



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
Adeline Palud

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

Caractérisation des ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* en présence de matrices ADN endommagées

Thèse soutenue le 8 Octobre 2009

devant le jury composé de :

Daniel Prieur
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *président*

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

Hannu Myllykallio
Directeur de Recherche CNRS, Institut de Génétique et Microbiologie-Université Paris Sud /
rapporteur

Claude Férec
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *examinateur*

Farida Akcha
Chercheur, IFREMER Nantes / *examinatrice*

Ghislaine Henneke
Chercheur, IFREMER Brest / *Co-directrice de thèse*

Jean-Paul Raffin
Chargé de Recherche CNRS, IFREMER Brest / *Directeur de thèse*



Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, à IFREMER et a été financée par IFREMER, la Région Bretagne et l'Université de Bretagne Occidentale.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à Ghislaine Henneke, qui m'a encadrée tout au long de ce travail. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir permis de faire évoluer ce projet si passionnant! Merci pour ton esprit critique et merci de m'avoir fait profiter de ton expertise dans le domaine de la maintenance génomique!

Je tiens également à remercier Jean-Paul Raffin, qui a assuré la direction de cette thèse. Merci pour tes conseils avisés et tes encouragements !

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'exprime ma reconnaissance au Professeur Ulrich Hübscher, et à Hannu Myllykallio, directeur de recherche, pour en avoir été les rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également aux Professeurs Claude Férec et Daniel Prieur ainsi qu'au Docteur Farida Akcha pour avoir examiné ce travail.

Je remercie Joël Quéréllou, Anne Godfoy et Daniel Prieur de m'avoir accueillie dans leur laboratoire et permis de mener à bien ce projet de recherche, dans d'excellentes conditions.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin aux résultats présentés dans ce travail de recherche :

Stéphane L'Haridon qui m'a appris à apprivoiser *Pyrococcus abyssi* lors de mon arrivée au LMEE et partagé son savoir et sa passion pour les cultures de microorganismes miraculeux!

Edmond Jolivet pour ses conseils avisés en champ pulsé et sa disponibilité.

Pierre Colin et Jeannette Castric pour m'avoir prêté le matériel d'électrophorèse en champ pulsé.

Anne Godfroy qui m'a fait bénéficier de son expertise en culture de microorganismes en bioréacteur gas-lift ainsi que pour ses encouragements et son enthousiasme au quotidien.

Farida Akcha et Nathalie Wessel de Nantes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer dans le cadre des dosages de la 8-oxo-dG.

Didier Flament pour ses conseils avisés en Bioinfo !!!... à qui j'aimerais emprunter la force tranquille !

Robert Fuchs pour avoir porté un regard critique sur mon article et pour les discussions scientifiques lors des congrès.

Marie-Thérèse Thébault et Pierre Lehn pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et suivi mes travaux durant de ces trois années.

Merci à Christine Lamy pour son enthousiasme communicatif, son efficacité et pour avoir simplifié mes démarches administratives durant la thèse!

Je remercie également tous les membres du groupe des « Répliquants » et du LMEE pour leur accueil et leur sympathie au quotidien !

Sans oublier mon microorganisme préféré ou binôme de choc, *Pyrococcus abyssi*, à qui j'exprime mes remerciements pour les coups de stress réciproques...

Un grand merci à mes deux copines d'Ifremer avec qui j'ai pu partager de nombreux éclats de rires et d'excellents moments : Audrey Le Goaziou « La Bricoleuse-Reine de la Purif » et Sophie Schmitt « La nouvelle Ifremerienne ». Merci à vous deux pour vos conseils, votre soutien constant et votre gentillesse !

Merci à mes compagnons de route : Benoît Castrec pour les discussions animées sur notre goût commun pour les jeux de société et autres concepts captivants... Erwan Roussel, alias « Hirsute », pour les discussions scientifiques et métaphysiques...et les balades en 2 roues. Julien Briffotiaux pour son humour et sa gentillesse au quotidien. Magali Le Breton alias « Mamie Mag-Ancienne collègue algéciste », Floriane Duval la voyageuse, Sven Lemoine Bauer le festivalier, Christophe Rouillon le poète et Christophe Crézé le pro des cristaux, pour la bonne ambiance dans le labo !

Merci à mes compagnons de thèse brestois qui se reconnaîtront: l'Elue, Cécé et la Nobel pour leur soutien sans relâche et leurs encouragements, les soirées – Débats « scientifiques et un peu moins scientifiques... », nécessitant des surdoses de Doliprane®.

Parallèlement à mes recherches au labo, j'ai aussi eu la chance de pouvoir enseigner à l'UBO. J'exprime ma reconnaissance à Germaine Dorange qui m'a accueillie dans son équipe au sein du département Génie Biologique, durant un an et demi à l'IUT de Brest. Merci beaucoup à tous mes collègues enseignants pour leur sympathie, leur soutien et leur aide précieuse lors de mes débuts : Marc Le Romancer, Tristan Montier, Yvonne Le Pennec, Armelle Hélène, Claudine Calvarin, Hélène Talarmin, Gilbert Grippon, Eric Bayle, Frédérique Duthoit, Joël Durand et Colette Lemoine.

Enfin, une pensée et un très très grand MERCI à ma famille, à Johan et à mes amis pour leur soutien sans faille sans qui ce travail aurait difficilement vu le jour!

Valorisation scientifique du projet de thèse

Les résultats obtenus lors de cette thèse ont contribué à la rédaction d'un article et ont fait l'objet de communications lors de congrès scientifiques.

Publication scientifique

Intrinsic properties of the two replicative DNA polymerases of *Pyrococcus abyssi* in replicating abasic sites: possible role in DNA Damage tolerance? . 2008, *Molecular Microbiology* 70, 746-761.

Adeline Palud, Giuseppe Villani, Stéphane L'Haridon, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin and Ghislaine Henneke

Participation à des congrès

Molecular biology of Archaea, 19-21 Août 2008, St Andrews, Écosse. **Poster:**

→ « Intrinsic properties of the two replicative DNA polymerases of *Pyrococcus abyssi* opposite abasic sites : Control of the genome stability ? »

Adeline Palud, Giuseppe Villani, Stéphane L'Haridon, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin and Ghislaine Henneke

34^{ème} Forum Jeunes Chercheurs et Congrès annuel de la SFBBM, 15-19 Octobre 2007, Embiez, France. **Communication orale :**

→ « Caractérisation des deux ADN polymérases répliquatives de l'euryarchaeote hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* en présence de matrices ADN apuriques »

Adeline Palud, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin et Ghislaine Henneke

FEBS 2007 Molecular Machines, Congrès international, 7-12 Juillet 2007, Vienne, Autriche.

Poster :

→ « When replicative DNA polymerases from *Pyrococcus abyssi* encounter an abasic site... »

Adeline Palud, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin and Ghislaine Henneke

7^{ème} Colloque des 3R – Réplication-Recombinaison-Réparation, 28-31 Mai 2007, Presqu'île de Giens, France. **Poster :**

→ « Quand les ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi* rencontrent des obstacles... »

Adeline Palud, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin et Ghislaine Henneke

Extremophiles, Congrès international, 17-21 Septembre 2006, Brest, France. **Poster :**

→ « Characterization of the two DNA polymerases from *Pyrococcus abyssi* in presence of damaged DNA »

Adeline Palud, Joël Querellou, Jean-Paul Raffin and Ghislaine Henneke

– TABLE DES MATIERES –

- TABLE DES MATIERES -	1
- ABREVIATIONS -	5
- LISTE DES FIGURES -	7
- LISTE DES TABLEAUX -	9
- INTRODUCTION GENERALE -	11
- PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE -	15
I. LES ARCHAEA – TROISIEME DOMAINE DU VIVANT	17
1.1. Découverte.....	17
1.2. Distribution écologique - colonisation.....	17
1.3. Principales caractéristiques génétiques, cellulaires et moléculaires des archaea.....	18
1.4. Diversité phylogénétique	21
1.5. Les Thermococcales.....	23
1.6. <i>Pyrococcus abyssi</i>	23
1.6.1. Description	23
1.6.2. Niche écologique.....	24
1.6.3. Modèle d'étude	25
II. L'ADN EN PROIE A DE NOMBREUSES AGRESSIONS	26
2.1. Origine et diversité des lésions affectant l'ADN et le « pool » de dNTPs	26
2.2. Focus sur la lésion apurinique	28
2.3. Focus sur la lésion 8-oxo-dG et le nucléotide 8-oxo-dGTP	29
2.4. Focus sur la lésion 8-oxo-dA.....	30
III. LES ADN POLYMERASES – ENZYMES CLE	32
IV. FONCTIONS DES ADN POLYMERASES ARCHEENNES DANS LA MAINTENANCE GENOMIQUE 36	
4.1. Les ADN polymérase chez les crenarchaea.....	36
4.1.1. Famille B	38
4.1.2. Famille Y	40
4.2. Les ADN polymérase chez les euryarchaea	42
4.2.1. Famille B	43
4.2.2. Famille D.....	46
4.2.3. Conclusions	48
V. REPONSES BIOLOGIQUES AUX DOMMAGES AFFECTANT L'ADN	49
5.1. Diversité des réponses.....	49
5.2. Synthèse translésionnelle ou Translésion	51
VI. PRESENTATION DE L'ETUDE	55
6.1. Problématique.....	55
6.2. Objectifs.....	57

CHAPITRE I : ETUDE DES LESIONS OXYDATIVES.....	59
I. INTRODUCTION.....	60
II. MATERIELS ET METHODES.....	62
2.1. Mesure de la 8-oxo-dG dans les génomes de <i>Pab</i> et <i>E.coli</i>	62
2.1.1. Techniques de cultures.....	62
2.1.1.1. Cultures d' <i>E.coli</i>	62
2.1.1.2. Cultures de <i>Pab</i>	62
2.1.1.3. Suivi des cultures.....	65
2.1.2. Suivi de croissance chez <i>Pab</i> en bioréacteur gas-lift.....	67
2.1.3. Stress oxydatif chez <i>Pab</i> en bioréacteur gas-lift	67
2.1.4. Dosage de la lésion 8-oxo-dG au sein des génomes de <i>Pab</i> et <i>E.coli</i> par HPLC-UV-EC	68
2.1.4.1. Extraction d'ADN totaux.....	68
2.1.4.2. Digestion.....	69
2.1.4.3. Analyse par HPLC-UV-EC.....	69
2.2. Production et purification d'une protéine recombinante <i>PabpolD</i> exo +	70
2.2.1. Expression de <i>PabpolD</i> exo+ en grand volume en système hétérologue <i>E.coli</i>	70
2.2.2. Extraction des protéines.....	71
2.2.3. Purification de <i>PabpolD</i> exo+	71
2.2.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions	71
2.2.3.2. Chromatographie d'affinité.....	71
2.2.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	72
2.2.5. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et révélation	72
2.2.6. Récapitulatif des étapes de production et de purification de <i>PabpolD</i> exo+.....	73
2.3. Caractérisation biochimique des <i>Pabpols</i>	74
2.3.1. Composition des réactions	74
2.3.1.1. Enzymes.....	74
2.3.1.2. Substrats nucléiques.....	74
2.3.2. Marquage des oligonucléotides à la fluorescéine et purification	75
2.3.3. Hybridation des oligonucléotides	76
2.3.4. Test d'activité des pols par mesure de l'incorporation de [³ H]-dTTP.....	76
2.3.5. Réactions d'extension d'amorces.....	77
2.3.5.1. Conditions réactionnelles	77
2.3.5.2. Séparation des produits réactionnels sur gel de polyacrylamide et révélation.....	78
III. RESULTATS.....	79
3.1. Mesure de la 8-oxo-dG dans le génome de <i>Pab</i> et de <i>E.coli</i>	79
3.1.1. Optimisation de la méthode de dosage de la lésion 8-oxo-dG chez <i>Pab</i>	79
3.1.1.1. Optimisation des conditions d'échantillonnage.....	79
3.1.1.2. Optimisation des conditions de mesure de la 8-oxo-dG par HPLC-UV-EC.....	81
3.1.2. Dosage de la lésion 8-oxo-dG en fonction du stade de croissance	82
3.1.3. Influence d'un stress oxydatif chez <i>Pab</i>	83
3.2. Caractérisation fonctionnelle des <i>Pabpols</i> en présence de matrices ADN endommagées contenant une lésion oxydative unique et d'un dNTP oxydé.....	85
3.2.1. Gamme de concentration des <i>Pabpols</i>	85
3.2.2. Activité polymérisique des <i>Pabpols</i> en présence d'un oligonucléotide contenant une lésion unique 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA en une position définie	86
3.2.3. Incorporation préférentielle de dNTPs par les <i>Pabpols</i> face aux lésions oxydatives 8-oxo-dG et 8-oxo-dA	90
3.2.3.1. Incorporation préférentielle de dNTPs face à la lésion 8-oxo-dG.....	90
3.2.3.2. Incorporation préférentielle de dNTPs face à la lésion 8-oxo-dA	93
3.2.4. Incorporation préférentielle du 8-oxo-dGTP par les <i>Pabpols</i>	95
3.2.5. Activité polymérisique de <i>PabpolB</i> en présence du 8-oxo-dGTP et des 3 autres dNTPs normaux	97
IV. DISCUSSION.....	98

4.1.	La lésion 8-oxo-dG dans le génome de <i>Pab</i> – Biomarqueur de stress oxydatif ?	98
4.2.	Caractérisation fonctionnelle des <i>Pabpols</i>	100
CHAPITRE II : ETUDE DE LA LESION APURINIQUE.....		105
I.	INTRODUCTION.....	106
II.	MATERIELS ET METHODES.....	107
2.1.	Dosage des lésions AP au sein du génome de <i>Pab</i> par une méthode indirecte	107
2.1.1.	Cultures de <i>Pab</i> et échantillonnage	107
2.1.2.	Détection des lésions AP par une méthode indirecte	108
2.1.2.1.	Préparation de l'ADN génomique	108
2.1.2.2.	Prédigestion de l'ADN génomique	108
2.1.2.3.	Traitement par l'endonucléase IV	108
2.1.2.4.	Electrophorèse en champ pulsé	109
2.1.2.5.	Révélation	109
2.2.	Stress acide chez <i>Pab</i> en flacon pénicilline	110
2.3.	Oligonucléotides additionnels pour la caractérisation fonctionnelle des <i>Pabpols</i>	110
III.	ARTICLE	111
IV.	RESULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION	131
4.1.	Détection des lésions AP au sein du génome de <i>Pab</i> par une méthode indirecte	131
4.2.	Influence d'un stress acide chez <i>Pab</i>	131
4.3.	Activité polymérasique simultanée des <i>Pabpols</i> <i>exo+</i> en présence d'une matrice ADN contenant un site AP unique.....	133
4.4.	Activité des <i>Pabpols</i> <i>exo+</i> en présence de matrices ADN contenant des clusters AP.....	134
V.	DISCUSSION DES RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	135
5.1.	Les lésions AP dans le génome de <i>Pab</i>	135
5.2.	Caractérisation fonctionnelle des <i>Pabpols</i> en présence de matrices ADN endommagées contenant une lésion AP.....	135
CHAPITRE III : APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES PABPOLS.....		137
I.	INTRODUCTION.....	138
II.	MATERIELS ET METHODES.....	140
2.1.	Enzymes	140
2.2.	Oligonucléotides	140
2.3.	Amplification de l'ADN par la technique de PCR.....	141
2.4.	Révélation des amplicons	142
III.	RESULTATS.....	143
IV.	DISCUSSION.....	146
- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES -		149
- ANNEXES -.....		155
- BIBLIOGRAPHIE -.....		163

– ABREVIATIONS –

A : nucléotide à Adénine	PCR : Polymerase Chain Reaction
Aa : Acide aminé	Plug (d'agarose) : portion semi-solide d'agarose
AAF : N2-Acétyle-Amino-Fluorène	PM : Poids Moléculaire
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	pol : ADN polymérase
ADNsb : ADN simple brin	RFC : Replication Factor C
ADNdb : ADN double brin	RPA : Replication Protein A
AP : apurinique	ROS : Reactive Oxygen Species
BER : Base Excision Repair	SSB : Single Strand Binding protein
C : nucléotide à Cytosine	T : nucléotide à Thymine
Cis-Pt : Cis-Platine	UV : Ultraviolet
CPD : Cyclobutane Pyrimidine Dimer	
dG : désoxyribonuguanosine	
dNMP : désoxyribo-Nucleotide-MonoPhosphate	
dNTP : désoxyribo-Nucleotide-TriPhosphate	
DO : Densité Optique	
exo+: pourvue d'une activité exonucléasique	
exo-: activité exonucléasique déficiente	
G : nucléotide à Guanine	
HPLC-UV-EC : High Performance Liquid Chromatography – UV – ElectroChemical Detection	
kDa : kilo Dalton	
kb: kilo base	
Mb : Million de bases	
mer : nucléotide	
8-oxo-dA : 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyadenosine	
8-oxo-dG : 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine	
8-oxo-dGTP : 7,8-dihydro-8-oxo-2- deoxyguanosine-5-triphosphate	
<i>Pab</i> : <i>Pyrococcus abyssi</i>	
pb : paire de bases	
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen	

– LISTE DES FIGURES –

Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné représentant les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria, Eukarya, adapté de Allers <i>et al.</i> (Allers & Mevarech, 2005).....	16
Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné représentant les grands groupes d'archaea, d'après Brochier <i>et al.</i> (Brochier-Armanet <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figure 3 : <i>Pyrococcus abyssi</i>	23
Figure 4 : Structure d'une lésion apurinique et d'un résidu tétrahydrofurane, adapté de Kamiya <i>et al.</i> (Kamiya, 2003).	29
Figure 5 : Structures des bases oxydées de l'ADN (8-oxo-dG et 8-oxo-dA), adapté de Kamiya <i>et al.</i> (Kamiya, 2003).	29
Figure 6 : Structure d'une ADN polymérase répliquative, d'après M.C. Franklin <i>et al.</i> (Franklin <i>et al.</i> , 2001).	33
Figure 7 : Structure de l'ADN polymérase B1 de <i>Sulfolobus solfataricus</i> , d'après Savino <i>et al.</i> (Savino <i>et al.</i> , 2004).....	39
Figure 8 : Structure du complexe ternaire Dpo4•ADN•dNTP, d'après Ling <i>et al.</i> (Ling <i>et al.</i> , 2004).	41
Figure 9 : Mécanisme de translésion d'un site AP par Dpo4, adapté de Fiala <i>et al.</i> (Fiala <i>et al.</i> , 2007)... ..	42
Figure 10 : Intéines chez les ADN polymérases B d'euryarchaea, d'après S. MacNeill (MacNeill, 2001).	43
Figure 11 : ADN polymérase de <i>Thermococcus gorganarius</i> en complexe avec un ADN contenant de l'uracile, d'après Firbank <i>et al.</i> (Firbank <i>et al.</i> , 2008).	44
Figure 12 : Groupement uracile dans la poche spécifique de reconnaissance de l'ADN polymérase de <i>Thermococcus gorganarius</i> , d'après Emptage <i>et al.</i> (Emptage <i>et al.</i> , 2008).....	44
Figure 13 : Modèle d'interaction entre les sous-unités de l'ADN polymérase D chez <i>Pyrococcus horikoshii</i> , d'après Tang <i>et al.</i> (Tang <i>et al.</i> , 2004).	47
Figure 14 : Equilibre biologique.	49
Figure 15 : Spectre des réponses biologiques aux dommages de l'ADN, modifié de Friedberg <i>et al.</i> (Friedberg <i>et al.</i> , 2006a).	50
Figure 16 : ADN polymérases impliquées dans des mécanismes de maintenance génomique chez les bactéries et les eucaryotes, adapté de Bebenek <i>et al.</i> (Bebenek & Kunkel, 2004).	51
Figure 17 : Comparaison des interfaces entre une paire de base et les bols des familles A, B et Y, adapté de Yang <i>et al.</i> (Yang, 2005).....	52
Figure 18 : Modèles de switch entre les ADN polymérases lors de la synthèse translésionnelle, adapté de Bebenek <i>et al.</i> (Bebenek & Kunkel, 2004).	53
Figure 19 : Représentation schématique du système expérimental de culture en bioréacteur gas-lift, adapté de Godfroy <i>et al.</i> (Godfroy <i>et al.</i> , 2006).....	64
Figure 20 : Rampe anaérobie de prélèvement d'échantillons installée sur le bioréacteur.	66
Figure 21 : Stratégie de production et de purification de <i>Pab</i> polD ^{exo+}	73
Figure 22 : Principe de marquage d'un oligonucléotide en 5' à la fluorescéine, d'après le kit « 5' End Tag Nucleic Acid Labeling system » - Vector Laboratories.....	76
Figure 23 : Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine, d'après Amersham (Amersham, 2000).	78
Figure 24 : Taux de 8-oxo-dG/10 ⁶ dG mesurés chez <i>Pab</i> en phase exponentielle, en fonction du mode d'échantillonnage.....	80
Figure 25 : Taux de 8-oxo-dG/10 ⁶ dG mesurés chez <i>Pab</i> en phase exponentielle, en fonction de la quantité d'ADN injectée sur la chaîne chromatographique.....	81
Figure 26 : Suivis de croissance de <i>Pab</i> et <i>E.coli</i>	82
Figure 27 : Taux de 8-oxo-dG/10 ⁶ dG mesurés chez <i>Pab</i> et <i>E.coli</i> , en fonction du stade de croissance... ..	83
Figure 28 : Influence d'un stress oxydatif sur la viabilité cellulaire de <i>Pab</i>	84

Figure 29 : Influence d'un stress oxydatif sur le taux de 8-oxo-dG/10 ⁶ dG et la viabilité cellulaire de <i>Pab</i>	85
Figure 30 : Réplication d'une matrice ADN non endommagée en présence de quantités croissantes de <i>Pabpols</i>	86
Figure 31 : Réplication d'une matrice ADN contenant une lésion 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA en présence de quantités croissantes de <i>Pabpols</i>	88
Figure 32 : Incorporation préférentielle de dNTPs par les <i>Pabpols</i> face à la lésion 8-oxo-dG.....	92
Figure 33 : Incorporation préférentielle de dNTPs par les <i>Pabpols</i> face à la lésion 8-oxo-dA.....	94
Figure 34 : Incorporation du 8-oxo-dGTP par les <i>Pabpols</i> face à un A, T, G ou C.....	96
Figure 35 : Réplication d'une matrice non endommagée par <i>PabpolB</i> , en présence des dNTPs : 8-oxo-dGTP, dATP, dTTP et dCTP.....	97
Figure 36 : Mode d'appariement de la lésion 8-oxo-dG, adapté de Hsu <i>et al.</i> (Hsu <i>et al.</i> , 2004).....	102
Figure 37 : Mode d'appariement de la lésion 8-oxo-dA d'après Kamiya <i>et al.</i> (Kamiya <i>et al.</i> , 1995). ...	103
Figure 38 : Détection et quantification des sites AP dans le génome de <i>Pab</i> , à différents pH.....	132
Figure 39 : Réplication d'une matrice ADN contenant une lésion AP par les <i>Pabpols</i> <i>exo+</i>	133
Figure 40 : Réplication d'une matrice ADN contenant 1, 2 ou 3 sites AP par les <i>Pabpols</i> <i>exo+</i>	134
Figure 41 : Amplification par PCR d'oligonucléotides endommagés.....	145

– LISTE DES TABLEAUX –

Tableau 1 : Principales caractéristiques des trois domaines du vivant.....	20
Tableau 2 : Composition chimique du bassin Nord Fijien (site White Lady) et de l'eau de mer environnante, adapté de Ishibashi <i>et al.</i> (Ishibashi <i>et al.</i> , 1994).	24
Tableau 3 : Taux de 8-oxo-dG mesurés dans les trois domaines du vivant par HPLC-UV-EC.	30
Tableau 4 : Membres représentatifs des familles d'ADN polymérase dans les trois domaines du vivant.	35
Tableau 5 : Caractéristiques des ADN polymérase chez les crenarchaea.....	37
Tableau 6 : Caractéristiques des ADN polymérase chez les euryarchaea.	42
Tableau 7 : Principales propriétés intrinsèques des <i>Pab</i> B et D (Gueguen <i>et al.</i> , 2001 , Henneke <i>et al.</i> , 2005 , Rouillon <i>et al.</i> , 2007).....	56
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des conditions de prélèvement d'échantillons de <i>Pab</i> et d' <i>E.coli</i> , en vue de détecter la lésion 8-oxo-dG.....	66
Tableau 9 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.	75
Tableau 10 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.	110
Tableau 11 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.	141
Tableau 12 : Comparaison des propriétés intrinsèques des <i>Pab</i> B et D en présence de matrices ADN endommagés ou d'un dNTP oxydé, découvertes lors de ce projet de thèse.	152

- INTRODUCTION GENERALE -

La maintenance génomique est d'une importance cruciale pour toutes les formes de vie ; le génome d'une cellule vivante est en permanence soumis à de nombreuses agressions induites par des facteurs endogènes ou exogènes. Le nombre de lésions par cellule et par jour est estimé entre 10 000 et 100 000 chez le mammifère. Ces dommages vont perturber la géométrie de la double hélice d'ADN et altérer les appariements. Les organismes doivent donc mettre en place des stratégies efficaces afin de maintenir l'intégrité génomique. Chez les archaea hyperthermophiles, la plupart des mécanismes impliqués dans la maintenance génomique sont encore méconnus. En effet, ces microorganismes colonisent des biotopes hostiles d'un point de vue anthropomorphique, où sévissent des conditions extrêmes de température, de pH, de pression et des radiations ionisantes, que peu de bactéries et d'eucaryotes ne toléreraient. Ces environnements sont favorables à l'apparition de lésions dans l'ADN comme des sites apuriques ou encore des lésions oxydatives. La persistance de ces lésions dans le matériel génétique peut engendrer le blocage des enzymes-clefs de la maintenance génomique, les ADN polymérase (pols). Cependant, à la différence des eucaryotes qui possèdent une batterie de pols spécialisées dans la réplication de l'ADN, la réparation ou encore la translésion, les archaea ne disposent que d'un nombre limité de pols. Ceci conduit à l'hypothèse suivante : les pols d'archaea doivent présenter plus d'un rôle fonctionnel dans la cellule. Dans le cadre de ce projet, l'euryarchaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* (*Pab*) a été utilisée comme modèle attractif pour étudier l'impact de ces lésions sur la maintenance de l'intégrité génomique, à haute température. Les objectifs de cette thèse ont donc été la détection des lésions oxydatives 8-oxo-dG et des lésions apuriques dans le génome de *Pab* puis la caractérisation fonctionnelle des deux ADN polymérase de *Pab*, *PabpolB* et *PabpolD* en présence de matrices ADN endommagées, afin d'élucider les mécanismes d'action mis en jeu par *Pab* pour préserver la stabilité génomique. Sur le plan biotechnologique, le troisième objectif a consisté à étudier les capacités des *Pabpols* à amplifier de l'ADN endommagé par la technique de PCR. L'ensemble de ce projet de recherche a porté uniquement sur les deux lésions oxydatives (8-oxo-dG et 8-oxo-dA) et la lésion apurique car il s'agit, de loin, les lésions les plus répandues affectant l'ADN.

- PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE -

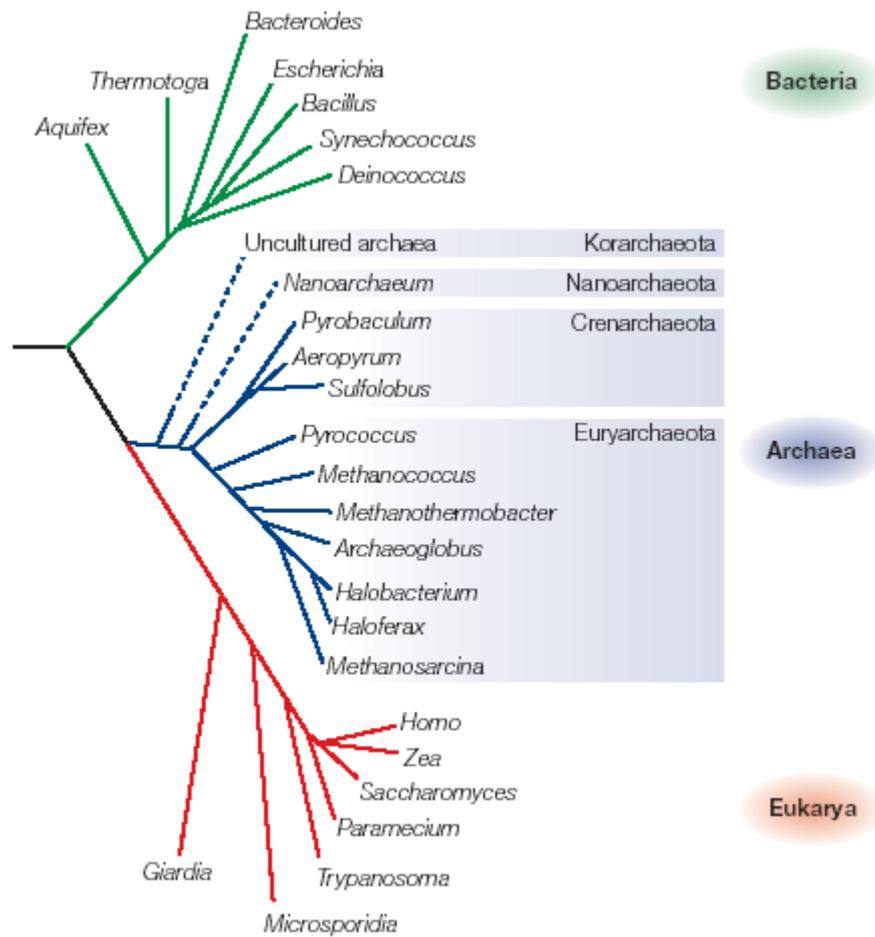


Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné représentant les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria, Eukarya, adapté de Allers *et al.* (Allers & Mevarech, 2005).

Arbre réalisé à partir de l'analyse de séquence d'ARN 16S. Le domaine des archaea est caractérisé par les branches bleues. Les pointillés bleus indiquent que ces phyla sont encore incertains.

I. LES ARCHAEA – TROISIEME DOMAINE DU VIVANT

1.1. Découverte

Depuis ses fondements par Louis Pasteur et Robert Koch, la microbiologie était une discipline qui se basait sur des critères essentiellement phénotypiques et physiologiques pour définir les relations entre les microorganismes. Durant des décennies, le monde vivant était divisé en deux règnes, les eucaryotes et les procaryotes. Il a fallu attendre l'émergence des approches moléculaires pour remettre en question cette classification : en 1977, Carl Woese et son équipe ont proposé une nouvelle taxonomie universelle, reposant sur la comparaison des séquences d'ARN de la petite sous-unité du ribosome (16S pour les procaryotes et 18S pour les eucaryotes) (Woese & Fox, 1977. Fox, 1977 #490). Ces ARN ribosomiques sont universels, conservés au cours de l'évolution, et constituent de véritables « horloges moléculaires » car ils présentent une alternance de zones extrêmement conservées et de zones variables, permettant de différencier les espèces entre elles. C'est ainsi que C. Woese et ses collaborateurs ont démontré en 1977 qu'un groupe de microorganismes, les méthanogènes, constituait un ensemble homogène, distinct des bactéries et des eucaryotes (Woese & Fox, 1977). Ces microorganismes unicellulaires, vivant dans des environnements proches des conditions présumées de l'atmosphère terrestre primitive (atmosphère riche en hydrogène et dioxyde de carbone, dépourvue d'oxygène), furent baptisés « archéobactéries ». En 1990, C. Woese proposa un nouvel arbre universel du vivant divisé en 3 domaines : Archaea, Bacteria et Eukarya (Woese *et al.*, 1990) (Voir arbre simplifié Figure 1). La racine de l'arbre et la nature de l'ancêtre commun LUCA (Last Universal Cellular Ancestor) sont actuellement à l'origine de nombreuses controverses (Forterre & Philippe, 1999, Cavalier-Smith, 2006, Walsh *et al.*, 2007, Glansdorff *et al.*, 2008). Toutefois, la branche des Bacteria se situerait sur la racine de l'arbre alors que la branche des Archaea serait plus proche de celle Eukarya (Voir arbre simplifié Figure 1).

1.2. Distribution écologique – colonisation

Grâce à leurs métabolismes variés, de nombreuses archaea ont réussi à coloniser des biotopes où sévissent des conditions extrêmes de température, de pH, de salinité, de sécheresse ou

encore d'anaérobiose que peu de bactéries et eucaryotes ne toléreraient : ces archaea sont qualifiées d'extrémophiles (Rothschild & Mancinelli, 2001). Récemment une étude a d'ailleurs mis en évidence la présence d'archaea appartenant à l'ordre des thermococcales (genres *Pyrococcus* et *Thermococcus*) à des températures comprises entre 60°C et 100°C, à 1600 m de profondeur sous le plancher océanique (Roussel *et al.*, 2008) ; aucune trace de vie n'avait jusqu'alors pu être détectée à une telle profondeur.

Toutefois, des travaux basés sur des approches moléculaires pour étudier la diversité archéenne ont démontré qu'elles ne sont pas toutes inféodées à ces biotopes hostiles ; elles colonisent des niches écologiques très diversifiées à la surface du globe y compris des milieux plus classiques, d'un point de vue anthropomorphique, comme le tube digestif de l'être humain (Chaban *et al.*, 2006). Les archaea sont aussi représentées en nombre significatif dans tous les océans de la planète (DeLong, 1992, Fuhrman *et al.*, 1992).

Le troisième domaine du vivant constituerait environ 20% de la biomasse totale de la planète (DeLong & Pace, 2001).

1.3. Principales caractéristiques génétiques, cellulaires et moléculaires des archaea

D'un point de vue évolutif, les archaea occupent une place singulière dans la phylogénie universelle (Brown & Doolittle, 1997). De ce fait, la génomique comparée a permis de montrer qu'elles possèdent des caractères cellulaires et moléculaires mosaïques, codés par deux groupes de gènes : les gènes codant pour les processus informationnels sont principalement des homologues de gènes eucaryotes tandis que les gènes codant pour des processus opérationnels sont plus proches de ceux des bactéries (Rivera *et al.*, 1998). Ainsi, la fraction de gènes étrangers (essentiellement bactérien) chez les archaea avoisineraient les 20 à 30 % (Koonin *et al.*, 2001).

De part leur génétique mosaïque, les archaea possèdent des caractéristiques communes avec les bactéries et les eucaryotes (Tableau 1). A la différence des eucaryotes, les bactéries et les archaea sont de petites cellules dépourvues d'organites cellulaires, possédant un chromosome circulaire concentré dans une zone appelée nucléoïde. Des éléments extra-chromosomiques ont également été identifiés, comme le plasmide pGT5 de l'euryarchaea

Pyrococcus abyssi (Erauso *et al.*, 1996) ou encore les plasmides pRN1, pRN2, and pHE7 chez la crenarchaea *Sulfolobus islandicus* (Zillig *et al.*, 1996, Keeling *et al.*, 1998). Parallèlement, les structures tridimensionnelles, les réactions fonctionnelles croisées et la génomique comparée ont confirmé de façon spectaculaire la ressemblance entre les mécanismes informationnels (transcription, traduction et réplication de l'ADN) des archaea et ceux des eucaryotes (Tableau 1). Étonnamment, les archaea utilisent une machinerie protéique de type eucaryote pour répliquer leur ADN (Grabowski & Kelman, 2003, Barry & Bell, 2006); en effet, leur génome code plusieurs protéines de réplication similaires à celles des eucaryotes, tels le facteur de processivité PCNA ou encore le facteur de réplication C (RFC). Cette haute conservation des propriétés structurales de leurs protéines a été démontrée notamment par des interactions fonctionnelles entre le RFC de *Pyrococcus abyssi* et le PCNA humain (Henneke *et al.*, 2002).

Toutefois, les archaea ne sont pas seulement réduits à la somme des génomes eucaryote et bactérien mais possèdent au contraire leurs propres caractéristiques génétiques (Graham *et al.*, 2000). Ces microorganismes se différencient des deux autres domaines par des caractères uniques (Tableau 1), notamment la structure et la chimie de leur paroi (Madigan & Martinko, 2007): les parois archéennes sont dépourvues de peptidoglycane composé d'acide N-acétylmuramique. Certaines archaea possèdent une paroi épaisse constituée d'un polysaccharide très similaire au peptidoglycane, la pseudomuréine; d'autres disposent de parois épaisses constituées de polysaccharides, de glycoprotéines ou encore des protéines. Le type de paroi le plus répandu chez les archaea est la couche de surface paracrystalline, constituée de sous-unités protéiques à symétrie hexagonale, appelée S-layer (Kandler & König, 1998). L'un des caractères les plus distinctifs des archaea réside dans la nature des lipides membranaires constitués de longues chaînes d'alcools isopréniques reliés au glycérol par des liaisons éther (Van de Vossenberg *et al.*, 1998); ce type de liaisons leur permet de résister aux attaques hydrolytiques, se déroulant à haute température et pH acide (Stetter, 1999).

	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>
Organisation cellulaire			
Taille	1 à 4 µm	1 à 4 µm	Supérieure à 5 µm
Paroi cellulaire	Composition variable	Composition variable	Composition variable
	Acide muramique présent	Acide muramique absent	Acide muramique absent
Lipides membranaires	Ester de glycérol et des acides gras liés par des liaisons ester	Ether de glycérol et d'isoprénoïdes liés par des liaisons éther	Ester de glycérol et des acides gras liés par des liaisons ester
Organites cellulaires	Absence	Absence	Présence
Membrane nucléaire	Absence	Absence	Présence
Matériel génétique	Chromosome circulaire	Chromosome circulaire	Chromosome en bâtonnet
	Euploïdie	Euploïdie / polyploïdie	Euploïdie / polyploïdie
	Plasmides	Plasmides	Plasmides rares
	Virus	Virus	Virus
	Absence d'histone	Présence d'histones s-like	Présence d'histones
Transcription			
ARN polymérase	1 seul type	1 seul type	3 types (I, II, III)
	4 sous-unités	12 sous-unités	Nombreuses sous-unités
Mode de fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur	Facteur σ	TBP (TATA-box Binding Protein)	TBP
Structure du promoteur	Séquence Pribnow située entre -35 pb et -10 pb en amont du site d'initiation	Séquence TATA située à -25 pb	Séquence TATA située à -25 pb
Traduction			
ARN ribosomiques	5S, 16S, 23S	5S, 16S, 23S	5S, 8S, 18S, 28S
Sous-unités ribosomiques	70S (30S+50S)	70S (30S+50S)	80S (40S+60S)
Shine Dalgarno	Présence	Présence	Absence
Initiateur des ARNt	Formyl-méthionine	Méthionine	Méthionine
Réplication de l'ADN			
Origine de réplique	Une seule origine <i>OriC</i>	Une ou plusieurs origines	Plusieurs origines
Hélicase	DnaB	MCM (Minichromosome Maintenance Complex)	MCM
Principales ADN polymérases	ADN polymérase III (Famille C)	Familles B et D chez les euryarchaea	ADN polymérase ϵ/δ (Famille B)
		Famille B chez les crenarchaea	
Facteur de chargement	Complexe γ	RFC	RFC
Facteur de processivité	β -clamp	PCNA	PCNA

Tableau 1 : Principales caractéristiques des trois domaines du vivant.

1.4. Diversité phylogénétique

Les archaea ont évolué sur de très longues périodes et constituent un groupe phylogénétique extrêmement varié (Figure 2). Le domaine des archaea est divisé en deux principaux phyla : les euryarchaea (du grec « euryos », signifiant diversité) constitue un groupe hétérogène incluant des méthanogènes, des halophiles extrêmes, et quelques hyperthermophiles (Woese *et al.*, 1990) alors que les Crenarchaea (du grec « crenos », signifiant source ou origine) sont composés essentiellement d'espèce hyperthermophiles métabolisant le soufre qui détiennent des records de résistance aux températures élevées, de quelques mésophiles et psychrophiles (Figure 2) (Burggraf *et al.*, 1997).

Un troisième phylum, nommé Korarchaeota, a été découvert par l'analyse des séquences d'ADNr 16S (Barns *et al.*, 1996) ; les représentants de ce groupe ont été isolés à partir d'une source chaude du parc de Yellowstone mais aucune culture pure n'a pu être obtenue. Par conséquent, les Korarchaeota ne sont pas encore officiellement reconnues en taxonomie (Voir arbre simplifié Figure 1).

Les Nanoarchaeota constituent le quatrième phylum, représenté par une seule espèce *Nanoarchaeum equitans*, un symbionte du genre *Ignicoccus* (Voir arbre simplifié Figure 1) (Huber *et al.*, 2002). Ce microorganisme présente de surprenantes caractéristiques, avec notamment le plus petit génome décrit (490 kb) et constitue une lignée très ancienne au sein du troisième domaine (Huber *et al.*, 2003).

Tout récemment, les crenarchaea mésophiles, pour la plupart incultivées, ont été assignées à un nouveau phylum : les Thaumarchaeota (du grec « thaumas » signifiant s'interroger) (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Toutefois, ces travaux, basés sur l'analyse du génome de *Cenarchaeum symbosium*, sont très préliminaires mais soulèvent des interrogations fascinantes sur l'origine et l'évolution des archaea (Figure 2).

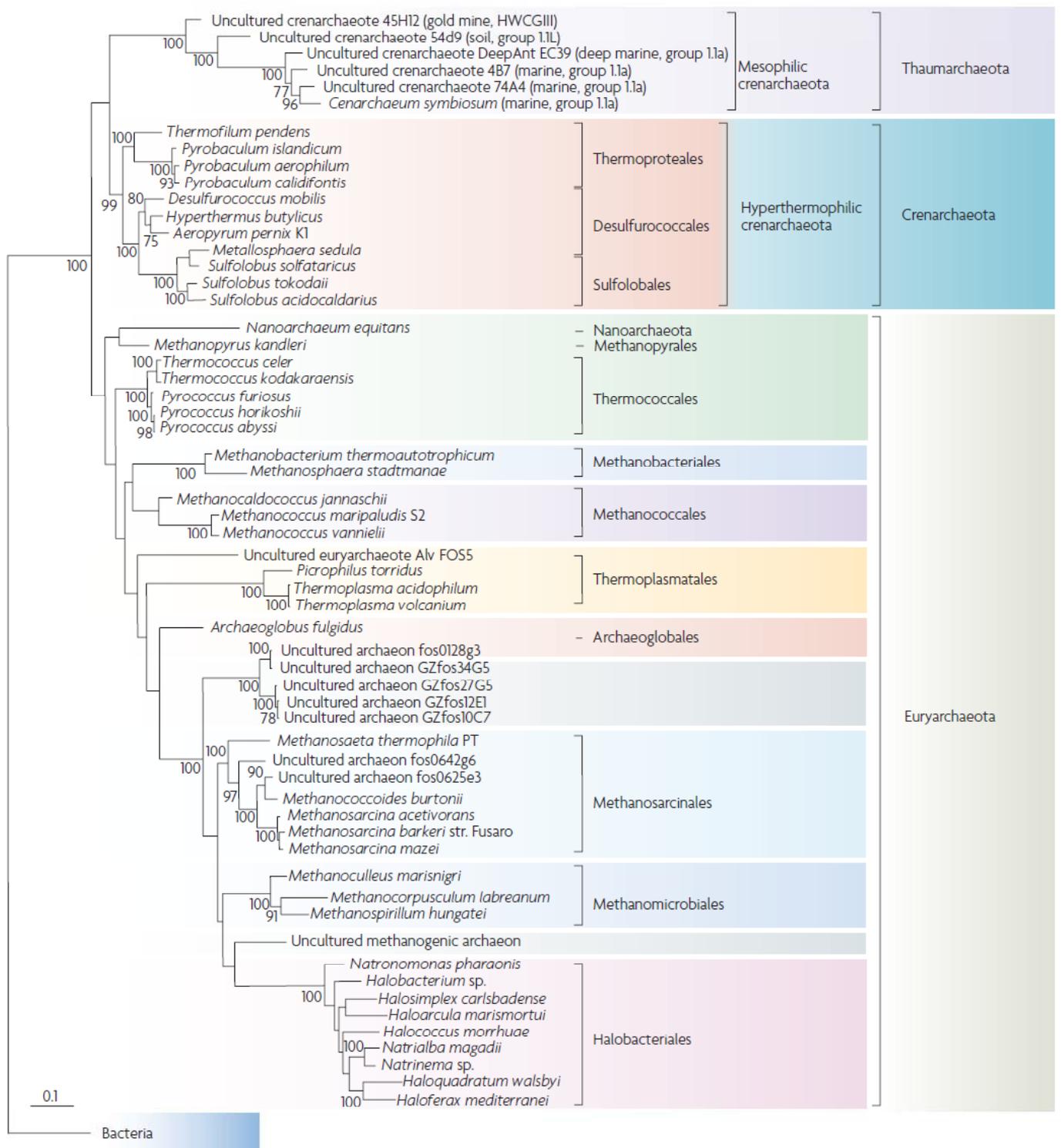


Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné représentant les grands groupes d'archaea, d'après Brochier *et al.* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008).

1.5. Les Thermococcales

Les Thermococcales, l'un des ordres des euryarchaea, sont les euryarchaea hyperthermophiles les plus étudiées qui dominent la microflore des sources hydrothermales. Ils regroupent les genres *Thermococcus*, *Palaeococcus* et *Pyrococcus* et notamment l'espèce *Pyrococcus abyssi* (Figure 2). Du fait de sa croissance rapide et sa mise en culture relativement aisée, *Pyrococcus abyssi* est devenue un organisme modèle pour les études moléculaires et biochimiques.

1.6. *Pyrococcus abyssi*

1.6.1. Description

Au laboratoire, le modèle utilisé pour l'étude de la réplication de l'ADN est l'euryarchaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* (*Pab*), dont la température optimale de croissance est de 96°C (Erauso *et al.*, 1993). Elle a été isolée à partir d'un fluide hydrothermal, au Nord du bassin Fijien, à une profondeur de 2000 m. Elle est Gram négative et a une forme de coque mobile légèrement irrégulière avec une taille variant de 0,8 à 2 µm, possédant un flagelle polaire (Figure 3) (Erauso *et al.*, 1993). Cette espèce anaérobie stricte est chimioorganotrophe et réduit le soufre. Elle a une tendance à la barophilie, aux températures de croissance élevées (Erauso *et al.*, 1993, Marteinsson *et al.*, 1997). Cette archaea hyperthermophile est capable de répliquer un génome circulaire de 1,7 Mb, à partir d'une seule origine de réplication, en un temps comparable à celui d'*Escherichia coli* (*E.coli*), avoisinant les 45 min (Myllykallio *et al.*, 2000) ; son génome a été entièrement séquencé et est disponible sur le site <http://www.genoscope.cns.fr/Pab/>. Elle dispose également d'un plasmide PGT5, qui a servi à la construction d'un vecteur navette pour de futures études génétiques (Erauso *et al.*, 1996, Lucas *et al.*, 2002).

