binding motif of DNA polymerase λ , unrelated to the PIP box, was involved in negative regulation of nucleotidyl transferase activity.³⁵ Using a random peptide library led to the identification of a new polymorphic PCNA-binding motif, the KA-box; this motif is found in human Pol δ and in other proteins such as members of the MCM family, mismatch repair protein MSH6, and cyclin D3.³⁶ Finally, the binding of DNA polymerase δ to PCNA is mediated by a glycine-rich region (GX4GX8GX3YFY).³⁷ However, the structure, and not just the sequence, of PCNA-interacting peptides is important. Indeed, recent studies have shown that PCNA binding to PCNA-interacting peptides is independent of the specific sequence.³⁸ Moreover, PIP-peptide interactions are mediated through beta zipper formation at the interaction surface.³⁹ The PIP box motif interacts preferentially with the hydrophobic pocket^{40,41} of PCNA, as defined by the C-terminus and the interdomain connector loop (IDCL). Therefore, PCNA's binding partners, especially DNA polymerases, bind the clamp through a complex set of motifs that are often distinct from the PIP box. Keeping this in mind, we searched for PCNA binding motifs in archaeal DNA polymerases in order to gain insights into the physical interactions required for the assembly of functional DNA polymerases and PCNA in Archaea.

RESULTS

The C-terminal PIP box motif mediates functional and physical interactions between *PabPCNA* and *PabPol B* but not *PabPol D*

We deleted the C-terminal PIP box of *PabPol B* and *PabPol D* to create *PabPol B* Δ pip and *PabPol D* Δ pip (Fig. 1a). We then tested the ability of the mutant proteins to interact with *PabPCNA* using surface plasmon resonance (SPR). For *PabPol B*, physical interactions with *PabPCNA* were abolished, indicating the importance of this structural motif for PCNA binding (Fig. 1b). In contrast, deletion of the putative PIP box of *PabPol D* only moderately impaired its binding to *PabPCNA* (Fig. 1b), suggesting that other critical residues in *PabPol D* interact with *PabPCNA*.

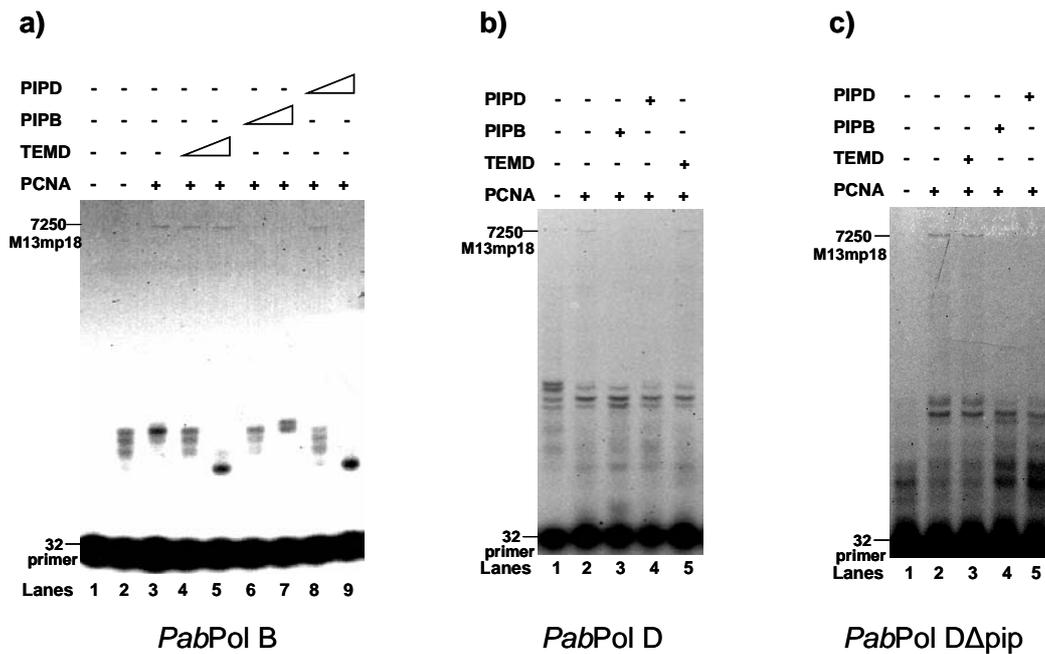


Figure 3. Functional interaction of *PabPols* with *PabPCNA* in the presence of competing peptides corresponding to PIP box motifs. Primer extension studies were performed with M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer. PIPB corresponds to the C-terminal region of *PabPol B*, PIPD corresponds to the C-terminal region of *PabPol D*, and TEMD is a control peptide corresponding to amino acids 83-103 of *PabPol D*. Primer extension studies were performed as described in the Methods section. Briefly, reactions were incubated at 60°C for 15 min, and products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized using a Typhoon 9400 imager. (a) PIP box peptides inhibit functional interactions of *PabPol B* with *PabPCNA*. The reactions contained 0.04 pmol of *PabPol B* and 0.04 pmol of *PabPCNA*. Lane 1 shows a control reaction lacking polymerase. Peptides (10 and 30 μM) were added at the same time as *PabPol B*. (b) PIP box peptides inhibit functional interactions of *PabPol D* with *PabPCNA*. The reactions contained 0.3 pmol of *PabPol D*, with *PabPCNA* added at an equimolar ratio. Peptides (30 μM) were added at the same time as *PabPol D*. (c) PIP box peptides affect functional interactions of *PabPol DΔpip* with *PabPCNA*. The reactions contained 0.6 pmol of *PabPol DΔpip*, with *PabPCNA* added at an equimolar ratio. Peptides (30 μM) were added at the same time as *PabPol DΔpip*.

A novel N-terminal motif in *PabPol D* is required for functional interaction with *PabPCNA*

Since the C-terminal PIP box motif of *PabPol D* did not play an essential role in terms of *PabPol D* interactions with *PabPCNA*, we looked for other putative PCNA-binding motifs in *PabPol D*. A novel motif localized at a glance at the N-terminus was identified. This putative PIP box (10-YFEMQLQREIDKAY-22) could correspond to a palindromic motif with the following general sequence: (a)xx(h)x(Q)xx(h)xxx(a). Glutamine 15 is located in the middle of the sequence (Fig. 4a). When we deleted the N-terminus of *PabPol D* (to create *PabPol DNcut*), the functional interactions with *PabPCNA* were strongly inhibited but not abolished in the primer extension assay (Fig. 4b). Quantitative analysis of the data from three independent experiments showed that PCNA stimulation was significantly reduced compared to *PabPol D* ($P < 0.005$) when *PabPol DNcut* was used in the assay (Fig. 4b).

a) MELPKEMEEYFEMLQREIDKAYEIAKKAR
 1 29

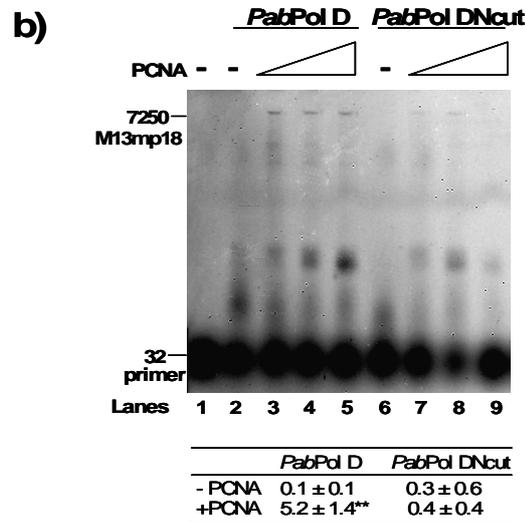


Figure 4. A putative PIP box motif is localized at the N-terminus of the large subunit of *PabPol D*. (a) The amino acid residues forming the palindromic PIP box motif are boxed, and the arrow indicates the glutamic acid residue that was mutated to be a start codon. (b) The N-terminus of the large subunit of *PabPol D* is not essential for functional interaction with *PabPCNA*. Primer extension studies were performed with M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer and containing 0.3 pmol of *PabPol D* and 0.7 pmol of *PabPol DNcut*. PCNA was added in 1:3, 1:1, and 3:1 ratios relative to the level of DNA polymerase (the ratios are indicated schematically using triangles). Primer extension studies were performed as described in the Methods section. Reactions were incubated at 60°C for 30 min, and products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized using a Typhoon 9400 imager. Lane 1 shows a control reaction lacking DNA polymerase. Densitometry was used to quantify the relative amounts of the full-length product. Data are expressed as the mean percent ± SD of full-length product relative to total elongation products. Differences between the means were tested using the sStudent's *t*-test for equal variances. Difference relative to control without PCNA: ***P* < 0.005 (n = 3). Data with *PabPol D* and *PabPol D*Δpip were significantly different when PCNA was present (*P* < 0.005).

We next looked at the primer extension activity of *PabPol D* in the presence of *PabPCNA* plus the competitor peptides Nter 1 and Nter 2 (Fig. 5). These peptides correspond to the sequences upstream and downstream of glutamine 15, respectively. *PabPol D* activity was still stimulated in the presence of both Nter 1 and Nter 2, which were added separately with peptide TEMD (Fig. 5, lanes 8-15). Strikingly, stimulation of *PabPol D* processivity was greatly reduced when both peptides were present (Fig. 5, lanes 18 and 19). This result confirmed that the entire palindromic PIP box sequence at the N-terminus of *PabPol D* is needed for functional interactions of *PabPol D* with *PabPCNA*.

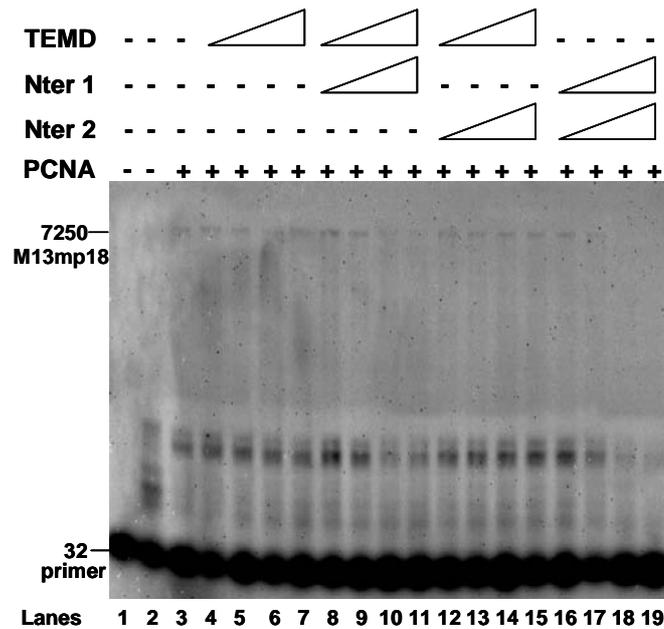


Figure 5. Functional interaction of *PabPol D* with *PabPCNA* in the presence of competitor peptides that mimic the N-terminus of *PabPol D*. Primer extension studies were performed with M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer. Nter 1 and Nter 2 correspond to amino acids 1-15 and 15-29, respectively, in the N-terminal region of the *PabPol D* large subunit. TEMD is a control peptide that corresponds to *PabPol D* amino acids 83-103. The reactions contained 0.3 pmol of *PabPol D* and 0.3 pmol of *PabPCNA*. Increasing amounts of peptides were added (50 μ M, 100 μ M, 500 μ M and 1000 μ M) at the same time as *PabPol D*, except for the experiments analyzed in lanes 4 to 7. In these four reactions, the amount of TEMD was sequentially increased: 100 μ M, 200 μ M, 1000 μ M, and 2000 μ M. Primer extension studies were performed as described in the Methods section. Briefly, reactions were incubated at 60°C for 15 min, and products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized using a Typhoon 9400 imager. Lane 1 shows a control reaction lacking DNA polymerase.

The C-terminus of *PabPCNA* is essential for *PabPol D* but not for *PabPol B* stimulation

The crystal structure of *PfuPCNA*,⁴² along with structure/function studies of eukaryotic PCNA,⁴³⁻⁴⁵ have produced a structural model of *PabPCNA*. To identify the residues of *PabPCNA* that are critical for its physical interactions with *PabPols*, we introduced mutations into its conserved structural domains (Fig. 6). We first generated three mutants in the IDCL region: EIE120, VDL123 and EL127. We then replaced the C-terminal proline and arginine with alanine. These mutations are shown schematically on a model of *PfuPCNA* in Figure 6. Native PAGE was used to control whether the mutant proteins were still homotrimers, i.e. if they migrated as a single band at about 85 kDa, as does wild type PCNA (data not shown).

Proteins	Mutations on IDCL
PCNA	¹¹⁵ LIDVEEIEVDLPELPFT ₁₃₁
EIE120	¹¹⁵ LIDVEAAAVDLPELPFT ₁₃₁
VDL123	¹¹⁵ LIDVEEIEAAAPELPFT ₁₃₁
EL127	¹¹⁵ LIDVEEIEVDLPAAPFT ₁₃₁
Proteins	Mutations on C-terminus
PCNA	²⁴³ LAPRVEE ₂₄₉
PR245	²⁴³ LAAAVEE ₂₄₉

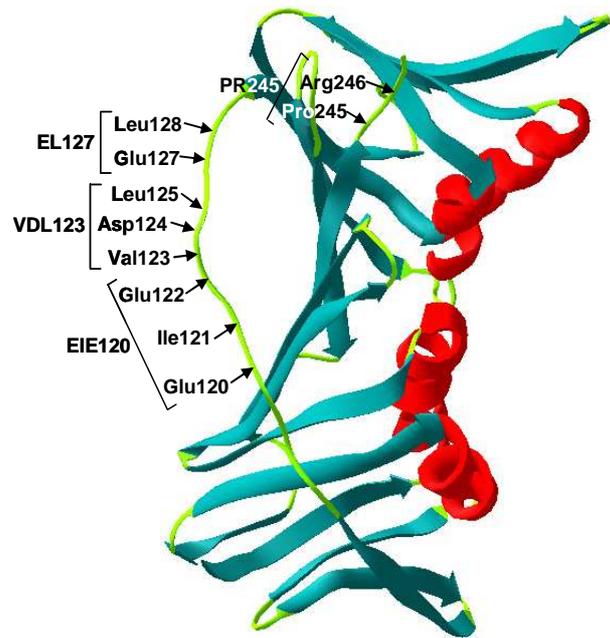


Figure 6. Left panel: Mutations of the IDCL region and C-terminus of *PabPCNA* in the region corresponding to the hydrophobic pocket. Right panel: The 3D structure of a PCNA monomer showing the mutated amino acids.

We then tested the primer elongation activities of *PabPol B*, *PabPol D*, and the mutants *PabPol D* Δ pip and *PabPol D*Ncut with the *PabPCNA* mutants using optimal stimulation conditions for each DNA polymerase (Fig. 7). All of the PCNA mutants stimulated *PabPol B* activity (Fig. 7). *PabPol D* activity was stimulated by the EIE120, VDL123, and EL127 PCNA mutants, while mutant PR245 did not enhance primer extension by *PabPol D* (Fig. 7). This indicates that the C-terminus of PCNA is critical for its physical and functional interaction with *PabPol D*. With the exception of PR245, the PCNA mutants stimulated *PabPol D* Δ pip and *PabPol D*Ncut (Fig. 7). Taken together, these results suggest that PCNA binding to *PabPol D* is mediated by the PIP motifs located at the N- and C-termini, respectively.

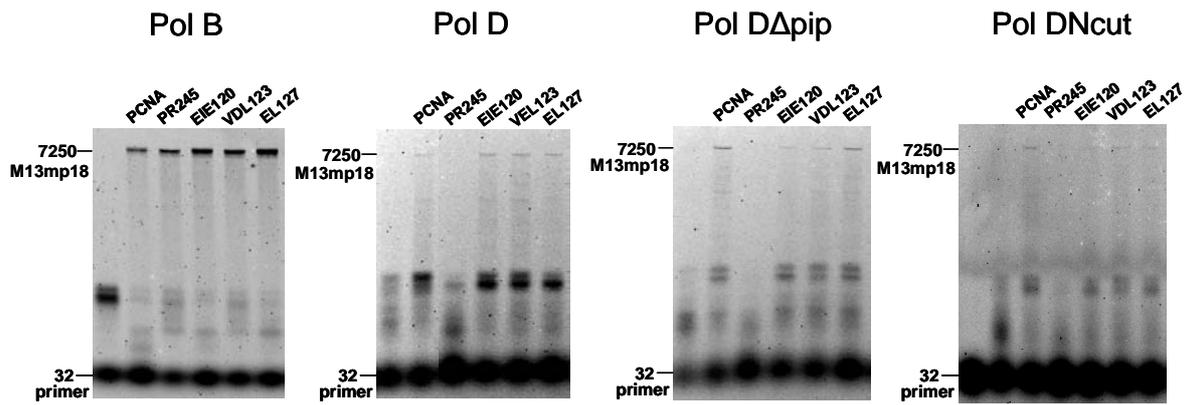


Figure 7. Functional interaction of *PabPol B*, *PabPol D*, *PabPol D Δ pip*, and *PabPol DNcut* with *PabPCNA* mutants. Primer extension studies were performed with M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer. Primer extension studies were performed as indicated in the Methods section. Products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized using a Typhoon 9400 imager. The reactions contained (a) 0.04 pmol *PabPol B* (wild type and mutant PCNA species were added at an equimolar ratio with *PabPol B*); (b) 0.3 pmol of *PabPol D*; (c) 0.6 pmol of *PabPol D Δ pip*; (d) 0.7 pmol of *PabPol DNcut*.

DISCUSSION

PCNA-binding motifs appear to be evolutionarily divergent in DNA replication proteins, and even the PIP box has a polymorphous nature. The human DNA polymerase δ p66 subunit has a canonical PIP motif in the N-terminal region that contributes greatly to its interactions with PCNA.³⁴ In the Pol X family, a non-canonical PIP box belongs to a longer PCNA-binding motif that has a conserved helix-hairpin-helix (HhH) domain.³³ PIP box-like motifs are also found in the core region of most DNA polymerases. For example, PIP box-like motifs are found in the large subunit of *Pfu*Pol D at amino acid residues 1096-1103 and 1253-1261.¹⁷ In *Pab*Pol B, the LxxFG motif involves amino acids 745-750, and two LxxFY motifs are located at amino acid sequences 894-904 in the large subunit of *Pab*Pol D. It is thus reasonable to assume that functional PIP box motifs are generally located in the terminal regions of proteins that interact with PCNA.

In this study, we gained further insights into the physical and functional interactions of *Pab*Pols with *Pab*PCNA. While *Pab*Pol B has just one PIP box motif at the C-terminus, *Pab*Pol D has two PIP-type motifs that interact with PCNA. This suggests that at the replication fork, the mechanism involved in *Pab*Pol D loading and stimulation by PCNA may be different from that involved in *Pab*Pol B loading and stimulation. In contrast to results with *Pab*Pol B, removing the canonical C-terminal PIP motif from *Pab*Pol D did not disrupt physical interactions with PCNA, although use of competitor peptides demonstrated that this shortened motif functioned as a PIP box that could indeed interact with PCNA, but with low or even no effects on the processivity of the reaction. Interestingly, the N-terminal PCNA-interacting motif in *Pab*Pol D is a palindromic putative PIP box defined by the sequence 10-YFEMLQREIDKAY-22. This sequence appears to be on the surface of *Pab*Pol D where it can interact with the sliding clamp.

Our finding that binding of *Pab*PCNA to *Pab*Pol D requires at least two motifs, one at the N-terminus and one at the C-terminus, contrasts with a recent report that *Pfu*Pol D interacts functionally with *Pfu*PCNA *in vitro* via its C-terminal PIP box.⁴⁶ This difference in results is surprising, since Pol D from *Pyrococcus abyssi* and *Pyrococcus furiosus* have strong similarities in terms of primary structure, particularly in their PIP boxes. Moreover, the authors further demonstrated that *Pfu*Pols bound to *Pfu*PCNA in the absence of DNA; in contrast, we found previously that DNA was required for this interaction.⁴⁷ In addition to the absence or presence of DNA, the level of PCNA in the reaction relative to the DNA polymerase concentration is important. For example, as shown in Fig. 4b, experiments with

PabPol DNcut indicate that using an excess of PCNA could lead to an erroneous conclusion that the N-terminal motif is the only PCNA-interacting motif.

Three domains of eukaryotic PCNA are involved in protein-protein interactions: the IDCL, which is a major interaction site that is recognized by several proteins, including Pol δ , p21, Fen1 and DNA ligase 1; the N-terminal region, comprising the inner α -helices, which forms part of the binding site for cyclin D; and the C-terminal tail, which is important for interactions with Pol ϵ and RF-C.^{48,49} Since *PabPol* D and *PabPol* D Δ pip did not interact with the C-terminal PCNA mutant (Fig. 7), and since interactions between *PabPol* D and *PabPCNA* are inhibited by competitor peptides that mimic the PIP boxes, it seems that the two PIP motifs in *PabPol* D interact with the same region of PCNA (i.e. the C-terminus). However, since none of the PCNA mutants affected binding to *PabPol* B, we do not know which region of *PabPCNA* is important for binding to *PabPol* B. More studies are needed to answer this question.

There is also the question of steric accessibility of the PCNA binding sites, especially when high molecular weight complexes are involved. The PIP box motif itself may be a flexible connector.⁵⁰ In addition, PCNA interactions with more than one partner have to be considered as proposed for the crenarchaeal heterotrimeric clamp.²¹ In the bacteriophage RB69, the DNA polymerase has a PIP box-like peptide that binds to only one site on the sliding clamp; the other two sites can bind additional proteins.⁵⁰ Through structural reorganization of the bound protein, this allows other proteins access to the free PCNA-binding sites. Interestingly, p21 interferes strongly with PCNA stimulation by Pol δ , but does not inhibit loading of the PCNA by RF-C.⁵¹ This indicates that there are different binding sites for Pol δ and RF-C. It has also been proposed that RF-C travels with Pol δ and PCNA.⁵² Nevertheless, we do not know whether both motifs interact with the same monomer or with two different monomers. We also cannot say whether both PIP box motifs on *PabPol* D interact with PCNA at the same time, alternatively, or in a preferential order depending on the replication steps and/or on repair partners. Finally, it is clear that PCNA binding is different for the two *Pyrococcus abyssi* DNA polymerases; this may imply that PCNA acts as a pivotal replication factor to coordinate and enhance DNA synthesis by the two *PabPols* at the leading and lagging strands, as hypothesized by previous studies.⁴⁷

MATERIALS AND METHODS

Recombinant proteins

PabPol B (IsisTM DNA polymerase) was purchased from Qbiogene (Illkirch, France). *PabPol D* and *PabPCNA* were prepared as described previously.^{16,26} Mutant versions of both DNA polymerases with the PIP boxes deleted were obtained using the QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands). The codons for lysine 768 and lysine 1440 were replaced with a stop codon just upstream of the PIP box in *PabPol B* and *PabPol D*, respectively, (Fig. 1a).

To express the *PabPol D*Ncut deletion mutant, we deleted the first 22 N-terminal amino acids by introducing an NdeI recognition sequence. The gene encoding *PabPol D*Ncut was cloned into plasmid pET25b+ (Promega) and amplified by PCR using the oligonucleotides 5'-CAGAGGGAGATAGATAAGGCCCATATGATAGCTAAAAAGGCGAGG-3' and 3'-GTCTCCCTCTATCTATTCCGGGTATACTATCGATTTTCCGCTCC-5'. The NdeI recognition sequence is underlined. The PCR product was digested with NdeI and reintroduced into the pET25b+ plasmid. The entire nucleotide sequence was confirmed by sequencing. The gene was co-transformed into *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS with plasmid pET28b+, which contained the gene encoding the small subunit of *PabPol D*.

For the PCNA mutants, proline 245 and arginine 246 (PR245); glutamic acid 120, isoleucine 121, and glutamic acid 122 (EIE120); valine 123, aspartic acid 124, and leucine 125 (VDL123); and glutamic acid 127 and leucine 128 (EL127) were replaced by alanine (Fig. 6). The mutants were obtained using the following oligonucleotides: 5'-TGATATTCCTCCTGGCTGCCGCGGTTGAGGAG-3' and 3'-GACTATAAGGAGGACCGACG GCGCCAACTCCTC-5' (PR245); 5'-ATAGATGTTGAGGCGGCCGAGTTGACTTGCCAGAG-3' and 3'-ATCTACA ACTCCGCGGCGTCAACTGAACGGTCTC-5' (EIE120); 5'-GAGGAGATCGAAGCTGCCGCGCCAGAGTTACCC-3' and 3'-CTC CTCTAGCTTCGACGGCGCGGTCTCAATGGG-5' (VDL123); 5'-ATCGAAGTTGACTTGCCAGCGGCACCTTCACG-3' and 3'-TAGCTTCAACTGAACGGTCGCCGT GGGAAAGTGC-5' (EL127). The PCR products were cloned into plasmid pET25b+ (Promega), and the entire nucleotide sequence was confirmed by sequencing. All mutants were expressed using the Rapid Translation System 500 *E. coli* HY Kit from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

The peptides used as competitor peptides for PCNA were synthesized by Eurogentec. PIPB corresponded to the C-terminus of *PabPol B* (765-QKTKQVFLGAWLKF-778), PIPD corresponded to the C-terminus of the *PabPol D* large subunit

(1438-PKKKRVISLEEFFSRKSK-1455), Nter 1 corresponded to the N-terminus of the *PabPol D* large subunit (1- MELPKEMEEYFEMLQ-15), Nter 2 corresponded to the N-terminal domain of the *PabPol D* large subunit (15-QREIDKAYEIAKKAR-29), and the control peptide TEMD corresponded to an internal *PabPol D* sequence (83-EIIEGKFGDLGSREKYAEQAV-103). The theoretical pIs of the competitor peptides PIPB, PIPD, Nter1, Nter2, and TEMD were 10.3, 10.57, 3.98, 9.52, and 4.59, respectively.

Primer extension assay

The 32-nt oligonucleotide used to prepare the primed DNA substrate for primer extension (5'-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3') was synthesized, labeled at the 5' terminus with 6-carboxyfluorescein, and purified by Eurogentec (Belgium). M13ssc was annealed to the 32-nt oligonucleotide at a 1:3 molar ratio in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, by heating at 75°C for 10 min followed by cooling to room temperature. Primer extension was performed in a final volume of 11 µl; reactions contained the following: 0.09 pmol of template/primer, 2 pmol of each dNTP, 0.02 to 1.5 pmol of *PabPCNA* and the *PabPols* to be tested in buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂). Reactions were incubated at 60°C for 30 min and stopped by transferring to ice and adding 10 µl of stop buffer (98% (v/v) formamide, 0.2 mM EDTA, pH 8.0).

For inhibition studies, peptides (30 µM to 1000 µM, as indicated) and *PabPols* were added simultaneously to start the reactions, which were incubated at 60°C for 15 min and then stopped on ice. The products were heated at 95°C for 5 min and resolved for 16 h at 30 V at 4°C on a 1% (w/v) alkaline agarose gel (50 mM NaOH, 1 mM EDTA). Finally, the products were visualized using a Typhoon 9400 imager (Amersham Biosciences).

Surface plasmon resonance (SPR) experiments

SPR analyses were performed on a BIAcore X apparatus (BIAcore, Uppsala, Sweden). DNA surfaces consisted of approximately 200 resonance units (RU) of biotinylated template immobilized onto a streptavidin surface (SA sensor chip, BIAcore) as described previously.⁴⁷ The interaction between the *PabPol* proteins and the DNA/PCNA complex were monitored as follows: *PabPCNA* (200 nM) was injected over the DNA chip and *PabPols* (200 nM) were added 30 seconds after *PabPCNA*. The interactions were monitored at 25°C at a flow rate of 30 µl/min in HBS-P buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) surfactant P20).

Acknowledgements

The work was supported by a grant from the European Union (Project QLK3-CT-2002-02071 REPBIOTECH). BC and CR were supported by a grant from Région Bretagne (211-B2-9/ARED) and Ifremer. DF also thanks ANR and Brittany regional council for financial support. We are grateful to Pascal Trouvé for giving access to the BIAcore apparatus (INSERM U.613, Génétique Moléculaire et Génétique Epidémiologique, Brest, France).

REFERENCES

1. Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1994). DNA replication: enzymology and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **4**, 185-195.
2. Forterre, P., Filée, J. & Myllykallio, H. (2004). Origin and evolution of DNA and DNA replication machineries. In *The Genetic Code and the Origin of Life* (de Pouplana, L. R., ed.), pp. 145-168. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
3. Toueille, M. & Hübscher, U. (2004). Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma*, **113**, 113-125.
4. O'Donnell, M., Jeruzalmi, D. & Kuriyan, J. (2001). Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Curr. Biol.* **11**, R935-R946.
5. Johnson, A. & O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 283-315.
6. McInerney, P., Johnson, A., Katz, F. & O'Donnell, M. (2007). Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Mol. Cell* **27**, 527-538.
7. Burgers, P. M. J. & Gerik, K. J. (1998). Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **273**, 19756-19762.
8. Zuo, S., Bermudez, V., Zhang, G., Kelman, Z. & Hurwitz, J. (2000). Structure and activity associated with multiple forms of *Schizosaccharomyces pombe* DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **275**, 5153-5162.
9. Podust, V. N., Chang, L.-S., Ott, R., Dianov, G. L. & Fanning, E. (2002). Using recombinant baculoviruses. The reconstitution of human DNA polymerase ϵ 12 subunit potentiates DNA polymerizing activity of the four-subunit enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 3894-3901.
10. Chilkova, O., Jonsson, B. H. & Johansson, E. (2003). The quaternary structure of DNA polymerase epsilon from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 14082-14086.
11. Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M. J. & Kunkel, T. A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol. Cell* **30**, 137-144.
12. Fukui, T., Yamauchi, K., Muroya, T., Akiyama, M., Maki, H., Sugino, A. & Waga, S. (2004). Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in and *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* **9**, 179-191.
13. Henneke, G., Raffin, J. P., Ferrari, E., Jónsson, Z. O., Dietrich, J. & Hübscher, U. (2000). The PCNA from *Thermococcus fumicolans* functionally interacts with DNA polymerase δ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 600-606.

14. Ishino, Y., Tsurimoto, T., Ishino, S. & Cann, I. K. (2001). Functional interactions of an archaeal sliding clamp with mammalian clamp loader and DNA polymerase δ . *Genes Cells* **6**, 699-706.
15. Gomes, X. V. & Burgers, P. M. J. (2001). ATP utilization by yeast replication factor C. I. ATP-mediated interaction with DNA and with Proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **276**, 34768-34775.
16. Henneke, G., Gueguen, Y., Flament, D., Azam, P., Querellou, J., Dietrich, J., Hübscher, U. & 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.
17. Cann, I. K. O., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K. & Ishino, Y. (1999). Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 6591-6599.
18. Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J. & Raffin, J. P. (2007). DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J. Mol. Biol.* **369**, 343-55.
19. De Felice, M., Sensen, C. W., Charlebois, R. L., Rossi, M. & Pisani, F. M. (1999). Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **291**, 47-57.
20. Daimon, K., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Sako, Y. & 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.
21. Dionne, I., Nookala, R. K., Jackson, S. P., Doherty, A. J. & Bell, S. D. (2003). A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Cell* **11**, 275-282.
22. Cann, I. K. O., Ishino, S., Nomura, N., Sako, Y. & Ishino, Y. (1999). Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, an aerobic hyperthermophilic crenarchaeote. *J. Bacteriol.* **181**, 5984-5992.
23. Iwai, T., Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Kimura, N. & Horiuchi, T. (2000). Sequence analysis of three family B DNA polymerases from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfurisphaera ohwakuensis*. *DNA Res.* **7**, 243-251.

24. Cann, I. K. O., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. & Ishino, Y. (1998). A heterodimeric DNA polymerase: Evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14250-14255.
25. Ishino, Y., Komori, K., Cann, I. K. O. & Koga, Y. (1998). A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol.* **180**, 2232-2236.
26. Gueguen, Y., Rolland, J. L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J. P. & Dietrich, J. (2001). Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5961-5969.
27. Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B. P., Brochier-Armanet, C. I., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. & Stetter, K. O. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8102-8107.
28. 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., Soell, D., Stetter, K. O., Short, J. M. & Noordewier, M. (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12984-12988.
29. Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-I., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18296-18301.
30. Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 171-200.
31. Warbrick, E. (1998). PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays* **20**, 195-199.
32. Ducoux, M., Urbach, S., Baldacci, G., Hübscher, U., Koundrioukoff, S., Christensen, J. & Hughes, P. (2001). Mediation of PCNA-dependent DNA replication through a conserved P21Cip1-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **276**, 49258-49266.
33. Maga, G., Blanca, G., Shevelev, I., Frouin, I., Ramadan, K., Spadari, S., Villani, G. & Hübscher, U. (2004). The human DNA polymerase λ interacts with PCNA through a domain important for DNA primer binding and the interaction is inhibited by p21/WAF1/CIP1. *Faseb J.* **18**, 1743-5.

34. Pohler, J. R., Otterlei, M. & Warbrick, E. (2005). An *in vivo* analysis of the localisation and interactions of human p66 subunit DNA polymerase δ . *BMC Mol. Biol.* **6**, 17.
35. Shimazaki, N., Yazaki, T., Kubota, T., Sato, A., Nakamura, A., Kurei, S., Toji, S., Tamai, K. & Koiwai, O. (2005). DNA polymerase lambda directly binds to proliferating cell nuclear antigen through a confined C-terminal region. *Genes Cells* **10**, 705-715.
36. Xu, H., Zhang, P., Liu, L. & Lee, H. (2001). A novel PCNA-binding motif identified by the fanning of a random peptide display library. *Biochemistry USA* **40**, 4512-4520.
37. Zhang, S. J., Zeng, X. R., Zhang, P., Toomey, N. L., Chuang, R. Y., Chang, L. S. & Lee, M. Y. W. T. (1995). A conserved region in the amino terminus of DNA polymerase δ is involved in proliferating cell nuclear antigen binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 7988-7992.
38. Mesiet-Cladiere, L., Norais, C., Kuhn, J., Briffotiaux, J., Sloostra, J. W., Ferrari, E., Hübscher, U., Flament, D. & Myllykallio, H. (2007). A novel proteomic approach identifies new interaction partners for proliferating cell nuclear antigen. *J. Mol. Biol.* **372**, 1137-1148.
39. Chapados, B. R., Hosfield, D. J., Han, S., Qiu, J., Yelent, B., Shen, B. & Tainer, J. A. (2004). Structural basis for FEN-1 substrate specificity and PCNA-mediated activation in DNA replication and repair. *Cell* **116**, 39-50.
40. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnel, M. & Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* **87**, 297-306.
41. Warbrick, E. (2000). The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22**, 997-1006.
42. Matsumiya, S., Ishino, Y. & Morikawa, K. (2001). Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* **10**, 17-23.
43. Jónsson, Z. O., Hindges, R. & 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.
44. Eissenberg, J. C., Ayyagari, R., Gomes, X. V. & Burgers, P. M. J. (1997). Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ . *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6367-6378.
45. Zhang, P., Sun, Y. B., Hsu, H., Zhang, L. F., Zhang, Y. N. & Lee, M. Y. W. T. (1998). The interdomain connector loop of human PCNA is involved in a direct interaction with human polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **273**, 713-719.

46. Tori, K., Kimizu, M., Ishino, S. & Ishino, Y. (2007). DNA polymerases BI and D from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* both bind to proliferating cell nuclear antigen with their C-terminal PIP-box motifs. *J. Bacteriol.* **189**, 5652-5657.
47. Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J. & 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.
48. Jónsson, Z. O. & Hübscher, U. (1997). Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* **19**, 967-975.
49. Maga, G. & Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051-3060.
50. Shamoo, Y. & 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.
51. Podust, L. M., Podust, V. N., Sogo, J. M. & Hübscher, U. (1995). 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.
52. Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J. & O'Donnell, M. (1999). Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase δ holoenzyme. *EMBO J.* **18**, 6189-6199.

III. Résultats complémentaires

III.1. Interaction entre le PCNA et les sous-unités de l'ADN polymérase D

Les interactions entre le PCNA et la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D ont été étudiées par la méthode de pull-down (Figure 21A). La révélation a été réalisée par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP1 de la Pol D. De la même façon, l'interaction entre la grande sous-unité DP2 de l'ADN polymérase D avec le PCNA a été testée en pull-down (Figure 21B). La révélation a été réalisée par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP2 de la Pol D. Le PCNA tagué histidine, préalablement fixé aux billes, n'interagit, ni avec la DP1 (Figure 21A), ni avec la DP2 (Figure 21B). Dans les deux cas, le résultat est identique, que ce soit en absence ou en présence d'ADN.

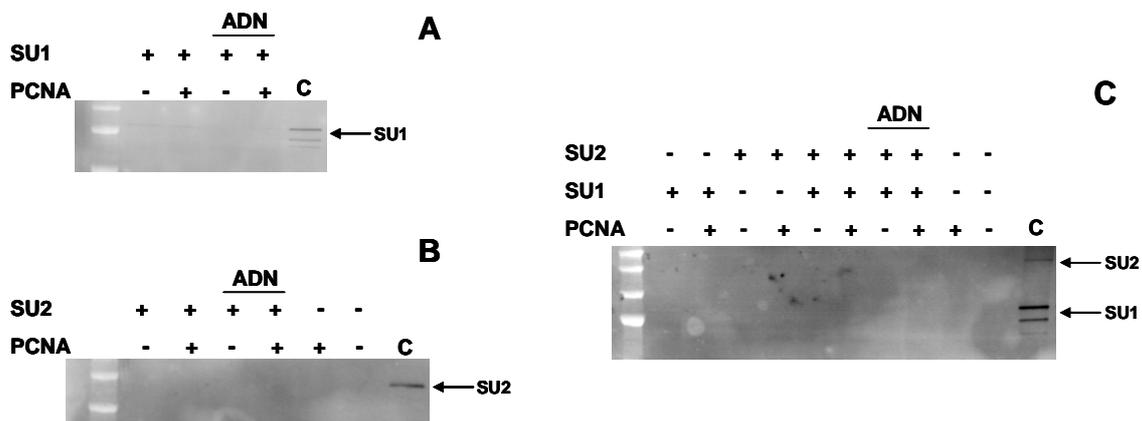


Figure 21 : Interaction entre le PCNA et les sous-unités de l'ADN polymérase D.

1,5 µg de PCNA tagué histidine ont été mis en présence des billes et 15 µg de DP1 et/ou de DP2 ont été chargés sur les billes, en présence ou en absence d'ADN (A2/B2). C représente le contrôle du western blot. La révélation a été réalisée par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP1 en A) et C), ou DP2 de la Pol D en B) et en C).

La méthode de pull-down ne nous a donc pas permis de démontrer l'interaction entre le PCNA et la petite sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D. Cette interaction a pourtant été observée chez d'autres Euryarchaeota, notamment chez *P. horikoshii* (Shen *et al.*, 2003). Chez cette espèce, le PCNA interagit plus particulièrement avec la région N-terminale (1-200) de la DP1 (Tang *et al.*, 2004). Par ailleurs, la méthode de pull-down ne nous a pas permis de d'observer l'interaction entre le PCNA et la DP2 seule de la Pol D. Il a été démontré que le PCNA interagissait fortement avec la sous-unité DP2 chez *P. furiosus* (Cann *et al.*, 1999a). De plus, le *Pfu*PCNA interagit avec la *Pfu*Pol D, grâce à son motif PIP box situé au niveau de la grande sous-unité (Tori *et al.*, 2007). Ces résultats sont en contradiction avec les nôtres (cf. article). En analysant leurs sensorgrammes obtenus en SPR, nous pouvons constater que

les courbes théoriques ne fissent pas leurs données expérimentales. Ces types de résultats sont dus généralement à l'hétérogénéité de la surface ou au tampon de flux et/ou à la non spécificité des liaisons. De plus, nous constatons, lors de leurs réactions d'extension d'amorce, l'existence de grands fragments en présence de PCNA. Leurs conditions de réactions d'extension d'amorce ne semblent pas optimisées pour pouvoir suivre l'accumulation de produits de longueur totale de la matrice. Par conséquent, nous ne sommes pas d'accord sur le fait que *PfuPol D*ΔPip ne soit pas stimulée par le PCNA. Ainsi, nous pensons que les différences d'interactions entre *PabPolD-PabPCNA* et celles des enzymes de *P. furiosus* sont liées aux conditions expérimentales.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'ADN polymérase D interagit avec le PCNA uniquement lorsque les deux sous-unités DP1 et DP2 sont complexées entre elles. Afin de confirmer cette hypothèse, la capacité du PCNA à se lier aux deux sous-unités préincubées ensemble, a été testée par la méthode de pull down (Figure 21C). Les sous-unités DP1 et DP2 ont été ajoutées extemporanément dans le milieu réactionnel contenant le PCNA préalablement fixé aux billes, en absence ou en présence d'ADN. La révélation a été réalisée par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP2 et anti-DP1 de la Pol D. Aucune interaction n'a été démontrée entre le PCNA et les deux sous-unités DP1 et DP2. Ainsi, ces travaux préliminaires ne nous ont donc pas donné d'informations quant à ces interactions. Nous pouvons imaginer que le complexe entre les deux sous-unités DP1 et DP2 ne se soit pas bien structuré. Néanmoins, il nous faudrait utiliser une autre méthode afin de pouvoir affirmer avec certitude l'absence d'interaction entre *PabPCNA* et la DP1 et la DP2 de *PabPol D*, notamment par SPR.

III.2. Interaction des ADN polymérases D et B avec les PCNA mutés en présence du peptide PIPD

Précédemment, nous avons utilisé le peptide PIPD correspondant à la structure primaire du motif PIP box à l'extrémité C-terminale de la grande sous-unité de *PabPol D* (cf. Matériels et Méthodes) en tant que compétiteur des interactions des ADN polymérases au PCNA. Nous avons démontré que le peptide PIPD inhibait l'interaction entre le PCNA d'une part et *PabPol D*, *PabPol D*Δpip ou *PabPol B* d'autre part. De plus, seul le PCNA muté PR245 ne stimulait pas la Pol D, qu'elle soit sauvage ou mutée, contrairement à *PabPol B*, qui voyait sa synthèse d'ADN améliorée en présence de tous les PCNA mutés. Dans l'étude

présentée ici, notre but était de voir, si le peptide PIPD gardait son effet inhibiteur, malgré les mutations réalisées dans la poche hydrophobe du PCNA. Ainsi, nous avons étudié l'influence du peptide PIPD sur les interactions entre *PabPol D* et *PabPol D Δ pip* avec les PCNA mutés. Pour cela, la stimulation d'extension d'amorce de l'ADN polymérase D par le PCNA, sauvage ou muté au niveau de la poche hydrophobe, a été testée en présence du peptide compétiteur PIPD (Figure 22A).

Tout d'abord, nous avons confirmé certains des résultats exposés dans la publication. En effet, contrairement au PCNA sauvage et aux PCNA mutés au niveau de l'IDCL (cf. Matériels et Méthodes), le PCNA muté PR245 ne stimule pas l'ADN polymérase D (Figure 22A, comparer piste 6 aux pistes 5, 7, 8 et 9). De plus, alors que le peptide PIPD supprime l'activation par le PCNA sauvage (Figure 22A, piste 15), la stimulation de la processivité de l'ADN polymérase D est toujours observée en présence du peptide témoin TEMD (Figure 22A, piste 10). En revanche, la synthèse d'ADN par la *PabPol D* est fortement inhibée en présence de n'importe quel PCNA muté et en présence du peptide PIPD (Figure 22A, pistes 16 à 19), mais pas en présence du peptide témoin TEMD (Figure 22A, pistes 11 à 14). Cette inhibition, par le peptide PIPD, de la synthèse d'ADN par la Pol D, uniquement en présence d'un PCNA muté, est difficile à interpréter. Même si ce résultat a été obtenu à plusieurs reprises, nous ne pouvons occulter le fait qu'il soit peut-être artefactuel. Néanmoins, il paraît évident qu'il y a une compétition entre le peptide PIPD et les motifs PIP box de la Pol D, vis-à-vis du PCNA. En plus de cette compétition, une mutation induite au niveau de la poche hydrophobe du PCNA pourrait générer notamment des problèmes de flexibilité des protéines. Ceci aurait pour conséquence un blocage du PCNA et/ou du complexe PCNA/Pol D sur l'ADN, et empêcherait ainsi la synthèse d'ADN. Des travaux ont déjà démontré l'inhibition de la synthèse d'ADN par des peptides synthétiques qui interagissent au niveau du PCNA (Zheleva *et al.*, 2000). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le motif PIP box de l'ADN polymérase D jouerait un rôle de déclencheur dans la processivité de l'enzyme, lors de la synthèse d'ADN, en validant le bon maintien du complexe Pol D/PCNA sur l'ADN.