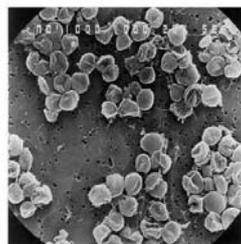


Figure 3 : *Pyrococcus abyssi*.

Photographie réalisée par microscopie électronique à balayage.

1.6.2. Niche écologique

La niche écologique de *Pab*, le bassin Nord Fijien, est un écosystème hydrothermal : la composition chimique du fluide hydrothermal anoxique de ce site présente quelques fluctuations et contraste fortement avec la composition de l'eau de mer environnante (Tableau 1) : il est acide (pH 4,7), riche en gaz et ions métalliques, et principalement caractérisé par une faible concentration en chlore et une absence de fer (Ishibashi *et al.*, 1994). D. Desbruyères et son équipe ont enregistré une grande variabilité spatiale et temporelle de la température sur ce site hydrothermal, en plaçant des capteurs sur des invertébrés marins, localisés à l'interface du fluide et de l'eau mer (Chevaldonne *et al.*, 1991).

Composants	Fluide hydrothermal du bassin Nord Fijien	Eau de mer du bassin Nord Fijien
T (°C)	285-291	
Li (µmol/kg)	200-282	24
Na (mmol/kg)	210-239	457
K (mmol/kg)	10,5-14,5	10,2
Rb (µmol/kg)	8,8-17	
Mg (mmol/kg)	0	51,8
Ca (mmol/kg)	6,5-9,0	9,9
Sr (µmol/kg)	30-43	0,432
Ba (µmol/kg)	5,3-5,9	
Mn (µmol/kg)	12-26	
Fe (µmol/kg)	9-13	
B (mmol/kg)	0,46-0,47	0,432
Al (µmol/kg)	6	
Si (mmol/kg)	13,3-14,0	0,14
Cl (mmol/kg)	255-267	552
Br (µmol/kg)	306-407	832
SO ₄ (mmol/kg)	0	27,8
pH (25°C)	4,7	7,6
Alk (mmol/kg)	-0,87-+0,12	2,32
H ₂ S (mmol/kg)	2,0-4,0	
CO ₂ (mmol/kg)	11,1-14,4	2,3

Tableau 2 : Composition chimique du bassin Nord Fijien (site White Lady) et de l'eau de mer environnante, adapté de Ishibashi *et al.* (Ishibashi *et al.*, 1994).

De plus, le taux de radioactivité naturelle mesuré dans les milieux hydrothermaux n'est pas négligeable (Cherry *et al.*, 1992, Gendron *et al.*, 1994, Boisson *et al.*, 2001, Charmasson *et al.*, 2009). La mesure de radioactivité naturelle issue particulièrement des radioinucléides ^{222}Rn , ^{210}Pb , ^{210}Po et des isotopes de l'uranium, contenus dans les cheminées hydrothermales, les fluides associés et les biotopes environnants, est élevée (Cherry *et al.*, 1992, Gendron *et al.*, 1994, Boisson *et al.*, 2001, Jolivet, 2002, Charmasson *et al.*, 2009). Des invertébrés marins seraient ainsi exposés à des taux de radiations naturelles 100 fois plus élevées que ceux subis par l'homme (Cherry *et al.*, 1992, Charmasson *et al.*, 2009). En ce sens, E. Jolivet *et al.* ont clairement démontré la radiorésistance de *Pab*, qui est capable de supporter une dose d'irradiation de 2 kGy (^{137}Cs) (Jolivet *et al.*, 2003).

Parallèlement, l'eau de mer environnante est fortement oxygénée et peut entraîner des variations des teneurs en oxygène à proximité des cheminées hydrothermales, lorsqu'elle se mélange aux fluides anoxiques (Huber *et al.*, 1990, Fouquet *et al.*, 1993, Summit & Baross, 1998). Toutefois, *Pab* est fortement sensible à l'oxygène, comme l'a montré G. Erauso *et al.* (Erauso *et al.*, 1993).

1.6.3. Modèle d'étude

D'un point de vue évolutif, le système répliatif mosaïque de *Pab* fait de ce microorganisme un excellent candidat pour élucider les mécanismes de maintenance génomique : si les archaea répliquent leur chromosome selon un mode bactérien, elles possèdent des protéines répliatives de type eucaryote simplifiées, quant au nombre et à la complexité (Kelman, 2000). Ce modèle archéen pourrait ainsi être extrapolé aux eucaryotes. Le caractère thermostable des protéines répliatives de *Pab* offre des perspectives intéressantes en biotechnologie, notamment pour la valorisation de nouvelles enzymes en biologie moléculaire. Enfin, sur un plan plus pratique, les protéines recombinantes du complexe de répliation de *Pab* peuvent être produites en grande quantité, facilitant ainsi l'expérimentation.

II. L'ADN EN PROIE A DE NOMBREUSES AGRESSIONS

2.1. Origine et diversité des lésions affectant l'ADN et le « pool » de dNTPs

L'interaction d'agents chimiques, physiques et enzymatiques avec le matériel génétique conduit à la formation de lésions de l'ADN et de ses précurseurs, les dNTPs. Approximativement, 30 000 lésions sont générées par jour, de façon spontanée, dans une cellule de mammifère (Lindahl & Barnes, 2000). L'ensemble des composants de la double hélice (bases, sucre, squelette phosphodiester) sont le siège de différents dommages. Ces lésions peuvent être divisées en deux grandes catégories : les dommages endogènes et les dommages induits par l'environnement (Friedberg *et al.*, 2006b).

Les dommages endogènes proviennent de l'intérieur du système, c'est à dire de la cellule elle-même. Parmi eux, on distingue :

■ Les altérations spontanées de l'ADN : l'ADN réagit continuellement avec l'oxygène et l'eau, favorisant l'apparition de lésions spontanées. Certains sites des bases azotées sont en effet sensibles à l'hydrolyse, à l'oxydation, aux alkylations ou encore à la méthylation. Sont classées parmi les altérations spontanées :

-la déamination des bases, notamment celle de la cytosine en uracile. A et G font aussi l'objet de déamination mais à un taux plus faible que C (Friedberg *et al.*, 2006b).

-les pertes de bases : les dépurinations et dépyrimidinations (Voir 2.2 ci-dessous).

-les dommages oxydatifs : si l'oxygène est pourtant essentiel à la vie des organismes aérobies, sa réduction conduit paradoxalement à la formation d'espèces oxygénées hautement réactives telles l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou encore le radical hydroxyl (OH^{\bullet}). Ces radicaux libres entraînent l'apparition de cassures d'ADN simple brin ou double brin, de bases modifiées comme la 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG) ou encore la 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyadenosine (8-oxo-dA) (Voir 2.3 et 2.4 ci-dessous).

■ Les erreurs de réplication : des mésappariements peuvent être occasionnellement générés suite à l'incorporation d'un nucléotide illégitime par les ADN polymérase car divers facteurs modulent en permanence leur fidélité. Ces erreurs de réplication sont aussi liées à l'incorporation de nucléotides endommagés essentiellement par des phénomènes d'oxydation. Ainsi, le 8-oxo-dGTP est souvent incorporé à la place d'un G.

Les dommages dépendent également de l'environnement et peuvent être induits par divers facteurs exogènes dont :

■ Les radiations ionisantes : les principales sources de radiations ionisantes sont les rayonnements cosmiques et telluriques (radon par exemple). L'énergie de ces radiations peut interagir directement avec l'ADN mais également avec des composants cellulaires qui réagissent à leur tour avec l'ADN (effets indirects). Parce que l'eau est prédominante dans les systèmes biologiques, les espèces réactives formées par radiolyse de l'eau sont la source majeure de dommages indirects à l'ADN. Ces radiations conduisent ainsi à la formation de molécules excitées ou ionisées qui peuvent induire de façon aléatoire une grande variété de lésions sur l'ADN telles :

-les pertes de base

-les cassures d'ADN simple brin ou double brin

-les modifications des bases notamment des dommages oxydatifs

■ Les rayonnements ultraviolets (UV) : l'exposition des cellules aux UV constitue vraisemblablement le modèle le plus utilisé pour explorer les réponses biologiques des cellules face à l'ADN endommagé. Les produits les plus fréquents induits par les UV, plus particulièrement les UV-C, sont les dimères de pyrimidines (CPD). D'autres photoproduits sont également générés par les UV notamment des lésions affectant les purines, les « hydrates » de pyrimidines ou encore la thymine glycol. Les UV peuvent aussi être à l'origine de cassures de brins ou de pontages entre l'ADN et des protéines.

■ Les agents chimiques : divers facteurs chimiques sont source de lésions de l'ADN, comme :

- les agents alkylants : ce sont des composés qui ont une affinité particulière pour les centres nucléophiles des molécules organiques. La plupart d'entre eux sont cancérigènes. Ils réagissent avec de nombreux sites de la double hélice d'ADN. Certaines enzymes peuvent aussi avoir une action alkylante au niveau de l'ADN.
- les agents de pontage (Azote Moutarde, Cis-Platine) : ils représentent des lésions relativement encombrantes.
- les intercalants comme le Psoralène

Certains agents chimiques nécessitent une activation métabolique préalable comme :

- les amines aromatiques (AAF)
- les hydrocarbures Polycycliques Aromatiques
- les aflatoxines

2.2. Focus sur la lésion apurinique

Les pertes de bases aboutissent à la création de sites apuriniques (AP), par clivage de la liaison N-glycosyl d'un nucléotide ; lors des expériences *in vitro*, le tétrahydrofurane, plus stable, est utilisé comme analogue du site AP (Figure 4). Ces lésions AP peuvent être la conséquence d'un phénomène de dépurination spontanée (Lindahl, 1993), résulter d'un dommage induit par des agents chimiques ou physiques (température, acidité...) (Loeb *et al.*, 1986, Breen & Murphy, 1995, Cadet *et al.*, 1999). Les dommages abasiques sont aussi des produits intermédiaires du processus de réparation par excision de base (BER), générés par une ADN glycosylase (Loeb *et al.*, 1986, Scharer & Jiricny, 2001). Le site AP constitue de loin la plus répandue des lésions affectant l'ADN (Lindahl, 1993) : le nombre de dépurinations spontanées s'élèvent à environ 9 000 pertes de bases, par cellule humaine, par jour (Nakamura *et al.*, 1998). Les bases pyrimidiques sont nettement plus stables que les bases puriques, à cause de leur mode de liaison au désoxyribose : le taux de dépyrimidations est de un contre vingt pour les dépurinations chez les mammifères, par cellule, par génération (Lindahl & Karlstrom, 1973).

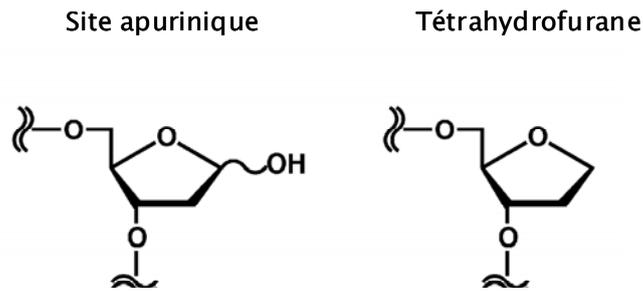


Figure 4 : Structure d'une lésion apurinique et d'un résidu tétrahydrofurane, adapté de Kamiya *et al.* (Kamiya, 2003).

2.3. Focus sur la lésion 8-oxo-dG et le nucléotide 8-oxo-dGTP

La lésion 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG) correspond à l'addition d'un groupement hydroxyle sur le carbone 8 d'un nucléotide à guanine (Figure 5).

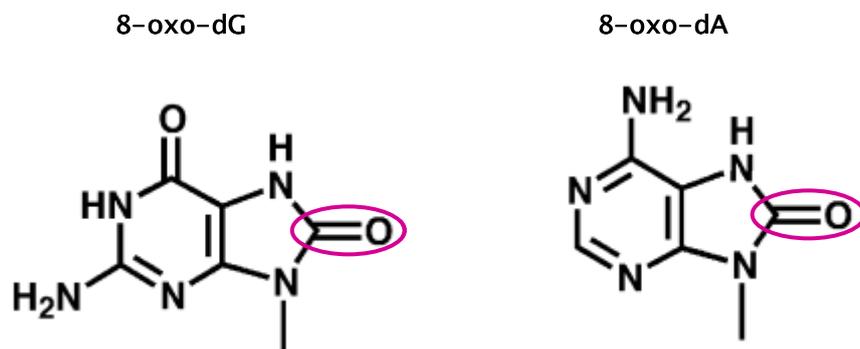


Figure 5 : Structures des bases oxydées de l'ADN (8-oxo-dG et 8-oxo-dA), adapté de Kamiya *et al.* (Kamiya, 2003).

Les groupements hydroxyle sont entourés en rose.

Il s'agit d'une des lésions les plus abondantes de l'ADN qui peut être générée de façon endogène, via les espèces réactives de l'oxygène (ROS) du métabolisme cellulaire (Lindahl, 1993, Cadet *et al.*, 2003). Elles peuvent également résulter de l'effet indirect de radiations ionisantes, via les ROS par hydrolyse de l'eau (Hutchinson, 1985) ou encore des UV (Cadet *et al.*, 2008). Le facteur température peut aussi induire l'apparition de la 8-oxo-dG par auto-oxydation ou indirectement par les ROS (Helbock *et al.*, 1998, Bruskov *et al.*, 2002). Ce dommage constitue un excellent marqueur de stress oxydatif car il peut être détecté par des techniques de très haute sensibilité (Kasai, 1997, Cadet *et al.*, 2003, Bolin & Cardozo-Pelaez, 2007). Bien qu'il existe des méthodes enzymatiques indirectes via l'utilisation d'endonucléases, permettant de déterminer le taux de 8-oxo-dG, les méthodes de dosages directes sont privilégiées (Cadet *et al.*, 2003). Comme le montrent les taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG

détectés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)/détection UV et ElectroChimique (UV-EC) dans la littérature, cette lésion est présente à l'état de trace dans les génomes (Tableau 3).

Domaine du vivant	Organisme	Lignée cellulaire	Niveaux de 8-oxo-dG/10 ⁶ dG	Références
Eucaryotes				
	Homme	Lymphocytes	2,7±1,2	(Nakajima <i>et al.</i> , 1996)
			4,3±3,0	(Collins <i>et al.</i> , 1997)
			3,1±1,6	(Asami <i>et al.</i> , 1996)
			4,5±1,8	(Lenton <i>et al.</i> , 1999)
	Souris	Cellules de foie	0,35±0,07	(Hamilton <i>et al.</i> , 2001a)
	Huître <i>Crassostrea gigas</i>	Cellules embryonnaires	~40±	(Wessel <i>et al.</i> , 2007)
	Lézard <i>Lacerta vivipara</i>	Cellules de foie	2,43±0,21	(Voituron <i>et al.</i> , 2006)
Bactéries aérobies				
	<i>E.coli</i>		2,8±0,5	(Tajiri <i>et al.</i> , 1995)
Bactéries anaérobies				
	<i>Prevotella melaninogenica</i>		0,5±0,1	(Takeuchi <i>et al.</i> , 1999) (Takeuchi <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Bacteroides fragilis</i>		0,5±0,1	(Takeuchi <i>et al.</i> , 1999) (Takeuchi <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>		Non Détectable	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 3 : Taux de 8-oxo-dG mesurés dans les trois domaines du vivant par HPLC-UV-EC.

Parallèlement, le « pool » de dNTPs est également sensible à des agents génotoxiques, pouvant induire des dommages comme le 8-oxo-dGTP, produit d'oxydation du dGTP (Kamiya, 2003). Ces précurseurs ou dNTPs, localisés dans le cytoplasme de la cellule seraient d'ailleurs plus accessible à des attaques que l'ADN, généralement surenroulé (Bolin & Cardozo-Pelaez, 2007). Les concentrations en 8-oxo-dGTP, déterminées par des méthodes récentes hautement sensibles, avoisineraient les 0,75 pmoles/10⁶ cellules, chez les mammifères (Bolin & Cardozo-Pelaez, 2007).

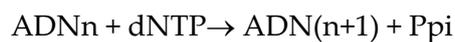
2.4. Focus sur la lésion 8-oxo-dA

La lésion 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyadenosine (8-oxo-dA) correspond à l'addition d'un groupement hydroxyle en C8 d'un nucléotide à adénine, qui n'entraîne pas de distorsion de

la structure de la double hélice d'ADN (Figure 5) (Guschlbauer *et al.*, 1991). Ce dommage est aussi, comme la 8-oxo-dG, une modification majeure induite essentiellement par les radiations ionisantes de type γ (Murata-Kamiya *et al.*, 1997, Cadet *et al.*, 2003). Actuellement, cette lésion n'a pas fait l'objet de quantification précise.

III. LES ADN POLYMERASES – ENZYMES CLE

Peu de temps après l'identification de l'ADN comme support moléculaire de l'hérédité (Avery *et al.*, 1995, Watson & Crick, 1953), l'enzyme clé du processus de réplication de l'ADN fut mise en évidence pour la première fois en 1956, chez *E.coli* : l'Acide Désoxyribonucléique polymérase (pol) (Bessman *et al.*, 1956). Il s'agit très probablement de l'une des premières machineries enzymatiques à être apparue au cours de l'évolution ; le mécanisme catalytique des pols doit donc être à la fois simple et universel. Ces enzymes assurent la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par copie d'un brin matrice, selon un processus semi-conservatif (Meselson & Stahl, 1958) ; elles catalysent la formation de liaisons ester entre le groupement 5'-phosphate (α) d'un dNTP libre et le groupement 3'-hydroxyle libre du brin d'ADN en formation, dans la direction 5'→3', selon l'équation :



Toutes les pols possèdent un processus catalytique similaire pour la synthèse d'ADN (Joyce & Steitz, 1994) : leur site actif renferme deux ions métalliques (généralement Mg^{2+}), qui sont des cofacteurs indispensables à la création de la liaison phosphodiester entre les nucléotides de la chaîne naissante. Plusieurs d'entre elles disposent également d'une activité exonucléasique 3'→5' associée, qui corrige les éventuelles erreurs de réplication, leur conférant ainsi une haute fidélité. Le mécanisme permettant d'enlever le nucléotide mésapparié correspond à un transfert de phosphate catalysé par 2 ions métalliques, similaire à celui responsable de la polymérisation. Par conséquent, il existe une étroite coordination entre les activités polymérasique et exonucléasique chez les pols lors de la réplication, afin de maintenir l'intégrité génomique (Shevelev & Hubscher, 2002, Khare & Eckert, 2002).

D'après les études cristallographiques, les pols partagent une architecture commune qui ressemble à une main humaine avec une paume, un pouce et des doigts qui entourent l'ADN (Figure 6) (Kohlstaedt *et al.*, 1992, Franklin *et al.*, 2001, Steitz, 1998) : la paume renferme le site catalytique alors que les doigts servent à positionner les nucléotides arrivants et la matrice d'ADN. Le pouce joue un rôle important dans la liaison à l'ADN ainsi que dans la processivité de l'enzyme.

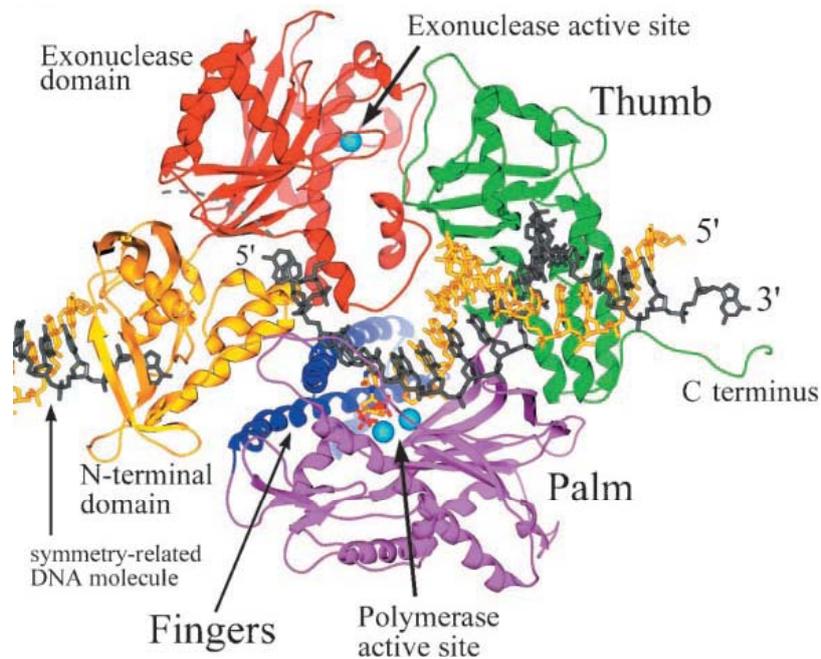


Figure 6 : Structure d'une ADN polymérase réplicative, d'après M.C. Franklin *et al.* (Franklin *et al.*, 2001).
Structure du complexe ternaire pol RB69•matrice ADN•dTTP.

Par comparaison des structures primaires des pols dans les trois domaines du vivant, six régions conservées ont pu être identifiées (Joyce & Steitz, 1994, Hübscher *et al.*, 2002) : la région I est située dans la paume et contient l'un des importants résidus aspartique. La région II contient l'autre acide aspartique invariant de la paume ainsi qu'un site de liaison pour les dNTPs. La région III correspond aussi à un site de liaison pour les dNTPs, situé sur les doigts. La région IV est située en N-terminal et représente la domaine exonucléasique 3'→5'. Pour terminer, les domaines V et VI sont localisés dans le pouce et les doigts respectivement.

En s'appuyant sur les homologies entre les séquences primaires et les similarités de structure, les pols ont pu être classées en six familles distinctes : A, B, C, D, X et Y (Ito & Braithwaite, 1991, Braithwaite & Ito, 1993, Ohmori *et al.*, 2001). Ces familles peuvent chacune contenir plusieurs pols possédant des fonctions distinctes dans la cellule (Tableau 4). Elles diffèrent par leur composition protéique et leurs propriétés catalytiques telles que (Bebenek & Kunkel, 2004) :

- la processivité : nombre de nucléotides incorporés par cycle d'attachement de la pol pouvant osciller de 1 à 10 000.

-la fidélité : nombre de nucléotides correctement incorporés pouvant varier d'un ordre de grandeur de 100 000, dépendant de la sélectivité de la pol et indirectement de la plasticité de son site actif (Kool, 2002). Cette propriété peut être fortement améliorée par la présence de la fonction exonucléasique 3'→5'.

-l'affinité pour le substrat : ADN non endommagé, ADN endommagé, ADN du brin avancé/retardé ou encore matrice ADN contenant des brèches....

-le taux d'extension de la chaîne d'ADN : nombre de nucléotides incorporés par unité de temps.

Certaines pols possèdent des activités additionnelles comme (Pavlov *et al.*, 2006) :

-l'activité exonucléasique 3'→5' chez la pol δ ou l'activité exonucléasique 5'→3' chez la pol I d' *E.coli*, permettant d'améliorer la fidélité de l'enzyme.

-l'activité 5'-deoxyribose phosphate lyase (dRP lyase) chez la pol β

-l'ATPase chez la pol θ

Les pols appartenant aux familles A, B, C et D sont généralement impliquées dans des fonctions de réplication alors que les pols alternatives récemment identifiées des familles X et Y interviennent dans des fonctions plus spécialisées (Tableau 4) (Rothwell & Waksman, 2005). Les pols X sont essentiellement associées à des mécanismes de réparation de l'ADN (Ramadan *et al.*, 2004, Moon *et al.*, 2007). Les pol Y sont exclusivement engagées dans le mécanisme de translesion ou synthèse translésionnelle (Voir 5.2) (Friedberg *et al.*, 2002).

Ainsi, l'évolution a produit un grand nombre de pols de différents types : à ce jour, 16 pols ont été dénombrées chez l'humain, 9 chez *Saccharomyces cerevisiae*, 5 chez *E.coli* et 3 chez les archaea (Hübscher *et al.*, 2002, Bebenek & Kunkel, 2004, Rothwell & Waksman, 2005). Au cours du cycle cellulaire, ces enzymes peuvent être seules mais aussi interagir avec des protéines accessoires de la fourche de réplication, comme le facteur de processivité (PCNA) ou le facteur de réplication C (RFC) ou encore la protéine de réplication A (RPA). Ces interactions s'effectuent via des domaines non catalytiques comme le domaine BRCT chez la pol λ ou des motifs spécifiques de liaison comme le motif PIP (Protein interacting PCNA) (Lee *et al.*, 2004, Maga & Hübscher, 2003).

Famille	Domaine	ADN polymérase	Fonctions
A	Bacteria	Pol I	Réplication - Réparation
	Eukarya	Pol θ	Translésion
		Pol ν	Réparation ?
		Pol γ	Réplication de l'ADN mitochondrial
B	Bacteria	Pol II	Réplication chromosomique
	Archaea	Voir Tableau 5 et Tableau 6	
	Eukarya	Pol ϵ	Réplication chromosomique
		Pol δ	Réplication chromosomique
		Pol α	Initiation de la réplication
Pol ζ	Translésion		
C	Bacteria	Pol III	Réplication chromosomique
D	Archaea	Voir Tableau 6	
X	Eukarya	Pol β	Réparation
		Pol λ	Réparation
		Pol μ	Réparation
		Pol σ	Réparation
		Tdt (Terminal déoxy-nucléotidyl transférase)	Réparation
Y	Bacteria	Pol IV	Translésion
		Pol V	Translésion
	Archaea	Voir Tableau 5	
	Eukarya	Pol η	Translésion
		Pol ι	Translésion
		Pol κ	Translésion
	Pol REV1	Translésion	

Tableau 4 : Membres représentatifs des familles d'ADN polymérases dans les trois domaines du vivant.

IV. FONCTIONS DES ADN POLYMERASES ARCHEENNES DANS LA MAINTENANCE GENOMIQUE

4.1. Les ADN polymérase chez les crenarchaea

Famille	ADN polymérase	Microorganisme	Activités catalytiques	S	Propriétés	Fonctions	Références
FAMILLE B							
	Pol B1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	ND	Réplication Réparation - Uracile Tolérance au dommage	(Rossi <i>et al.</i> , 1986, Pisani <i>et al.</i> , 1992, Pisani <i>et al.</i> , 1998, Gruz <i>et al.</i> , 2003)
		<i>Aeropyrum pernix</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	ND	Réplication	(Cann <i>et al.</i> , 1999b)
		<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	ND	1	ND	ND	Identifiée dans le génome
		<i>Pyrodictium occultum</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	ND	Réplication	(Uemori <i>et al.</i> , 1995)
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	ND	Réplication	(Klimczak <i>et al.</i> , 1985, Elie <i>et al.</i> , 1989, Datukishvili <i>et al.</i> , 1996)
	Pol B2	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ND	1	ND	ND	(Edgell <i>et al.</i> , 1997, Pisani <i>et al.</i> , 1998)
		<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Pol 5'→3'	1	Faiblement processive	Réplication Réparation	(Sartori & Jiricny, 2003)
	Pol B3	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ND	1	ND	ND	Identifiée dans le génome
		<i>Aeropyrum pernix</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1		Réplication	(Cann <i>et al.</i> , 1999b)
		<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1		Réplication Réparation ?	(Sartori & Jiricny, 2003)
		<i>Pyrodictium occultum</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	ND	ND	(Uemori <i>et al.</i> , 1995)
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	ND	1	ND	ND	Identifiée dans le génome
FAMILLE Y							
	Dbh	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P1	Pol 5'→3'	1	Distributive, peu fidèle	Translésion	(Kulaeva <i>et al.</i> , 1996, Gruz <i>et al.</i> , 2001, Gruz <i>et al.</i> , 2003)
	Dpo4	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Pol 5'→3'	1	Distributive, peu fidèle	Translésion	(Boudsocq <i>et al.</i> , 2001, Ling <i>et al.</i> , 2003, Fiala <i>et al.</i> , 2007, Fiala & Suo, 2007)
	Sac Pol Y1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Pol 5'→3'	1	Distributive, peu fidèle	Translésion	(Boudsocq <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 5 : Caractéristiques des ADN polymérases chez les crenarchaea.

SU : Nombre de Sous-Unités ; ND : Non Déterminé. Cette liste d'ADN polymérases n'est pas exhaustive.

4.1.1. Famille B

Les premières pols archéennes appartenant à la famille B ont été isolées et caractérisées chez les crenarchaea hyperthermophiles *Sulfolobus acidocaldarius* et *Sulfolobus solfataricus* (Tableau 5). Les séquences d'acides aminés de ces enzymes présentent toutes des résidus carboxylates invariants, formant le site catalytique des répliques eucaryotes (α , δ , ϵ), caractéristiques des pols appartenant à la famille B (Hübscher *et al.*, 2002). Par analogie avec les eucaryotes qui disposent de trois pols appartenant à la famille B (α , δ , ϵ), les crenarchaea possèderaient également deux ou trois pols B : les pols BI, BII et BIII qui sembleraient avoir des rôles biologiques distincts dans la cellule (Tableau 5). Une différence entre les pols B des crenarchaea et des eucaryotes réside dans l'influence de l'aphidicoline sur leur activité polymérasique : si les pols eucaryotes α , δ , ϵ sont sensibles à l'aphidicoline (Kornberg, 1992), les pols B chez les crenarchaea présentent des sensibilités variables et peuvent parfois être résistantes à cette drogue (Uemori *et al.*, 1995, Kelman, 2000).

L'organisation structurale de ces pols B archéennes est similaire à celle de la pol T4 du bactériophage RB69, avec un domaine polymérasique C-terminal et un domaine exonucléasique N-terminal leur conférant une haute fidélité (Figure 7) (Savino *et al.*, 2004). Ces pols B présentent aussi quelques adaptations propres aux thermophiles : des ponts disulfures et des clusters d'acides aminés chargés positivement afin de favoriser les interactions électrostatiques entre l'ADN et la protéine, peuvent améliorer la thermostabilité à la pol (Kelman, 2000, Savino *et al.*, 2004). Une autre particularité intéressante a été identifiée chez la pol B de *Desulfurococcus* sp. : Il semblerait qu'elle possède un domaine putatif de liaison à l'ARN en N-terminal, conservé chez les pols eucaryotes δ et ϵ (Zhao *et al.*, 1999). Toutefois, sa fonction n'a pas encore été élucidée.

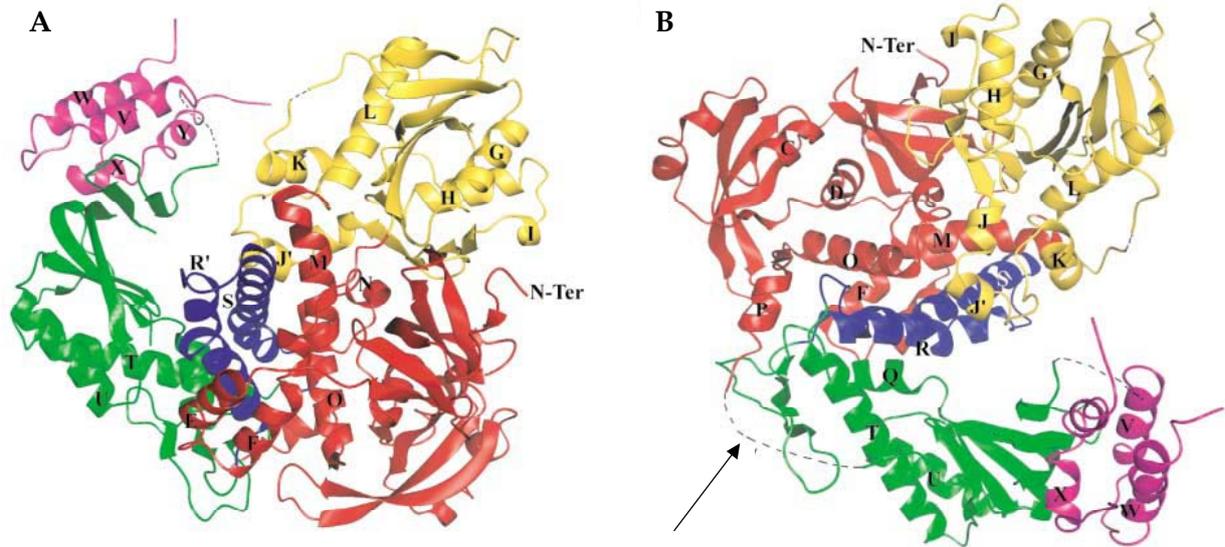


Figure 7 : Structure de l'ADN polymérase B1 de *Sulfolobus solfataricus*, d'après Savino *et al.* (Savino *et al.*, 2004). A et B, Représentation selon deux orientations. Les éléments de structure secondaire et les différents domaines sont représentés (domaine N-terminal, rouge ; domaine exonucléasique, jaune ; la paume, vert ; les doigts, bleu ; le pouce, rose). La flèche en B montre la liaison (N482-A497) entre les domaines N et C-terminal.

Dans un contexte de fourche de réplication, les pols B des crenarchaea sont capables d'interagir avec d'autres protéines accessoires. Chez *Sulfolobus solfataricus*, le PCNA est capable de stimuler l'activité de la pol B1 mais seul le PCNA2 interagit directement avec la pol (Dionne *et al.*, 2003). De même, le RFC stimule la pol B1 (Pisani *et al.*, 2000). D'ailleurs, ces stimulations de la Pol BI par le PCNA2 et le RFC suggèrent que cette pol soit impliquée dans l'élongation des brins avancés et retardés chez les crenarchaea (Böhlke *et al.*, 2002).

Si les pols B des crenarchaea sont, en outre, impliquées dans la réplication de l'ADN, des analyses biochimiques et structurales ont mis en évidence un caractère unique présent chez les pols B archéennes en général, leur permettant de détecter l'uracile à distance sur une matrice ADN (Lasken *et al.*, 1996, Greagg *et al.*, 1999) : elles reconnaissent l'uracile, grâce à une poche spécifique située en N-TER (Figure 12) et s'arrêtent au 3^{ème}/4^{ème} nucléotide en amont de ce dommage (Fogg *et al.*, 2002, Savino *et al.*, 2004). D'après des études plus récentes, cette fonction de reconnaissance fonctionne également en présence du produit de désamination de l'adénine, l'hypoxanthine. Ce processus original, inexistant chez les bactéries et les eucaryotes, interviendrait dans l'étape initiale de réparation des bases désaminées, empêchant la mésincorporation d'une adénine ou d'une cytosine en face

respectivement de l'uracile ou de l'hypoxanthine, lors de la réplication. Ce mécanisme permet ainsi de réduire le potentiel mutagène de l'uracile et de l'adénine (Lindahl, 1993, Wardle *et al.*, 2008, Connolly, 2009).

De plus, la pol BII semblerait être la pol impliquée dans le processus de Réparation par Excision de Base (BER), comme l'a démontré Sartori A. *et al.*, chez la crenarchaea *Pyrobaculum aerophilum* (Sartori & Jiricny, 2003) : la pol BII, peu processive, posséderait une activité dRPlyase ; elle serait capable de combler des brèches et semblerait aussi interagir avec le PCNA, lors du BER (Sartori & Jiricny, 2003). De même, la pol BIII pourrait intervenir lors de ce processus de réparation (Sartori & Jiricny, 2003).

D'une façon intéressante, les polys B de crenarchaea peuvent aussi être associées à des mécanismes de tolérance aux dommages. L'équipe de P. Gruz a clairement montré que la pol B1 de *Sulfolobus solfataricus* est totalement bloquée par un site AP et est sévèrement inhibée par une lésion 8-oxo-dG : elle s'arrête après incorporation en face de ce dommage oxydatif pour permettre à la pol translésionnelle Dbh (Famille Y) de poursuivre l'élongation (Gruz *et al.*, 2003).

4.1.2. Famille Y

En plus des polys répliquatives, les crenarchaea disposent également de polys spécialisées dans la tolérance aux dommages, appartenant à la nouvelle famille Y (Tableau 5). Les premières ont été découvertes chez *Sulfolobus solfataricus* : Dbh et Dpo4 isolées de deux souches proches de *Sulfolobus solfataricus*, P1 et P2 respectivement (Tableau 5) (Kulaeva *et al.*, 1996, Gruz *et al.*, 2001, Gruz *et al.*, 2003, Boudsocq *et al.*, 2001). A la différence de leur homologue bactérienne, la pol IV d' *E.coli*, elles ne sont pas inductibles par les UV (Wagner *et al.*, 1999, Nohmi, 2006, Romano *et al.*, 2007).

Comme les polys de la famille Y, ces polys translésionnelles sont distributives et peu fidèles en présence d'ADN non endommagé à cause de l'absence d'activité exonucléasique (Gruz *et al.*, 2001, Boudsocq *et al.*, 2001, Gruz *et al.*, 2003, Kunkel, 2004). Elles sont résistantes à l'aphidicoline et aux ddTTP, qui inhibent habituellement la plupart des polys appartenant à aux familles A, B et X (Gruz *et al.*, 2001).

Les deux premières structures de pols Y ont été résolues chez les archaea : il s'agit de la pol Dbh et de la pol Dpo4 de *Sulfolobus solfataricus* (Zhou *et al.*, 2001 , Ling *et al.*, 2001). Malgré leur site actif conservé et leur structure en forme de main, similaires aux autres familles de pols, Dbh et Dpo4 possèdent un petit doigt additionnel et un site actif plus ouvert, leur permettant d'accommoder plus facilement des bases endommagées (Figure 8) (Zhou *et al.*, 2001 , Ling *et al.*, 2001 , Boudsocq *et al.*, 2004).

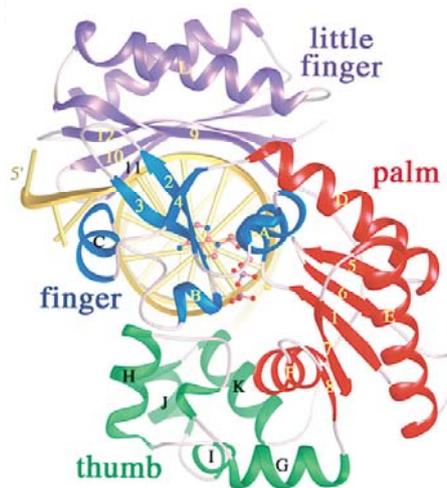


Figure 8 : Structure du complexe ternaire Dpo4•ADN•dNTP, d'après Ling *et al.* (Ling *et al.*, 2004).

Les domaines structuraux sont représentés par différentes couleurs : la paume en rouge, le pouce en vert, le doigt en bleu, le petit doigt en violet et l'ADN en or. Les structures secondaires sont nommées par ordre alphabétique ou numérique.

Chez les crenarchaea, les pols Y découvertes sont impliquées exclusivement dans le mécanisme de synthèse translésionnelle, comme leurs homologues eucaryotes et bactériens (Voir 5.2 ci-dessous) (Friedberg *et al.*, 2002). En présence d'ADN endommagé, Dpo4 est capable de franchir un site AP, un dimère de thymine, une lésion cis-platine ou encore un adduit acétyl aminofluorène (Boudsocq *et al.*, 2001 , Ling *et al.*, 2003 , Ling *et al.*, 2004) alors que Dbh franchit efficacement l'hypoxanthine et l'uracile, mais est bloquée par un site AP (Gruz *et al.*, 2003). Les travaux de Fiala *et al.* ont permis d'élucider le processus de translésion d'un site AP par Dpo4. Dpo4 et ses homologues DinB utiliseraient deux stratégies dominantes, qui ne s'excluent pas mutuellement, pour franchir cette lésion : la « loi du A » et le mécanisme de « lesion looped-out » (Figure 9) (Fiala & Suo, 2007 , Fiala *et al.*, 2007). Parallèlement, la pol Dbh agirait de façon coordonnée à la pol B1, en présence d'ADN contenant de l'uracile/hypoxanthine, au niveau de la fourche de réplication ; après la

première étape de reconnaissance du dommage par la pol réplicative B1, Dbh permettrait la reprise de l'élongation, en incorporant un nucléotide en face du site lésé (Gruz *et al.*, 2003).

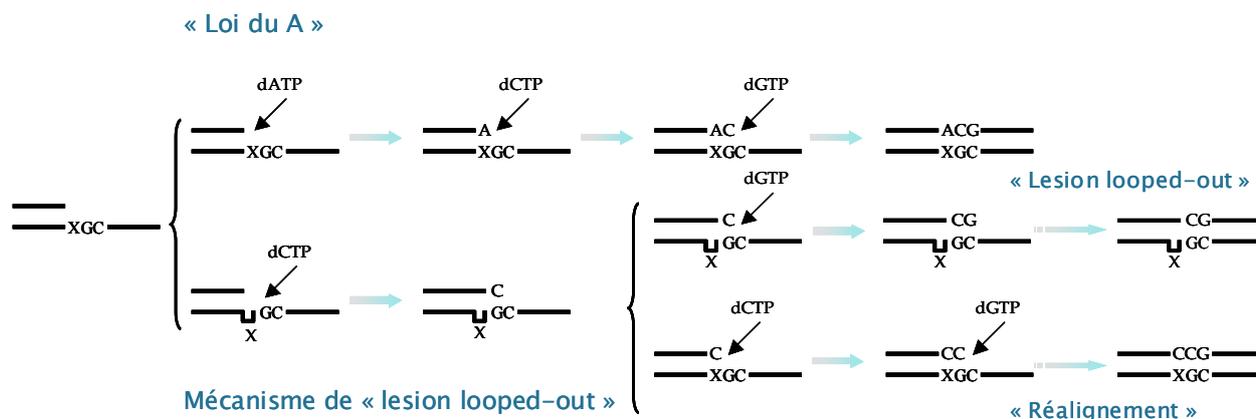


Figure 9 : Mécanisme de translésion d'un site AP par Dpo4, adapté de Fiala *et al.* (Fiala *et al.*, 2007). X représente le site AP.

4.2. Les ADN polymérases chez les euryarchaea

Famille	ADN polymérase	Microorganisme	Activités catalytiques	S	Propriétés	Fonctions	Références
FAMILLE B							
Pfu		<i>Pyrococcus furiosus</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	Processive	Réplication Reconnaissance de l'uracile - Réparation	(Lundberg <i>et al.</i> , 1991, Uemori <i>et al.</i> , 1993, Lasken <i>et al.</i> , 1996, Greagg <i>et al.</i> , 1999, Emptage <i>et al.</i> , 2008)
PabpolB		<i>Pyrococcus abyssi</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	1	Processive	Réplication (brin avancé)	(Gueguen <i>et al.</i> , 2001, Henneke <i>et al.</i> , 2005)
		<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	ND	1	ND	ND	Identifiée dans le génome
Mth		<i>Methanococcus thermoautotrophicum</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	2	Processive	Réplication	(Kelman <i>et al.</i> , 1999)
FAMILLE D							
PfupolD		<i>Pyrococcus furiosus</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	2	Processive	Réplication	(Uemori <i>et al.</i> , 1997, Cann <i>et al.</i> , 1998, Cann <i>et al.</i> , 1999a)
PabpolD		<i>Pyrococcus abyssi</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	2	Processive	Réplication (brin retardé)	(Gueguen <i>et al.</i> , 2001, Henneke <i>et al.</i> , 2005)
		<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Pol 5'→3' Exo 3'→5'	2		Réplication	(Ishino <i>et al.</i> , 1998)

Tableau 6 : Caractéristiques des ADN polymérases chez les euryarchaea.

SU : Nombre de Sous-Unités ; ND : Non Déterminé. Cette liste d'ADN polymérases n'est pas exhaustive.

4.2.1. Famille B

La distribution des pols B chez les euryarchaea est différente de celle présente chez les crenarchaea : une seule pol B a été identifiée et caractérisée à ce jour, contrairement aux crenarchaea qui peuvent en posséder 3 différentes (BI, BII et BIII) (Tableau 6). Elles comportent une fonction polymérisique 5'→3' ainsi qu'une fonction exonucléasique 3'→5'. Étonnamment, le transcrite primaire de plusieurs de ces pols B peut contenir une ou des intéines (Figure 10) (Perler *et al.*, 1994) : il s'agit de séquences intra-protéiques qui sont rapidement excisées par un processus autocatalytique lors de la maturation de la protéine (Perler, 1998). L'intéine excisée possède une triple fonction : endonucléase, autoexcision et ligation des extéines (Perler, 1998). Ces intéines ne sont pas rencontrées exclusivement chez les pols d'archaea. Elles sont également retrouvées dans d'autres protéines comme le RFC, le PCNA ou encore la pol D (MacNeill, 2001). Une autre curiosité a été découverte chez l'euryarchaea *Methanococcus thermoautotrophicum* : sa pol B est codée par 2 gènes distincts séparés par une région non conservée d'environ 850 kb (Figure 10) (Kelman *et al.*, 1999). Les deux polypeptides interagissent et forment alors une pol dimérique appartenant à la famille B.

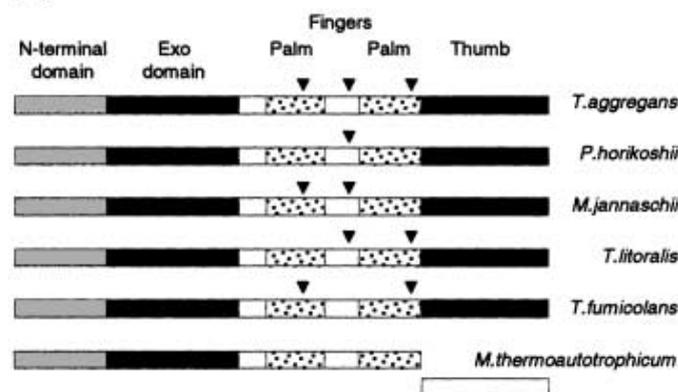


Figure 10 : Intéines chez les ADN polymérase B d'euryarchaea, d'après S. MacNeill (MacNeill, 2001).

Représentation schématique de 6 pols B d'euryarchaea, montrant les sites d'insertions des intéines représentés par un triangle noir retourné et l'organisation des domaines protéiques basée sur les structures tridimensionnelles des enzymes de *Thermococcus* et *Desulfurococcus* sp. (Hopfner *et al.*, 1999, Zhao *et al.*, 1999, Rodriguez *et al.*, 2000). La pol B de *Methanococcus thermoautotrophicum* scindée en 2 parties est également représentée (Kelman *et al.*, 1999).

L'organisation structurale des pols B d'euryarchaea est identique à celle des pols B chez les crenarchaea et plus généralement à celle des autres membres de la famille B comme la pol T4 (Figure 11). Comme le montrent les résolutions de récentes structures des pols B de

Thermococcus gornogarius, *Thermococcus* sp. ou encore *Pyrococcus kodakaraensis*, elles partagent une organisation architecturale commune semblable à celle d'une main humaine et sont constituées d'un domaine polymérasique et d'un domaine exonucléasique (Figure 11) (Hopfner *et al.*, 1999 , Zhao *et al.*, 1999 , Rodriguez *et al.*, 2000 , Hashimoto *et al.*, 2001 , Firbank *et al.*, 2008). La singularité observée chez les pols B archéennes réside en la présence de la poche additionnelle assurant la reconnaissance de l'uracile, qui a été découverte chez les euryarchaea (Figure 12) (Fogg *et al.*, 2002 , Firbank *et al.*, 2008).