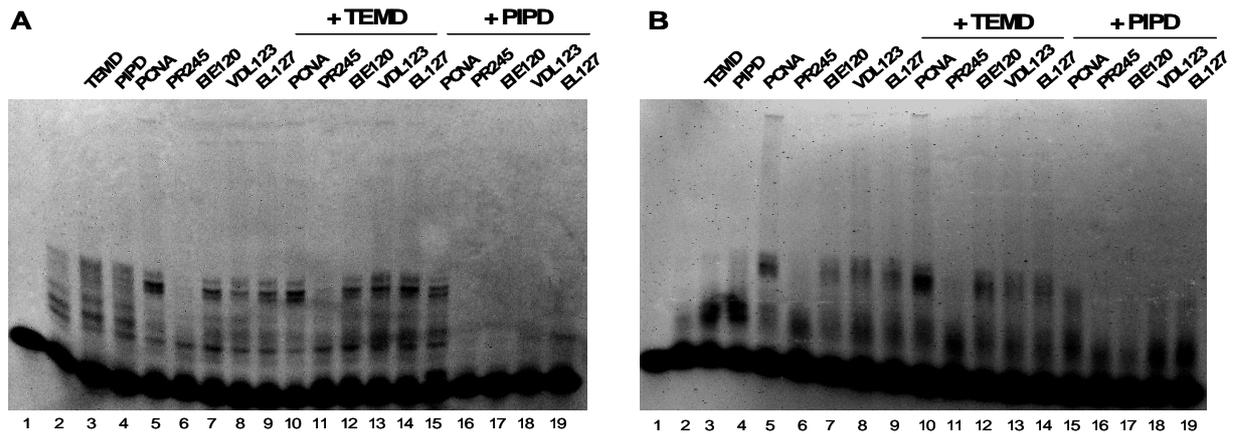


Figure 22 : Extension d'amorce par *PabPol D* et *PabPol D Δ pip*, en présence du PCNA sauvage ou muté, et en présence ou non des peptides compétiteurs. Gel dénaturant agarose alcalin à 1%. La matrice est le M13mp18(+) amorcé par un fragment M13cut32FAM, marqué en 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 15 min. A) la Pol D a été utilisée à 0,6 pmol ; B) la Pol D Δ pip a été utilisée à 0,7 pmol. Le PCNA sauvage ou muté a été utilisé pour un rapport PCNA/Pol équimolaire, et les peptides ont été utilisés à une concentration finale de 30 μ M.

De la même façon, la stimulation d'extension d'amorce de *PabPol D Δ pip*, par le PCNA sauvage ou muté au niveau de la poche hydrophobe, a été testée en présence du peptide compétiteur PIPD (Figure 22B). Comme décrit dans la publication, le PCNA PR245 ne stimule pas *PabPol D Δ pip*, contrairement au PCNA sauvage et aux PCNA mutés au niveau de l'IDCL, (Figure 22B, comparer piste 6 aux pistes 5, 7, 8 et 9). De plus, alors que le peptide PIPD supprime l'activation par le PCNA sauvage, la stimulation de la processivité de l'ADN polymérase D Δ pip est toujours observée en présence du peptide témoin TEMD (Figure 22B, pistes 10 et 15). Egalement, en présence du peptide TEMD, la stimulation de la *PabPol D Δ pip* est toujours observée en présence des PCNA mutés EIE120, VDL123 et EL127 (Figure 22B, pistes 12 à 14) alors que, le peptide PIPD inhibe la stimulation de *PabPol D Δ pip* par les mêmes PCNA (Figure 22B, pistes 17 à 19). Cependant ces PCNA ne modifient pas la synthèse basique de l'ADN (Figure 22B, pistes 15 à 18), contrairement à ce qui est observé pour la Pol D sauvage (Figure 22A, pistes 16 à 19). Ainsi, les interactions entre la Pol D Δ pip et les PCNA mutés sont totalement abrogées en présence du peptide PIPD. Ceci permet de confirmer que le peptide interagit bien au niveau de la poche hydrophobe, excepté le mutant de l'extrémité C-terminale, siège des interactions entre le PCNA et l'ADN polymérase D.

Les interactions entre *PabPol B* et les différents PCNA mutés ont été testées, en présence du peptide PIPD, utilisé à deux concentrations différentes (30 et 100 μ M) (Figure 23A et B). Tout d'abord, *PabPol B* est stimulée par tous les PCNA sauvage ou mutés

(Figure 23A, pistes 5 à 9). De plus, la stimulation de la processivité de l'ADN polymérase B est toujours observée en présence du peptide témoin TEMD pour les PCNA sauvage ou mutés (Figure 23A, pistes 10 à 14). Dans les mêmes conditions, le peptide PIPD, utilisé à une concentration de 30 μ M, inhibe partiellement la stimulation par le PCNA sauvage et les PCNA mutés EIE120, VDL123 et EL127, et totalement la stimulation par le PCNA PR245 (Figure 23A, pistes 15 à 19). En revanche, le peptide PIPD utilisé à une concentration de 100 μ M, inhibe complètement la stimulation de *PabPol B* par les PCNA sauvage et mutés (Figure 23B, pistes 15 à 19). Egalement, quelque soit la concentration testée, le peptide PIPD n'a aucune influence sur la synthèse basique de l'ADN par *PabPol B*. Ces travaux préliminaires ne nous permettent pas de conclure quant à la réelle implication du motif PIP box de la Pol B au sein de la poche hydrophobe du PCNA. Néanmoins, nous pouvons imaginer que la Pol B, *via* son motif PIP box, interagirait spécifiquement au niveau de l'extrémité C-terminale du facteur de processivité, et également au niveau d'une autre zone de la poche hydrophobe comme montré pour l'ADN ligase I de *Saccharomyces cerevisiae* (Vijayakumar *et al.*, 2007).

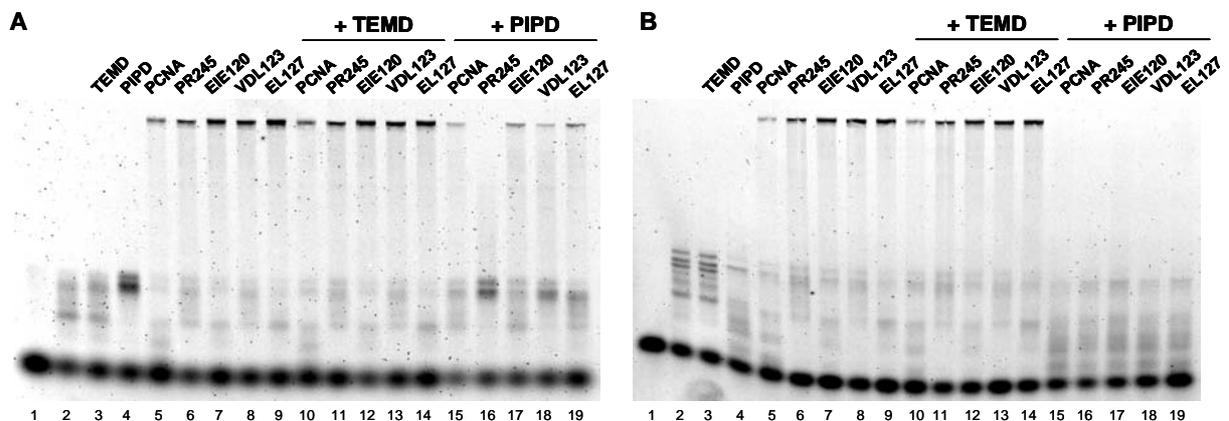


Figure 23 : Extension d'amorce par *PabPol B*, en présence des PCNA sauvage ou mutés, et en présence ou non des peptides compétiteurs.

Gel dénaturant agarose alcalin à 1%. La matrice est le M13mp18(+) amorcé par un fragment M13cut32FAM marqué en 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 15 min. La Pol B a été utilisée à 0,04 pmol. Les PCNA sauvage ou mutés ont été utilisés pour un rapport PCNA/Pol équimolaire, et les peptides ont été utilisés à une concentration finale de 30 μ M (A) et de 100 μ M (B).

IV. Conclusion et perspectives

Nous avons pu démontrer que le motif PIP box C-terminal était indispensable aux interactions entre le PCNA et l'ADN polymérase B, et pas l'ADN polymérase D. Cette dernière possède un autre motif d'interaction au PCNA, sous la forme d'un palindrome, qui se

situé au niveau de son extrémité N-terminale. Par ailleurs, l'ADN polymérase D interagit spécifiquement au niveau de l'extrémité C-terminale du PCNA, alors que l'ADN polymérase B pourrait interagir à la fois au niveau du C-terminus et aussi au niveau de l'IDCL. La figure 24 illustre de façon hypothétique les interactions entre les ADN polymérases B et D avec le PCNA.

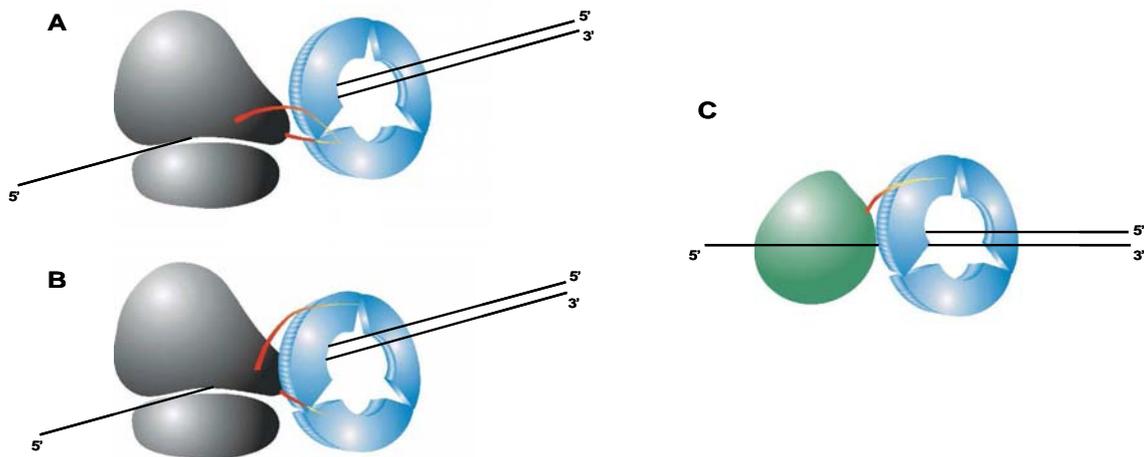


Figure 24 : Liaison des ADN polymérases B et D au PCNA. A, PabPol D interagit au niveau de l'extrémité C-terminale d'un seul monomère du PCNA grâce à ses motifs PIP box C-terminal et N-terminal de *PabPol D* (en rouge). B, PabPol D interagit au niveau de l'extrémité C-terminale de deux monomères du PCNA grâce à ses motifs PIP box C-terminal et N-terminal de *PabPol D* (en rouge). C, *PabPol B* interagit le long de la poche hydrophobe du PCNA grâce à son motif PIP box (en rouge).

Néanmoins, la description précise des interactions de *PabPol B* avec le facteur de processivité nécessite d'autres études. Dans cette optique, de nouvelles mutations uniques ou conjointes devront être réalisées, au niveau des zones d'intérêts que sont l'IDCL et le C-terminus, ainsi que d'autres zones comme la boucle au centre du monomère (Oku *et al.*, 1998). Nous pouvons également imaginer un processus dynamique évoluant en fonction de l'ADN. En effet, la protéine Apn2 de *S. cerevisiae* se lie au PCNA, au niveau de l'IDCL, en absence d'ADN, mais son activité nucléasique requiert la partie C-terminale du facteur de processivité (Unk *et al.*, 2002).

En revanche, nous n'avons pas pu observer d'interaction entre le PCNA et la petite sous-unité DP1. Une amélioration de nos conditions de pull-down doit être réalisée. Toutefois, nous pouvons émettre l'hypothèse que le PCNA se fixe à la *PabPol D* seulement si les deux sous-unités DP1 et DP2 sont complexées entre elles. Enfin, les études préliminaires d'extensions d'amorce, en présence des peptides compétiteurs et en présence des PCNA mutés, nous ont permis d'observer des comportements différents pour les deux ADN

polymérase. Néanmoins, cette étude est incomplète et ne nous permet que d'émettre des hypothèses sur l'implication des motifs PIP box et de leur interaction au sein de la poche hydrophobe du PCNA. Cette étude pourrait se poursuivre en utilisant, lors de tests d'extension d'amorce, le peptide PIPB correspondant à la structure primaire du motif PIP box de *PabPol B*.

Ces travaux nous suggèrent que différents mécanismes sont mis en œuvre pour la liaison au PCNA. Sachant que le facteur de processivité a un rôle de plateforme durant toutes les phases de la réplication de l'ADN, nous pouvons imaginer une modulation des interactions suivant le mécanisme en cours, comme cela a été déjà démontré (Lopez De Saro *et al.*, 2003). De plus, la structure et la nature des acides nucléiques joueraient un rôle dans l'affinité des enzymes interagissant avec le PCNA (Leu *et al.*, 2003). Ainsi, étant donné que différents mécanismes apparaissent chez *P. abyssi*, quant au recrutement des ADN polymérase, nous pouvons imaginer que les motifs PIP box ont également des affinités différentes.

Si cela est possible, de futurs travaux, axés sur l'expression d'une ADN polymérase D dépourvue de ses deux extrémités N et C-terminale, nous permettraient de valider définitivement notre interprétation sur le mécanisme d'interaction entre le PCNA et *PabPol D*. Des mutations ponctuelles dans les motifs sont également envisageables. Par ailleurs, nous n'avons pas pu déterminer un ordre privilégié d'implication des deux motifs PIP box, de *PabPol D*, dans la liaison au PCNA. En effet, les deux extrémités N et C-terminale de cette enzyme pourraient interagir en même temps, alternativement ou séquentiellement. Une nouvelle approche pourrait être mise en place en se focalisant notamment sur l'affinité de chaque motif pour le PCNA. La détermination structurale de l'ADN polymérase D seule et/ou complexée au PCNA apporterait la réponse. La présence commune du PCNA muté et des peptides compétiteurs, lors d'un test d'extension d'amorce, pourrait également s'effectuer avec la Pol DNcut afin d'éclaircir le processus de recrutement de *PabPol D*. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les zones d'interaction, au niveau de la poche hydrophobe du PCNA, d'autres protéines impliquées dans la réplication, telles que FEN-1 et ADN ligase I. Nous pourrions ainsi comparer les mécanismes d'interaction de chez *P. abyssi*, avec ceux des eucaryotes qui sont déjà caractérisés (Gomes & Burgers, 2000, Vijayakumar *et al.*, 2007).

Chapitre 2

Étude du complexe

ADN polymérase/RF-C/PCNA

I. Introduction

Le RF-C est aussi appelé le facteur de chargement, étant donné que son rôle principal au sein des trois domaines du vivant, est de charger le PCNA sur l'ADN. Généralement, cette réaction se met en place de façon ATP-dépendante. Néanmoins, il a été montré chez *P. abyssi* que le facteur de processivité pouvait se charger tout seul sur l'ADN (Rouillon *et al.*, 2007).

Sachant que le RF-C, au même titre que la plupart des protéines interagissant avec le PCNA, possède à son extrémité C-terminale un motif PIP box, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une compétition entre les ADN polymérases et le RF-C, vis-à-vis du PCNA. Il est intéressant de noter que la configuration du RF-C, chez les Archaea, est particulière, du fait que le motif PIP box est relié au reste de la structure primaire de la grande sous-unité par un bras flexible composé de plusieurs dizaines de résidus chargés. Par ailleurs, de nombreux travaux nous permettent de suggérer que plusieurs types de protéines pourraient se fixer simultanément sur le PCNA. Ceci nous amène à penser que des compétitions pourraient avoir lieu entre les différents partenaires du PCNA, lors des phases de la réplication de l'ADN. Ces observations soulèvent des questions chez les Archaea, non seulement sur le comportement du RF-C lors de la synthèse d'ADN et lors des phases de chargement du PCNA sur l'ADN, mais également sur le rôle du motif PIP box.

Nous avons ainsi étudié le comportement du RF-C lors de la synthèse d'ADN par les ADN polymérases B et D, sauvages ou mutées (Δpip), en présence ou en absence de PCNA. Ensuite, nous nous sommes focalisés sur la liaison à l'ADN du complexe de l'ADN polymérase D avec ses deux facteurs accessoires. Enfin, nous avons étudié de manière plus fine la fonction principale du RF-C, c'est-à-dire le chargement du PCNA sur l'ADN. En parallèle, les travaux se sont portés sur l'expression du RF-C dépourvu de son motif PIP box, avec pour principal but d'étudier le rôle de ce motif durant la synthèse d'ADN et durant les phases de chargement/déchargement du PCNA sur l'ADN.

Même si l'approche décrite dans ce chapitre nous permet de souligner le comportement du complexe tripartite, composé de l'ADN polymérase et de ses deux facteurs accessoires, cette étude reste encore préliminaire et demande à être améliorée à l'avenir.

II. Résultats

II.1. Effets du RF-C sur l'extension d'amorce des ADN polymérase D et B sauvages et Δ pip

Tout d'abord, l'influence de la quantité de RF-C a été testée sur les Pol D sauvage et Δ pip, lors d'un test d'extension d'amorce (Figure 25A). Le RF-C seul n'a pas d'effet sur la Pol D (Figure 25A, piste 3). Par contre, la stimulation de la Pol D par le PCNA est inhibée en présence du RF-C, uniquement pour un rapport RF-C/Pol supérieur à 2 (Figure 25B, pistes 4 à 7). Le RF-C seul n'a pas non plus d'effet sur la Pol D Δ pip (Figure 25, piste 10). En revanche, son activité de synthèse d'ADN semble freinée en présence du PCNA, pour toutes les concentrations en RF-C (Figure 25B, pistes 11 à 12). Pour des rapports RF-C/Pol supérieur à 2, la synthèse d'ADN est totalement supprimée (Figure 25A, pistes 13 et 14).

L'influence du RF-C a également été testée selon le moment d'incubation du RF-C au cours de la réaction, en se plaçant dans un rapport RF-C/PCNA/Pol de 2 : 1 : 1 (Figure 25B). Le RF-C a été ajouté au milieu réactionnel, soit en même temps que l'ADN polymérase, soit 10 min, 17 min ou 25 min après le départ de la réaction de synthèse d'ADN. Le RF-C inhibe légèrement la stimulation de la Pol D par le PCNA, quelque soit le moment d'incubation (Figure 25B, pistes 4 à 7). En revanche, le complexe Pol D Δ pip/PCNA est totalement inhibé lorsque le RF-C est ajouté au même moment (Figure 25B, piste 11). De plus, cette inhibition est d'autant plus faible que le RF-C est ajouté tardivement. Ainsi le complexe Pol D Δ pip/PCNA pourrait être déstabilisé par le facteur de chargement, contrairement à celui formé entre la Pol D et le PCNA. Cela suggère que le motif PIP box C-terminal de l'ADN polymérase D empêche la liaison du RF-C sur le PCNA, par son motif PIP box.

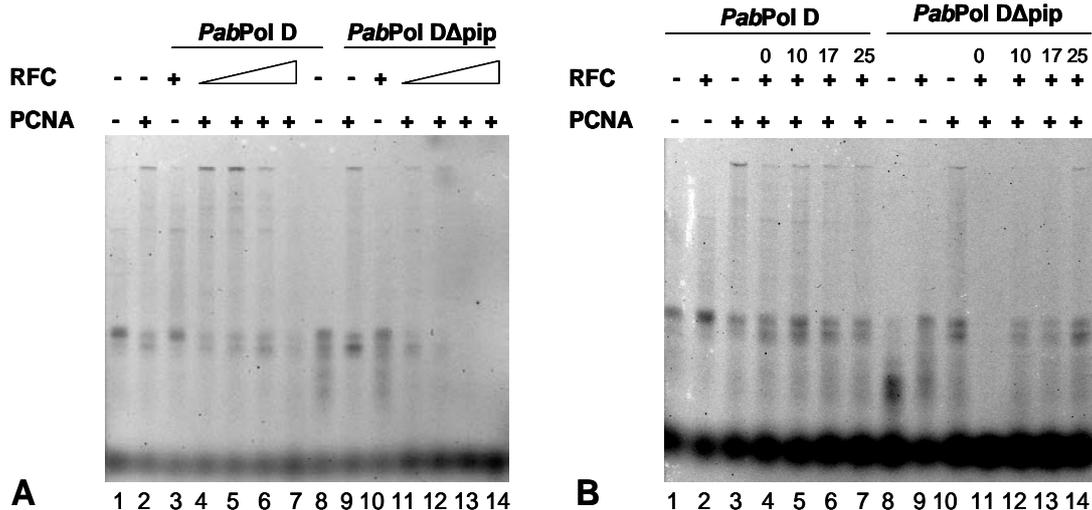


Figure 25 : Extension d'amorce par *PabPol D* et *PabPol DΔpip* et en présence ou non de PCNA et de RF-C. Gel dénaturant agarose alcalin à 1%. La matrice est le M13mp18(+) amorcé par un fragment M13cut32FAM marqué en 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 30 min. Pour chaque réaction, la Pol D et la Pol DΔpip ont été utilisées respectivement à 1 et 2 pmol, et le PCNA a été utilisé pour un rapport PCNA/Pol égal à 1. A) le RF-C a été utilisé pour un rapport RF-C/Pol égal à 1/2, 1, 2 ou 4, symbolisé par le triangle. B) le RF-C été utilisé pour un rapport RF-C/Pol égal à 2, et a été ajouté à 10, 17 ou 25 min après le début de l'incubation avec l'ADN polymérase.

Ces tests ont également été réalisés, dans les mêmes conditions, avec la Pol B et la Pol BΔpip (données non montrées). Néanmoins, aucun effet du RF-C n'a été observé. La Pol B est toujours stimulée par le PCNA en présence du RF-C. La Pol BΔpip n'est pas stimulée par le PCNA, et l'ajout de RF-C ne modifie pas son comportement.

Nous avons étudié l'influence de l'ATP sur la synthèse d'ADN par le complexe PCNA/Pol D sauvage ou Δpip, en présence du RF-C (Figure 26A et B). Le mélange réactionnel a été incubé à 60°C pendant 30 min. Le RF-C a été ajouté 5 min avant le début de la réaction, en même temps que les autres enzymes, ou 5 min après le départ de la réaction. En présence d'ATP, le RF-C seul n'a aucun effet sur l'activité de synthèse d'ADN par la Pol D (Figure 26A, piste 5). Par contre, la stimulation de la Pol D par le PCNA (Figure 26A, piste 4) est très légèrement inhibée en présence du RF-C, lorsqu'il est ajouté, soit au même moment, soit 5 min après le début de réaction (Figure 26A, pistes 7 et 8). La Pol DΔpip est stimulée par le PCNA mais pas par le RF-C (Figure 26A, respectivement pistes 10 et 11). En revanche, elle est partiellement inhibée lorsqu'elle est incubée en présence du PCNA et du RF-C quelque soit le moment d'incubation de ce dernier (Figure 26A, pistes 12 à 14). En absence d'ATP, la synthèse d'ADN par la Pol D est d'autant plus inhibée par le RF-C que celui-ci est ajouté tardivement (Figure 26B, pistes 6 à 8). L'activité de synthèse du complexe Pol DΔpip/PCNA est, quant à elle, totalement inhibée en présence de RF-C (Figure 26B, pistes 12 à 14).

Cette étude a également été réalisée avec l'ADN polymérase B sauvage et Δ pip, avec ou sans ATP (Figure 26C et D). En présence d'ATP, le RF-C seul n'influence pas l'activité d'extension d'amorce de l'ADN polymérase B sauvage ou Δ pip (Figure 26C, pistes 5 et 11). De plus, la stimulation de la Pol B par le PCNA (piste 4) n'est pas influencée par le RF-C, quelque soit le moment d'addition de celui-ci (Figure 26C, pistes 6 à 8). Il en est de même pour la Pol B Δ pip qui n'est pas stimulée par le PCNA (piste 10) et dont l'activité polymérasique n'est ni stimulée, ni inhibée en présence du RF-C (Figure 26C, pistes 12 à 14). Ces résultats sont identiques en absence d'ATP (Figure 26D). Cela suggère qu'il n'y a pas de compétition entre le motif PIP box de la Pol B et celui du RF-C au niveau du PCNA.

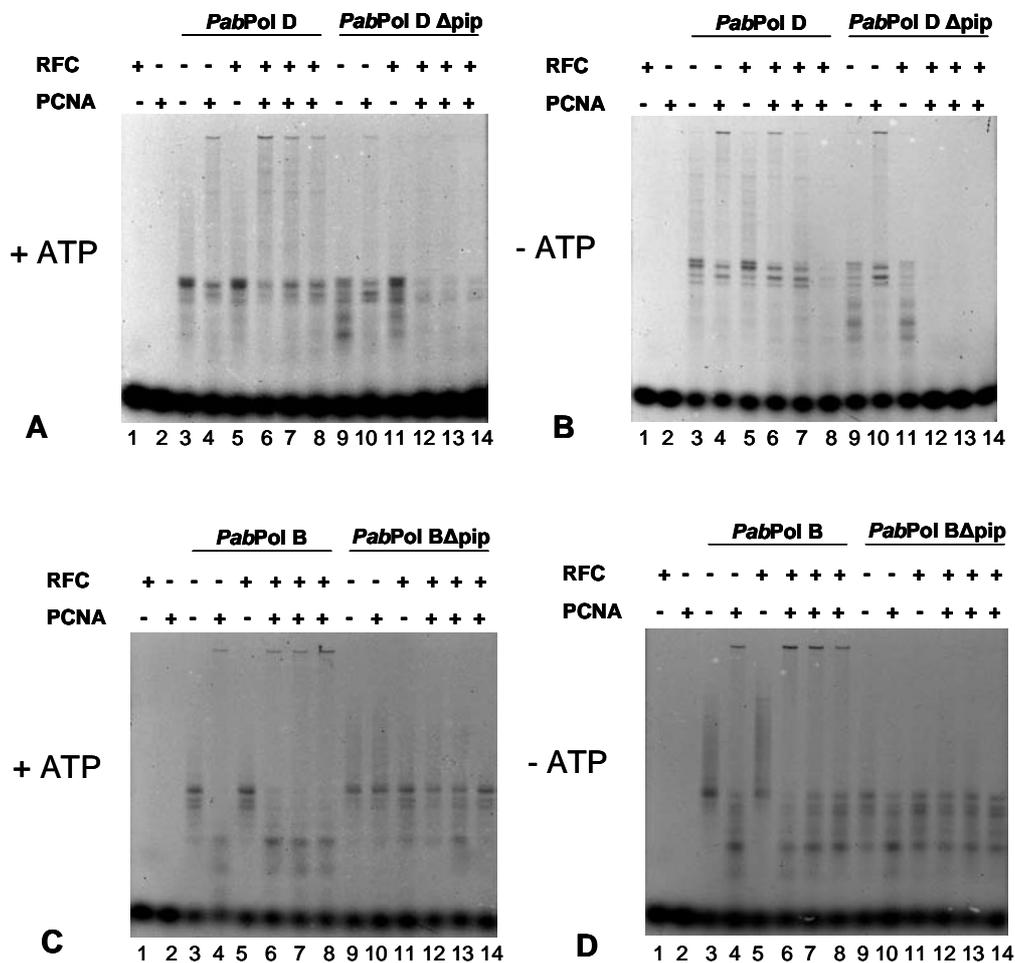


Figure 26 : Extension d'amorce, par *PabPol D* et *PabPol D* Δ pip et *PabPol B* et *PabPol B* Δ pip, en présence ou non de PCNA et de RF-C et d'ATP.

Gel dénaturant agarose alcalin à 1%. La matrice est le M13mp18(+) amorcé par un fragment M13cut32FAM marqué en 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 30 min. La Pol D et la Pol D Δ pip ont été utilisées respectivement à 1 et 2 pmol (A et B). La Pol B et la Pol B Δ pip ont été utilisées respectivement à 0,04 et 0,02 pmol (C et D). Pour chaque réaction, le PCNA a été utilisé pour un rapport PCNA/Pol égal à 1. Le RF-C été utilisé pour un rapport RF-C/Pol égal à 2 et a été ajouté soit 5min avant l'ajout de l'ADN polymérase (puits 7 et 12), soit en même temps (puits 8 et 13), soit 5 min après en présence de 0,5 mM d'ATP. Les réactions ont été réalisées de la même façon mais sans ATP.

II.2. Etude des interactions physiques, en présence d'ADN, entre le PCNA, le RF-C et les ADN polymérases D sauvage et Δ pip

Nous avons ensuite étudié la capacité de liaison à l'ADN du complexe formé entre le RF-C, le PCNA et l'ADN polymérase D sauvage ou Δ pip, en présence du même ADN amorcé (Figure 27).

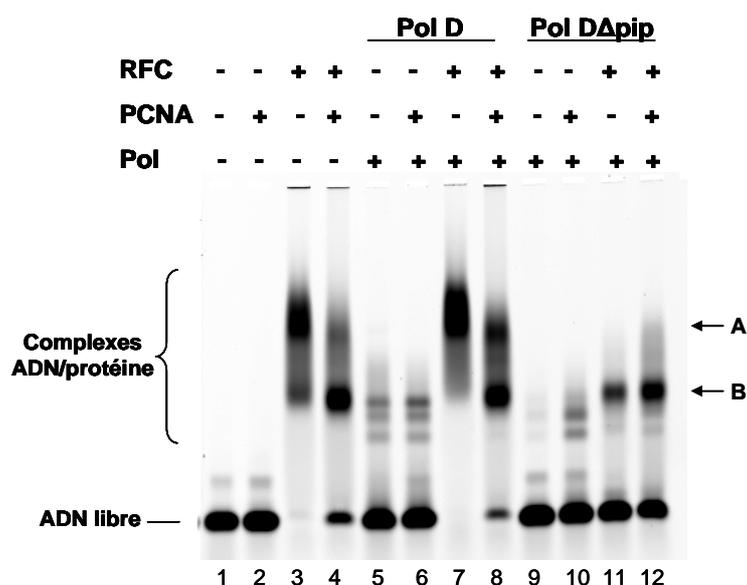


Figure 27 : Retard sur gel des différents complexes formés par le RF-C, le PCNA et la Pol D et la Pol D Δ pip sur l'ADN.

Pour chaque réaction, 2,5 pmol d'ADN ont été incubés en présence des protéines, ajoutées à une quantité de 10 pmol. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 10 min. L'ADN est l'oligo L87 amorcé par l'oligo M13cut32 marqué à la fluorescéine en 5'.

Alors qu'aucun complexe n'est visible en présence du PCNA et de l'ADN (Figure 27, piste 2), le RF-C forme deux types de complexes avec l'ADN (Figure 27, piste 3). Ces deux complexes, dénommés A et B, varient d'intensité en présence du PCNA et/ ou de la Pol D. En présence de RF-C, le complexe B devient dominant en présence du PCNA (Figure 27, piste 4). La présence de Pol D ne modifie pas la nature de ces complexes, mais leurs intensités respectives (Figure 27, pistes 7 et 8). La Pol D semble former un complexe indépendant de la présence du PCNA (Figure 27, pistes 5 et 6). Par contre, le PCNA semble avoir une influence sur le complexe formé par la Pol D Δ pip (Figure 27, pistes 9 et 10). De plus, alors que les complexes formés par le RF-C s'intensifient en présence de la Pol D, seul subsiste le complexe B en présence de la Pol D Δ pip, avec ou sans PCNA (Figure 27, pistes 11 et 12), suggérant que le RF-C n'est plus présent. Lorsque l'ADN polymérase est dépourvue de son extrémité C-terminale, la compétition entre le RF-C et la Pol D, vis-à-vis du PCNA, pourrait

être d'autant plus forte. Ce travail ne nous permet pas de déterminer avec certitude la nature des différents complexes ; par conséquent, nous ne pouvons déduire l'influence du RF-C sur le complexe PCNA/Pol fixé sur l'ADN par la technique d'EMSA (Electrophoresis Mobility-Shift Assay).

II.3. Extension d'amorce des ADN polymérase D sauvage et Δpip , en présence du PCNA et du RF-C sauvage ou Δpip

Nous avons ensuite étudié l'influence du motif PIP box du RF-C sur le complexe PCNA/Pol D sauvage ou Δpip , lors de la synthèse d'ADN (Figure 28). Le RF-C dépourvu de son extrémité C-terminale (RF-C Δpip) a été ajouté en même temps que le RF-C sauvage, lors d'un test d'extension d'amorce effectué par *PabPol D* et *PabPol D Δpip* , en présence ou non de PCNA. Le mélange réactionnel a été incubé à 60°C pendant 30 min. Nous nous sommes placés dans des conditions où l'effet inhibiteur du RF-C apparaissait fortement pour les deux ADN polymérase, i.e., en absence d'ATP et avec ajout du RF-C au départ de la réaction. Le RF-C et le RF-C Δpip seuls n'ont aucun effet sur l'activité de synthèse d'ADN de la Pol D, en absence de PCNA (Figure 28, pistes 3 et 4).

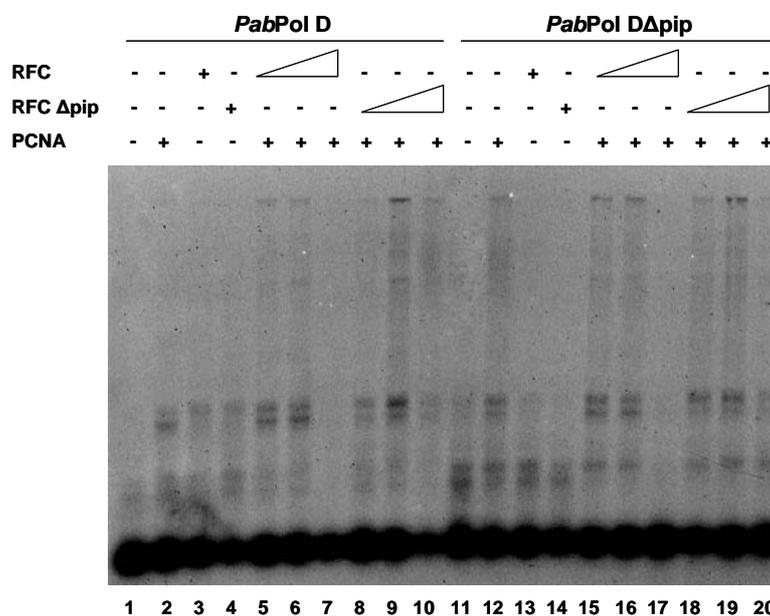


Figure 28 : Extension d'amorce par la Pol D et la Pol D Δpip en présence ou non de RF-C ou de RF-C Δpip . Gel dénaturant agarose alcalin à 1%. La matrice est le M13mp18(+) amorcé au fragment M13cut32FAM marqué à l'extrémité 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 30 min. La Pol D et la Pol D Δpip ont été utilisées respectivement à 0,6 et 0,7 pmol. Le PCNA a été utilisé pour un rapport PCNA/Pol égal à 1. Le RF-C et le RF-C Δpip ont été utilisés pour un rapport RF-C/Pol égal à 1, 2 ou 3, symbolisé par un triangle, et ont été ajoutés en même temps que l'ADN polymérase.

Par ailleurs, alors que le RF-C, pour un rapport RF-C/Pol D de 3 : 1, inhibe fortement la synthèse d'ADN en présence du PCNA (Figure 28, piste 7), le RF-C Δ pip n'a aucune influence sur cette activité (Figure 28, pistes 8 à 10). En outre, la Pol D Δ pip seule n'est ni stimulée, ni inhibée par les RF-C sauvage et Δ pip (Figure 28, pistes 13 et 14). En revanche, elle est totalement inhibée lorsqu'elle est incubée en présence du PCNA et du RF-C pour un rapport 3 : 1 (Figure 28, piste 17). En présence de RF-C Δ pip, la synthèse d'ADN de la Pol D Δ pip est légèrement stimulée pour un rapport 2 : 1 mais n'est pas inhibée quelque soit la concentration en RF-C Δ pip (Figure 28, pistes 18 à 20). Ce résultat indiquerait que l'inhibition l'activité de la Pol D sauvage ou Δ pip, est liée au motif PIP box du RF-C. De plus, nous pouvons suggérer qu'il existe une compétition entre les motifs PIP box du RF-C et de la Pol D vis-à-vis du PCNA lors de la synthèse d'ADN. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que le motif PIP box C-terminal de la Pol D a une affinité plus élevée pour le PCNA que le motif PIP box du RF-C.

II.4. Etude du chargement du PCNA sur l'ADN, en présence du RF-C ou du RF-C Δ pip

Le chargement du PCNA sur l'ADN a été étudié par la méthode de cross-linking, en présence ou en absence du RF-C sauvage ou du RF-C Δ pip. Le PCNA est marqué au TMR ce qui permet de visualiser les complexes comportant le facteur de processivité. L'ADN étant marqué au Cy5, une visualisation grâce à ce fluorophore est effectuée en parallèle pour confirmer la présence d'ADN (données non montrées). Tout d'abord, l'étude du chargement a été réalisée en absence d'ATP (Figure 29A). Le chargement du PCNA a ensuite été étudié par analyse quantitative des bandes correspondant au PCNA (Figure 29B).

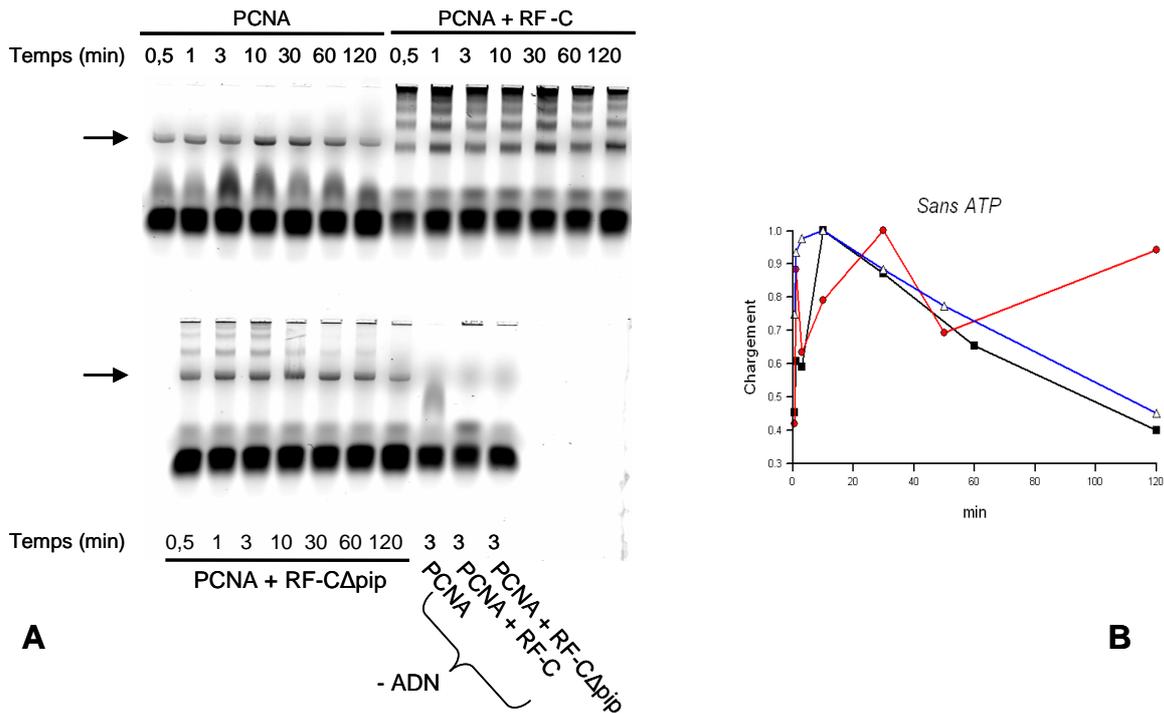


Figure 29 : Chargement du PCNA sur l'ADN, en présence ou en absence du RF-C sauvage ou du RF-C Δ pip, et en absence d'ATP.

A) La matrice est le M13mp18(+) amorcé au fragment M13cut32FAM marqué à l'extrémité 5' au Cy5. Les différentes protéines ont été utilisées à 2,4 pmol. Le PCNA était marqué au TMR. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 45°C entre 0,5 à 120 min. Les produits de réaction ont été visualisés à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400. B) Etude quantitative du chargement du PCNA sur l'ADN. La mesure du chargement d'un PCNA a été réalisée à l'aide du logiciel PicoQuant par rapport à la bande correspondant au PCNA à l'intensité maximale (flèche noire). La courbe noire représente le chargement du PCNA seul, la courbe rouge représente le chargement du PCNA en présence de RF-C et la courbe bleue représente le chargement du PCNA en présence du RF-C Δ pip.

Le PCNA se charge sur l'ADN plus rapidement en présence du RF-C ou du RF-C Δ pip. En revanche, alors que le PCNA se décharge de façon similaire en absence du RF-C ou en présence du RF-C Δ pip, le PCNA reste chargé sur l'ADN en présence du RF-C.

L'étude du chargement du PCNA sur l'ADN a ensuite été réalisée dans les mêmes conditions décrites précédemment, mais en présence d'ATP (Figure 30A). Une analyse quantitative des bandes correspondant au PCNA a également été effectuée (Figure 30B).

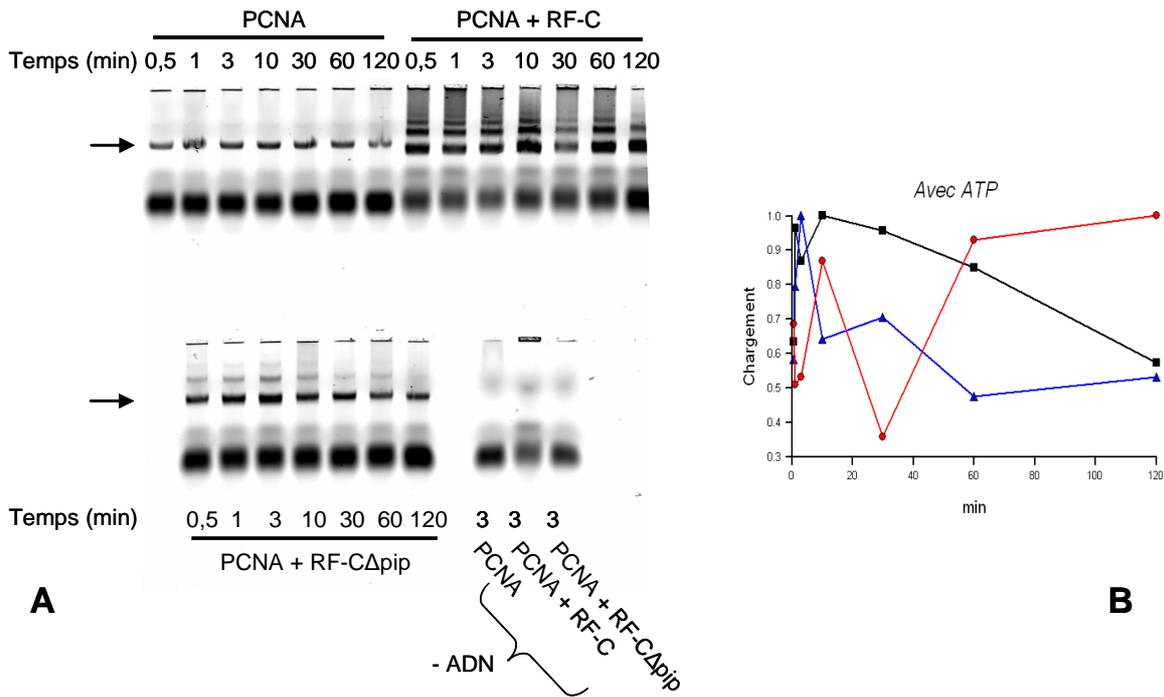


Figure 30 : Chargement du PCNA sur l'ADN en présence ou en absence du RF-C sauvage ou du RF-C Δ pip, et en présence d'ATP.