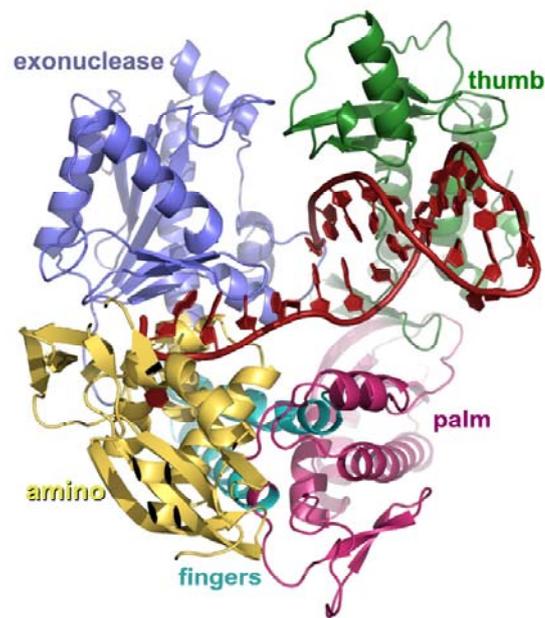


Figure 11 : ADN polymérase de *Thermococcus gorganarius* en complexe avec un ADN contenant de l'uracile, d'après Firbank *et al.* (Firbank *et al.*, 2008).

Le domaine N-terminal est représenté en jaune, le domaine exonucléasique en violet, la paume en magenta, les doigts en bleu turquoise et le pouce en vert. L'ADN est rouge.

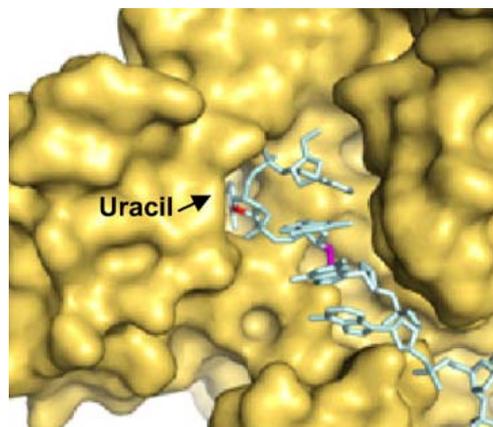


Figure 12 : Groupement uracile dans la poche spécifique de reconnaissance de l'ADN polymérase de *Thermococcus gorganarius*, d'après Emptage *et al.* (Emptage *et al.*, 2008).

Région N-terminale (couleur or) complexée à une matrice ADN contenant un uracile. La liaison glycosidique de l'ADN est représentée en rouge, le phosphate coupé par l'endonucléase V en rose. L'uracile est enchâssé dans la poche.

Sur le plan fonctionnel, la polB intervient lors de la réplication dans la cellule des euryarchaea. Une récente étude biochimique a clairement démontré que la polB de l'hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* (*PabpolB*) était capable seule, d'étendre totalement une matrice ADN. En revanche, elle est incapable d'élonguer une amorce ARN et d'effectuer du déplacement de brin en l'absence du PCNA (Henneke *et al.*, 2005). Certaines pols B, notamment la Tli de *Thermococcus litoralis*, peuvent aussi créer de l'information génétique en l'absence d'amorce et de matrice ADN (Ogata & Miura, 1998) ; cette fonction de synthèse d'ADN *de novo*, déjà observée chez la pol bactérienne de *Thermus aquaticus* ou encore les pols eucaryotes λ et μ , dépend de la température, du pH et de la force ionique (Ogata & Miura, 1998, Ramadan *et al.*, 2004). Au niveau de la fourche de réplication des euryarchaea, l'étude de G. Henneke *et al.* chez *Pab* a suggéré que l'unique pol B semblerait agir de façon complémentaire et coordonnée au niveau de la fourche de réplication avec la pol D : *PabpolB* synthétiserait le brin avancé car elle est uniquement capable d'étendre des amorces ADN alors que *PabpolD* interviendrait sur le brin retardé (Henneke *et al.*, 2005). De plus, *PabpolB* interagit avec le PCNA via l'intermédiaire d'un motif majeur PIP-box (PCNA interacting Protein-box), conservé dans les 3 domaines du vivant (Rouillon *et al.*, 2007) (Communication personnelle Benoît Castrec). L'ajout du PCNA permet à *PabpolB* de réaliser du déplacement de brin mais pas d'élonguer des amorces ARN (Henneke *et al.*, 2005) ; à l'inverse, *PabpolB* est capable de stimuler le chargement du PCNA (Rouillon *et al.*, 2007). L'instabilité du complexe PCNA•*PabpolB*•Amorce ARN observée renforce le rôle potentiel de *PabpolB* sur le brin avancé (Rouillon *et al.*, 2007). Parallèlement, l'équipe de I. Cann a démontré que les 3 sous-unités de la protéine de réplication A (RPA) est capable de stimuler la synthèse d'ADN par la pol B, chez *Methanosarcina acetivorans* (Robbins *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la capacité des pols B d'archaea à reconnaître l'uracile a été découverte pour la première fois chez les pols B d'euryarchaea : Tli et Pfu (Lasken *et al.*, 1996, Greagg *et al.*, 1999). Un rôle important du PCNA, associé à cette fonction unique, a récemment été mis en évidence chez *Pyrococcus furiosus* (Emptage *et al.*, 2008) : l'arrêt de la réplication, observé lorsque la pol B rencontre l'uracile/hypoxanthine, serait totalement inhibé par la présence du PCNA, empêchant ainsi la mise en place du BER (Emptage *et al.*, 2008).

D'un point de vue biotechnologique, les pols B d'euryarchaea présentent un fort potentiel pour des applications en PCR, grâce à leur processivité élevée et leur fonction exonucléasique qui leur confère une haute fidélité. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet de dépôt de brevet et sont actuellement commercialisées, comme la Pfu de *Pyrococcus furiosus*, la Vent™ de *Thermococcus litoralis* (Cariello *et al.*, 1991), la Pwo de *Pyrococcus woesei* (Cline *et al.*, 1996, Antranikian *et al.*, 2005), la pol KOD 1 de *Thermococcus kodakarensis* (Hashimoto *et al.*, 2001) ou encore la pol Isis™ / PabpolB^{exo+} de *Pab* (Dietrich *et al.*, 2002)... Toutefois, l'utilisation de ces pols en PCR peut parfois engendrer un problème pratique à cause de leur fonction de reconnaissance de l'uracile, qui diminue l'efficacité de la PCR. Afin de pallier à ce problème, la dUTPase est souvent ajoutée au mélange réactionnel pour diminuer le taux de dUTP, générés lors de la désamination du dCTP au cours de la PCR (Hogrefe *et al.*, 2002) ; la Pfu dUTPase permet d'améliorer le rendement des produits amplifiés, par exemple.

4.2.2. Famille D

A la différence des crenarchaea, les euryarchaea possèdent une pol unique appartenant à une nouvelle famille, nommée D par Ishino Y. *et al.* (Tableau 6) (Uemori *et al.*, 1997, Cann *et al.*, 1998, Cann & Ishino, 1999, Tang *et al.*, 2004). Contrairement aux pols B archéennes, cette pol est organisée en 2 sous-unités (Figure 13) : la grande sous-unité DP2 est codée par un gène qui diffère des autres familles de pols déjà identifiées (Cann *et al.*, 1998). En revanche, la séquence codant pour la petite sous-unité DP1 présente des homologies avec les pols répliquatives eucaryotes α , δ et ϵ (Aravind & Koonin, 1998). Les gènes codant pour DP1 et DP2 sont disposés en tandem dans le génome des euryarchaea ; ils sont localisés à proximité de l'origine de répllication oriC ainsi que des gènes codant pour le RFC, l'hélicase, Orc1/Cdc6 et Rad51, qui sont des protéines impliquées dans la répllication, la réparation ou encore la recombinaison (Myllykallio *et al.*, 2000). Ces pols D peuvent aussi comporter des intéines, comme la sous-unité DP2 chez *Pab* (Gueguen *et al.*, 2001).

Chez *Pab*, la pol D serait organisée en hétérodimère (Gueguen *et al.*, 2001) alors que chez *Pyrococcus horikoshii*, elle semblerait avoir une structure hétérotétramérique, comme celle de la pol δ eucaryote (Figure 13) (Shen *et al.*, 2001). Sur le plan structural, aucune donnée cristallographique de la pol D n'est disponible à ce jour.

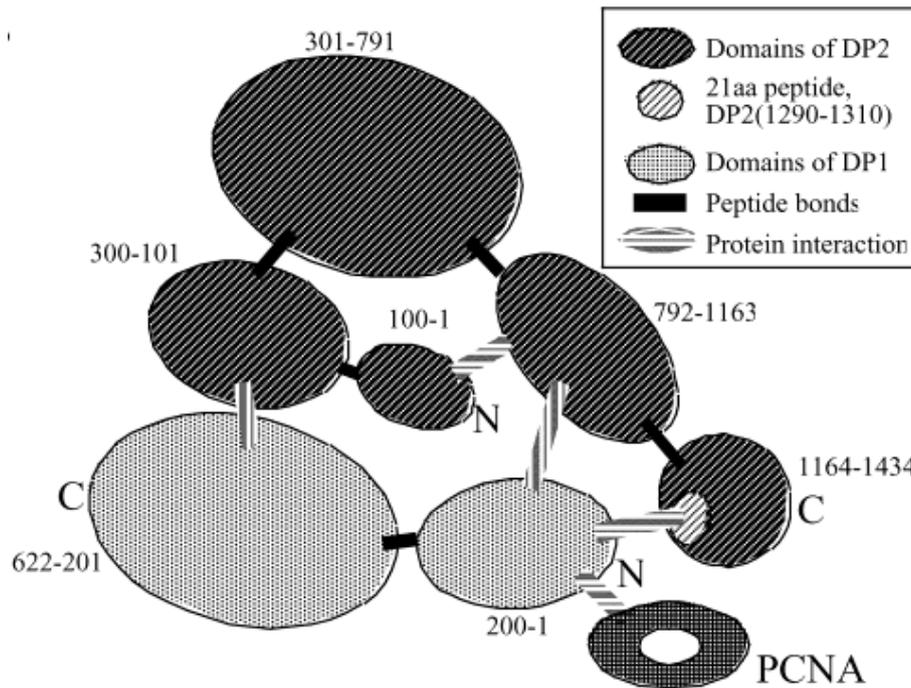


Figure 13 : Modèle d'interaction entre les sous-unités de l'ADN polymérase D chez *Pyrococcus horikoshii*, d'après Tang *et al.* (Tang *et al.*, 2004).

Sur le plan fonctionnel, la grande sous-unité DP2 correspond la fonction polymérasique 5'→3' (Shen *et al.*, 2001, Gueguen *et al.*, 2001) ; les résidus impliqués dans cette fonction ont été identifiés dans la région la plus conservée de DP2 (Asp1122 et Asp1124), par mutagenèse dirigée (Shen *et al.*, 2001). Sous sa forme hétérodimérique, la pol D possède une forte activité exonucléasique 3'→5', qui est portée par la petite sous-unité DP1 (Gueguen *et al.*, 2001, Jokela *et al.*, 2004) ; cette activité semble plus élevée en présence de nucléotides mésappariés et d'ADNsb (Jokela *et al.*, 2004).

Dans le contexte de la fourche de réplication, plusieurs études biochimiques ont mis en évidence des interactants de la pol D chez *Pyrococcus furiosus*. Il a été montré qu'il existait une interaction directe entre la pol D et le PCNA ; ce dernier stimulerait son activité (Cann *et al.*, 1999a). Le RFC associé au PCNA entraînerait également une stimulation de l'activité polymérasique de la pol D (Cann *et al.*, 2001, Henneke *et al.*, 2002). La sous-unité DP1 interagit aussi avec Rad51, protéine intervenant dans le mécanisme de recombinaison (Hayashi *et al.*, 1999). Ainsi, les activités catalytiques, l'organisation des gènes et la capacité d'interaction de la pol D avec des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, suggèrent qu'elle soit une des réplicases majeures chez les euryarchaea. Chez *Pab*, la pol D

serait moins processive que les pols de la famille B ; elle est également capable d'élonguer une amorce à ARN et de réaliser du déplacement de brin seule, à la différence de la pol B (Henneke *et al.*, 2005). Elle interagit avec le PCNA, uniquement en présence d'ADN et cette interaction met en jeu 2 motifs spécifiques, présents en N-terminal sur sa grande sous-unité DP2 (Henneke *et al.*, 2005), (Communication personnelle Benoît Castrec). Le PCNA pourrait alors servir de plateforme en recrutant la pol B sur le brin avancé et la pol D sur le brin retardé car elle est capable d'élonguer une amorce ARN et dispose d'une activité de déplacement de brins (Henneke *et al.*, 2005, Rouillon *et al.*, 2007), (Communication personnelle Benoît Castrec).

4.2.3. Conclusions

La distribution spécifique des pols chez les crenarchaea et les euryarchaea justifie des fonctionnements distincts des fourches de réplication. Si les crenarchaea répliquent leur ADN comme leurs homologues eucaryotes, grâce à deux ou trois pols répliquatives B, les euryarchaea disposent d'un système unique : elles utilisent de façon coordonnée une pol B sur le brin avancé et une pol D sur le brin retardé (Henneke *et al.*, 2005). D'ailleurs, une récente étude génétique a consisté à inactiver les gènes codant pour les pols B et D chez l'archaea *Halobacterium* sp. NRC-1 et a mis en évidence le rôle essentiel de ces 2 réplicases majeures chez les euryarchaea, renforçant ainsi le modèle (Berquist *et al.*, 2007).

Contrairement aux crenarchaea, aucune pol additionnelle appartenant à la famille Y n'a été caractérisée chez les euryarchaea, à ce jour. De même, aucune pol appartenant à la famille X, spécialisée dans la réparation, n'a été découverte, ni caractérisée biochimiquement chez les archaea. Ainsi, la compréhension des mécanismes de tolérance aux dommages est encore peu connue, dans le troisième domaine du vivant.

V. REPONSES BIOLOGIQUES AUX DOMMAGES AFFECTANT L'ADN

5.1. Diversité des réponses

La grande variété de lésions affectant l'ADN constitue un obstacle, pouvant entraver les fonctions cellulaires. Ces dommages nécessitent l'intervention d'un réseau mécanistique complexe au sein de la cellule, assurant un équilibre biologique entre le maintien de l'information génétique au fil des générations et la diversité génétique nécessaire à l'évolution des espèces (Figure 14 et Figure 15) (Friedberg *et al.*, 2006c).

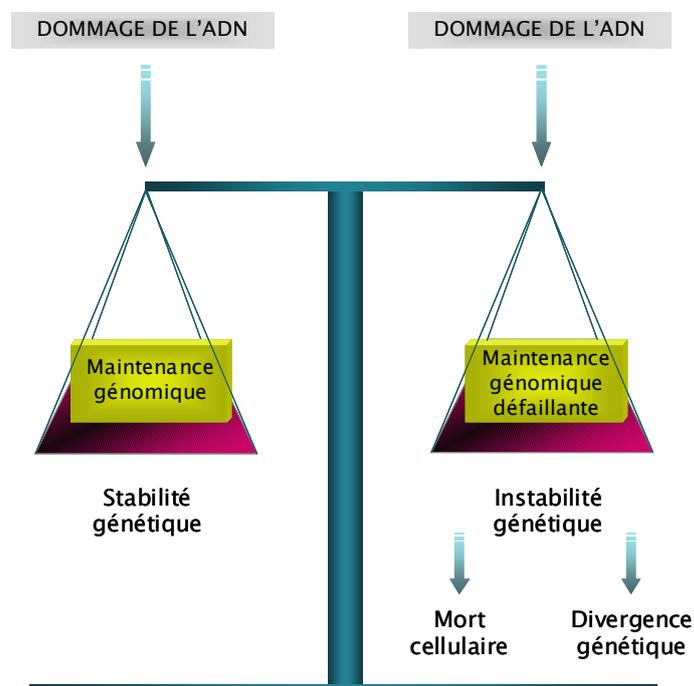


Figure 14 : Equilibre biologique.

Lorsqu'une lésion survient dans l'ADN, la stratégie la plus simple réside en la réversibilité du dommage (Figure 15) ; la seconde possibilité pour la cellule, et de loin la plus évidente, est de réparer la zone cible par l'un des processus d'excision de la ou des base(s) endommagée(s) existants (Figure 15) (Sartori & Jiricny, 2003, Friedberg *et al.*, 2006c). Récemment, des travaux ont montré qu'il existe une autre alternative, lorsque le site n'est pas réparable : la cellule dispose de systèmes lui permettant de tolérer temporairement les lésions de l'ADN (Friedberg *et al.*, 2002). Cette tolérance aux dommages regroupe actuellement 3 mécanismes distincts connus : la synthèse d'ADN translésionnelle ou

translèsion (TLS) (Voir 5.2 ci-dessous), le remplissage de brèche post-répliatif et l'avancée de la fourche de répliation (Friedberg *et al.*, 2006c). A la différence des systèmes de réparation, la lésion persiste dans l'ADN lors de l'utilisation de l'un de ces processus de tolérance par la cellule. Toutefois, en l'absence de ces mécanismes de tolérance, les cellules devraient faire face à des arrêts de la fourche de répliation, pouvant activer des points de contrôle du cycle cellulaire et conduire à l'apoptose ou mort cellulaire (Figure 15).



Figure 15 : Spectre des réponses biologiques aux dommages de l'ADN, modifié de Friedberg *et al.* (Friedberg *et al.*, 2006a).

Les différentes étapes de chacun des mécanismes de maintenance génomique font intervenir des pôles spécifiques, de part leurs propriétés physiques et biochimiques, dans le but de conserver un équilibre biologique (Figure 14 et Figure 16).

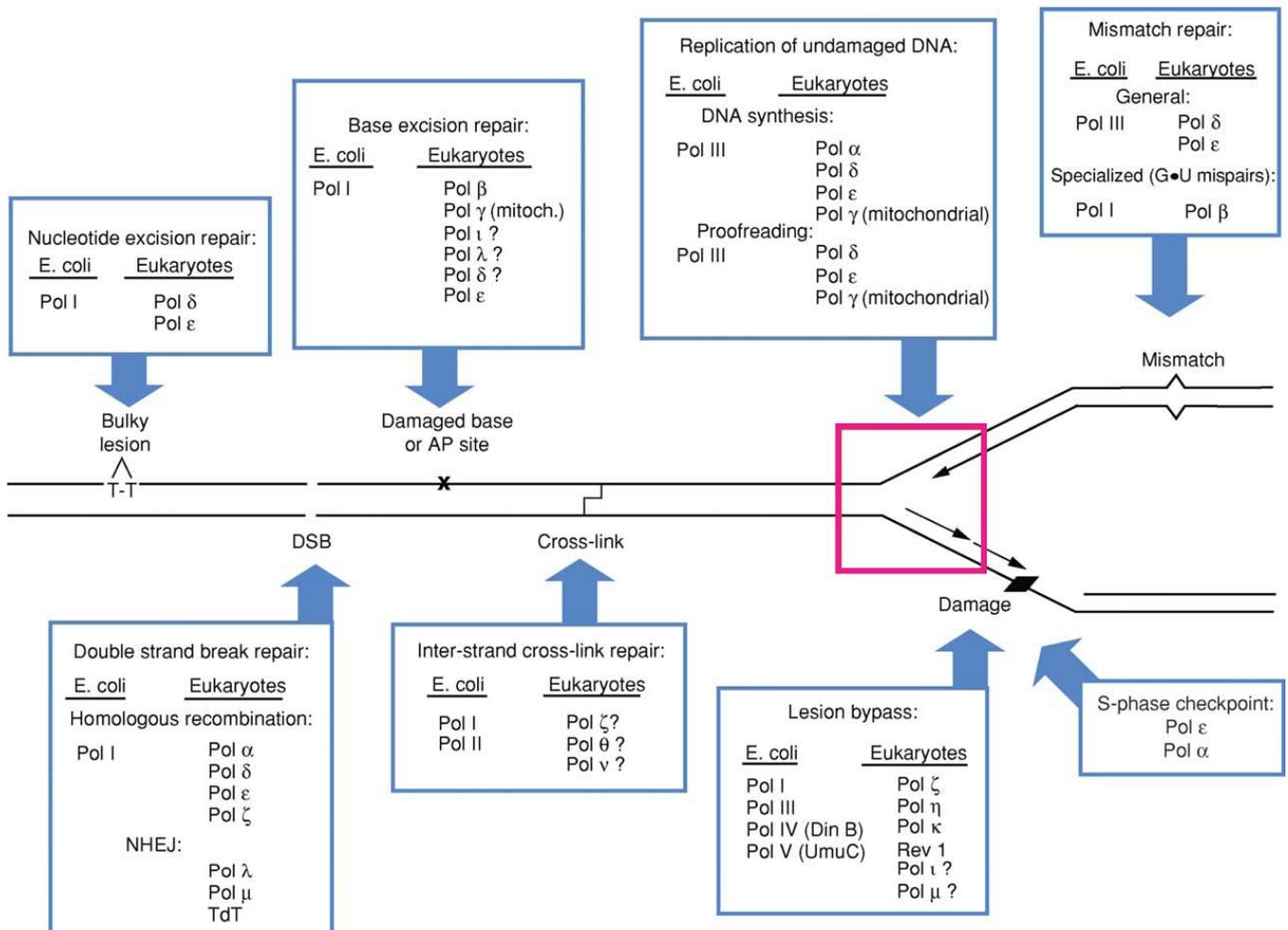


Figure 16 : ADN polymérase impliquées dans des mécanismes de maintenance génomique chez les bactéries et les eucaryotes, adapté de Bebenek *et al.* (Bebenek & Kunkel, 2004).

5.2. Synthèse translésionnelle ou Translésion

La translésion correspond au processus par lequel une pol est capable de franchir une lésion en incorporant un nucléotide en face ; ce mécanisme alternatif est plus rapide et moins coûteux sur le plan énergétique pour la cellule que les processus de réparation. Il met en jeu essentiellement des pols de la nouvelle famille Y comme la pol η ou la pol κ chez l'eucaryote (Ohmori *et al.*, 2001, Hübscher *et al.*, 2002, Friedberg *et al.*, 2002, Waters *et al.*, 2009) ou encore la pol IV et la pol V chez *E.coli* (Wagner *et al.*, 1999, Reuven *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 1999, Fuchs *et al.*, 2004) car elles se sont avérées capables de franchir *in vitro* des lésions qui bloquent la majeure partie des pols répliquatives. Ces pols translésionnelles peuvent aussi incorporer dans certains cas des dNTPs endommagés, présents dans le pool de précurseurs

de la cellule (Shimizu *et al.*, 2003, Yamada *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2007, Hidaka *et al.*, 2008).

Les pols translesionnelles existent dans les trois domaines du vivant, avec le plus grand nombre découvert chez les eucaryotes (Tableau 4). Chez les crenarchaea, seules les deux pols, Dbh et Dpo4, appartenant à la famille Y ont été identifiées et caractérisées à ce jour, alors qu'aucune pol translesionnelle n'a été découverte chez les euryarchaea (Tableau 6) (Gruz *et al.*, 2003, Boudsocq *et al.*, 2001). Ces pols de la famille Y sont caractérisées principalement par leurs faibles processivité et fidélité en présence d'ADN non endommagé, dont le taux d'erreur est compris entre 10^{-1} et 10^{-3} lors de la TLS du fait de leur absence d'activité exonucléasique (Kunkel, 2004). Elles peuvent être mutagéniques « error prone » ou « error-free » (Friedberg *et al.*, 2002). Sur le plan structural, elles présentent un site actif plus ouvert que les autres types de pols et peuvent accueillir jusqu'à 2 nucléotides à la fois (Figure 17) ((Yang, 2005) ; Communication personnelle Giuseppe Villani).

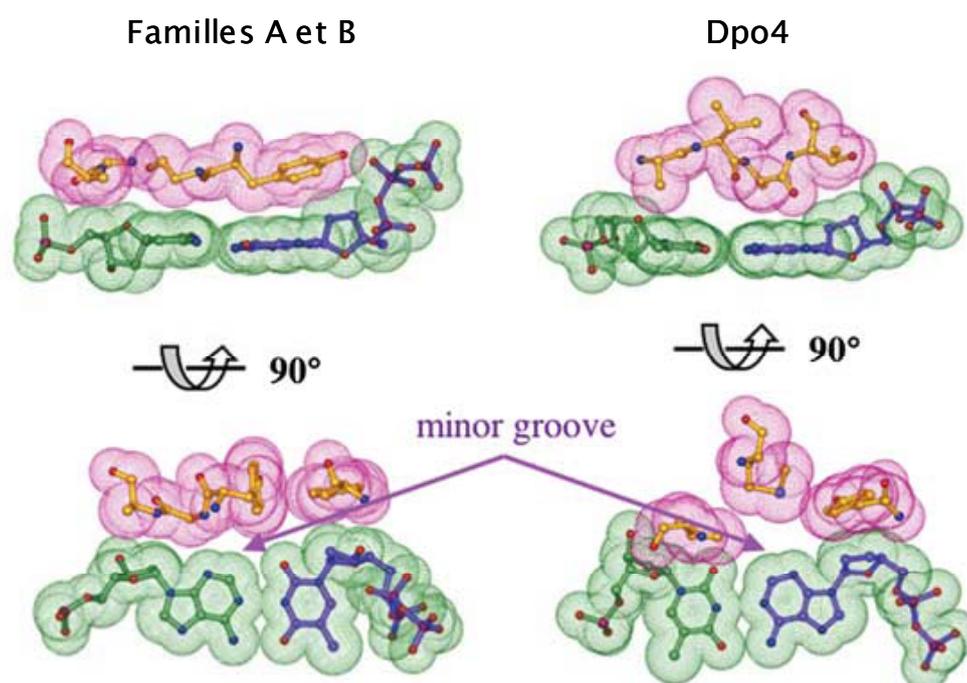


Figure 17 : Comparaison des interfaces entre une paire de base et les pols des familles A, B et Y, adapté de Yang *et al.* (Yang, 2005).

La paire de base est représentée en verte et la pol en rose. L'interface avec une pol de haute fidélité (Famille A et B) est totalement complémentaire alors qu'avec Dpo4 (Famille Y), elle est imparfaite.

Cependant, d'autres pols que celles de la famille Y participent également à la TLS. Les membres de la famille X comme les pols β , λ , et μ , en particulier, peuvent insérer un

nucléotide en face de certaines lésions (Ramadan *et al.*, 2004, Moon *et al.*, 2007). Une autre pol eucaryote, la pol ζ appartenant à la famille des pols répliquatives B, dépourvue d'activité exonucléasique 3'→5', intervient dans la TLS en élonguant la matrice ADN après le dommage (Haracska *et al.*, 2001, Lawrence, 2004, Lin *et al.*, 2006, Waters *et al.*, 2009). De même, la pol θ constituerait une exception au sein des pols de la famille A puisqu'elle semble capable de réaliser de la TLS et d'induire des mutations au sein des gènes codant pour les immunoglobulines (Maga *et al.*, 2002, Arana *et al.*, 2008).

En présence d'ADN endommagé, les pols translésionnelles remplacent les pols répliquatives bloquées et jouent un rôle essentiel non seulement pour la progression de la fourche de répllication mais plus généralement pour la survie cellulaire. D'un point de vue mécanistique, deux modèles de synthèse translésionnelle sont proposés, faisant intervenir des phénomènes de remplacement/« switch » (Figure 18).

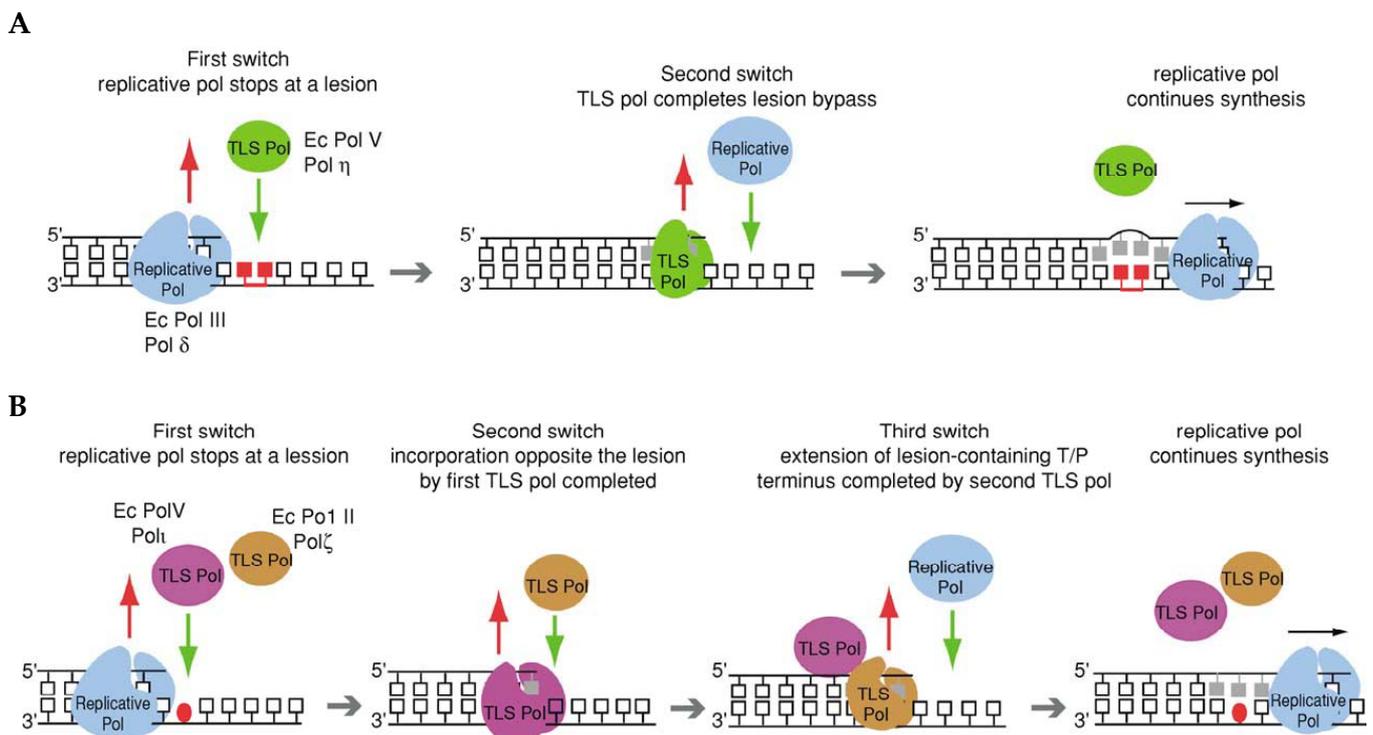


Figure 18 : Modèles de switch entre les ADN polymérases lors de la synthèse translésionnelle, adapté de Bebenek *et al.* (Bebenek & Kunkel, 2004).

A, Modèle impliquant une seule pol translésionnelle = un seul switch. **B**, Modèle impliquant deux pols translésionnelles = deux switches.

Le PCNA joue un rôle crucial, lors de la TLS, en recrutant les pols adaptées au niveau de la fourche de réplication (Goodman, 2002, Maga & Hubscher, 2003, Crespan *et al.*, 2007, Maga *et al.*, 2007). Le PCNA associé au RPA peuvent aussi moduler l'incorporation préférentielle par les pols en face d'un site endommagé, comme déjà démontré avec les pols translésionnelles λ et η (Maga *et al.*, 2007).

Ainsi, la régulation des processus translésionnels permet d'éviter des blocages répétitifs de la fourche de réplication bien qu'ils puissent induire des mutations. Cependant, ces mutations peuvent parfois constituer un avantage sélectif pour la survie d'un être unicellulaire en réponse à un changement d'environnement brutal.

VI. PRESENTATION DE L'ETUDE

6.1. Problématique

Chez les archaea hyperthermophiles, l'étude des mécanismes de maintenance génomique est à ses balbutiements et soulève des interrogations extrêmement fascinantes, comme le montre l'étude bibliographique ci-dessus. En effet, ces microorganismes sont inféodés à des biotopes hostiles d'un point de vue anthropomorphique, où sévissent des conditions extrêmes de température, de pH, de pression ou de salinité, que peu de bactéries et d'eucaryotes ne toléreraient. Des gradients abrupts de température, de pH, de potentiel d'oxydoréduction peuvent s'établir sur des distances de quelques centimètres à quelques mètres autour des émissions hydrothermales. De plus, les niveaux de radioactivité élevés, détectés au sein des biotopes hydrothermaux, suggèrent que les archaea hyperthermophiles, soient soumises à des doses d'irradiation naturelle élevées, pouvant jouer un rôle important dans l'adaptation et l'évolution des mécanismes de maintenance génomique.

Ces environnements particuliers sont propices à l'apparition de lésions sur l'ADN. Récemment, des travaux ont montré que chez l'espèce *Sulfolobus acidocaldarius*, le taux de mutation était presque identique à celui d'*E.coli* (Grogan *et al.*, 2001): cela suppose que les archaea disposent de puissants mécanismes pour préserver leur génome intact. Leur machinerie répliquative, comme chez toute cellule vivante, est probablement régulièrement confrontée à des matrices ADN présentant des lésions spontanées ou induites par des facteurs endogènes (oxydation, dépurinations spontanées) ou des facteurs exogènes (UV, rayonnements ionisants) (Grogan, 1998, Grogan, 2004). Ces lésions, de nature très diverse, peuvent être réparées par le mécanisme de réparation par excision de base comme l'a montré Sartori *et al.*, chez la crenarchaea *Pyrobaculum aerophilum* (Sartori & Jiricny, 2003). L'uracile peut également être détecté par les pols répliquatives archéennes appartenant à la famille B (Connolly, 2009). Cependant, à la différence des eucaryotes qui possèdent une batterie de pols spécialisées dans l'élongation de l'ADN, la réparation ou encore la translésion, la revue bibliographique réalisée précédemment montre bien que les archaea ne disposent que d'un

nombre limité de Pols. Ceci conduit à l'hypothèse suivante : les Pols d'archaea doivent présenter plus d'un rôle fonctionnel dans la cellule.

Ainsi, chez l'euryarchaea hyperthermophile *Pab*, à ce jour, seules deux Pols répliquatives ont été découvertes et caractérisées (Tableau 6 et Tableau 7) (Gueguen *et al.*, 2001, Henneke *et al.*, 2005) : *PabpolB* (Famille B) et *PabpolD* (Famille D).

	<i>PabpolB</i>	<i>PabpolD</i>	
CLASSIFICATION	Famille B	Famille D	
STRUCTURE	Monomère	Hétérodimère	
SEQUENCE PROTEIQUE	771 Aa soit 85 kDa	DP1: 619 Aa - 68 kDa DP2: 1270 Aa - 139,7 kDa Intéine: 185 Aa	
SEQUENCE NUCLEIQUE	1 séquence sans intéine	1 opéron: 2 sous-unités codées par des séquences en tandem, séparées par une intéine	
FONCTION PRINCIPALE	Réplication de l'ADN	Réplication de l'ADN	
PROPRIETES BIOCHIMIQUES			
	pH optimal	8,5-9	6,5
	[KCl] optimale	50-80 mM	40 mM
	[Mg²⁺] optimale	3 mM	10-20 mM
	Température optimale	Plus thermotolérante que <i>PabpolD</i>	
PROPRIETES FONCTIONNELLES			
	Substrats	Matrice ADNsb amorcée (ADN)	Matrice ADNsb amorcée (ADN, ARN)
	Taux d'erreur	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶	ND
	Activité Polymérase	5'→3'	DP2 : 5'→3'
	Activité Exonucléasique	3'→5'	DP1 : 3'→5'
	Synthèse sur brin avancé	Oui	
	Synthèse sur brin retardé		Oui
	Déplacement de brin	Oui en présence du PCNA	Oui
PROPRIETES INTERACTIONNELLES	Interactions avec le PCNA	PIPbox	PIPbox

Tableau 7 : Principales propriétés intrinsèques des *Pabpols* B et D (Gueguen *et al.*, 2001, Henneke *et al.*, 2005, Rouillon *et al.*, 2007).

A la différence de *PabpolB* constituée d'une seule sous-unité de 85 kDa, *PabpolD* (famille D) est un hétérodimère (Gueguen *et al.*, 2001) (Tableau 7) : la petite sous-unité de 68 kDa porte la

fonction exonucléasique 3'→5' alors que la grande sous-unité de 139 kDa renferme l'activité polymérasique 5'→3' (Tableau 7). A ce jour, aucune pol spécialisée, appartenant aux familles X et Y, n'a été identifiée dans le génome de *Pab* ; seules les deux pols répliquatives *Pabpol B* et *Pabpol D* ont été découvertes et caractérisées. Par inférence aux systèmes translésionnels connus, l'une des *Pabpol*s ou les deux pourraient être capables de tolérer certains types de lésions affectant l'ADN. Ainsi, l'étude du comportement des *Pabpol*s, en présence d'ADN endommagé, constitue un enjeu majeur car ces 2 enzymes pourraient être impliquées dans des processus de tolérance aux dommages et donc de mutagenèse. Comment réagissent ces pols répliquatives lorsqu'elles sont confrontées à un obstacle au niveau de la fourche de réplication ?

6.2. Objectifs

L'objectif de cette thèse est donc la caractérisation fonctionnelle des *Pabpol*s en présence de matrices ADN endommagées, afin d'élucider les mécanismes d'action mis en jeu par *Pab* pour préserver la stabilité génomique. L'étude porte uniquement sur les 2 lésions oxydatives (8-oxo-dG et 8-oxo-dA) et la lésion apurinique (AP) car il s'agit, de loin, les lésions les plus répandues affectant l'ADN (Lindahl, 1993). Le projet de recherche s'articule en trois parties :

La première partie a consisté à étudier des lésions oxydatives. Dans un premier temps, l'objectif a été de déterminer le taux de la lésion oxydative 8-oxo-dG, dans le génome de *Pab*, en collaboration avec F. Akcha (Laboratoire des polluants chimiques, IFREMER- Nantes). Dans un second temps, une caractérisation des propriétés intrinsèques des *Pabpol*s sauvages (exo+) en présence des lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA ainsi que d'un dNTP oxydé, le 8-oxo-dGTP, a été réalisée.

La seconde partie du projet a été consacrée à l'étude exhaustive de la lésion apurinique (AP). Une démarche similaire à celle menée pour les lésions oxydatives a été mise en place : d'une part, une étape préalable de détection des sites AP au sein du génome de *Pab* a été effectuée afin de compléter les résultats fonctionnels. D'autre part, la suite de l'étude a consisté à élucider le comportement des *Pabpol*s sauvages (exo+) et des *Pabpol*s mutées, dépourvues

d'activité exonucléasique (exo-), en présence de la lésion AP afin d'évaluer le rôle de cette fonction de correction d'erreur.

Outre l'intérêt fondamental du projet, la troisième partie a été consacrée à la mise au point d'une nouvelle application biotechnologique des *Pabpols*. En ce sens, *PabpolB* est actuellement commercialisée sous le nom d'Isis™, par la société MP Biomedicals et est capable d'amplifier de l'ADN non endommagé par la technique de PCR de façon beaucoup plus fidèle que la Taq, grâce à sa fonction exonucléasique (Dietrich *et al.*, 2002). En revanche, *PabpolD* a été brevetée mais n'a fait l'objet d'aucune application pour la technique de PCR, ni d'une commercialisation, à ce jour. Cela laisse penser que les *Pabpols*, du fait de leur haute fidélité, constitueraient d'excellentes candidates pour la mise au point d'une technique d'amplification d'ADN endommagé, qui pourrait trouver des applications en médecine légale, en archéologie, par exemple. Par conséquent, cette approche biotechnologique a eu pour objectif de mettre au point des conditions réactionnelles permettant de réaliser des amplifications d'ADN par PCR avec *PabpolD*. Ensuite, des expériences d'amplification d'ADN endommagé par des lésions AP et la lésion 8-oxo-dG ont été effectuées, par la technique de PCR.

CHAPITRE I : ETUDE DES LESIONS OXYDATIVES

I. INTRODUCTION

Le stress oxydatif correspond à une situation de dérèglement physiologique des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites, au cours de laquelle la cellule vivante est soumise à une accumulation d'oxydants variés incluant les ROS. Celles-ci représentent une réelle menace pour l'intégrité cellulaire car elles sont notamment à l'origine de nombreuses lésions affectant l'ADN et le pool de dNTPs cellulaire (Ames, 1989, Imlay, 2003, Bjelland & Seeberg, 2003, Cooke *et al.*, 2003, Cadet, 2008 #545).

Chez les euryarchaea hyperthermophiles anaérobies, l'étude des mécanismes de résistance aux agents oxydants notamment les ROS, est à ses balbutiements et soulève des interrogations fascinantes. Même si ces microorganismes sont considérés comme vivant en conditions anoxiques, il est fort probable que leur ADN et leur pool de dNTPs soient confrontés à des dommages oxydatifs. D'une part, comme dans toute cellule vivante, l'ADN et les dNTPs de ces euryarchaea sont continuellement exposés aux espèces oxygénées d'origine endogène, c'est à dire produites par le métabolisme cellulaire (Cooke *et al.*, 2003, Cadet, 2008 #545). D'autre part, les dommages oxydatifs peuvent aussi être induits par des facteurs exogènes comme l'oxygène, la température ou encore les rayonnements ionisants (Cadet *et al.*, 2003). En effet, ces microorganismes, inféodés au milieu hydrothermal, sont exposés à l'oxygène lorsque le fluide hydrothermal anoxique sortant des cheminées se mélange à l'eau de fond froide riche en oxygène (Huber *et al.*, 1990, Fouquet *et al.*, 1993, Summit & Baross, 1998). De plus, les hautes températures favorisent les réactions d'auto-oxydation des bases azotées (Helbock *et al.*, 1998) et peuvent aussi indirectement conduire à la formation de ROS (Bruskov *et al.*, 2002). Enfin, l'effet indirect de la radioactivité naturelle du milieu hydrothermal via les ROS, par hydrolyse de l'eau, est propice à l'apparition de lésions oxydatives dans l'ADN (Hutchinson, 1985, Charmasson *et al.*, 2009).

Les dommages oxydatifs des bases de l'ADN conduisent le plus souvent à la formation de purines oxydées, particulièrement la 8-oxo-dG ou encore la 8-oxo-dA (Breen & Murphy, 1995). La 8-oxo-dG est d'ailleurs considérée comme un excellent marqueur biologique du stress oxydatif car elle peut être détectée avec une grande sensibilité (Kasai *et al.*, 1991, Kasai, 1997, Bolin & Cardozo-Pelaez, 2007). Toutefois, si les niveaux de

8-oxo-dG ont fait l'objet de mesures précises chez les eucaryotes et les bactéries (Tableau 3), aucune donnée n'est actuellement disponible chez les archaea. Parallèlement, les précurseurs de l'ADN sont aussi en proie à de nombreuses agressions induites par les ROS, aboutissant notamment à la formation de 8-oxo-dGTP, qui peut être incorporé dans l'ADN lors de la réplication (Ames & Gold, 1991).

Lorsqu'ils échappent aux mécanismes de surveillance ou de réparation du génome (Figure 15), ces dommages oxydatifs affectant l'ADN ou le pool de dNTPs cellulaire, s'avèrent hautement mutagènes pour la cellule car ils sont fortement tolérés par la plupart des pols lors de la réplication de l'ADN (Ames & Gold, 1991, Cheng *et al.*, 1992). En effet, les pols sont capables d'insérer un dNTP, correctement ou de façon illégitime, face aux lésions codantes 8-oxo-dG et 8-oxo-dA ; elles peuvent aussi incorporer le dNTP oxydé 8-oxo-dGTP (Kamiya, 2003, Nohmi, 2006). Néanmoins, chez les euryarchaea, et particulièrement chez *Pab*, jusqu'alors aucune pol translésionnelle n'a été découverte et le comportement des pols répliquatives B et D en présence de ces dommages oxydatifs n'a jamais été étudié. Il paraît donc essentiel d'évaluer le potentiel mutagène de ces lésions oxydatives, chez ces microorganismes. Pour répondre à cet objectif, la première partie de l'étude a été consacrée à la mesure du taux de la 8-oxo-dG au sein du génome de *Pab* avant ou après un stress oxydatif, en collaboration avec F. Akcha (Laboratoire des polluants chimiques, IFREMER-Nantes). La seconde partie a consisté à caractériser les propriétés intrinsèques des *Pab* pols sauvages (exo+) en présence de matrices ADN contenant une lésion 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA et du dNTP oxydé, 8-oxo-dGTP.

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Mesure de la 8-oxo-dG dans les génomes de *Pab* et *E.coli*

2.1.1. Techniques de cultures

2.1.1.1. Cultures d'*E.coli*

Des cultures en mode batch (sans apport de milieu de culture frais) de la souche de référence CIP 54.8 d'*E.coli* (CRBIP) ont été réalisées, à 37°C et à pH 7, sous agitation (170 rpm) dans des erlenmeyer de 5 L contenant 1 L de milieu frais Luria-Bertani (LB) (Annexe 1). Le milieu LB a été stérilisé par autoclavage : 1 cycle de 20 min à 121°C.

2.1.1.2. Cultures de *Pab*

➤ Milieu de culture

Différentes cultures de la souche GE5 de *Pab* (Souchothèque de Bretagne, <http://www.ifremer.fr/souchotheque>) ont été réalisées en anaérobiose stricte, dans un milieu complexe : le milieu SME modifié dont la composition varie légèrement en fonction de la technique de culture utilisée (Annexe 1) (Stetter *et al.*, 1983, Raven *et al.*, 1992, Godfroy *et al.*, 2006). La résazurine, indicateur de l'état de réduction du milieu, permet de s'assurer visuellement du maintien de l'anaérobiose : elle est bleue à l'état oxydée, rose à 50 % d'oxydation (résorufine) et incolore à l'état réduit (dihydrorésorufine).

La stérilisation du milieu s'effectue de différentes façons :

- par tyndallisation : 2 cycles de 30 min à 100°C séparés par un refroidissement complet permettant la destruction d'éventuelles spores. Ce procédé est utilisé pour le soufre colloïdal, composé sensible à la température.
- par autoclavage : 1 cycle de 20 min à 121°C.
- par filtration : à l'aide de filtres d'une porosité de 0,22 µm (Millipore). Cette technique empêche la dégradation des composés chimiques thermolabiles (vitamines) et est adaptée à la stérilisation de volumes importants (10 à 20 L de milieu consommé par jour dans le bioréacteur en mode continu).