A) La matrice est le M13mp18(+) amorcé au fragment M13cut32FAM marqué à l'extrémité 5' au Cy5. Les différentes protéines ont été utilisées à 2,4 pmol. Le PCNA était marqué au TMR. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 45°C de 0,5 à 120 min. Les produits de réaction ont été visualisés à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400. B) Etude quantitative du chargement du PCNA sur l'ADN. La mesure du chargement du PCNA a été réalisée à l'aide du logiciel PicoQuant par rapport à la bande correspondant à l'intensité maximale (flèche noire). La courbe noire représente le chargement du PCNA seul, la courbe rouge représente le chargement du PCNA en présence de RF-C et la courbe bleue représente le chargement du PCNA en présence de RF-C Δ pip.

Dans ce cas, le PCNA semble s'auto-charger sur l'ADN plus rapidement que lorsqu'il est complexé au RF-C. En revanche, alors que le PCNA seul se décharge lentement de l'ADN, il en est déchargé rapidement en présence de RF-C Δ pip. Par contre, le RF-C stabilise le PCNA sur l'ADN.

III. Discussion

L'ajout de RF-C, en excès molaire, lors de l'activité d'extension d'amorce des différentes ADN polymérases, provoque une inhibition des ADN polymérases D sauvage et mutée Δ pip, en présence du PCNA. A l'inverse, la Pol B est toujours stimulée par le PCNA, en présence du RF-C en excès molaire. En outre, en absence de PCNA, le RF-C n'a aucun effet sur les ADN polymérases D sauvage et Δ pip. L'inhibition par le RF-C est donc PCNA-dépendante. De plus, cette inhibition est plus forte en présence d'ATP ; elle serait donc également dépendante de l'hydrolyse de l'ATP. Il a été montré, chez *P. furiosus*, que le

peptide correspondant au motif PIP box de la grande sous-unité du RF-C interagissait spécifiquement au niveau de l'extrémité C-terminale du PCNA (Matsumiya *et al.*, 2002). Nous avons démontré que le C-terminus était également le siège des interactions entre *PabPol D* et le PCNA (cf. chapitre 1). Ainsi, l'inhibition de la synthèse d'ADN pourrait s'expliquer par une compétition vis-à-vis du PCNA, entre le RF-C et l'ADN polymérase, au niveau du même site de liaison sur le PCNA, c'est-à-dire l'extrémité C-terminale.

Des études ont suggéré que le PCNA était plus rigide quand il se liait au peptide PIP box du RF-C d'Archaea (Matsumiya *et al.*, 2002). Cependant, selon les mêmes auteurs, le RF-C Δ pip se lie toujours au PCNA, montrant ainsi que le motif PIP box de la grande sous-unité du RF-C n'est pas essentiel pour cette liaison. Par ailleurs, des études structurales, chez *P. furiosus*, ont montré que le PCNA et le RF-C interagissaient au niveau d'une interface importante (Miyata *et al.*, 2005), suggérant que des régions autres que le C-terminus chez le RF-C sont impliquées dans la liaison au PCNA. Cela rejoint la situation observée chez l'eucaryote, où aucun motif PIP box n'est présent et où plusieurs modes d'interaction au PCNA ont été démontrés. En effet, en plus des dimères RFC2/3 et RF-C3/4, la sous-unité RF-C1 pourrait interagir seule avec le facteur de processivité, grâce à deux résidus hydrophobes (Yao *et al.*, 2003). Ainsi, comme le montre notre étude, le motif PIP box du RF-C semble ne pas servir pour le chargement du PCNA sur l'ADN. Nous avons également montré que le RF-C Δ pip n'inhibait pas la synthèse d'ADN des ADN polymérase D sauvage et Δ pip, suggérant que l'effet d'inhibiteur du RF-C était dû à son motif PIP box C-terminal sur la grande sous-unité. Il a déjà été suggéré chez les bactéries, que le complexe γ pourrait être également un facteur de déchargement afin de commencer une nouvelle synthèse d'ADN (Yao *et al.*, 1996). Durant notre étude, un équilibre entre chargement et déchargement a été observé avec le RF-C sauvage particulièrement en présence d'ATP. En outre, nous avons montré que le déchargement du PCNA de l'ADN était lié à l'absence du motif PIP box du RF-C. Ainsi, le RF-C semble stabiliser le PCNA sur l'ADN *via* son motif PIP box, confirmant le fait que le RF-C pourrait former un complexe très stable avec le PCNA, sur l'ADN. Ceci suggère un équilibre entre le chargement et le déchargement du PCNA par le RF-C. Cette étude en présence d'ATP γ S, analogue non hydrolysable de l'ATP doit également être réalisée, ce qui mettrait en valeur l'importance de l'hydrolyse de l'ATP au cours de ce processus.

Par ailleurs, il a été montré que le motif PIP box du RF-C d'Archaea et la séquence qui le précède au niveau de l'extrémité C-terminale, pouvaient synergiquement contribuer à la formation d'un complexe tripartite RF-C/PCNA/ADN très stable (Nishida *et al.*, 2005a). Le bras connecteur du motif PIP box de la grande sous-unité du RF-C est un domaine non

structuré, dû à une alternance de résidus acides et basiques. Ainsi, nous pouvons penser que cette séquence pourrait être un linker qui place le motif PIP box dans une position très accessible au PCNA chargé. *In vitro*, ceci amène à une inhibition de la synthèse d'ADN du fait d'une compétition entre les motifs PIP box des ADN polymérase et du RF-C.

Il a été montré, dans notre laboratoire, que le RF-C de *P. abyssi* avait une structure très flexible pouvant passer d'un pentamère à un hexamère, selon les conditions. Nous proposons donc, qu'après avoir chargé le PCNA (de manière ATP-indépendante), l'hydrolyse de l'ATP provoque un changement conformationnel du RF-C, ce qui en fait un linker entre le brin avancé et le brin retardé de l'ADN (Figure 31).

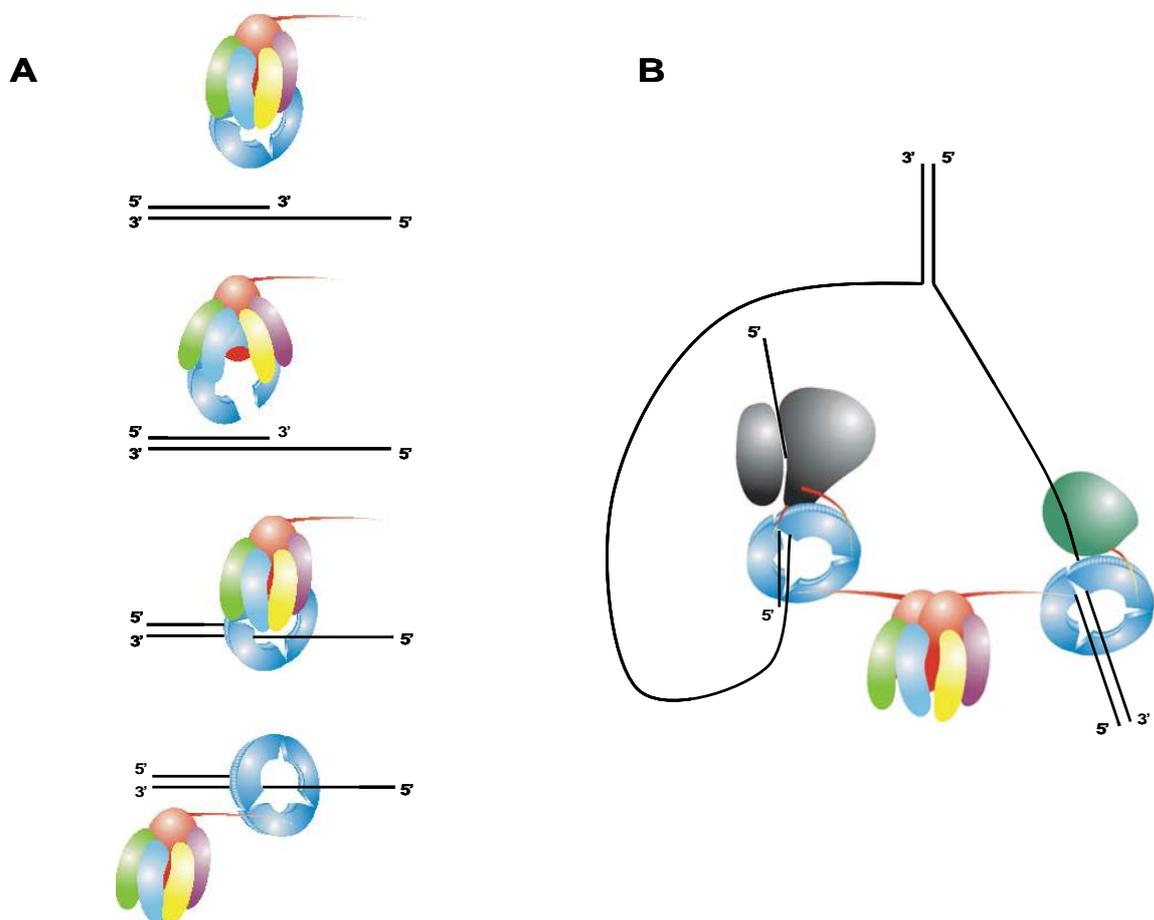


Figure 31 : Schéma hypothétique du chargement du RF-C. A, Le RF-C interagit avec le PCNA, ouvre la structure trimérique de ce dernier avant de le charger sur l'ADN (Rouillon *et al.*, 2007). Enfin, le RF-C maintient le PCNA sur l'ADN, grâce à son motif PIP box (cf. chapitre 2). B, le RF-C change de conformation et devient hexamérique (Jean-Paul Raffin, communication personnelle). Grâce à ses deux motifs PIP box, le RF-C est lié aux PCNA engagés dans l'élongation du brin avancé (*PabPol B*) et du brin retardé (*PabPol D*).

IV. Conclusion et perspectives

Ces travaux préliminaires ne nous ont pas permis de définir plus clairement le rôle du motif PIP box du RF-C. Néanmoins, le RF-C interagirait avec le PCNA chargé sur l'ADN, *via* son motif PIP box. Lorsque le facteur de chargement est en excès molaire, il peut former un complexe très stable avec le PCNA, sur l'ADN, qui bloquerait la synthèse d'ADN par *PabPol D*. Néanmoins, il faut incontestablement poursuivre les travaux en cross-linking afin de s'assurer du rôle exact du motif PIP lors des différentes phases de chargement et de déchargement du PCNA sur l'ADN. L'étude de l'activité ATPasique pourrait également compléter ces résultats. Aussi, au même titre que les travaux réalisés sur les motifs PIP box des ADN polymérase (cf. chapitre 1), l'utilisation d'un peptide compétiteur correspondant à la structure primaire du motif PIP box du RF-C sera utile pour compléter plus finement notre approche.

De plus, il a été suggéré que le RF-C et l'ADN polymérase D partagent le même site d'interaction au niveau de la poche hydrophobe du PCNA. Toutefois, une étude sur les interactions fonctionnelle et physique entre le RF-C et les PCNA mutés (cf. chapitre 1) devra être menée afin de confirmer cette hypothèse. Aussi, l'interaction physique entre le PCNA et le RF-C Δ pip reste à démontrer.

Ces travaux ont été réalisés avant que le motif situé en N-terminus de la grande sous-unité de la Pol D ne soit identifié. Ainsi, étant donné que l'effet inhibiteur est sans doute la conséquence d'une compétition entre différents motifs PIP box, au niveau du PCNA, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet du RF-C lors de l'extension d'amorce de la Pol DNcut.

Enfin, des travaux futurs pourraient se porter sur l'expression d'un RF-C dépourvu, non seulement du motif PIP box mais aussi du long bras permettant de relier le motif PIP box terminal à la chaîne polypeptidique.

Chapitre 3

Étude d'un motif riche en glycines de l'ADN
polymérase D de *Pyrococcus abyssi*

I. Introduction

Les ADN polymérasés de la famille D sont présentes dans tous les génomes séquencés des Euryarchaeota. Récemment, d'autres phyla représentatifs des Archaea, tels que *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ont été décrits (Elkins *et al.*, 2008). Alors que des caractérisations biochimiques ont permis de bien décrire les activités ADN polymérasique et exonucléasique de l'ADN polymérase D, peu de données sont disponibles sur le plan structural. Cette enzyme est composée d'une petite sous-unité (DP1) et d'une grande sous-unité (DP2).

Dans le cadre de la recherche de motifs d'interaction au PCNA, nous nous sommes focalisés sur un motif riche en glycines, décrit pour l'ADN polymérase δ comme étant important dans la liaison au PCNA (Zhang *et al.*, 1999). Depuis, ces résultats ont été contestés et d'autres motifs d'interaction au PCNA ont été localisés, notamment, au niveau de la petite sous-unité de la Pol δ (Lu *et al.*, 2002). Cependant, ce motif a été retrouvé dans toutes les ADN polymérasés D, dont *PabPol D*, et a été redéfini comme une séquence GX3GX6GX3PYF. Les trois glycines et la triade d'acides aminés, proline, tyrosine et phénylalanine, sont également retrouvées dans les ADN polymérasés δ des eucaryotes. Nous avons ainsi dénommé cette séquence le motif PYF box.

Afin d'élucider le rôle de ce motif au sein de l'ADN polymérase D, deux formes mutées au niveau de ce motif, ont été produites. Puis, nous avons étudié l'importance de ce motif dans les interactions avec le PCNA, sur les plans fonctionnel et structural. Les premiers résultats nous ont mené à nous intéresser aux implications du motif PYF box quant aux interactions fonctionnelles et physiques entre les deux sous-unités DP1 et DP2. Enfin, les travaux ont porté sur l'importance du motif PYF box sur la thermostabilité de *PabPol D*.

La publication présentée à la page suivante et intitulée : « The glycine-rich motif of *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase D is critical for protein stability » a été soumise à *Journal of Molecular Biology*. Elle présente la majorité des travaux réalisés sur le motif PYF box de *PabPol D*. Ici, cette étude est complétée par des travaux axés sur l'activité 3'→5' exonucléasique de l'ADN polymérase D.

Ces travaux nous ont permis d'apporter de nouvelles données sur les aspects structuraux et fonctionnels de l'ADN polymérase D des Euryarchaeota.

II. Article

The glycine-rich motif of *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase D is critical for protein stability

Benoît Castrec^{2,3}, Ghislaine Henneke^{2,3}, Didier Flament^{2,3} and Jean-Paul Raffin^{1,2}

Submitted at *Journal of Molecular Biology*

¹CNRS, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

²Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

³IFREMER, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie et Environnements Extrêmes, BP 70, F-29280 Plouzané, France.

Corresponding author: Jean-Paul RAFFIN, Ifremer, EEP/LM2E, B.P. 70, 29280 Plouzané, France; Tel.: +33 2 98 22 45 39; Fax: +33 2 98 22 47 57;
E-mail: jpraffin@ifremer.fr

Running title: *Pyrococcus* DNA polymerase D glycine-rich motif

Keywords: DNA replication; DNA polymerase D, PYF box; Archaea; thermostability

ABSTRACT

A glycine-rich motif described as being involved in human Pol δ PCNA binding has also been identified in all euryarchaeal DNA polymerase D. We redefined the motif as the PYF box. In the present study, DNA polymerase D PYF box motif mutants from *Pyrococcus abyssi* were generated to investigate its role in functional interactions with the cognate PCNA. We demonstrated that this motif is not essential for interactions between PabPol D and PCNA using surface plasmon resonance and primer-extension studies. Interestingly, the PYF box is located in a hydrophobic region close to the active site. The PYF box mutants exhibited altered DNA-binding properties. In addition, the thermal stability of all mutants was reduced compared to the wild-type, and this effect could be attributed to increased exposure of the hydrophobic region. These studies suggest that the PYF box motif mediates inter-subunit interactions and that it may be crucial for the thermostability of PabPol D.

Abbreviations used

Pab, *Pyrococcus abyssi*; *Pho*, *Pyrococcus horikoshii*; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PabPCNA, *Pyrococcus abyssi* PCNA; *PabPol B*, *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase B; *PabPol D*, *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase D; *PabPol Dmut1*, G934A and G941A mutations in the large subunit of PabPol D; *PabPol Dmut2*, G934A, G941A, Y946A, and F947A mutations in the large subunit of PabPol D; DTT, dithiothreitol; DP1, small subunit of Pol D; DP2, large subunit of Pol D; M13ssc, single-stranded circular M13mp18 DNA.

INTRODUCTION

The processivity of DNA polymerase has been conserved among prokaryotes and eukaryotes. A double or triple replicative DNA polymerase is recruited for DNA synthesis in *Escherichia coli* (DNA polymerase III),¹ whereas two replicases, DNA polymerases δ and ϵ , are found in eukaryotes. The picture is more confusing in Archaea because the spectra of DNA polymerases differ significantly between the Crenarchaea and Euryarchaea sub-domains. Crenarchaea possess two to three DNA polymerase B (Pol B) family members,²⁻⁴ whereas one Pol B and one DNA polymerase D (Pol D) family member are found in Euryarchaea.⁵⁻⁷

Recently, Pol D has also been detected in the genomes of *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*,⁸ *Nanoarchaeum equitans*,⁹ and *Cenarchaeum symbiosum*.¹⁰

During the last 10 years, some biochemical characterizations of Pol D have been published,^{7,11,12} but no structural information is yet available. Pol D is composed of two subunits, DP1 and DP2,⁵ and is described as a heterodimer,⁷ though some studies have shown that *Pho*Pol D can form a heterotetrameric structure containing two large subunits and two small subunits.¹² The small subunit, DP1, exhibits strong homology with the non-catalytic B-subunits of the eukaryotic DNA polymerases α , δ , and ϵ .¹³ This subunit harbors the 3'→5' exonuclease activity, and the large subunit, DP2, is the DNA polymerase subunit,¹¹ in which Asp1122 and Asp1124 have been identified as catalytic residues.¹² In addition, the 3'→5' exonuclease activity is regulated by the N-terminal extremity of DP1^{7,14} and stimulated by interaction with DP2.¹⁵ The interactions between the two subunits might also be essential for activity.⁶

The role of DNA polymerases acting at the euryarchaeal replication fork, and the functional interactions of these DNA polymerases with the processivity factor, has been studied. When more than one replicative DNA polymerase is present, questions about their involvement in leading and lagging strand synthesis are raised¹⁶⁻¹⁸, but Pol D is essential.¹⁹ In a previous study, we showed that *Pab*Pol D is capable of RNA primer elongation, making it a good candidate for the initiation of DNA synthesis at the leading and lagging strands.^{20,21} Also, on the leading strand, we proposed a DNA polymerase switch from Pol D to Pol B,²¹ suggesting that *Pab*Pol B and *Pab*Pol D cooperate to perform efficient and coordinated DNA synthesis.

PCNA stimulates Pol B and Pol D on a circular DNA template in the absence of the RF-C.² Also, PCNA interacts strongly with DP2 and weakly with DP1 in *Pyrococcus furiosus*,²² and the N-terminal region (1-200) of DP1 interacts with PCNA in *Pyrococcus horikoshii*.²³ The highly conserved PCNA interacting protein (PIP) box²⁴ is commonly described as a specific structural determinant of protein interactions with the sliding clamp. Nevertheless, the PIP box is not always sufficient to imply the requirement of additional structural elements; a region proximal to the core-conserved domain significantly contributes to the physical PCNA interaction.²⁵ Recent studies have also shown that PCNA binding of PIP box peptides is not only dependent on their structure, but also on their sequence.²⁶ Furthermore, in eukaryotes, the binding of DNA polymerase δ to PCNA has been shown to be mediated by a glycine-rich region (GX4GX8GX3YFY).²⁷

In this study, we focused on a glycine-rich motif of *Pab*Pol D that is similar to the motif in human DNA polymerase δ and its implication on PCNA-binding. Finally, we compared the

interactions between both subunits of wild-type and mutants. Our data suggest that this glycine-rich motif plays a role in the stability of *PabPol D*.

RESULTS

Another putative PCNA-binding motif in euryarchaeal DNA polymerases

Preliminary results for *PabPol D* showed that the terminal PIP box motif plays no significant role in its interactions with the cognate PCNA (Castrec *et al.*, manuscript submitted). Therefore, we looked for other putative PCNA-binding motifs in Pol D. We carefully inspected PCNA-binding motifs on Pol B and Pol D. First, we found that the glycine-rich motif identified²⁷ is present in the core of the large subunits of euryarchaeal Pol D and eukaryotic DNA polymerase δ (Figure 1a). We suggest calling this motif the PYF box because these three amino acids are highly conserved.

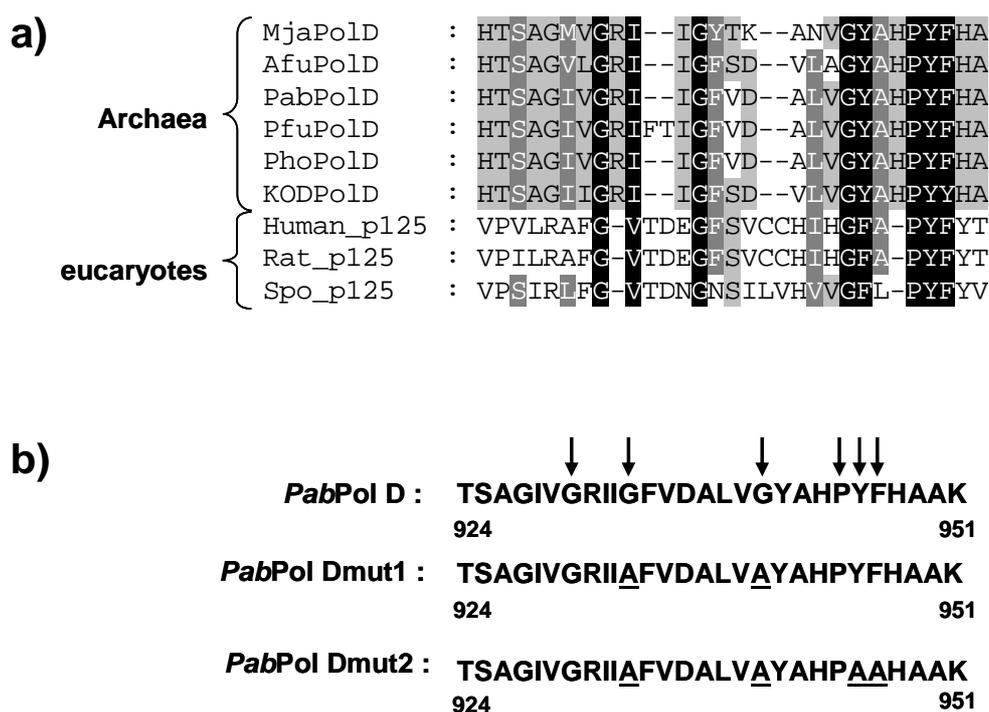


Figure 1. PYF-box, a conserved PCNA-binding motif in diverse archaeal and eukaryotic DNA polymerases. (a) Amino acid alignment of the PYF-box. For eucaryotes, the protein-protein interaction motif of the N2 region of the p125 subunit of Pol δ is shown. (b) Mutations performed in the PYF box motif of *PabPol D*. The amino acid residues of the PYF box are indicated by arrows. The amino acid residues that are substituted by alanine in *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* are underlined.

The PYF box does not favor physical and functional interactions between PabPol D and PabPCNA

The PYF box of *PabPol D* was mutated in two different ways, with the resulting proteins termed *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* (Figure 1b). The DNA-dependent interactions of the mutant proteins with *PabPCNA* were then investigated; their physical interactions were similar to that of *PabPol D* (Figure 2), suggesting that the PYF box is not essential for *PabPCNA* recognition.

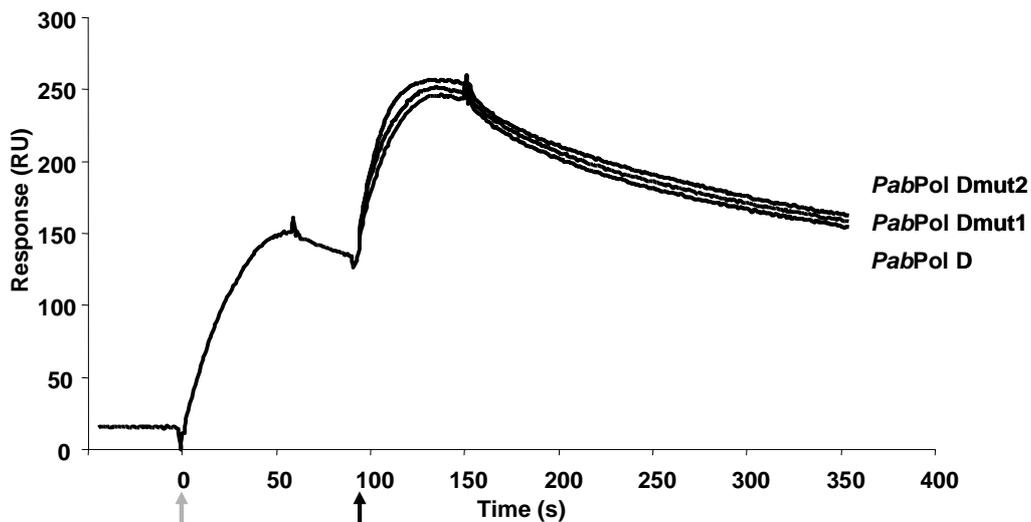


Figure 2. SPR measurements of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, or *PabPol Dmut2* interactions with *PabPCNA*. At time 0, *PabPCNA* was injected over the DNA surface, as indicated by the grey arrow, and *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, or *PabPol Dmut2*, as indicated by the black arrow. The background resulting from the injection buffer was subtracted from the data before plotting.

The functional interactions of the mutant proteins with *PabPCNA* were also investigated (Figure 3a). The addition of *PabPCNA* led to full-length products for the different ratios of *PabPCNA* and mutated or wild-type *PabPol D* tested (Figure 3a). The primer elongation activity of *PabPol D* in the presence of *PabPCNA* was also tested in the presence of the competitor peptide PYFD, corresponding to the primary structure of the PYF box (Figure 3b). Stimulation of full DNA synthesis by *PabPol D* was still observed in the presence of the peptide (Figure 3b, compare lanes 3 with 6 and 7), confirming that the functional interaction between *PabPol D* and *PabPCNA* is PYF box-independent. Definitely, the PYF box motif is not required for PCNA binding.

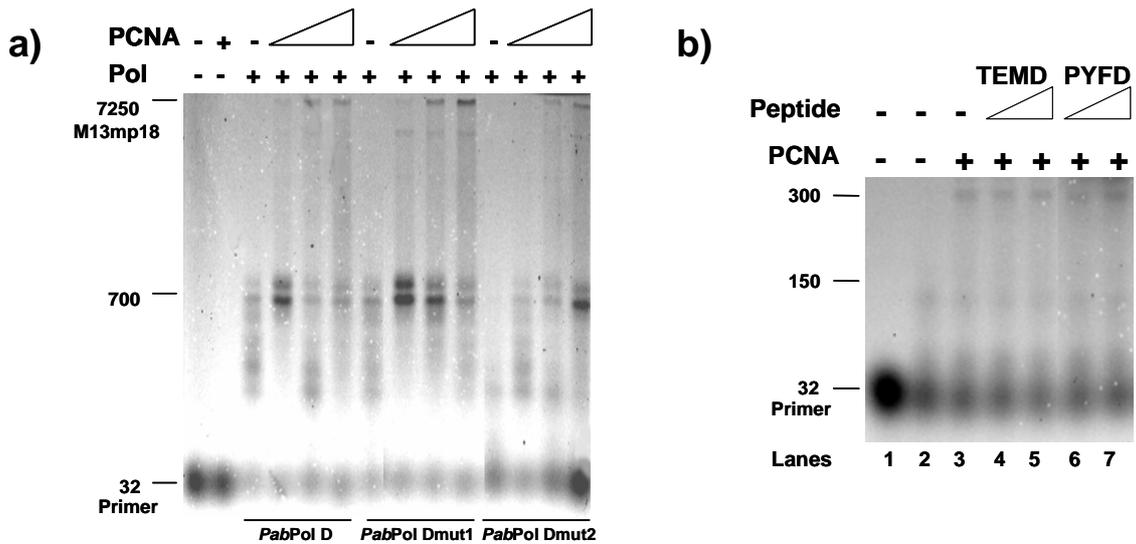


Figure 3 The PYF box of *PabPol D* is not required for functional interactions with *PabPCNA*.

(a) Primer extension studies were performed using M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer and containing 0.3 pmol of *PabPol D*, 0.6 pmol of *PabPol Dmut1*, or 0.3 pmol of *PabPol Dmut2*. *PabPCNA* was added at three different ratios - 1:1, 1:2, and 1:3. Reactions were incubated at 60°C for 30 min. Extended products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized on a Typhoon 9400 imager. (b) Functional interaction of *PabPol D* with *PabPCNA* in the presence of competitor peptides corresponding to the PYF box. The reactions contained 0.3 pmol of *PabPol D* and *PabPCNA* was added at an equimolar ratio. Peptides were added (30 μM and 100 μM) at the same time as *PabPol D*. TEMD was a control peptide corresponding to amino acids 83-103 of *PabPol D*; PYFD corresponded to the PYF box motif of *PabPol D*.

Wild-type and mutant *PabPol D* bind differently to DNA

In order to measure the DNA binding abilities of wild-type *PabPol D* and the *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* mutants, titrations were carried out in the presence of the same primed DNA (Figure 4). The amount of DNA-protein complex increased with higher amounts of *PabPol D* (Figure 4, lanes 2-4), and fewer complexes were observed depending on the concentration of *PabPol Dmut1* or *PabPol Dmut2* (Figure 4, lanes 5-10). These results show that the mutant proteins interact differently with DNA compared to wild-type Pol D, suggesting that the PYF box modulates DNA binding.

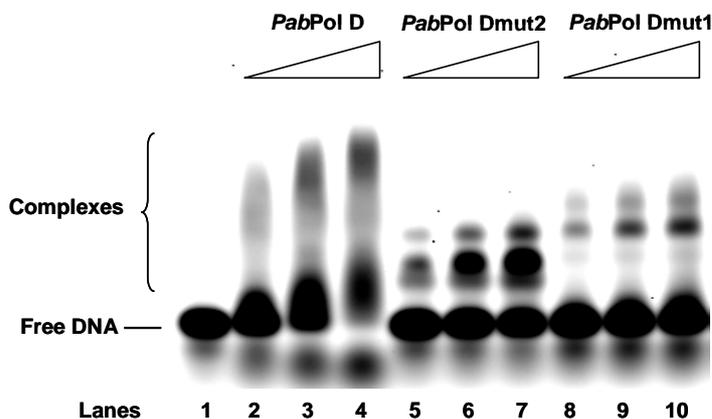


Figure 4. Gel shift reactions demonstrate that *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* bind DNA differently than wild-type *PabPol D*. The increasing amount of enzyme (5, 10, and 15 pmol) is symbolized by a triangle. The positions of free DNA and complexes are indicated on the left.

***PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* were not expressed in Rosetta cells**

Expression in small volumes provided some information about the stability of the DP1-DP2 complex (Figure 5). Wild-type *PabPol D* and the mutants *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* were expressed in either Rosetta or HMS 174 *E. coli* strains and analyzed by Western blot. The subunits DP1 and DP2 alone were co-expressed in HMS 174 but not Rosetta cells (Figure 5, lanes 1-4), whereas both subunits of wild-type Pol D were expressed in both cell types (Figure 5, lanes 5 and 6). We concluded that separate subunits were probably degraded in Rosetta cells. Moreover, because *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* complexes were not expressed in Rosetta cells, we hypothesized that protein degradation results from decreased DP1-DP2 interaction. No subunits were observed in pellets, discouraging a hypothesis of inclusion body formation (data not shown).

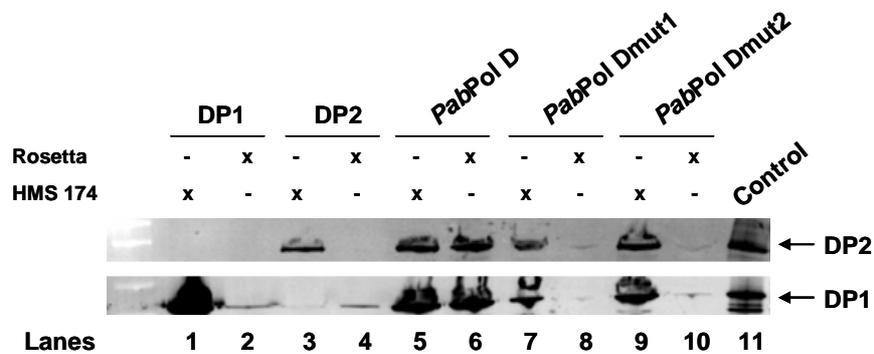


Figure 5. Expression of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, and *PabPol Dmut2* complexes or individual subunits. Proteins were expressed in 2 ml of LB medium. Western blotting was performed using specific antibodies for DP1 and DP2. The composition of wells was defined as follows (protein/*E. coli* strain): 1, DP1 of *PabPol D*/HMS174; 2, DP1 of *PabPol D*/ Rosetta; 3, DP2 of *PabPol D*/ HMS174; 4, DP2 of *PabPol D*/ Rosetta; 5, DP1+DP2 of *PabPol D*/ HMS174; 6, DP1+DP2 of *PabPol D*/ Rosetta; 7, DP1 + DP2 of *PabPol Dmut1*/HMS174; 8, DP1 + DP2 of *PabPol Dmut1*/ Rosetta; 9, DP1 + DP2 of *PabPol Dmut2*/ HMS174 ; 10, DP1 + DP2 of *PabPol Dmut2*/ Rosetta.

Physical and functional interaction between DP1 and DP2

His-tagged wild-type DP1 was produced and purified as described in “Experimental procedures”. DP2 of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, and *PabPol Dmut2* were expressed separately in the *E. coli* HMS 174 strain (50 ml). The interactions between both subunits were investigated by pull-down assays using DP1 as bait and immunoblotting for DP2 (Figure 6a). Physical interactions of the large DP2 and small DP1 subunits were similarly preserved in *PabPol D* and *PabPol Dmut1*. However, the interaction between DP1 and DP2 of *PabPol Dmut2* was weaker, suggesting that the PYF box may participate in inter-subunit interactions, even if it is not essential.

Next, wild-type DP1 and DP2 of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, and *PabPol Dmut2*, expressed separately in the *E. coli* HMS 174 strain, were mixed together and tested using primer extension assays (Figure 6b). DP1 and DP2 did not express primer extension activity alone (Figure 6b, lanes 2-5). The primer extension activity of DP1 mixed with DP2 of *PabPol Dmut1* was similar to that of wild-type DP2, but it was lower with DP2 from *PabPol Dmut2* (Figure 6b, lanes 6-8), suggesting that the *PabPol D* complex is less stable with mutations in the PYF box. In addition, we were not able to reconstitute the 3'→5' exonuclease activity under any conditions (data not shown).

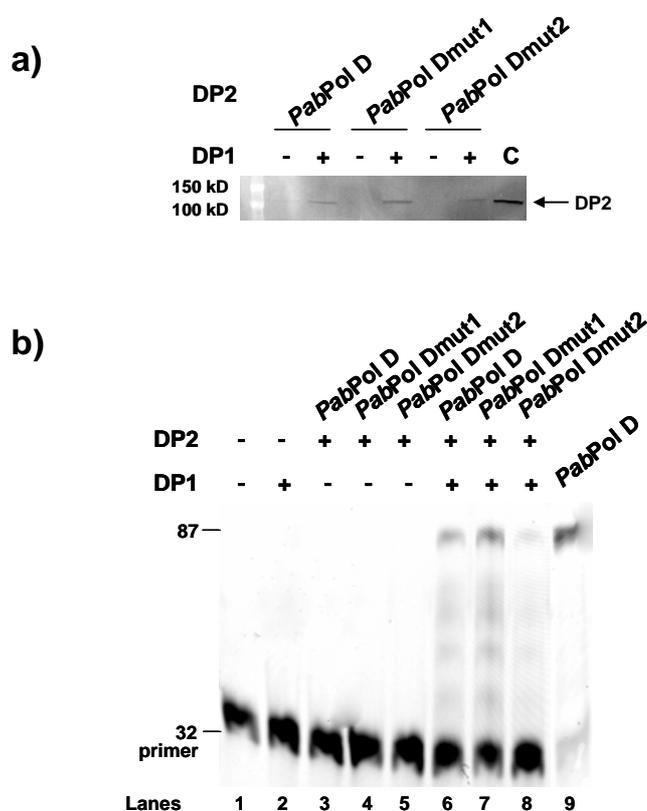


Figure 6. Physical and functional interactions between DP1 and DP2 of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, and *PabPol Dmut2*.

(a) Physical interactions tested by pull-down assays. His-tagged DP1 (10 pmol) was fixed to magnetic beads, and 10 pmol of DP2 from *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, and *PabPol Dmut2* was added in 200 μ l of binding and washing buffer. Proteins were eluted, loaded on SDS-PAGE, and the presence of DP2 determined by Western blot. C, Western blot control. (b) Primer extension assays of DP1 reconstituted in vitro with DP2 of *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, or *PabPol Dmut2*. Primer extension studies were performed with the 87-nt (30 fmol) template hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer and containing 6 pmol each of DP1 and DP2 from *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, or *PabPol Dmut2*. DP1 was added at the same time as DP2 and at an equimolar ratio. Lane 9, 0.4 pmol of *PabPol D*. Reactions were incubated at 60°C for 30 min, and products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized on a Typhoon 9400 imager.

The PYF box motif of *PabPol D* is involved in the thermal stability of the enzyme

Nile Red fluorescence

Nile Red fluorescence is sensitive to the polarity of its environment and can be used as a probe for the presence of hydrophobic regions in proteins.²⁸ As a consequence, Nile Red is regularly employed to probe changes in protein conformation and the exposure of hydrophobic surfaces.²⁹ The spectra of thermally treated *PabPol D* showed a very weak blue shift from 660 to 658, as well as a weak increase in fluorescence intensity (Figure 7a). Thus, wild-type Pol D appears to be thermally stable. On the contrary, the spectra of thermally treated samples of *PabPol Dmut1* showed a high blue shift from 660 to 646 and a high increase in fluorescence intensity (Figure 7b). Similarly, a blue shift from 656 to 643 was observed for *PabPol Dmut2*, which was progressive with temperature treatment (Figure 7c). These results suggest that higher heating results in more hydrophobic regions of *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* being exposed, contrary to what was observed for wild-type *PabPol D*. Thus, we hypothesized that the PYF box mutants conferred a lower thermal stability to *PabPol D*.

Primer extension assays

The primer extension activity of thermally treated *PabPol D* and PYF box mutants are shown in Figure 7d. Wild-type *PabPol D* was less active after heating to 100°C (Figure 7d, lanes 2-5), whereas *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* progressively lost their DNA polymerase activity from 80°C (Figure 7d, lanes 6-13). More precisely, after heating to 90°C, full-length products were less prevalent with *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2* (Figure 7d, lanes 8 and 12). After heating to 100°C, *PabPol Dmut1* elongated small products but *PabPol Dmut2* was inactive (Figure 7d, lanes 9 and 13). Thus, heating induced a decrease in the polymerase activity of the mutants compared to wild-type DNA polymerase D. This finding confirms that the PYF box motif of *PabPol D* is involved in the stability of the enzyme.

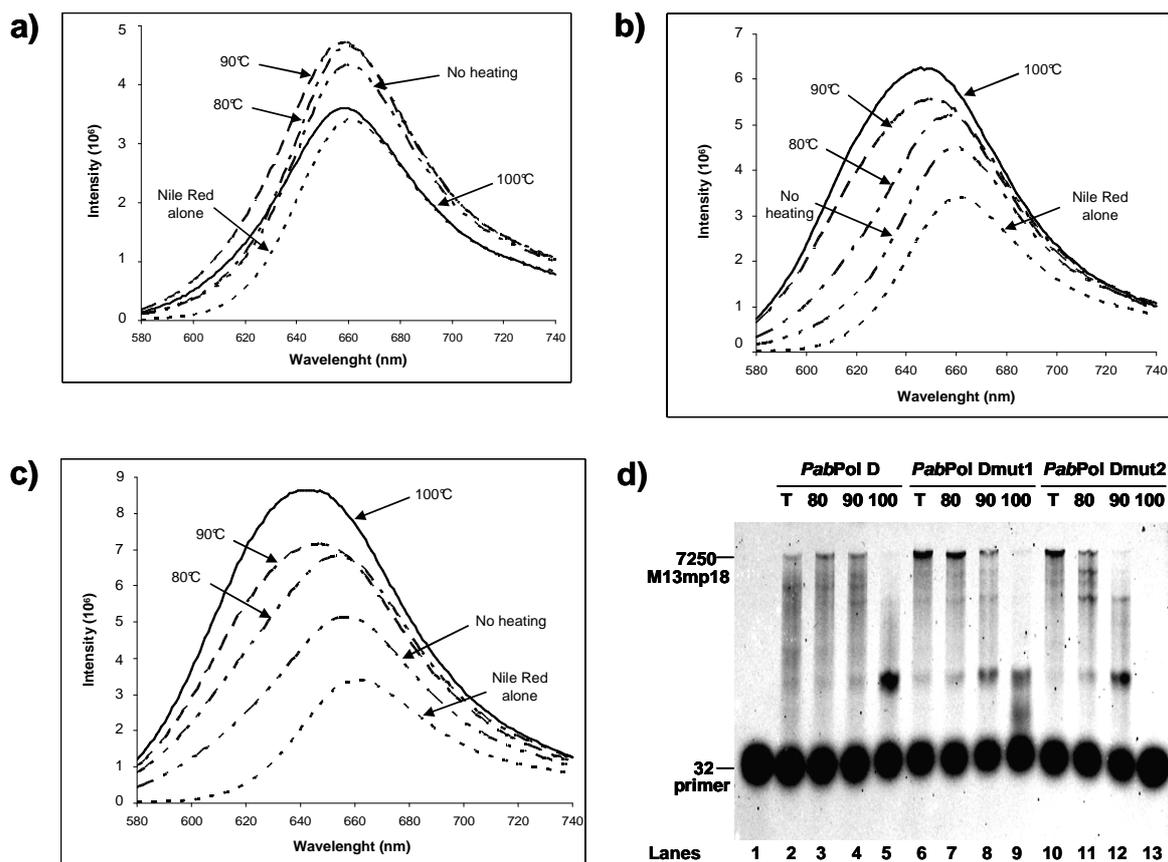


Figure 7. *PabPol* Dmut1 and *PabPol* Dmut2 are less thermally stable than wild-type *PabPol* D.

Nile Red fluorescence of *PabPol* D (a), *PabPol* Dmut1 (b), and *PabPol* Dmut2 (c). Enzymes were heated for 5 min and 48 pmol incubated with Nile Red. The excitation wavelength was 550 nm, and emission spectra were recorded in the range of 580-440 nm. The dotted line represents Nile Red alone. The double dot-dashed line represents unheated enzyme. The dot-dash line, dashed, and continuous lines represent enzyme heated at 80°C, 90°C, and 100°C, respectively. Intensity represents counts $\times 10^6$. (d) *PabPol* D, *PabPol* Dmut1, and *PabPol* Dmut2 polymerase activity after heating. The enzyme was heated for 5 min at 80°C, 90°C, or 100°C and 2 pmol incubated with M13mp18 template (90 fmol) hybridized to a 5'-fluorescein-labeled primer for primer extension studies. Reactions were performed at 60°C for 30 min, and products were resolved on denaturing alkaline 1% agarose gels and visualized on a Typhoon 9400 imager.