➤ Cultures de *Pab* en flacon pénicilline

Des cultures en mode batch de la souche GE5 de *Pab* (Souchothèque de Bretagne, <http://www.ifremer.fr/souchotheque>) ont été réalisées en anaérobiose stricte, à 95°C et à pH 6,8, dans des flacons pénicilline de 100 mL contenant 40 mL de milieu frais SME modifié (Annexe 1) : à la différence du milieu SME modifié pour la culture en bioréacteur, ce milieu contient :

- un tampon : le Pipes permettant le maintien du pH dans une gamme de 6,1 à 7,5
- un accepteur d'électron : le soufre colloïdal
- un agent réducteur : le sulfure de sodium (Na₂S) afin de maintenir l'anaérobiose

Les flacons sont fermés par des bouchons en caoutchouc étanches au gaz, et sertis ; ils sont inoculés à raison de 2,5 % à l'aide de précultures en milieu de phase exponentielle, avec des seringues à usage unique.

➤ Cultures de *Pab* en bioréacteur gas-lift

Des cultures en continu de la souche GE5 de *Pab* ont été réalisées en bioréacteur de type gas-lift d'une capacité de 5 L (Figure 19) : il s'agit d'un bioréacteur dont l'agitation est assurée par le balayage gazeux stérile et possédant un dispositif cylindrique de circulation interne, appelé « draft-tube ». Cet outil a été conçu pour la culture de microorganismes hyperthermophiles réduisant le soufre, par apport continu de milieu nutritif frais (Raven *et al.*, 1992, Godfroy *et al.*, 2006).

Le milieu fermenté contenu dans la cuve est soutiré simultanément, à un même débit que l'apport de milieu frais. A l'équilibre, la densité microbienne est ainsi maintenue constante. Le balayage gazeux de la culture à l'azote permet le maintien de l'anaérobiose, l'homogénéisation du milieu et l'élimination des composés gazeux toxiques issus du métabolisme (H₂ et H₂S). Ce système de culture permet de contrôler les paramètres physico-chimiques (pH et température) en temps réel, grâce à un système analogique de contrôle relié à un ordinateur (non représenté sur la Figure 19).

Une culture de *Pab*, en milieu protéique SME modifié, a ainsi été effectuée en bioréacteur, à une température de 90°C, à un pH de 6,8 et avec un taux de dilution de 0,1 h⁻¹. Le milieu est dépourvu de Pipes et de Na₂S, et contient de la L-Cystéine, utilisée comme accepteur final d'électrons à la place du soufre colloïdal (Annexe 1).

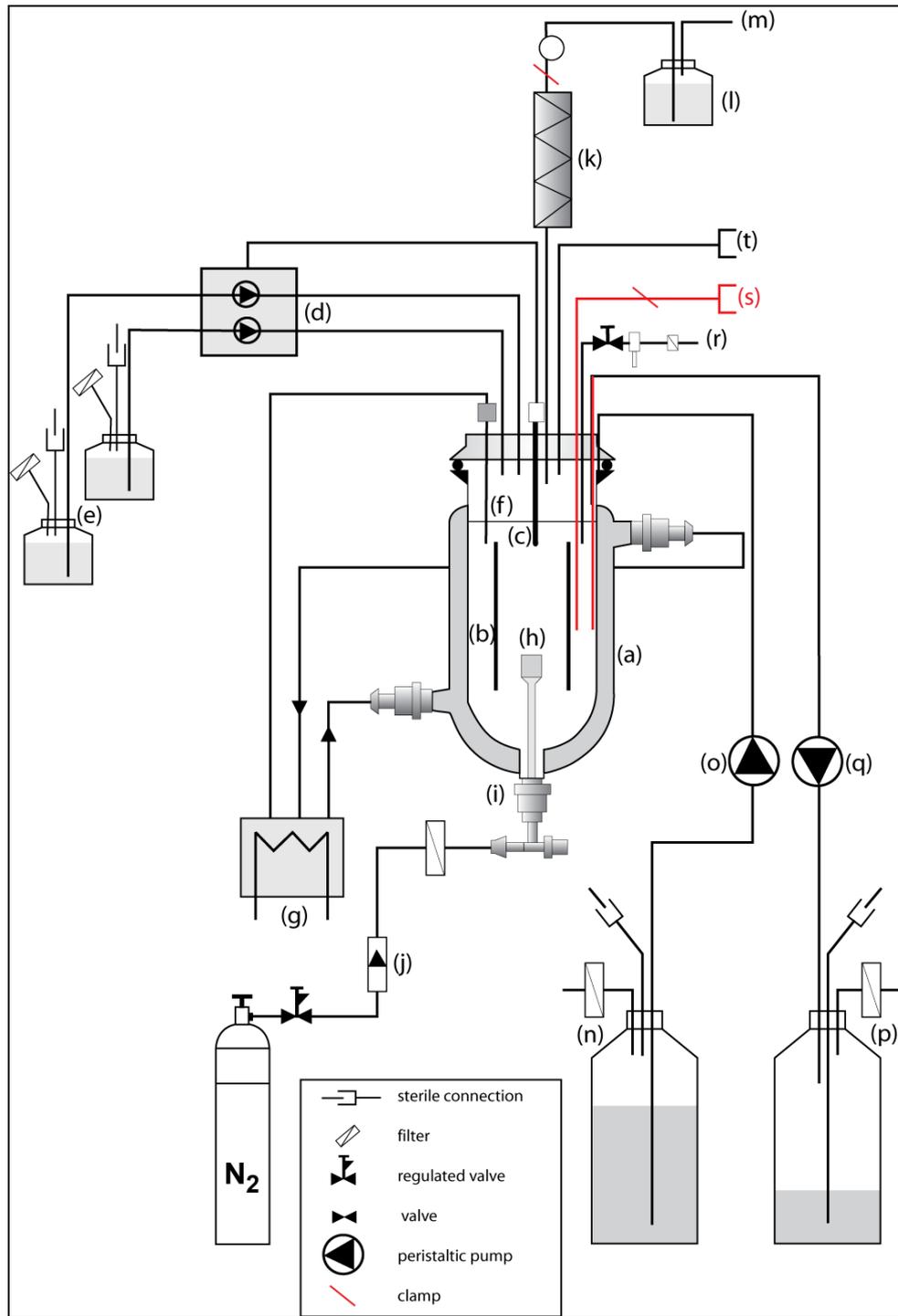


Figure 19 : Représentation schématique du système expérimental de culture en bioréacteur gas-lift, adapté de Godfroy *et al.* (Godfroy *et al.*, 2006).

(a) cuve en verre à double enveloppe ; (b) « draft-tube » ; (c) sonde de pH ; (d) contrôleur de pH ; (e) flacons d'acide (HCl 1 N) et de base (NaOH 1 N) ; (f) sonde de température ; (g) bain thermostaté ; (h) bulleur ; (i) robinet du bulleur ; (j) débitmètre à bille pour gaz ; (k) condenseur ; (l) trappe de condensation ; (m) effluent gazeux ; (n) bidon d'entrée (milieu de culture) ; (o) pompe d'entrée ; (p) bidon de sortie (déchets) ; (q) pompe de sortie ; (r) rampe aérobie de prélèvement d'échantillons ; (s) rampe anaérobie de prélèvement d'échantillons ; (t) système d'inoculation. Les éléments de couleur rouge ont été conçus dans le cadre de cette étude.

2.1.1.3. Suivi des cultures

➤ Observations microscopiques

Des états frais d'*E.coli* et de *Pab* ont été observés au microscope à contraste de phase (Objectif 100X à immersion) (Olympus BX60) afin d'apprécier la morphologie des cellules et l'évolution de la croissance.

➤ Dénombrement cellulaire

La densité cellulaire des cultures d'*E.coli* et de *Pab* a été évaluée régulièrement par comptage direct à l'aide de l'hématimètre de Thoma (0,02 mm de profondeur) (Weber Scientific International) et d'un microscope à contraste de phase (Objectif 40X) (Olympus BX60). Pour *E.coli*, la croissance a également été estimée par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Milton Roy Spectronic 301). Un tube de milieu non ensemencé sert de blanc pour la correction de l'absorbance.

➤ Prélèvements et conditionnement des échantillons

L'ensemble des échantillons collectés lors des différentes expériences et leur conditionnement respectif sont présentés dans le [Tableau 8](#).

	<i>E.coli</i>	<i>Pab</i>	
Technique de culture	Mode batch en erlenmeyer sous agitation	Mode batch en flacon pénicilline	Mode continu/batch en bioréacteur gas-lift
Stade de croissance	-Milieu de phase exponentielle -Phase stationnaire	-Milieu de phase exponentielle	-Milieu de phase exponentielle -Phase stationnaire
Stress oxydatif			Voir Chapitre I. 2.1.3
Volume de l'échantillon	3 X 20 mL	40 mL par flacon	3 X 80 mL
Conditions appliquées lors du prélèvement d'un échantillon	-Prélèvement avec une pipette stérile -Transfert de l'échantillon dans un tube à fond conique (Falcon®)	-Dépôt du flacon 15 min sur glace -Transfert <u>aérobie</u> de l'échantillon dans un tube à fond conique (Falcon®)	-Système de prélèvement anaérobie* -Dépôt du flacon 15 min sur glace -Transfert <u>anaérobie</u> de l'échantillon dans un tube étanche aux gaz (Beckman Coulter®); réalisé dans l'enceinte anaérobie
Centrifugation	6000 g – 15 min – 4°C		
Élimination des surnageants	Aérobie		Dans l'enceinte anaérobie
Stockage des culots cellulaires	-20°		

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des conditions de prélèvement d'échantillons de *Pab* et d' *E.coli*, en vue de détecter la lésion 8-oxo-dG.

*Une ligne de soutirage spécifique a été conçue dans le but de maintenir l'anaérobie stricte depuis le prélèvement de l'échantillon au sein du bioréacteur jusqu'à l'étape de stockage des culots cellulaires à -20°C (Figure 19. s et Figure 20) :



Figure 20 : Rampe anaérobie de prélèvement d'échantillons installée sur le bioréacteur. A, raccord en tuyau étanche au gaz Tygon silicone (Masterflex, Norton). B, embout de seringue.

Lors du prélèvement, les lignes d'entrée et de sortie du bioréacteur (Milieu, Acide/Base) sont fermées à l'aide de clamps. Un clamp ajouté à la sortie du condenseur (Figure 19), permet de mettre le bioréacteur sous pression, de manière à récolter l'échantillon par la rampe anaérobie (Figure 19. s et Figure 20). Celle-ci est constituée de 3 éléments : une longue tige de verre (37 cm) plongeant dans la cuve du bioréacteur (Figure 19. s) est raccordée à un embout de seringue (Figure 20. B) par l'intermédiaire d'un tuyau étanche au gaz (Masterflex, Norton) (Figure 20. A). Cette rampe est directement connectée, par une aiguille à usage unique, à un flacon pénicilline stérile. La phase gazeuse de ces flacons est préalablement remplacée par de l'azote N₂, via une rampe de dégazage ; l'application d'un vide partiel dans le flacon permet la collecte de l'échantillon. Après avoir été déposés 15 min sur glace en flacon pénicilline, les échantillons sont transférés dans l'enceinte anaérobie (mélange N₂/H₂ en proportions 90/10) où ils sont transvasés dans des tubes spécifiques étanches au gaz (Beckman Coulter) puis centrifugés ; les surnageants sont éliminés dans l'enceinte anaérobie et enfin les culots cellulaires sont stockés à -20°C.

2.1.2. Suivi de croissance chez *Pab* en bioréacteur gas-lift

Un suivi de croissance de *Pab* en bioréacteur gas-lift a été réalisé afin de prélever des échantillons à différentes phases de croissance. Pour cela, il faut abaisser rapidement la densité cellulaire d'une culture active (phase exponentielle) : la cuve est vidangée en laissant un volume suffisant pour permettre d'initier un autre cycle d'expansion ; cette opération s'effectue grâce à la ligne de sortie de milieu reliée à une longue tige de verre (37 cm) plongeant au fond du bioréacteur (Figure 19). Un apport rapide de milieu frais permet alors de rétablir le volume initial de culture (5 L). Enfin, un taux de dilution élevé est appliqué jusqu'à obtention d'une densité cellulaire souhaitée pour débiter le suivi. Dès lors, le bioréacteur est passé en mode batch (arrêt du mode continu) et des prélèvements sont effectués à intervalle de temps réguliers.

2.1.3. Stress oxydatif chez *Pab* en bioréacteur gas-lift

Après passage du bioréacteur en mode batch (arrêt du continu), un stress oxydatif a été appliqué, par balayage à l'air d'une culture active de *Pab* (phase exponentielle), durant 5 min. Le virage au rose de la résazurine (Eh ~ -70 mV) permet alors de contrôler l'état

d'oxydation du milieu. Différents prélèvements ont été effectués selon la technique décrite ci-dessus, avant et après le stress.

Pour chaque prélèvement, un dénombrement des cellules viables de *Pab* a été réalisé par la technique statistique du nombre le plus probable à trois tubes (NPP). Le titre de cellules viables de l'échantillon est estimé statistiquement, en utilisant la table de Mac Grady.

2.1.4. Dosage de la lésion 8-oxo-dG au sein des génomes de *Pab* et *E.coli* par HPLC-UV-EC

La détection de la lésion 8-oxo-dG a été effectuée chez l'euryarchaea hyperthermophile *Pab* mais aussi chez la bactérie mésophile *E.coli*, afin de réaliser des comparaisons. Les différentes étapes de la détection ont été réalisées dans des conditions de faible luminosité afin d'éviter les phénomènes de photo-oxydation des bases azotées de l'ADN (Cadet *et al.*, 2008).

2.1.4.1. Extraction d'ADN totaux

L'ADN génomique d'*E.coli* et de *Pab* a été isolé par une méthode chaotrope à l'iodure de sodium (NaI), dérivée de la méthode de Helbock (Helbock *et al.*, 1998) et légèrement modifiée par F. Akcka (Akcha *et al.*, 2000), (Wessel *et al.*, 2007). Cette méthode douce permet d'éviter la formation de lésions oxydatives artéfactuelles.

L'étape de lyse cellulaire est réalisée par voie chimique : les culots cellulaires sont resuspendus dans 1,5 mL de tampon de lyse TNE-1 X (100 mM Tris-HCl (pH 8), 1,4 M NaCl, SDS (1 %), β -mercaptoéthanol (0,2 %)), en présence de 0,125 mM de déféroxamine mesylate (desferal), puis homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem. La desferal, chélateur d'ions Fe^{2+} , limite les éventuelles réactions d'auto-oxydation (Helbock *et al.*, 1998). Après une centrifugation de 5 min à 5000 g à 4°C, les culots ont été resuspendus dans 600 μ L de TNE 1X à 0,125 mM de desferal et 200 μ L de CTAB (Hexadecyltriméthylammonium bromide) (10 %). La lyse cellulaire a ensuite été effectuée à 65°C pendant 1 h, puis l'extraction des ADN totaux réalisée par ajout d'un volume de Chloroforme/Alcool Isoamylique (24/1). Les échantillons ont été agités par retournement puis centrifugés à 12 000 g pendant 20 min à 4°C. La phase aqueuse a été délicatement récupérée puis un traitement à la ribonucléase A (RNase A) (20 μ g) a été appliqué pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer les ARN. L'ADN a ensuite été précipité par addition de 1,2 mL d'une solution de NaI (20 mM EDTA- Na_2 , 7,6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 0,3 mM desferal (pH 8)) puis centrifugé à 10 000 g pendant

20 min à 4°C. Les culots sont resuspendus dans 1 mL d'isopropanol glacé (40 %) et centrifugés à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. Enfin, les culots ont été lavés dans 2 mL d'éthanol 70 % et centrifugés à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. Après élimination de l'éthanol, les culots d'ADN ont été séchés à température ambiante et resuspendus dans 50 à 100 µL de desferal (0,1 mM). Les ADN obtenus ont été dosés par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (NanoDrop Technologies, Inc), et considérés comme purs si les rapports 260/280 nm et 260/230 nm sont compris respectivement entre 1,8 et 2, et avoisinant les 2. Les échantillons ont ensuite été stockés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse.

2.1.4.2. Digestion

L'ADN génomique a été digéré par voie enzymatique en libérant les 2'-désoxyribonucléosides. Pour chaque échantillon, 10/15 µg d'ADN génomique ont été digérés par 5U de la nucléase P1 de *Penicillium citrinum* (Sigma), pendant 2 H à 37°C. La nucléase P1 rompt les liaisons phosphodiester de la chaîne d'ADN, libérant ainsi les désoxyribonucléotides. Après addition de 4U de phosphatase alcaline d'intestin de veau (Sigma), le mélange réactionnel a été de nouveau incubé, pendant 1 H à 37°C. La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des groupements 5'-phosphate, libérant ainsi les 2'-désoxyribonucléosides.

2.1.4.3. Analyse par HPLC-UV-EC

➤ Principe :

La détection de la lésion 8-oxo-dG a été réalisée par une méthode directe, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Agilent 1200 series) couplée à une détection UV (Agilent 1200 series) et électrochimique (EC) (Coulochem® III, ESA).

La séparation des 2'-deoxyribonucléosides des 8-oxo-dG est réalisée par chromatographie de partage à polarité de phase inversée : la phase stationnaire est constituée de gel de silice sur lequel sont greffés des groupements hydrophobes de type octadecylsilyle (précolonne C18 5 µm, colonne 5ODB - Interchim). L'élution a été réalisée en mode isocratique avec une phase mobile aqueuse composée de méthanol (10 %), 100 mM acétate de sodium (pH 5,2). Le débit dispensé par la pompe est de 1 mL/min. L'éluat traverse ensuite un détecteur UV (Agilent 1200 series) qui mesure l'absorbance en continu à 254 nm afin de quantifier la base normale dG. Enfin, il est acheminé vers le détecteur EC coulométrique (ESA Coulochem® III

Multi-Electrode detector) pour la mesure quantitative de la 8-oxo-dG. Le couple d'oxydoréduction étudié est le couple dG (réduit) / 8-oxo-dG (oxydé). Les potentiels sont ajustés à 460 mV pour la cellule de garde et à 380 mV pour l'électrode de la mesure de la 8-oxo-dG. Le potentiel d'oxydation de la 8-oxo-dG a été préalablement déterminé par F. Akcha et N. Wessel, en réalisant un voltamogramme hydrodynamique.

➤ Dosage

Pour chaque échantillon, 10 ou 15 µg d'ADN ont été injectés sur la colonne, le volume d'injection étant de 50 µL. Parallèlement, des standards externes de dG et de 8-oxo-dG ont également été analysés afin d'identifier les 2'-désoxyribonucléosides réduits et oxydés et d'obtenir une droite d'étalonnage. Dans les conditions expérimentales définies, les temps de rétention de la dG et de la 8-oxo-dG avoisinent respectivement les 8,5 min et 11,5 min à 35°C. La quantification de la 8-oxo-dG a ensuite été réalisée à l'aide de la droite de régression linéaire des standards. Le résultat a été exprimé en nombre de 8-oxo-dG/10⁶ dG. Pour chaque condition, deux échantillons ont été analysés en triplicat, quand cela était possible.

2.2. Production et purification d'une protéine recombinante *Pabp*D

exo +

Une production de *Pabp*D^{exo+}, portant un tag histidine sur la grande sous-unité polymérasique DP2 ([Annexe 3](#)), a été réalisée en grand volume. Les deux sous-unités DP1 et DP2 ont été préalablement clonées au laboratoire, respectivement dans les vecteurs pARSH et pET28a puis coexprimés dans la souche HMS 174 (DE3) d'*E.coli*.

2.2.1. Expression de *Pabp*D^{exo+} en grand volume en système hétérologue

E.coli

Des précultures du clone de *Pabp*D^{exo+} ont été effectuées successivement dans du LB à 37°C ([Annexe 1](#)) jusqu'à atteindre le volume de production souhaité (6 X 1,5 L). L'induction a été réalisée par addition d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (1 mM) à une DO_{600 nm} de 0,6. Après 3 H 30, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 5000 g pendant 50 min à 4°C. Le culot cellulaire a ensuite été directement utilisé ou stocké à -20°C, avant l'extraction des protéines.

2.2.2. Extraction des protéines

Le culot cellulaire récolté a été resuspendu dans un tampon de broyage (50 mM Tris-HCl (pH 8), 2mM β -mercaptoéthanol, contenant 2 tablettes de Complete-EDTA free (Roche) (=inhibiteurs de protéases)). L'extraction des protéines a alors été réalisée à l'aide de deux passages dans une Presse de French (S.L.M. Aminco®). Une observation au microscope à contraste de phase (Objectif 100X - Olympus BX60) a permis de s'assurer de l'efficacité de la lyse cellulaire. Le lysat cellulaire obtenu a été centrifugé à 9 250 g pendant 45 min à 4°C.

2.2.3. Purification de *PabpolD* *exo+*

Le surnageant, obtenu après l'étape d'extraction des protéines, a été soumis à un choc thermique de 10 min à 75°C. Après une centrifugation à 9 250 g pendant 50 min à 4°C, la protéine recombinante *PabpolD* *exo+*, contenue dans le surnageant, a été purifiée par chromatographie basse pression, à l'aide du système FPLC® (Pharmacia Biotech), en 3 étapes :

2.2.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions

L'extrait enzymatique a été injecté sur une colonne échangeuse d'anions Resource™ 15Q – 150 mL (Amersham Biosciences). La phase mobile est constituée de 2 tampons :

-Tampon d'équilibration A : 50 mM NaP (Phosphate de sodium) (pH 6,5), 1 mM DTT (Dithiothréitol)

-Tampon d'élution B : 50 mM NaP (pH 6,5), 1 mM DTT, 1 M NaCl

L'élution est réalisée avec un gradient linéaire de NaCl (0-100 % de B), à un débit de 1 mL/min.

2.2.3.2. Chromatographie d'affinité

Les fractions actives obtenues sur la colonne précédente ont été déposées sur une colonne HiPrep16/10 Q Heparin FF – 20 mL (Amersham Biosciences), qui constitue une colonne d'affinité pour les ADN polymérases. La phase mobile est constituée de 2 tampons :

-Tampon d'équilibration A : 50 mM NaP (pH 6,5), 1 mM DTT

-Tampon d'élution B : 50 mM NaP (pH 6,5), 1 mM DTT, 1 M NaCl

L'élution de *PabpolD* *exo+* est réalisée avec un gradient linéaire de NaCl (0-100 % de B), à un débit de 1 mL/min.

Les fractions actives recueillies ont été déposées, après dialyse contre le tampon d'équilibration C, sur une colonne HisTrap™ - 5 mL (Amersham Biosciences), permettant de retenir les protéines possédant un tag histidine, ayant une affinité pour le nickel. La phase mobile est constituée de 2 tampons :

-Tampon d'équilibration C : 50 mM NaP (pH 6,5), 1 mM DTT ; 20 mM Imidazole

-Tampon d'élution D : 50 mM NaP (pH 6,5), 1 mM DTT, 500 mM Imidazole

L'élution est réalisée par un gradient linéaire d'Imidazole (0-100 % de D), à un débit de 1 mL/min.

Les fractions actives sont regroupées puis dialysées contre un tampon de conservation (20 mM Tris-HCl (pH 6,5), 1 mM DTT), avant d'être stockées à -20°C , après addition de glycérol (30 %).

2.2.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les protéines ont été dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide du kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad), selon les recommandations du fournisseur. La BSA (Bovin Serum Albumin) sert de standard pour établir une courbe d'étalonnage. Les absorbances sont mesurées à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON 940 (Kontron Instruments).

A partir de cette production (6 X 1,5 L), 12,5 mL de *Pabp*LD^{exo+} à 1,6 mg/mL ont été récoltés, soit au total 20 mg de protéines.

2.2.5. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et révélation

L'échantillon protéique (15 μL) a préalablement été dénaturé pendant 10 min à 100°C , après addition de 7,5 μL de XT Sample Buffer 4X (Biorad) et 1,5 μL de XT Reducing Agent™ (Biorad). Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse en conditions semi-dénaturantes, sur des gels Bis-Tris 12 %, prêts à l'emploi (Criterion™ XT Precast Gel, Biorad), avec le système Criterion (Biorad).

Conditions électrophorétiques :

-Tampon de migration : MOPS 1 X ([Annexe 2](#))

-Migration à voltage constant : 1 H à 200 V

-Marqueur de taille : All Blue – Precision Plus™ Standards 10-250 kD (Biorad)

Les protéines sont révélées après coloration au bleu de Coomassie G250 (Annexe 2).

2.2.6. Récapitulatif des étapes de production et de purification de *PabpolD* *exo+*

L'organigramme ci-dessous récapitule les différentes étapes de production et de purification de *PabpolD* *exo+* (Figure 21). Le principe du test d'activité de la pol est détaillé dans le paragraphe 2.3.4 ci-dessous (Chapitre I).

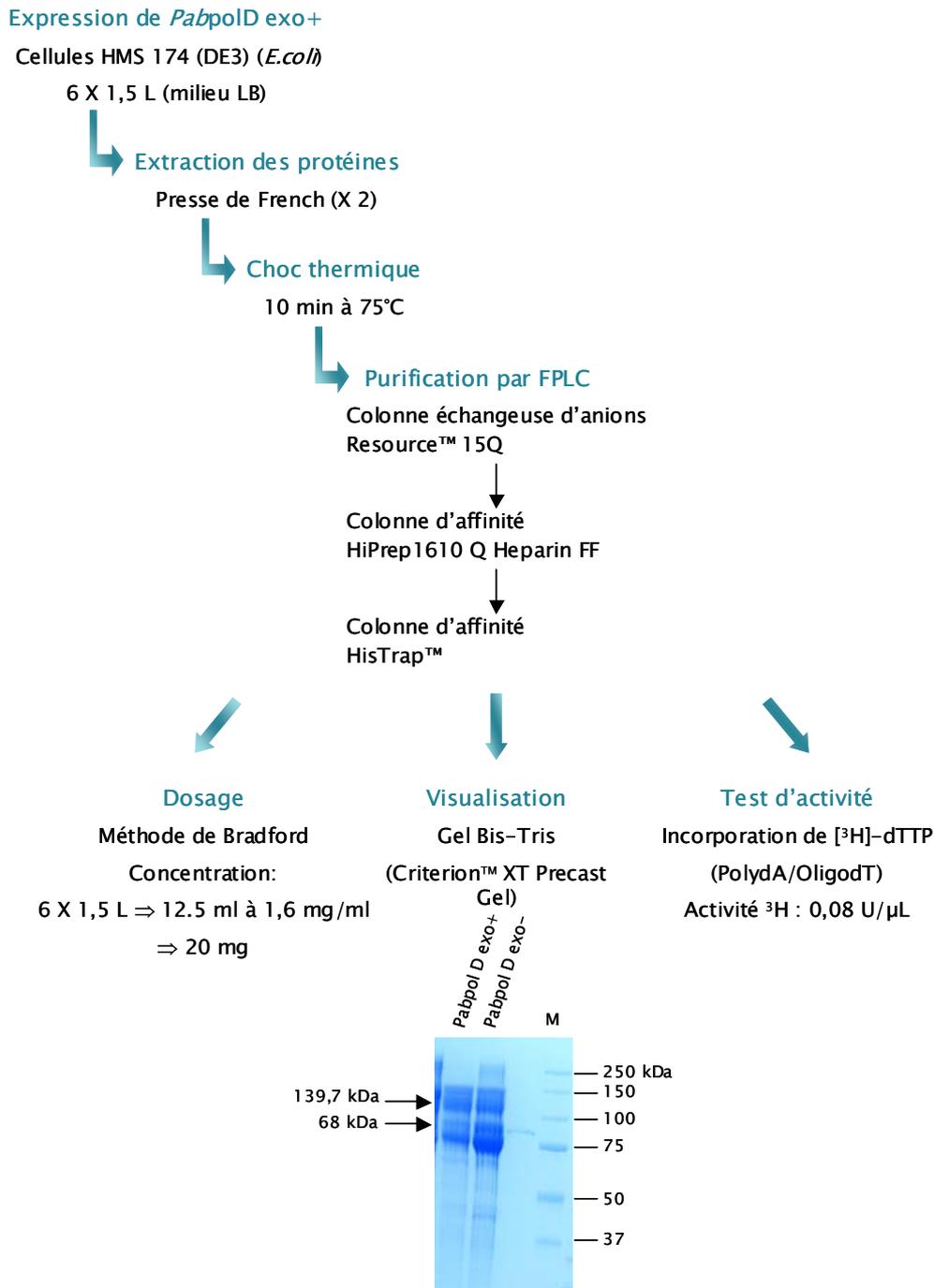


Figure 21 : Stratégie de production et de purification de *PabpolD* *exo+*.

2.3. Caractérisation biochimique des *Pabpols*

2.3.1. Composition des réactions

2.3.1.1. Enzymes

PabpolD exo+ a été clonée, exprimée et purifiée au laboratoire comme décrit ci-dessus. *PabpolB* exo+ a été caractérisée au laboratoire (Gueguen *et al.*, 2001, Dietrich *et al.*, 2002) puis commercialisée par MP Biomedicals sous le nom Isis™ DNA polymerase. Les *Pabpols* ont été diluées, avant utilisation, dans le tampon 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), Glycérol (20 %). Les réactions en présence de *PabpolB* et *PabpolD*, ont été effectuées dans le tampon 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1 mM DTT, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂ (Gueguen *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Substrats nucléiques

➤ dNTPs

Les dNTPs A, T, G, C (MP Biomedicals) ont été utilisés ensemble ou individuellement aux concentrations indiquées.

Le dNTP oxydé, 8-oxo-dGTP (Jena Bioscience), porte un groupement hydroxyle sur le carbone 8, et a été utilisé comme indiqué.

➤ Oligonucléotides

Les différents oligonucléotides utilisés lors de cette étude ont été synthétisés et purifiés par Eurogentec (Belgique) (Tableau 9). Les oligonucléotides 1 (87 mer 8-oxo-dG) et 2 (87 mer 8-oxo-dA) présentent respectivement un groupement hydroxyle sur le carbone 8 de la guanine ou de l'adénine, situé en position 33 (Figure 5). Les oligonucléotides 7, 8, 9 et 10 sont marqués en 5' à la fluorescéine (Voir Chapitre I. 2.3.2 ci-dessous).

Oligonucléotide 1 – 87 mer 8-oxo-dG5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 2 – 87 mer 8-oxo-dA**5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCYTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 3 – 87 mer T**5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 4 – 87 mer A**5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCACTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 5 – 87 mer G**5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCGCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 6 – 87 mer C**5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA – 3'**Oligonucléotide 7 – 17 mer**

5' – TGCCAAGCTTGCATGCC – 3'

Oligonucléotide 8 – 32 mer

5' – TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA – 3'

Oligonucléotide 9 – 33 mer

5' – TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG – 3'

Oligonucléotide 10 – 34 mer

5' – TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGA – 3'

Tableau 9 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.

X et Y représentent respectivement les lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA. Les oligonucléotides 7, 8, 9 et 10 sont marqués en 5' à la fluorescéine.

2.3.2. Marquage des oligonucléotides à la fluorescéine et purification

Les oligonucléotides ont été marqués à leur extrémité 5' à la fluorescéine (Figure 22. A) selon le protocole décrit dans le kit « 5' End Tag Nucleic Acid Labeling system » (Vector Laboratories), laissant l'extrémité 3' libre pour la polymérisation. La réaction s'effectue en 2 étapes (Figure 22. B) : Un groupement phosphate est d'abord transféré de l'ATPγS sur le groupe hydroxyle 5' de l'acide nucléique par la T4 polynucléotide kinase. Après addition du groupe fonctionnel thiol, la fluorescéine maléimide est couplée chimiquement à l'extrémité 5' de l'acide nucléique.

Les amorces marquées ont ensuite été purifiées par chromatographie d'exclusion, sur des colonnes Microspin™ Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), afin d'éliminer l'excès de fluorophores libres.

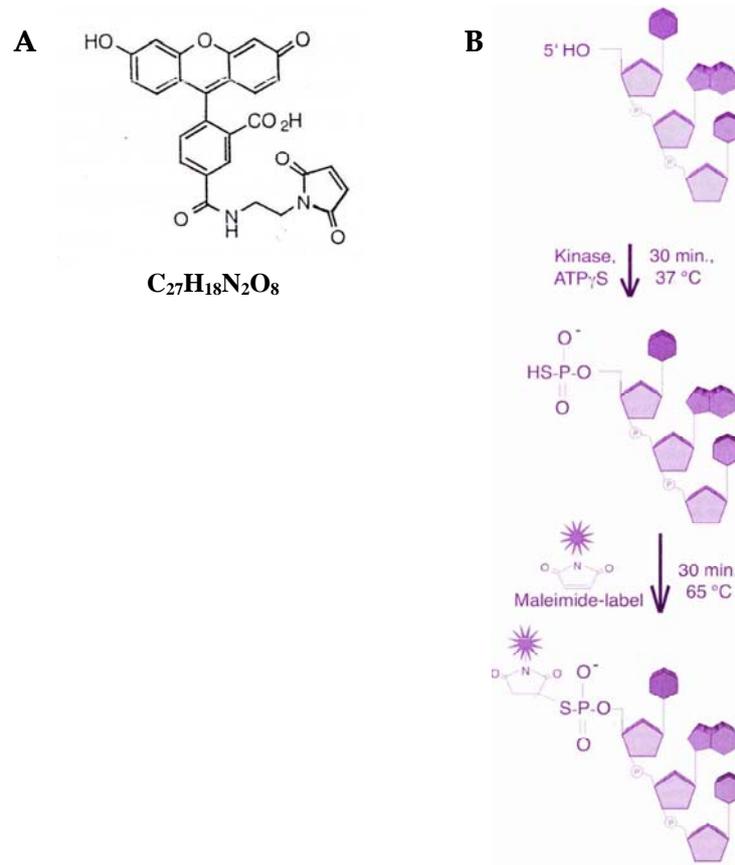


Figure 22: Principe de marquage d'un oligonucléotide en 5' à la fluorescéine, d'après le kit « 5' End Tag Nucleic Acid Labeling system » - Vector Laboratories.

A, Structure de la fluorescéine. B, Marquage en 5' à la fluorescéine.

2.3.3. Hybridation des oligonucléotides

Les différents oligonucléotides ont été hybridés en conditions équimolaires dans 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM NaCl. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 min à 75°C puis refroidit 1 h à température ambiante.

2.3.4. Test d'activité des pols par mesure de l'incorporation de [^3H]-dTTP

Afin de déterminer le taux d'incorporation de dTTP marqué à l'isotope radioactif [^3H], des réactions d'extension d'amorces en présence d'une matrice poly (dA) / oligo (dT) (10 :1) ont été réalisées en présence de la pol, son tampon réactionnel, des dNTPs et du [^3H]-dTTP.

➤ Préparation de la matrice poly (dA) / oligo (dT) (10 :1) à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

poly (dA) 1.5 mg/mL	250 μL
oligo (dT) 1.5 mg/mL	25 μL
20mM Tris-HCl (pH 8)	233,5 μL

Le mélange réactionnel a été incubé pendant 5 min à 65°C, puis 16,5 µL de KCl 1M ont été ajoutés.

➤ Réaction d'extension d'amorces

Tampon d'incubation 10 X de la pol	2 µL
Poly (dA) / oligo (dT) (10 :1) 0,5 µg/ µL	1 µL (0,5 µg)
dNTP 10 mM	0.4 µL (200 µM final)
[³ H]-dTTP (40 à 60 Ci/mmmole)	0.8 µL (32 à 48 Ci/mmmole final)
Eau milliQ	14.8 µL
Pol	1 µL (à concentration souhaitée)
<hr/>	
Vf	20µL

La réaction a été incubée pendant 30 min à 55°C, puis arrêtée sur de la glace durant 5 min.

➤ Précipitation au TCA-PPi

10 µL de mélange réactionnel ont été absorbés sur du papier filtre Whatman GF/C. Ces papiers ont été lavés dans 8 bains successifs de TCA-PPi (5 % (v/v) - 40 mM PPi). Les papiers ont enfin été lavés par 2 bains d'éthanol 95 % successifs et séchés sous une lampe, pendant 1 H.

➤ Comptage par scintillation liquide

Les papiers ont été déposés dans des flacons de comptage contenant 3 mL de liquide scintillant Optifluor[®] O (Perkin Elmer) et comptés en scintillation à l'aide d'un compteur 2000 CA/LL (Packard).

2.3.5. Réactions d'extension d'amorces

2.3.5.1. Conditions réactionnelles

Toutes les réactions d'extension d'amorces ont été effectuées dans un volume final de 15 µl ; elles sont incubées pendant 30 min à 55°C, en présence des *Pabpols*, des matrices ADN amorcées et des dNTPs, respectivement aux concentrations indiquées. Elles sont ensuite bloquées sur de la glace par addition d'un volume de Formamide (98 %), 10 mM EDTA.

2.3.5.2. Séparation des produits réactionnels sur gel de polyacrylamide et révélation

Après 5 min de dénaturation à 95°C, les produits réactionnels marqués à la fluorescéine ont été analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 15 % - Urée 7 M - 6,25 % Formamide (Annexe 2) avec le système Protean®II Xi Cell (Bio-Rad). Ce pourcentage élevé en polyacrylamide est suffisamment résolutif pour visualiser les oligonucléotides du Tableau 9.

Conditions électrophorétiques :

-Tampon de migration : Tris-Borate-EDTA (TBE) 1 X (Annexe 2)

-Migration à voltage constant : 5 H à 300 V

-Marqueur de taille : oligonucléotides mentionnés marqués en 5' à la fluorescéine

La révélation des produits a été réalisée à l'aide du Phospho-fluorimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), avec une excitation à 495 nm via le laser vert et le filtre d'émission 526 SP, correspondant aux spectres de la fluorescéine (Figure 23). Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics®).

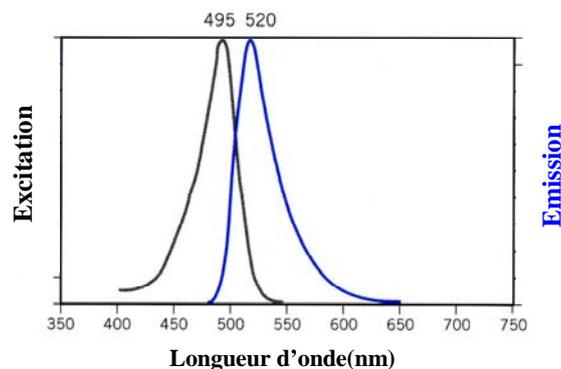


Figure 23 : Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine, d'après Amersham (Amersham, 2000).

III. RESULTATS

3.1. Mesure de la 8-oxo-dG dans le génome de *Pab* et de *E.coli*

3.1.1. Optimisation de la méthode de dosage de la lésion 8-oxo-dG chez *Pab*

3.1.1.1. Optimisation des conditions d'échantillonnage

Afin de mesurer précisément la lésion 8-oxo-dG au sein du génome de *Pab* par HPLC-UV-EC en limitant les phénomènes d'oxydations artéfactuelles des bases azotées, il a été nécessaire d'optimiser les conditions d'échantillonnage. Des mesures préliminaires de la 8-oxo-dG ont donc été effectuées sur des cultures de *Pab* en phase exponentielle, selon 2 modes d'échantillonnage distincts :

- Conditions 1° : Mesure effectuée sur un échantillon obtenu à partir d'une culture en flacon pénicilline, en présence de Na₂S.
- Conditions 2° : Mesure effectuée sur un échantillon obtenu à partir d'une culture en bioréacteur gas-lift en l'absence de Na₂S et conditionné en anaérobie stricte.

Dans un premier temps, le dosage de la lésion 8-oxo-dG/10⁶ dG a été réalisé, selon les conditions 1° (Figure 24. Conditions 1) : 544 lésions 8-oxo-dG/10⁶ dG ont été dénombrées au sein du génome de *Pab*. Ce taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG est relativement élevé par rapport aux taux décrits dans la littérature, chez les eucaryotes et les bactéries (Tableau 3). Cependant, dans les conditions 1°, deux facteurs potentiels pourraient expliquer ce taux élevé :

- l'utilisation de Na₂S entraîne la formation de précipités de métaux lourds, visibles dans les culots cellulaires : ces précipités, collés aux parois cellulaires, pourraient être à l'origine de lésions artéfactuelles lors de l'étape de lyse cellulaire.
- le conditionnement des échantillons depuis le flacon de culture jusqu'au stockage des culots cellulaires a été réalisé en conditions aérobies. Malgré l'arrêt des cultures sur glace, il est possible que les cellules aient subi un léger stress oxydatif induisant des lésions additionnelles.

Ainsi, le taux mesuré dans les conditions 1° ne refléterait pas le taux physiologique chez *Pab* mais plutôt un artéfact de mesure.

Afin de vérifier cette hypothèse, un nouveau mode d'échantillonnage, correspondant aux conditions 2°, a été expérimenté (Figure 24. Conditions 2). Une culture en mode continu de *Pab* a été réalisée en bioréacteur gas-lift (Figure 19). Cette approche offre trois avantages majeurs : ce procédé de culture en grand volume permet de réaliser des prélèvements homogènes, en triplicat (3 X 70 mL environ), à la différence des fioles pénicillines. Le balayage continu à l'azote permet de s'affranchir de l'utilisation du Na₂S. La conception d'une ligne de soutirage spécifique et l'utilisation de tubes à centrifuger étanches au gaz, ont permis un conditionnement anaérobie des échantillons depuis le prélèvement au sein du bioréacteur jusqu'à l'étape de conservation des culots cellulaires à -20°C (Figure 20). Le taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG mesuré dans ces conditions 2° était alors 10 fois inférieur à celui mesuré dans les conditions 1° (Figure 24. Comparer conditions 1 et 2) et corrobore davantage les données de la littérature (Tableau 3).

⇒ En conclusion, l'approche culturale en bioréacteur gas-lift et le conditionnement anaérobie des échantillons sont validés et seront désormais appliqués pour la suite de l'étude.

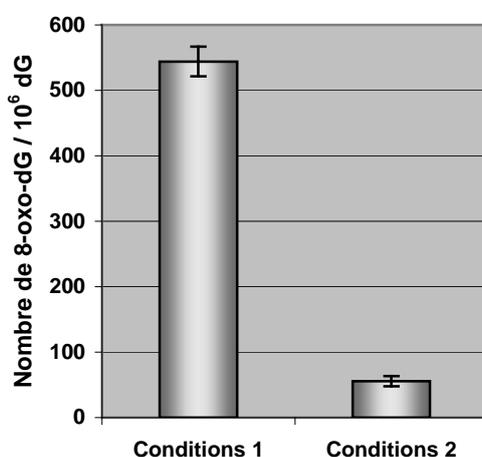


Figure 24: Taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG mesurés chez *Pab* en phase exponentielle, en fonction du mode d'échantillonnage.

Dosage de la 8-oxo-dG/10⁶ dG effectué par HPLC-UV-EC, en présence de 15 µg d'ADN. **Conditions 1°** : Mesure effectuée sur un échantillon obtenu à partir d'une culture en flacon pénicilline, en présence de Na₂S. **Conditions 2°** : Mesure effectuée sur un échantillon obtenu à partir d'une culture en bioréacteur gas-lift en l'absence de Na₂S et conditionné en anaérobie stricte. La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat analytique.

3.1.1.2. Optimisation des conditions de mesure de la 8-oxo-dG par HPLC-UV-EC

➤ Etape d'extraction de l'ADN

Les rendements d'extraction d'ADN génomique obtenus par la méthode chaotrope sont de l'ordre de 5 à 15 μg d'ADN pour $1,2 \times 10^{10}$ cellules en phase exponentielle ou $3,2 \times 10^{10}$ cellules en phase stationnaire ; ils sont donc insuffisants à la réalisation de triplicats pour la plupart des échantillons de *Pab* (Données non montrées). Toutefois, la lyse cellulaire au CTAB, adaptée à l'isolement d'ADN génomique de bactéries Gram- (Park, 2007), est probablement trop douce pour rompre la paroi des cellules d'archaea. Il serait intéressant de la remplacer par une étape de lyse plus robuste, adaptée aux cellules archéennes, selon le protocole classique décrit par Charbonnier *et al.* (Charbonnier *et al.*, 1995).

➤ Etape de dosage de la 8-oxo-dG par HPLC-UV-EC

Les mesures de la 8-oxo-dG dans le génome de *Pab* ont été réalisées en injectant deux quantités d'ADN différentes sur la chaîne HPLC-UV-EC : 10 ou 15 μg . La différence de taux de 8-oxo-dG/ 10^6 dG observée en fonction de la quantité d'ADN injectée n'est pas significative (Test Student $P \gg 0,05$) (Figure 25).

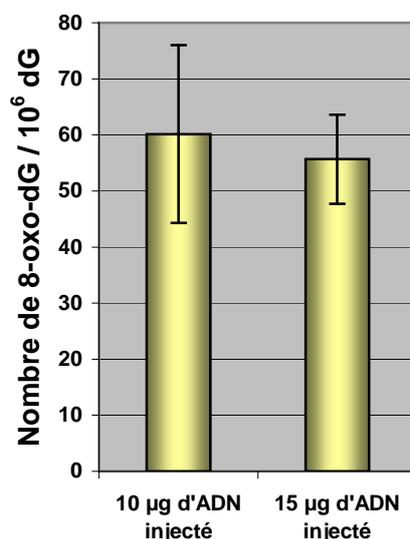


Figure 25 : Taux de 8-oxo-dG/ 10^6 dG mesurés chez *Pab* en phase exponentielle, en fonction de la quantité d'ADN injectée sur la chaîne chromatographique.

Dosage de la 8-oxo-dG/ 10^6 dG effectué par HPLC-UV-EC. La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat analytique.

3.1.2. Dosage de la lésion 8-oxo-dG en fonction du stade de croissance

Afin d'effectuer le dosage de la 8-oxo-dG dans le génome de l'euryarchaea hyperthermophile *Pab* et de la bactérie mésophile *E.coli*, à différents stades de croissance, des suivis ont été réalisés dans les conditions optimales de culture de ces deux microorganismes, en vue de comparaisons (Figure 26). Cependant, alors que le temps de génération habituel de *Pab* est de 35 min (Erauso *et al.*, 1993), celui-ci est de 116 min, soit triple en bioréacteur gas-lift (Figure 26. B). En effet, la technique de lessivage du bioréacteur, permettant d'abaisser la densité cellulaire, induit un léger stress oxydatif chez *Pab* (virage au rose de la rézazurine) et perturbe l'amorçage d'un autre cycle d'expansion. Par conséquent, les prélèvements cellulaires de *Pab* ont été effectués uniquement en phase exponentielle en mode continu puis en phase stationnaire, après passage en mode batch.