DISCUSSION

We investigated a motif that was previously shown to be involved in the direct interaction between PCNA and the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase δ .^{27,30} This motif is found in all euryarchaeal DNA polymerase D (Figure 1a) and in some p125 catalytic subunits of eukaryotic DNA polymerase δ . We proposed calling the motif the PYF box because of the occurrence of a conserved amino-acid triplet (Pro, Tyr, Phe).

In our study, *PabPol D* PYF box mutants retain stimulation by *PabPCNA*, suggesting that, at least in Archaea, the PYF box motif is not involved in the interaction with PCNA. We also characterized the role of this glycine-rich motif. Firstly, we showed that the two PYF box mutants, *PabPol Dmut1* and *PabPol Dmut2*, interact differently with DNA compared to wild-type *PabPol D*. This behavior can be explained by two points of view. On the one hand, most crenarchaeal Pol B3, euryarchaeal Pol B, and crenarchaeal Pol B1 possess a motif at their N-terminus that is partially related to the PYF box (data not shown). Interestingly, many studies have reported a sequence including this amino-acid triplet in the N-terminal domains of archaeal DNA polymerases that is clearly positioned at a region interacting with DNA.³¹ Indeed, the proline and tyrosine are highly conserved in the uracil binding pocket responsible for uracil recognition by the archaeal Pol B.^{32,33} However, the other residues defining the uracil pocket are not found in *PabPol D*. Also, we do not yet know if uracil detection activity is present in *PabPol D* as it is in Pol B. On the other hand, the PYF box motif is located in the vicinity of the two catalytic residues, D956 and D958.⁷ No influence of mutations in the PYF box motif on polymerase activity was observed. Thus, we can easily imagine that mutations in the PYF box motif involve a conformational change at the level of this sequence that does not affect the active site of Pol D.

Interestingly, in *P. horikoshii*, the domain (792-1163) of the large subunit of Pol D contains three hydrophobic regions.²³ As the primary structures of the DNA polymerases of *P. horikoshii* and *P. abyssi* are analogous, particularly at the level of the PYF box, the PYF box motif (927-947) belongs to one of the hydrophobic regions.

In order to determine the implication of the PYF box motif in inter-subunit stability, the small and large subunits of the wild-type and mutant *PabPol D* were expressed separately. We have shown that subunits cannot be expressed, but degrade, when cloned separately in the *E. coli* Rosetta strain. In addition, the subunits of the *PabPol D* mutants are not expressed when cloned together in the *E. coli* Rosetta strain. These results confirm the fact that the DP1-DP2 complex of *PabPol D* is weaker when the PYF box motif is mutated. As a consequence, the

DP1-DP2 interaction is disrupted and both subunits degraded following expression in Rosetta cells. Also, the physical and functional interactions between DP1 and DP2 of *PabPol Dmut2* seem to be weaker than those of *PabPol Dmut1*. Therefore, increasing the number of mutations in this zone leads to a progressive loss of complex stability. Finally, if the PYF box is not an essential motif participating in inter-subunit assembly within the range of amino acids 792-1163 of the large subunit of *PhoPol D*, mutations in the PYF box motif, particularly at the level of tyrosine 946 and phenylalanine 947, induce radical changes in the conformation of the protein. Heating experiments confirmed this assumption. Proteins with mutated PYF box motifs were rapidly degraded, demonstrating their weak thermostability compared to the wild-type protein. In addition, heating induced decreased the DNA polymerase activity of the mutant enzymes. Hydrophobic forces are major contributors to molecular folding and thermostability.^{34,35} This result corroborates the studies on *P. horikoshii* that found that the domain (792-1163) plays a role in the stability of the *PhoPol D* complex and in polymerase activity.²³ We show that, inside this domain, the PYF box has a major role in Pol D stability.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant proteins

PabPol D and PabPCNA were prepared as previously described.^{7,36} In PabPol Dmut1 and PabPol Dmut2, the glycine at positions 934 and 941 (PabPol Dmut1) and tyrosine 946 and phenylalanine 947 (PabPol Dmut2) were substituted by alanine. The two mutants were obtained using the following oligonucleotides (mutated codons are underlined): 5'-AGGATAATAGCCTTTGTCGATGCCCTAGTTGCCTTACGCT-3' and 3'-AGCGTAAG CAACTAGGGCATCGACAAAGGCTTATTATCCT-5' for PabPol Dmut1 or 5'-GCCCTAG TTGGTTACGCTCACCCCGCCGCCCACGCTGC G-3' and 3'-CGCAGCGTGGGCGGCGGGGTGAGCGTAACCAACTAGGGC-5' for PabPol Dmut2. The PCR products were cloned into the pET26b+ plasmid (Promega), and the entire nucleotide sequence was confirmed by sequencing. The two mutants were purified as previously described for PabPol D.⁷

DP1 and DP2 of PabPol D, DP2 of PabPol Dmut1, and DP2 of PabPol Dmut2 constructs containing the bacteriophage T7 gene promoter and leader sequence were introduced together or separately into *E. coli* strains HMS174 or Rosetta. The cells were grown at 37°C in 2 ml or 50 ml of LB medium with ampicillin (100 mg ml⁻¹) or kanamycin (30 mg ml⁻¹) with gentle shaking (150 rpm). The cells were grown to an A_{600 nm} of 0.7, and then IPTG was added to a final concentration of 1 mM to induce the overproduction of the recombinant proteins. The cells were cultured for an additional 4 hours and centrifuged at 13,000 x g for 15 min at 4°C. The pellets were resuspended in 80 µl of buffer (50 mM Tris HCl pH 8, 2 mM β-mercaptoethanol, and protease inhibitor cocktail tablets; Complete, Roche diagnostics), and bacterial lysates were prepared by sonication (3 x 15 s pulses). Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants were heated at 75°C for 10 min, followed by centrifugation at 13,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants were loaded onto an SDS-PAGE Criterion XT 12% polyacrylamide precast gel (Bio-Rad) and analyzed by Western blotting.

His-tagged DP1 of PabPol D was purified as follows. In short, the extract was passed through an affinity column (His-trap, 5 ml; 1 ml min⁻¹) pre-equilibrated with 50 mM Na(P) (pH 6.5) containing 1 mM DTT and 20 mM imidazole. The proteins were eluted by a linear gradient of imidazole up to 500 mM. The fractions containing DP1 (detected by SDS-PAGE) were pooled and loaded onto a Hiprep™ 16/10 Q FF column (1 ml min⁻¹) pre-equilibrated with 50 mM Na(P) (pH 6.5) containing 1 mM DTT. DP1 was eluted by a linear gradient of NaCl

up to 1 M. The fractions containing DP1 were dialyzed against 20 mM Tris HCl (pH 8) containing 1 mM DTT and 20% (v/v) glycerol, concentrated, and stored at -20°C.

The peptides used as competitors for PCNA were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium). PYFD corresponded to the PYF box motif of *PabPol D* (928-IVGRIIGFVDALVGYAHPYFH-948); TEMD corresponded to an internal sequence of *PabPol D* (83-EIIEGKFGDLG SREKYAEQAV-103) and was used as a control. The theoretical pI of competitor peptides PYFD and TEMD was 6.92 and 4.59, respectively.

Western blotting

Proteins separated on the SDS-PAGE Criterion XT 12% polyacrylamide precast gel (Bio-Rad) were transferred to immune-blot polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). The blots were saturated with blocking buffer containing 5% (w/v) skim milk in TBS-T (Tris-buffered saline: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) for 1 h at room temperature. The blots were incubated for 1 h at room temperature with a 1:5,000 dilution of the rabbit polyclonal anti-DP1 for *PabPol D* and the rabbit polyclonal anti-DP2 for *PabPol D* in TBS-T. The membranes were then washed three times with TBS-T and incubated for 1 h at room temperature in a 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG in TBS-T. The membranes were washed three times with TBS-T and the secondary antibody was detected by the enhanced chemiluminescence system ECL+ (Amersham Biosciences). The bands were visualized on a Typhoon 9400 imager (Amersham Biosciences).

Primer extension assay

The 32-nt oligonucleotide used to prepare the primed DNA substrate for the primer extension assays (5'-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3') was synthesized, labeled at the 5' terminus with 6-carboxyfluorescein, and purified by Eurogentec. The 32-nt oligonucleotide was either annealed to M13ssc at a 3:1 molar ratio or to an 87-nt oligonucleotide (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCGGGGTCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3') at an equimolar ratio in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 50 mM NaCl by heating to 75°C for 10 min, followed by cooling to room temperature. Primer extension assays were performed in a final volume of 11 µl containing the following components: 0.09 pmol of M13 ssc, 2 pmol of each dNTP, 0.02-1.5 pmol of *PabPCNA* and *PabPol* to be tested in the buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM DTT, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂). Reactions were incubated at 60°C for

30 min and then stopped on ice by adding 10 μ l of stop buffer (98% (v/v) formamide, 0.2 mM EDTA, pH 8.0). Peptides (30 μ M and 100 μ M) were added to the reaction at the same time as *PabPol*, incubated at 60°C for 15 min, and then stopped on ice. The products were heated to 95°C for 5 min and resolved for 16 h at 30 V at 4°C on a 1% (w/v) alkaline agarose gel (50 mM NaOH, 1 mM EDTA). Primer extension with 87mer/32mer-FAM (0.03 pmol) was performed under the same conditions and contained 6 pmol of DP1 and DP2. The products were resolved for 5 h at room temperature on a 15% polyacrylamide, 7 M urea gel. Finally, the products were visualized on a Typhoon 9400 imager (Amersham Biosciences).

Surface plasmon resonance (SPR) experiments

The SPR analyses were performed on a BIAcore X apparatus (BIAcore, Uppsala, Sweden). DNA surfaces consisted of approximately 200 resonance units (RU) of biotinylated template immobilized onto a streptavidin surface (SA sensor chip, BIAcore) as previously described (Henneke *et al.*, 2005). The interaction between *PabPol* and the DNA/PCNA complex were monitored as follows: *PabPCNA* (200 nM) was injected over the DNA chip and *PabPol* (200 nM) was supplemented 30 s after injection. In all experiments, the interactions were monitored at 25°C at a flow rate of 30 μ l/min in HBS-P buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) surfactant P20).

Nile Red fluorescence

All analyses were performed using an Edinburgh FLS920 spectrofluorimeter. The cell, with a path length of 3 mm and a working volume of 120 μ l, was thermostated at 20°C \pm 0.5°C. The excitation wavelength was set at 550 nm, and the excitation and emission slits were set at 5 nm and 10 nm, respectively. Nile Red was dissolved in Me₂SO to a concentration of 0.25 mM, which was added to a final concentration of 1 μ M in the cell containing 48 pmol samples of *PabPol* D, *PabPol* Dmut1, or *PabPol* Dmut2. Spectra were recorded after 5 min.

Thermostability of wild-type and mutant *PabPol* D

The thermal stabilities of 5 pmol *PabPol* D, *PabPol* Dmut1, or *PabPol* Dmut2 were monitored in dilution buffer (Tris HCl 20 mM pH 7.5, glycerol 20%) in a final volume of 10 μ l. Each sample was incubated at 80°C, 90°C, or 100°C for 5 min and then cooled on ice. Enzymes were assayed at 3 pmol for primer extension and at 48 pmol for Nile Red fluorescence.

Pull-down assays

His-tagged DP1 (10 µg) was incubated with 4 µl of magnetic beads (Dynabeads Talon, DynaL Biotech) in 100 µl of binding and washing buffer (BW buffer: 50 mM Na(P) pH 8, 300 mM NaCl, 0.01% Tween 20) for 30 min at room temperature. Next, the beads were washed in BW buffer. The samples were incubated with DP2 for 1 h at room temperature and washed five times with the same buffer. Proteins were eluted from the beads in loading buffer before being loaded onto a SDS-PAGE Criterion XT 12% polyacrylamide precast gel (Bio-Rad), and DP2 was analyzed by Western blotting.

Electrophoresis mobility-shift assay (EMSA)

Binding reactions were performed in a final volume of 20 µl containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 20 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 µg ml⁻¹ BSA, 4% Ficoll, 2.5 pmol of labeled template/primer (87mer/32mer), and 5, 10, or 15 pmol of wild-type *PabPol D*, *PabPol Dmut1*, or *PabPol Dmut2*. The reactions were incubated at 60°C for 10 min and cooled on ice. The samples were loaded onto a 1% (w/v) agarose gel containing 4.5 mM Tris HCl, 4.5 mM Boric acid, and 2 mM EDTA (pH 8) and run at 90 V for 3 h. The products were visualized on a Typhoon 9400 imager.

Sequence accession numbers

The Entrez protein database accession numbers for the sequences used in this paper are: NP_070550 (*Archaeoglobus fulgidus*), NP_248640 (*Methanocaldococcus jannaschii*), YP_184316 (*Thermococcus kodakarensis*), NP_125813 (*Pyrococcus abyssi*), NP_577748 (*Pyrococcus furiosus*), NP_142130 (*Pyrococcus horikoshii*), NP_002682 (*Homo sapiens*), NP_596124 (*Schizosaccharomyces pombe*), NP_067694 (*Rattus norvegicus*).

Acknowledgements

BC was supported by a grant from Région Bretagne (211-B2-9/ARED). DF was supported by grants from the National Research Agency and Brittany regional council. We are grateful to Pascal Trouvé for giving us access to the BIAcore apparatus (INSERM U.613, Génétique moléculaire et génétique épidémiologique, Brest, France).

REFERENCES

1. McInerney, P., Johnson, A., Katz, F. & O'Donnell, M. (2007). Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Mol. Cell* **27**, 527-538.
2. Cann, I.K.O. & Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: Identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* **152**, 1249-1267.
3. Cann, I.K.O., Ishino, S., Nomura, N., Sako, Y. & Ishino, Y. (1999). Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, an aerobic hyperthermophilic crenarchaeote. *J. Bacteriol.* **181**, 5984-5992.
4. Iwai, T., Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Kimura, N. & Horiuchi, T. (2000). Sequence analysis of three family B DNA polymerases from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfurisphaera ohwakuensis*. *DNA Res.* **7**, 243-251.
5. Cann, I.K.O., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. & Ishino, Y. (1998). A heterodimeric DNA polymerase: Evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14250-14255.
6. Ishino, Y., Komori, K., Cann, I.K.O., & Koga Y., (1998). A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol.* **180**, 2232-2236.
7. Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J.P. *et al.* (2001). Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5961-5969.
8. Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P. *et al.* (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8102-8107.
9. Waters, E., Hohn, M.J., Ahel, I., Graham, D.E., Adams, M.D., Barnstead, M., Beeson, K.Y. *et al.* (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12984-12988.
10. Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., Preston, C. *et al.* (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18296-18301.
11. Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., & Ishino, Y. (1997). A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression and characterization. *Genes Cell.* **2**, 499-512.

12. Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawarabayashi, Y. & Matsui, I. (2001). Invariant Asp1122 and Asp1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* **276**, 27376-27383.
13. Aravind, L., Leipe, D.D. & Koonin, E.V. (1998). Toprim - a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucl. Acids Res.* **26**, 4205-4213.
14. Shen, Y., Tang, X.F. & 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.
15. Shen, Y.L., Tang, X.F., Yokoyama, H., Matsui, E. & Matsui, I. (2004). A 21-amino acid peptide from the cysteine cluster II of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii* stimulates its nuclease activity which is Mre11-like and prefers manganese ion as the cofactor. *Nucl. Acids Res.* **32**, 158-168.
16. Waga, S & Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 721-751.
17. Hübscher, U., Maga, G. & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 133-163.
18. Fukui, T., Yamauchi, K., Muroya, T., Akiyama, M., Maki, H., Sugino, A. & Waga, S. (2004). Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cell.* **9**, 179-191.
19. Berquist, B.R., DasSarma, P. & DasSarma, S. (2007). Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp NRC-I. *BMC Genet.* **8**, 31.
20. Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J. & 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.
21. Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J. & Raffin, J.P. (2007). DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the Euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J. Mol. Biol.* **369**, 343-355.
22. Cann, I.K.O., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K. & Ishino, Y. (1999). Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 6591-6599.

23. Tang, X.F., Shen, Y., Matsui, E. & Matsui, I. (2004). Domain topology of the DNA polymerase D complex from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* **43**, 11818-11827.
24. Warbrick, E. (1998). PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays* **20**, 195-199.
25. Pohler, J.R., Otterlei, M. & Warbrick, E. (2005). An *in vivo* analysis of the localisation and interactions of human p66 DNA polymerase δ subunit. *BMC Mol. Biol.* **6**, 17.
26. Mesiet-Cladiere, L., Norais, C., Kuhn, J., Briffotiaux, J., Sloostra, J.W., Ferrari, E., Hübscher, U. *et al.* (2007). A novel proteomic approach identifies new interaction partners for proliferating cell nuclear antigen. *J. Mol. Biol.* **372**, 1137-1148.
27. Zhang, S.J., Zeng, X.R., Zhang, P., Toomey, N.L., Chuang, R.Y., Chang, L.S. & Lee, M.Y.W.T. (1995). A conserved region in the amino terminus of DNA polymerase δ is involved in proliferating cell nuclear antigen binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 7988-7992.
28. Sackett, D.L. & Wolff, J. (1987). Nile red as a polarity-sensitive fluorescent-probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal. Biochem.* **167**, 228-234.
29. Febbraio, F., Andolfo, A., Tanfani, F., Briante, R., Gentile, F., Formisano, S., Vaccaro, C. *et al.* (2004). Thermal stability and aggregation of *Sulfolobus solfataricus* beta-glycosidase are dependent upon the n-epsilon-methylation of specific lysyl residues - Critical role of *in vivo* post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* **279**, 10185-10194.
30. Zhang, P., Mo, J.Y., Perez, A., Leon, A., Liu, L., Mazloun, N., Xu, H. *et al.* (1999). Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **274**, 26647-26653.
31. Fogg, M.J., Pearl, L.H. & Connolly, B.A. (2002). Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. *Nature Struct. Biol.* **9**, 922-927.
32. Savino, C., Federici, L., Johnson, K.A., Vallone, B., Nastopoulos, V., Rossi, M., Pisani, F.M. *et al.* (2004). Insights into DNA replication: The crystal structure of DNA polymerase B1 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Structure* **12**, 2001-2008.
33. Franklin, M.C., Wang, J. & Steitz, T.A. (2001). Structure of the replicating complex of a Pol α family DNA polymerase. *Cell* **105**, 657-667.
34. Goodenough, P.W. & Jenkins, J.A. (1991). Protein engineering to change thermal-stability for food enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 655-662.
35. Vieille, C. & Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1-43.
36. Henneke, G., Gueguen, Y., Flament, D., Azam, P., Querellou, J., Dietrich, J., Hübscher, U. *et al.* (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.

III. Résultats complémentaires

III.1. Activité 3'→5' exonucléasique de *PabPol D*, *PabPol Dmut1* et *PabPol Dmut2*

Une réaction 3'→5' exonucléasique a été réalisée avec l'ADN polymérase D sauvage et les ADN polymérase D mutées dans le motif PYF box (Figure 32).

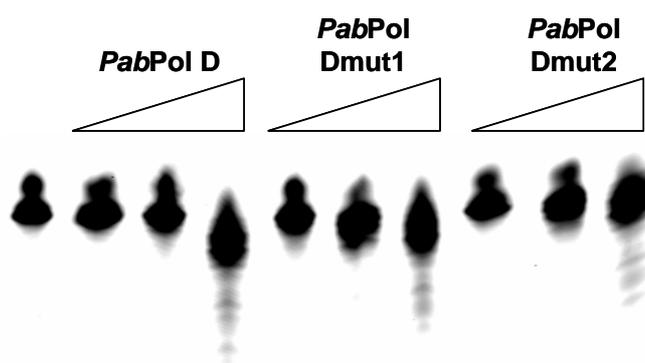


Figure 32 : Activité 3'→5' exonucléasique des ADN polymérase D sauvage et mutées dans le motif PYF box. Gel dénaturant acrylamide-urée à 12 %. La matrice est le L87 amorcé avec le fragment M13cut32FAM, marqué à l'extrémité 5' à la fluorescéine et utilisé à une concentration finale de 30 nM. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 30 min. Les enzymes ont été utilisées dans une gamme de 0,5, 1 à 2 pmol, symbolisé par le triangle.

Dans nos conditions, l'activité exonucléasique est observée seulement pour 2 pmol, pour chacune des protéines. Il a été démontré que la petite sous-unité DP1 possédait l'activité exonucléasique (Shen *et al.*, 2001), stimulée par son interaction avec la grande sous-unité DP2 (Shen *et al.*, 2004b). D'après les résultats précédents, nous avons conclu que le motif PYF box pouvait participer, sans être essentiel, aux interactions entre les deux sous-unités DP1 et DP2 de l'ADN polymérase D. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'interaction entre les deux sous-unités est encore suffisamment stable, malgré les mutations au niveau du motif PYF box, pour que la protéine puisse conserver son activité exonucléasique 3'→5'.

III.2. Interactions fonctionnelles entre les sous-unités DP1 et DP2 : importance pour l'activité 3'→5' exonucléasique

La petite sous-unité DP1 sauvage et les sous-unités DP2 de *PabPol D*, *PabPol Dmut1* et *PabPol Dmut2*, ont été exprimées séparément, puis mélangées afin de tester leur activité 3'→5' exonucléasique (Figure 33).

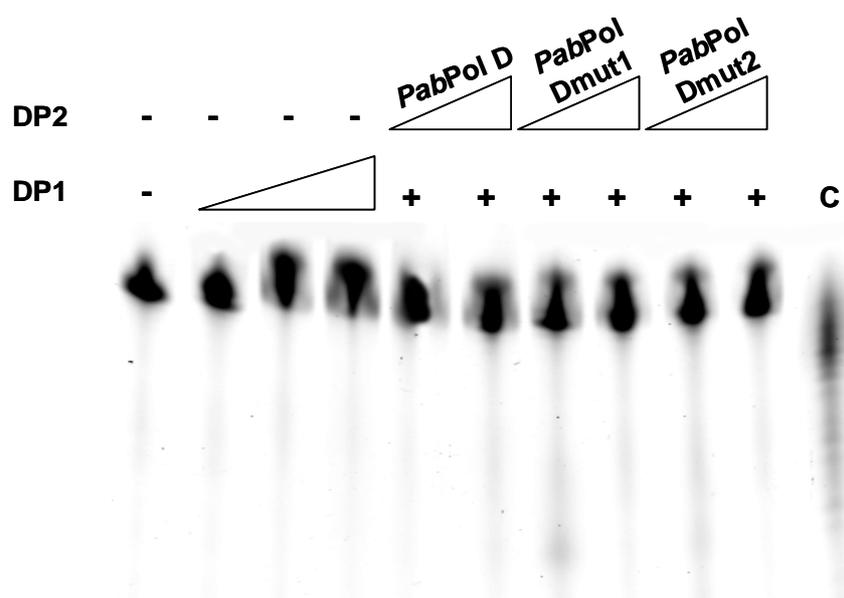


Figure 33 : Activité 3'→5' exonucléasique de la petite sous-unité DP1 de *PabPol D*, reconstituée avec la grande sous-unité DP2, de *PabPol D*, *PabPol Dmut1* ou *PabPol Dmut2*. Gel dénaturant acrylamide-urée à 12 %. La matrice est le L87 amorcé au fragment M13cut32FAM, marqué à l'extrémité 5' à la fluorescéine. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 60°C pendant 30 min. La sous-unité DP1 a été utilisée seule pour une gamme de 1, 3, 6 et 10 pmol (symbolisé par le triangle), et à 6 pmol, dans un rapport équimolaire, lorsqu'elle était complétée avec la sous-unité DP2. C, *PabPol D* utilisée à 2 pmol.

Ici, la petite sous-unité DP1 seule, ou coincubée avec la grande sous-unité DP2, sauvage ou mutée PYF box, n'a aucune activité 3'→5' exonucléase. Dans les mêmes conditions, nous avons observé une activité ADN polymérase uniquement lorsque les deux sous-unités DP1 et DP2 étaient mélangées entre elles (cf. article). Par conséquent, nous n'avons pas pu démontrer l'implication du motif PYF box dans les interactions entre les deux sous-unités de *PabPol D* et dans la stabilité du complexe DP1-DP2, pour l'activité exonucléasique. Il est intéressant de noter que des travaux ont démontré que l'activité 3'→5' exonucléasique était mesurable avec la sous-unité DP1 seule (Jokela *et al.*, 2004). Dans d'autres travaux, cette activité était détectée seulement lorsque les deux sous-unités étaient mélangées entre elles (Ishino *et al.*, 1998). Ainsi, il est probable qu'une optimisation de nos conditions de réaction soit nécessaire afin de détecter une activité 3'→5' exonucléasique.

IV. Conclusions et perspectives

Nous avons clairement démontré que le motif PYF box n'entraîne pas en jeu dans les interactions de l'ADN polymérase D avec son facteur de processivité. En revanche, il apparaît que le motif PYF box participe à la stabilité du complexe formé entre les deux sous-unités DP1 et DP2. Une étude par Dichroïsme circulaire de *PabPol Dmut1* et *PabPol Dmut2* nous permettrait d'apporter des renseignements quant à de possibles changements conformationnels dus aux mutations au niveau du motif PYF box.

Alors que les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence l'activité ADN polymérasique, lorsque les deux sous-unités DP1 et DP2 étaient réassociées, aucune activité 3'→5' exonucléase n'a pu être déterminée pour la petite sous-unité DP1 seule ou co-incubée avec la grande sous-unité DP2. Ainsi, il est nécessaire d'entrevoir une optimisation des conditions de réaction afin de pouvoir comparer le modèle de *PabPol D* avec d'autres ADN polymérases D d'Archaea. Par ailleurs, alors que l'activité de reconnaissance de la base uracile a été déterminée chez les ADN polymérases de la famille B (Franklin *et al.*, 2001, Savino *et al.*, 2004), aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant les ADN polymérases D. Des travaux préliminaires ont permis de démontrer que *PabPol D* ne possédait pas cette activité, même si un ralentissement de la synthèse d'ADN a été observé (Ghislaine Henneke, communication personnelle). De plus, les ADN polymérases D mutées au niveau du motif PYF box, sembleraient avoir le même comportement que la Pol D sauvage, suggérant que ce motif n'est pas impliqué dans le mécanisme de reconnaissance de la base uracile. Des travaux ultérieurs sont à envisager à court terme afin de déterminer le comportement de l'ADN polymérase D face à une base uracile.

Nous avons rencontré de nombreux problèmes pour l'obtention de la grande sous-unité DP2, étant donné sa très faible solubilité. Ainsi, une optimisation des conditions d'expression et de purification de la grande sous-unité DP2 sera nécessaire afin d'obtenir une plus grande quantité, plus en adéquation avec des études biophysiques. Il serait alors possible d'étudier, à plus grande échelle, les implications des deux sous-unités, indépendamment, dans la liaison à l'ADN notamment.

Enfin, devant la difficulté d'obtenir une ADN polymérase D très homogène, aucune structure de l'enzyme n'a pour l'instant pu être déterminée. Néanmoins, des travaux en cristallographie sont d'ores et déjà envisagés au sein du laboratoire. L'obtention de cristaux pourrait nous apporter des renseignements, notamment sur le complexe formé entre les deux sous-unités, et également son interaction avec l'ADN.

Chapitre 4

Travaux préliminaires en spectroscopie de fluorescence

I. Introduction

Ce chapitre rassemble des travaux préliminaires effectués, durant ce doctorat, en spectroscopie de fluorescence. Nous avons pu nous initier à diverses techniques qui présentent un intérêt croissant dans le domaine de la biochimie des protéines. Généralement, les techniques basées sur la fluorescence présentent l'avantage d'obtenir des données en temps réel, et d'être plus en adéquation avec la dynamique des réactions. En revanche, ces techniques étant très sensibles, elles nécessitent énormément de mises au point et de contrôles, afin de minimiser les effets et les signaux artéfactuels issus des tampons et de l'appareillage.

Nous nous sommes notamment intéressés à l'anisotropie de fluorescence, qui permet l'étude des interactions entre deux molécules, i.e., généralement, la liaison d'une protéine sur un acide nucléique. Par ailleurs, l'utilisation de sondes fluorescentes, extrinsèques ou intrinsèques, qui sont sensibles à leur environnement proche, a permis de nous apporter des renseignements sur les changements conformationnels des protéines et sur les zones d'interaction.

II. Résultats

II.1. Anisotropie de fluorescence

La lumière incidente de fluorescence possède des propriétés de polarisation. Les fluorophores absorbent la lumière selon une direction privilégiée, définissant le moment de transition. Après excitation par une lumière polarisée, les fluorophores, dont le moment de transition est orienté dans une direction proche de celle du vecteur incident, seront excités préférentiellement. Il s'agit ainsi d'une photosélection à l'excitation.

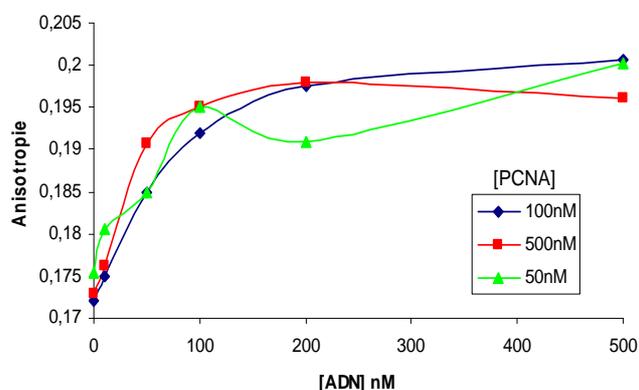
La principale cause de dépolarisation de la fluorescence est la diffusion rotationnelle des fluorophores par mouvement brownien. Ainsi, tout phénomène susceptible de modifier la mobilité et l'orientation des fluorophores aura pour conséquence de faire varier la polarisation de la lumière émise. De plus, à l'état excité, tout mouvement, local ou global proche du fluorophore, sera susceptible de faire varier l'orientation du dipôle d'émission qui définit tout type de macromolécule. Par conséquent, l'anisotropie de fluorescence est liée à la dynamique des macromolécules. Il est, par exemple, possible d'étudier des interactions entre protéines par polarisation de fluorescence, en étudiant la vitesse de diffusion rotationnelle d'une protéine liée ou non à son partenaire. Cette technique est très prometteuse pour la caractérisation de la dynamique et des interactions de macromolécules à l'échelle moléculaire. De nombreux travaux concernent la liaison à l'ADN des protéines du vivant. A titre d'exemple, on peut citer l'ADN polymérase I, chez les procaryotes (Bailey *et al.*, 2001), le facteur de transcription Mbp1, chez les eucaryotes (Deleeuw *et al.*, 2008), une hélicase impliquée dans la réparation (Richards *et al.*, 2008), le RPA (Kernchen & Lipps, 2006) ou bien encore l'ADN polymérase B (Shuttleworth *et al.*, 2004) chez les Archaea. Par ailleurs, l'anisotropie peut s'appliquer à d'autres types d'acides nucléiques tels que les ARN (Bonarek *et al.*, 2008).

Dans le cadre de notre étude, les mesures d'anisotropie obtenues constituent une première mise au point de la technique au sein du laboratoire. Les principaux résultats présentés ci-dessous restent préliminaires et ne peuvent constituer des supports exploitables pour d'éventuelles interprétations sur la liaison de protéines à l'ADN. Ces travaux réalisés nous permettent néanmoins de donner des informations sur la flexibilité de la protéine ou de sa mobilité sur l'ADN, et de calculer des constantes d'interaction.

II.1.1. PCNA marqué par un groupement fluorescent

En règle générale, l'anisotropie de fluorescence se mesure par la titration d'une protéine sur un acide nucléique marqué. Même si cela paraît moins logique, il est possible d'utiliser une protéine marquée avec un fluorophore. Nous avons étudié l'interaction de l'ADN avec le PCNA marqué au TMR (Figure 34).

Le fluorophore était greffé au niveau de la cystéine 211, préalablement introduite par mutagenèse dirigée à la place d'une leucine (PCNA L211C). Ici, globalement, la valeur initiale de l'anisotropie est assez élevée (environ 0,172). Il faut savoir que plus une molécule marquée et libre est petite (i.e. petit fragment d'ADN), plus la valeur d'anisotropie avoisine le 0. Cette notion est sensible au rapport de taille entre la molécule d'intérêt et le fluorophore qui lui est greffé. Dans notre cas, la faible diffusion rotationnelle du TMR, greffé sur le PCNA, s'explique par la taille importante du PCNA. De plus, l'amplitude entre la valeur d'anisotropie du PCNA seul, et celle du PCNA complexé à l'ADN, est environ égale à 0,05 quelque soit la concentration du PCNA. Cette valeur est faible et démontre la faible flexibilité du PCNA quand on ajoute des concentrations croissantes d'ADN. La liaison entre les molécules est néanmoins démontrée mais ne semble pas dépendante de la concentration du PCNA.



II.1.2. PCNA marqué –L211C/V46C

Nous avons ensuite comparé la liaison de l'ADN au PCNA L211C et un autre PCNA marqué au TMR à la position 46 (Figure 35). Ici encore, une cystéine au niveau de laquelle le fluorophore pouvait se greffer, avait été introduite par mutagenèse dirigée à la place de la valine 46. Dans ce cas, la concentration du PCNA L211C, était de 100 nM. Dans les mêmes conditions, l'ADN a été titré en présence du PCNA V46C. Tout d'abord, alors que la valeur

initiale d'anisotropie du PCNA L211C était très élevée (0,172), celle du PCNA V46C l'était encore davantage. De plus, contrairement au PCNA L211C qui se liait de façon affine à l'ADN, aucune interaction n'est démontrée pour le PCNA V46C. Nous pouvons supposer ici, qu'il s'agit d'une liaison directe entre le fluorophore et l'ADN. Ceci pourrait prouver indirectement que l'ADN est en contact avec cette zone du PCNA. Le PCNA V46C stimule les ADN polymérase lors de tests d'extension d'amorces (données non montrées), cependant aucun contrôle sur gel natif n'a été effectué nous permettant de confirmer sa trimérisation.

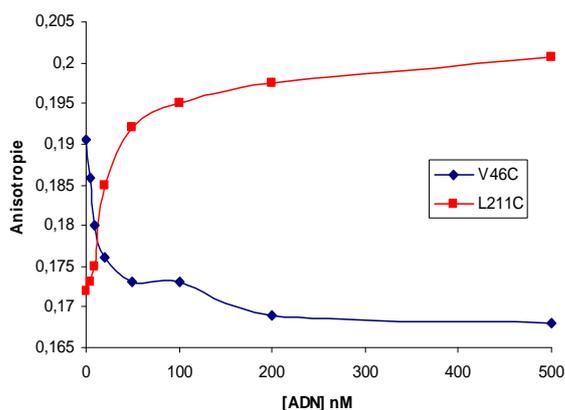


Figure 35 : Liaison du PCNA à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence. Le PCNA était, soit le L211C, soit le V46C, marqués tous deux au TMR. L'ADN était le A2 hybridé à une amorce B2 (cf. Matériels et Méthodes) et a été ajouté directement dans la cuve, à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée indépendamment, à 25°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

II.1.3. Liaison du PCNA à l'ADN L34 hybridé à différentes amorces

Les travaux de mesures d'anisotropie de fluorescence ont été effectués par la suite sur un ADN marqué à la fluorescéine en son extrémité 5'. Contrairement aux deux études précédentes, le PCNA n'est cette fois-ci pas marqué.

Tout d'abord, une étude a été réalisée sur la liaison du PCNA sur l'ADN L34 hybridé, soit à une amorce de 32-mer marquée à la fluorescéine (M13cut32FAM), soit à une amorce 17-mer marquée à la fluorescéine (M13cut17FAM) (Figure 36). La valeur d'anisotropie augmente en fonction de la concentration en PCNA, quelque soit l'amorce utilisée. Les courbes représentant la liaison du PCNA à l'ADN hybridé aux différentes amorces sont superposables, suggérant que le PCNA se lie de manière identique, quelque soit la longueur de l'amorce.

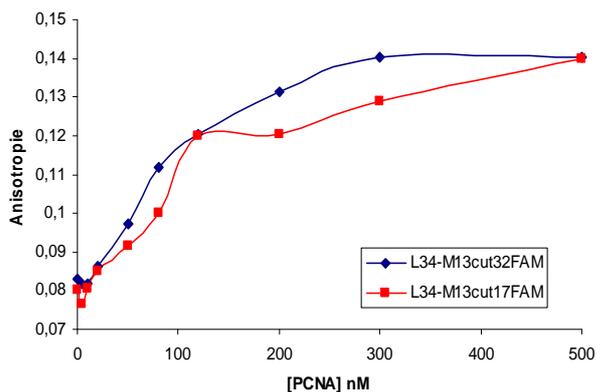


Figure 36 : Liaison du PCNA à différents ADN amorcés mesurée par anisotropie de fluorescence.

L'ADN était le L34 hybridé à une amorce marquée en 5' à la fluorescéine, de longueur 32-mer ou 17-mer. Le PCNA a été ajouté directement dans la cuve à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée à 25°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

II.1.4. Liaison du PCNA à l'ADN, à différentes températures

La figure 37 illustre la liaison du PCNA sur l'ADN L34, hybridé avec l'amorce M13cut32FAM marquée à la fluorescéine, en fonction de trois températures d'incubation différentes (25°C, 42°C et 50°C). La valeur d'anisotropie augmente en fonction de la concentration en PCNA, quelque soit la température. Il s'agit bien là d'une interaction entre les deux molécules. Plus précisément la valeur initiale et l'amplitude de la variation d'anisotropie diminuent avec la température. Il peut s'agir ici, d'un effet du tampon. A noter qu'un test a été effectué à 55-60°C, sans résultats, étant donné le bullage trop important du tampon. L'utilisation d'une cuve hermétiquement fermée, grâce à un septum, sera à envisager. Dans ce cas, l'ajout de molécule se fait par une seringue. Nous avons, pour la suite de l'étude, privilégié la température de 25°C.

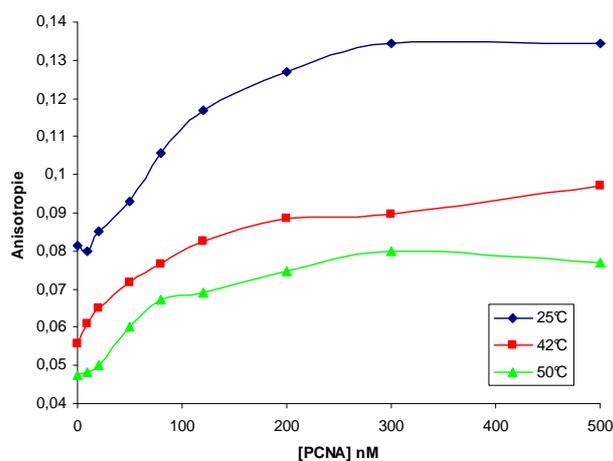


Figure 37 : Liaison du PCNA à l'ADN à différentes températures mesurée par anisotropie de fluorescence.

L'ADN était le L34 hybridé à une amorce M13cut32FAM, marquée en 5' à la fluorescéine. Le PCNA a été ajouté directement dans la cuve à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée indépendamment à 25°C, à 42°C et à 50°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

II.1.5. Liaison à l'ADN du complexe PCNA/RFC

Nous avons également étudié l'affinité du RF-C pour l'ADN L34, et l'effet de celui-ci sur la liaison du PCNA à l'ADN. Plusieurs études ont démontré la potentialité d'anisotropie pour l'étude de liaison à l'ADN de plusieurs protéines. C'est notamment le cas, chez *P. furiosus*, où le PCNA améliorerait la liaison de l'ADN polymérase à l'ADN (Emptage *et al.*, 2008). Ici, le RF-C semble se lier à l'ADN de manière non spécifique et non affine. Nous avons également pu améliorer la liaison du PCNA, sur le même ADN, comparé aux résultats précédents (Figure 38). De plus, lorsque le RF-C est préincubé avec le PCNA, on note une amélioration de la liaison des protéines à l'ADN. Il est cependant difficile d'interpréter la courbe dans le sens où nous ne pouvons savoir comment s'effectue l'interaction entre les trois molécules présentes à l'équilibre : l'ADN, le RF-C et le PCNA. Nous pouvons néanmoins supposer que le RF-C améliore le chargement du PCNA sur l'ADN. A noter que cette étude a été réalisée en absence d'ATP.

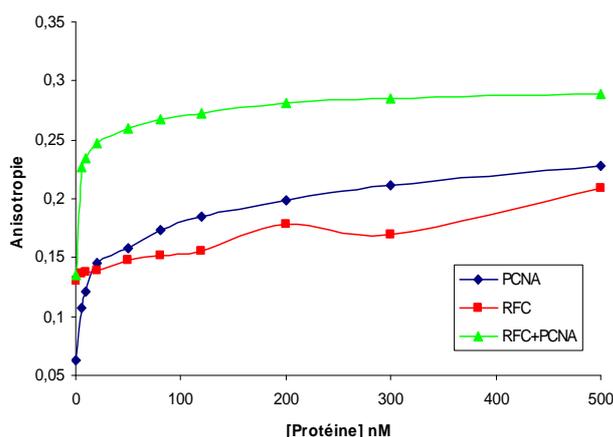


Figure 38 : Liaison du PCNA et du RF-C à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.

L'ADN était le L34 hybridé à une amorce M13cut32FAM, marquée en 5' à la fluorescéine. Le PCNA et le RF-C ont été ajoutés, seuls ou ensemble directement dans la cuve à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée à 25°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

II.1.6. Liaison à l'ADN des ADN polymérases D mutées au niveau du motif PYF box

Nous avons étudié ici l'affinité des ADN polymérases mutées au niveau du motif PYF box pour l'ADN (cf. chapitre 3) (Figure 39). Il faut noter que des travaux préliminaires, nous permettaient de conclure que les meilleures conditions possibles, pour l'étude avec le PCNA, étaient identiques à celles utilisées pour les ADN polymérases, à savoir : l'ADN L34 hybridé à l'amorce M13cut17FAM, à une température de 25°C. Nous avons augmenté également le nombre de points de titration afin de permettre une analyse des courbes. A noter que l'étude de la liaison de l'ADN polymérase D sauvage à l'ADN, dans les mêmes conditions, n'a pu

être réalisée en raison de problèmes techniques. Nous pouvons constater que la liaison, à l'ADN, du mutant PabPol Dmut2, paraît être plus faible que celle du mutant PabPol Dmut1. Ces travaux pourraient compléter l'étude menée dans le chapitre 3.

La liaison des ADN polymérase à l'ADN conduit à une augmentation d'anisotropie de fluorescence, à partir de laquelle les constantes de dissociation peuvent être calculées (données non montrées).

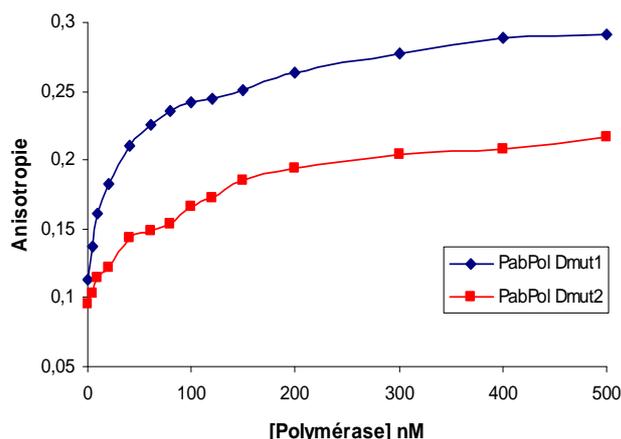


Figure 39 : Liaison de *PabPol* Dmut1 et mut2 à l'ADN mesurée par anisotropie de fluorescence.

L'ADN était le L34 hybridé à une amorce M13cut32FAM, marquée en 5' à la fluorescéine. Les ADN polymérase Dmut1 et Dmut2 ont été ajoutées directement dans la cuve, à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée indépendamment, à 25°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

II.2. Utilisation du peptide PIPB

L'utilisation de peptides synthétiques, en tant que sonde de fluorescence, peut être envisageable, afin de démontrer l'interaction entre deux molécules. Par exemple, des travaux sur l'interaction, entre la calmoduline et la caM kinase I, ont été réalisés grâce au suivi de la fluorescence intrinsèque d'un peptide correspondant à la zone d'intérêt dans les protéines (Gomes *et al.*, 2000). Egalement, il est possible de déterminer la pénétration, dans une membrane cellulaire, d'un peptide correspondant à la structure primaire d'un domaine protéique (Christiaens *et al.*, 2002).

Dans le cadre de ce doctorat, afin d'étudier l'interaction du motif PIP box de *PabPol* B avec le PCNA, nous avons utilisé le peptide PIPB, correspondant à la structure primaire du motif PIP box de *PabPol* B. Ce peptide a la séquence suivante : QKTKQVFLGAWLKF (cf. Matériels et Méthodes). Par ailleurs, le PCNA ne possède pas de tryptophane dans sa structure primaire. Il possède néanmoins 5 tyrosines. Ainsi, la longueur d'excitation a été fixée à 295 nm, afin d'exciter au maximum le tryptophane sans interférence avec les tyrosines. La fluorescence du tryptophane, appartenant au peptide PIPB, pourra par conséquent être étudiée.

Le PCNA a été ajouté, en présence d'ADN, dans la cuve contenant le peptide PIPB. A chaque point de titration, un spectre d'émission a été obtenu après excitation du tryptophane à 295 nm. Ici, en plus du PCNA sauvage, le PCNA muté au niveau de son extrémité C-terminale (PR245) et le PCNA muté au niveau de l'IDCL (EIE120) ont été étudiés (respectivement, Figure 40A, B et C).

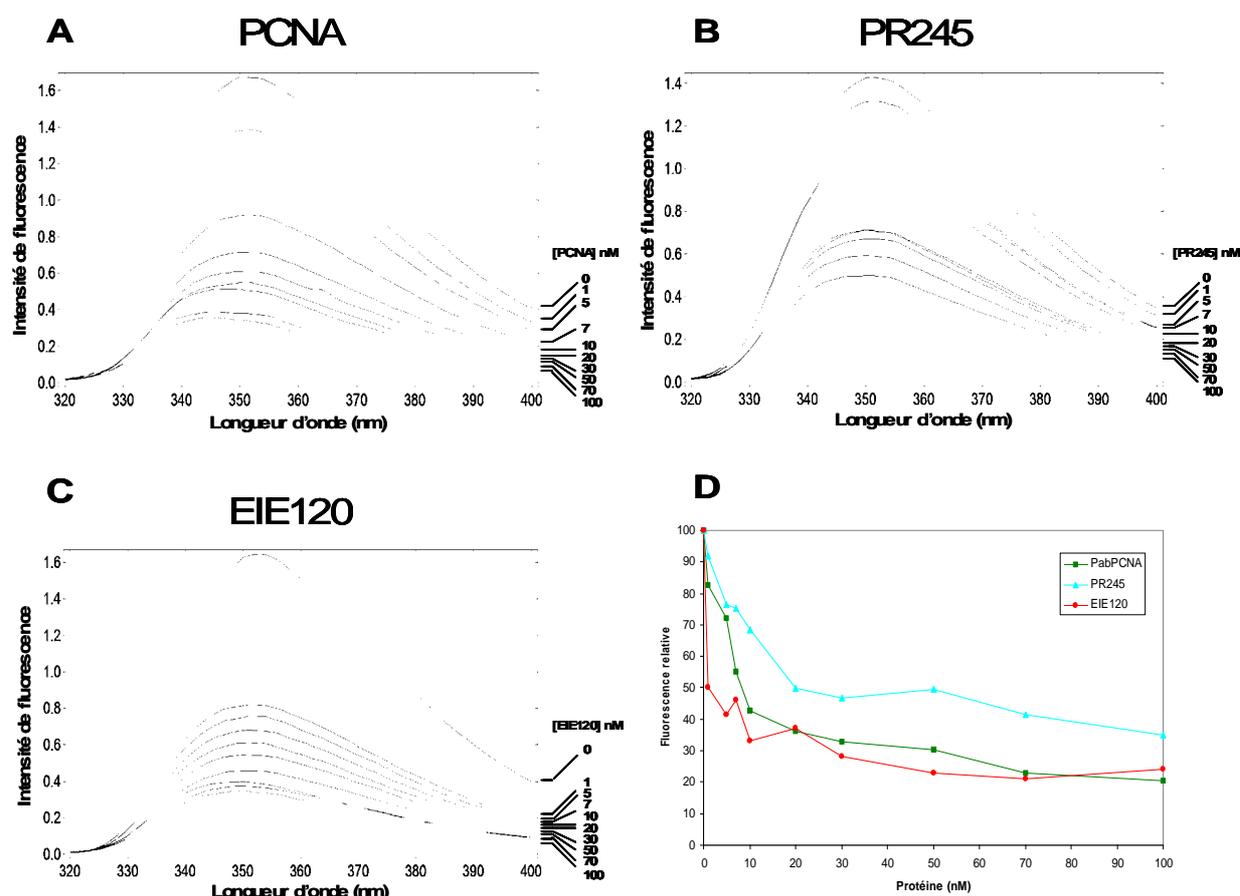


Figure 40 : Spectre de fluorescence du peptide PIPB en présence du PCNA sauvage (A), du PCNA PR245 (B) et du PCNA EIE120 (C). Le PCNA a été ajouté, directement dans la cuve, à des concentrations croissantes. La titration a été effectuée, à 25°C, dans le tampon décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». D, fluorescence relative du peptide PIPB en présence du PCNA sauvage, du PCNA PR245 et du PCNA EIE120. Les courbes sont construites sur le rapport entre l'intensité de fluorescence du peptide PIPB seul sur celle du peptide PIPB en présence du PCNA. Les valeurs sont les maxima d'intensité de fluorescence des courbes obtenues en A, B et C.

Le peptide seul montre un maximum d'émission à 351 nm (Figure 40A, B et C). La fluorescence du tryptophane du peptide diminue avec la concentration en PCNA, suggérant que nous sommes en présence d'un quenching statique (Figure 40A). C'est également le cas avec les PCNA mutés (Figure 40B et C). Ainsi, lors de cette réaction, le peptide PIPB peut être considéré en tant que molécule fluorescente (M) et le PCNA sauvage ou muté en tant que quencheur (Q). Par conséquent, l'interaction entre le PCNA (Q) et le peptide (M) conduit à la formation du complexe M-Q provoquant une diminution de la fluorescence sans réémission. Il est à noter que

ce phénomène est lié à la concentration du quencheur, mais en revanche n'est ni lié à la viscosité du tampon ni à la température. Cependant, durant cette étude, nous nous sommes focalisés uniquement sur la concentration du PCNA.

La diminution de la fluorescence, par ajout croissant de PCNA, a ensuite été étudiée en prenant en compte le maximum de l'intensité de fluorescence du tryptophane, pour chaque point de titration. Les courbes de titration ont été obtenues en traçant la valeur relative de la fluorescence du tryptophane du peptide PIPB, en fonction de la concentration en PCNA (Figure 40D). Ces courbes semblent décrire la courbe classique représentant l'interaction entre une molécule fluorescente et un quencheur (Figure 41). En effet, généralement, la fluorescence diminue progressivement et tend vers une asymptote. Cependant, l'incubation avec le PCNA muté PR245 semble avoir moins d'effet sur la fluorescence du peptide, suggérant une plus faible affinité du peptide pour ce PCNA, qui est muté au niveau de l'extrémité C-terminale.

Il ne semble pas qu'il s'agisse d'un quenching dynamique pendant lequel, une partie des molécules fluorescentes transmettraient l'énergie au quencheur. En effet, lorsque le rapport de la fluorescence, en absence de quencheur, et la fluorescence, en présence de quencheur (F_0/F), est porté en fonction de la concentration en quencheur, il en résulte une droite qui permet le calcul de la constante de Stern-Volmer (Figure 41) (Valeur, 2004).

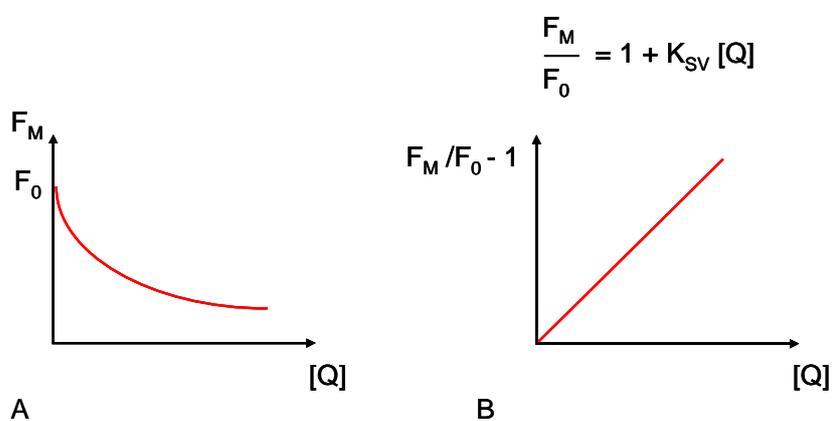


Figure 41 : Représentation théorique d'un quenching statique ou dynamique (A). Relation de Stern-Volmer et rapport de la fluorescence initiale sur la fluorescence en fonction de la concentration en quencheur $[Q]$ (B). La constante de Stern-Volmer, K_{SV} , s'exprime en $L.mol^{-1}$.

Durant notre étude, aucune droite n'a été obtenue que ce soit pour le PCNA sauvage ou les PCNA mutés PR245 et EIE120. Ceci ne nous permet donc pas de déterminer la constante K_{SV} (Figure 42). Il est indubitable qu'il faut compléter ces travaux préliminaires.

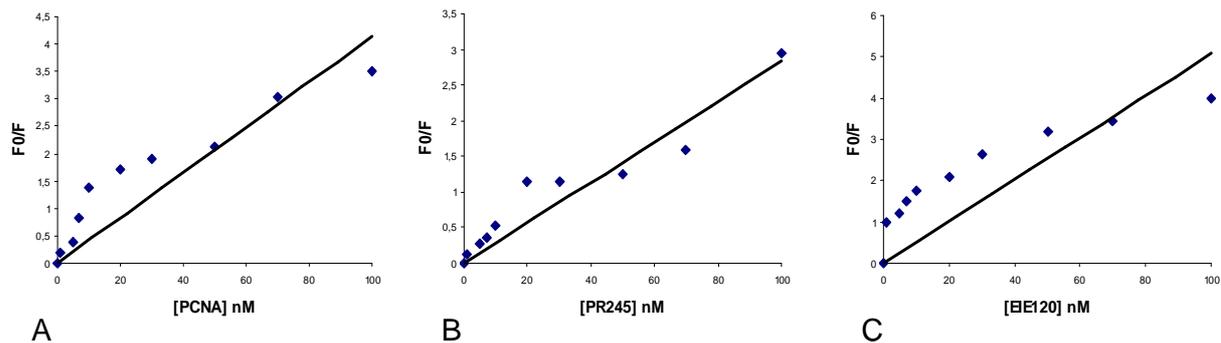


Figure 42 : Représentation du quenching obtenu après ajout croissant du PCNA sauvage (A), du PCNA muté PR245 (B) et du PCNA muté EIE120 (C). Le rapport de l'intensité de fluorescence initiale sur la fluorescence est porté en fonction de la concentration de PCNA.

Par ailleurs, lorsque le PCNA est ajouté en forte concentration, i.e., 70 et 100 nM, le maximum de fluorescence du tryptophane se déplaçait de 351 à 345 nm (Figure 40A). Ce blue-shift suggère que le tryptophane se retrouve dans un environnement hydrophobe, pour un excès de PCNA ou pour le PCNA muté. Nous pouvons imaginer que le peptide se retrouve au sein de la poche hydrophobe formée entre l'IDCL et le C-terminus du PCNA. En revanche, la fluorescence se déplaçait de 351 à 348 nm, pour des concentrations élevées en PCNA mutés PR245 et EIE120 (Figure 40B et C). Ce faible blue-shift démontre que le tryptophane se retrouve dans un environnement ayant une hydrophobicité légèrement plus élevée que lorsque le PCNA est ajouté en plus faible quantité.

Cette étude est incomplète et demande à être répétée et améliorée. Néanmoins nous pouvons émettre l'hypothèse que le peptide PIPB interagirait directement avec le PCNA au niveau de l'extrémité C-terminale. De plus, ce travail nous amène à dire que les résidus constituant le peptide PIPB, autour du tryptophane, pourrait interagir de manière moins affine lorsqu'une mutation est présente, soit sur l'IDCL, soit sur le C-terminus. Eu égard à la littérature et les résultats menés dans le chapitre 1, nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le motif PIP box de l'ADN polymérase B pourrait interagir avec le PCNA, à la fois au niveau de l'extrémité C-terminale, mais aussi au niveau de l'IDCL du facteur de processivité (Vijayakumar *et al.*, 2007).

II.3. Utilisation d'une sonde de polarité : le Nile Red

L'utilisation de sondes fluorescentes extrinsèques est de plus en plus intéressante pour des travaux portant sur la caractérisation des protéines pour les phénomènes d'agrégation, de folding, les changements conformationnels ou bien encore la mesure des surfaces hydrophobes

(Hawe *et al.*, 2008). Une des sondes les plus intéressantes est le Nile Red, qui est sensible à la polarité de son environnement. Etant donné qu'il peut se lier aux surfaces hydrophobes, il est couramment utilisé en tant que sonde pour l'analyse de changements conformationnels d'une protéine (Sackett *et al.*, 1990, Kim *et al.*, 2005). Par conséquent, dans l'étude concernant la thermostabilité de l'ADN polymérase D, le Nile Red nous a permis d'observer l'exposition d'environnements hydrophobes au sein de l'ADN polymérase D, après mutation au niveau du motif PYF box. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 3.

Il est intéressant de noter que contrairement à la fluorescence du tryptophane du peptide PIPB, qui diminuait en présence du PCNA, la fluorescence du Nile Red augmentait en présence de molécules possédant des zones hydrophobes plus importantes. Dans ce cas, le Nile Red n'interagissait pas directement avec les ADN polymérases testées, mais pouvait se localiser dans des cavités hydrophobes créées après mutation de la protéine.

III. Conclusion et perspectives

Les mesures en anisotropie nous ont permis de suivre la liaison du PCNA à l'ADN, en fonction de différents paramètres, tels que la température et la longueur de l'amorce d'ADN. Nous avons également pu comparer la liaison, à l'ADN, des ADN polymérases mutées au niveau du motif PYF box. Toutefois, une amélioration est à apporter afin que l'on puisse déterminer avec certitude les constantes d'association. Il faudra également réaliser les contrôles nécessaires pour valider les interactions ADN-protéine, et éliminer les artéfacts dus à l'interaction avec le fluorophore. Pour cela, l'expérience classique, sur laquelle nous nous sommes initié (données non montrées), est de réaliser une titration compétitive entre un ADN marqué et un ADN non marqué (LiCata & Wowor, 2008, Reid *et al.*, 2001). Lorsqu'on utilise un ADN amorcé, il existe trois zones d'interactions : la zone double brin, la zone simple brin et la jonction double-simple brin. Cette configuration rend plus complexe l'interprétation de l'interaction d'une protéine pour cet ADN.

A très court terme, l'anisotropie nous permettra d'étudier la liaison à l'ADN des différents facteurs protéiques impliqués dans la réplication de l'ADN, comme par exemple le RPA, nouvellement produit au laboratoire, et le PCNA, et ceci vis-à-vis de divers substrats ADN simple ou double brin. Tous les paramètres sont à envisager, comme la longueur de l'acide nucléique, même si celle-ci ne doit normalement pas dépasser 40 pb (LiCata & Wowor, 2008), ou encore l'affinité en fonction de la température. Egalement, il serait intéressant de suivre l'affinité des protéines pour différents types d'ADN comportant des erreurs. Il est à noter que

tout type d'acide nucléique est étudiable grâce à cette technique. On peut également étudier l'affinité d'une protéine pour une séquence particulière (Reid *et al.*, 2001) ou pour des substrats ADN endommagés (Gill *et al.*, 2007). Enfin, des travaux, axés sur l'étude des structures secondaires des acides nucléiques, sont tout à fait envisageables, à moyen terme, étant donné le peu de données disponibles à ce sujet. Ainsi, la technique d'anisotropie de fluorescence nous apportera une meilleure compréhension du comportement des protéines au niveau des pausings observés lors des tests d'extension d'amorce.

L'étude des interactions entre protéines, grâce au suivi de la fluorescence intrinsèque d'un peptide, est largement envisageable à court terme. Néanmoins, cette étude est à améliorer dans le sens où il faudra envisager d'autres mutations, au niveau du PCNA, pour pouvoir étudier un large éventail d'interactions différentes. Etant donné que le motif PIP box de l'ADN polymérase B est le seul à contenir un résidu tryptophane, cette étude ne pourra pas se porter sur d'autres protéines (par exemple le motif PIP box de la Pol D) et montre l'intérêt limité quant à l'étude de la liaison au PCNA.

La méthode de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) est également à envisager pour étudier le comportement du PCNA sur l'ADN, en utilisant un PCNA marqué (Laurence *et al.*, 2008). Différentes versions du PCNA, portant une cystéine permettant un greffage d'un fluorophore, sont d'ores et déjà disponibles au laboratoire. Par conséquent, le transfert d'énergie pourrait être mené entre un ADN marqué à la fluorescéine et un PCNA marqué à l'Alexa fluor[®] 350.

Conclusion générale

Les travaux réalisés, durant ce doctorat, ont porté sur les interactions entre les ADN polymérase B et D, de l'Archaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*, et leur facteurs accessoires, le PCNA et le RF-C. Les principaux résultats nous permettent de parfaire notre connaissance sur le complexe répliatif mis en place chez les Archaea.

L'interaction entre les ADN polymérase et leur facteur de processivité, le PCNA, a été étudiée fonctionnellement. Le motif PIP box, situé à l'extrémité C-terminale de la Pol B, est essentiel pour l'interaction au PCNA. L'interaction entre la Pol D et le PCNA se fait par l'intermédiaire de deux motifs. Le premier motif se situe à l'extrémité C-terminale et ne semble pas participer à la processivité de l'ADN polymérase. Le second motif se situe au niveau de l'extrémité N-terminale et ressemble à un motif PIP box palindromique. Ce motif, qui est pour la première fois décrit, paraît être important dans la liaison au PCNA et pour la processivité de l'ADN polymérase D.

La poche hydrophobe, formée au sein du PCNA par l>IDCL et le C-terminus, est le siège de toute interaction avec le facteur de processivité. Des travaux de mutagenèse dirigée au niveau de cette région ont permis, pour la première fois, de décrire fonctionnellement, chez les Archaea, les interactions des ADN polymérase au niveau du facteur de processivité.

La Pol D interagit spécifiquement au niveau de l'extrémité C-terminale du PCNA, tandis que la Pol B interagirait au niveau de l'extrémité C-terminale, mais aussi au niveau d'une autre zone qui reste à déterminer.

Une étude fonctionnelle du complexe formé entre l'ADN polymérase et ses deux facteurs, le RF-C et le PCNA, a été menée durant ce doctorat.

Alors que le RF-C n'a aucun effet sur la synthèse d'ADN polymérase B, il inhibe spécifiquement la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase D, uniquement en présence de PCNA. Cette inhibition est due au motif PIP box du RF-C et résulte d'une compétition entre les motifs PIP box de la Pol D et du RF-C vis-à-vis du PCNA. Le motif PIP box du RF-C, absent chez les eucaryotes, a la particularité, chez les Archaea, d'être relié au reste de la structure primaire par un long bras de résidus chargés. Il n'intervient directement, ni dans le chargement, ni dans le

déchargement du PCNA sur l'ADN. En revanche, il pourrait permettre le maintien de l'interaction avec le PCNA et former un complexe très stable sur l'ADN.

Un schéma récapitulatif de la réplication chez les Archaea, alimenté de résultats obtenus au sein du laboratoire et d'une étude bibliographique, est proposé et illustre les différentes phases du chargement du PCNA par le RF-C chez les Archaea.

Un motif, riche en glycines, qui a été impliqué dans les interactions de l'ADN polymérase δ avec le PCNA eucaryote, a été retrouvé chez toutes les ADN polymérases D. Ce motif, que nous avons renommé PYF box, a été caractérisé chez la Pol D de *P. abyssi*.

Il a été démontré que ce motif n'entrait pas dans les interactions avec le PCNA. En revanche, il est impliqué dans la thermostabilité de l'ADN polymérase D et pourrait participer aux interactions entre les deux sous-unités DP1 et DP2 de cette enzyme. De plus, ce motif PYF box est situé à proximité du site actif ; des travaux permettent de suggérer qu'il pourrait faire partie intégrante de la région impliquée dans la liaison à l'ADN.

Par ailleurs, pour la première fois, la grande sous-unité DP2 de la Pol D, qui est très peu soluble, a été exprimée et étudiée fonctionnellement. Néanmoins des travaux futurs sont nécessaires pour l'étude du complexe de l'ADN polymérase D.

Enfin, ce doctorat a permis de mettre place plusieurs techniques de fluorescence sur le spectrofluorimètre Edinburgh FLS920 dont s'est doté le laboratoire. L'utilisation d'une sonde de polarité, le Nile Red, a permis, notamment, de compléter les résultats sur la thermostabilité de la Pol D. Par ailleurs, des travaux préliminaires, en anisotropie de fluorescence, nous ont permis d'étudier la liaison de différentes protéines à l'ADN, selon différents paramètres, tels que la température et le type de substrat ADN. Cette technique nous offre de nombreuses perspectives quant à l'étude des complexes nucléoprotéiques.

Matériels et Méthodes

I. Techniques de culture cellulaire et de biologie moléculaire

I.1. Culture d'*Escherichia coli*

Différentes souches d'*E. coli* ont été utilisées pour le clonage et la production de protéines recombinantes : les cellules de stabilisation DH5 α (Invitrogen) et XL1-gold (Stratagene), ainsi que les cellules d'expression Rosetta (Novagen) et HMS 174 (DE3) pLysS.

Les bactéries ont été cultivées à 37°C, dans un milieu LB (Luria Bertani) liquide (cf. annexe 1), sous agitation (150 rpm), ou en milieu gélosé dans des boîtes de pétri (agar 1,5 %). Chaque milieu contenait le(s) antibiotique(s) approprié(s) permettant de sélectionner les plasmides d'intérêt (ampicilline 100 μ g/mL, chloramphénicol 34 μ g/mL, kanamycine 30 μ g/mL).

I.2. PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées sur un thermocycleur Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Les gènes d'intérêt ont été amplifiés, à partir de l'ADN génomique de *P. abyssi*, dans un volume total de 50 μ L, contenant 125 ng d'amorces spécifiques, 100 μ M de dNTP et 2,5 Unités de l'ADN polymérase *Pfu*. Cette polymérase est hautement fidèle, possédant une activité correctrice d'erreur (activité exo 3' \rightarrow 5') et permet une synthèse de 500 pb/min.

I.3. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique a été extrait, à partir des suspensions bactériennes transformées, à l'aide des kits QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) et QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen), respectivement, pour les petits volumes (2 mL) et les grands volumes (50 mL) de production. L'extraction plasmidique repose sur une technique de lyse cellulaire alcaline.

I.4. Visualisation de l'ADN plasmidique

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN de tailles comprises entre 0,2 et 50 kpb. Les fragments d'ADN, après ajout d'une solution de dépôt 6 X (cf. annexe 2), ont été déposés sur un gel d'agarose à 0,8 %, dans un tampon Tris-acétate 1 X (TAE : Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM pH 8, acide acétique glacial 0,1 %). L'électrophorèse a

été réalisée sous un voltage constant de 110 V. Le bromure d'éthidium (BET) a été directement incorporé et les bandes d'ADN ont été visualisées sous Ultraviolet, à l'aide d'un GEL Doc 2000 (Bio-Rad) couplé à une caméra CCD. Un marqueur de taille SmartLadder (200 - 10 000 pb, Eurogentec) a été déposé sur le même gel, afin d'estimer la taille et la quantité des fragments d'ADN.

I.5. Coupure de l'ADN par des enzymes de restriction

Les différentes enzymes de restriction disponibles au laboratoire provenaient du même fournisseur (New England Biolabs). Les incubations ont été réalisées selon les recommandations de ce fournisseur, et en règle générale à 37°C, pendant 1 h, dans le tampon dans lequel leur activité est optimale. Pour vérifier la présence du gène d'intérêt, une double coupure a été réalisée, par deux enzymes de restriction différentes, dans le tampon commun optimal selon les indications du fournisseur.

I.6. Clonage dans un vecteur d'expression

I.6.1. Vecteur d'expression

Les différents vecteurs d'expression, utilisés lors des travaux, étaient le pET25b(+), le pET26b(+), et le pET28a(+) (Novagen). Ces plasmides possèdent un gène conférant une résistance à l'ampicilline pour pET25b(+), ou à la kanamycine pour pET26b(+) et pET28a(+). De plus, les plasmides possèdent une région contenant une multitude de sites de clonage uniques, ainsi que le promoteur T7, situé en amont du gène cloné, et reconnu par l'ARN polymérase du phage T7.

I.6.2. Préparation des inserts et des plasmides

Avant d'être inséré dans le plasmide, le gène d'intérêt a subi une double digestion par deux enzymes de restriction. Le vecteur d'expression a été linéarisé par les mêmes enzymes. Les produits de réaction ont ensuite été séparés sur gel d'agarose à 0,8 % (p/v). Les bandes correspondant à l'insert et au vecteur linéarisé ont été découpées avant d'être purifiées à l'aide du kit QIAquick PCR purification (Qiagen).

I.6.3. Ligature du vecteur linéarisé et des inserts digérés

Le volume réactionnel de 20 μL contenait : 2 μL de tampon 10 X, 1 μL de T4 ADN ligase (Promega), x μL de plasmides linéarisés, y μL d'inserts digérés. Les quantités x et y ont été choisies de manière à avoir un rapport y/x égal à 3. La réaction de ligature a été réalisée pendant une nuit, à 16°C.

I.7. Transformation dans des cellules compétentes

I.7.1. Cellules de stabilisation

Le mélange réactionnel de ligature a été ajouté à 50 μL de cellules compétentes DH5 α (Novagen) ou XL1-gold (Stratagene). Le mélange a été incubé pendant 30 min à 4°C, puis pendant 45 sec à 42°C, et enfin pendant 2 min à 4°C. Cette suspension, à laquelle 800 μL de milieu SOC (cf. annexe 1) ou de milieu LB ont été ajoutés, a été incubée pendant 1 h à 37°C, sous agitation à 200 rpm. De 50 à 350 μL de suspension bactérienne ont été étalés sur une boîte de pétri LB-agar contenant l'antibiotique sélectif. Les boîtes ont été incubées pendant une nuit à 37°C.

Les clones obtenus ont été contrôlés par extraction plasmidique, suivie d'une double digestion par des enzymes de restriction. Les clones positifs, portant le gène d'intérêt, ont été conservés pendant 24 h à -20°C, puis à -80°C dans du milieu LB- glycérol 20 % (v/v).

I.7.2. Cellules d'expression

L'ADN plasmidique, issu d'une extraction en grand volume (50 mL), a été intégré dans des cellules d'expression, également par choc thermique. La transformation des cellules HMS174 (DE3) pLysS a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour les cellules de stabilisation. La transformation des cellules Rosetta (Novagen) a été effectuée dans les conditions suivantes : 5 min à 4°C, 30 sec à 42°C puis 2 min à 4°C. Cette suspension, à laquelle 800 μL de milieu SOC ou de milieu LB ont été ajoutés, a été incubée pendant 1 h à 37°C, sous agitation à 200 rpm, avant étalement sur boîte de pétri.

I.8. Mutagenèses dirigées

I.8.1. Stratégies de clonage

Les mutations, concernant la délétion de la région PIP box des ADN polymérases, consistaient à introduire un codon stop à la place du codon correspondant à la lysine, située juste

en amont du motif PIP box, à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase B et de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D (Tableau 3). Cette mutation a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire (Rouillon, 2006). La souche comportant le plasmide d'intérêt était conservée à -80°C.

Protéines	Mutations au niveau de la PIP box
<i>PabPol B</i>	⁷⁴⁶ PAVERILRAFGYRKEDLKYQKTK QVGLGAWLKF ₇₇₈
<i>PabPol B</i> Δpip	⁷⁴⁶ PAVERILRAFGYRKEDLKYQKT ₇₆₇
<i>PabPol D</i>	¹⁴²¹ TEKAEKAEKPRKKSDEKPKKKR VISLEEFFSRKSK ₁₄₅₅
<i>PabPol D</i> Δpip	¹⁴²¹ TEKAEKAEKPRKKSDEKPK ₁₄₃₉

Tableau 3 : Mutations réalisées au niveau du motif PIP box, situé à l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase B et de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D. Les motifs PIP box sont notés en bleu.

Les mutations concernant la modification de la région PYF box, au niveau de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D, consistaient à substituer les acides aminés incriminés par des alanines. Ainsi pour *PabPol D*mut1, les résidus choisis étaient les glycines en position 934 et 941 et pour *PabPol D*mut2, en plus de ces deux mutations, la tyrosine 946 et la phénylalanine 947 (Tableau 4).

Protéines	Mutations au niveau de la PYF box
<i>PabPol D</i>	⁹²⁴ TSAGIVGRII GFVDALVGYAHPYF HAAK ₉₅₁
<i>PabPol D</i> mut1	⁹²⁴ TSAGIVGRII AFVDALVAYAHPYF HAAK ₉₅₁
<i>PabPol D</i> mut2	⁹²⁴ TSAGIVGRII AFVDALVAYAHPAA HAAK ₉₅₁

Tableau 4 : Mutations réalisées au niveau du motif PYF box de l'ADN polymérase D. Les acides aminés, déterminant le motif PYF box, sont notés en bleu. Les substitutions en alanine sont notées en rouge.

Les mutations concernant la délétion de l'extrémité N-terminale de l'ADN polymérase D consistaient à introduire un site de restriction NdeI juste en aval de la séquence palindromique PIP box (Tableau 5).

Protéines	Mutation au niveau du N-terminus
<i>PabPol D</i>	₁ MELPKEMEEYEMLQREIDKAYEIAKKAR ₂₉
<i>PabPol DNcut</i>	₂₃ MI _{AKKAR} ₂₉

Tableau 5 : Mutation réalisée au niveau du motif PIP box situé de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité de l'ADN polymérase D. Le motif PIP box est noté en bleu. La méthionine remplaçant ce motif est notée en rouge.

Le gène comportant la mutation a ensuite été digéré par NdeI et réintroduit dans le plasmide pET25b+. Enfin, le gène a été cotransformé dans *E. coli* HMS174(DE3) pLysS avec le plasmide pET28a+ contenant le gène codant pour la petite sous-unité de la *PabPol D* (Figure 43).

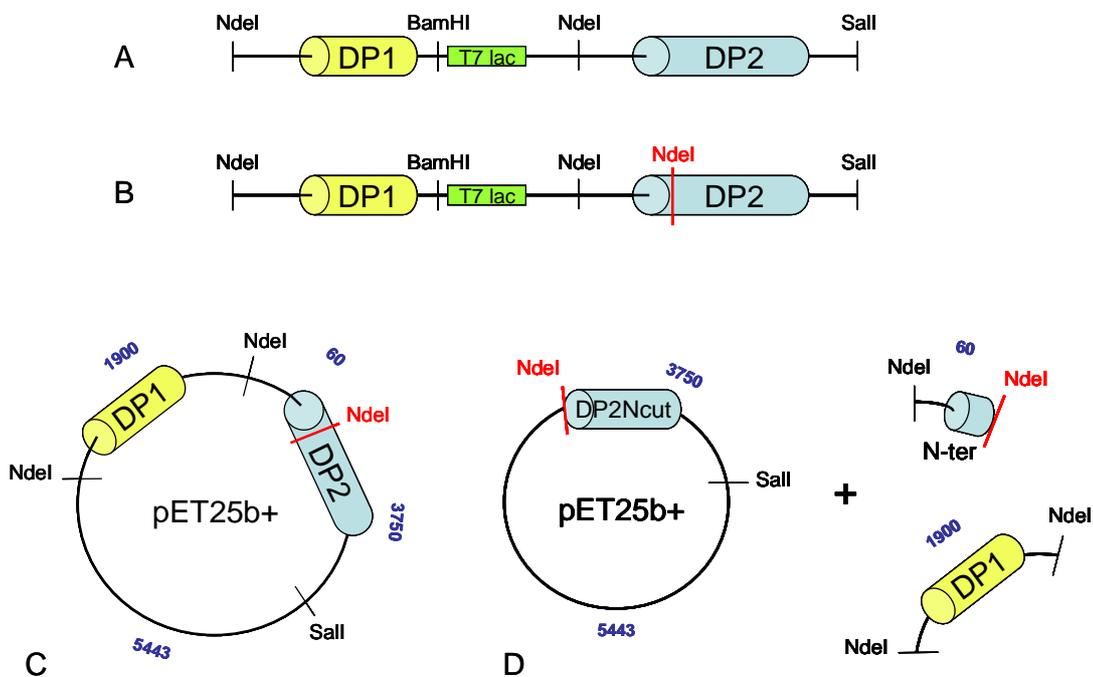


Figure 43 : Stratégie de clonage pour la construction du gène codant pour l'ADN polymérase DNcut. A) Construction du gène codant pour *PabPol D* (Gueguen *et al.*, 2001) ; B) Mutation au niveau de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité DP2, permettant la création d'un site NdeI (noté en rouge); C) Construction du plasmide contenant les gènes codant pour les deux sous-unités DP1 et DP2 de *PabPol D*, avec présence du nouveau site NdeI ; D) Digestion par NdeI permettant la création d'un plasmide comportant le gène codant pour la grande sous-unité DP2Ncut de taille totale de 9200 pb environ. Les tailles des différentes portions d'ADN bornées sont notées en bleu.

Les différentes étapes de la construction de l'ADN polymérase Ncut sont présentées ci-dessous. La méthodologie appliquée est détaillée dans les parties précédentes. Tout d'abord, la digestion du plasmide pET25b+, contenant les gènes codant pour les sous-unités DP1 et DP2 de *PabPol D*, avec la présence du nouveau site NdeI, a été réalisée par l'enzyme NdeI (New England Biolabs) (Figure 44A). La bande correspondant au plasmide pET25b+, contenant le

gène codant pour la sous-unité DP2 dépourvue de son extrémité N-terminale, a ensuite été purifiée (Figure 44B). Le fragment d'ADN purifié a ensuite été ligaturé, avant d'être transfecté dans les cellules XL1-gold. Les différents clones obtenus ont été remis en suspension, dans un petit volume de 2 mL de culture, avant d'en extraire l'ADN. Les plasmides extraits ont ensuite été digérés par l'enzyme NdeI (Figure 44C). Suite à cette digestion, seul le clone n°3 comportait le plasmide pET25b+, contenant le gène d'intérêt (9200 pb environ). Le clone n°3 a été conservé à -80°C avant d'être remis en suspension dans un grand volume de 50 mL de culture, avant d'en extraire l'ADN. Le plasmide extrait a ensuite été cotransfecté avec le plasmide pET28a+, contenant le gène codant pour la sous-unité DP1. Les clones obtenus ont été remis en suspension dans un petit volume de 2 mL de culture et une vérification de la présence des deux plasmides d'intérêt a été effectuée, grâce à deux digestions indépendantes par les enzymes NdeI (Figure 44D) et SalI (New England Biolabs) (Figure 44E). À l'issue de cette double vérification, seul le clone n°2 contenait les deux plasmides d'intérêt pET25b+/DP2Ncut et pET28a+/DP1, faisant respectivement 9200 pb et 7300 pb. Il a été conservé dans les cellules HMS174 (DE3) pLysS à -80°C.

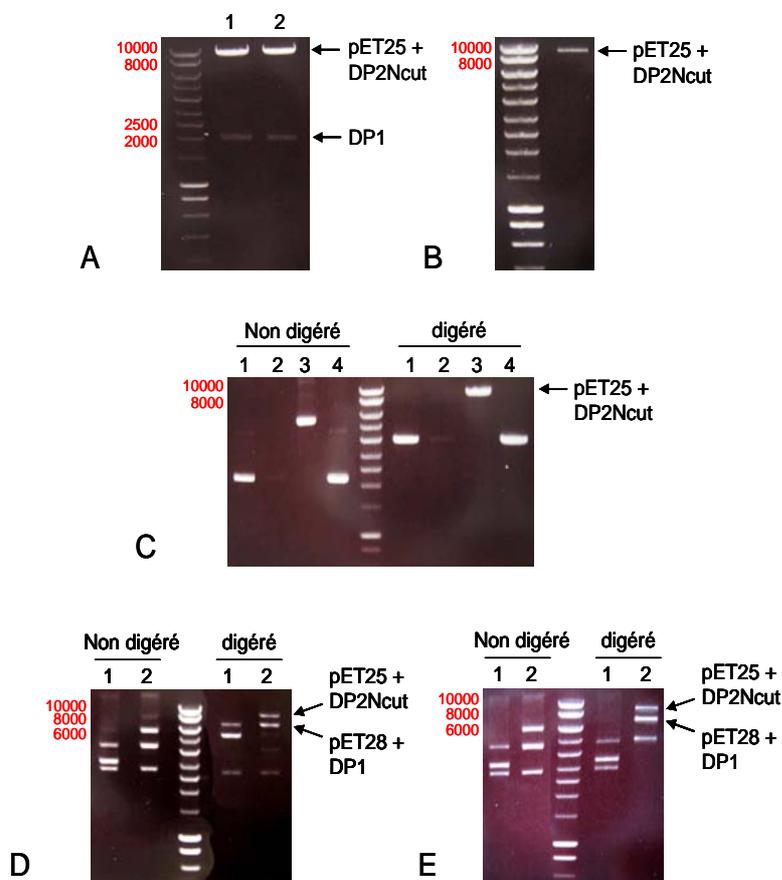


Figure 44 : Construction de l'ADN polymérase DNcut.

A) Digestion du plasmide pET25b+ contenant les gènes codant pour les sous-unités DP1 et DP2 de *PabPol D*, avec la présence du nouveau site NdeI ; B) Purification de la bande correspondant au gène codant pour la sous-unité DP2 Ncut contenue dans le plasmide pET25b+ ; C) Digestion par NdeI de l'ADN extrait de plusieurs clones ; D) Digestion par NdeI de l'ADN extrait de deux clones ; E) Digestion par SalI de l'ADN extrait de deux clones ayant subi la cotransformation.

Les mutations, concernant les domaines d'interaction du PCNA, consistaient à substituer les acides aminés incriminés par des alanines. Nous avons choisi de modifier deux zones qui constituent la poche hydrophobe, le C-terminus et l'IDCL (Tableau 6). Ainsi, pour PR245, il s'agissait de la proline 245 et de l'arginine 246, situées au niveau de l'extrémité C-terminale. Ensuite, trois mutations différentes ont été créées, afin de cribler la totalité de l'IDCL. Il s'agissait ainsi pour EIE120 de la glutamine 120, de l'isoleucine 121 et de la glutamine 122. Ensuite, pour VDL123, il s'agissait de la valine 123, de l'acide aspartique 124 et de la leucine 125. Et enfin, pour EL127, l'acide glutamique 127 et de la leucine 128 ont également été remplacés par une alanine. Par ailleurs, pour E224, la glutamine 224 situé sur une boucle intermédiaire a été remplacée par une alanine.

Protéines	Mutations au niveau de l'IDCL
PCNA	¹¹⁵ LIDVEEIEVDLPELPFT ₁₃₁
EIE120	¹¹⁵ LIDVE AAA VDLPELPFT ₁₃₁
VDL123	¹¹⁵ LIDVEEIE AA PELPFT ₁₃₁
EL127	¹¹⁵ LIDVEEIEVDLP AA PFT ₁₃₁
Protéines	Mutations au niveau du C-terminus
PCNA	²⁴³ LAPRVEE ₂₄₉
PR245	²⁴³ LAA VEE ₂₄₉

Tableau 6 : Mutations réalisées au niveau de la poche hydrophobe (IDCL et C-terminus) du PCNA. Les substitutions en alanine sont notées en rouge.

I.8.2. Conditions de PCR

La mutagenèse dirigée a été effectuée avec le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) pour les versions mutantes du PCNA. Un kit spécial pour les grands fragments, QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), a été utilisé pour chaque version mutante de l'ADN polymérase D, étant donné que le plasmide comportant le gène codant pour l'ADN polymérase D fait 11220 pb.

La PCR a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les amorces choisies, ainsi que les conditions de PCR, pour chaque mutant produit au cours du doctorat, sont répertoriées dans le tableau 7. Les oligonucléotides servant d'amorce ont été synthétisés par Eurogentec.

Protéine sauvage	Nom	Amorces	Conditions de PCR
ADN polymérase D	PabPol Dmut1	5'-AGGATAATAGCCTTTGTCGATGCCCTAGTTG <u>CTTACGCT</u> -3' et 3'-TCCTATTATCGGAAAC AGCTACGGGATCAACGAATGCGA-5'	1 cycle: 95°C, 1 min 18 cycles: { 95°C, 50 sec 60°C, 50 sec 68°C, 12 min 1 cycle: 68°C, 7 min
	PabPol Dmut2	5'-GCCCTAGTTGGTTACGCTCACCCCGCGCCC ACGCTGCG-3' et 3'-CGGGATCAACCAATG CGAGTGGGGCGGCGGGTGCACGC-5'	idem
	PabPol DNcut	5'-CAGAGGGAGATAGATAAGGCCCATATGATA GCTAAAAAGGCGAGG-3' et 3'-GTCTCCCTC TATCTATCCGGGTATACTATCGATTTTCCGCT CC-5'	idem

Protéine sauvage	Nom	Amorces	Conditions de PCR
PCNA	PR245	5'-TGATATTCCTCCTGGCTGCCGCGTTGAGGAG- 3' et 3'-GACTATAAGGAGGACCGACGCGCCAAC TCCTC-5'	1 cycle: 95°C, 30 sec 16 cycles: { 95°C, 30 sec 55°C, 1 min 68°C, 7 min 1 cycle: 68°C, 7 min
	VDL123	5'-GAGGAGATCGAAGCTGCCGCGCCAGAGTTAC CC-3' et 3'-CTCCTCTAGCTTCGACGCGCGGTCTC AATGGG-5'	idem
	EL127	5'-ATCGAAGTTGACTTGCCAGCGGCACCCTTAC G-3' et 3'-TAGCTTCAACTGAACGGTCGCCGTGG GAAGTGC-5'	idem
	E224	5'-ACGATAAAGTTCGGAAACCGATGCCGATGC AAATGGAG-3' et 3'-TGCTATTTCAAGCCTTTGCG CTACGGCTACGTTTACCTC-5'	idem
	EIE120	5'-ATAGATGTTGAGGCGGCCGAGTTGACTTGCC AGAG-3' et 3'-ATCTACAACCTCCGCGCGTCAAC TGAACGGTCTC-5'	idem

Tableau 7 : Conditions de PCR utilisées pour l'obtention des plasmides portant les gènes codant pour les versions mutées de l'ADN polymérase D et du PCNA. Les codons mutés sont soulignés.