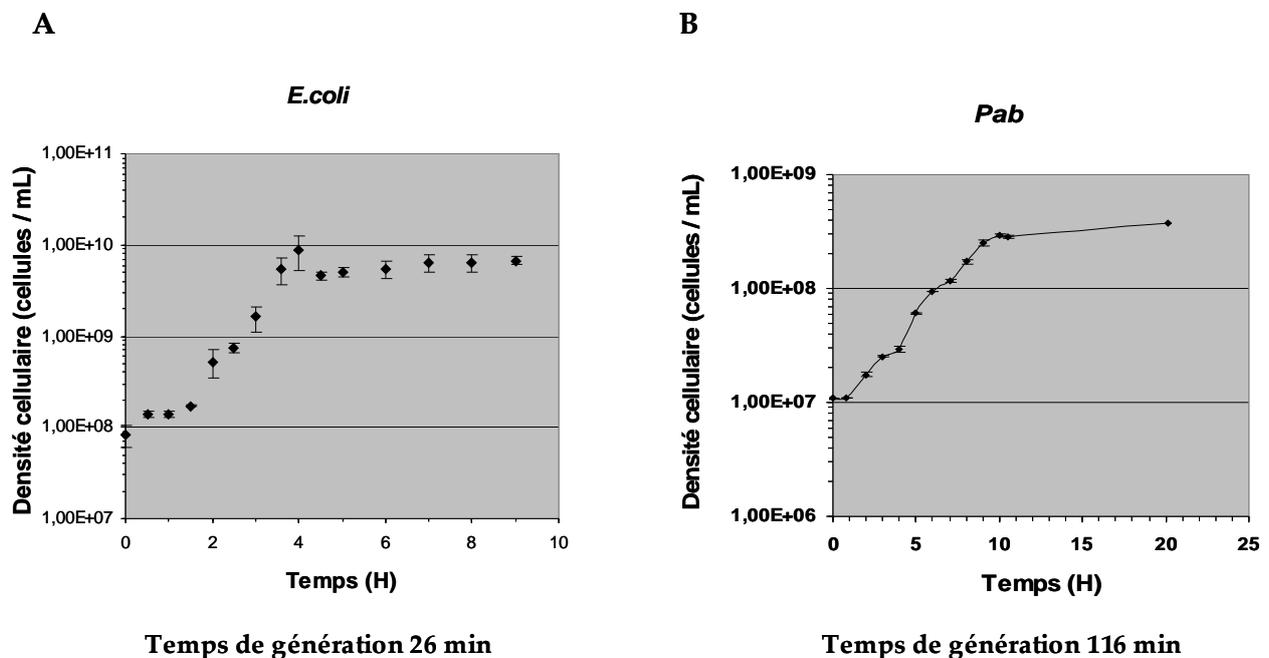


Figure 26 : Suivis de croissance de *Pab* et *E.coli*.

A, Suivi de croissance de *E.coli*. B, Suivi de croissance de *Pab* en bioréacteur gas-lift.

Chez *E.coli*, dans les conditions optimales de croissance, le taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG n'est pas détectable par HPLC-UV-EC, indépendamment du stade de croissance (Figure 27). Ce taux, au seuil de sensibilité de la technique, peut s'expliquer par la faible quantité d'ADN injectée sur la colonne. Toutefois, ces résultats sont parfaitement en accord avec les données publiées sur d'autres bactéries mésophiles aérobie/anaérobies (Tableau 3) (Tajiri *et al.*, 1995, Takeuchi *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 2004). Chez *Pab*, les quantités d'ADN extraites ont permis de

réaliser des mesures uniquement en phase exponentielle. Par comparaison à *E.coli*, le génome de *Pab* semble posséder un plus fort taux basal de 8-oxo-dG/10⁶ dG, avoisinant les 60 pour 10 µg d'ADN injecté (Figure 27). Toutefois, ce résultat n'est que préliminaire et mérite d'être confirmé sur un plus grand nombre d'échantillons.

⇒ Globalement, l'existence de lésions 8-oxo-dG au sein du génome de *Pab* a ainsi été démontrée, ce qui renforce ainsi l'étude des propriétés translésionnelles des *Pab*pols en présence de matrices contenant des lésions oxydatives.

	Stade de croissance	Quantité d'ADN injectée (µg)	Nombre de 8-oxo-dG / 10 ⁶ dG
<i>E.coli</i>	Phase exponentielle	10	ND
		15	ND
	Phase stationnaire	10	ND
		15	ND
<i>Pab</i>	Phase exponentielle	10	60,15±5,86
		15	55,67±7,95
	Phase stationnaire	10	
		15	

Figure 27 : Taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG mesurés chez *Pab* et *E.coli*, en fonction du stade de croissance.

Dosage de la 8-oxo-dG/10⁶ dG effectué par HPLC-UV-EC. ND : Non Détectable en réalisant des triplicats analytiques sur 2 échantillons. Écart-type d'un triplicat analytique. Les cases barrées n'ont pas été analysées.

3.1.3. Influence d'un stress oxydatif chez *Pab*

L'euryarchaea hyperthermophile *Pab* présente une forte sensibilité à l'oxygène (Erauso *et al.*, 1993). Afin d'étudier la réponse de *Pab* à un stress oxydatif, la culture en bioréacteur a été passée en mode batch, et balayée à l'air pendant 5 min. Le passage à la couleur rose de la résazurine (Eh ~ -70 mV) permet de confirmer l'état oxydé du milieu. Si le balayage gazeux à l'air n'a duré que 5 min, le milieu est resté à l'état oxydé durant 25 min, soit 20 min après le retour du balayage gazeux à l'azote. Un dénombrement des cellules viables à différents temps (T) a été réalisé dans le but d'évaluer l'influence de l'oxygène sur la viabilité cellulaire de *Pab* (Figure 28).

Après 5 min de balayage à l'air de la culture de *Pab* en bioréacteur, le titre de cellules viables chute rapidement : seulement 8 % des cellules sont encore viables (Figure 28. T1). Ce pourcentage diminue fortement 40 min après le stress oxydatif : seulement 0,04 % de la population initiale est encore viable (Figure 28. T2). Toutefois, 320 min après le stress, une petite partie de la population est résistante à l'oxygène (0,78 %) et survit (Figure 28. T4) : le titre de cellules viables se stabilise autour de 7×10^5 cellules/mL. Après T4 (Figure 28), le milieu nutritif est de nouveau apporté en continu dans le but d'initier un nouveau cycle d'expansion : 24 H après stress, la culture est en phase exponentielle, à une densité cellulaire d'environ $1,5 \times 10^7$ cellules/mL.

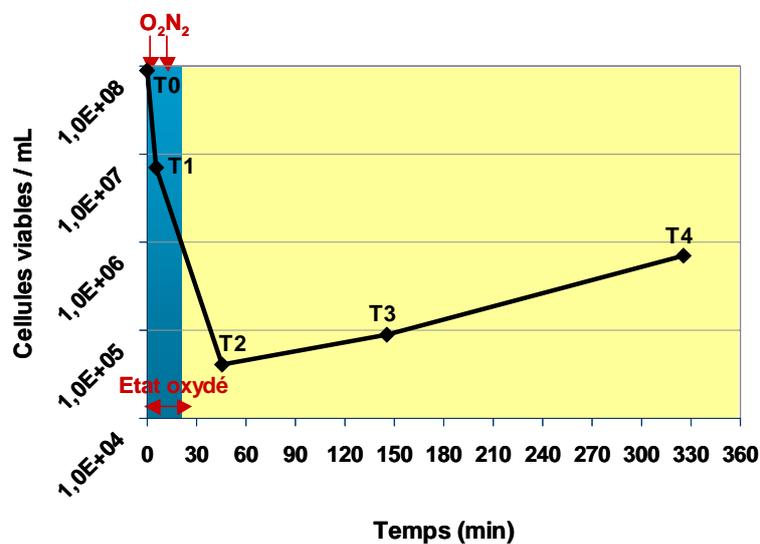


Figure 28 : Influence d'un stress oxydatif sur la viabilité cellulaire de *Pab*.

T0, Avant stress. T1, Après 5 min de stress oxydatif. T2, 40 min après stress. T3, 140 min après stress. T4, 320 min après stress.

Parallèlement, afin d'étudier l'effet génotoxique du stress oxydatif au sein du génome de *Pab*, le taux de 8-oxo-dG/ 10^6 a été mesuré aux différents temps T après exposition au stress (Figure 29). Ce taux triple immédiatement après 5 min de stress (Figure 29. Comparer T0 et T1) ; cette augmentation est corrélée à une diminution importante de la survie cellulaire (8 %). Étonnamment, un retour au taux basal de 8-oxo-dG/ 10^6 est observé 140 min après le stress (Figure 29. T3 et T4), et s'accompagne d'une reprise de la croissance cellulaire dans le bioréacteur, après 320 min de stress (Figure 29. T4). Toutefois, ces résultats préliminaires restent à confirmer à cause du trop faible nombre d'échantillons analysés (d'où l'absence de barre d'erreur).

⇒ Il semblerait que *Pab* soit capable de lutter contre les effets génotoxiques induits par un stress oxydatif.

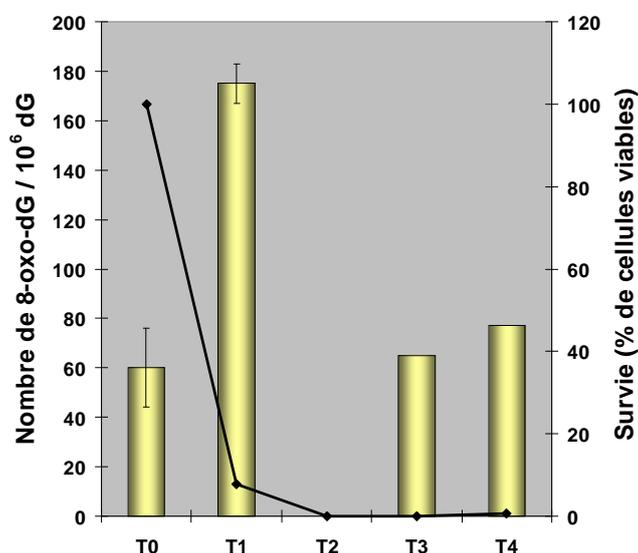


Figure 29 : Influence d'un stress oxydatif sur le taux de 8-oxo-dG/10⁶ dG et la viabilité cellulaire de *Pab*. Dosage de la 8-oxo-dG/10⁶ dG effectué par HPLC-UV-EC, en présence de 10 µg d'ADN. La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat analytique. T0, Avant stress. T1, après 5 min de stress oxydatif. T2, 40 min après stress. T3, 140 min après stress. T4, 320 min après stress.

3.2. Caractérisation fonctionnelle des *Pab*pols en présence de matrices ADN endommagées contenant une lésion oxydative unique et d'un dNTP oxydé

3.2.1. Gamme de concentration des *Pab*pols

Avant d'étudier les propriétés translésionnelles des *Pab*pols en présence de matrices ADN présentant des dommages oxydatifs ou de dNTPs oxydés, il a été nécessaire de déterminer les conditions optimales de réaction d'extension d'amorces des *Pab*pols, en présence d'une concentration fixe de la matrice ADN non endommagée 3/7 et de dNTPs, et d'une concentration croissante en enzyme (Tableau 9 et Figure 30). Les *Pab*pols sont capables de répliquer totalement la matrice ADN, pour de très faibles concentrations en enzyme, de l'ordre de 6,6 nM et 3,3 nM, respectivement pour *Pab*polD et *Pab*polB (Figure 30. A, piste 2 et B, piste 2, respectivement).

Lors de cette étude, l'ensemble des réactions d'extension d'amorces ont donc été réalisées ainsi :

-*PabpolD* : 33,3 nM de matrice ADN ; 200 μ M de dNTPs ; concentrations en *PabpolD* comprises entre 6,6 et 73,3 nM (Figure 30. A).

-*PabpolB* : 8,3 nM de matrice ADN ; 200 μ M de dNTPs ; concentrations en *PabpolB* comprises entre 3,3 et 33,3 nM (Figure 30. B).

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA-3' 87 mer
3'-CCGTACGTTCGAACCGT-5' 17 mer

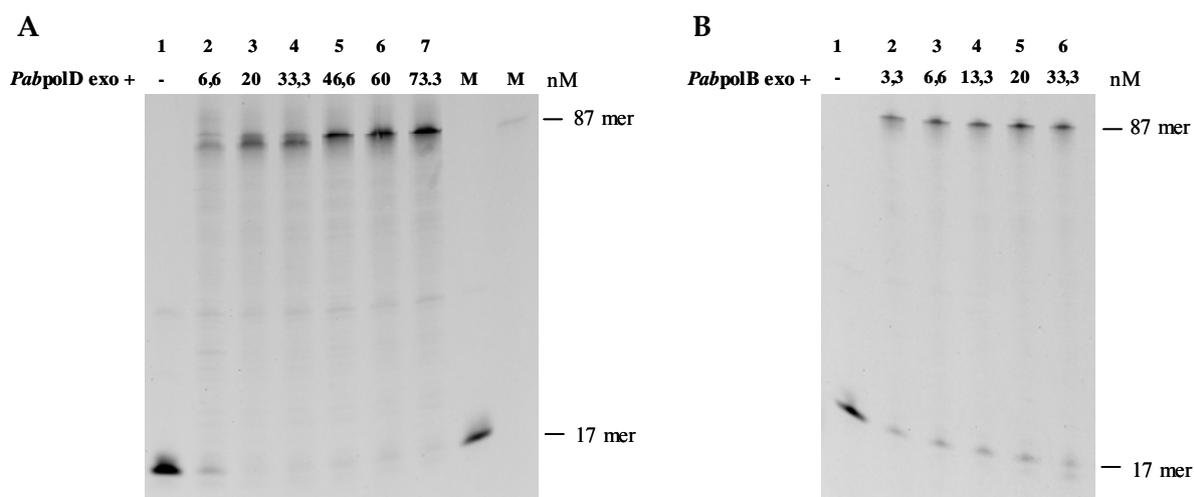


Figure 30 : Réplication d'une matrice ADN non endommagée en présence de quantités croissantes de *Pabpols*. Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. M : Marqueur de taille. **A**, Réaction en présence de *PabpolD* aux concentrations indiquées, de 33,3 nM de matrice ADN 3/7 et de 200 μ M de dNTPs ; 55°C - 30 min. **B**, Réaction en présence de *PabpolB* aux concentrations indiquées, de 8.3 nM de matrice ADN 3/7 et de 200 μ M de dNTPs ; 55°C - 30 min.

3.2.2. Activité polymérasique des *Pabpols* en présence d'un oligonucléotide contenant une lésion unique 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA en une position définie

Des réactions d'extension d'amorces ont été réalisées, en conditions dites « Running start » en présence de :

-l'oligonucléotide 1 contenant une lésion 8-oxo-dG unique hybridé à l'amorce 7 (1/7) (Tableau 9).

ou

-l'oligonucléotide 2 contenant une lésion 8-oxo-dA unique hybridé à l'amorce 7 (2/7) (Tableau 9).

8-oxo-dG

★

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA-3' 87 mer
3'-CCGTACGTTCGAACCGT-5' 17 mer

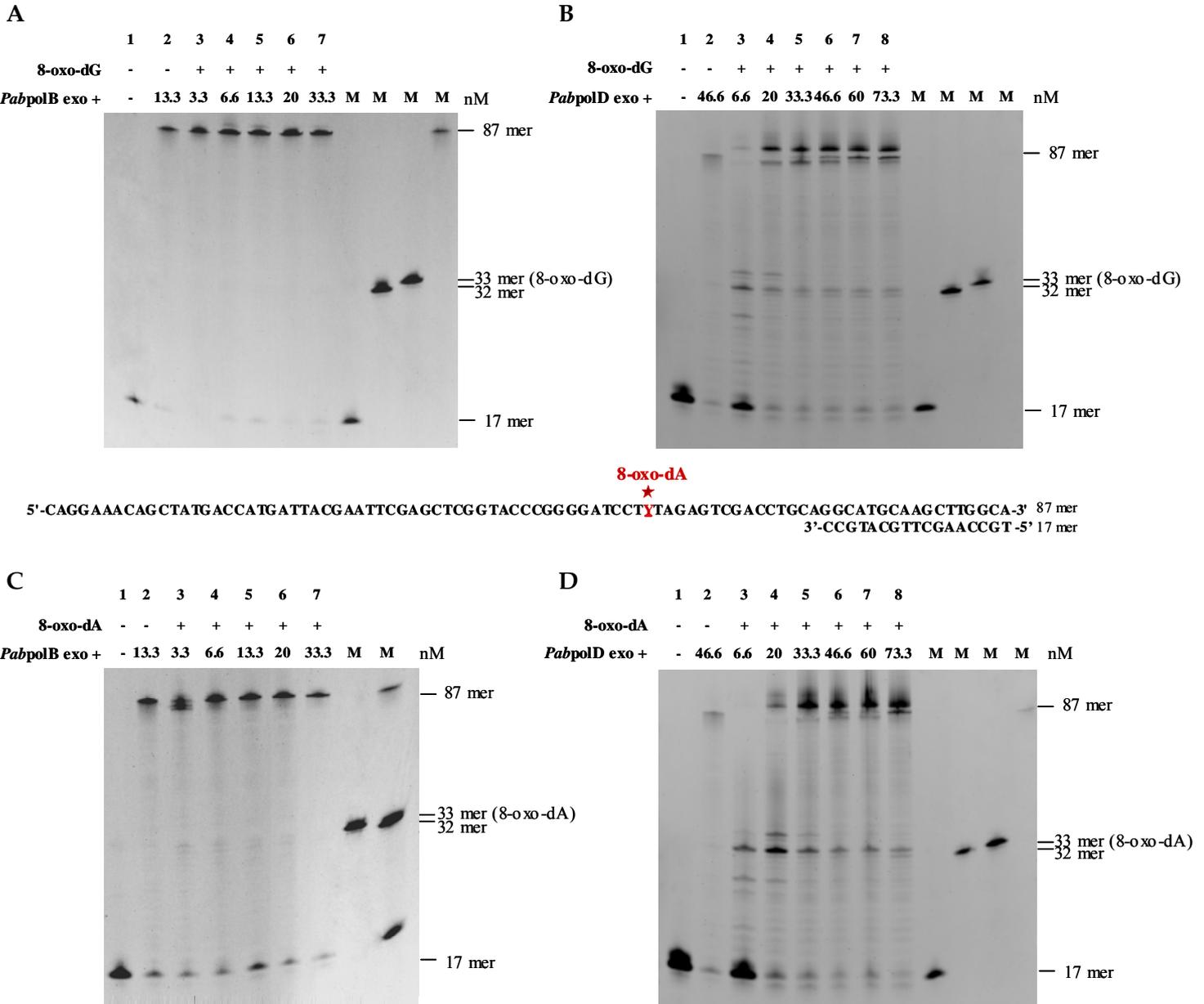


Figure 31: Réplication d'une matrice ADN contenant une lésion 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA en présence de quantités croissantes de *Pabpols*.

Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. M : Marqueur de taille. **A et C**, Réaction en présence de *PabpolB* aux concentrations indiquées, de 8,3 nM de matrice ADN endommagée 1/7 et 2/7 respectivement et de 200 µM de dNTPs ; 55°C - 30 min. Les pistes 1 et 2 sont les contrôles positifs avec 13,3 nM de *PabpolB* et 8,3 nM de matrice ADN non endommagée 3/7. X représente la position de la lésion 8-oxo-dG. **B et D**, Réaction en présence de *PabpolD* aux concentrations indiquées, de 33,3 nM de matrice ADN endommagée 1/7 et 2/7 respectivement et de 200 µM de dNTPs ; 55°C - 30 min. Les pistes 1 et 2 sont les contrôles positifs avec 46,6 nM de *PabpolD* et 33,3 nM de matrice ADN non endommagée 3/7. Y représente la position de la lésion 8-oxo-dA.

D'une part, lors de la réplication de la matrice ADN 1/7 contenant une lésion 8-oxo-dG en présence de *PabpolB*, une bande de la taille d'un 87 mer, correspondant à la matrice totalement dupliquée, est observée pour toutes les quantités d'enzyme testées (Figure 31. A, pistes 3 à 7). *PabpolB* franchit donc efficacement la lésion 8-oxo-dG, indépendamment de la quantité d'enzyme utilisée, lors de cette étude. Un résultat similaire a été obtenu dans un autre contexte nucléotidique, en présence d'une matrice de 72 mer (résultats non montrés). Comparativement à *PabpolB*, pour les faibles concentrations en enzyme, *PabpolD* est davantage bloquée par le dommage oxydatif, comme en attestent les bandes de 32 mer et de 33 mer correspondant au blocage de l'enzyme avant ou lors de l'incorporation (Figure 31. Comparer A, pistes 3-4 à B, pistes 3-4, pour *PabpolB* et *PabpolD* respectivement). En revanche, pour des rapports enzyme/matrice ADN égaux ou supérieurs à 1, *PabpolD* franchit le dommage (Figure 31. B, pistes 5 à 8). Ainsi, la capacité de *PabpolD* à franchir la lésion 8-oxo-dG est davantage dépendante de la concentration en enzyme que pour *PabpolB*. D'autre part, en présence de la matrice ADN 2/7 contenant une lésion 8-oxo-dA, les *Pabpols* présentent un comportement similaire à celui observé en présence de la lésion 8-oxo-dG (Figure 31. Comparer les profils A-B à C-D, respectivement). Néanmoins, aux faibles concentrations en enzyme, *PabpolB* est très légèrement bloquée alors que *PabpolD* marque un arrêt significatif après l'incorporation d'un nucléotide face à la lésion 8-oxo-dA (Figure 31. C, pistes 3-4 et D, pistes 3-4, respectivement). Les *Pabpols* semblent donc franchir plus difficilement la lésion 8-oxo-dA (Figure 31. Comparer respectivement A, pistes 3-4 à C, pistes 3-4 et B, pistes 3-4 à D, pistes 3-4).

Étonnamment, lors de l'élongation des matrices ADN 1/7 et 2/7, par *PabpolD*, au lieu d'observer une seule bande d'ADN aux environs de 87 mer, plusieurs bandes extrêmement proches sont visualisées sur les profils électrophorétiques (Figure 31. B, pistes 4 à 8 et D, pistes 4 à 8): la bande de forte intensité d'une taille supérieure à 87 mer pourrait correspondre à un glissement +1 de la pol sur la matrice ADN alors que la bande de faible intensité d'une taille inférieure au 87 mer pourrait être un glissement -1. De même, avec *PabpolB* en présence de la matrice 2/7, des bandes de taille inférieure au 87 mer pourraient témoigner d'un glissement -1 et/ou -2 de la pol (Figure 31. C, piste 3). Cependant, ces hypothèses sont à prendre avec précaution car la résolution du gel est insuffisante pour conclure.

⇒ En conclusion, si *PabpolD* semble être légèrement plus sensible à la présence des lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA, les deux *Pabpols* franchissent toutefois efficacement ces dommages oxydatifs.

3.2.3. Incorporation préférentielle de dNTPs par les *Pabpols* face aux lésions oxydatives 8-oxo-dG et 8-oxo-dA

La suite de l'étude a consisté à déterminer le type de nucléotide incorporé en face des deux lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA par les *Pabpols*. Pour cela, des réactions d'extension d'amorces ont été réalisées en conditions « Standing Start », en présence de :

-l'oligonucléotide 1 contenant une lésion 8-oxo-dG unique hybridé à l'amorce 8 (1/8) (Tableau 9).

ou

-l'oligonucléotide 2 contenant une lésion 8-oxo-dA unique hybridé à l'amorce 8 (2/8) (Tableau 9).

L'extrémité 3' de l'amorce est alors située juste en amont de la lésion 8-oxo-dG (Tableau 9). Dans ce cas, le premier nucléotide à être lu par la pol est la base endommagée 8-oxo-dG.

3.2.3.1. Incorporation préférentielle de dNTPs face à la lésion 8-oxo-dG

PabpolD insère un dCMP (59 %) en face de la lésion 8-oxo-dG, créant un appariement « légitime » de type Watson et Crick 8-oxo-dG•dCMP (Figure 32. A, pistes 16 à 18 et C). Cependant, le pourcentage d'incorporation de dAMP (71 %) est plus élevé comme si *PabpolD* favorisait la formation d'une paire de base illégitime 8-oxo-dG•dAMP (Figure 32. A, pistes 4 à 6 et C). Il est intéressant de souligner que *PabpolD* est également capable d'incorporer dans une moindre mesure un dTMP (26 %) et un dGMP (15 %) (Figure 32. A, pistes 7 à 9 et 13 à 15 respectivement, et C). En revanche, *PabpolB* n'insère qu'un dAMP (58 %) en face de la lésion 8-oxo-dG, privilégiant la formation d'une paire de base illégitime 8-oxo-dG•dAMP (Figure 32. B, pistes 3 à 5 et C). A la différence de *PabpolD*, son activité exonucléasique empêche l'incorporation d'un dTTP, dGTP ou dCTP face à la lésion 8-oxo-dG, comme l'atteste l'accumulation de plusieurs bandes d'une taille inférieure à celle de l'amorce 8 (32 mer) (Figure 32.B, pistes 6 à 14). Néanmoins, la fonction de correction d'erreur de *PabpolB* ne permet pas de prévenir l'incorporation du dAMP. Enfin, les *Pabpols*

sont capables d'incorporer plusieurs dAMP en aval de la lésion, par complémentarité avec les deux dTMP en 5' de la lésion (Figure 32. A, pistes 4 à 6 ; B, pistes 3 à 5).

⇒ En conclusion, les *Pab*pols franchissent la lésion 8-oxo-dG en incorporant majoritairement un dAMP.

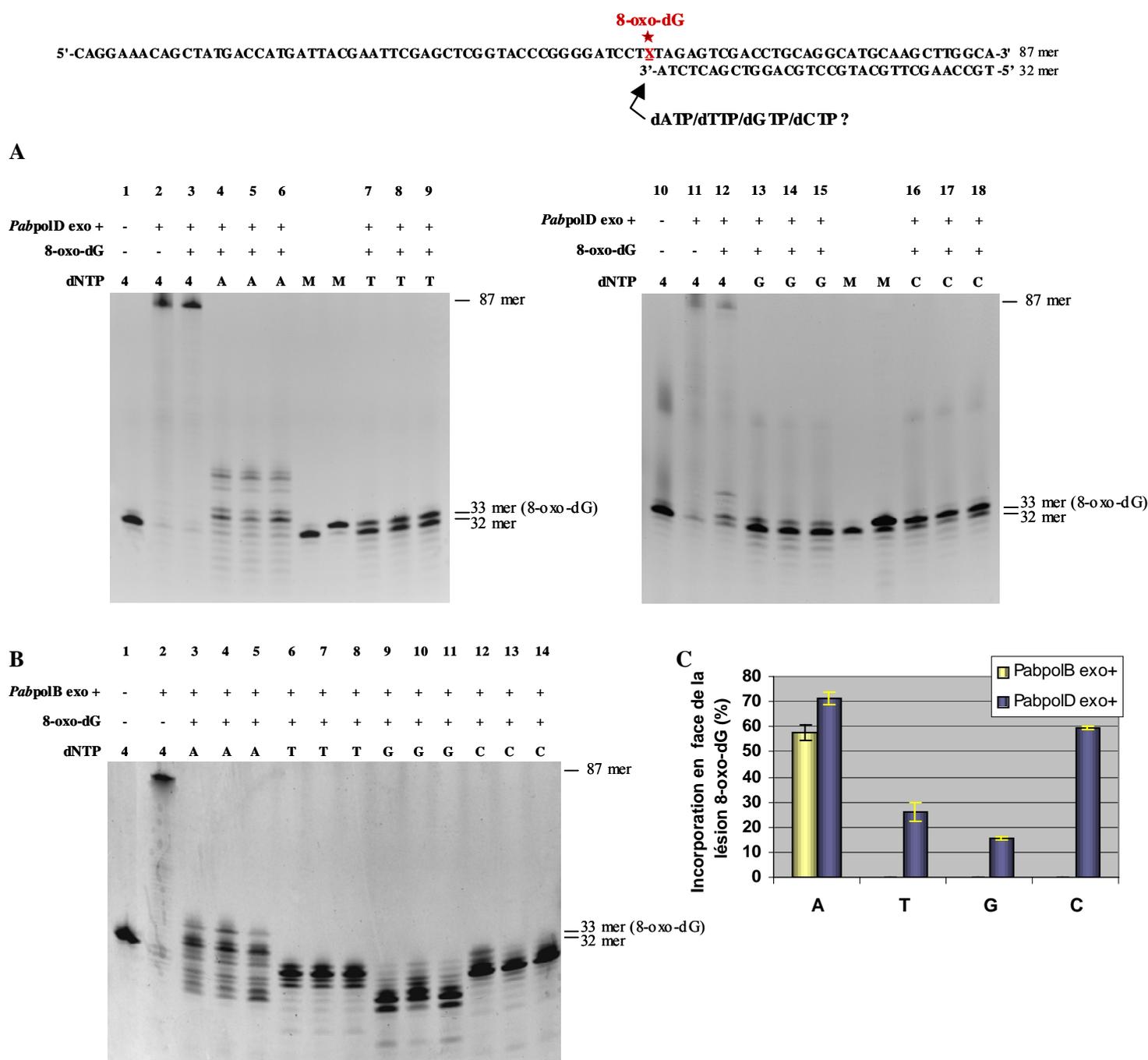


Figure 32 : Incorporation préférentielle de dNTPs par les *Pabpols* face à la lésion 8-oxo-dG.

A et B, Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. X représente la position de la lésion 8-oxo-dG. M : Marqueur de taille. 4 : 200 μ M de dNTPs A, T, G, C. **A**, Réaction en présence de 46,6 nM *PabpolD*, de 33,3 nM de matrice ADN endommagée 1/8 et de 200 μ M des 4 dNTPs individuellement ; 55°C - 30 min. Les pistes 2-11 et 3-12 sont les contrôles positifs avec 46,6 nM de *PabpolD* et 33,3 nM de matrice ADN 1/8 et 3/8 respectivement. **B**, Réaction en présence de 13,3 nM *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN endommagée 1/8 et de 200 μ M des 4 dNTPs individuellement ; 55°C - 30 min. La piste 2 est le contrôle positif avec 13,3 nM de *PabpolB* et 8,3 nM de matrice ADN non endommagée 3/8. **C**, Quantification des données obtenues en A et B, à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat.

3.2.3.2. Incorporation préférentielle de dNTPs face à la lésion 8-oxo-dA

En face de la lésion 8-oxo-dA, *PabpolD* insère majoritairement un dTMP (61 %) selon les règles classiques d'appariement (Figure 33. A, pistes 6 à 8 et C). En revanche, les pourcentages d'incorporation montrent que *PabpolD* est capable d'insérer, dans des proportions identiques, un dAMP (63 %) en face de ce dommage, aboutissant à la création d'un appariement illégitime 8-oxo-dA•dAMP. Elle incorpore également, de façon illégitime, un dGMP en face de la lésion 8-oxo-dA dans une moindre mesure (29 %) (Figure 33. A, et C). La fonction exonucléasique de *PabpolD* ne permet donc pas d'éviter la formation de ces mésappariements.

A contrario, *PabpolB* n'insère étonnamment aucun nucléotide face à la lésion 8-oxo-dA (Figure 33. B), bien qu'elle soit capable de franchir ce dommage en conditions « Running Start » (Figure 31. C). L'une des hypothèses consiste à dire que l'activité exonucléasique est davantage stimulée lorsque *PabpolB* est directement confrontée à l'obstacle en conditions « Standing Start », comme l'atteste le contrôle positif (Figure 33. B, piste 2). Parallèlement, il n'est pas exclu qu'un glissement de la pol ait lieu lors de la TLS du dommage oxydatif (Figure 33. C, piste 3). Il n'est donc pas possible de conclure quant au caractère mutagène de la lésion 8-oxo-dA lorsque celle-ci est franchie par *PabpolB*.

⇒ En conclusion, bien que *PabpolB* n'ait pas été capable d'incorporer un dNTP en face de la lésion 8-oxo-dA dans ces conditions expérimentales, des mésappariements ont été générés par *PabpolD*.

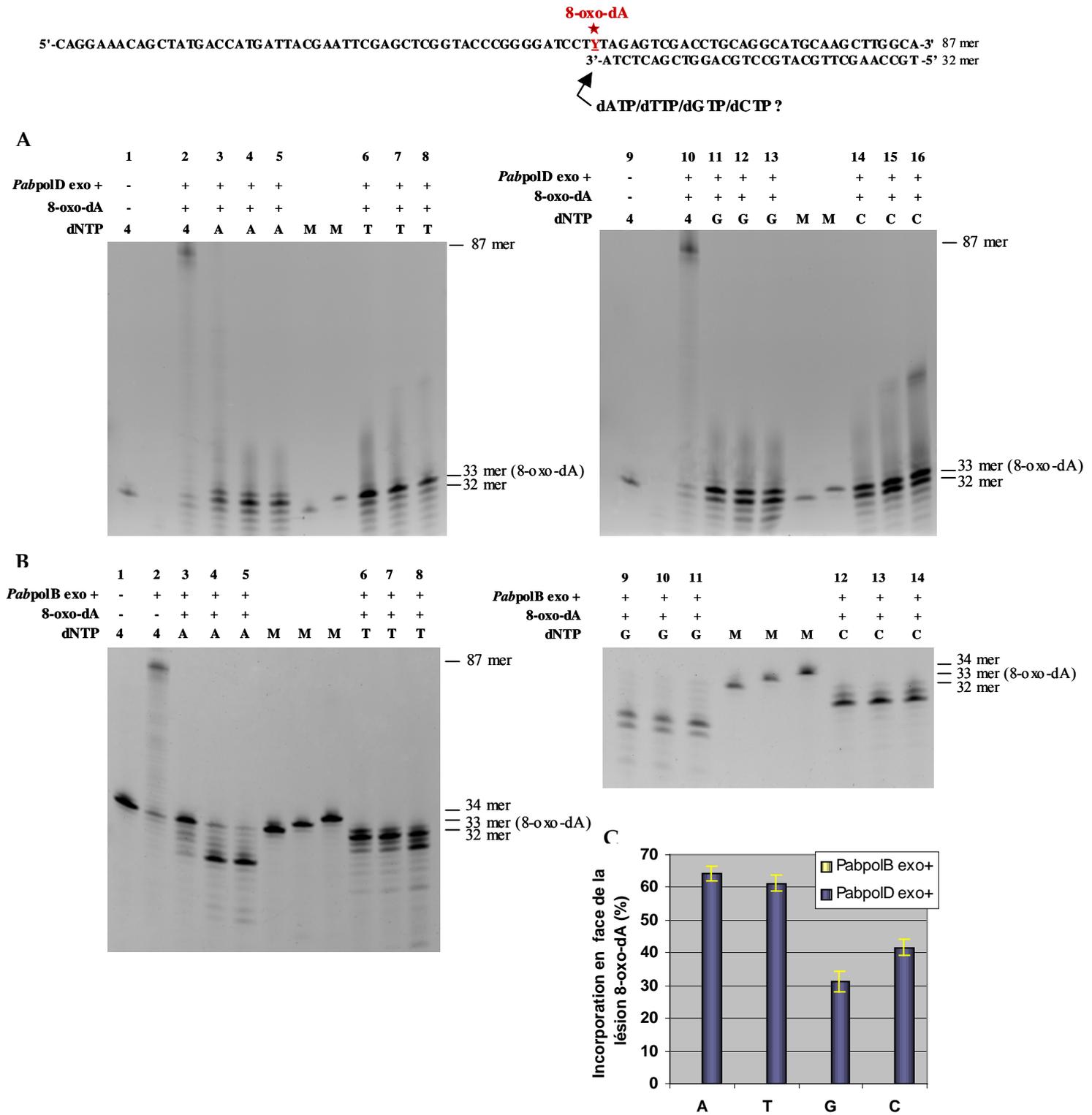


Figure 33 : Incorporation préférentielle de dNTPs par les *Pabpols* face à la lésion 8-oxo-dA.

A et B, Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. Y représente la position de la lésion 8-oxo-dA. M : Marqueur de taille. **A**, Réaction en présence de 46,6 nM *PabpolD*, de 33,3 nM de matrice ADN endommagée 2/8 et de 200 µM des 4 dNTPs individuellement ; 55°C - 30 min. Les pistes 2 et 10 sont les contrôles positifs avec 46,6 nM de *PabpolD* et 33,3 nM de matrice ADN non endommagée 3/8. **B**, Réaction en présence de 13,3 nM *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN endommagée 2/8 et de 200 µM des 4 dNTPs individuellement ; 55°C - 30 min. La piste 2 est le contrôle positif avec 13,3 nM de *PabpolB* et 8,3 nM de matrice ADN non endommagée 3/8. **C**, Quantification des données obtenues en A et B, à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat.

3.2.4. Incorporation préférentielle du 8-oxo-dGTP par les *Pab*pols

Si des ROS peuvent induire l'apparition de lésions oxydatives dans le génome de *Pab*, elles peuvent aussi être à l'origine d'oxydation du « pool » de dNTPs, conduisant par exemple à la formation de 8-oxo-dGTP. Si ce dNTP oxydé échappe aux mécanismes de surveillance, il est possible que les pols l'incorporent lors de la réplication de l'ADN. Nous avons donc voulu savoir si les *Pab*pols étaient capables d'incorporer un 8-oxo-dGTP en face de l'un des 4 dNTPs. Pour cela, des réactions d'élongation ont été effectuées en présence des matrices 3 (dN=T), 4 (dN=A), 5 (dN=G) ou 6 (dN=C) non endommagées, hybridées à l'amorce 9 de telle sorte que le premier nucléotide à être lu par la pol soit respectivement un A, T, G ou C (Tableau 9 et Figure 34).

Cette expérience a permis de montrer que *PabpolD* et *PabpolB* insèrent le 8-oxo-dGTP en face du C>A>G>T (Figure 34). Les pourcentages d'incorporation du 8-oxo-dGTP par *PabpolD* et *PabpolB*, sont très faibles en face du T (0 % et 1 % respectivement) et du G (4 % et 5 % respectivement) (Figure 34. A, pistes 6 à 8, pistes 11 à 13 et B, pistes 6 à 8, pistes 9 à 11, et Fig C). La fonction exonucléasique, comme attendu, semble freiner la formation d'appariements illégitimes. En revanche, *PabpolD* et *PabpolB* insèrent le 8-oxodGTP majoritairement en face du C (48 % et 39,5 % respectivement) selon un appariement de type Watson et Crick mais aussi en face du A (30 et 10 % respectivement) de façon illégitime (Figure 34. A, pistes 14 à 16, pistes 3 à 5 et B, pistes 12 à 14, pistes 3 à 5, respectivement et Figure 34. C).

Cependant, il semblerait que le contexte nucléotidique ait influencé les *Pab*pols à incorporer de façon illégitime le dNTP oxydé face aux bases azotées A, T, G et C, comme en témoignent les bandes correspondant à l'incorporation du 8-oxo-dGTP situées au-delà du 34^{mer} (positions 35 et 36) (Figure 34. A et B).

⇒ En conclusion, les *Pab*pols incorporent correctement le 8-oxodGTP face au C mais incorporent aussi de façon illégitime ce dNTP oxydé face au A.

5'-CAGGAAA CAGCTATGACCATGATTACG AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGA TCC **N**CTAGAGTCGACCTG CAGG CATGCAAGCTTGGCA-3' 87 mer
 3'-GATCTCAGCTGGACGTCCGTACG TTCGAAACCGT-5' 33 mer

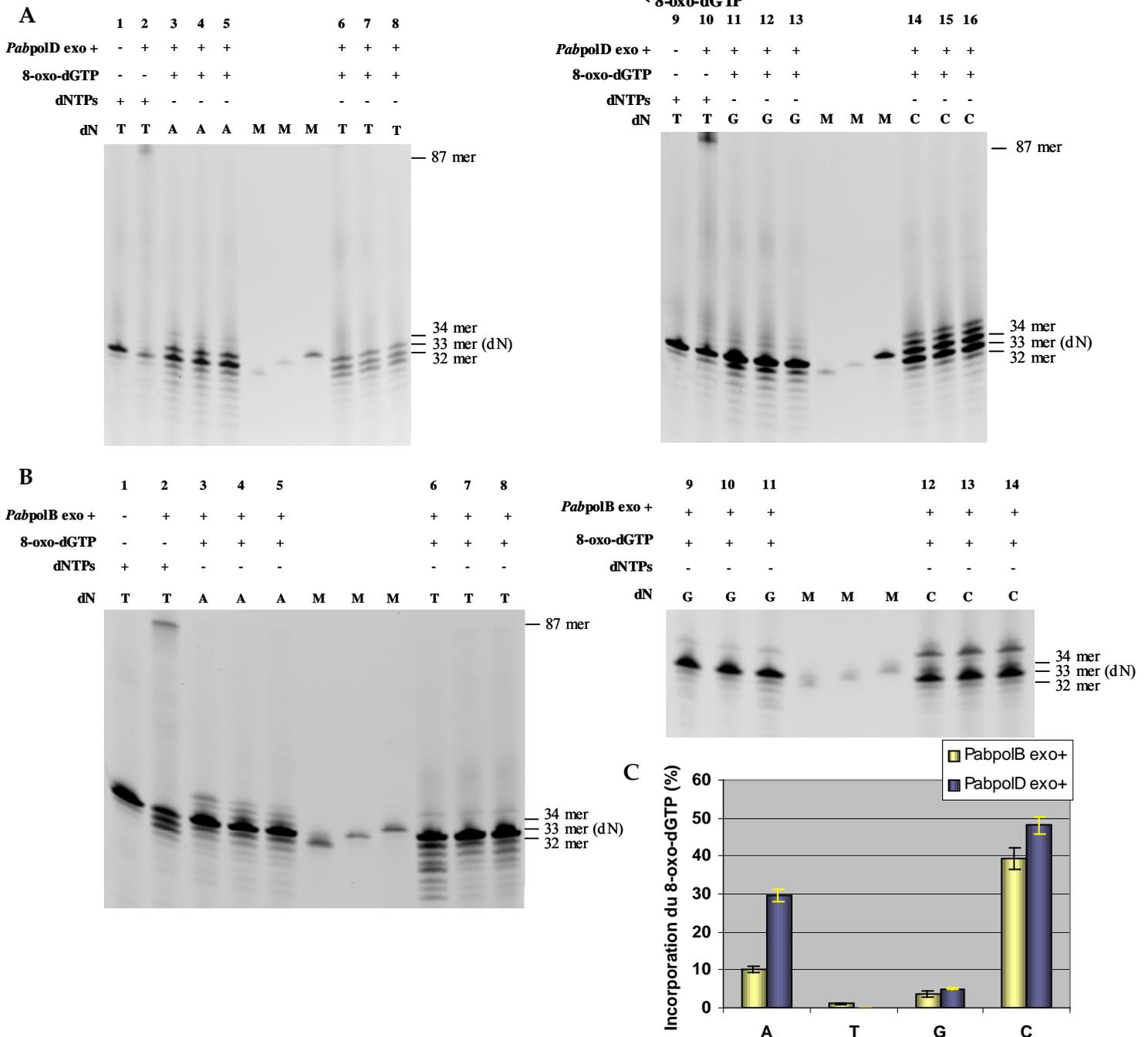


Figure 34 : Incorporation du 8-oxo-dGTP par les *Pabpols* face à un A, T, G ou C.

A et B, Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. M : Marqueur de taille. **A**, Réaction en présence de 46,6 nM *PabpolD*, de 33,3 nM de matrice ADN endommagée 3/9 (dN=T) ou 4/9 (dN=A) ou 5/9 (dN=G) ou 6/9 (dN=C) et de 200 µM de 8-oxo-dGTP ; 55°C - 30 min. Les pistes 2 et 10 sont les contrôles positifs avec 46,6 nM de *PabpolD*, de 33,3 nM de matrice ADN 3/9 et 200 µM des 4 dNTPs. **B**, Réaction en présence de 13,3 nM *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN endommagée 3/9 (dN=T) ou 4/9 (dN=A) ou 5/9 (dN=G) ou 6/9 (dN=C) et de 200 µM de 8-oxo-dGTP ; 55°C - 30 min. Les pistes 2 et 10 sont les contrôles positifs avec 13,3 nM de *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN 3/9 et 200 µM des 4 dNTPs. **C**, Quantification des données obtenues en A et B, à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). La barre d'erreur correspond à l'écart type d'un triplicat.

3.2.5. Activité polymérasique de *PabpolB* en présence du 8-oxo-dGTP et des 3 autres dNTPs normaux

PabpolB a été mise en présence de quantités égales de 8-oxo-dGTP et des 3 dNTPs normaux (dATP, dTTP et dCTP) afin de vérifier si elle était capable de répliquer la matrice de 87 mer. Les réactions d'élongation ont été effectuées en présence des matrices 3 (dN=T), 4 (dN=A), 5 (dN=G) ou 6 (dN=C) non endommagées, hybridées à l'amorce 9 (Tableau 9 et Figure 35).

La présence du 8-oxodGTP, au lieu du dGTP dans le mélange réactionnel, inhibe sévèrement l'élongation par la pol malgré une élongation totale de la matrice (Figure 35. pistes 3 à 6). Il est d'ailleurs surprenant que *PabpolB* soit même capable de répliquer entièrement la matrice de 87 mer, excepté avec la matrice 6 (dN=C) (Figure 35. pistes 3 à 5). Cependant, la quantité de produit totalement étendu reste nettement inférieure à celle du témoin positif, comme si la fonction exonucléasique inhibait l'élongation en présence du dNTP oxydé.

⇒ *PabpolB* est ainsi capable de réaliser une élongation totale en présence des 4 dNTPs lorsque le dGTP est remplacé par du 8-oxo-dGTP dans le mélange réactionnel.

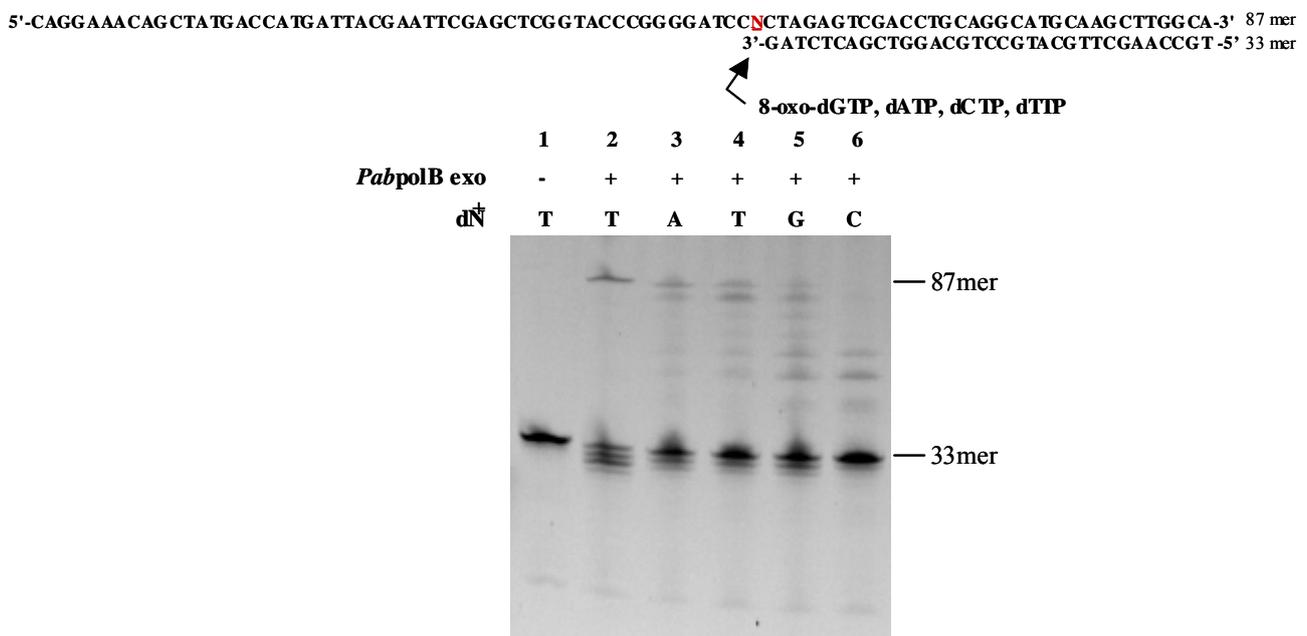


Figure 35 : Réplication d'une matrice non endommagée par *PabpolB*, en présence des dNTPs : 8-oxo-dGTP, dATP, dTTP et dCTP.

Gel dénaturant Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. Réaction en présence de 13,3 nM *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN endommagée 3/9 (dN=T) ou 4/9 (dN=A) ou 5/9 (dN=G) ou 6/9 (dN=C) et de 200 µM de 8-oxo-dGTP, dATP, dTTP, dCTP ; 55°C - 30 min. La piste 2 est le contrôle positif avec 13,3 nM de *PabpolB*, de 8,3 nM de matrice ADN 3/9 et 200 µM des 4 dNTPs.

IV. DISCUSSION

4.1. La lésion 8-oxo-dG dans le génome de *Pab* – Biomarqueur de stress oxydatif ?

Pour la première fois, un bioréacteur gas-lift a été utilisé pour appliquer un stress oxydatif chez une archaea hyperthermophile anaérobie. Cette approche originale a permis simultanément sur une même culture de suivre l'effet du stress oxydatif sur la viabilité cellulaire et de collecter des échantillons de qualité pour quantifier la lésion 8-oxo-dG dans le génome de *Pab*.

D'une part, lors de l'application du stress oxydatif en bioréacteur sur *Pab*, la diminution importante du nombre de cellules viables, observée 5 min après le stress, confirme clairement la sensibilité de *Pab* à l'oxygène, comme précédemment démontré par Erauso *et al.* (Erauso *et al.*, 1993) et plus généralement celle des archaea hyperthermophiles anaérobies. Etonnamment, il est intéressant de noter qu'une petite partie de la population cellulaire est capable de survivre au stress, dans les conditions expérimentales définies. Bien que les microorganismes anaérobies soient dépourvus de catalase et de superoxyde dismutase, il semblerait que *Pab* possède une ligne de défenses antioxydantes pour résister à l'accumulation ponctuelle de ROS. Dans ce sens, son homologue, *Pyrococcus furiosus* dispose d'un mécanisme unique de détoxification des ROS mettant en jeu une superoxyde réductase, une NAD(P)H rubrédoxine oxydoréductase et une rubredoxine (Jenney *et al.*, 1999, Grunden *et al.*, 2005). Chez *Pab*, aucune caractérisation biochimique similaire n'a pour l'instant été menée mais l'étude de son génome a révélé la présence de gènes codant pour les protéines impliquées dans cette voie métabolique (Jenney *et al.*, 1999). D'autres protéines comme, la rubrerythrine portant une activité NAD(P)H peroxidase, la NADH oxydase participeraient également aux mécanismes de lutte contre l'accumulation excessive de ROS chez *Pyrococcus furiosus* (Weinberg *et al.*, 2004, Ward *et al.*, 2001). Ces protéines sont également retrouvées dans le génome de *Pab* (rubrerythrine, GI : 14521099 ; NADH oxydase, GI :14520458). Une étude récente a d'ailleurs montré que ces protéines, impliquées dans les mécanismes de détoxification des ROS, sont exprimées de façon constitutive chez *Pyrococcus furiosus* (Williams *et al.*, 2007).

D'autre part, un taux de 8-oxo-dG a pu être mesuré, pour la première fois, chez une euryarchaea hyperthermophile, avant et après un stress oxydatif. Toutefois, il est intéressant de noter qu'au sein des génomes eucaryotes et bactériens, la lésion 8-oxo-dG est présente à l'état de trace (Tableau 3). Par conséquent, le taux basal de 8-oxo-dG, en l'absence de stress oxydatif, reste difficile à déterminer précisément, à cause des artéfacts induits lors de la préparation de l'échantillon et de la mesure (Helbock *et al.*, 1998, Ravanat *et al.*, 2002, Cadet *et al.*, 2003, Cadet *et al.*, 2008). Dans le génome de l'euryarchaea *Pab*, le taux basal de 8-oxo-dG paraît légèrement supérieur à celui de la bactérie mésophile *E.coli*. Afin d'améliorer la détection de la 8-oxo-dG, il pourrait être envisagé de préparer les échantillons en anaérobiose stricte (Nakajima *et al.*, 1996) et d'utiliser des colonnes monolithes à base de silice, qui permettent d'effectuer l'analyse sur la chaîne HPLC-UV-EC en seulement 4 min, minimisant ainsi les oxydations artéfactuelles (Kelly *et al.*, 2008). De plus, une détection simultanée du nombre de 8-oxo-dG et 8-oxo-dGTP dans le génome de *Pab* mériterait également d'être entreprise, comme l'ont déjà réalisée C. Bolin et F. Cardozo-Pelaez chez l'eucaryote (Bolin & Cardozo-Pelaez, 2007).

Par ailleurs, 5 min après le stress oxydatif, l'augmentation significative du nombre de 8-oxo-dG semblerait corrélée à une diminution importante de la survie cellulaire, suggérant que ces dommages oxydatifs dans l'ADN soient une cause majeure d'intolérance à l'oxygène chez *Pab*. Cette augmentation du nombre de lésions 8-oxo-dG, immédiatement après le stress oxydatif, a déjà été observée chez des eucaryotes (Kasai, 1997) ou encore chez des bactéries mésophiles aérobies ou anaérobies (Takeuchi *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 2004). Le stress aurait donc des effets génotoxiques pouvant entraîner la mort cellulaire de *Pab*. De plus, quelques heures après le stress, le retour au taux basal du nombre de lésions 8-oxo-dG au sein du génome de *Pab*, coïncidant avec la reprise de croissance, témoignerait de l'existence de mécanismes efficaces de maintenance de l'intégrité génomique. Ainsi, le taux de 8-oxo-dG pourrait, à l'avenir, constituer un biomarqueur de stress oxydatif utile pour explorer et évaluer les effets biologiques des ROS chez les euryarchaea hyperthermophiles.

⇒ Même si ces résultats obtenus sont préliminaires, ils sont fortement encourageants car ils démontrent que *Pab* dispose de mécanismes efficaces pour lutter contre un excès de ROS et contre les agressions génotoxiques induites par ces ROS.

4.2. Caractérisation fonctionnelle des *Pabpols*

Cette étude a également souligné que les *Pabpols* peuvent être impliquées dans des processus de tolérance aux dommages oxydatifs, en franchissant les deux lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA ou en incorporant le dNTP oxydé, 8-oxo-dGTP.

Les lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA sont tolérées par les *Pabpols*. En effet, dans les conditions « Running start », les *Pabpols* répliquent totalement la matrice ADN endommagée. Ce comportement a déjà été observé chez de nombreuses pols de haute fidélité (Shibutani *et al.*, 1991, Lowe & Guengerich, 1996, Furge & Guengerich, 1997, Duarte *et al.*, 1999, Freisinger *et al.*, 2004, Bruck *et al.*, 2003, Brieba *et al.*, 2004, De Vega & Salas, 2007). *PabpolD* est légèrement plus sensible à ces dommages oxydatifs que *PabpolB* : elle détecte l'anomalie sur la matrice ADN et bloque légèrement avant ou lors de l'incorporation. *A contrario*, l'étroite coordination entre l'activité polymérasique et l'activité exonucléasique de *PabpolB* ne permet pas d'empêcher la synthèse translésionnelle même si un léger blocage est observé. Toutefois, des expériences additionnelles doivent être entreprises afin d'élucider davantage le mécanisme de tolérance à ces dommages oxydatifs par les *Pabpols*. L'utilisation de gels dénaturants plus résolutifs permettrait de savoir si les *Pabpols* contournent le site endommagé par glissement et/ou si elles sont capables de synthèse translésionnelle. Dans ce dernier cas, il est probable que les *Pabpols* se dissocient de la matrice ADN avant ou après incorporation d'un dNTP en face de la lésion oxydative ; elles pourraient même entrer dans des cycles d'insertion – excision, avant de décrocher. Afin de vérifier ces hypothèses, des expériences au cours d'un seul cycle d'extension pourraient être réalisées. La mesure des paramètres cinétiques d'incorporation en face de la lésion et d'extension après le dommage serait également nécessaire à l'identification de l'étape limitante du processus translésionnel (incorporation en face de la lésion ou extension après incorporation).

De plus, par ses caractéristiques chimiques et ses propriétés physiques, la lésion 8-oxo-dG est insidieuse lorsqu'elle est franchie par les *Pabpols* : si les *Pabpols* incorporent correctement un dCMP en face de ce dommage oxydatif, elles insèrent majoritairement un dAMP de façon illégitime. Cette incorporation préférentielle d'un dAMP face à la lésion 8-oxo-dG, par les *Pabpols*, corrobore les résultats obtenus avec les *pols* de haute fidélité α et δ chez les eucaryotes (Shibutani *et al.*, 1991, Haracska *et al.*, 2003), pol I, pol II *exo-*, KF et BF et DnaE chez les bactéries (Lowe & Guengerich, 1996, Shibutani *et al.*, 1991, Hsu *et al.*, 2004, Bruck *et al.*, 2003), ou encore la pol T7 chez le bactériophage T7 (Furge & Guengerich, 1997). Parce qu'elle mime un T en conformation *syn* (Figure 36. C), la lésion 8-oxo-dG est particulièrement délétère. Dans ce sens, des analyses structurales ont montré que la formation d'un appariement de Hoogsteen entre les bases 8-oxo-dG (*syn*)•dAMP (*anti*), mimant la structure d'une paire de base de type Watson et Crick, est privilégiée par rapport à la paire de base « légitime » 8-oxo-dG•dCMP, considérée comme un mésappariement par les *pols* répliquatives (Figure 36. C) (Briebe *et al.*, 2004, Hsu *et al.*, 2004). L'appariement de Hoogsteen 8-oxo-dG (*syn*)•dAMP (*anti*) peut ainsi échapper au mécanisme classique de détection et de correction par l'activité exonucléasique des *pols* répliquatives (Briebe *et al.*, 2004, Hsu *et al.*, 2004). Par conséquent, l'appariement 8-oxo-dG (*syn*)•dAMP (*anti*) s'avère hautement mutagénique car il en résulte une transversion G•C \rightarrow T•A, pouvant parfois aboutir à des mutations stables, létales pour la cellule (Cheng *et al.*, 1992). De plus, des données thermodynamiques justifient également l'appariement préférentiel 8-oxo-dG•dAMP (McAuley-Hecht *et al.*, 1994). Enfin, la dernière hypothèse, permettant d'expliquer cette incorporation préférentielle d'un dAMP par les *Pabpols*, résiderait dans l'incorporation d'un dAMP, par mésalignement avec le T situé en aval de la lésion 8-oxo-dG, pouvant générer ainsi une délétion -1. Cette dernière possibilité est effectivement suggérée par les glissements -1 observés lors des réactions en conditions « Running start » et a déjà été observée avec la pol η (famille X) (Yung *et al.*, 2007).

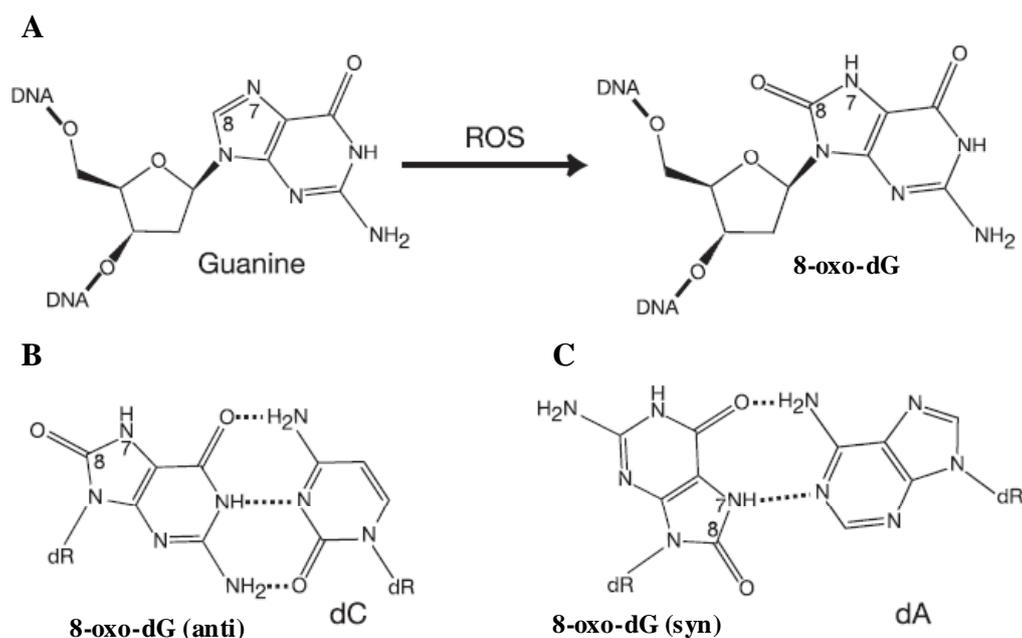


Figure 36 : Mode d'appariement de la lésion 8-oxo-dG, adapté de Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2004).

A, Oxydation du G en C8 par une ROS. B, 8-oxo-dG•dCMP dans un appariement de type Watson et Crick. C, 8-oxo-dG (syn) •dAMP(anti) dans un appariement de Hoogsteen.

Parallèlement, l'étude de l'incorporation préférentielle en face de la lésion 8-oxo-dA a montré que *Pabp*LD privilégiait l'appariement correct 8-oxo-dA•dTMP, comme la pol répliquative eucaryote α ou encore les réplicases bactériennes KF *exo+*, KF *exo-* et Taq (Shibutani *et al.*, 1993, Kamiya *et al.*, 1995, Duarte *et al.*, 1999, Guschlbauer *et al.*, 1991). En effet, une étude par RMN a permis de démontrer que la 8-oxo-dA peut former un appariement de type Watson et Crick avec un dTMP en forme keto (Guschlbauer *et al.*, 1991) (Figure 37. A). De plus, l'incorporation privilégiée d'un dAMP et du dTMP couplée à la faible insertion d'un dGMP et d'un dCMP par *Pabp*LD n'a jamais été observée jusqu'alors chez les polys répliquatives. Toutefois, à ce jour, la lésion 8-oxo-dA a fait l'objet de peu de travaux. Les polys KF *exo+* et α semblent privilégier les appariements 8-oxo-dA•dTMP et 8-oxo-dA•dGMP (Shibutani *et al.*, 1993, Kamiya *et al.*, 1995) mais ces derniers résultats font l'objet de controverses (Kamiya, 2003). Pour l'instant, seule la pol β , appartenant à la famille X, est capable de réaliser un mésappariement 8-oxo-dA•dAMP (Kamiya *et al.*, 1995). L'existence d'appariement 8-oxo-dA•dCMP a été suggérée par les mutations A→G observées *in vivo* lors d'étude génétique mais aucune étude biochimique ne l'a clairement démontré. Seules des hypothèses ont été formulées afin de justifier les mésappariements 8-oxo-dA•dCMP et 8-oxo-dA•dAMP (Figure 37. respectivement B et E) (Kamiya *et al.*, 1995). Néanmoins, dans

notre cas, l'incorporation préférentielle du dAMP par *Pabp*olD pourrait simplement résulter de l'influence du T situé en 5' de la lésion 8-oxo-dA, comme précédemment suggéré en présence de la lésion 8-oxo-dG, structurellement apparentée. Par ailleurs, *Pabp*olB n'incorpore aucun nucléotide en face de la lésion 8-oxo-dA, dans les conditions testées.

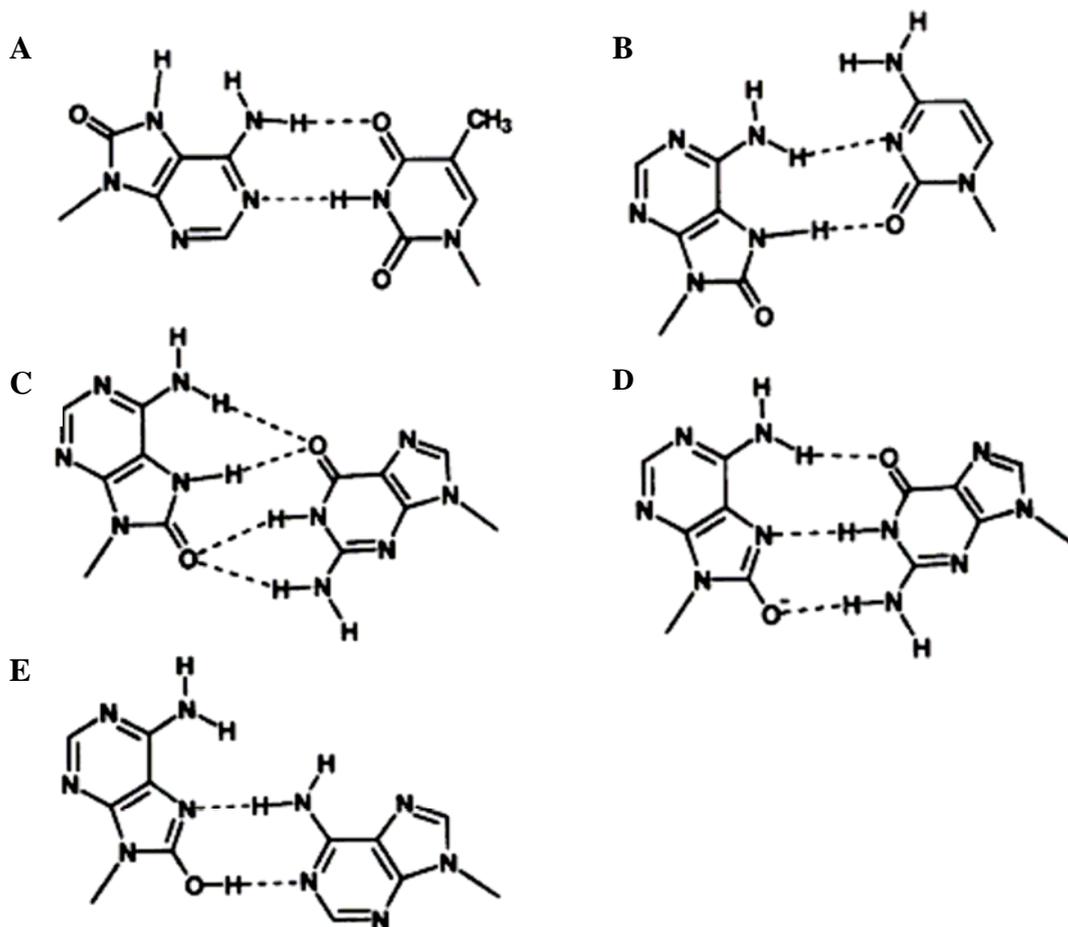


Figure 37 : Mode d'appariement de la lésion 8-oxo-dA d'après Kamiya *et al.* (Kamiya *et al.*, 1995).

A, 8-oxo-dA•dTMP élucidé par RMN (Guschlbauer *et al.*, 1991). B, 8-oxo-dA•dCMP postulé. C, 8-oxo-dA•dGMP détecté par cristallographie (Leonard *et al.*, 1992). D, autre forme possible de l'appariement 8-oxo-dA(enol)•dGMP. E, 8-oxo-dA(enol)•dAMP postulé.

Enfin, en plus d'entraîner des lésions dans l'ADN, la présence de ROS est aussi à l'origine d'oxydations des précurseurs de l'ADN, les dNTPs, dont la forme la plus abondante est le 8-oxo-dGTP (Sekiguchi & Tsuzuki, 2002). Ainsi, les *Pabp*ols insèrent correctement le 8-oxo-dGTP en face du C, puis en face du A probablement selon un appariement de type Hoogsteen. Ce résultat suggère qu'elles peuvent accommoder le dNTP oxydé dans leur site actif mais, à ce jour, la structure du complexe ternaire pol•ADN•8-oxo-dGTP n'a pas été étudiée. De nombreuses pols incorporent préférentiellement le 8-oxo-dGTP en face du A,

notamment les pols T7 et γ (famille A) (Einolf *et al.*, 1998, Hanes *et al.*, 2006, Pursell *et al.*, 2008), les pols β et γ (famille X) (Miller *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2007) ou encore la pol IV, les pols Dbh, Dpo4 et η (Famille Y) (Yamada *et al.*, 2006, Shimizu *et al.*, 2003, Shimizu *et al.*, 2007, Hidaka *et al.*, 2008). Néanmoins, le comportement des *Pab*polys n'est pas étonnant car l'incorporation du 8-oxo-dGTP, selon le mode d'appariement de type Watson et Crick, a déjà été observée chez les pols répliquatives pol I (famille A), pol II exo-, δ , KF exo- et ϕ 29 (famille B) (Einolf *et al.*, 1998, Einolf & Guengerich, 2001, De Vega & Salas, 2007). Il est intéressant de souligner que cette insertion préférentielle du 8-oxo-dGTP en face du C par les *Pab*polys, a pu être influencée par l'environnement nucléotidique, notamment par les deux C situés en 5' de la matrice ADN. Globalement, ces résultats sont difficiles à interpréter en terme de mutagenèse : d'une part, l'appariement 8-oxo-dGTP•dAMP est directement mutagénique car il en résulte une transversion A•T \rightarrow C•G ; d'autre part, l'appariement légitime 8-oxo-dGTP•dCMP peut lui aussi aboutir indirectement à l'apparition de mutations car le 8-oxo-dG incorporé peut s'apparier avec l'un des 4 dNTPs lors du cycle de réplication suivant si il n'est pas réparé (Cheng *et al.*, 1992, Kamiya & Kasai, 1995, Inoue *et al.*, 1998, Kasai, 2002, Hidaka *et al.*, 2008). Toutefois, des études cinétiques ont montré que les dNTPs oxydés, notamment le 8-oxo-dGTP, constituaient un mauvais substrat pour les pols répliquatives. En effet, les pols δ , T7, Pol II et KF exo- n'incorporent pas efficacement le 8-oxo-dGTP (Einolf *et al.*, 1998, Einolf & Guengerich, 2001).

\Rightarrow L'ensemble de ces résultats suggèrent que la TLS des dommages 8-oxo-dA et 8-oxo-dG et l'incorporation de dNTPs oxydés par les *Pab*polys peuvent être hautement mutagènes pour *Pab*, en l'absence de mécanismes de réparation post-répliquatifs. Le contexte nucléotidique pourrait également influencer le mécanisme d'incorporation des dNTPs normaux ou oxydés par les *Pab*polys.

CHAPITRE II :ETUDE DE LA LESION APURINIQUE

I. INTRODUCTION

L'une des lésions les plus répandues affectant l'ADN est le site apurinique (AP) (Lindahl, 1993) : il correspond à la rupture entre la liaison N-Glycosyl entre la base et le sucre d'un nucléotide. Ces lésions peuvent résulter d'une dépurination spontanée (Lindahl, 1993) ou d'un dommage sur l'ADN causé par divers agents chimiques ou physiques (Loeb *et al.*, 1986, Breen & Murphy, 1995, Cadet *et al.*, 1999) ou encore de l'activité enzymatique d'une ADN glycosylase lors du BER (Loeb *et al.*, 1986, Scharer & Jiricny, 2001). A ce jour, la présence de sites AP au sein des génomes d'archaea hyperthermophiles est fortement présomptive ; en effet, les archaea sont inféodés à des biotopes hostiles réunissant les facteurs physico-chimiques favorables à l'apparition de dommages AP (Grogan, 1998, Grogan, 2004). Toutefois, aucun résultat ne l'a clairement démontré.

Le site AP est une lésion hautement mutagène car elle ne code pour aucun nucléotide (Shearman & Loeb, 1977, Kunkel *et al.*, 1983, Loeb *et al.*, 1986). Même si elle constitue un sévère blocage pour les pols, il a été clairement démontré que de nombreuses pols répliquatives eucaryotes et bactériennes insèrent préférentiellement un « A » en face de ce site endommagé (loi du « A ») (Strauss, 1991, Shibutani *et al.*, 1997, Haracska *et al.*, 2001, Strauss, 2002, Scharer & Jiricny, 2001). Cependant, chez les pols répliquatives archéennes, aucune étude biochimique n'a pour l'instant été réalisée or il est fortement probable qu' *in vivo*, elles soient confrontées à ce dommage majeur. Il apparaît donc nécessaire d'évaluer le potentiel mutagène de ces lésions non instructives, chez les archaea hyperthermophiles, plus particulièrement chez *Pab*. Afin d'atteindre ce but, une démarche expérimentale similaire à celle menée pour les lésions oxydatives, a été utilisée. Le taux de sites AP au sein du génome de *Pab* a été mesuré et comparé à celui de la bactérie mésophile *E.coli*, à différents stades de croissance. L'influence d'un stress acide sur l'apparition des sites AP a aussi été étudiée chez *Pab* uniquement. Parallèlement, l'aptitude des *Pab*pols, sauvages ou dépourvues de fonction exonucléasique, à franchir la lésion AP a été déterminée en faisant varier la topologie de l'ADN et le nucléotide en aval de la lésion. Enfin, afin d'évaluer le rôle de la fonction exonucléasique, les paramètres cinétiques d'incorporation par les *Pab*pols ont été mesurés à l'équilibre, en présence d'ADN non endommagé et d'ADN contenant un site AP.

II. MATERIELS ET METHODES

Cette partie est consacrée uniquement à des compléments d'informations techniques ne figurant pas dans l'article (Palud *et al.*, 2008).

2.1. Dosage des lésions AP au sein du génome de *Pab* par une méthode indirecte

A la différence de la méthode immunochimique directe décrite dans l'article, une seconde méthode indirecte de détection des lésions AP basée sur l'utilisation d'une ADN glycosylase, a été envisagée pour confirmer la présence de sites AP dans le génome de *Pab* (Sutherland *et al.*, 2002b).

2.1.1. Cultures de *Pab* et échantillonnage

Afin de mesurer les effets potentiels de la température et de la pression sur la quantité de sites AP présents dans le génome de *Pab*, des cultures de la souche GE5 de *Pab* (Souchothèque de Bretagne, <http://www.ifremer.fr/souchotheque>) sont réalisées en anaérobiose stricte, à pH 6,8, dans des flacons pénicilline de 100 mL ou des seringues de 50 mL, contenant 40 mL de milieu frais TRM (Annexe 1). Dans ce milieu, le soufre colloïdal, utilisé comme accepteur final d'électrons, est remplacé par de la L-cystéine, permettant ainsi de suivre la croissance de *Pab* par simple mesure d'absorbance à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Milton Roy Spectronic 301).

Les cultures sont réalisées dans les conditions suivantes : 5 températures différentes (80°C, 85°C, 90°C, 95°C et 100°C) ; pour chaque température, trois conditions de pression sont testées avec l'aide de Jean-Louis Birrien, grâce à un système spécifique décrit dans l'article de V. Marteinson *et al.* (Marteinson *et al.*, 1997) : pression atmosphérique (0.1 MPa), 20 MPa et 40 MPa. Un triplicat est réalisé pour chaque échantillon.

Enfin, les cultures sont arrêtées 15 min sur glace lorsque la DO atteint 0,3-0,4 à 600 nm, puis centrifugées à 6000 g pendant 15 min à 4°C.

2.1.2. Détection des lésions AP par une méthode indirecte

Cette méthode indirecte permettant de détecter les sites AP potentiels dans le génome de *Pab*, est basée sur l'utilisation de l'endonucléase IV d'*E.coli*, encore appelée Nfo. Elle reconnaît principalement les dommages abasiques multiples localisés, présents sur l'ADNdb et les transforme en cassures double brin détectables par électrophorèse en champ pulsé (Sutherland *et al.*, 2002a).

2.1.2.1. Préparation de l'ADN génomique

Les cellules sont lavées dans de l'eau de mer artificielle puis reprises dans une solution de 125 mM EDTA (pH 8), à une densité de 5×10^8 cellules/mL. Les suspensions cellulaires sont alors mélangées à l'agarose low-melting pour obtenir une concentration finale en agarose de 0,8 %.

La lyse cellulaire est effectuée dans cette matrice semi-solide d'agarose appelée « plugs » pour éviter toutes forces de cisaillement, susceptibles d'endommager l'ADN. Cette étape permet de libérer l'ADN chromosomique et de le rendre disponible à la digestion enzymatique ultérieure. Les plugs sont placés dans une solution de lyse ESP (0,5 M EDTA (pH 9-9,5) ; 1 % N-lauroylsarcosine ; 1 mg/mL protéinase K), à 50°C sur la nuit. Les plugs sont enfin lavés 6 fois avec du TE (pH 7,5) et conservés dans ce même tampon à 4°C.

2.1.2.2. Prédigestion de l'ADN génomique

Une prédigestion de l'ADN chromosomique de *Pab* est effectuée par une endonucléase de restriction qui reconnaît des sites de coupures rares, de façon à générer un nombre restreint de fragments d'ADN de grande taille. L'enzyme sélectionnée pour le génome de *Pab* est NotI (Jolivet *et al.*, 2003). L'ADN au sein des plugs est digéré par 40U de NotI (New England Biolabs) à 37°C sur la nuit.

2.1.2.3. Traitement par l'endonucléase IV

Pour chaque échantillon, deux plugs sont placés dans la solution suivante à pH 7,6 : 70 mM Hepes KOH, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 10 mg/mL BSA ; l'un des plugs est incubé avec le tampon uniquement, l'autre est traité par une quantité suffisante d'endonucléase IV (New England Biolabs). Afin d'éliminer toute trace d'enzyme, les plugs sont traités à la protéinase K (1 mg/mL), sarcosyl (1 %) dans 10 mM de Tris-HCl (pH 8),

20 mM NaCl et 0.1 M EDTA (pH 8). Ils sont ensuite rincés et équilibrés dans 10 mM de Tris, 87 mM d'acide acétique et 0.5 M d'EDTA (pH 8). Le même traitement est appliqué au génome irradié de la bactérie *Deinococcus radiodurans* R1 (offert gracieusement par Edmond Jolivet, CNRS UMR 8621) qui sert de contrôle positif (offert gracieusement par Edmond Jolivet, CNRS UMR 8621).

2.1.2.4. Electrophorèse en champ pulsé

Cette technique est basée sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel et permet de séparer des fragments d'ADN de haut poids moléculaire.

L'ADN, traité au sein des plugs, est alors analysé sur gel agarose 1 %, à l'aide de l'appareil CHEF-DR III (Bio-Rad) (Afssa – site de Brest).

Conditions électrophorétiques :

-Tampon de migration : TBE 0.5 X ([Annexe 2](#))

-Voltage : 6 V/cm

-Temps de pulsation : 1 à 12 sec

-Angle : 120°

-Durée : variable (15 H à 22 H)

-Température : 12°C

-Marqueur de taille : Lambda (50 à 1000 kb) et Low range (0,13 kb-194 kb) (New England Biolabs).

2.1.2.5. Révélation

Le gel est ensuite coloré pendant 20 min à l'obscurité au SybrGold (Molecular Probe), intercalant de l'ADN, puis numérisé à l'aide du phosphofluorimager Typhoon 9400 aux longueurs d'onde suivantes :

-Excitation à 488 nm

-Emission 520 nm BP 40

Les profils électrophorétiques obtenus sont ensuite analysés comme décrit dans la publication (Sutherland *et al.*, 2001).

2.2. Stress acide chez *Pab* en flacon pénicilline

Des cultures en mode batch de la souche GE5 de *Pab* (Souchothèque de Bretagne, <http://www.ifremer.fr/souchotheque>) ont été réalisées en anaérobiose stricte, à 95°C et à pH 6,8, dans des flacons pénicilline de 100 mL contenant 40 mL de milieu frais YPS (Annexe 1), comme décrit dans l'article (Palud *et al.*, 2008). En milieu de phase exponentielle, des quantités définies d'HCl 4 N (autoclavé et dégazé) ont été ajoutées à l'aide d'une seringue dans les flacons de culture, afin d'abaisser brutalement le pH. Après ajout de l'acide chlorhydrique, les cultures ont été réincubées à l'étuve durant 30 min puis centrifugées à 6000 g pendant 15 min à 4°C ; les surnageants de cultures ont servi à mesurer, à température ambiante, le pH du milieu après injection de l'acide tandis que les culots cellulaires ont été stockés à -20°C avant extraction de l'ADN.

Pour chaque condition de pH testée, les extractions d'ADN suivies de la détection des sites AP en triplicat ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'article (Palud *et al.*, 2008).

2.3. Oligonucléotides additionnels pour la caractérisation fonctionnelle des *Pabpols*

Les différents oligonucléotides utilisés lors de cette étude ont été synthétisés et purifiés par Eurogentec (Belgique) (Tableau 10). Les oligonucléotides 2, 3 et 4 (87 mer AP) présentent respectivement un site AP artificiel (résidu tétrahydrofurane), situé en position 33, 2 sites AP (positions 33 et 34) et 3 sites AP (positions 33, 34 et 35). L'oligonucléotide 5 est marqué à l'extrémité 5' à la fluorescéine (Voir Chapitre I. 2.3.2 ci-dessus).

Oligonucléotide 1 – 87 mer T

5' - CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTA CCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA - 3'

Oligonucléotide 2 – 87 mer AP1

5' - CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTA CCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA - 3'

Oligonucléotide 3 – 87 mer AP2

5' - CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTA CCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA - 3'

Oligonucléotide 4 – 87 mer AP3

5' - CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTA CCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA - 3'

Oligonucléotide 5 – 17 mer

5' - TGCCAAGCTTGCATGCC - 3'

Tableau 10 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.

X représente le site AP. L'oligonucléotide 5 est marqué en 5' à la fluorescéine.

III. ARTICLE

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/121421251/abstract>

Molecular Microbiology (2008) 70(3), 746–761 ■

doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06446.x
First published online 25 September 2008

Intrinsic properties of the two replicative DNA polymerases of *Pyrococcus abyssi* in replicating abasic sites: possible role in DNA damage tolerance?

Adeline Palud,^{1,2} Giuseppe Villani,³
Stéphane L'Haridon,² Joël Querellou,^{1,2}
Jean-Paul Raffin^{1,2} and Ghislaine Henneke^{1,2*}

¹Ifremer, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, BP 70, 29280 Plouzané, France.

²Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, 29280 Plouzané, France.

³Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS-Université Paul Sabatier Toulouse III, UMR 5089, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex, France.

Summary

Spontaneous and induced abasic sites in hyperthermophiles DNA have long been suspected to occur at high frequency. Here, *Pyrococcus abyssi* was used as an attractive model to analyse the impact of such lesions onto the maintenance of genome integrity. We demonstrated that endogenous AP sites persist at a slightly higher level in *P. abyssi* genome compared with *Escherichia coli*. Then, the two replicative DNA polymerases, *Pabp*olB and *Pabp*olD, were characterized in presence of DNA containing abasic sites. Both *Pabp*ols had abortive DNA synthesis upon encountering AP sites. Under running start conditions, *Pabp*olB could incorporate in front of the damage and even replicate to the full-length oligonucleotides containing a specific AP site, but only when present at a molar excess. Conversely, bypassing activity of *Pabp*olD was strictly inhibited. The tight regulation of nucleotide incorporation opposite the AP site was assigned to the efficiency of the proof-reading function, because exonuclease-deficient enzymes exhibited effective TLS. Steady-state kinetics reinforced that *Pabp*ols are high-fidelity DNA polymerases onto undamaged DNA. Moreover, *Pabp*ols preferentially

inserted dAMP opposite an AP site, albeit inefficiently. While the template sequence of the oligonucleotides did not influence the nucleotide insertion, the DNA topology could impact on the progression of *Pabp*ols. Our results are interpreted in terms of DNA damage tolerance.

Introduction

The genome of a living cell continuously undergoes a plethora of both exogenous and endogenous genotoxic attacks. Among the myriad of DNA lesions, the abasic [apurinic/aprimidinic (AP)] sites are one of the most common lesions arising at high steady-state levels, yielding up to 2000–10 000 lesions per human cell per day by spontaneous hydrolysis of the N-glycosylic bond (Lindahl and Nyberg, 1972; Lindahl, 1993). These lesions can be generated by direct elimination of bases via free radical attacks, as a consequence of cells exposure to chemical and physical agents (Loeb *et al.*, 1986; Breen and Murphy, 1995; Cadet *et al.*, 1999). Furthermore, AP sites appear transiently as intermediates of Base Excision Repair by DNA N-glycosylases (Loeb *et al.*, 1986; Schärer and Jiricny, 2001). Despite the fact that it could be considered as an attractive model, identification and determination of the mutagenic properties of AP sites in hyperthermophilic archaea (HA) remain poorly understood. Presumably, life at high temperature inflicts additional stress to genomic DNA in each cell and very high rates of potentially mutagenic DNA lesions (deamination, depurination, oxidation by hydrolytic mechanisms and subsequent strand breakage) should be expected. However, and interestingly, it was demonstrated that the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* exhibits a modest rate of spontaneous mutations nearly close to that of *Escherichia coli*, raising the question of how HA do to preserve their genome intact in such deleterious environmental conditions (Jacobs and Grogan, 1997; Grogan *et al.*, 2001).

To cope with the huge spectrum of impediments that result in genome destabilizing lesions, multiple DNA repair mechanisms have evolved in all organisms to ensure genomic stability (Hoeijmakers, 2001; Grogan, 2004;

Accepted 3 September, 2008. *For correspondence. E-mail ghenneke@ifremer.fr; Tel. (+33) 2 98 22 46 09; Fax (+33) 2 98 22 47 57.

Friedberg *et al.*, 2006). However, situations can arise in which DNA damage escapes to DNA repair and persists into the genome. Cells have developed DNA damage tolerance mechanisms to tolerate hurdles in DNA either by post-replicative gap filling, copy-choice DNA synthesis or translesion DNA synthesis (TLS) (Friedberg, 2005; Friedberg *et al.*, 2006). Both bacteria and eukaryotes can tolerate arrested DNA replication by template switching, therefore avoiding accumulation of mutations (McGlynn and Lloyd, 2002; Courcelle *et al.*, 2003). Whereas template switching systems remain unknown in archaea, TLS appears to be conserved within the three kingdoms of life (Friedberg *et al.*, 2000; Boudsocq *et al.*, 2001; Hubscher *et al.*, 2002; Pages and Fuchs, 2002; Shimizu *et al.*, 2003; Nohmi, 2006; Yang and Woodgate, 2007). Kinetically, this damage tolerance mechanism can be divided in two steps: (i) nucleotide insertion opposite the DNA lesion; (ii) extension beyond the lesion. Depending on the nature of the lesion, the bypass may involve a single or the concerted action of DNA polymerases (Friedberg, 2005; Friedberg *et al.*, 2005). High-fidelity replicative DNA polymerases in crenarchaea, bacteria and eukaryotes are intrinsically severely blocked upon incorporation opposite a lesion such as an abasic site, thus recognizing the illegitimate formed base pair and entering into futile cycles of insertion/excision (Gruz *et al.*, 2003; Tanguy Le Gac *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Pages *et al.*, 2005). This phenomenon called 'idling' is relevant to replicative DNA polymerases harbouring the proof-reading 3'-5' exonuclease and reflects the partitioning of a mispaired DNA template between the exonuclease/polymerase active sites (Villani *et al.*, 1978). The exonuclease activity acts as a kinetic barrier to TLS by preventing the stable incorporation of bases opposite the DNA lesion and therefore confers the exquisite accuracy of replicative DNA polymerases to preserve the integrity of the genome (Khare and Eckert, 2002). In the absence of coding information owing to the base loss, most of replicative DNA polymerases obey to the A-rule, preferentially incorporating a dAMP opposite the abasic site (Lawrence *et al.*, 1990; Shibutani *et al.*, 1997; Haracska *et al.*, 2001). Conceivably, the DNA sequence context, the structure of the DNA primer lesion and the replicative DNA polymerase examined can account for the preferential dAMP insertion opposite an abasic site. Currently, the A-rule for replicative DNA polymerases remains under intensive debates (Taylor, 2002; Hogg *et al.*, 2004; Kroeger *et al.*, 2006).

Here, we used *Pyrococcus abyssi*, as a model for studying the genomic maintenance at high temperature. This euryarchaeote grows at an optimum of 95°C and is faced to environmental fluctuations imposed by hydrothermal vents (Erauso *et al.*, 1993; Jolivet *et al.*, 2003). Interestingly, *P. abyssi* is able to duplicate bidirectionally its 1.7 million base pairs from a single origin as fast as 45 min (Myllykallio

et al., 2000) and DNA replication is thought to be achieved by the two high-fidelity DNA polymerases (*Pabp*D and *Pabp*B) and their accessory factors (Henneke *et al.*, 2005; Rouillon *et al.*, 2007). Consistent with the existing translesional systems and the lack of specialized DNA polymerases in *P. abyssi*, we speculate that one or both *Pabp*ols could be involved in damage tolerance. In this study, we determine the steady-state level of AP sites in *E. coli* and *P. abyssi* at different growth stages. Second, we examine the bypass properties of the exonuclease proficient and deficient replicative *Pabp*ols across an abasic site by varying the DNA topology and sequence context. Finally, steady-state kinetic was employed to give substantial insights into the role of the proof-reading activity of *Pabp*ols for nucleotide incorporation on damaged in comparison with intact DNA templates. Potential mutagenicity of abasic sites and more generally genomic maintenance in *P. abyssi* are discussed.

Results

Rate of endogenous AP sites in *P. abyssi* and *E. coli*

Before dissecting the *in vitro* behaviour of the *Pabp*ols in the presence of abasic sites, we investigated whether such DNA lesions were present into the genome of *P. abyssi*. The mesophilic bacteria *E. coli* was used as a control. The steady-state level of abasic sites was evaluated during the exponential and stationary phases of growth (Fig. 1). In the exponential phase, 2 and 25 abasic sites per 100 000 bp were calculated for *E. coli* and *P. abyssi* respectively (Fig. 1). This value moderately increased to reach the number of 4 and 42 abasic sites per 100 000 bp at the stationary phase, for *E. coli* and *P. abyssi* respectively. Taken together, these data provided evidence for the first time that the genome of the hyperthermophile *P. abyssi* has to deal with the presence of abasic sites. Further, the level of AP sites in *P. abyssi* genome is approximately 10-fold higher than in *E. coli*.

Replication of AP sites containing M13mp18 DNA template by *Pabp*ols

We first checked the capacity of *Pabp*ols to duplicate a circular AP-containing heteropolymeric M13mp18 DNA template. Preparation of this damaged AP-M13mp18 templates is depicted in Fig. 2A. Under the conditions employed, 11 apurinic (the predominant lesion) and apyrimidinic sites are introduced per molecules (Schaaper and Loeb, 1981). *Pabp*ols were tested in a primer extension assay in the presence of either abasic or undamaged M13mp18 templates. DNA elongation of the 5'-end fluorescein labelled oligonucleotide 6 (Table 1) was visualized by product analysis on alkaline agarose gel. In the presence of undamaged DNA template, both *Pabp*ols (wild-

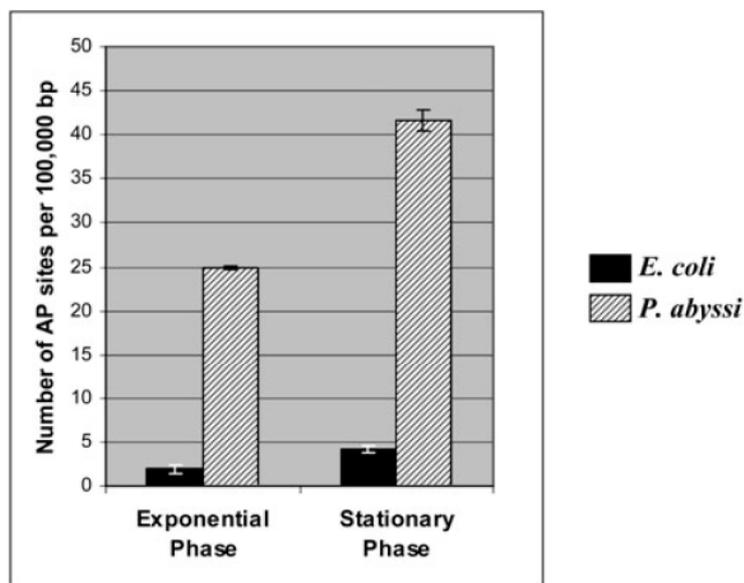


Fig. 1. Rate of endogenous AP sites into *P. abyssi* and *E. coli* genomes at different growth stages. Steady-state level of AP sites per 100 000 bp was calculated during the exponential and stationary phases of growth. The number of AP sites per 100 000 bp represents the mean of triplicate experiments and error bars show the standard deviations of each measurement.

type or exonuclease-deficient, respectively, *exo+* and *exo-*) could extend the primer but with distinct efficiencies. While *PabpolB* *exo+/exo-* carried out DNA synthesis to the full length of the unmodified M13mp18 (7249 nt), *PabpolD* *exo+/exo-* did only extend the primer to 3600 nt likely owing to its sensitivity to secondary structures as already observed (Henneke *et al.*, 2005) (Fig. 2B, compare lanes 2 and 4–7 and 9). However, when *PabpolD* *exo-* elongated the undamaged template, a faint band corresponding to the full-length product was observed (Fig. 2B, lane 9), consistent with the lower sensitivity of the *PabpolD* *exo-* to secondary structures. DNA synthesis reactions of the wild-type *Pabpols* with AP templates gave patterns similar to those obtained with undamaged templates, but with a lower amount of elongated products (Fig. 2B, lanes 3 and 8). Therefore, the presence of abasic sites has an inhibitory effect on *Pabpols* activities. The results obtained with *Pabpols* were compared with those of T4 DNA polymerase, used as a control. While the relative distribution of the products of DNA replication was different with damaged versus undamaged M13mp18 DNA template, the lower efficiency of the T4 DNA polymerase (family B) in the presence of DNA lesions was confirmed (Fig. 2B, lanes 12 and 13), as already described (Tanguy Le Gac *et al.*, 2004; Blanca *et al.*, 2007). It should be noted that, when reac-

tions were carried out in the presence of *Pabpols* *exo-* with damaged DNA, a higher amount of replicated DNA products appeared (Fig. 2B, compare lanes 3–5 for *PabpolB* and lanes 8–10 for *PabpolD*) indicating that the proof-reading activity of *Pabpols* acts as a kinetic barrier to translesion synthesis onto damaged M13mp18. To further address the inhibitory effect of AP sites onto the DNA polymerizing activity of *Pabpols*, quantitative analyses were performed by acid precipitable assay as described under *Experimental procedures*. Figure 2C shows the results of replicating these DNA templates by *Pabpols*. Both *Pabpols* could discriminate between damaged and intact M13mp18 DNA template. Indeed, reduced synthetic rates were observed for *Pabpols* independently of the proficient or deficient exonuclease activity, with damaged DNA templates. The presence of AP sites caused a more pronounced inhibition of replication by *PabpolD*, showing a 183-fold and 55-fold reduction of synthetic rates, respectively, for *PabpolD* *exo+* and *PabpolD* *exo-*. In the case of *PabpolB*, a sixfold and fivefold reduction of synthetic rates, respectively, for *PabpolB* *exo+* and *PabpolB* *exo-*, was caused by AP sites. T4 DNA polymerase (family B), used as a control, exhibited a reduced replicating activity comparable to that of *PabpolB*. Taken together, these results argued that *Pabpols* discriminate between undamaged or

Fig. 2. Replication of AP sites containing M13mp18 DNA template by *Pabpols*.