I.9. Séquençage de l'ADN

Afin de s'assurer de la présence des mutations désirées et qu'il n'y a pas eu de mutations ponctuelles au niveau des gènes d'intérêts, un séquençage a été réalisé sur les ADN plasmidiques. Les amorces flanquantes à l'insert, le T7 promoter primer #69348-3 et le T7 terminator primer #69337-3, ont été utilisées. Ce séquençage a été effectué par Cogenics.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du serveur (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>), par alignement avec les séquences des gènes natifs obtenues à l'aide du serveur (<http://www.ebi.ac.uk/Databases/nucleotide.html>).

II. Techniques de biochimie

II.1. Techniques de production des protéines recombinantes

II.1.1. Expression des protéines par un système de traduction *in vitro* (RTS)

Le système RTS (Rapid Translation System) permet d'exprimer des protéines *in vitro* en moins de 24 h, en se reposant sur le couplage des réactions de transcription et de traduction. L'apport des réactifs et des composés énergétiques se fait à travers une membrane de dialyse semi-perméable séparant les deux compartiments de l'enceinte réactionnelle. La production des PCNA mutés a été effectuée à l'aide du kit RTS 500 *E. coli* HY (Roche Diagnostics) (Figure 45). Le compartiment réactionnel était composé du lysat bactérien (apport en ribosomes+ facteurs...), de l'ARN polymérase du phage T7 pour la transcription et de 10 µg de plasmide portant le gène codant pour le PCNA. L'autre compartiment, alimentant la réaction, était composé des substrats nécessaires à la traduction (substrats énergétiques, ARN de transfert, acides aminés). La cuve a été incubée pendant 22 h à 30°C, sous une agitation de 990 rpm, dans le Proteomaster (Roche).



Figure 45 : Système RTS ProteoMaster 500.

II.1.2. Expression des protéines recombinantes en grand volume

L'ADN polymérase B, qui est commercialisée par Q-BIOgene (MPBiomedicals), et l'ADN polymérase D, qui est issue d'une production effectuée selon (Gueguen *et al.*, 2001), étaient disponibles à mon arrivée au laboratoire.

Le RF-C et le PCNA sauvages ainsi que le RF-C Δ pip ont été exprimés et purifiés selon (Henneke *et al.*, 2002). Le PCNA, tagué histidine, a été exprimé et purifié selon (Mesiet-Cladiere *et al.*, 2007). Enfin, l'ADN polymérase B Δ pip a été exprimée et purifiée selon (Rouillon, 2006).

Les différentes ADN polymérases mutantes ont été produites dans un volume de 3 L de milieu LB. Une préculture de 2 mL, dans du milieu LB, a été réalisée à 37°C, sur la nuit, par un ensemencement des cellules d'expression d'*E. coli* (Rosetta ou HMS174 (DE3)) contenant le

plasmide pET25b(+) ou le plasmide pET28a(+) portant le gène d'intérêt. Ensuite une cascade de précultures a été réalisée jusqu'au volume de production (3 L). L'induction a été effectuée à une DO_{600nm} de 0,6 avec 1 mM d'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Pour chaque préculture, une quantité déterminée d'antibiotique de sélection a été ajoutée.

La sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D a également été produite selon le même protocole. Une préculture de 2 mL, dans du milieu LB, a été réalisée à 37°C, sur la nuit, par un ensemencement des cellules d'expression d'*E. coli* (HMS 174 (DE3)) contenant le plasmide pET28b+ portant le gène d'intérêt. A partir de cette préculture, une série d'ensemencements a été réalisée jusqu'au volume de production (3 litres). Après une centrifugation de 40 min à 6000 rpm, les culots bactériens ont été remis en suspension dans un tampon de broyage (Tris-HCl pH8, 50 mM, β -mercaptoéthanol 2 mM, et un mélange d'inhibiteurs de protéases («complete», Roche Diagnostics). La lyse des cellules a été effectuée à l'aide d'une presse de French (Aminco[®] –SLM Instruments) à une pression de 1000 PsiG, suivie d'une centrifugation de 45 min à 12000 rpm à 4°C, puis d'un chauffage à 80°C pendant 15 min afin d'éliminer les débris cellulaires et la plus grande partie des protéines bactériennes.

II.1.3. Expression des protéines recombinantes en petit volume

Pour l'expression en petits volumes (2 mL ou 50 mL) de la grande sous-unité (DP2) de l'ADN polymérase D, les conditions expérimentales étaient identiques à celles décrites ci-dessus, sauf pour la lyse cellulaire, qui a été effectuée par ultrasons à l'aide d'un sonicateur Vibra-Cell[™] 72408 (Bioblock scientific).

II.2. Purification des protéines recombinantes

II.2.1. Purification de protéines exprimées par RTS

Dans le cas de l'expression de protéines par RTS, une phase de purification par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) n'était pas nécessaire, étant donné que seule la protéine d'intérêt est exprimée. L'échantillon récupéré dans l'enceinte réactionnelle a néanmoins été soumis à un chauffage de 15 min à 75°C, puis centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. Une dialyse de 2 x 2 h a été réalisée dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, DTT 1 mM, NaCl 0,5 M. Une vérification en SDS-PAGE a été réalisée sur les PCNA mutés au niveau de la poche hydrophobe (cf. Matériels et Méthodes, II.4.1.) (Figure 46A). Afin de s'assurer de la trimérisation des PCNA, une vérification sur gel natif a également été réalisée (cf. Matériels et Méthodes, II.4.2) (Figure 46B). Les trimères sont majoritaires, même si nous pouvons apercevoir

les PCNA sous forme de dimères et de monomères. Les protéines ont été conservées à -20°C dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, DTT 1 mM, NaCl 0,5 M.

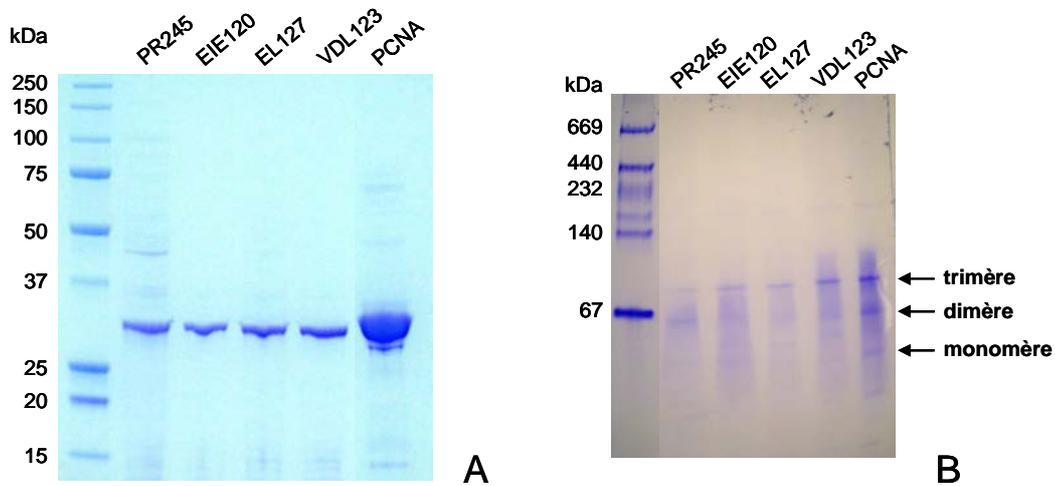


Figure 46 : Analyse par SDS-PAGE 12% (A) et par PAGE (B) des PCNA mutés produits par RTS.

Dans le cadre de l'étude d'un PCNA fluorescent, le PCNA a tout d'abord été exprimé par RTS, suivant les conditions présentées précédemment, puis a subi une réaction de marquage par greffage du fluorophore TMR (cf. Matériels et Méthodes, II.14.4.). La fraction protéique a ensuite été déposée sur une colonne HiprepTM Q FF (16 cm x 10 cm), équilibrée dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM. L'élution a été réalisée, à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, par l'application d'un gradient de concentration en NaCl de 0 à 1 M. Les fractions colorées magenta (couleur du TMR) ont été rassemblées et concentrées sur Centriprep-10 (Millipore). Ensuite, afin d'éliminer le sel et l'excès de TMR, la fraction protéique a été déposée sur une colonne HiprepTM 26/10 Desalting à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, NaCl 0,5 M (Figure 47A). Les fractions colorées et correspondant au pic d'absorption ont été rassemblées. La protéine finale a été concentrée à l'aide du système Centriprep-10 (Millipore) et conservée à -20°C . Un suivi de purification a été réalisé sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 47B).

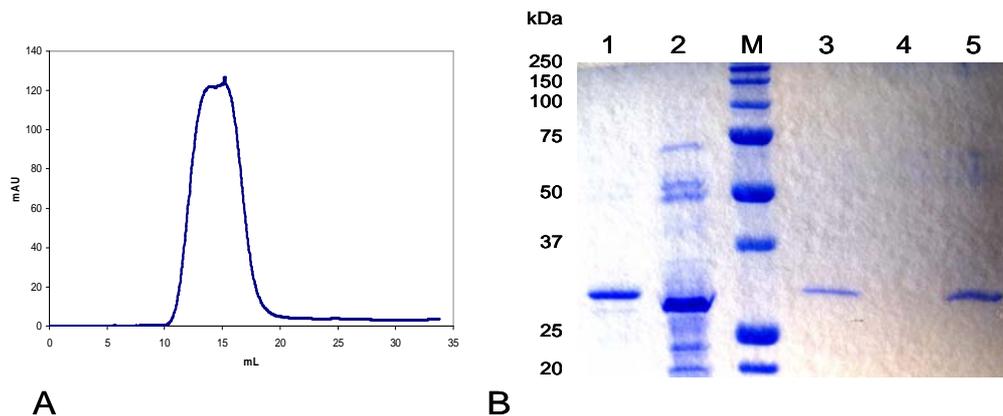


Figure 47 : Purification du PCNA marqué au TMR.

A) Profil d'élution sur colonne de désalage. Le pic correspondait aux fractions contenant le PCNA marqué (coloration magenta) ; B) Analyse en SDS-PAGE 12 %. 1, PCNA marqué et concentré ; 2, fraction avant chauffage ; 3, fraction avant passage sur colonne de désalage ; 4, éluât de concentration ; 5, PCNA non marqué utilisé comme témoin.

II.2.2. Purification des ADN polymérases

Les différentes ADN polymérases recombinantes ont été purifiées sur un système FPLC (Äkta, Amersham). Les extraits protéiques ont été déposés sur une colonne Hiprep™ Q FF (16 cm x 10 cm) équilibrée dans un tampon NaP 50 mM, pH 6,5, DTT 1 mM. L'élution a été réalisée, à un débit de 1 mL.min⁻¹, par l'application d'un gradient de concentration en NaCl de 0 à 1 M. Une deuxième étape de purification a été réalisée, dans les mêmes conditions de débit et de tampon, sur une colonne Heparin™ Hiprep (Amersham Biosciences). Après chaque étape de purification, un test d'activité a été réalisé sur les fractions en sortie de colonne (cf. Matériels et Méthodes, II.8.1.). Les fractions ayant une forte activité ont été rassemblées et concentrées à l'aide des systèmes Centriprep-10 puis Centricon-10 (Millipore). Les différentes étapes de la purification des ADN polymérases sont illustrées sur la figure 48 où seule la purification de l'ADN polymérase Dmut1 est présentée. Enfin les protéines ont été conservées dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 1 mM, Glycérol 55% (v/v) et conservées à -20°C.

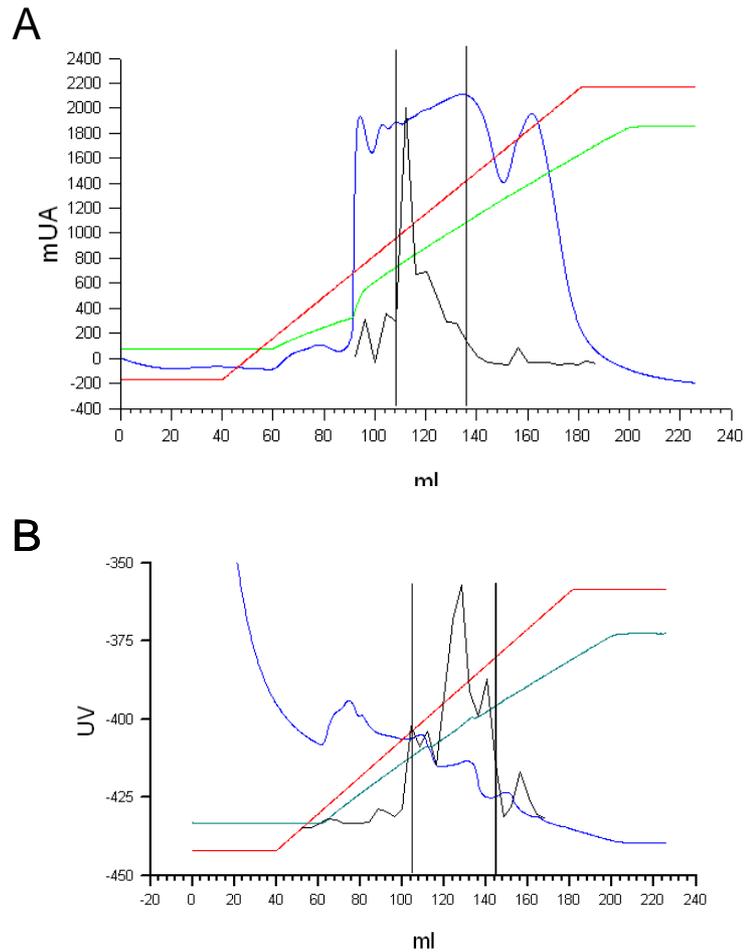


Figure 48 : Purification de l'ADN polymérase Dmut1.

A) profil d'éluion sur colonne HiPrep Q FF. B) profil d'éluion sur colonne d'Heparin. En rouge, la courbe théorique du gradient de NaCl, en vert la conductance et en noir l'activité ADN polymérasique. Les fractions comprises entre les séparateurs ont été collectées.

Le suivi de la purification de la Pol Dmut1 a été analysé sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 49). Nous pouvons constater que les bandes correspondant aux protéines d'intérêt présentent de légères stries signifiant la présence d'ADN dans les fractions collectées.

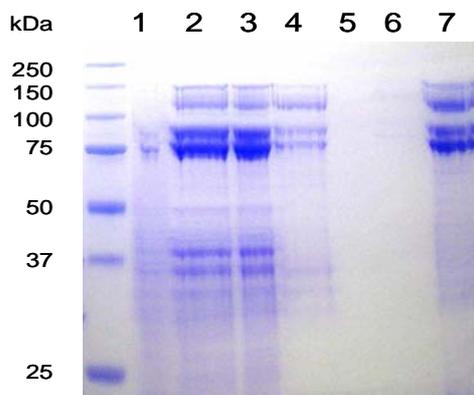


Figure 49 : Profil de purification de la Pol Dmut1 par analyse en SDS-PAGE à 12 %.

1, après choc thermique ; 2, après passage sur colonne HiPrep Q FF ; 3, après dialyse ; 4, après passage sur colonne Heparin ; 5, éluât de concentration Centriprep-10 ; 6, éluât de concentration Centricon-10 ; 7, protéine finale concentrée.

Afin d'éliminer l'ADN, un autre protocole a été mis en place, par la suite, pour les purifications de toutes les ADN polymérase D. Pour cela, après passage à la presse French, une DNase (Promega) été ajoutée à la fraction contenant la protéine d'intérêt puis l'extrait a été incubé, pendant 1 h à 37°C. L'extrait protéique a ensuite été déposé sur une colonne de Hiprep™ Q FF (Amersham Biosciences), dans les conditions décrites précédemment. L'étape finale de purification a été réalisée sur une colonne de Superdex 200™ (Amersham Biosciences), équilibrée dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8. Les fractions comportant la protéine d'intérêt ont été rassemblées et concentrées à l'aide du kit Centriprep-10. Seul le suivi de purification de l'ADN polymérase D Δ pip est présenté sur la figure 50. Les protéines ont été reprises dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 1 mM, Glycérol 55% (v/v) et conservées à -20°C.

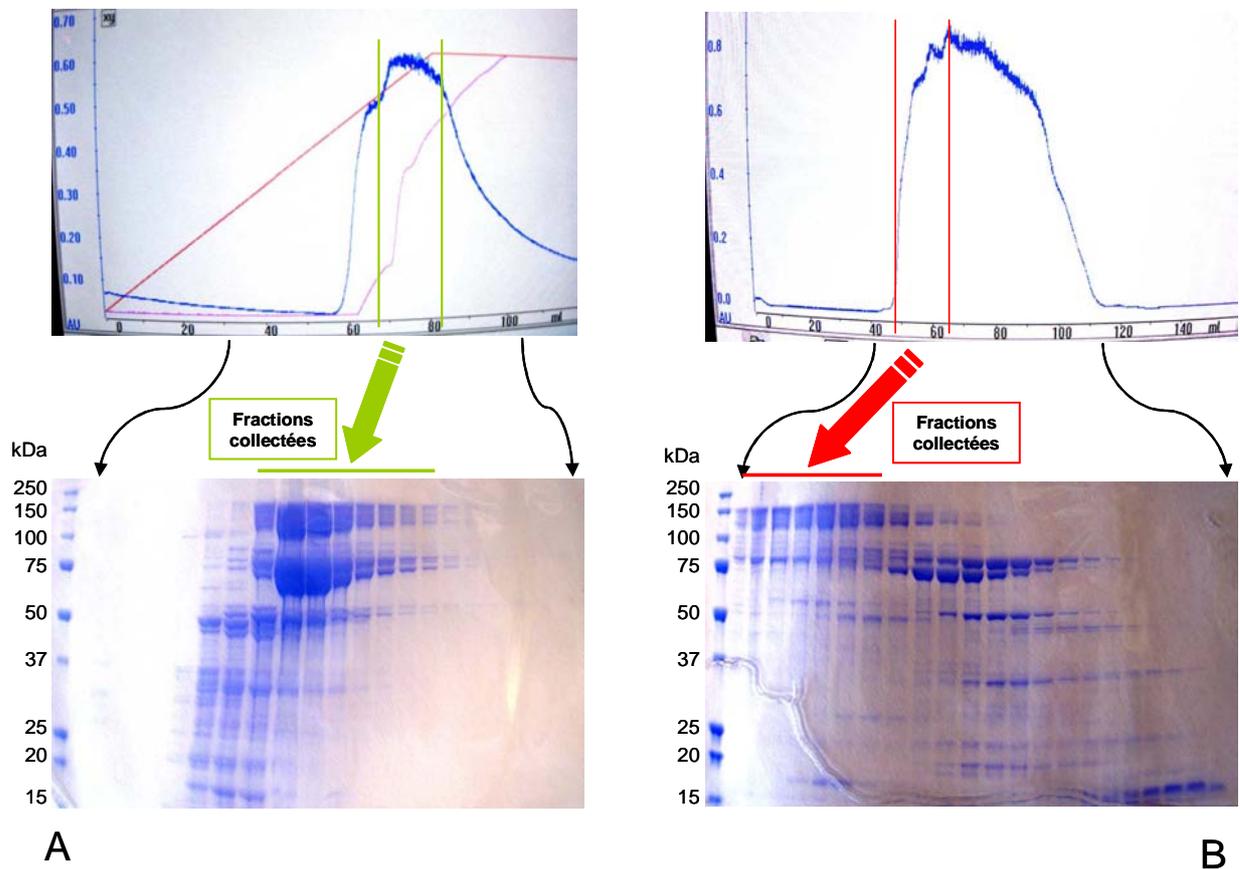


Figure 50 : Purification de l'ADN polymérase D Δ pip.

A) (haut) profil d'éluion sur colonne Hiprep Q FF ; en rouge, la courbe théorique du gradient de NaCl, en vert la conductance ; (bas) analyse en SDS-PAGE 12 % B) (haut) profil d'éluion sur colonne Superdex200 ; (bas) analyse en SDS-PAGE 12 %. Les fractions comprises entre les séparateurs ont été collectées.

Le suivi de la purification de l'ADN polymérase Dmut1 est illustré sur la figure 51. Nous pouvons constater ici que les deux sous-unités sont légèrement dégradées.

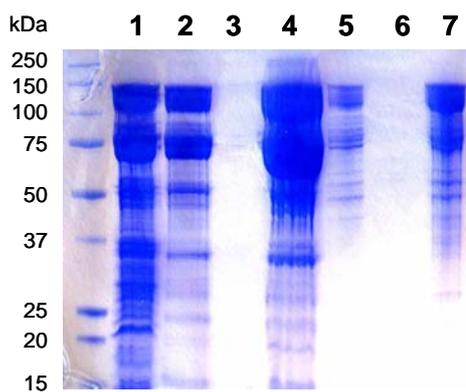


Figure 51 : Suivi de purification de l'ADN polymérase D Δ pip par analyse en SDS-PAGE.

1, après choc thermique ; 2, après passage sur colonne Hiprep Q FF ; 3, éluât de concentration Centriprep-10 ; 4, après dialyse ; 5, après passage sur colonne Superdex 200 ; 6, éluât de concentration Centricron-10 ; 7, protéine finale concentrée.

Un autre protocole de purification a été utilisé pour la petite sous-unité (DP1) de l'ADN polymérase D. Les extraits protéiques ont été déposés sur une colonne Histrap™ de 5 ml (Amersham Biosciences), équilibrée avec le tampon A (Na(P) pH 6,5, 50mM, DTT 1 mM, imidazole 20 mM). L'éluion a été réalisée, à un débit de 1 mL.min⁻¹, par l'application d'un gradient de concentration en imidazole de 20 à 500 mM dans le tampon B (Na(P) pH 6,5, 50 mM, DTT 1 mM, imidazole 500 mM). Une deuxième étape de purification a été réalisée à un débit de 1 mL.min⁻¹ et dans le tampon A, sur une colonne Heparin™ Hiprep (Amersham Biosciences). L'éluion a été réalisée, par l'application d'un gradient de concentration en NaCl dans le tampon B. Une dialyse (2 x 2 h) a été réalisée dans le tampon suivant : Tris-HCl pH 8, 20 mM, DTT 1mM. Une analyse des fractions obtenues a été réalisée par SDS-PAGE afin de vérifier la pureté de la protéine (Figure 52). Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été rassemblées et concentrées à l'aide du kit Centriprep-10 (Millipore). Au final, la protéine concentrée a été conservées à -20°C dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 1 mM, glycérol 55% (v/v).

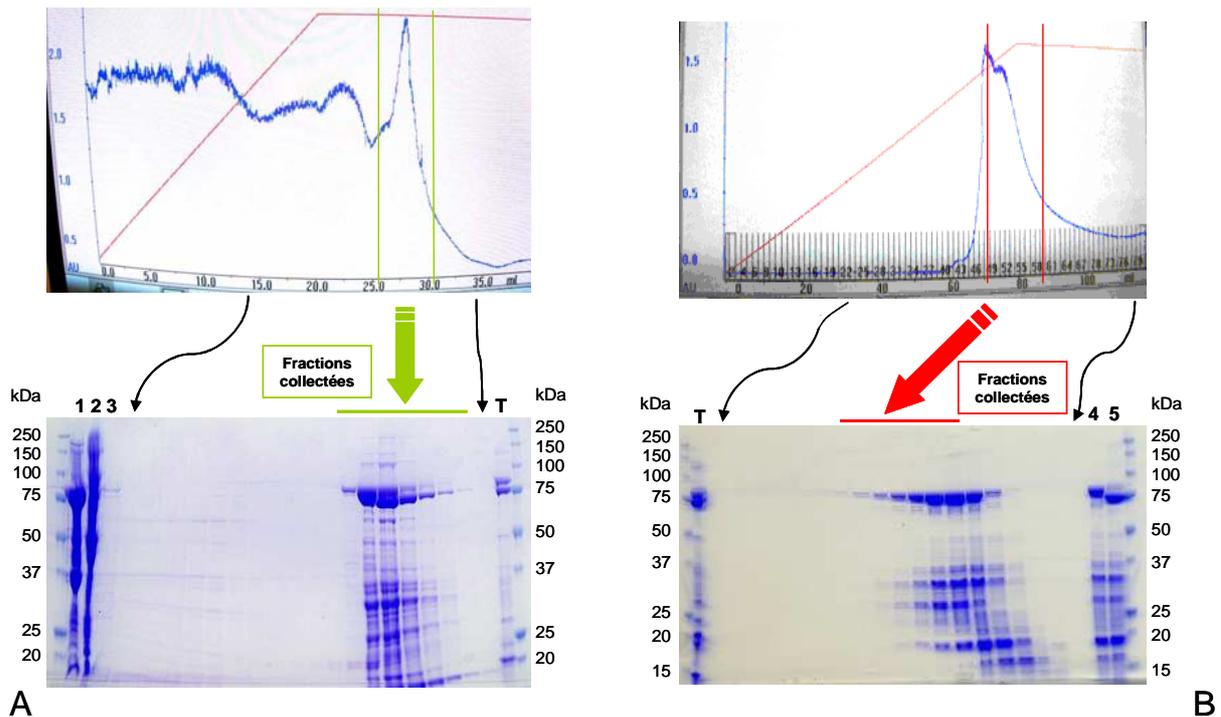


Figure 52 : Purification de la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D.
 A) (haut) profil d'éluion sur colonne Histrap™. La courbe théorique du gradient en imidazole est représentée en rouge; (bas) analyse en SDS-PAGE 12 % B) (haut) profil d'éluion sur colonne Heparin ; (bas) analyse en SDS-PAGE 12 %. La courbe théorique du gradient de NaCl est représentée en rouge. Les fractions comprises entre les séparateurs ont été collectées.

Le suivi de la purification de la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D est illustré sur la figure 53. Nous pouvons constater que de nombreux contaminants sont encore présents, toutefois nous avons pris la décision d'arrêter la purification à ce stade.

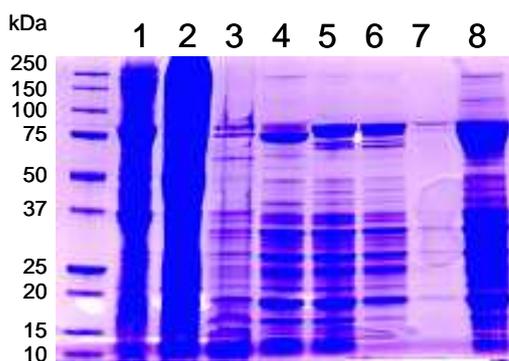


Figure 53 : Suivi de purification de la sous-unité DP1 de l'ADN polymérase D par analyse en SDS-PAGE 12 %.
 1, après passage à la presse de French ; 2, culot issu du choc thermique ; 3, après choc thermique ; 4, après passage sur colonne Histrap ; 5, après dialyse ; 6, après passage sur colonne Heparin ; 7, éluât de concentration Centriprep-10 ; 8, protéine finale concentrée.

Les grandes sous-unités des ADN polymérases D, sauvage et mutées au niveau de du motif PYF box, ont été exprimées en volume de 50 mL, en partie à cause de leur problème de solubilité. Après choc thermique, les fractions protéiques ont été dialysées dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, DTT 1 mM. La concentration estimée était de à 65 μ M pour chacune

des sous-unités DP2. La présence des protéines a été révélée par Western Blot (cf. Matériels et Méthodes, II.5.) (Figure 54).

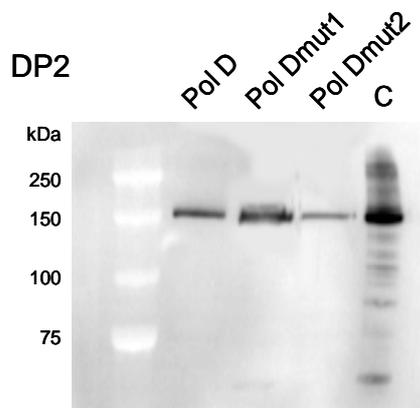


Figure 54 : Expression des sous-unités DP2 de la Pol D, Pol Dmut1 et Pol Dmut2.

La détection a été effectuée par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP2. La révélation a été réalisée à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400. C, représente le contrôle du Western Blot.

Un autre protocole de purification a été utilisé pour l'ADN polymérase DNcut. Après passage à la presse de French, l'extrait était très visqueux, dû à une forte concentration en d'ADN. La solution, à laquelle a été ajouté du NaCl à une concentration finale de 0,5 M et de la Polymine P 0,15 % final, a été mise sous agitation douce à 4°C pendant 45 min. Ensuite, une centrifugation à 12 000 rpm, pendant 1 h à 4°C, a été effectuée et le culot a été remis en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium saturée à 80%, pendant 1 h dans la glace. Le culot, issu d'une centrifugation à 12000 rpm pendant 1 h à 4°C, a été repris dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, glycérol 10% (v/v). Les extraits protéiques ont ensuite été déposés sur une colonne Histrap™ de 20 ml (Amersham Biosciences), équilibrée avec le tampon A. L'élution a été réalisée, à un débit de 1 mL.min⁻¹, par l'application d'un gradient de concentration en imidazole de 20 à 500 mM dans le tampon B. Les fractions protéiques étant invisibles sur SDS-PAGE, un western blot a été réalisé afin d'analyser le suivi de purification (Figure 55). Nous avons pu constater que la petite sous-unité DP1 était en excès par rapport à la grande sous-unité DP2 qui a été très peu exprimée. Ainsi, nous avons pris la décision d'arrêter les étapes de purification à ce stade. Les fractions collectées ont été rassemblées et concentrées à l'aide du centriprep-10 et dialysées pendant 2 x 2 h contre le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, DTT 1 mM. Du glycérol 20 % (v/v) a été ajouté et la protéine a été conservée à -80°C.

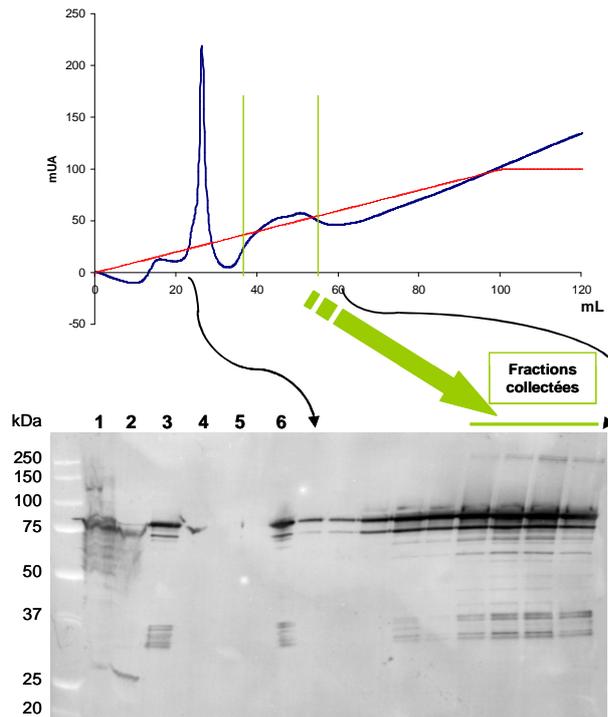


Figure 55 : Purification de l'ADN polymérase DNcut.

Profil d'élution sur colonne HiTrap (en haut). La courbe théorique du gradient en imidazole est représentée en rouge. Les séparateurs en vert représentent les fractions collectées; Analyse par Western Blot en utilisant les anticorps anti-DP2 (en bas). La révélation a été réalisée à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400. 1, après passage à la presse de French ; 2, après 1^{er} choc thermique ; 3, après 2^e choc thermique ; 4, culot après traitement à la polyminine P; 5, surnageant après traitement au sulfate d'ammonium ; 6, culot après traitement au sulfate d'ammonium.

II.3. Dosage des protéines

La détermination de la concentration finale de la protéine a été réalisée selon la technique de Lowry, à l'aide du kit DC protein assay (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur. Le dosage a été réalisé avec 25 μ L d'échantillon dilué, la DO étant mesurée à 750 nm, après la réaction, à l'aide du spectrophotomètre UVIKON 940 (Kontron Instruments). Une gamme d'étalonnage a été réalisée avec de la BSA (*Bovin Serum Albumin*) (Figure 56).

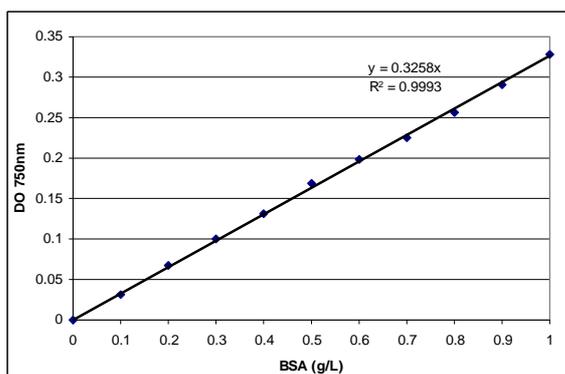


Figure 56 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par le kit DC protein assay (Bio-Rad)

II.4. Séparation et visualisation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

II.4.1. Gels SDS-PAGE

II.4.1.1. Préparation des échantillons

Les extraits protéiques (10 µL ou 1 µg), auquel a été ajouté du tampon de chargement de Laemmli (cf. annexe 2), ont été chauffés à 100°C, pendant 10 min, avant dépôt sur le gel, pour permettre la dénaturation des protéines. Un marqueur de masse moléculaire (*Precision Plus Protein™ All Blue Standards 10-250 kDa*, Bio-Rad) a été déposé sur le même gel afin de déterminer la taille des protéines d'intérêt.

II.4.1.2. Migration

Les électrophorèses ont été réalisées avec des gels de polyacrylamide à 12%, précoulés, Bis-Tris *Criterion™ XT Precast Gel* (Bio-Rad). Ces gels ont été placés dans une cuve *criterion™* (Bio-Rad) contenant du tampon MOPS-SDS 1X (cf. annexe 3). La migration a été effectuée pendant 1 h à un voltage constant de 200 V.

II.4.2. Gels natifs

II.4.2.1. Préparation des échantillons

Les extraits protéiques (10 µg) ont été mis dans du tampon de chargement (cf. annexe 2), avant d'être déposés sur le gel sans étape de chauffage. Un marqueur de masse moléculaire (HMW, Amersham Pharmacia), conçu pour les gel non dénaturants, a été déposé sur le même gel, afin de déterminer la taille des protéines d'intérêt.

II.4.2.2. Migration :

Les électrophorèses ont été réalisées sur gel de polyacrylamide 4%-20% précoulé (Tris-HCl Ready Gel (Bio-Rad)). Le gel a été placé dans une cuve protean II (Bio-Rad) contenant du tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM). La migration a été effectuée pendant 40 min, à un voltage constant de 200 V.

II.4.3. Coloration/décoloration des gels d'électrophorèse

Les gels démoulés ont été placés sous agitation, pendant 1 h, dans une solution de coloration (10 % d'acide acétique, 50 % d'éthanol, bleu de coomassie 1g/L). Les gels ont ensuite été placés dans plusieurs bains de décoloration (10 % d'acide acétique, 30 % d'éthanol) jusqu'à visualisation des bandes correspondant aux protéines. Les gels ont été conservés par séchage à l'aide du kit gel drying frames (Diversified Biotech). Les gels ont été préalablement incubés pendant 2 min dans un tampon (20% éthanol, 10% glycérol), puis placés entre deux feuilles de

cellophane. L'ensemble a été placé entre deux plaques clipsées, puis laissé pendant 48h à température ambiante.

II.5. Technique de Western Blot

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). La membrane a été incubée dans du méthanol puis dans le tampon de transfert (Tris base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20 % (v/v)), avant d'être appliquée contre le gel, du côté de la cathode. Des papiers Whatman, imbibés de tampon de transfert, ont été appliqués de part et d'autre du gel et de la membrane. Le transfert a été effectué pendant 40 min, à un voltage constant de 100 V, dans une cuve *Criterion Blotter* (Bio-Rad), placée dans de la glace et contenant du tampon de transfert.

Après transfert, la membrane a été incubée pendant 1 h dans le tampon TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % de Tween 20) contenant 5% (p/v) de lait en poudre, afin de saturer les sites libres de la membrane. La membrane PVDF a ensuite été incubée, pendant 1 h à température ambiante, ou durant une nuit à 4°C, dans le tampon TBS (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt et dilué au 1/5000. Les anticorps ont été produits chez le lapin par la société Eurogentec (Seraing, Belgique). La membrane a été lavée pendant 3 x 15 min dans du tampon TBST, avant d'être incubée pendant 1 h à température ambiante, dans du tampon TBS, en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP).

La révélation a été réalisée à l'aide du kit ECL+ (Amersham Biosciences). Cette méthode est basée sur la chimiluminescence améliorée (Enhanced Chemiluminescence). La membrane est incubée pendant 2 min dans une solution contenant un agent luminescent, le luminol, qui est oxydé en ester d'acridium, grâce à l'enzyme HRP, en présence de peroxyde d'hydrogène. Les produits formés émettent une fluorescence proportionnelle à la concentration en protéine. La révélation a été effectuée à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), à la longueur d'onde de 457 nm.

II.6. Peptides synthétiques

Les peptides étaient constitués d'une vingtaine d'acides aminés, correspondant à la structure primaire de différentes régions des ADN polymérases. Ils ont été utilisés en tant que compétiteurs vis-à-vis du PCNA. Le peptide TEMD a servi de témoin étant donné qu'il appartient à une région de l'ADN polymérase D qui n'est pas connue pour être impliquée dans

des interactions avec le PCNA. Les peptides ont été synthétisés par Eurogentec et fournis sous forme lyophilisée. Ils ont été remis en suspension, à une concentration finale de 10 mM, dans de l'eau milliQ. Exceptionnellement, le peptide PYFD a été repris, à la même concentration, dans un mélange DMSO/eau milliQ, vu son hydrophobicité élevée. Les séquences des peptides et leur localisation dans les protéines d'origine sont représentées dans le tableau 8.

Nom	Séquence	Protéine d'origine	localisation
PIPB	QKTKQVFLGAWLKF	ADN polymérase B	Extrémité C-terminale (765-778)
PIPD	PKKKRVISLEEFFSRKSK	ADN polymérase D	Extrémité C-terminale (1438-1455)
PYFD	IVGRIIGFVDALVGYAHPYFH	ADN polymérase D	Séquence PYF box (928-948)
TEMD	EIIEGKFGDLGSREKYAEQAV	ADN polymérase D	Séquence (83-103)
Nter1	MELPKEMEEYEMLQ	ADN polymérase D	Extrémité N-terminale (1-15)
Nter2	QREIDKAYETIAKKAR	ADN polymérase D	Extrémité N-terminale (15-29)

Tableau 8 : Peptides synthétiques utilisés durant cette étude.

II.7. Substrats nucléiques

II.7.1. Présentation

Tous les oligonucléotides synthétiques, utilisés au laboratoire, ont été synthétisés par la société Eurogentec (Tableau 9). Ils ont été purifiés par HPLC-RP (High Performance Liquid Chromatography - reversed phase) et fournis sous forme lyophilisée. Les oligonucléotides ont été dissous dans de l'eau milliQ, à une concentration de 100 μ M, et ont été conservés à -20°C.

Oligonucléotide	Taille (bases)	Séquence 5'-3'
M13cut32FAM	32-mer	5' fam-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3'
M13cut17FAM	17-mer	5' fam-TGCCAAGCTTGCATGCC-3'
M13cut32Cy5	32-mer	5' CY5-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3'
L87 linear (de M13mp18(+))	87-mer	5' -CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'
B2	75-mer	5' -GAGCTAGATGTCTGGACTCTGCCTCAAGACGGGTAGTCAACGTGCACTCGAGGTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
B1	75-mer	5' -GAGCTAGATGTCTGGACTCTGCCTCAAGACGGGTAGTCAA CGTGCCTCGAGGTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' Biotine
A2	48-mer	5' -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGACCTCGAGTGCACGTTG ACTACCCGT-3'
L34	34-mer	5' -TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés durant cette étude.

II.7.2. Préparation d'une matrice d'ADN amorcée

La matrice ADN utilisée au cours des expériences d'extension d'amorce était le vecteur M13mp18(+) (Amersham Biosciences), dérivé du bactériophage filamenteux M13. Ce vecteur est un ADN simple brin de 7 250 bases. Une hybridation a été réalisée entre le M13mp18(+) et une amorce M13cut32FAM marquée à la fluorescéine, dans un rapport 1 : 3 et permettant la création d'une zone double brin. Le mélange réactionnel, dans un volume total de 312,5 µL, était constitué de : 125 µL de vecteur M13mp18(+) à 200 ng/µL, 15,625 µL de M13cut32FAM à 2 µM et 31,25 µL d'annealing buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 ; NaCl 500 mM). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 min à 75°C, puis pendant 1 h à température ambiante. La concentration finale en matrice M13 amorcée est estimée à 0,090 µM.

Dans le cadre des études du chargement du PCNA, le M13mp18(+) était hybridé à une amorce d'ADN M13cut32 marquée au Cy5, dans un rapport 1 : 1 et permettant la création d'une zone double brin. L'hybridation a été réalisée avec l'amorce M13cut32Cy5 avec le même protocole décrit précédemment.

Pour les expériences de détermination de l'activité exonucléasique et les EMSA, le substrat utilisé était le L87. Une hybridation a été réalisée entre le L87 et une amorce M13cut32FAM marquée à la fluorescéine, dans un rapport 1 : 1 et permettant la création d'une zone double brin. Le mélange réactionnel, volume final de 40 µL, contenait : 2 µL de L87 à 100 µM, 2 µL de M13cut32FAM à 100 µM et 4 µL d'annealing buffer 10X. Le mélange

réactionnel a été incubé pendant 15 min à 75°C, puis pendant 1 h à température ambiante. La concentration finale en matrice M13 amorcée était de 5 µM.

Dans le cadre des études en anisotropie de fluorescence, le substrat utilisé était le L34. L'hybridation a été réalisée avec l'amorce M13cut32FAM ou l'amorce M13cut17FAM et avec le même protocole que pour l'ADN L87. En revanche, une étape de purification était nécessaire. L'ADN a été déposé sur un gel d'acrylamide natif à 12,5%, contenant 50 mM de NaCl pour conserver le duplex. La migration a été réalisée, à un voltage de 130-150V, pendant 3-5 h. Les fragments d'acrylamide, portant l'ADN d'intérêt, ont été découpés et incubés dans 400 µL de tampon d'éluion (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM), pendant 1 nuit à 37°C et sous agitation à 250 rpm. Le lendemain, l'échantillon a subi une centrifugation de 1 min à 3000 rpm. Le surnageant a été récupéré dans une solution d'acétate de sodium 3 M (1/10 vol) et d'éthanol 100% -20°C (2 vol). Le précipité a été centrifugé pendant 15 min à 12500 rpm et à 4°C. Le culot a ensuite été lavé avec 500 µL d'éthanol 70°C, avant de subir une centrifugation pendant 5 min à 12500 rpm à 4°C. Le culot, préalablement séché au speedvac, a été remis en suspension dans de l'eau pure, à une concentration finale estimée à 0,52 µM (Figure 57).

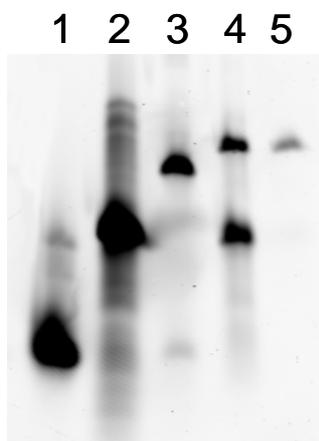


Figure 57 : Purification des ADN marqués à la fluorescéine.

1, M13cut17FAM ; 2, M13cut32FAM ; 3, L34 hybridé au M13cut17FAM purifié ; 4, L34 hybridé au M13cut32FAM non purifié ; 5, L34 hybridé au M13cut32FAM purifié.