A. Chemical treatment to induced AP sites into M13mp18 DNA.

B. Primer extension assays were performed with 5'-fluorescein end labelled primer (oligonucleotide 6) hybridized to either the damaged or undamaged M13mp18 DNA template, *Pabpols* and T4 DNA polymerase used as a control experiment. The elongated products were separated on a 0.8% (w/v) denaturing alkaline agarose gel. Lanes 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12 are the undamaged extended products; lanes 3, 5, 8, 10, 13 are the damaged extended products.

C. dNTPs incorporation into the damaged and undamaged M13mp18 DNA primed templates were tested by acid precipitation and incubation was performed according to the dependent polymerase reactions with [³H]dTTP as the substrate (as outlined in *Experimental procedures*).

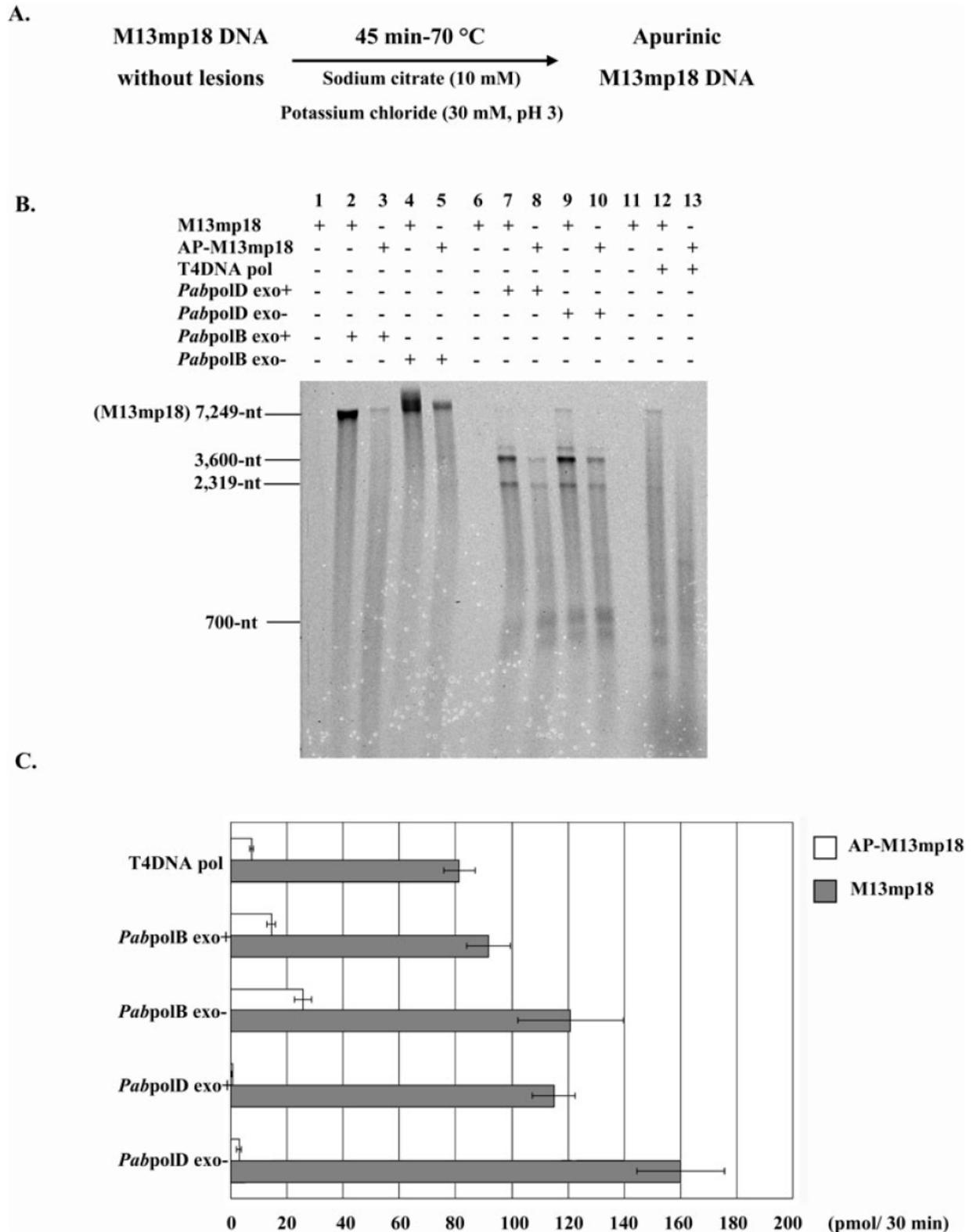


Table 1. Damaged or intact oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotide 1
5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'
Oligonucleotide 2
5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCAXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'
Oligonucleotide 3
5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCGXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'
Oligonucleotide 4
5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'
Oligonucleotide 5
5'-TGCCAAGCTTGCATGCC-3'
Oligonucleotide 6
5'-TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA-3'

X represents the position of the correct base, template C, or a tetrahydrofuran moiety designed to functionally mimic an abasic site.

damaged DNA templates, with distinct reduced polymerizing activities, suggesting that the presence of AP sites is rate limiting.

Replication of AP-containing mini-circular and linear oligonucleotides DNA templates by the wild-type or exonuclease-deficient PabpolB

As we provided evidence that DNA synthesis was severely impaired on damaged M13mp18 for both *Pabpols*, we further investigated the insights of such reduced activities. Translesional synthesis of a unique AP site from wild-type or exonuclease-deficient *Pabpols* were examined under running start conditions using either linear or mini-circular oligonucleotides DNA templates. The presence of the AP site was controlled by using T4 DNA polymerase as already described (Blanca *et al.*, 2007). While *PabpolB* *exo*⁺ could bypass the abasic site with moderate efficiency (63%) at a ratio enzyme/DNA of 4:1, under these conditions *PabpolB* *exo*⁻ displayed almost full translesion synthesis (93%) (Fig. 3A, compare lanes 7 and lanes 14, respectively, for *PabpolB* *exo*⁺ and *PabpolB* *exo*⁻). Moreover, *PabpolB* *exo*⁺ had an increased capacity to stall at the AP site, as showed by the more marked presence of pausing sites at the lesion (Fig. 3A, lanes 3–7). The efficiency of the bypass was dependent on the amount of the DNA polymerase used and the presence or absence of the 3'- to 5' exonuclease but, in all cases, a plateau could be reached near the equimolar enzyme/DNA concentrations (Fig. 3A, lanes 4–5 and lanes 11–12, respectively, for *PabpolB* *exo*⁺ and *PabpolB* *exo*⁻). The tolerance of the abasic site was reproducible and confirmed by using a linear 73-mer with a different DNA sequence context (data not shown) as already described (Tanguy Le Gac *et al.*, 2004). When replicating the circular DNA template, the translesion ability of *PabpolB* *exo*⁺/*exo*⁻ was reduced at all enzyme concentrations tested. Interestingly, even at the highest concentrations of *PabpolB* over the mini-circle template,

translesion synthesis across the AP site for *PabpolB* *exo*⁺ only reached 32% at its peak (Fig. 3B, lane 7) whereas it was much more effective, reaching up to 86% for *PabpolB* *exo*⁻ (Fig. 3B, lane 13). In addition, under these saturating conditions, there was a stimulation of strand displacement activity of the two *PabpolB* versions, as indicated by the proportion of products longer than the 87-mer (Fig. 3B, lane 6–7 and 12–13). Taken together these results indicate that *PabpolB* has the capacity to replicate past an AP site at high pol/DNA ratio. The proof-reading activity of *PabpolB* influences its translesion capacity and progression of both exonuclease-deficient and proficient *PabpolB* are reduced in the presence of the mini-circular DNA template.

Replication of AP-containing mini-circular and linear oligonucleotides DNA template by the wild-type or exonuclease-deficient PabpolD

The ability of *PabpolD* *exo*⁺/*exo*⁻ to bypass an abasic site onto the linear and circular oligonucleotides DNA templates was analysed and the results are presented in Fig. 4. As it can be seen, *PabpolD* *exo*⁺ could incorporate in front of the AP site but, contrary to *PabpolB*, could not extend past the lesion both on linear and circular DNA templates at all the enzyme's concentrations tested (lanes 3–7 in Fig. 4A, and in Fig. 4B). In addition, accumulation of a shorter product at position +32 could be detected, indicating the 'idling' activity of the *PabpolD* *exo*⁺. *PabpolD* *exo*⁻ was also blocked at the AP site in the presence of the linear template but longer products past the AP site at position +34, +35 and +36 could be detected, although they never reached the full length of the 87-mer, even at saturating enzyme concentrations (Fig. 4A, lanes 9–13). Interestingly, 35% of bypass could be measured at a ratio *PabpolD* *exo*⁻/DNA of 4:1 on the linear DNA template. Similarly, when the experiments were repeated in the presence of the mini-circle DNA template, a strong block at the AP site (+33) could be

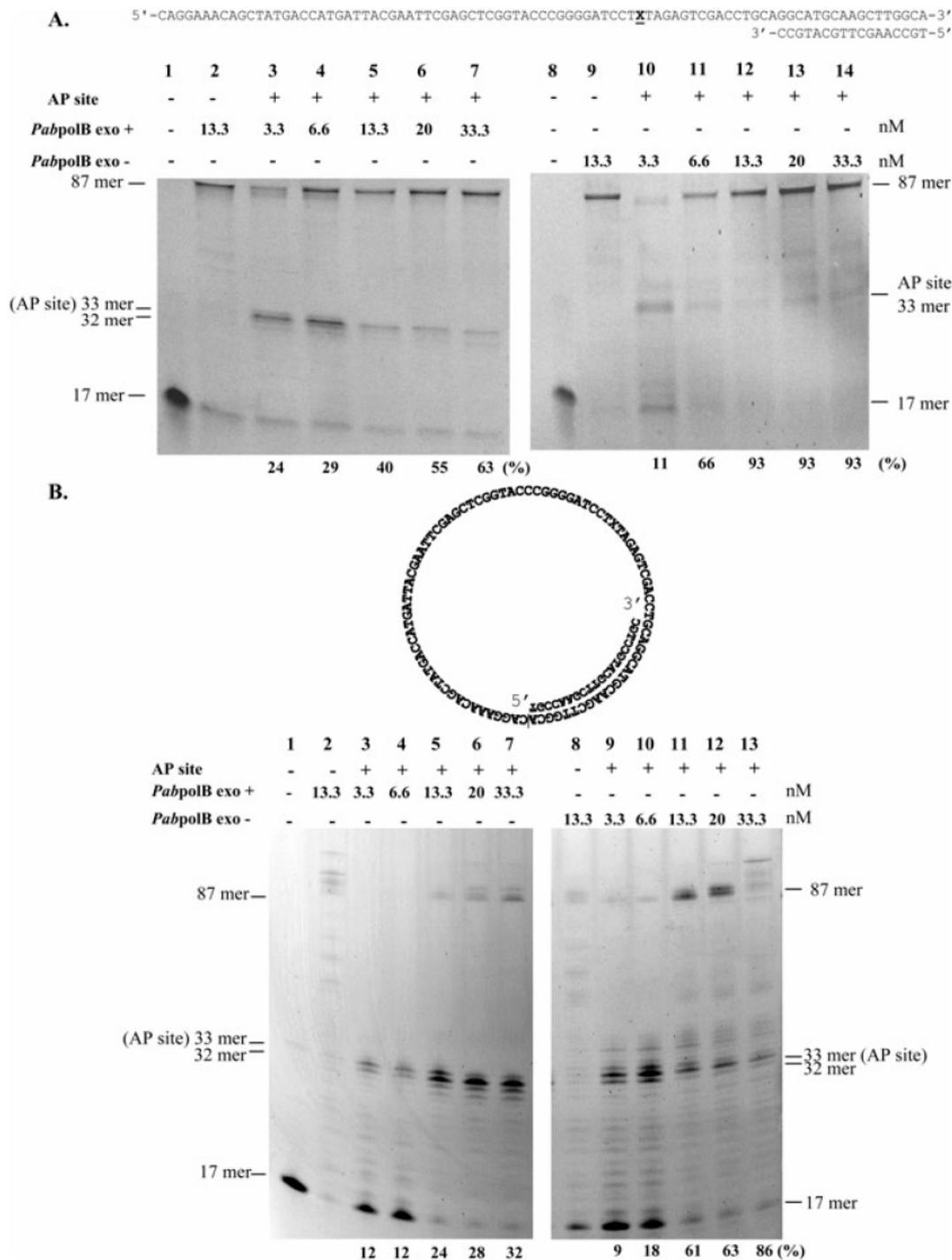


Fig. 3. Replication of AP-containing mini-circular and linear oligonucleotides DNA templates by the wild-type or exonuclease-deficient *PabpolB*. Primer extension assays were performed at the indicated *PabpolB* concentrations with 8.3 nM of primer template (oligonucleotides 1 and 5), 200 μM dNTPs at 55°C for 30 min as described in the *Experimental procedures*. Quantifications of the extended products from the AP site are mentioned below the gels. The extent of the bypass reaction was calculated as the ratio of the intensity of the bands downstream of the AP site to the intensity of the bands opposite the lesion.

A. Replication onto the AP site-containing linear template. The position of the abasic site is indicated by X. Lanes 2 and 9 correspond to the positive control with 8.3 nM of intact template (X = C).

B. Replication of the AP site-containing circular template. Lanes 2 and 8 correspond to the positive control with 8.3 nM of intact template (X = C). 32-mer indicates the position of the base preceding the AP site, while 33-mer is the position of the AP site.

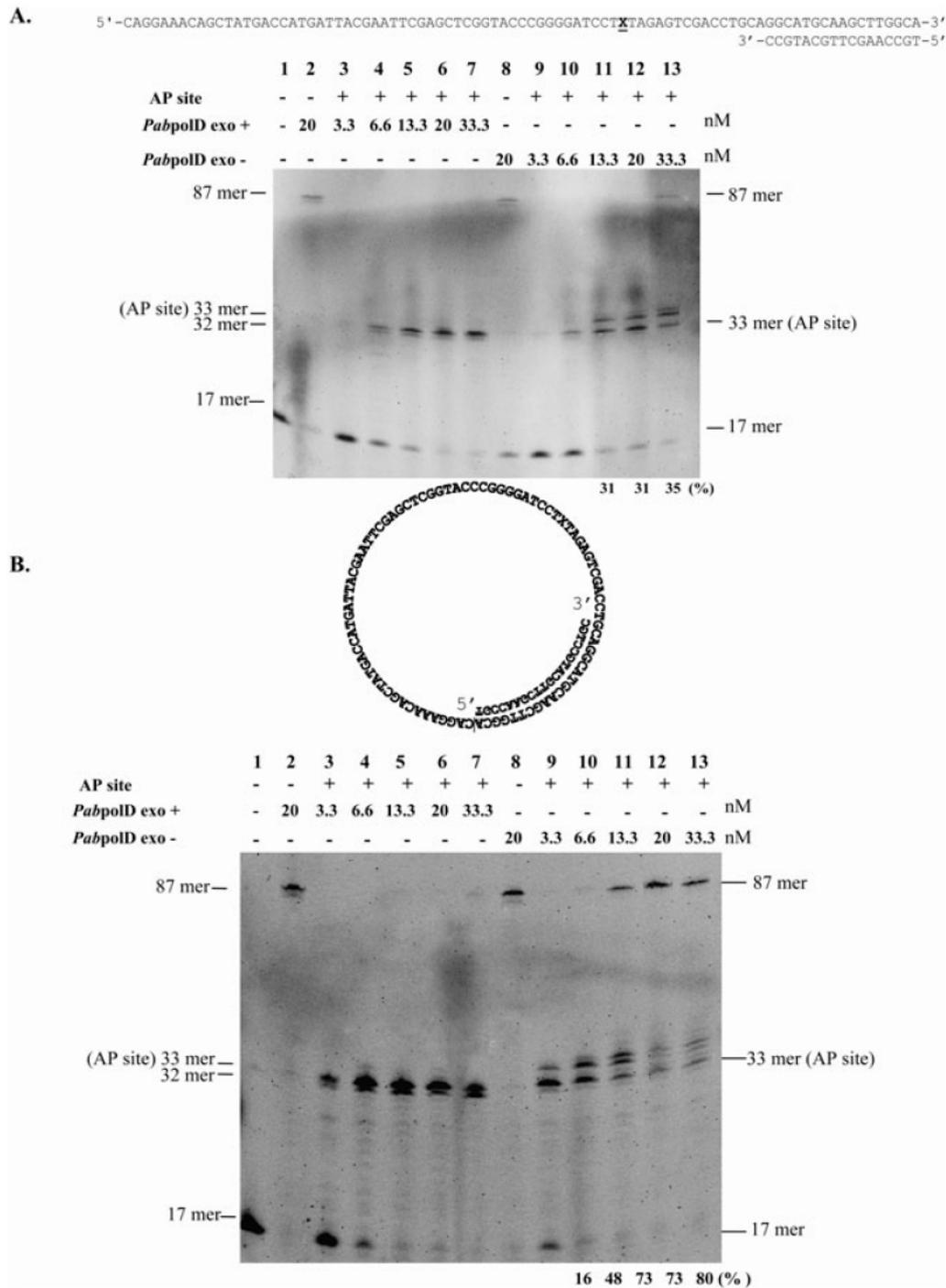


Fig. 4. Replication of AP-containing mini-circular and linear oligonucleotides DNA templates by the wild-type or exonuclease-deficient *Pabp*oD. Primer extension assays were performed at the indicated *Pabp*oD concentrations with 8.3 nM of primer template (oligonucleotides 1 and 5), 200 μ M dNTPs at 55°C for 30 min as described in the *Experimental procedures*. Quantification of the extended products from the AP site is mentioned below the gels. The extent of the bypass reaction was calculated as the ratio of the intensity of the bands downstream of the AP site to the intensity of the bands opposite the lesion.

A. Replication onto the AP site-containing linear template. The position of the abasic site is indicated by X. Lanes 2 and 8 correspond to the positive control with 8.3 nM of template (X = C).

B. Replication of the AP site-containing circular template. Lanes 2 and 8 correspond to the positive control with 8.3 nM of template (X = C). 32-mer indicates the position of the base preceding the AP site, while 33-mer is the position of the AP site.

Table 2. Incorporation kinetics by wild-type and exonuclease-deficient *Pabpols*.

	DNA polymerase	dNTP	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$f(\text{misinsertion frequency})$	
Insertion opposite C	<i>PabpolB</i> <i>exo+</i>	dATP	ND	ND	ND		
		dTTP	ND	ND	ND		
		dGTP	0.25 ± 0.01	425.27 ± 0.12	1671.5		
	<i>PabpolD</i> <i>exo+</i>	dATP	ND	ND	ND		
		dTTP	ND	ND	ND		
		dGTP	0.19 ± 0.02	66.70 ± 0.69	346.36		
	<i>PabpolB</i> <i>exo-</i>	dATP	18.70 ± 1.23	61.09 ± 0.43	3.27	0.11	
		dTTP	5.46 ± 0.05	35.05 ± 0.86	6.42	0.21	
		dGTP	1.98 ± 0.35	60.29 ± 0.15	30.41	1.00	
	<i>PabpolD</i> <i>exo-</i>	dATP	32.01 ± 2.11	23.07 ± 0.37	0.72	0.02	
		dTTP	74.47 ± 9.16	39.71 ± 1.28	0.53	0.16	
		dGTP	17.00 ± 3.50	32.50 ± 1.30	1.91	0.57	
	Insertion opposite AP site	<i>PabpolB</i> <i>exo+</i>	dATP	100 ± 9	87 ± 4	0.79	
			dTTP	121 ± 7	91 ± 4	0.75	
			dGTP	610 ± 40	120 ± 8	0.20	
<i>PabpolD</i> <i>exo+</i>		dATP	ND	ND	ND		
		dTTP	36 ± 3	114 ± 4	3.17		
		dGTP	650 ± 20	102 ± 2	0.16		
<i>PabpolB</i> <i>exo-</i>		dATP	ND	ND	ND		
		dTTP	ND	ND	ND		
		dGTP	4.19 ± 0.31	89.42 ± 1.23	21.35		
<i>PabpolD</i> <i>exo-</i>		dATP	15.02 ± 0.18	62.92 ± 0.11	4.19		
		dTTP	8.88 ± 2.35	73.68 ± 4.71	8.30		
		dGTP	ND	ND	ND		
<i>PabpolB</i> <i>exo-</i>		dATP	12.00 ± 2.41	29.03 ± 1.32	2.42		
		dTTP	76.19 ± 0.85	25.55 ± 0.07	0.34		
		dGTP	70.41 ± 7.61	12.43 ± 0.36	0.18		
<i>PabpolD</i> <i>exo-</i>	dATP	82.08 ± 6.12	30.72 ± 0.54	0.37			
	dTTP						
	dGTP						

Single nucleotide insertion assays were performed as described in *Experimental procedures*. The observed rates of deoxynucleotide incorporation as a function of dNTP concentration were firstly determined from Lineweaver–Burk plots. The data were fit by non-linear regression using the Marquardt–Levenberg algorithm (Enzfitter 2.0, BioSoft) to the Michaelis–Menten equation describing a hyperbola, $v = (V_{max} \times [dNTP]) / (K_m + [dNTP])$ as already described (Le Breton *et al.*, 2007). Apparent K_m and V_{max} kinetic parameters were obtained from the fit and were used to calculate the efficiency of deoxynucleotide incorporation (k_{cat}/K_m). The kinetics values are the average of at least triplicate determinations and are shown with SD. The $f(\text{misinsertion frequency})$ is the ratio k_{cat}/K_m for the incorrect nucleotide to k_{cat}/K_m for the correct nucleotide. ND means no detectable incorporation observed.

observed for *PabpolD* *exo-* present at lower concentration to the DNA template (Fig. 4B, lanes 9–10). Moreover, DNA synthesis continued past the AP site at position +34, +35 and +36, but was also able to reach up to the full-length 87-mer (Fig. 4B, lanes 11–13), when the concentration of the enzyme was higher than that of the mini-circle DNA template. Therefore, in the case of *PabpolD*, its exonuclease activity prevents translesion synthesis of an abasic site independently of the structure of DNA template, while the *exo-* mutant shows some bypass capacity that seems enhanced in the case of a mini-circular DNA.

Steady-state kinetic analysis of nucleotide incorporation of wild-type and exonuclease-deficient *Pabpols* opposite undamaged bases

Pabpols have been designated as replicative DNA polymerases (Henneke *et al.*, 2005). This designation sup-

poses that *Pabpols* must endow with high selectivity for each incoming nucleotide depending on the nature of the base-containing template. Nucleotide incorporation kinetics were measured in standing start reactions as described in *Experimental procedures*. Incorporation efficiency (k_{cat}/K_m) was measured for the wild-type and exonuclease-deficient *Pabpols* and the frequency of nucleotide misinsertion was calculated as the ratio of the efficiency (k_{cat}/K_m) of incorrect nucleotide incorporation to the efficiency (k_{cat}/K_m) of correct nucleotide incorporation (Table 2). Both wild-type *Pabpols* exclusively incorporated the correct dGMP opposite template C and no misincorporation could be detected. In these conditions, a fivefold reduced incorporation efficiency for *PabpolD* compared with *PabpolB* was observed as indicated by the k_{cat}/K_m values. The results obtained with the exonuclease-deficient *Pabpols* at template C showed that the correct dGMP was preferentially incorporated but their efficien-

cies were dramatically reduced compared with the wild-type enzymes, as judged from the dropped k_{cat}/K_m values, 55- and 103-fold, respectively, for *PabpolB* and *PabpolD*. In addition, misinsertion events by the exonuclease-deficient *Pabpols* at template C were comparable, with preference for insertion of dTMP > dAMP > dCMP (Table 2). Taken together, these results demonstrate that, while wild-type *Pabpols* monitor the instructional base of the template and discriminate between correct and incorrect nucleotides insertion, exonuclease-deficient *Pabpols* are much less efficient.

Steady-state kinetics analysis of nucleotide incorporation of wild-type and exonuclease-deficient Pabpols opposite an AP site

The efficiency for deoxynucleotide insertion opposite an abasic site for the wild-type *PabpolB* followed the order dAMP > dTMP and to a lesser extent dGMP. Interestingly, *PabpolB* *exo*⁺ incorporated a dGMP 8355-fold less efficiently opposite an AP site than opposite the template C (Table 2). Similarly, as judged by the k_{cat}/K_m values, *PabpolD* *exo*⁺ incorporated preferentially a dAMP over a dTMP opposite the abasic site with a 20-fold higher magnitude efficiency. It is noteworthy that the apparent K_m values from the incorporation of nucleotides opposite the abasic site were always higher than from the insertion of a correct dGMP at template C. Thus, proficient proof-reading *Pabpols* are sensitive to abasic sites and are not efficient at inserting a nucleotide opposite such as non-instructive lesion. As observed from the k_{cat}/K_m values, *Pabpols* *exo*⁻ inserted a dAMP more efficiently than other deoxynucleotides opposite the AP site. While incorporation efficiencies of dAMP, dGMP and dTMP were higher when the proof-reading function of *PabpolB* was deficient, no striking difference was observed between the wild-type and exonuclease-deficient *PabpolD*. Therefore, *PabpolB* and *PabpolD* exonuclease-deficient resemble each other in their ability to insert nucleotides opposite an abasic site with higher efficiencies for dAMP incorporation. Taken together, the data show that, while wild-type *PabpolB* does not significantly discriminate among nucleotides for incorporation opposite an AP site, the exonuclease-deficient *PabpolB* and both wild-type and exonuclease-deficient *PabpolD* were much sensitive to a non-coding lesion that seems to govern the dAMP incorporation rather than other dNTPs.

Effect of varying the downstream template base on nucleotide incorporation opposite an AP site by the Pabpols

The primer templates used in these experiments were designed in order to examine the effect of changing the

template base (N) at the 5' side of the AP site (X) on the initiation of the extension of the primer. Nucleotide incorporation was measured in standing start reactions under standard *Pabpols* assay conditions. The 32-mer primer (oligonucleotide 6) was annealed to the four templates differing by the nature of the base N = A, T, G and C at the 5' side of the AP site (Oligonucleotides 2, 1, 3, 4, respectively) (Fig. 5). Extension of the primer in the four duplexes was conducted in the presence of each of the natural dNTPs. On the one hand, the wild-type *Pabpols* exclusively inserted a dAMP opposite the abasic lesion, independently of the sequence context (Fig. 5A and 5B). While the percentages of incorporation of a dAMP ranged from 46% to 58% for *PabpolD* *exo*⁺, they only reached 18% for *PabpolB* *exo*⁺. The *Pabpols* *exo*⁻ also preferentially incorporated a dAMP opposite the AP site with a higher order of magnitude compared with the *Pabpols* *exo*⁺. For example, the percentages of incorporation of a dAMP ranged from 66% to 72% for *PabpolD* *exo*⁻ and from 46% to 58% for *PabpolB* *exo*⁻ (Fig. 5B and D respectively). However, unlike *Pabpols* *exo*⁺, the *Pabpols* *exo*⁻ also inserted other dNMPs opposite the non-instructive lesion, following the order: dAMP > dGMP > dTMP > dCMP for *PabpolB* *exo*⁻ and dAMP > dTMP > dCMP > dGMP for *PabpolD* *exo*⁻, independently of the sequence context (Fig. 5C and D respectively). Thus, these results demonstrate that nucleotide incorporation opposite an AP site by the *Pabpols* *exo*⁺/*exo*⁻ is not directed by the nature of the base located at the 5' side of the AP site.

Discussion

In hyperthermophiles, cellular and environmental stresses encountered by cells are likely to be exacerbated by adaptation to extreme conditions. Cell survival is ensured by a complex network of DNA events that contributes to the maintenance of the functional integrity of nucleic acids at high temperature. Here, we have focused the study on *P. abyssi*, an anaerobe hyperthermophilic euryarchaeota (HA) that thrives at elevated temperature in the immediate surroundings of deep-sea hydrothermal vents. This is the first report that establishes a relationship between the specific genomic level of abasic sites and the resulting impact on the intrinsic properties of replicative DNA polymerases in archaea. These features show that *P. abyssi* can be used as an informative model to analyse the biological relevance of DNA damage accumulation in the hyperthermophilic chromosome and the underlying genomic maintenance mechanisms.

The investigation presented here shows that the steady-state level of AP sites into the 1.7 million base pairs of *P. abyssi* ranged from 25 to 42 AP sites per 100 000 bp during the exponential and stationary phases

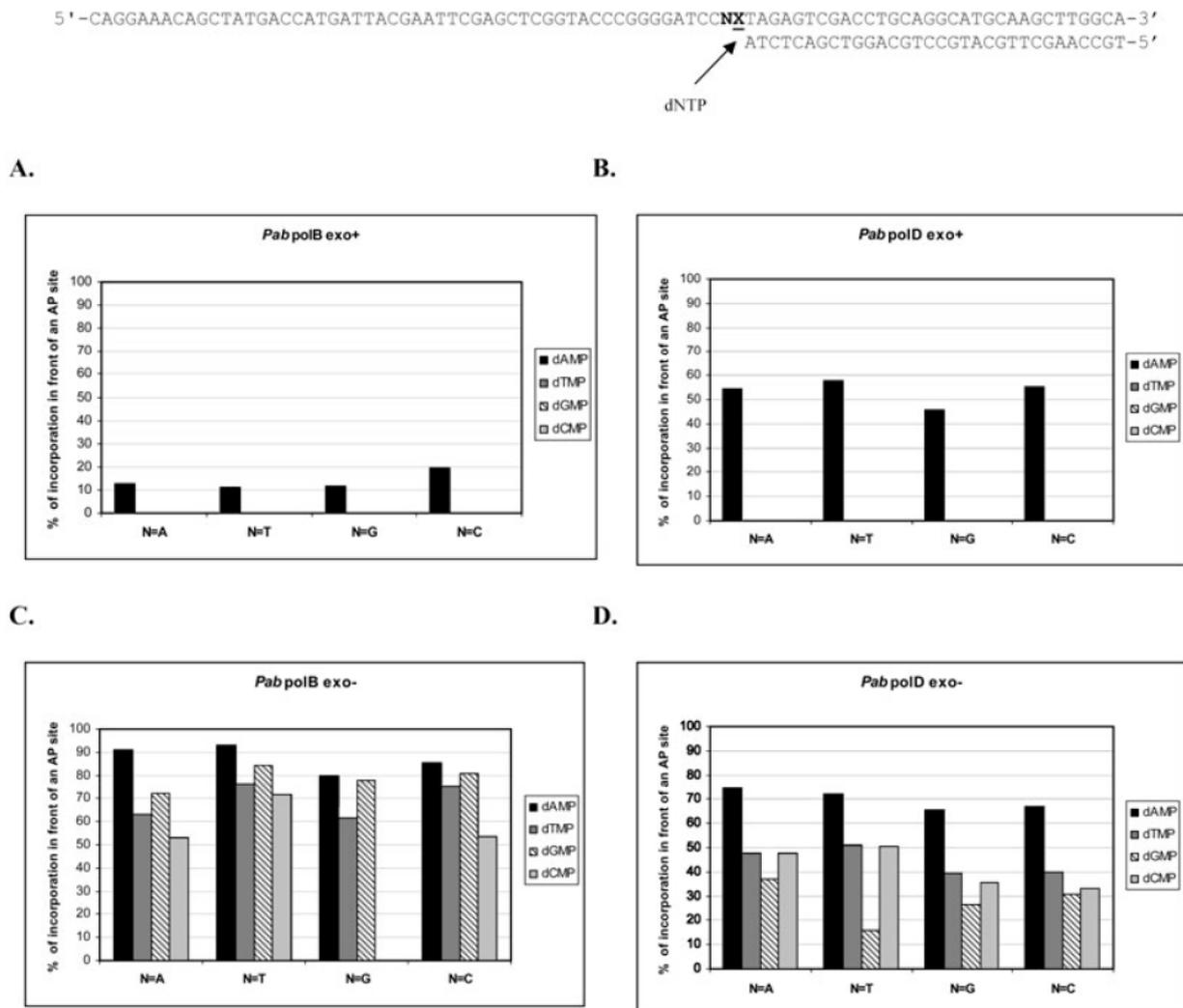


Fig. 5. Effect of varying the downstream template base on nucleotide incorporation opposite an AP site by *Pabpol*s. Standing start reactions were performed with four DNA templates that varied by the nature of the 5' template base. The fluorescein-labelled primer (oligonucleotide 6) was annealed right before the template AP site that is indicated by X. Different template bases 5' to the AP site are depicted by N (N = A, oligonucleotide 2; N = T, oligonucleotide 1; N = G, oligonucleotide 3; N = C, oligonucleotide 4) (Table 1). Single nucleotide incorporations were carried out as described in *Experimental procedures* with the different primed templates, 13 nM of *PabpolB* *exo+*/*exo-*, 20 μ M of each dNTP at 55°C for 30 min.

- A. Reaction with 13 nM *PabpolB* *exo+*.
- B. Reaction with 20 nM *PabpolD* *exo+*.
- C. Reaction with 13 nM *PabpolB* *exo-*.
- D. Reaction with 20 nM *PabpolD* *exo+*.

respectively. Similarly, a twofold increase of AP sites is observed in *E. coli*. These findings corroborate the higher efficiency of DNA protection and repair mechanisms in proliferating cells, compatible with a low level of AP sites. However, it is important to precise that our expectation to detect a drastic increased number of abasic sites in the hyperthermophilic chromosome was not fulfilled. Indeed, the level was only 10-fold higher than in the mesophilic bacteria *E. coli*. Comparatively, the frequency of endogenous AP sites in mammalian cells reached 10–12 AP

sites per 100 000 bp (Zhao *et al.*, 2006). Indeed, in the literature, the number of AP sites in the genome of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms is always suspected to increase drastically compared with the mesophilic counterparts (Grogan, 1998; 2000). This assumption takes into account of the intrinsic properties of the primary structure of DNA at elevated temperatures, corresponding to a 3000-fold increase in DNA decay at 100°C (Lindahl, 1993). Conceivably, *P. abyssi* has evolved to adjust genetically the level of endogenous AP

sites in its genome that could be detrimental for genome integrity of mesophiles. Accumulation of AP sites and, more generally, others DNA lesions can be envisaged, suggesting that hyperthermophiles are adapted to survive pre-existing mutations. Clearly, these results establish that the number of AP sites seems to evolve respect to the growth stage without affecting cell growth and viability. However, further studies are required to determine the threshold that hyperthermophiles can support to ensure cell survival.

Evolution has produced multiple DNA polymerases able to replicate undamaged or damaged DNA. Sixteen DNA polymerases have been described in human, nine in *Saccharomyces cerevisiae*, five in *E. coli* (Hubscher *et al.*, 2002; Bebenek and Kunkel, 2004; Rothwell and Waksman, 2005) and up to five in archaea (Yang, 2005; Barry and Bell, 2006). Interestingly, the genome of the euryarchaeota *P. abyssi* encodes only two DNA polymerases, families B and D, required to faithfully duplicate the genetic information (Henneke *et al.*, 2005). In this study, steady-state kinetic analyses of nucleotide insertion show for the first time that *PabpolD* is endowed with high fidelity onto undamaged DNA as its replicative counterpart, *PabpolB* (Table 2). Incorporation efficiency of *PabpolD* was reduced to fivefold compared with *PabpolB*, demonstrating that *Pabpols* possesses distinct kinetic properties.

Our results give evidence that the presence of AP sites strongly inhibited the DNA polymerizing activity of both *Pabpols* and that the absence of their proof-reading function correlates with enhanced bypass of AP sites. The degree of inhibition of DNA synthesis was dependent upon the *Pabpol* examined. *PabpolD* could insert a nucleotide opposite the AP site and, in all conditions tested, was not able to extend beyond the 3' primer lesion. *PabpolB* inserted opposite the AP site and extended the DNA template to the full length, only when present at a molar excess over the template. This result is comparable to previous studies showing that molar excess of enzyme versus DNA template could enhance translesion synthesis by DNA polymerases past an abasic site (Tanguy Le Gac *et al.*, 2004; McCulloch and Kunkel, 2006; Blanca *et al.*, 2007). While translesion synthesis of both exonuclease-proficient and deficient *PabpolBs* and the exonuclease-deficient *PabpolD* was differently affected by the topology of the DNA template, the template sequence context did not significantly influence the bypass properties of *Pabpols*. Further, both *Pabpols* inserted dAMP opposite the AP site independently of the nature of the 5' template base to the AP site. Despite this nucleotide selectivity, steady-state kinetics showed that dAMP incorporation was not efficient. These observations show for the first time that archaeal replicative (families B and D) DNA polymerases follow the 'A-rule' (Strauss, 1991; Taylor, 2002) like eukaryal and

bacterial counterparts (Shibutani *et al.*, 1997; Haracska *et al.*, 2001). The physical basis of the 'A-rule' is still an intensive debate (Kool, 2002; Zahn *et al.*, 2007) and structural studies reported the molecular level of replication blockage that produced catalytically inactive DNA polymerases (Freisinger *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 2004). Whether the molecular and physical bases are conserved through archaeal replicative DNA polymerases would have to be unravelled. Accordingly, the ability of abasic sites to inhibit *Pabpols* could reflect steric constraints imposed by the 'tightness' of the active site. Furthermore, the capacity to partition the mispairs away from the polymerase domain into the exonuclease active site might exhibit structural rearrangements that are differentially influenced by the dynamic features of the DNA polymerase. To this point, the major distinction between the two *Pabpols* is the subunits composition. While *PabpolB* is a monomeric enzyme with associated exonuclease and polymerase activities, *PabpolD* is a heterodimeric enzyme with the large and the small subunits carrying, respectively, the polymerase and the exonuclease activities (Gueguen *et al.*, 2001). Therefore, it is reasonable to suggest that the architecture of the two DNA polymerases may account for the subtle differences observed within the polymerase and exonuclease efficiencies. However, a complete detailed functional analysis must await the crystal structure of the individual *Pabpols*. The balance between polymerization and excision was recently described in B-family DNA polymerase in archaea (Kuroita *et al.*, 2005) but never in D-family. The distinct kinetic partitioning of insertion and edition of mispairs observed within *Pabpols* corroborates with eukaryal and bacterial homologues properties (Jin *et al.*, 2003; 2005; Pages *et al.*, 2005) and confers that replicative DNA polymerases are high-fidelity enzymes (Bloom *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2002).

The downregulation of the proof-reading function of *PabpolB* could favour TLS in order to overcome the block imposed by AP sites. Bypass of AP sites could generate either single-base substitutions or frameshift mutations (Baynton and Fuchs, 2000). *PabpolB* appears to proceed through single-base substitution upon completion of DNA template containing an AP site. The molar excess of the enzyme over the DNA template accounted for TLS under our *in vitro* conditions. On the other hand, a replicative *Pabpol* idling at a DNA lesion could be a crucial factor to trigger cellular responses to DNA damage in *P. abyssi*. The mechanism by which proof-reading activities of archaeal DNA polymerases could be regulated *in vivo* (dNTPs balance, role of accessory proteins and enzymes switching) and their contribution in some cases to counteract genomic DNA lesions has to be elucidated. Recently, it was described that *P. abyssi* has evolved with efficient DNA strategies to cope with ionizing radiations and elevated temperatures (Jolivet *et al.*, 2003). Bio-

chemical evidence for relevant DNA repair mechanisms has not been demonstrated in *P. abyssi* yet. More striking is the lack of identification of any mismatch repair genes and the complete set of damage excision genes (Cohen *et al.*, 2003). Interestingly, homologous recombination genes (*RecA/Rad51*) have been identified into the genome sequence of *P. abyssi* together with the fact that exponentially growing thermophilic archaea contain several copies of the chromosome (Bernander and Poplawski, 1997; Breuert *et al.*, 2006). This might be particularly consistent for the repair of strand breaks. Furthermore, it is not excluded that the recently characterized primase from *P. abyssi* could also play a role in damage avoidance as it possesses sequence and structural similarities with the family X DNA polymerases (Le Breton *et al.*, 2007). Ultimately, the process of such DNA lesions would have to be explored by the *P. abyssi* replisome in the context of genomic mutagenicity.

Experimental procedures

Strains and cell culture techniques

Pyrococcus abyssi GE5 (Brittany Culture Collection, <http://www.ifremer.fr/souchotheque>) were grown in 50 ml YPS medium under anaerobic conditions at 95°C (Erauso *et al.*, 1993). The *E. coli* CIP 54.8 strain (CRBIP) was cultivated in 1 l of Luria–Bertani (LB) broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) at 37°C and pH 7.3, in a shaking incubator (170 r.p.m.). Growth was monitored by density measurements with a cell Thoma counting chamber (0.02 mm depth). Samples for DNA extraction were collected in the exponential and stationary growth phases as indicated in Fig. 1. The samples for DNA extraction were centrifuged at 6000 g for 15 min at 4°C and the pellets were stored at –20°C.

Genomic DNA isolation and detection of AP sites

Genomic DNA from *P. abyssi* was isolated using the extraction method as described (Charbonnier *et al.*, 1995) and optimized in order to avoid the formation of additional AP sites. Briefly, cell pellets were suspended in 800 µl TE-Na-1 X lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0). This was followed by successive additions of 50 µl proteinase K (20 mg ml⁻¹), 100 µl Sarcosyl (10%), 100 µl SDS (10%). The applied lysis treatment was performed at 37°C for 1.5 h and isolation of the total DNA was accomplished by adding an equal volume of buffered (pH 8.0) PCI (Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol: 25/24/1). The samples were gently mixed and the aqueous phases were collected by centrifugation at 10 000 g for 10 min at 4°C. A total of 10 µl RNase (10 mg ml⁻¹) were added and incubation was performed at 37°C for 1 h. DNAs were purified with an equal volume of PCI and centrifuged. The upper phase was extracted with an equal volume of pure chloroform and centrifuged. DNA precipitation was obtained by mixing the final aqueous phase with 0.7 volume of 100% isopropanol followed by incubation for 1 h at room temperature. After a

30 min centrifugation at 15 000 g at 4°C, the DNA pellets were washed once with 0.5 ml of 70% ice cold ethanol. Finally, the DNA pellets were air-dried during 1 h before solubilization in TE-1X buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5).

Genomic DNA extractions from *E. coli* were performed following the CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide) method for Gram-negative bacteria as described (Park, 2007).

The level of AP sites in genomic DNA was measured using the DNA damage quantification –AP site Counting kit from Dojindo Molecular Technologies (Gaithersburg, MD). DNA pellets were dissolved in TE buffer supplied by the kit and DNA concentrations were exactly adjusted to 100 ng µl⁻¹. Briefly, DNA samples were incubated with the Aldehyde Reactive Probe reagent (N'-aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin) that specifically reacted with the aldehydic ring-opened AP sites (Kubo *et al.*, 1992; Kow and Dare, 2000). The AP sites tagged with biotin interacted with horseradish peroxidase-streptavidin and AP sites were colorimetrically detected. For each condition, the average of three measurements per sample was used in the statistical analyses.

Chemicals and enzymes

Unlabelled dNTPs were from MP Biomedicals. T4 polynucleotide kinase, DNA ligase and T4 DNA polymerase were from New England Biolabs. *Pabp*D was cloned, expressed and purified as described (Henneke *et al.*, 2005). *Pabp*B (Iis DNA polymerase) and *Pabp*B exonuclease-deficient (Pyra DNA polymerase) were purchased from MP Biomedicals. One unit of *Pabp*ols corresponds to the incorporation of 1 nmol of total dTMP into acid precipitable material per minute at 65°C in a standard assay containing 0.5 µg (nucleotides) of poly(dA)/oligo(dT)₁₀₋₁. All other reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich and Fluka.

Construction, expression and purification of the recombinant wild-type and exonuclease-deficient His tag *Pabp*D

The pET26b expression vector containing the *Pabp*D large subunit (DP2) (Gueguen *et al.*, 2001) was digested with NdeI and Sall and the resulting fragment was inserted into the pET28a expression vector (Novagen) in order to introduce a histidine tag (His tag) at the N-terminus. To render the *Pabp*D exonuclease-deficient, site-directed mutagenesis was carried out by introducing the H451A point mutation onto the *Pabp*D small subunit (DP1) (Gueguen *et al.*, 2001). The two site-specific complementary primers, reverse H451A 5'-TGGCCTAGCGGCATCGGCATTTCTGGCCCTAT-3' and forward H451A 5'-ATAGGGCCAGGAAATGCCGATGCCGCTAGGCCA-3', were used to PCR amplify the pARHS expression vector containing DP1 according to the protocol of the Quick change Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). DNA sequencing was used to confirm that no spurious mutations had been introduced during PCR. The constructed expression vectors pET28a/DP2 and either the wild-type or the

exonuclease-deficient pARHS/DP1 were reintroduced into host *E. coli* HMS174 (DE3). The transformed cells were grown in 1.5 l LB medium containing ampicillin (100 µg ml⁻¹) and kanamycin (30 µg ml⁻¹) at 37°C. When A₆₀₀ reached 0.7, 1 mM isopropylthio-β-D-galactoside was added to induce expression of active DNA polymerases. After being cultured 4 h at 37°C with gentle shaking (160 r.p.m.), the cells were harvested by centrifugation, resuspended in 25 ml buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.6, 1 mM DTT, 20 mM Imidazole) containing the protease inhibitor, disrupted on ice by French press and then heat-treated at 80°C for 15 min. Denatured host proteins were removed by centrifugation. The clarified supernatant was applied further onto Ni²⁺-HisTrap column (5 ml of bed volume) pre-equilibrated with buffer A. Proteins were eluted with buffer B (20 mM sodium phosphate, pH 6.6, 1 mM DTT, 500 mM Imidazole) and active fractions were pooled and dialysed against buffer C (20 mM sodium phosphate, pH 6.6, 1 mM DTT). The dialysate was loaded onto a heparin column (5 ml of bed volume) pre-equilibrated with buffer D (20 mM sodium phosphate, pH 6.6, 1 mM DTT, 0.15 M NaCl). The column was developed with a linear gradient from buffer D to buffer E (20 mM sodium phosphate, pH 6.6, 1 mM DTT, 1 M NaCl). Eluted protein showed over 98% purity. Pure His-*Pabp*olD (wild-type and exonuclease-deficient) were dialysed against storage buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT, and 50% glycerol) and stored at -20°C until use. We checked by acid precipitable assay, as described (Henneke *et al.*, 2005), that the addition of the His tag at the N-terminus of DP2 had no effect on the DNA polymerization activities. Moreover, the 3'-5' exonuclease deficiency for the mutant H451A was confirmed (data not shown). Sequence alignment of exonuclease domain in representative euryarchaeal DNA polymerases highlighting residues critical for proof-reading function is shown in Fig. S1.