II.8. Techniques de synthèse d'ADN

II.8.1. Test d'activité des ADN polymérase par incorporation de [³H]dTTP

Après chaque étape de purification, un test d'activité a été réalisé sur les fractions, en sortie de colonne, par incorporation de [³H]dTTP (tymidine triphosphate tritiée) dans une matrice d'ADN (fragment de 1000-1500 bases d'adénine poly(dA), hybridé à une amorce de 12-18 bases de thymine oligo(dT), dans un rapport 1 : 20). Le milieu de réaction, dans un volume total de 20 µL, contenait 1 mM dNTP, 20 mM Bis-Tris pH 6,5, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 20 µM [³H]dTTP, 0,5 µg.µL⁻¹ poly(dA)/oligo(dT). Un microlitre de chaque

fraction a été ajouté à ce milieu, avant d'être incubé pendant 20 min à 60°C. Dix microlitres de ce mélange ont été déposés sur une rondelle de papier GF/C (Whatman). Les papiers ont ensuite été lavés dans 250 ml de Trichloro acetic acid-TCA 5 % / Pyrophosphate de sodium 40 mM froid, pendant 20 min, lavés 8 x 3 min dans du TCA 5 % / Ppi 40 mM froid, et enfin 2 x 5 min avec de l'éthanol 95% froid. Les rondelles de papier ont été séchées pendant 40 min, sous une lampe, et placées dans un tube contenant 3 ml de mélange scintillant Optifluor® O (Perkin Elmer). Le comptage des émissions β a été intégré sur une durée comprise entre 1 et 3 min avec un compteur 2000 CA/LL (Packard).

II.8.2. Réactions d'extension d'amorce

Les ADN polymérase B et D recombinantes de *P. abyssi*, sous la forme sauvage ou mutée, ont été testées, quant à leur activité d'extension d'amorce, sur des matrices d'ADN amorcées, en présence ou non des facteurs (PCNA et RF-C). Pour une réaction, dans un volume total de 10 μ L, ont été ajoutés : 45 fmol de M13mp18(+), 2 μ M de dNTPs, 1 μ L de tampon de réaction 10X (Tris-HCl 500 mM pH 9, DTT 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM) et les protéines désirées ont été ajoutées à une quantité variant entre 0,02 et 10 pmol. Les réactions ont été incubées pendant 5 à 30 min à 60°C, puis arrêtées dans la glace. Un tampon d'arrêt de réaction a ensuite été ajouté (Formamide 98%, EDTA 5 mM, pH 8). Eventuellement, avant incubation les ADN polymérase et le PCNA ont été dilués respectivement dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, glycérol 20 % et un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 1 mM.

Les produits de réaction ont été chauffés pendant 7 min, à 100°C, avant dépôt sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) contenant du NaOH 50 mM et de l'EDTA 1 mM, qui contribuent à dénaturer l'ADN. Le marqueur de taille d'ADN (Raoul markers, MP Biomedicals) a été déposé sur le même gel, afin de déterminer la taille des fragments d'ADN. Le gel a été placé dans une cuve (Gibco BRL Horizon, 11-14 gel electrophoresis Life Technologies) et la migration a été effectuée, pendant 5 h, à un voltage constant de 80 V, ou pendant 16 h à 30 V. La réaction est représentée sur la figure 58.

La révélation a été acquise numériquement à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400, à la longueur d'onde de 488 nm, permettant d'exciter la fluorescéine situé en 5' des amorces.

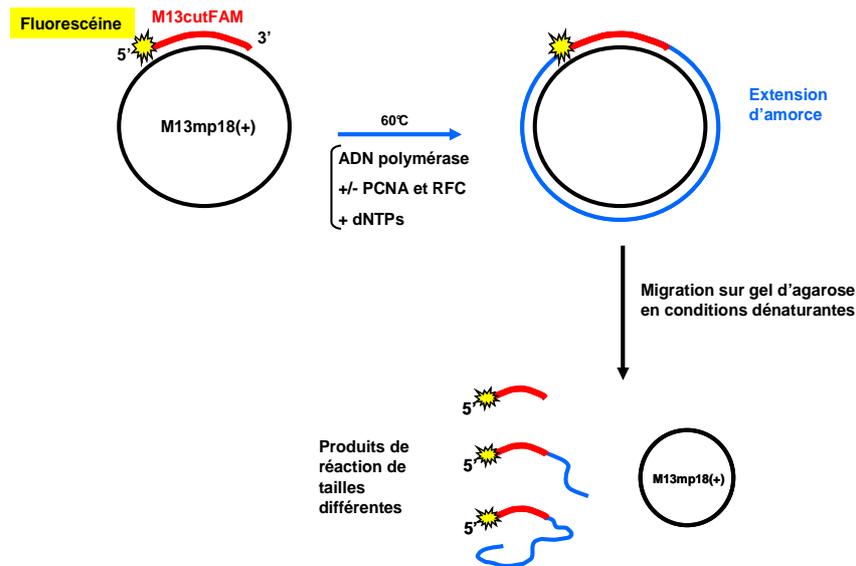


Figure 58 : Schéma représentant la réaction d'extension d'amorce.

II.8.3. Réaction 3'→5' exonucléasique

Pour déterminer l'activité exonucléasique, nous avons utilisé comme substrat ADN le L87 hybridé à une amorce marquée à la fluorescéine (M13cut32FAM). Le mélange réactionnel, dans un volume total de 10 μ L, était constitué de : L87 30 nM, 1 μ L de tampon de réaction 10X (Tris-HCl 500 mM pH 9, DTT 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM) et les protéines désirées à une quantité variant de 0,02 à 10 pmol. Les réactions ont été incubées pendant 30 min à 60°C, puis arrêtées dans la glace. Un tampon d'arrêt de réaction a ensuite été ajouté (Formamide 98%, EDTA 5 mM, pH 8).

Les produits de réaction ont été incubés pendant 7 min à 100°C, avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide à 12% contenant du TBE 1 X (cf. annexe 3), urée 7 M et formamide 3,075 M (condition dénaturante), et APS et TEMED. Le gel a été placé dans un tampon TBE 1 X, dans une cuve Protein II xi cell (Bio-Rad). La migration a été effectuée pendant 5 h à un voltage constant de 300 V.

II.9. Captures de partenaires par Pull-down sur billes magnétiques

Une étude complémentaire des interactions entre les sous-unités DP1 et DP2 de l'ADN polymérase D, sauvage ou mutée, avec le PCNA, a été également réalisée en pull-down, sur billes magnétiques (Dynabeads[®] Talon[™], Invitrogen).

Dans un tube de type eppendorf, 200 μ g de billes, préalablement lavées avec un tampon « Binding and washing buffer » (50 mM NaP, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,01 % Tween-20), ont été mises en présence de 10 μ g la sous-unité DP1, taguée histidine, et incubée pendant 45 min, à

4°C, sur un système rotatif. Les billes étant magnétiques, nous pouvons procéder à des lavages en utilisant un aimant. Les billes ont été lavées avec le tampon « Binding and washing buffer ». Ensuite, 20 µg de la sous-unité DP2 ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 1 h à 4°C. Les billes ont été remises en suspension dans un tampon de chargement SDS-PAGE afin de d'analyser les protéines. Dans le cadre de l'étude des interactions entre le PCNA et les sous-unités DP1 et DP2 de l'ADN polymérase D, les conditions décrites ci-dessus ont été respectées sauf au niveau de la quantité des protéines : 1,5 µg de PCNA, tagué histidine, ont été mis en présence des billes et les sous-unités DP1 et DP2 ont été ajoutées à 15 µg.

Les protéines ont alors subi une électrophorèse sur gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane PVDF, avant d'être révélées avec des anticorps spécifiques. La visualisation par ECL (Enhanced Chemiluminescence - Amersham) a été réalisée à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

II.10. Etude d'interaction protéine-protéine par résonance plasmonique de surface (SPR)

II.10.1. Principe

La SPR est une technique utilisée pour l'étude des interactions entre deux molécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides). Par cette technique, il est possible de suivre, en temps réel, l'interaction entre un ligand immobilisé sur une puce (biocapteur) et un analyte injecté à un débit constant. L'appareil fonctionne par la détection des variations de masse à la surface de la puce. Le suivi de la variation de signal SPR en fonction du temps est représenté sous forme de sensorgramme (Figure 59). Il est possible de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation, et d'en déduire la valeur de la constante d'affinité lorsque plusieurs concentrations d'analyte sont utilisées.

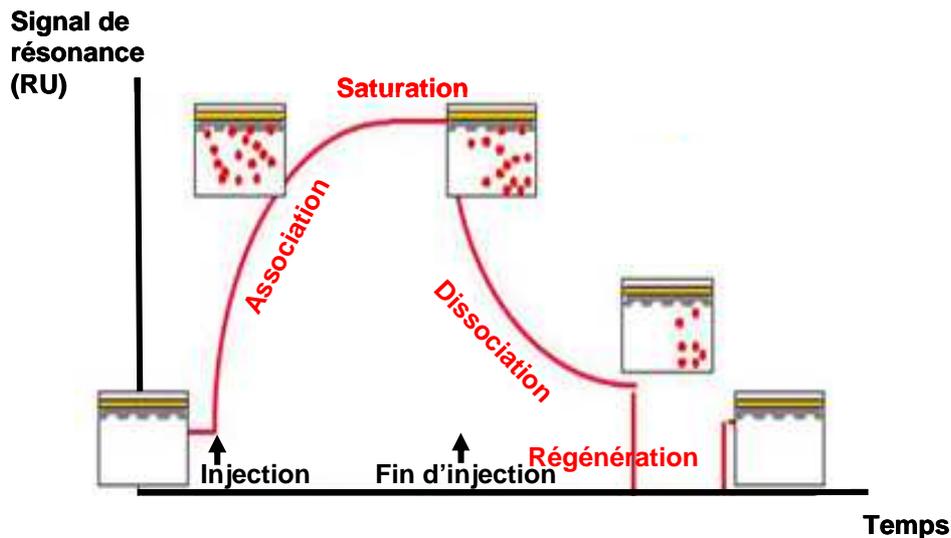


Figure 59 : Sensorgramme illustrant une association entre un analyte et un ligand fixé sur le biocapteur. L'analyte (points rouges) est injecté sur la puce sur laquelle est immobilisé le ligand (carrés gris). La courbe est composée de différentes phases représentées en rouge.

De façon plus détaillée, le ligand est immobilisé de manière covalente sur le biocapteur, puis est soumis à un flux de tampon de course. L'angle de résonance varie selon l'indice de réfraction du milieu, au niveau du biocapteur. La réponse SPR, enregistrée sur le sensorgramme, est constante. Lorsqu'un analyte, injecté sur la puce par un système microfluidique, se lie au ligand et induit un changement de masse à la surface du biocapteur, la réfringence du milieu en est modifiée et la lumière réfléchi se déplace suivant un angle de résonance. Ainsi, sur le sensorgramme, la réponse SPR augmente. En fin d'injection, l'analyte se dissocie progressivement, la lumière réfléchi est déviée et revient à sa position d'origine, se traduisant, sur le sensorgramme, par une baisse de la réponse SPR. Ce système est représenté sur la figure 60.

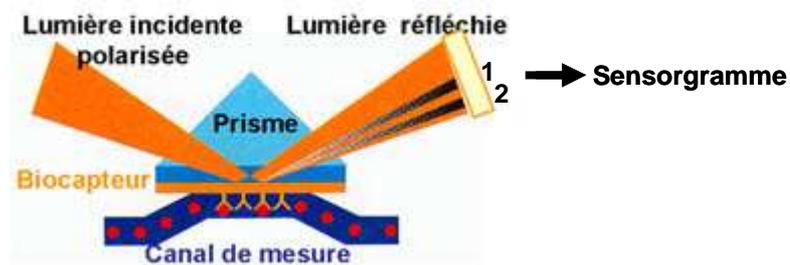


Figure 60 : Schéma présentant le principe de la résonance plasmonique de surface.

Typiquement, le BIAcore utilise des biocapteurs composés d'une lame de verre sur laquelle est appliquée une couche d'or couplée à une matrice (dextran). Cette structure tridimensionnelle peut être modifiée suivant les molécules à immobiliser. Par exemple, la

fixation de molécules biotynilées pourra se réaliser sur une puce contenant de la streptavidine. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). 1000 unités de résonance correspondent à une quantité de 1 ng de protéines fixées par mm² de surface active.

II.10.2. Expériences réalisées

Les analyses ont été réalisées sur l'appareil BIAcore X (BIAcore, Uppsala, Sweden) appartenant au laboratoire INSERM U.613, Génétique Moléculaire et Génétique Epidémiologique (Brest, France). L'ADN biotynilé B1 a été fixé sur la puce (SA sensor chip, BIAcore) par une réaction streptavidine-biotine. Il a été injecté dans le tampon HBS-P (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,005% (v/v) P20), à un débit de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'amorce A2 a été hybridée à l'ADN B1, après injection dans le même tampon avec le même débit. Le PCNA a ensuite été injecté sur la puce d'ADN, à un débit de 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et à une concentration de 200 nM. Les ADN polymérases ont été injectées, après 30 s, avec le même débit et à la même concentration de 200 nM. Les études d'interactions ont été réalisées à 25°C dans le tampon HBS-P. Entre deux expériences, la puce a été régénérée par l'application d'une solution de NaOH 50 mM (10 μL à 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), afin de décrocher les protéines et l'amorce A2. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel BIAevaluation software.

II.11. EMSA (Electrophoresis Mobility-Shift Assay)

Le retard sur gel nous a permis d'étudier les interactions physiques entre l'ADN et les protéines. L'ADN utilisé était le L87, amorcé par l'oligonucléotide M13cut32FAM. Pour chaque réaction, 2,5 pmol d'ADN ont été incubées avec différentes quantités (de 5 à 15 pmol) de protéines (ADN polymérase, RF-C, PCNA), pendant 10 min à 60°C. La visualisation a été réalisée sur un gel d'agarose à 1 %, en conditions natives, dans du tampon TBE 1X (cf. annexe 3). Ainsi, l'ADN complexé aux protéines verra sa migration freinée.

II.12. Etude du chargement du PCNA sur un ADN (Cross-linking)

Le glutaraldéhyde possède la propriété de former des pontages covalents entre les macromolécules. Ainsi, le PCNA chargé sur l'ADN s'y retrouvera fixé après ajout de glutaraldéhyde. Nous avons utilisé ce procédé afin d'étudier le chargement du facteur de processivité sur l'ADN.

Pour une réaction dans un volume de 20 μL final, ont été ajoutés : 227 fmol d'ADN, 5 μL de tampon d'incubation (Hepes-NaOH 20mM, pH 7.5 ; DTT à 5mM ; MgCl_2 à 30mM ;

NaCl à 100 mM ; glycérol 40%), avec ou sans l'ATP ou l'ATP γ S à 1 mM et les protéines désirées utilisées à 2,4 pmol. Les réactions ont été incubées à 65°C, pendant 0,5 à 120 min. Les réactions ont été arrêtées par l'ajout du glutaraldéhyde 1%. Une incubation pendant 10 min à 37°C permet la catalyse de la réaction du glutaraldéhyde. Les produits de réaction ont été déposés sur un gel d'agarose à 0,8 % composé de TBE 0,5 X (cf. annexe 3) et de SDS à 0,1 %. Enfin, le gel a été placé dans une cuve (Gibco BRL Horizon, 11-14 gel electrophoresis Life Technologies) et la migration a été effectuée pendant 3 h à un voltage constant de 80 V.

La révélation a été réalisée à l'aide du variable mode imager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), aux longueurs d'onde de 532 et 633 nm, afin d'exciter le TMR lié au PCNA et le Cy5 lié à l'ADN, respectivement.

II.13. Mesures de la thermostabilité des ADN polymérases

Afin de tester la thermostabilité de l'ADN polymérase D et des mutants *PabPol Dmut1* et *PabPol Dmut2*, les enzymes ont été incubées, pendant 5 min, à différentes températures (80°C, 90°C ou 100°C). Une quantité de 5 pmol a été ajoutée dans le mélange réactionnel, dans un volume final de 10 μ L contenant le tampon de dilution (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glycérol 20 %), puis refroidies dans de la glace.

Ensuite, afin de mesurer les conséquences du chauffage sur l'activité des enzymes, un test d'extension d'amorce a été réalisé (voir ci-dessus), où chaque protéine était testée à une quantité de 2 pmol. Egalement, afin de mesurer les conséquences du chauffage au niveau conformationnel, une analyse spectrale de fluorescence a été réalisée, en utilisant le Nile Red comme sonde de polarité (voir ci-dessous), les protéines étant testées à une concentration de 0,4 μ M.

II.14. Etudes en fluorescence

II.14.1. Analyse spectrale

L'acquisition des mesures des spectres a été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre Edinburgh FLS920. Afin de limiter l'incidence de la lumière diffusée, un filtre passe haut, ne laissant pas passer les sources lumineuses de longueur d'onde inférieures à celle de la longueur d'onde d'émission, a été utilisé systématiquement sur le chemin d'émission.

II.14.2. Anisotropie d'émission de fluorescence

II.14.2.1. Principe

L'anisotropie de fluorescence est une technique en plein essor, généralement utilisée pour étudier les interactions ADN-protéine. Elle a notamment l'avantage de permettre l'analyse d'une réaction, à l'équilibre et en temps réel. Les fluorophores utilisés étaient, soit la fluorescéine greffée à l'ADN, soit le TMR greffé au PCNA. Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm, avec une largeur de fente de 3 nm. La longueur d'onde d'émission était de 530 nm, avec une largeur de fente de 3 nm. De plus, un polariseur d'excitation était placé verticalement, et un polariseur d'émission était positionné alternativement dans les positions verticale et horizontale, afin de mesurer les intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} , respectivement. La figure 61 nous montre la configuration utilisée lors des mesures d'anisotropie.

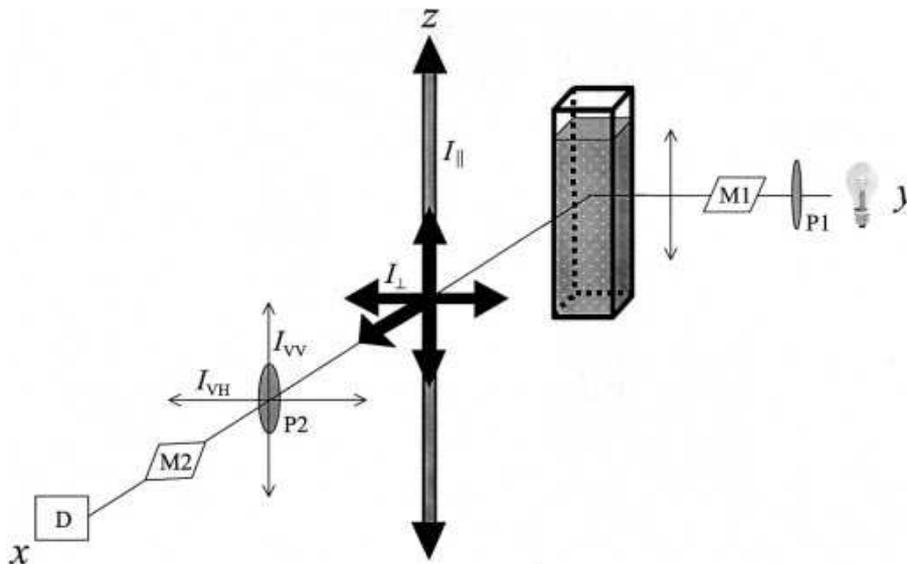


Figure 61 : Schéma représentant la configuration de la mesure d'anisotropie de fluorescence. P1 et P2 représentent, respectivement, le polariseur vertical et horizontal. D'après (Bailey *et al.*, 2001).

L'anisotropie est définie selon l'équation suivante : $A = (I_{VV} - I_{VH}) / (I_{VV} + 2I_{VH})$. A chaque point de titration, l'anisotropie a été mesurée cinq fois, avec 10 s de temps d'intégration. Le facteur G ($G = I_{HV} - I_{HV}$) représente le rapport des sensibilités du système de détection à des lumières polarisées verticalement et horizontalement. Il est calculé automatiquement par le logiciel. L'étude a été réalisée en respectant des paramètres décrits dans des études récentes (Bailey *et al.*, 2001, LiCata & Wowor, 2008, Reid *et al.*, 2001).

II.14.2.2. Expériences réalisées lors de cette étude

Dans une cuve de chemin optique de 3 mm, le volume initial était de 120 µL dans le tampon Tris-HCl pH 7,5, DTT 1 mM. Tous les tampons ont été préparés avec de l'eau millipore et filtrés. L'ADN L34, marqué à la fluorescéine en 5', a été ajouté à une concentration finale de 10 nM. Les réactions ont été réalisées à différentes températures (25°C, 40°C, 50°C, 55°C). Le PCNA ou les différentes ADN polymérases ont été ajoutés à l'ADN, selon une gamme de concentration allant de 5 à 500 nM. Chaque ajout de protéine était inférieur à 1 µL, afin d'éviter une trop grande variation de volume.

II.14.2.3. Traitement des données

Les données ont été traitées comme décrites précédemment (Reid *et al.*, 2001 ; Richards *et al.*, 2007), à l'aide du logiciel Enzfitter, en utilisant l'équation suivante :

$$A = A_{\min} + [(D + E + K_D) - \{(D + E + K_D)^2 - (4DE)\}^{1/2}] (A_{\max} - A_{\min}) / (2D)$$

A = anisotropie mesurée à une concentration particulière de la protéine, E = concentration totale en protéine, D = concentration totale en ADN, A_{\min} = anisotropie minimale (ADN libre), A_{\max} = anisotropie maximale (complexe ADN-protéine) et K_D = constante de dissociation.

II.14.3. Utilisation d'une sonde de polarité: le Nile Red

Le Nile Red est une molécule fluorescente utilisée classiquement comme une sonde de polarité de l'environnement. Il est notamment sensible aux sites hydrophobes des protéines (Sackett & Wolff, 1987). En conséquence il est généralement employé comme indicateur des changements de conformation des protéines, comme par exemple l'exposition des surfaces hydrophobes (Febbraio *et al.*, 2004).

Le Nile Red a été préalablement dissout à une concentration de 0,25 mM dans du Me_2SO , étant donné sa grande hydrophobicité, et conservé en aliquots de 5 µL à -20°C.

Toutes les analyses ont été réalisées sur le spectrofluorimètre Edinburgh FLS920. La cuve, disposant d'une fenêtre de mesure de 3 mm, a été thermostatée à 20°C. La longueur d'onde d'excitation était de 550 nm et les fentes d'excitation et d'émission étaient réglées à 5 nm et 10 nm, respectivement. Dans la cuve, le volume de réaction de 120 µL contenait 0,4 µM d'ADN polymérase (*PabPol D*, *PabPol Dmut1* ou *PabPol Dmut2*) dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, DTT 1mM, MgCl_2 15 mM. Le Nile Red a été ajouté, à chaque échantillon, à une concentration finale de 1 µM. Après 5 min d'équilibration, le spectre a été mesuré entre 580 nm et 740 nm.

II.14.4. Obtention d'un PCNA marqué par un fluorophore

Des protéines modifiées ont été obtenues par introduction d'une cystéine, par mutagenèse dirigée, à une position stratégique, déterminée par rapport à la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine. Il faut préciser que le PCNA, à l'état natif, ne contient aucune cystéine. Diverses mutations ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire, et les souches glycérolées, contenant les gènes codant pour les PCNA mutés, étaient stockées à -80°C. Nous avons décidé de nous focaliser, dans un premier temps, sur le PCNA muté en position 211, où la cystéine remplace une leucine. La production du PCNA muté a été effectuée à l'aide du système RTS 500 (Roche) (cf. Matériels et Méthodes, II.1.1.).

Le dérivé maléimide du fluorophore est ensuite greffé sur la cystéine. Pour se faire, une dialyse (2 x 2 h) a été réalisée contre le tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8), dans une enceinte anaérobie afin d'éviter toute oxydation du groupement fonctionnel de la cystéine. Toujours dans l'enceinte anaérobie, un volume de cette solution a été incubé sous agitation, pendant 2 h à l'obscurité, avec un volume de TMR (tétraméthylrhodamine-5-maléimide), deux volumes de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 10 volumes de tampon A. Ensuite, en dehors de l'enceinte anaérobie, du DTT à 1 mM final a été ajouté à la solution et conservé à 4°C à l'obscurité. Le PCNA marqué a ensuite été purifié par deux étapes de chromatographie (cf. Matériels et Méthodes, II.2.1.).

II.14.5. Utilisation de la fluorescence intrinsèque du peptide PIPB

Toutes les analyses ont été réalisées sur le spectrofluorimètre Edinburgh FLS920. La cuve, disposant d'une fenêtre de mesure de 3 mm, a été thermostatée à 20°C. La longueur d'onde d'excitation était de 295 nm et les fentes d'excitation et d'émission étaient réglées à 1,5 nm. Dans la cuve, le volume de réaction de 120 µL contenait 10 nM du peptide PIPB (cf. Matériels et Méthodes) dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, DTT 1 mM. L'ADN était le fragment B1 hybridé à l'amorce A2, non marqué à la fluorescéine, et a été ajouté à 10 fM. Ensuite, le PCNA sauvage ou muté (PR245 et EIE120) ont été ajoutés et titrés selon une gamme de concentration allant de 1 à 100 nM. Après 5 min d'équilibration, le spectre a été mesuré entre 320 nm et 400 nm.

II.15. Numéros d'accès aux séquences

Les numéros d'accès aux banques de données des protéines Entrez sont notés ci-dessous :

NP_070550 (*Archaeoglobus fulgidus*), NP_248640 (*Methanocaldococcus jannaschii*), YP_184316 (*Thermococcus kodakarensis*), NP_125813 (*Pyrococcus abyssi*), NP_577748 (*Pyrococcus furiosus*), NP_142130 (*Pyrococcus horikoshii*), NP_002682 (*Homo sapiens*), NP_596124 (*Schizosaccharomyces pombe*), NP_067694 (*Rattus norvegicus*).

L'alignement entre ces séquences a été réalisé à l'aide du programme « align » sur le site suivant : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> et mis en page à l'aide de l'application Genedoc.

Références bibliographiques

A

- Aguilar, D., F. X. Aviles, E. Querol & M. J. Sternberg, (2004) Analysis of phenetic trees based on metabolic capabilities across the three domains of life. *J. Mol. Biol.* **340**: 491-512.
- Andrade, M. A., C. Ouzounis, C. Sander, J. Tamames & A. Valencia, (1999) Functional classes in the three domains of life. *J. Mol. Evol.* **49**: 551-557.
- Aravind, L., D. D. Leipe & E. V. Koonin, (1998) Toprim - a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucl. Acids Res.* **26**: 4205-4213.

B

- Bailey, M. F., E. H. Thompson & D. P. Millar, (2001) Probing DNA polymerase fidelity mechanisms using time-resolved fluorescence anisotropy. *Methods* **25**: 62-77.
- Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer & N. R. Pace, (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9188-9193.
- Barry, E. R. & S. D. Bell, (2006) DNA Replication in the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 876-887.
- Bartlett, M. S., (2005) Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 677-684.
- Beaucamp, N., A. Hofmann, B. Kellerer & R. Jaenicke, (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science* **6**: 2159-2165.
- Bell, S. D., (2005) Archaeal transcriptional regulation - variation on a bacterial theme? *Trends Microbiol.* **13**: 262-265.
- Bell, S. D. & S. P. Jackson, (2001) Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 208-213.
- Biles, B. D. & B. A. Connolly, (2004) Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucl. Acids Res.* **32**.
- Blank, A., B. Kim & L. A. Loeb, (1994) DNA-Polymerase-delta is required for base excision-repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9047-9051.
- Blinkova, A., C. Hervas, P. T. Stukenberg, R. Onrust, M. E. Odonnell & J. R. Walker, (1993) The *Escherichia-Coli* DNA Polymerase-III Holoenzyme Contains Both Products of the DnaX Gene, Tau and Gamma, but Only Tau Is Essential. *J. Bacteriol.* **175**: 6018-6027.
- Bocquier, A. A., L. D. Liu, I. K. O. Cann, K. Komori, D. Kohda & Y. Ishino, (2001) Archaeal primase: bridging the gap between RNA and DNA polymerases. *Current Biology* **11**: 452-456.
- Bohlke, K., F. M. Pisani, M. Rossi & G. Antranikian, (2002) Archaeal DNA replication: spotlight on a rapidly moving field. *Extremophiles* **6**: 1-14.
- Bonarek, P., S. Kedracka-Krok, B. Kepys & Z. Wasylewski, (2008) Quantitative analysis of the ternary complex of RNA polymerase, cyclic AMP receptor protein and DNA by fluorescence anisotropy measurements. *Acta Biochim. Pol.* **55**: 537-547.
- Boudsocq, F., S. Iwai, F. Hanaoka & R. Woodgate, (2001) *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol eta. *Nucl. Acids Res.* **29**: 4607-4616.
- Bowman, G. D., (2004) Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**: 724-730.
- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo & P. Forterre, (2008) Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 245-252.
- Brown, W. C. & J. L. Campbell, (1993) Interaction of proliferating cell nuclear antigen with yeast DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **268**: 21706-21710.
- Bruning, J. B. & Y. Shamoo, (2004) Structural and Thermodynamic Analysis of Human PCNA with Peptides Derived from DNA Polymerase-[delta] p66 Subunit and Flap Endonuclease-1. *Structure* **12**: 2209-2219.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H. P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese & J. G. Venter, (1996) Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.

- Bunting, K. A., S. M. Roe & L. H. Pearl, (2003) Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/DinB to the beta-clamp. *Embo J.* **22**: 5883-5892.
- Burgers, P. M. J. & K. J. Gerik, (1998) Structure and Processivity of Two Forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **273**: 19756-19762.
- Burggraf, S., H. Huber & K. O. Stetter, (1997) Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 657-660.
- Burnouf, D. Y., V. Olieric, J. Wagner, S. Fujii, J. Reinbolt, R. P. Fuchs & P. Dumas, (2004) Structural and biochemical analysis of sliding clamp/ligand interactions suggest a competition between replicative and translesion DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **335**: 1187-1197.
- ## C
- Cambon-Bonavita, M. A., P. Schmitt, M. Zieger, J. M. Flaman, F. Lesongeur, G. Raguene, D. Bindel, N. Frisch, Z. Lakkis, D. Dupret, G. Barbier & J. Querellou, (2000) Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fomicolans*. *Extremophiles* **4**: 215-225.
- Cann, I. K. O., S. Ishino, I. Hayashi, K. Komori, H. Toh, K. Morikawa & Y. Ishino, (1999a) Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**: 6591-6599.
- Cann, I. K. O., S. Ishino, N. Nomura, Y. Sako & Y. Ishino, (1999b) Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, an aerobic hyperthermophilic crenarchaeote. *J. Bacteriol.* **181**: 5984-5992.
- Cann, I. K. O., S. Ishino, M. Yuasa, H. Daiyasu, H. Toh & Y. Ishino, (2001) Biochemical analysis of Replication Factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **183**: 2614-2623.
- Cann, I. K. O., K. Komori, H. Toh, S. Kanai & Y. Ishino, (1998) A heterodimeric DNA polymerase: Evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14250-14255.
- Carpentieri, F., M. De Felice, M. De Falco, M. Rossi & F. M. Pisani, (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.
- Chapados, B. R., Q. Chai, D. J. Hosfield, J. Z. Qiu, B. H. Shen & J. A. Tainer, (2001) Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J. Mol. Biol.* **307**: 541-556.
- Chapados, B. R., D. J. Hosfield, S. Han, J. Qiu, B. Yelent, B. Shen & J. A. Tainer, (2004) Structural Basis for FEN-1 Substrate Specificity and PCNA-Mediated Activation in DNA Replication and Repair. *Cell* **116**: 39-50.
- Charbonnier, F., G. Erauso, T. Barbeyron, D. Prieur & P. Forterre, (1992) Evidence that a plasmid from a hyperthermophilic archaeobacterium is relaxed at physiological temperatures. *J. Bacteriol.* **174**: 6103-6108.
- Chen, Y. H., S. A. Kocherginskaya, Y. Y. Lin, B. Sriratana, A. M. Lagunas, J. B. Robbins, R. I. Mackie & I. K. O. Cann, (2005) Biochemical and mutational analyses of a unique clamp loader complex in the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J. Biol. Chem.* **280**: 41852-41863.
- Chien, A., D. B. Edgar & J. M. Trela, (1976) Deoxyribonucleic-Acid Polymerase from Extreme Thermophile *Thermus-Aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1550-1557.
- Chilkova, O., B. H. Jonsson & E. Johansson, (2003) The Quaternary Structure of DNA Polymerase epsilon from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 14082-14086.
- Christiaens, B., S. Symoens, S. Vanderheyden, Y. Engelborghs, A. Joliot, A. Prochiantz, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu & B. Vanloo, (2002) Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2918-2926.
- Cline, J., J. C. Braman & H. H. Hogrefe, (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **24**: 3546-3551.
- Cohen, G. N., V. Barbe, D. Flament, M. Galperin, R. Heilig, O. Lecompte, O. Poch, D. Prieur, J. Querellou, R. Ripp, J. C. Thierry, D. O. J. Van, J. Weissenbach, Y. Zivanovic & P. Forterre, (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1495-1512.
- Colombo, S., S. Dauria, P. Fusi, L. Zecca, C. A. Raia & P. Tortora, (1992) Purification and Characterization of a Thermostable Carboxypeptidase from the Extreme Thermophilic Archaeobacterium *Sulfolobus-Solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* **206**: 349-357.
- Cubeddu, L. & M. F. White, (2005) DNA damage detection by an archaeal single-stranded DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* **353**: 507-516.

Cullmann, G., K. Fien, R. Kobayashi & B. Stillman, (1995) Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4661-4671.

D

Dabrowski, S. & J. Kur, (1998) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant His-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Prot. Expr. Purif.* **14**: 131-138.

Daimon, K., Y. Kawarabayasi, H. Kikuchi, Y. Sako & Y. Ishino, (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.

De Felice, M., L. Esposito, B. Pucci, F. Carpentieri, M. De Falco, M. Rossi & F. M. Pisani, (2003) Biochemical characterization of a CDC6-like protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **278**: 46424-46431.

De Felice, M., L. Esposito, B. Pucci, M. De Falco, M. Rossi & F. M. Pisani, (2004) A CDC6-like factor from the archaea *Sulfolobus solfataricus* promotes binding of the mini-chromosome maintenance complex to DNA. *J. Biol. Chem.* **279**: 43008-43012.

De Felice, M., C. W. Sensen, R. L. Charlebois, M. Rossi & F. M. Pisani, (1999) Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **291**: 47-57.

Deleeuw, L., A. V. Tchernatynskaia & A. N. Lane, (2008) Thermodynamics and specificity of the Mbp1-DNA interaction. *Biochemistry* **47**: 6378-6385.

Dietrich, J., P. Schmitt, M. Zieger, B. Preve, J. L. Rolland, H. Chaabihi & Y. Gueguen, (2002) PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *Fems Microbiol. Lett.* **217**: 89-94.

Dionne, I., N. J. Brown, R. Woodgate & S. D. Bell, (2008) On the mechanism of loading the PCNA sliding clamp by RFC. *Mol. Microbiol.* **68**: 216-222.

Dionne, I., R. K. Nookala, S. P. Jackson, A. J. Doherty & S. D. Bell, (2003) A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Cell* **11**: 275-282.

DiRuggiero, J., D. Dunn, D. L. Maeder, R. Holley-Shanks, J. Chatard, R. Horlacher, F. T. Robb, W. Boos & R. B. Weiss, (2000) Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic Archaea. *Mol. Microbiol.* **38**: 684-693.

Dore, A. S., M. L. Kilkenny, S. A. Jones, A. W. Oliver, S. M. Roe, S. D. Bell & L. H. Pearl, (2006) Structure of an archaeal PCNA1-PCNA2-FEN1 complex: elucidating PCNA subunit and client enzyme specificity. *Nucl. Acids Res.* **34**: 4515-4526.

Ducoux, M., S. Urbach, G. Baldacci, U. Hübscher, S. Koundrioukoff, J. Christensen & P. Hughes, (2001) Mediation of PCNA-dependent DNA replication through a conserved P21Cip1-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **276**: 49258-49266.

E

Edgell, D. R., H. P. Klenk & W. F. Doolittle, (1997) Gene duplications in evolution of archaeal family B DNA polymerases. *J. Bacteriol.* **179**: 2632-2640.

Egorova, K. & G. Antranikian, (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 649-655.

Eissenberg, J. C., R. Ayyagari, X. V. Gomes & P. M. J. Burgers, (1997) Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ . *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6367-6378.

Elkins, J. G., M. Podar, D. E. Graham, K. S. Makarova, Y. Wolf, L. Randau, B. P. Hedlund, C. I. Brochier-Armanet, V. Kunin, I. Anderson, A. Lapidus, E. Goltsman, K. Barry, E. V. Koonin, P. Hugenholtz, N. Kyrpides, G. Wanner, P. Richardson, M. Keller & K. O. Stetter, (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 8102-8107.

Emberly E. G., R. M., Chao Tang, Ned S. Wingreen,, (2004) Flexibility of beta-sheets: Principal component analysis of database protein structures. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **55**: 91-98.

Emptage, K., R. O'Neill, A. Solovyova & B. A. Connolly, (2008) Interplay between DNA Polymerase and Proliferating Cell Nuclear Antigen Switches Off Base Excision Repair of Uracil and Hypoxanthine during Replication in Archaea. *J. Mol. Biol.* **383**: 762-771.

Erauso, G., A. L. Reysenbach, A. Godfroy, J. R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross, V. Marteinson, G. Barbier, N. R. Pace & D. Prieur, (1993) *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **160**:338-349.

F

- Febbraio, F., A. Andolfo, F. Tanfani, R. Briante, F. Gentile, S. Formisano, C. Vaccaro, A. Scire, E. Bertoli, P. Pucci & R. Nucci, (2004) Thermal stability and aggregation of *Sulfolobus solfataricus* beta-glycosidase are dependent upon the n-epsilon-methylation of specific lysyl residues - Critical role of in vivo post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* **279**: 10185-10194.
- Feng, W. Y. & G. D'Urso, (2001) *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the amino-terminal catalytic domains of DNA polymerase epsilon are viable but require the DNA damage checkpoint control. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 4495-4504.
- Fiala, G. & K. O. Stetter, (1986) *Pyrococcus-Furiosus* Sp-Nov Represents a Novel Genus of Marine Heterotrophic Archaeobacteria Growing Optimally at 100-Degrees C. *Arch. Microbiol.* **145**: 56-61.
- Firbank, S. J., J. Wardle, P. Heslop, R. J. Lewis & B. A. Connolly, (2008) Uracil recognition in archaeal DNA polymerases captured by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **381**: 529-539.
- Fletcher, R. J., B. E. Bishop, R. P. Leon, R. A. Sclafani, C. M. Ogata & X. J. S. Chen, (2003) The structure and function of MCM from archaeal M-thermoautotrophicum. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 160-167.
- Fogg, M. J., L. H. Pearl & B. A. Connolly, (2002) Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 922-927.
- Forterre, P., C. Brochier & H. Philippe, (2002) Evolution of the archaea. *Theor. Pop. Biol.* **61**: 409-422.
- Forterre, P., J. Filée & H. Myllykallio, (2004) Origin and evolution of DNA and DNA replication machineries. In: *The Genetic Code and the Origin of Life*. L. R. de Pouplana (ed). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York, pp. 145-168.
- Franklin, M. C., J. Wang & T. A. Steitz, (2001) Structure of the Replicating Complex of a Pol [alpha] Family DNA Polymerase. *Cell* **105**: 657-667.
- Fukuda, K., H. Morioka, S. Imajou, S. Ikeda, E. Ohtsuka & T. Tsurimoto, (1995) Structure-function relationship of the eukariotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **270**: 22527-22534.
- Fukui, T., K. Yamauchi, T. Muroya, M. Akiyama, H. Maki, A. Sugino & S. Waga, (2004) Distinct roles of DNA polymerases δ and ϵ at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* **9**: 179-191.

G

- Georgescu, R. E., S. S. Kim, O. Yurieva, J. Kuriyan, X. P. Kong & M. O'Donnell, (2008) Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell* **132**: 43-54.
- Gerard, E., E. Jolivet, D. Prieur & P. Forterre, (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P-furiosus*. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 72-78.
- Gill, S., R. O'Neill, R. J. Lewis & B. A. Connolly, (2007) Interaction of the family-B DNA polymerase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* with deaminated bases. *J. Mol. Biol.* **372**: 855-863.
- Giver, L., A. Gershenson, P. O. Freskgard & F. H. Arnold, (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12809-12813.
- Godfroy, A., N. D. H. Raven & R. J. Sharp, (2000) Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *Fems Microbiol. Lett.* **186**: 127-132.
- Gomes, A. V., J. A. Barnes & H. J. Vogel, (2000) Spectroscopic characterization of the interaction between calmodulin-dependent protein kinase I and calmodulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**: 28-36.
- Gomes, X. V. & P. M. J. Burgers, (2000) Two modes of FEN1 binding to PCNA regulated by DNA. *EMBO J.* **19**: 3811-3821.
- Gomes, X. V. & P. M. J. Burgers, (2001) ATP utilization by yeast replication factor C. I. ATP-mediated interaction with DNA and with Proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **276**: 34768-34775.
- Gomez-Llorente, Y., R. J. Fletcher, X. J. S. Chen, J. M. Carazo & C. S. Martin, (2005) Polymorphism and double hexamer structure in the archaeal minichromosome maintenance (MCM) helicase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **280**: 40909-40915.
- Gonzalez, J. M., Y. Masuchi, F. T. Robb, J. W. Ammerman, D. L. Maeder, M. Yanagibayashi, J. Tamaoka & C. Kato, (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130.
- Grabowski, B. & Z. Kelman, (2003) Archaeal DNA replication: Eukaryal Proteins in a Bacterial Context. *Ann. Rev. Microbiol.* **57**: 487-516.
- Greagg, M. A., M. J. Fogg, G. Panayotou, S. J. Evans, B. A. Connolly & L. H. Pearl, (1999) A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-

- strand uracil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 9045-9050.
- Gribaldo, S. & C. Brochier-Armanet, (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **361**: 1007-1022.
- Gueguen, Y., J. L. Rolland, O. Lecompte, P. Azam, G. Le Romancer, D. Flament, J. P. Raffin & J. Dietrich, (2001) Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5961-5969.
- Gulbis, J. M., Z. Kelman, J. Hurwitz, M. O'Donnel & J. Kuriyan, (1996) Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* **87**: 297-306.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami & B. Chauhan, (2003) Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* **38**: 1599-1616.
- ## H
- Hallam, S. J., K. T. Konstantinidis, N. Putnam, C. Schleper, Y.-i. Watanabe, J. Sugahara, C. Preston, J. de la Torre, P. M. Richardson & E. F. DeLong, (2006) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote Cenarchaeum symbiosum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 18296-18301.
- Hamatake, R. K., H. Hasegawa, A. B. Clark, K. Bebenek, T. A. Kunkel & A. Sugino, (1990) Purification and Characterization of DNA Polymerase-Ii from the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae* - Identification of the Catalytic Core and a Possible Holoenzyme Form of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**: 4072-4083.
- Harmsen, H. J. M., D. Prieur & C. Jeanthon, (1997) Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2876-2883.
- Hawe, A., M. Sutter & W. Jiskoot, (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* **25**: 1487-1499.
- Hayashi, I., K. Morikawa & Y. Ishino, (1999) Specific interaction between DNA polymerase II(PolD) and RadB, a Rad51/Dmc1 homolog, in *Pyrococcus furiosus*. *Nucl. Acids Res.* **27**: 4695-4702.
- Henneke, G., D. Flament, U. Hübscher, J. Querellou & J. P. Raffin, (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., Y. Gueguen, D. Flament, P. Azam, J. Querellou, J. Dietrich, U. Hübscher & J. P. Raffin, (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., J. P. Raffin, E. Ferrari, Z. O. Jónsson, J. Dietrich & U. Hübscher, (2000) The PCNA from *Thermococcus fumicolans* functionally interacts with DNA polymerase delta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**: 600-606.
- Hingorani, M. M. & M. O'Donnell, (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.
- Hopfner, K. P., A. Eichinger, R. A. Engh, F. Laue, W. Ankenbauer, R. Huber & B. Angerer, (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3600-3605.
- Hosfield, D. J., C. D. Mol, B. Shen & J. A. Tainer, (1998) Structure of the DNA Repair and Replication Endonuclease and Exonuclease FEN-1: Coupling DNA and PCNA Binding to FEN-1 Activity. *Cell* **95**: 135-146.
- Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer & K. O. Stetter, (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Huber, R., H. Huber & K. O. Stetter, (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *Fems Microbiol. Rev.* **24**: 615-623.
- Hübscher, U., G. Maga & S. Spadari, (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* **71**: 133-163.
- Hwang, K. Y., K. Baek, H. Y. Kim & Y. Cho, (1998) The crystal structure of flap endonuclease-1 from *Methanococcus jannaschii*. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 707-713.
- ## I
- Imamura, K., K. Fukunaga, Y. Kawarabayasi & Y. Ishino, (2007) Specific interactions of three proliferating cell nuclear antigens with replication-related proteins in *Aeropyrum pernix*. *Mol. Microbiol.* **64**: 308-318.
- Ishino, Y., K. Komori, I. K. O. Cann & Y. Koga, (1998) A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol.* **180**: 2232-2236.
- Ishino, Y., T. Tsurimoto, S. Ishino & I. K. Cann, (2001) Functional interactions of an archaeal

sliding clamp with mammalian clamp loader and DNA polymerase δ . *Genes Cells* **6**: 699-706.

- Ito, N., O. Nureki, M. Shirouzu, S. Yokoyama & F. Hanaoka, (2003) Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis. *Genes Cells* **8**: 913-923.
- Ivanov, I., B. R. Chapados, J. A. McCammon & J. A. Tainer, (2006) Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucl. Acids Res.* **34**: 6023-6033.
- Iwai, T., N. Kurosawa, Y. H. Itoh, N. Kimura & T. Horiuchi, (2000) Sequence analysis of three family B DNA polymerases from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfurisphaera ohwakuensis*. *DNA Res.* **7**: 243-251.

J

- Jacquemet, A., J. Barbeau, L. Lemiegre & T. Benvegna, (2009) Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie* **91**: 711-717.
- Jaenicke, R. & G. Böhm, (2001) Thermostability of proteins from *Thermotoga maritima*. *Methods Enzymol.* **334**: 438-469.
- Jeruzalmi, D., M. O'Donnell & J. Kuriyan, (2001) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of E-coli DNA polymerase III. *Cell* **106**: 429-441.
- Johansson, E., P. Garg & P. M. J. Burgers, (2004) The pol32 subunit of DNA polymerase delta contains separable domains for processive replication and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding. *J. Biol. Chem.* **279**: 1907-1915.
- Johnson, A. & M. O'Donnell, (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* **74**: 283-315.
- Jokela, M., A. Eskelinen, H. Pospiech, J. Rouvinen & J. E. Syvaöja, (2004) Characterization of the 3' exonuclease subunit DP1 of *Methanococcus jannaschii* replicative DNA polymerase D. *Nucl. Acids Res.* **32**: 2430-2440.
- Jónsson, Z. O., R. Hindges & U. Hübscher, (1998) Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J.* **17**: 2412-2425.

K

- Kafer, E. & S. K. Chae, (2008) uvsF(RFC1), the large subunit of replication factor C in

Aspergillus nidulans, is essential for DNA replication, functions in UV repair and is upregulated in response to MMS-induced DNA damage. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 1227-1234.

- Kahler, M. & G. Antranikian, (2000) Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*. *J. Bacteriol.* **182**: 655-663.
- Karlin, S., J. Mrazek, J. Ma & L. Brocchieri, (2005) Predicted highly expressed genes in archaeal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 7303-7308.
- Kashima, Y., K. Mori, H. Fukada & K. Ishikawa, (2005) Analysis of the function of a hyperthermophilic endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii* that hydrolyzes crystalline cellulose. *Extremophiles* **9**: 37-43.
- Kasiviswanathan, R., J. H. Shin & Z. Kelman, (2005) Interactions between the archaeal Cdc6 and MCM proteins modulate their biochemical properties. *Nucl. Acids Res.* **33**: 4940-4950.
- Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, S. Yamazaki, Y. Haikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, H. Nakazawa, M. Takamiya, S. Masuda, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. I. Aoki, K. Kubota, Y. Nakamura, N. Nomura, Y. Sako & H. Kiguchi, (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **6**: 83-101.
- Kawarabayasi, Y., M. Sawada, H. Horikawa, Y. Haikawa, Y. Hino, S. Yamamoto, M. Sekine, S. Baba, H. Kosugi, A. Hosoyama, Y. Nagai, M. Sakai, K. Ogura, R. Otsuka, H. Nakazawa, M. Takamiya, Y. Ohfuku, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki & H. Kikuchi, (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* **5**: 147-155.
- Kazmirski, S. L., Y. Zhao, G. D. Bowman, M. O'Donnell & J. Kuriyan, (2005) Out-of-plane motions in open sliding clamps: molecular dynamics simulations of eukaryotic and archaeal proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 13801-13806.
- Kedar, P. S., S. J. Kim, A. Robertson, E. Hou, R. Prasad, J. K. Horton, M. Lewis & S. H. Wilson, (2002) Direct interaction between mammalian DNA polymerase β and proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **279**: 19310-19320.

- Keller, R. C., R. Mossi, G. Maga, R. E. Wellinger, U. Hubscher & J. M. Sogo, (1999) Electron microscopic analysis reveals that replication factor C is sequestered by single-stranded DNA. *Nucl. Acids Res.* **27**: 3433-3437.
- Kelman, Z. & J. Hurwitz, (1998) Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem. Sci.* **23**: 236-238.
- Kelman, Z. & J. Hurwitz, (2000) A unique organization of the protein subunits of the DNA polymerase clamp loader in the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. *J. Biol. Chem.* **275**: 7327-7336.
- Kelman, Z. & M. O'Donnell, (1994) DNA replication : enzymology and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 185-195.
- Kelman, Z. & M. O'Donnell, (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 171-200.
- Kennedy, S. P., W. V. Ng, S. L. Salzberg, L. Hood & S. DasSarma, (2001) Understanding the adaptation of Halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.* **11**: 1641-1650.
- Kernchen, U. & G. Lipps, (2006) Thermodynamic analysis of the single-stranded DNA binding activity of the archaeal replication protein A (RPA) from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* **45**: 594-603.
- Kerr, I. D., R. I. Wadsworth, L. Cubeddu, W. Blankenfeldt, J. H. Naismith & M. F. White, (2003) Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein. *EMBO J.* **22**: 2561-2570.
- Kim, S., H. G. Dallmann, C. S. McHenry & K. J. Marians, (1996) Coupling of a Replicative Polymerase and Helicase: A [tau]-DnaB Interaction Mediates Rapid Replication Fork Movement. *Cell* **84**: 643-650.
- Kim, S. W., D. U. Kim, J. K. Kim, L. W. Kang & H. S. Cho, (2008) Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* **42**: 356-361.
- Kim, S. Y., A. N. Semyonov, R. J. Twieg, A. L. Horwich, J. Frydman & W. E. Moerner, (2005) Probing the sequence of conformationally induced polarity changes in the molecular chaperonin GroEL with fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **109**: 24517-24525.
- Kiyonari, S., K. Takayama, H. Nishida & Y. Ishino, (2006) Identification of a novel binding motif in *pyrococcus furiosus* DNA ligase for the functional interaction with proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **281**: 28023-28032.
- Knibiehler, M., F. Goubin, N. Escalas, Z. O. Jonsson, H. Mazarguil, U. Hübscher & B. Ducommun, (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. & Y. Ishino, (2000) Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'-> 5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Prot. Eng.* **13**: 41-47.
- Komori, K. & Y. Ishino, (2001) Replication protein A in *Pyrococcus furiosus* is involved in homologous DNA recombination. *J. Biol. Chem.* **276**: 25654-25660.
- Kong, X. P., R. Onrust, M. O'Donnell & J. Kuriyan, (1992) Three-dimensional structure of the [beta] subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Kontopidis, G., S.-Y. Wu, D. I. Zheleva, P. Taylor, C. McInnes, D. P. Lane, P. M. Fischer & M. D. Walkinshaw, (2005) Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 1871-1876.
- Krishna, T. S. R., X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers & J. Kuriyan, (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**: 1233-1243.
- ## L
- Lai, L. H., H. Yokota, L. W. Hung, R. Kim & S. H. Kim, (2000) Crystal structure of archaeal RNase HII: a homologue of human major RNase H. *Structure Fold Ds.* **8**: 897-904.
- Lai, X. Q., H. B. Shao, F. Y. Hao & L. Huang, (2002) Biochemical characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus shibatae*. *Extremophiles* **6**: 469-477.
- Lao-Sirieix, S. H. & S. D. Bell, (2004) The heterodimeric primase of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* possesses DNA and RNA primase, polymerase and 3'-terminal nucleotidyl transferase activities. *J. Mol. Biol.* **344**: 1251-1263.
- Laurence, T. A., Y. Kwon, A. Johnson, C. W. Hollars, M. O'Donnell, J. A. Camarero & D. Barsky, (2008) Motion of a DNA sliding clamp observed by single molecule fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **283**: 22895-22906.
- Le Breton, M., G. Henneke, C. Norais, D. Flament, H. Myllykallio, J. Querellou & J.-P. Raffin, (2007) The Heterodimeric Primase from the

- Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*: A Multifunctional Enzyme for Initiation and Repair? *J. Mol. Biol.* **374**: 1172-1185.
- Lecompte, O., R. Ripp, V. Puzos-Barbe, S. Duprat, R. Heilig, J. Dietrich, J. C. Thierry & O. Poch, (2001) Genome evolution at the genus level: comparison of three complete genomes of hyperthermophilic archaea. *Genome Res.* **11**: 981-993.
- Lee, Y. J., J. J. Choi & S. T. Kwon, (2006) Cloning, expression, and partial characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 821-830.
- Leu, F. P., R. Georgescu & M. O'Donnell, (2003) Mechanism of the E-coli tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol. Cell* **11**: 315-327.
- Leveque, E., S. Janecek, B. Haye & A. Belarbi, (2000) Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzym. Microb. Technol.* **26**: 3-14.
- Levin, D. S., A. E. McKenna, T. A. Motycka, Y. Matsumoto & A. E. Tomkinson, (2000) Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr. Biol.* **10**: 919-922.
- Levin, D. S., S. Vijayakumar, X. Liu, V. P. Bermudez, J. Hurwitz & A. E. Tomkinson, (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, H., B. Xie, Y. Zhou, A. Rahmeh, S. Trusa, S. Zhang, Y. Gao, E. Y. Lee & M. Y. Lee, (2006) Functional roles of p12, the fourth subunit of human DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **281**: 14748-14755.
- Li, R., G. J. Hannon, D. Beach & B. Stillman, (1996) Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr. Biol.* **6**: 189-199.
- Li, W. F., X. X. Zhou & P. Lu, (2005) Structural features of thermozymses. *Biotechnol. Adv.* **23**: 271-281.
- LiCata, V. J. & A. J. Wowor, (2008) Applications of Fluorescence Anisotropy to the Study of Protein-DNA Interactions. *Methods in Cell Biology.* 243-262.
- Liu, L. D., K. Komori, S. Ishino, A. A. Bocquier, I. K. O. Cann, D. Kohda & Y. Ishino, (2001) The archaeal DNA primase - Biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **276**: 45484-45490.
- Lopez, P., H. Philippe, H. Myllykallio & P. Forterre, (1999) Identification of putative chromosomal origins of replication in Archaea. *Mol. Microbiol.* **32**: 883-886.
- Lopez De Saro, F. L., R. E. Georgescu, F. Leu & M. O'Donnell, (2003) Protein trafficking on sliding clamps. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **359**: 25-30.
- Lou, H. Q., Z. H. Duan, T. Sun & L. Huang, (2004) Cleavage of double-stranded DNA by the intrinsic 3'-5' exonuclease activity of DNA polymerase B1 from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* at high temperature. *Fems Microbiol. Lett.* **231**: 111-117.
- Lu, S., Z. Li, Z. Wang, X. Ma, D. Sheng, J. Ni & Y. Shen, (2008) Spatial subunit distribution and in vitro functions of the novel trimeric PCNA complex from *Sulfolobus tokodaii*. *Biochem. Biophys Res. Commun* **376**: 369-374.
- Lu, X., C. K. Tan, J. Q. Zhou, M. You, L. M. Carastro, K. M. Downey & A. G. So, (2002) Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **277**: 24340-24345.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge & E. J. Mathur, (1991) High-Fidelity Amplification Using a Thermostable DNA-Polymerase Isolated from *Pyrococcus-Furiosus*. *Gene* **108**: 1-6.
- Lundgren, M., A. Andersson, L. M. Chen, P. Nilsson & R. Bernander, (2004) Three replication origins in *Sulfolobus* species: Synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 7046-7051.

M

- Maga, G., G. Blanca, I. Shevelev, I. Frouin, K. Ramadan, S. Spadari, G. Villani & U. Hübscher, (2004) The human DNA polymerase λ interacts with PCNA through a domain important for DNA primer binding and the interaction is inhibited by p21/WAF1/CIP1. *Faseb J.* **18**: 1743-1745.
- Maga, G. & U. Hübscher, (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**: 3051-3060.
- Maga, G., M. Stucki, S. Spadari & U. Hübscher, (2000) DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J. Mol. Biol.* **295**: 791-801.
- Maga, G., G. Villani, K. Ramadan, I. Shevelev, N. Tanguy Le Gac, L. Blanco, G. Blanca, S. Spadari & U. Hübscher, (2002) Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 48434-48440.

- Maga, G., G. Villani, V. Tillement, M. Stucki, G. A. Locatelli, I. Frouin, S. Spadari & U. Hübscher, (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. USA* **98**: 14298-14303.
- Maisnier-Patin, S., L. Malandrin, N. K. Birkeland & R. Bernander, (2002) Chromosome replication patterns in the hyperthermophilic euryarchaea *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanocaldococcus jannaschii*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1443-1450.
- Majernik, A. I. & J. P. J. Chong, (2008) A conserved mechanism for replication origin recognition and binding in archaea. *Biochem. J.* **409**: 511-518.
- Majernik, A. I., E. R. Jenkinson & J. P. J. Chong, (2004) DNA replication in thermophiles. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 236-239.
- Majka, J. & P. M. J. Burgers, (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**: 227-260.
- Makarova, K. S., L. Aravind, M. Y. Galperin, N. V. Grishin, R. L. Tatusov, Y. I. Wolf & E. V. Koonin, (1999) Comparative genomics of the archaea (Euryarchaeota): Evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res.* **9**: 608-628.
- Marteinsson, V. T., L. Watrin, D. Prieur, J. C. Caprais, G. Ragueneas & G. Erauso, (1995) Phenotypic characterization, DNA similarities, and protein profiles of twenty sulfur metabolizing hyperthermophilic anaerobic archaea isolated from hydrothermal vents in the southwestern Pacific Ocean. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 623-632.
- Matsui, E., S. Kawasaki, H. Ishida, K. Ishikawa, Y. Kosugi, H. Kikuchi, Y. Kawarabayashi & I. Matsui, (1999) Thermostable flap endonuclease from the archaeon, *Pyrococcus horikoshii*, cleaves the replication fork-like structure endonucleolytically. *J. Biol. Chem.* **274**: 18297-18309.
- Matsumiya, S., S. Ishino, Y. Ishino & K. Morikawa, (2002) Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*. *Genes Cells* **7**: 911-922.
- Matsumiya, S., S. Ishino, Y. Ishino & K. Morikawa, (2003) Intermolecular ion pairs maintain the toroidal structure of *Pyrococcus furiosus* PCNA. *Prot. Sci.* **12**: 823-831.
- Matsumiya, S., Y. Ishino & K. Morikawa, (2001) Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Prot. Sci.* **10**: 17-23.
- Matsunaga, F., P. Forterre, Y. Ishino & H. Myllykallio, (2001) *In vivo* interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11152-11257.
- Matsunaga, F., C. Norais, P. Forterre & H. Myllykallio, (2003) Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep.* **4**: 1-5.
- Mayanagi, K., T. Miyata, T. Oyama, Y. Ishino & K. Morikawa, (2001) Three-Dimensional Electron Microscopy of the Clamp Loader Small Subunit from *Pyrococcus furiosus*. *J. Struct. Biol.* **134**: 35-45.
- McInerney, P., A. Johnson, F. Katz & M. O'Donnell, (2007) Characterization of a Triple DNA Polymerase Replisome. *Mol. Cell* **27**: 527-538.
- Mesiet-Cladiere, L., C. Norais, J. Kuhn, J. Briffotiaux, J. W. Sloostra, E. Ferrari, U. Hübscher, D. Flament & H. Myllykallio, (2007) A novel proteomic approach identifies new interaction partners for proliferating cell nuclear antigen. *J. Mol. Biol.* **372**: 1137-1148.
- Miyata, T., H. Suzuki, T. Oyama, K. Mayanagi, Y. Ishino & K. Morikawa, (2005) Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 13795-13800.
- Moldovan, G.-L., B. Pfander & S. Jentsch, (2007) PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* **129**: 665-679.
- Mossi, R., R. C. Keller, E. Ferrari & U. Hübscher, (2000) DNA polymerase switching: II. Replication factor C abrogates primer synthesis by DNA polymerase α at a critical length. *J. Mol. Biol.* **295**: 803-814.
- Motz, M., I. Kober, C. Girardot, E. Loeser, U. Bauer, M. Albers, G. Moeckel, E. Minch, H. Voss, C. Kilger & M. Koegl, (2002) Elucidation of an archaeal replication protein network to generate enhanced PCR enzymes. *J. Biol. Chem.* **277**: 16179-16188.
- Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu & E. F. DeLong, (1998) Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Env. Microbiol.* **64**: 2585-2595.
- Myllykallio, H., P. Lopez, P. Lopez Garcia, R. Heilig, W. Saurin, Y. Zivanovic, H. Philippe & P. Forterre, (2000) Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science* **288**: 2212-2215.

N

- Nakashima, H., S. Fukuchi & K. Nishikawa, (2003) Compositional changes in RNA, DNA and proteins for bacterial adaptation to higher and lower temperatures. *J. Biochem.* **133**: 507-513.
- Nakatani, M., S. Ezaki, H. Atomi & T. Imanaka, (2000) A DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon with unique cofactor specificity. *J. Bacteriol.* **182**: 6424-6433.
- Nakatani, M., S. Ezaki, H. Atomi & T. Imanaka, (2002) Substrate recognition and fidelity of strand joining by an archaeal DNA ligase. *Eur. J. Biochem.* **269**: 650-656.
- Naryzhny, S. N., H. Zhao & H. Lee, (2005) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J. Biol. Chem.* **280**: 13888-13894.
- Neuwald, A. F., (2005) Evolutionary clues to eukaryotic DNA clamp-loading mechanisms: analysis of the functional constraints imposed on replication factor C AAA+ ATPases. *Nucl. Acids Res.* **33**: 3614-3628.
- Nishida, H., S. Ishino, T. Miyata, K. Morikawa & Y. Ishino, (2005a) 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.
- Nishida, H., S. Kiyonari, Y. Ishino & K. Morikawa, (2006) The closed structure of an archaeal DNA ligase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* **360**: 956-967.
- Nishida, H., D. Tsuchiya, Y. Ishino & K. Morikawa, (2005b) Overexpression, purification and crystallization of an archaeal DNA ligase from *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**: 1100-1102.

O

- O'Donnell, M., D. Jeruzalmi & J. Kuriyan, (2001) Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Curr. Biol.* **11**: R935-R946.
- O'Donnell, M., R. Onrust, F. B. Dean, M. Chen & J. Hurwitz, (1993) Homology in accessory proteins of replicative polymerases - *E. coli* to humans. *Nucl. Acids Res.* **21**: 1-3.
- Ogura, T. & A. J. Wilkinson, (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**: 575-597.

- Ohmori, H., E. C. Friedberg, R. P. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, Z. G. Wang & R. Woodgate, (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell* **8**: 7-8.
- Oku, T., S. Ikeda, H. Sasaki, K. Fukuda, H. Morioka, E. Ohtsuka, H. Yoshikawa & T. Tsurimoto, (1998) Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells* **3**: 357-369.
- Ola, A., S. Waga, V. Ellison, B. Stillman, M. McGurk, I. M. Leigh, N. H. Waseem & A. Waseem, (2001) Human-*Saccharomyces cerevisiae* proliferating cell nuclear antigen hybrids: oligomeric structure and functional characterization using in vitro DNA replication. *J. Biol. Chem.* **276**: 10168-10177.
- Olsen, G. J. & C. R. Woese, (1996) Lessons from an Archaeal genome: What are we learning from *Methanococcus jannaschii*? *Trends Genet.* **12**: 377-379.
- Oren, A., (2002) Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 56-63.
- Oyama, T., Y. Ishino, I. K. O. Cann, S. Ishino & K. Morikawa, (2001) Atomic Structure of the Clamp Loader Small Subunit from *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Cell* **8**: 455-463.

P

- Palud, A., G. Villani, S. L'Haridon, J. Querellou, J. P. Raffin & G. Henneke, (2008) Intrinsic properties of the two replicative DNA polymerases of *Pyrococcus abyssi* in replicating abasic sites: possible role in DNA damage tolerance? *Mol. Microbiol.* **70**: 746-761.
- Pascal, J. M., O. V. Tsodikov, G. L. Hura, W. Song, E. A. Cotner, S. Classen, A. E. Tomkinson, J. A. Tainer & T. Ellenberger, (2006) A flexible interface between DNA ligase and PCNA supports conformational switching and efficient ligation of DNA. *Mol. Cell* **24**: 279-291.
- Patel, G. B. & G. D. Sprott, (1999) Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**: 317-357.
- Pisani, F. M., M. De Felice, F. Carpentieri & M. Rossi, (2000) Biochemical characterization of a clamp-loader complex homologous to eukaryotic replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **301**: 61-73.

- Pisani, F. M., M. De Felice & M. Rossi, (1998) Amino acid residues involved in determining the processivity of the 3'-5' exonuclease activity in a family B DNA polymerase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* **37**: 15005-15012.
- Pisani, F. M., G. Manco, V. Carratore & M. Rossi, (1996) Domain organization and DNA-induced conformational changes of an archaeal family B DNA polymerase. *Biochemistry* **35**: 9158-9166.
- Podust, V. N., L.-S. Chang, R. Ott, G. L. Dianov & E. Fanning, (2002) Reconstitution of Human DNA Polymerase δ using Recombinant Baculoviruses. The p12 subunit potentiates DNA polymerizing activity of the four-subunit enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**: 3894-3901.
- Podust, V. N., N. Tiwari, S. Stephan & E. Fanning, (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.
- Pohler, J. R., M. Otterlei & E. Warbrick, (2005) An *in vivo* analysis of the localisation and interactions of human p66 DNA polymerase δ subunit. *BMC Mol. Biol.* **6**: 17.
- p125 subunit of DNA polymerase delta or DNA ligase I. *Exp. Cell Res.* **293**: 357-367.
- Robbins, J. B., M. C. McKinney, C. E. Guzman, B. Sriratana, S. Fitz-Gibbon, T. Ha & I. K. Cann, (2005) The euryarchaeota, nature's medium for engineering of single-stranded DNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **280**: 15325-15339.
- Robinson, N. P., I. Dionne, M. Lundgren, V. L. Marsh, R. Bernander & S. D. Bell, (2004) Identification of two origins of replication in the single chromosome of the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell* **116**: 25-38.
- Rossi, M. L., & Bambara, R. A. (2006) Reconstituted okazaki fragment processing indicates two pathways of primer removal. *J. Biol. Chem.* **281**: 26051-26061
- Rothschild, L. J. & R. L. Mancinelli, (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101.
- Rothwell, P. J. & G. Waksman, (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* **71**: 401-440.
- Rouillon, C., (2006) La répllication de l'ADN chez l'euryarchaea *Pyrococcus abyssi* : mise en place et dynamique du complexe. Brest: Université de Rennes1, pp. 170.
- Rouillon, C., G. Henneke, D. Flament, J. Querellou & J. P. Raffin, (2007) DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J. Mol. Biol.* **369**: 343-355.

R

- Reeve, J. N., K. A. Bailey, W. T. Li, F. Marc, K. Sandman & D. J. Soares, (2004) Archaeal histones: structures, stability and DNA binding. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 227-230.
- Reid, S. L., D. Parry, H.-H. Liu & B. A. Connolly, (2001) Binding and Recognition of GATATC Target Sequences by the EcoRV Restriction Endonuclease: A Study Using Fluorescent Oligonucleotides and Fluorescence Polarization. *Biochemistry* **40**: 2484-2494.
- Reiter, W. D., U. Hudepohl & W. Zillig, (1990) Mutational Analysis of an Archaeobacterial Promoter - Essential Role of a Tata Box for Transcription Efficiency and Start-Site Selection *In vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9509-9513.
- Richards, J. D., K. A. Johnson, H. Liu, A. M. McRobbie, S. McMahon, M. Oke, L. Carter, J. H. Naismith & M. F. White, (2008) Structure of the DNA repair helicase hel308 reveals DNA binding and autoinhibitory domains. *J. Biol. Chem.* **283**: 5118-5126.
- Riva, F., M. Savio, O. Cazzalini, L. A. Stivala, I. A. Scovassi, L. S. Cox, B. Ducommun & E. Prosperi, (2004) Distinct pools of proliferating cell nuclear antigen associated to DNA replication sites interact with the

S

- Sackett, D. L., J. R. Knutson & J. Wolff, (1990) Hydrophobic surfaces of tubulin probed by time-resolved and steady-state fluorescence of Nile red. *J. Biol. Chem.* **265**: 14899-14906.
- Sackett, D. L. & J. Wolff, (1987) Nile Red as a Polarity-Sensitive Fluorescent-Probe of Hydrophobic Protein Surfaces. *Anal. Biochem.* **167**: 228-234.
- Sakurai, S., K. Kitano, H. Yamaguchi, K. Hamada, K. Okada, K. Fukuda, M. Uchida, E. Ohtsuka, H. Morioka & T. Hakoshima, (2005) Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *Embo J.* **24**: 683-693.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz & S. Linn, (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Rev. Biochem.* **73**: 39-85.
- Sandman, K. & J. N. Reeve, (2005) Archaeal chromatin proteins: different structures but common function? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 656-661.

- Sato, A., A. Kanai, M. Itaya & M. Tomita, (2003) Cooperative regulation for Okazaki fragment processing by RNase HIII and FEN-1 purified from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**: 247-252.
- Savino, C., L. Federici, K. A. Johnson, B. Vallone, V. Nastopoulos, M. Rossi, F. M. Pisani & D. Tsernoglou, (2004) Insights into DNA Replication: The Crystal Structure of DNA Polymerase B1 from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Structure*. **12**: 2001-2008.
- Schiraldi, C. & M. De Rosa, (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* **20**: 515-521.
- Schwartzman, D. W. & C. H. Lineweaver, (2004) The hyperthermophilic origin of life revisited. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 168-171.
- Seybert, A., D. J. Scott, S. Scaife, M. R. Singleton & D. B. Wigley, (2002) Biochemical characterisation of the clamp/clamp loader proteins from the euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nucl. Acids Res.* **30**: 4329-4338.
- Seybert, A. & D. B. Wigley, (2004) Distinct roles for ATP binding and hydrolysis at individual subunits of an archaeal clamp loader. *EMBO J.* **23**: 1360-1371.
- Shamoo, Y. & T. A. Steitz, (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.
- Shen, Y., K. Musti, M. Hiramoto, H. Kikuchi, Y. Kawarabayashi & I. Matsui, (2001) Invariant Asp1122 and Asp1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* **276**: 27376-27383.
- Shen, Y., X.-F. Tang & I. Matsui, (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.
- Shen, Y., X. F. Tang, E. Matsui & I. Matsui, (2004a) Subunit interaction and regulation of activity through terminal domains of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 245-249.
- Shen, Y. L., X. F. Tang, H. Yokoyama, E. Matsui & I. Matsui, (2004b) A 21-amino acid peptide from the cysteine cluster II of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii* stimulates its nuclease activity which is Mre11-like and prefers manganese ion as the cofactor. *Nucl. Acids Res.* **32**: 158-168.
- Shimazaki, N., T. Yazaki, T. Kubota, A. Sato, A. Nakamura, S. Kurei, S. Toji, K. Tamai & O. Koiwai, (2005) DNA polymerase lambda directly binds to proliferating cell nuclear antigen through a confined C-terminal region. *Genes Cells* **10**: 705-715.
- Shiomi, Y., J. Usukura, Y. Masamura, K. Takeyasu, Y. Nakayama, C. Obuse, H. Yoshikawa & T. Tsurimoto, (2000) ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp-loader protein, replication factor C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 14127-14132.
- Shockley, K. R., D. E. Ward, S. R. Chhabra, S. B. Conners, C. I. Montero & R. M. Kelly, (2003) Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ Microbiol.* **69**: 2365-2371.
- Shuttleworth, G., M. J. Fogg, M. R. Kurpiewski, L. Jen-Jacobson & B. A. Connolly, (2004) Recognition of the pro-mutagenic base uracil by family B DNA polymerases from archaea. *J. Mol. Biol.* **337**: 621-634.
- Singer, G. A. C. & D. A. Hickey, (2003) Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene* **317**: 39-47.
- Slater, S. C., M. R. Lifshits, M. Odonnell & R. Maurer, (1994) Hole, the Gene Coding for the Theta Subunit of DNA-Polymerase-III of *Escherichia-Coli* - Characterization of Hole Mutant and Comparison with a Dnaq (Epsilon-Subunit) Mutant. *J. Bacteriol.* **176**: 815-821.
- Stetter, K. O., (1996) Hyperthermophiles in the history of life. *Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth (and Mars?)* **202**: 1-18.
- Stucki, M., Z. O. Jonsson & U. Hübscher, (2001) In eukaryotic flap endonuclease 1, the C terminus is essential for substrate binding. *J. Biol. Chem.* **276**: 7843-7849.

T

- Takagi, M., M. Nishioka, H. Kakihara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka & T. Imanaka, (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4504-4510.
- Tanaka, T., T. Fukui, S. Fujiwara, H. Atomi & T. Imanaka, (2004) Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* **279**: 30021-30027.
- Tang, X. F., Y. Shen, E. Matsui & I. Matsui, (2004) Domain Topology of the DNA Polymerase

- D Complex from a Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry USA* **43**: 11818-11827.
- Tom, S., L. A. Henricksen & R. A. Bambara, (2000) Mechanism whereby proliferating cell nuclear antigen stimulates flap endonuclease 1. *J. Biol. Chem.* **275**: 10498-10505.
- Tom, S., L. A. Henricksen, M. S. Park & R. A. Bambara, (2001) DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen form a functional complex. *J. Biol. Chem.* **276**: 24817-24825.
- Tori, K., M. Kimizu, S. Ishino & Y. Ishino, (2007) DNA Polymerases BI and D from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Both Bind to Proliferating Cell Nuclear Antigen with Their C-Terminal PIP-Box Motifs. *J. Bacteriol.* **189**: 5652-5657.
- Toueuille, M. & U. Hübscher, (2004) Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma* **113**: 113-125.
- Tsuchihashi, Z. & A. Kornberg, (1989) Atp Interactions of the Tau-Subunits and Gamma-Subunits of DNA Polymerase-III Holoenzyme of *Escherichia-Coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 17790-17795.
- Tsurimoto, T., (1999) PCNA binding proteins. *Front Biosci* **4**: D849-858.
- U**
- Uemori, T., Y. Sato, I. Kato, H. Doi & Y. Ishino, (1997) A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression and characterization. *Genes to Cells* **2**: 499-512.
- Umar, A., A. B. Buermeyer, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay & T. A. Kunkel, (1996) Requirement for PCNA in DNA Mismatch Repair at a Step Preceding DNA Resynthesis. *Cell* **87**: 65-73.
- Unk, I., L. Haracska, X. V. Gomes, P. M. Burgers, L. Prakash & S. Prakash, (2002) Stimulation of 3'→5' exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities of yeast *apn2* by proliferating cell nuclear antigen. *Mol. Cell Biol.* **22**: 6480-6486.
- V**
- Valeur B., (2004). Invitation à la Fluorescence Moléculaire. De Boeck (Ed.), Bruxelles.
- Vetriani, C., D. L. Maeder, N. Tolliday, K. S. Yip, T. J. Stillman, K. L. Britton, D. W. Rice, H. H. Klump & F. T. Robb, (1998) Protein thermostability above 100 degreesC: a key role for ionic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12300-12305.
- Vieille, C. & G. J. Zeikus, (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 1-43.
- Vijayakumar, S., B. R. Chapados, K. H. Schmidt, R. D. Kolodner, J. A. Tainer & A. E. Tomkinson, (2007) The C-terminal domain of yeast PCNA is required for physical and functional interactions with Cdc9 DNA ligase. *Nucl. Acids Res.* **35**: 1624-1637.
- Vivona, J. B. & Z. Kelman, (2003) The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. *FEBS Lett.* **546**: 167-172.
- Vogt, G., S. Woell & P. Argos, (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.* **69**: 631-643.
- W**
- Waga, S. & B. Stillman, (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* **67**: 721-751.
- Warbrick, E., (1998) PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays* **20**: 195-199.
- Wardle, J., P. M. J. Burgers, I. K. O. Cann, K. Darley, P. Heslop, E. Johansson, L. J. Lin, P. McGlynn, J. Sanvoisin, C. M. Stith & B. A. Connolly, (2008) Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the archaea, not occurring with bacteria and eukarya. *Nucl. Acids Res.* **36**: 705-711.
- Waters, E., M. J. Hohn, I. Ahel, D. E. Graham, M. D. Adams, M. Barnstead, K. Y. Beeson, L. Bibbs, R. Bolanos, M. Keller, K. Kretz, X. Lin, E. Mathur, J. Ni, M. Podar, T. Richardson, G. G. Sutton, M. Simon, D. Söll, K. O. Stetter, J. M. Short & M. Noordewier, (2003) The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 12984-12988.
- Webster, N. S., A. P. Negri, M. Munro & C. N. Battershill, (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environmental Microbiology* **6**: 288-300.
- Williams, G. J., K. Johnson, J. Rudolf, S. A. McMahon, L. Carter, M. Oke, H. T. Liu, G. L. Taylor, M. F. White & J. H. Naismith, (2006) Structure of the heterotrimeric PCNA from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**: 944-948.
- Woese, C. R. & G. E. Fox, (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R., O. Kandler & M. L. Wheelis, (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria,

and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4576-4579.

Wu, K., X. Lai, X. Guo, J. Hu, X. Xiang & L. Huang, (2007) Interplay between primase and replication factor C in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* **63**: 826-837.

X

Xu, H., P. Zhang, L. Liu & H. Lee, (2001) A novel PCNA-binding motif identified by the fanning of a random peptide display library. *Biochemistry USA* **40**: 4512-4520.

Y

Yang, H., J. H. Chiang, S. Fitz-Gibbon, M. Lebel, A. A. Sartori, J. Jiricny, M. M. Slupska & J. H. Miller, (2002) Direct interaction between uracil-DNA glycosylase and a proliferating cell nuclear antigen homolog in the crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J. Biol. Chem.* **277**: 22271-22278.

Yao, N., J. Hurwitz & M. O'Donnell, (2000) Dynamics of beta and proliferating cell nuclear antigen sliding clamps in traversing DNA secondary structure. *J. Biol. Chem.* **275**: 1421-1432.

Yao, N., J. Turner, Z. Kelman, P. T. Stukenberg, F. Dean, D. Shechter, Z. Q. Pan, J. Hurwitz & M. O'Donnell, (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.

Yao, N. Y., L. Coyell, D. Zhang, R. Georgescu, J. Finkelstein, M. M. Coman, M. M. Hingorani & M. O'Donnell, (2003) Replication Factor C clamp loader subunit arrangement within the circular pentamer and its attachment points to PCNA. *J. Biol. Chem.* **278**: 50744-50753.

Yao, N. Y., A. Johnson, G. Bowman, J. Kuriyan & M. O'Donnell, (2006) Mechanism of PCNA clamp opening by RFC. *J. Biol. Chem.* **281**: 17528-17539.

Yu, X., M. S. VanLoock, A. Poplawski, Z. Kelman, T. Xiang, B. K. Tye & E. H. Egelman, (2002) The Methanobacterium thermoautotrophicum MCM protein can form heptameric rings. *EMBO Rep.* **3**: 792-797.

Yutin, N., K. S. Makarova, S. L. Mekhedov, Y. I. Wolf & E. V. Koonin, (2008) The Deep

Archaeal Roots of Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1619-1630.

Yuzhakov, A., Z. Kelman, J. Hurwitz & M. O'Donnell, (1999) Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase δ holoenzyme. *EMBO J.* **18**: 6189-6199.

Z

Zhang, P., J. Y. Mo, A. Perez, A. Leon, L. Liu, N. Mazloun, H. Xu & M. Lee, (1999) Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **274**: 26647-26653.

Zhang, P., Y. B. Sun, H. Hsu, L. F. Zhang, Y. N. Zhang & M. Y. W. T. Lee, (1998) The interdomain connector loop of human PCNA is involved in a direct interaction with human polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **273**: 713-719.

Zhang, S. J., X. R. Zeng, P. Zhang, N. L. Toomey, R. Y. Chuang, L. S. Chang & M. Y. W. T. Lee, (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.

Zheleva, D. I., N. Z. Zhelev, P. M. Fischer, S. V. Duff, E. Warbrick, D. G. Blake & D. P. Lane, (2000) A Quantitative Study of the in Vitro Binding of the C-Terminal Domain of p21 to PCNA: Affinity, Stoichiometry, and Thermodynamics. *Biochemistry* **39**: 7388-7397.

Zillig, W., I. Holz, H. P. Klenk, J. Trent, S. Wunderl, D. Janekovic, E. Imself & B. Haas, (1987) *Pyrococcus-woesei*, Sp-Nov, an Ultra-Thermophilic Marine Archaeobacterium, Representing a Novel Order, Thermococcales. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**: 62-70.

Zivanovic, Y., P. Lopez, H. Philippe & P. Forterre, (2002) *Pyrococcus* genome comparison evidences chromosome shuffling-driven evolution. *Nucl. Acids Res.* **30**: 1902-1910.

Zuo, S., V. Bermudez, G. Zhang, Z. Kelman & J. Hurwitz, (2000) Structure and Activity Associated with Multiple Forms of *Schizosaccharomyces pombe* DNA Polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **275**: 5153-5162.

Annexes

Annexe 1 - Milieux de culture

Milieu LB (liquide)

Composants	Quantité pour 1 L
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g

+ 1,5 % agar (p/v) (milieu solide)

Milieu SOC (liquide)

Composants	Quantité pour 1 L
Tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	0,5 g

Autoclaver puis ajouter :

- 10 mL de MgCl₂ filtré
- 10 mL de MgSO₄ filtré
- 2 mL de glucose 20 % filtré

Annexe 2 - Tampons de chargements électrophorèse

Tampon de chargement sur gel SDS-PAGE

Composants
Tris-HCl 125 mM pH 6,8
Glycérol 10 %
SDS 2 %
β-Mercaptoéthanol 5 %
Bleu de bromophénol 1 %

Tampon de chargement sur gel PAGE

Composants
Tris-HCl 32 mM pH 6,8
Glycérol 12 %
Bleu de bromophénol 1 %

Tampon de dépôt 6 X sur gel d'agarose

Composants
Tris-HCl 20 mM pH 8
EDTA 1 mM
glycérol 50 %
Bleu de bromophénol 0,07 %

Annexe 3 – Tampons électrophorèse

Tampon MOPS-SDS 20 X

Composants	Quantité pour 1 L	Concentration finale
MOPS	209,2 g	1 M
Tris-base	121,2 g	0,5 M
SDS	20 g	70 mM
EDTA	6 g	16 mM

Tampon TBE 10 X

Composants	Quantité pour 1 L	Concentration finale
Tris-base	108 g	890 mM
Acide borique	55 g	890 mM
EDTA	40 mL EDTA 0,5 M pH 8	20 mM

Annexe 4 – Gel acrylamide 12 %-urée-formamide

Composants	Quantité pour 40 mL
Formamide	12 mL
TBE 10X	4 mL
Acrylamide bis-acrylamide 40 %	12 mL
Urée	16,82 g
Ammonium persulfate (APS) 10 %*	400 µL
TEMED (N,N,N',N' Tétréthylènediamine)*	60 µL

* Ajouter extemporanément

Résumé

La réplication de l'ADN est un mécanisme fonctionnellement conservé à travers les trois domaines du vivant. Le processus est effectué par des ADN polymérases, accompagnées de deux facteurs accessoires, le PCNA et le RF-C, respectivement le facteur de processivité et le facteur de chargement. Notre modèle d'étude, l'Euryarchaeota *Pyrococcus abyssi*, possède une ADN polymérase monomérique appartenant à la famille B, et une ADN polymérase hétérodimérique, appartenant à la famille D. En grande majorité, les protéines interagissent avec le PCNA au niveau d'une poche hydrophobe, formée par l'IDCL (interdomain connecting loop) et la partie C-terminale. Ces interactions sont médiées au travers de motifs communs, dont le motif PIP box (PCNA interacting Protein). Nous avons démontré que la Pol B a juste un motif PIP box à l'extrémité C-terminale, alors que la Pol D contient deux motifs d'interaction au PCNA, situés au niveau des extrémités N- et C-terminales. En outre, un travail de mutagenèse dirigée a été réalisé au niveau de plusieurs sites définissant la poche hydrophobe du PCNA et a permis de mettre en évidence le fait que la Pol D interagit précisément au niveau de l'extrémité C-terminale du PCNA. De la même façon, nous avons démontré que le RF-C, *via* son motif PIP box, maintient le PCNA sur l'ADN et peut bloquer le complexe Pol D-PCNA. Par ailleurs, un motif riche en glycines a été caractérisé chez la Pol D. Ce motif, renommé PYF box, est impliqué dans la thermostabilité de cette enzyme et pourrait participer aux interactions entre les deux sous-unités DP1 et DP2. Enfin, des travaux préliminaires en spectroscopie de fluorescence ont été menés et nous offrent de nombreuses perspectives quant à l'étude des complexes nucléoprotéiques. La recherche des motifs, impliqués dans les relations structure-fonction, nous permet de compléter nos connaissances sur les mécanismes du système répliatif des archées et sur la Pol D, qui reste encore largement méconnue.

Mots-clés : Archaea, ADN polymérases, PCNA, RF-C, réplication de l'ADN, motifs, interactions, thermostabilité

Abstract

DNA replication is a functionally conserved mechanism among the three domains of life. This process is performed by DNA polymerases with two accessories factors, PCNA and RF-C, sliding clamp and clamp loader, respectively. Our model of study, the Euryarchaeota *Pyrococcus abyssi*, possesses one monomeric DNA polymerase, belonging to the Family B, and one heterodimeric DNA polymerase, belonging to the Family D. Usually, proteins interact with PCNA at a hydrophobic pocket which is formed by the IDCL (interdomain connecting loop) and the C-terminus. These interactions are mediated through common motifs like the PIP box (motif PCNA interacting Protein). We have demonstrated that Pol B has just one PIP box motif at the C-terminus, while Pol D has two PIP-type motifs, at the N- and C-terminus, respectively, that interact with PCNA. Besides, directed mutagenesis has been performed at different sites into the hydrophobic pocket of PCNA and permit to give prominence to that Pol D precisely interacts at the C-terminus of PCNA. In the same way, we have demonstrated that RF-C, *via* its PIP box motif, can maintain PCNA on DNA and can block the Pol D/PCNA complex. In addition, a glycine-rich motif has been characterised in Pol D. This motif, renamed PYF box, is implicated in thermostability of this enzyme and could participate to the interactions between subunits DP1 and DP2. Finally, preliminary work on fluorescence spectroscopy gives us some perspectives in the study of nucleo-proteic complexes. The investigation of motifs, implied in structure-function relationship, let us to complete our knowledge about mechanisms of replicative systems in Archaea and more precisely on Pol D, which is still largely unknown.

Keywords : Archaea, DNA polymerases, PCNA, RF-C, DNA replication, motifs, interactions, thermostability