Nucleic acid substrates

Single-stranded (ss) M13mp18 was purchased (Amersham Biosciences, GE Healthcare). In order to create AP sites into natural DNA templates, the ssM13mp18 viral DNA was incubated at a final concentration of 0.18 pmol µl⁻¹ in 30 mM potassium chloride, 10 mM sodium citrate, pH 3.0 at 70°C for 45 min (Schaaper *et al.*, 1983). These conditions introduced one AP sites per molecule in 4 min, measured by survival (Schaaper and Loeb, 1981). After treatment, the damaged M13mp18 was purified with the QIAquick® PCR Purification Kit from Qiagen (Germany).

The sequences of the DNA primers/templates used in the present study are depicted in Table 1. All oligonucleotides, including those containing a tetrahydrofuran moiety mimicking an abasic site, were chemically synthesized and gel-purified (Eurogentec, Belgium). Primers were labelled at their 5'-end by fluorescein with the 5' End Tag kit labelling system from Vector Laboratories (California). Free fluorescein was removed through the Microspin G-25 column (Amersham Biosciences, GE Healthcare) and the labelled primers were hybridized to the respective templates at equimolar concentrations.

The mini-circle template was prepared as described (Tanguy Le Gac *et al.*, 2004). Briefly, the linear 5'-phos-

phorylated oligonucleotide 1 (intact or containing the tetrahydrofuran moiety) was intramolecularly ligated under dilute conditions using a scaffold 40-mer oligonucleotide (5'-ATATTCTACCCTCCCGATCTATCCACCATACTACCCTCC-3'). Mini-circles were gel-purified and their concentration was determined spectrophotometrically, followed by annealing with their complementary 5'-fluorescein labelled primer at equimolar concentration.

Primer extension onto intact or damaged primed oligonucleotides

'Standing start' and 'Running start' assays were catalysed into a final volume (15 µl) containing the following components: (i) for *Pabp*olD: 8.3 nM of labelled primers/templates, 20 nM of *Pabp*olD *exo*+/*exo*- unless otherwise specified, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ and 200 µM dNTPs; (ii) for *Pabp*olB: 8.3 nM of labelled primers/templates, 13 nM of *Pabp*olB *exo*+/*exo*- unless otherwise mentioned, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂ and 200 µM dNTPs. Reactions were performed at 55°C for 30 min and quenched by the addition of 15 µl of stop buffer (98% formamide, 10 mM EDTA). Samples were heated at 95°C for 5 min. The reactions products were resolved on 15% polyacrylamide, 7 M urea gels and visualized with a Mode Imager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, GE Healthcare). Quantification of the results was performed using ImageQuant 5.2 software. The extent of the bypass reaction was calculated as the ratio of the intensity of the bands downstream of the AP site to the intensity of the bands opposite the lesion.

Effect of sequence context on AP site bypass was analysed under standing start conditions. The fluorescein-labelled primer (oligonucleotide 6) was annealed right before the template AP site that is indicated by X. Different template bases 5' to the AP site are depicted by N (N = A, oligonucleotide 2; N = T, oligonucleotide 1; N = G, oligonucleotide 3; N = C, oligonucleotide 4) (Table 1). Bypass assays were performed as described above excepted that 16 nM of DNA templates were used when the template base 5' to the AP site was: N = T and N = C for *Pabp*olB *exo*-, N = T and N = G for *Pabp*olD *exo*+, N = C for *Pabp*olB *exo*+. Quantification of nucleotides insertion opposite the AP site is calculated for wild-type and exonuclease-deficient *Pabp*ols in triplicate but only the more resolving gel was quantified.

Steady-state kinetic analyses

A 5'-fluorescein labelled primer, annealed to either a correct or damaged template, was extended in the presence of increasing concentrations of a single dNTP. *Pabp*ols concentrations and reaction times were set so that maximal product formation was ≤20% of the substrate concentration. The linear primer template (oligonucleotides 6 and 1) was extended with dNTP at 55°C in the presence of 6.6–33.3 nM enzyme for 1 or 5 min, depending on the proper utilization efficiency and substrate utilization. All reactions (15 µl) were carried out at various dNTP concentrations (in triplicate) and quenched with two volumes of a solution of 20 mM EDTA in 95% formamide (v/v). Products

were resolved using a 15% polyacrylamide (w/v) electrophoresis gel containing 7 M urea and visualized using a Mode Imager Typhoon 9400. Bands were quantified with ImageQuant 5.2 software (Amersham Biosciences, GE Healthcare). The observed rates of deoxynucleotide incorporation as a function of dNTP concentration were firstly determined from Lineweaver–Burk plots. The data were fit by non-linear regression using the Marquardt–Levenberg algorithm (EnzFitter 2.0, BioSoft) to the Michaelis–Menten equation describing a hyperbola, $v = (V_{\max} \times [dNTP]) / (K_m + [dNTP])$ as already described (Le Breton *et al.*, 2007). Apparent K_m and V_{\max} kinetic parameters were obtained from the fit and were used to calculate the efficiency of deoxynucleotide incorporation (K_{cat}/K_m). The kinetics values are the average of at least triplicate determinations and are shown with standard deviations. ND, means that no detectable incorporation was observed. Gel patterns and quantitation of single nucleotide incorporation reactions are shown in Fig. S2.

Primer extension onto intact or damaged M13mp18 DNA template

Product analysis. The oligonucleotide 6 was annealed to either the damaged AP-M13mp18 or undamaged M13mp18 at a molar ratio 3:1. Standard *Pabpols* reactions (10 μ l) were conducted into their respective buffer containing 200 μ M each of dNTPs, 7 nM of DNA template and 2 pmol of *Pabpols*. Reactions were carried out at 60°C for 30 min. T4 DNA polymerase reactions were performed at 37°C for 30 min into the 1 X T4 pol buffer (according to the manufacturer's protocol) with 7 nM of DNA template, 100 μ M each of dNTPs and 2 pmol of T4 DNA polymerase. Reaction mixtures were stopped by the addition of 10 μ l of 30 mM EDTA and the samples were heated to 100°C for 10 min. Reactions mixtures were subjected to a 0.8% (w/v) denaturing alkaline agarose gel electrophoresis, and replication products were visualized with a Mode Imager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, GE Healthcare). DNA ladders (Raoul markers, MP Biomedicals) were run into the same gel and revealed separately.

Acid precipitable assay. The reaction buffers composition was identical to those described in product analysis for *Pabpols* and T4 DNA pol. The final volume of 10 μ l contained 200 μ M of unlabeled dNTPs, 20 μ M [³H]dTTP, 7 nM of DNA template (AP-M13mp18 or undamaged M13mp18) and 2 pmol of enzyme to be tested. Reactions were carried out at 60°C and 37°C, respectively, for *Pabpols* and T4 DNA pol for 30 min. DNA were precipitated with 10% TCA. Insoluble radioactive material was determined by scintillation counting as described (Henneke *et al.*, 2005; Rouillon *et al.*, 2007).

Acknowledgements

We especially thank Kihei Kubo (Osaka Prefecture University, Sakai, Japan) for helpful technical comments on the Dojindo Kit. In addition, we thank Robert Fuchs for critical reading of the manuscript and very helpful discussions. This

work was supported by IFREMER and the Région Bretagne. G.V. was supported by CNRS and ARC (grant 4969).

References

- Barry, E.R., and Bell, S.D. (2006) DNA replication in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 876–887.
- Baynton, K., and Fuchs, R.P. (2000) Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends Biochem Sci* **25**: 74–79.
- Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **69**: 137–165.
- Bernander, R., and Poplawski, A. (1997) Cell cycle characteristics of thermophilic archaea. *J Bacteriol* **179**: 4963–4969.
- Blanca, G., Delagoutte, E., Tanguy le Gac, N., Johnson, N.P., Baldacci, G., and Villani, G. (2007) Accessory proteins assist exonuclease-deficient bacteriophage T4 DNA polymerase in replicating past an abasic site. *Biochem J* **402**: 321–329.
- Bloom, L.B., Chen, X., Fyngenson, D.K., Turner, J., O'Donnell, M., and Goodman, M.F. (1997) Fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. The effects of beta, gamma complex processivity proteins and epsilon proof-reading exonuclease on nucleotide misincorporation efficiencies. *J Biol Chem* **272**: 27919–27930.
- Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R. (2001) *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta. *Nucleic Acids Res* **29**: 4607–4616.
- Breen, A.P., and Murphy, J.A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* **18**: 1033–1077.
- Breuer, S., Allers, T., Spohn, G., and Soppa, J. (2006) Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS ONE* **1**: e92.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* **424**: 9–21.
- Charbonnier, F., Forterre, P., Erauso, G., and Prieur, D. (1995) Purification of plasmids from thermophilic and hyperthermophilic archaea. In *Archaea: A Laboratory Manual*. Robb, F.T., and Place, A.R. (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 87–90.
- Chen, X., Zuo, S., Kelman, Z., O'Donnell, M., Hurwitz, J., and Goodman, M.F. (2000) Fidelity of eucaryotic DNA polymerase delta holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **275**: 17677–17682.
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., *et al.* (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**: 1495–1512.
- Courcelle, J., Donaldson, J.R., Chow, K.H., and Courcelle, C.T. (2003) DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science* **299**: 1064–1067.
- Erauso, G., Reysenbach, A.L., Godfroy, A., Meunier, J.R., Crump, B., Partensky, F., *et al.* (1993) *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch Microbiology* **160**: 338–349.
- Freisinger, E., Grollman, A.P., Miller, H., and Kisker, C.

- (2004) Lesion (in)tolerance reveals insights into DNA replication fidelity. *EMBO J* **23**: 1494–1505.
- Friedberg, E.C. (2005) Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 943–953.
- Friedberg, E.C., Feaver, W.J., and Gerlach, V.L. (2000) The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5681–5683.
- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P. (2005) Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**: 499–505.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T. (2006) Biological responses to DNA damage. In *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 3–7.
- Grogan, D.W. (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol Microbiol* **28**: 1043–1049.
- Grogan, D.W. (2000) The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol* **8**: 180–185.
- Grogan, D.W. (2004) Stability and repair of DNA in hyperthermophilic archaea. *Curr Issues Mol Biol* **6**: 137–144.
- Grogan, D.W., Carver, G.T., and Drake, J.W. (2001) Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7928–7933.
- Gruz, P., Shimizu, M., Pisani, F.M., De Felice, M., Kanke, Y., and Nohmi, T. (2003) Processing of DNA lesions by archaeal DNA polymerases from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res* **31**: 4024–4030.
- Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., et al. (2001) Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem* **268**: 5961–5969.
- Haracska, L., Unk, I., Johnson, R.E., Johansson, E., Burgers, P.M., Prakash, S., and Prakash, L. (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev* **15**: 945–954.
- Henneke, G., Flament, D., Hubscher, U., Querellou, J., and Raffin, J.P. (2005) The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J Mol Biol* **350**: 53–64.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374.
- Hogg, M., Wallace, S.S., and Double, S. (2004) Crystallographic snapshots of a replicative DNA polymerase encountering an abasic site. *EMBO J* **23**: 1483–1493.
- Hubscher, U., Maga, G., and Spadari, S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133–163.
- Jacobs, K.L., and Grogan, D.W. (1997) Rates of spontaneous mutation in an archaeon from geothermal environments. *J Bacteriol* **179**: 3298–3303.
- Jin, Y.H., Ayyagari, R., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., and Burgers, P.M. (2003) Okazaki fragment maturation in yeast. II. Cooperation between the polymerase and 3'-5'-exonuclease activities of Pol delta in the creation of a ligatable nick. *J Biol Chem* **278**: 1626–1633.
- Jin, Y.H., Garg, P., Stith, C.M., Al-Refai, H., Sterling, J.F., Murray, L.J., et al. (2005) The multiple biological roles of the 3' → 5' exonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta require switching between the polymerase and exonuclease domains. *Mol Cell Biol* **25**: 461–471.
- Jolivet, E., Matsunaga, F., Ishino, Y., Forterre, P., Prieur, D., and Myllykallio, H. (2003) Physiological responses of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* to DNA damage caused by ionizing radiation. *J Bacteriol* **185**: 3958–3961.
- Khare, V., and Eckert, K.A. (2002) The proofreading 3' → 5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat Res* **510**: 45–54.
- Kool, E.T. (2002) Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **71**: 191–219.
- Kow, Y.W., and Dare, A. (2000) Detection of abasic sites and oxidative DNA base damage using an ELISA-like assay. *Methods* **22**: 164–169.
- Kroeger, K.M., Kim, J., Goodman, M.F., and Greenberg, M.M. (2006) Replication of an oxidized abasic site in *Escherichia coli* by a dNTP-stabilized misalignment mechanism that reads upstream and downstream nucleotides. *Biochemistry* **45**: 5048–5056.
- Kubo, K., Ide, H., Wallace, S.S., and Kow, Y.W. (1992) A novel, sensitive, and specific assay for abasic sites, the most commonly produced DNA lesion. *Biochemistry* **31**: 3703–3708.
- Kuroita, T., Matsumura, H., Yokota, N., Kitabayashi, M., Hashimoto, H., Inoue, T., et al. (2005) Structural mechanism for coordination of proofreading and polymerase activities in archaeal DNA polymerases. *J Mol Biol* **351**: 291–298.
- Lawrence, C.W., Borden, A., Banerjee, S.K., and LeClerc, J.E. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res* **18**: 2153–2157.
- Le Breton, M., Henneke, G., Norais, C., Flament, D., Myllykallio, H., Querellou, J., and Raffin, J.P. (2007) The heterodimeric primase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*: a multifunctional enzyme for initiation and repair? *J Mol Biol* **374**: 1172–1185.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715.
- Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**: 3610–3618.
- Loeb, L.A., Preston, B.D., Snow, E.T., and Schaaper, R.M. (1986) Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis. *Basic Life Sci* **38**: 341–347.
- McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2006) Multiple solutions to inefficient lesion bypass by T7 DNA polymerase. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1373–1383.
- McGlynn, P., and Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859–870.
- Myllykallio, H., Lopez, P., Lopez Garcia, P., Heilig, R., Saurin, W., Zivanovic, Y., et al. (2000) Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science* **288**: 2212–2215.
- Nohmi, T. (2006) Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* **60**: 231–253.
- Pages, V., and Fuchs, R.P. (2002) How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* **21**: 8957–8966.

- Pages, V., Janel-Bintz, R., and Fuchs, R.P. (2005) Pol III proofreading activity prevents lesion bypass as evidenced by its molecular signature within *E. coli* cells. *J Mol Biol* **352**: 501–509.
- Park, D. (2007) Genomic DNA isolation from different biological materials. *Methods Mol Biol* **353**: 3–13.
- Rothwell, P.J., and Waksman, G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **71**: 401–440.
- Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J., and 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.
- Schaaper, R.M., and Loeb, L.A. (1981) Depurination causes mutations in SOS-induced cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1773–1777.
- Schaaper, R.M., Kunkel, T.A., and Loeb, L.A. (1983) Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 487–491.
- Scharer, O.D., and Jiricny, J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* **23**: 270–281.
- Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A.P. (1997) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the 'A rule'. *J Biol Chem* **272**: 13916–13922.
- Shimizu, K., Hashimoto, K., Kirchner, J.M., Nakai, W., Nishikawa, H., Resnick, M.A., and Sugino, A. (2002) Fidelity of DNA polymerase epsilon holoenzyme from budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 37422–37429.
- Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Kim, S.R., Pisani, F.M., Masutani, C., *et al.* (2003) Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases. *EMBO Rep* **4**: 269–273.
- Strauss, B.S. (1991) The 'A rule' of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *Bioessays* **13**: 79–84.
- Tanguy Le Gac, N., Delagoutte, E., Germain, M., and Villani, G. (2004) Inactivation of the 3'-5' exonuclease of the replicative T4 DNA polymerase allows translesion DNA synthesis at an abasic site. *J Mol Biol* **336**: 1023–1034.
- Taylor, J.S. (2002) New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutat Res* **510**: 55–70.
- Villani, G., Boiteux, S., and Radman, M. (1978) Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: extent and fidelity of *in vitro* DNA synthesis on irradiated templates. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 3037–3041.
- Yang, W. (2005) Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett* **579**: 868–872.
- Yang, W., and Woodgate, R. (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 15591–15598.
- Zahn, K.E., Belrhali, H., Wallace, S.S., and Doublet, S. (2007) Caught bending the A-rule: crystal structures of translesion DNA synthesis with a non-natural nucleotide. *Biochemistry* **46**: 10551–10561.
- Zhao, B., Xie, Z., Shen, H., and Wang, Z. (2004) Role of DNA polymerase eta in the bypass of abasic sites in yeast cells. *Nucleic Acids Res* **32**: 3984–3994.
- Zhao, H., Shen, J., Deininger, P., and Hunt, J.D. (2006) Abasic sites and survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **246**: 47–53.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

A



B

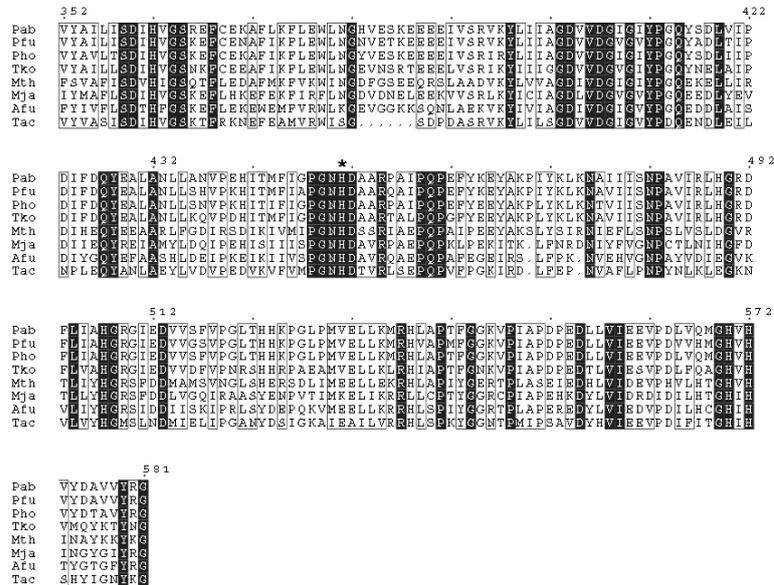


Figure S1: Mapping of conserved residues involved in 3'-5' exonuclease activity among representative euryarchaeal DNA polymerases.

A, Sequence alignment of the exonuclease domain in representative family B DNA polymerases. The sequences are from eight euryarchaeota species, *P. abyssi* (Pab, accession number, gi:14521919), *P. furiosus* (Pfu, accession number, gi:18976584), *P. horikoshii* (Pho, accession number, gi:14591688), *T. kodakarensis* KOD1 (Tko, accession number, gi:57639936), *M. thermoautotrophicum* (Mth, accession number, gi:15679219), *M. jannashii* (Mja, accession number, gi:15669075), *A. fulgidus* (Afu, accession number, gi:11498108), *T. acidophilum* (Tac, accession number, gi:16081956). The star indicates the identified residue in *Pab*polB responsible for proofreading activity. **B**, Partial sequence alignment of the small subunits (DP1s) of the family D DNA polymerases. The sequences are from eight euryarchaeota species, *P. abyssi* (Pab, accession number, gi:14520339), *P. furiosus* (Pfu, accession number, gi:18976390), *P. horikoshii* (Pho, accession number, gi:14590067), *T. kodakarensis* KOD1 (Tko, accession number, gi:57641837), *M. thermoautotrophicum* (Mth, accession number, gi:15679404), *M. jannashii* (Mja, accession number, gi:15668883), *A. fulgidus* (Afu, accession number, gi:11499379), *T. acidophilum* (Tac, accession number, gi:16081371). The star indicates the identified residue in *Pab*DP1 responsible for proofreading activity. Amino acid sequence alignments have been constructed by ClustalW2. Numbering refers to *P. abyssi* amino acid sequences.

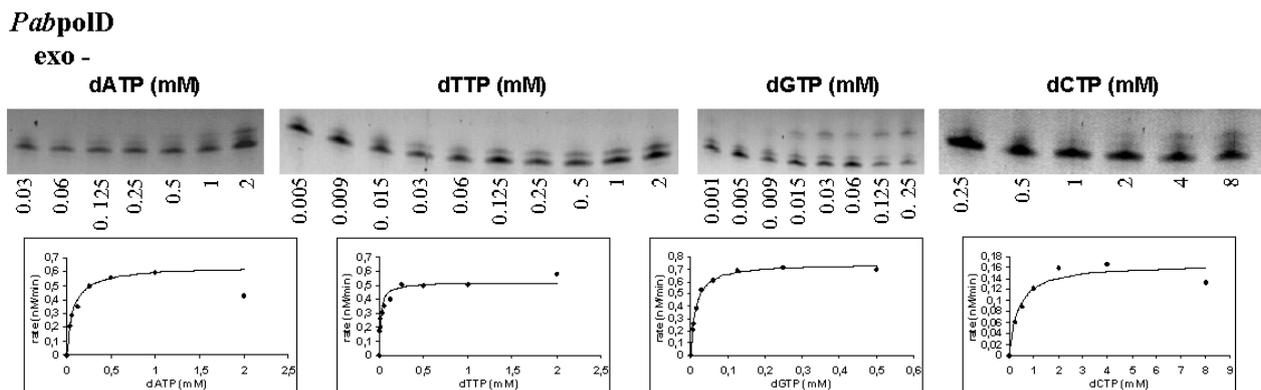
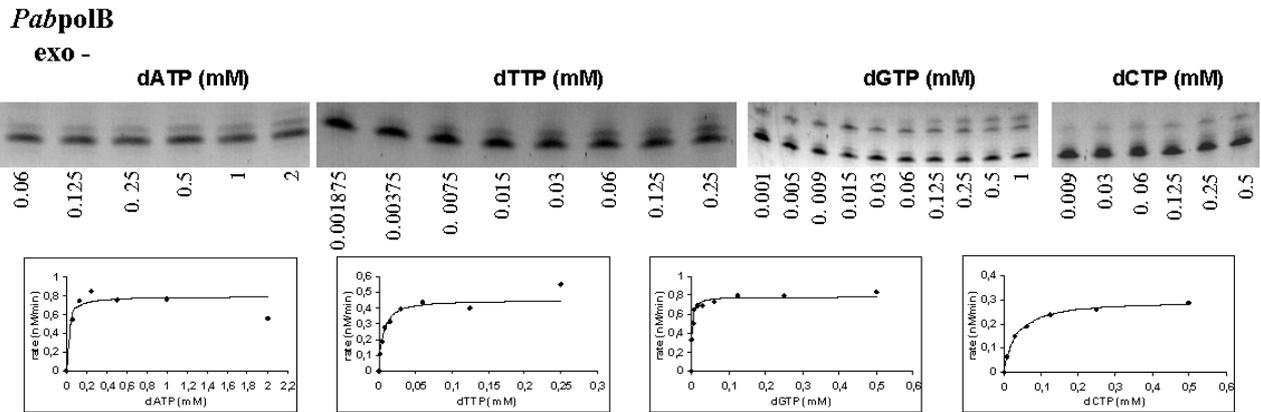
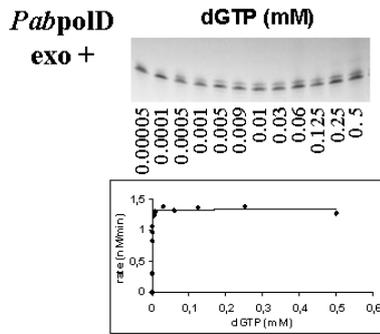
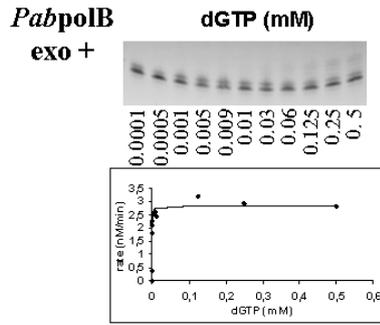
A.

Figure S2

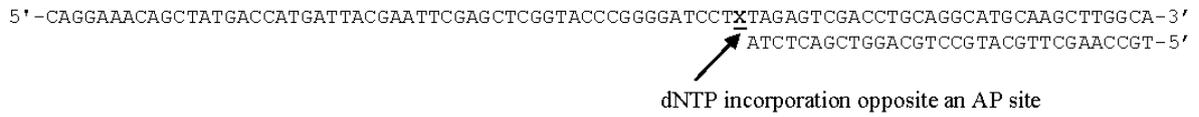
5' - CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA - 3'

ATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCCAACCGT - 5'

dNTP incorporation opposite undamaged nucleotide C

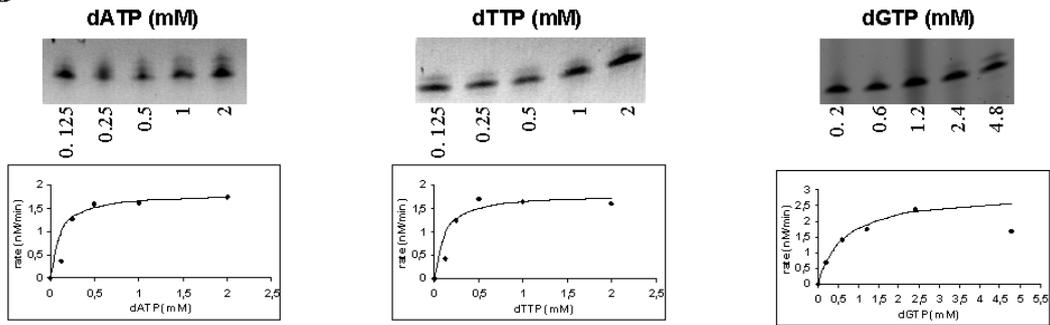


B.



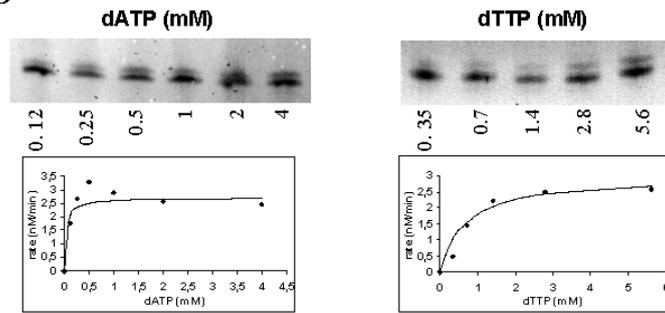
PabpolB

exo +



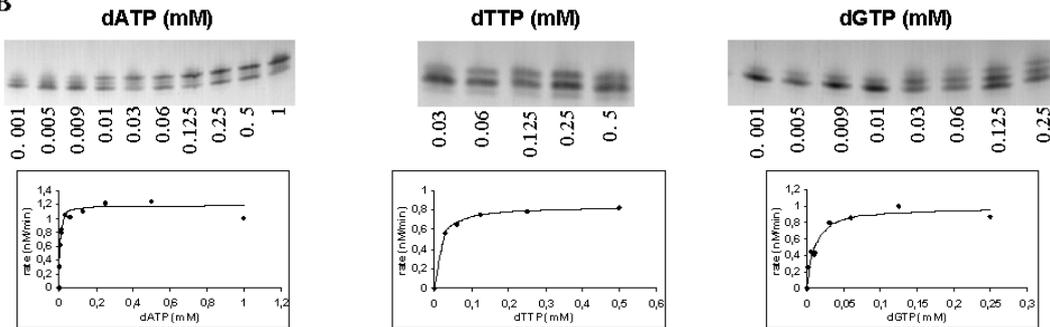
PabpolD

exo +



PabpolB

exo -



PabpolD

exo -

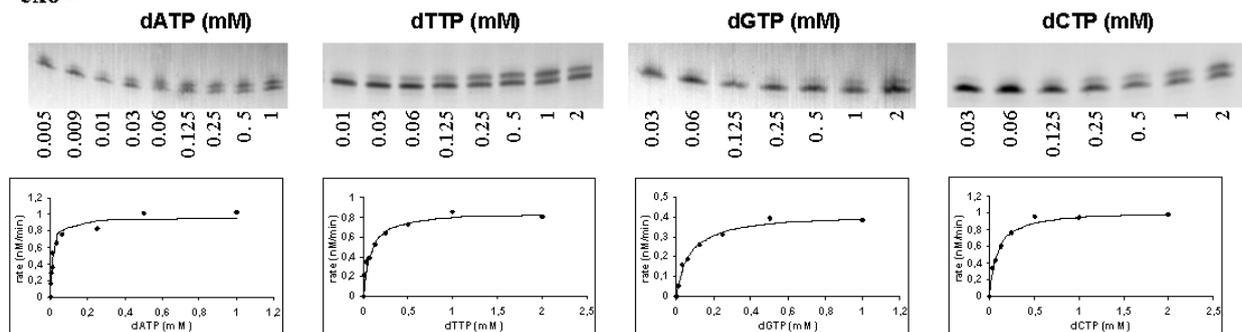


Figure S2: Steady-state kinetics analyses of deoxynucleotide incorporation by *Pabpols*.

A, Incorporation of dNTP opposite undamaged C. The primer-template duplex (8.3 nM) was incubated individually with *PabpolB* *exo+* (6.6 nM), *PabpolD* *exo+* (20 nM), *PabpolB* *exo-* (13 nM) or *PabpolD* *exo-* (16 nM), in the presence of a single dNTP at the indicated concentrations. **B**, Incorporation of dNTP opposite an AP site. The primer-template duplex (8.3 nM) was incubated individually with *PabpolB* *exo+* (24 nM), *PabpolD* *exo+* (20 nM), *PabpolB* *exo-* (13.3 nM) or *PabpolD* *exo-* (33.3 nM), in the presence of a single dNTP at the indicated concentrations. Reactions were carried out at 55°C under standard *Pabpols* assay conditions and the products were resolved by denaturing PAGE. The rate of incorporation was graphed as a function of dNTP concentration and the data were fit to the Michaelis-Menten equation. The k_{cat} et K_m parameters obtained from the fit are listed in Table 2.

IV. RESULTATS ADDITIONNELS ET DISCUSSION

4.1. Détection des lésions AP au sein du génome de *Pab* par une méthode indirecte

Lors de la mise en place du projet de détection des lésions AP au sein du génome de *Pab*, deux techniques de détection ont été envisagées :

- la méthode indirecte utilisant l'endonucléase IV d'*E.coli*

- la méthode immunochimique directe décrite dans l'article (Palud *et al.*, 2008)

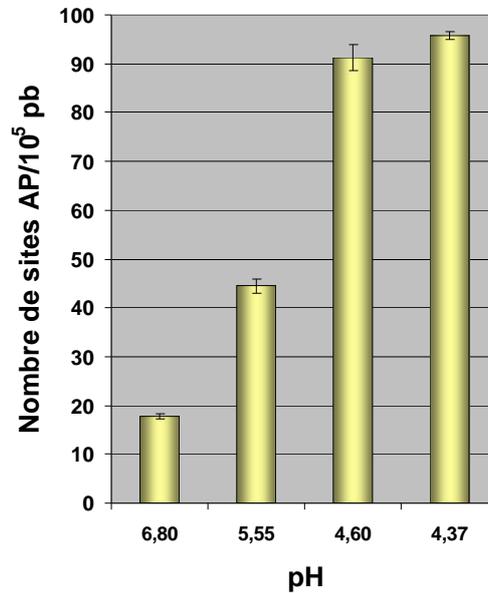
L'objectif initial était de valider l'approche indirecte par la technique immunochimique. Par conséquent, les différents échantillons de *Pab* ont été collectés puis conservés au sein des plugs d'agarose à 4°C (Voir Chapitre II.1.2 ci-dessus). Plusieurs échantillons ont été utilisés pour calibrer le système d'électrophorèse en champ pulsé jusqu'à l'étape de prédigestion avec Not I, avec l'aide d'E. Jolivet (CNRS UMR 8621). Une optimisation de l'étape de digestion par l'endonucléase IV a été réalisée avec l'aide de B. Sutherland (Brookhaven National Laboratory, NY, USA). Toutefois, aucun profil électrophorétique n'a permis de réaliser de quantifications. Cette approche a donc été abandonnée au profit de la détection immunochimique.

4.2. Influence d'un stress acide chez *Pab*

Le taux de sites AP au sein du génome de *Pab* a également été déterminé après un stress acide afin de se rapprocher davantage des conditions physiologiques au niveau d'un site hydrothermal (shift de pH). Pour cela, une diminution de pH a été réalisée par des injections définies d'HCl 4 N, sur des cultures de *Pab*, en milieu de phase exponentielle. L'histogramme de la Figure 38 représente le nombre de sites AP/10⁵ pb en fonction du pH du milieu de culture. A pH optimal (6,8), 18 sites AP/10⁵ pb sont détectés dans le génome de *Pab* (Figure 38. A). Ce résultat corrobore celui déjà observé dans l'article dans les mêmes conditions expérimentales (Palud *et al.*, 2008) (25 sites AP/10⁵ pb). En revanche, lorsque le pH diminue au sein du milieu de culture, ce nombre de sites AP augmente considérablement (Figure 38. A) : à pH 5,55, le taux de sites AP/10⁵ pb double par rapport aux conditions optimales de croissance (44 sites AP/10⁵ pb) ; aux pH plus faibles, 4,60 et 4,37, le taux de sites

AP/10⁵ pb avoisine les 91 et 96, respectivement. En effet, une analyse de la corrélation a montré qu'il existe une corrélation linéaire très hautement significative entre le nombre de sites AP/10⁵ pb et le stade de croissance de *Pab* ($r=-0.99$ et $P\text{-value}=1.75 \times 10^{11}$) (Figure 38. B).

A



B

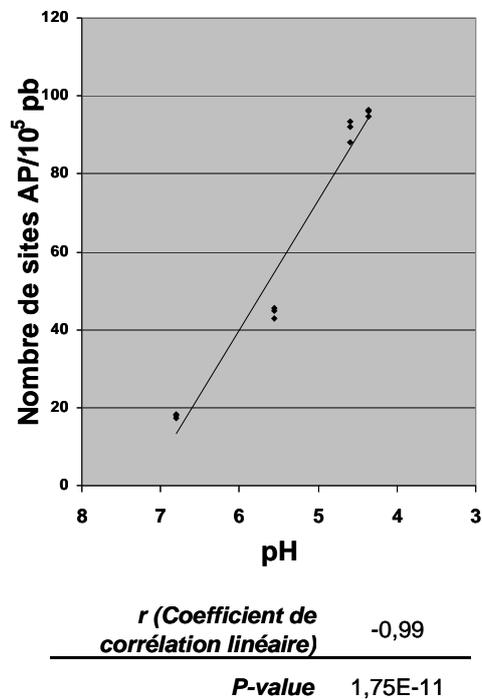


Figure 38 : Détection et quantification des sites AP dans le génome de *Pab*, à différents pH.

A, Suivi du nombre de sites AP/10⁵ pb en fonction du pH du milieu de culture ; la barre d'erreur correspond à l'écart-type entre triplicats. B, Analyse statistique de la corrélation linéaire des résultats obtenus en A.

4.3. Activité polymérasique simultanée des *Pabpols* *exo+* en présence d'une matrice ADN contenant un site AP unique

Une réaction d'extension d'amorces en présence de l'oligonucléotide 2 contenant un site AP unique, hybridé à l'amorce 5 a été effectuée en conditions dites « Running start ».

En présence de la matrice ADN 2/5 contenant une lésion AP unique, *PabpolB* franchit efficacement la lésion comme en atteste la bande de 87 mer correspondant à la matrice totalement dupliquée, alors que *PabpolD* *exo+* est bloquée au site AP, comme déjà observé (Figure 39. Comparer piste 3 et piste 5) (Palud *et al.*, 2008). De plus, lorsque la matrice ADN 2/5 est mise en présence des deux *Pabpols* simultanément, la lésion AP est franchie efficacement malgré le léger site de pause observé aux environs de 32 mer et 33 mer. Cette expérience démontre que les *Pabpols* *exo+* ne s'inhibent pas entre elles mais ne permet pas de mettre en évidence un éventuel « switch » entre les *Pabpols*, lors de la TLS du site AP.

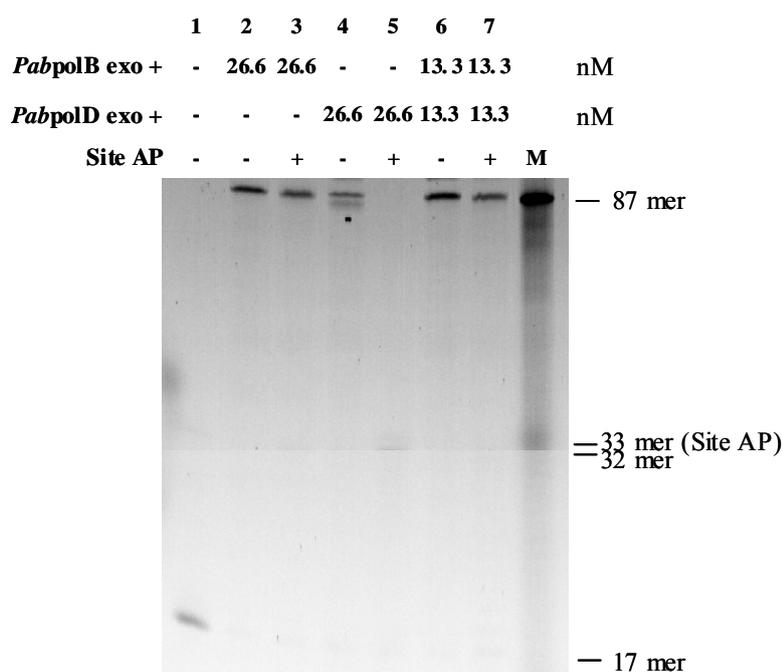


Figure 39 : Réplication d'une matrice ADN contenant une lésion AP par les *Pabpols* *exo+*.

Gel dénaturant Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. M : Marqueur de taille. Réactions en présence des *Pabpols* *exo+* aux concentrations indiquées, de 16,6 nM de matrice ADN endommagée 2/5 et de 200 μ M de dNTPs ; 55°C - 30 min. Les pistes 2, 4 et 6 sont les contrôles positifs avec 26,6 nM de *PabpolB* *exo+* / *PabpolD* *exo+* ou 13,3 nM de *PabpolB* *exo+* et *PabpolD* *exo+*, 16,6 nM de matrice ADN non endommagée 1/5.

4.4. Activité des *Pabpols* *exo+* en présence de matrices ADN contenant des clusters AP

Des réactions d'extension d'amorces ont été réalisées, en conditions dites « Running start » en présence des oligonucléotides 2/3/4 contenant respectivement 1/2/3 sites AP, hybridés à l'amorce 5 (Tableau 10).

En présence de la matrice ADN 2/5 contenant une lésion AP unique, *PabpolB* franchit efficacement la lésion comme en atteste la bande de 87 mer correspondant à la matrice totalement dupliquée, alors que *PabpolD* *exo+* est bloquée au site AP, comme déjà observé (Palud *et al.*, 2008) (Figure 40. Comparer A, piste 3 à B, piste 3). De plus, lorsque la matrice ADN présente 2 ou 3 sites AP consécutifs (oligonucléotides 3 et 4), les *Papols* *exo+* sont totalement bloquées par les dommages, comme en attestent les bandes de 32 mer et de 33 mer correspondant au blocage de l'enzyme avant ou lors de l'incorporation.

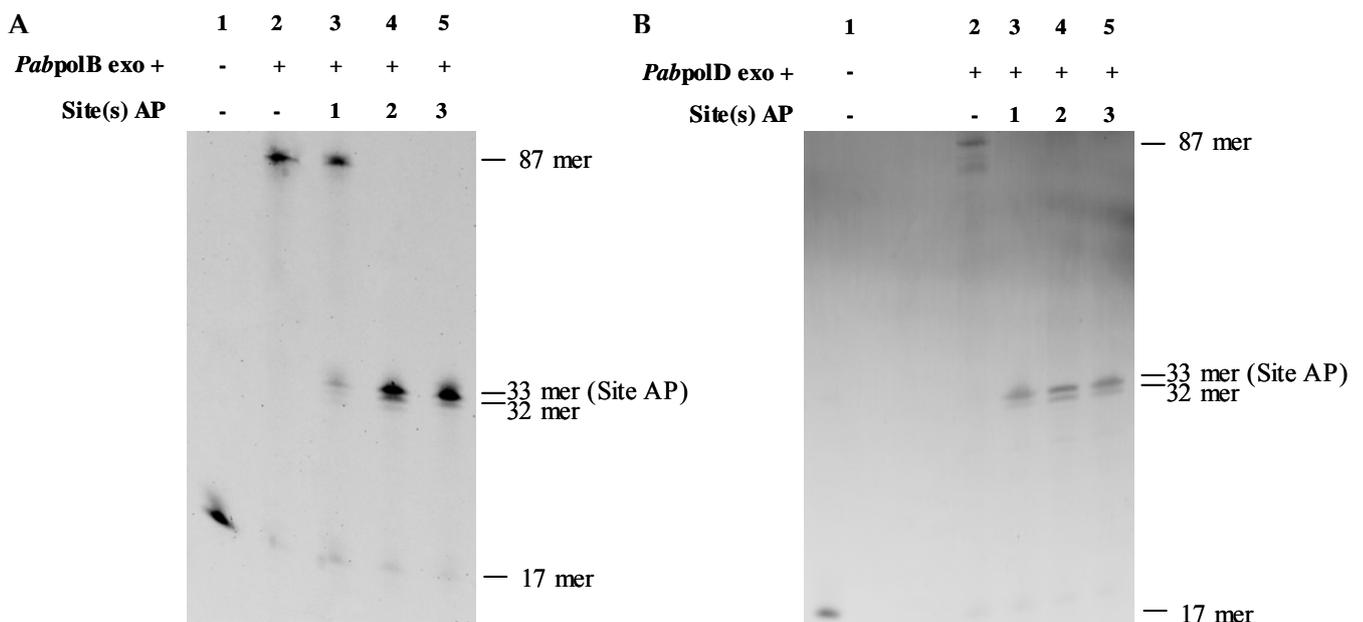


Figure 40 : Réplication d'une matrice ADN contenant 1, 2 ou 3 sites AP par les *Pabpols* *exo+*.

Gels dénaturants Acrylamide 15 % / Urée 7M / Formamide 6,25 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400 après une réaction d'extension d'amorces marquées à la fluorescéine. **A**, Réaction en présence de 26,6 nM de *PabpolB* *exo+*, de 16,6 nM de matrice ADN endommagée (oligonucléotide 2, 3 ou 4 contenant respectivement 1, 2 ou 3 sites AP hybridés à l'oligonucléotide 5) et de 200 μ M de dNTPs ; 55°C - 30 min. La piste 2 correspond au contrôle positif avec 26,6 nM de *PabpolB* *exo+* et 16,6 nM de matrice ADN non endommagée 1/5. **B**, Réaction en présence de 40 nM de *PabpolD* *exo+*, de 16,6 nM de matrice ADN endommagée (oligonucléotide 2, 3 ou 4 contenant respectivement 1, 2 ou 3 sites AP hybridés à l'oligonucléotide 5) et de 200 μ M de dNTPs ; 55°C - 30 min. La piste 2 correspond au contrôle positif avec 26,6 nM de *PabpolD* *exo+* et 16,6 nM de matrice ADN non endommagée 1/5.

V. DISCUSSION DES RESULTATS COMPLEMENTAIRES

5.1. Les lésions AP dans le génome de *Pab*

D'une part, lors de la détection des sites AP dans le génome de *Pab*, le couplage de la méthode immunochimique (Palud *et al.*, 2008) à la méthode enzymatique indirecte n'a pas abouti : la mise au point trop laborieuse et coûteuse de cette dernière n'a pas permis d'obtenir des résultats quantitatifs pour compléter ceux de l'article.

D'autre part, lors de l'application du stress acide en fiole pénicilline sur *Pab*, la diminution du pH s'accompagne d'une augmentation du nombre de sites AP, comme le démontre clairement l'approche statistique. Comme précédemment démontré par Erauso *et al.*, ce résultat n'est pas surprenant car pour des pH inférieurs à 5, la croissance de la souche est fortement ralentie (Erauso *et al.*, 1993).

Il apparaît alors difficile de replacer ce résultat dans un contexte de physiologie cellulaire car il est impossible d'établir un lien direct entre le pH du milieu de culture et le nombre de lésions AP détectées dans le génome de *Pab*. Par conséquent, il serait fortement intéressant d'appliquer une démarche expérimentale en bioréacteur gas-lift, similaire à celle mise au point dans le Chapitre I, afin de compléter ces données : cela permettrait simultanément sur une même culture, de suivre l'effet du stress acide sur la viabilité cellulaire et de collecter des échantillons de qualité pour quantifier la lésion AP dans le génome de *Pab*. De plus, sur le plan pratique, la réalisation du stress acide s'effectuerait en temps réel sur une même culture et bénéficierait ainsi d'un meilleur suivi grâce à la sonde de pH, directement reliée au système analogique de contrôle associé à l'ordinateur.

5.2. Caractérisation fonctionnelle des *Pabpols* en présence de matrices ADN endommagées contenant une lésion AP

Les expériences complémentaires à celles présentées dans l'article ont permis d'apporter deux résultats supplémentaires. La réaction d'extension d'amorces effectuée en présence des deux *Pabpols* simultanément dans le mélange réactionnel montre clairement que les *Pabpols* ne s'inhibent pas. Il serait fortement intéressant de compléter ce résultat pour déterminer précisément laquelle des deux *Pabpols* a le plus d'affinité pour le site AP, par exemple via la

technique de Résonance Plasmonique de Surface ou encore par la technique de retard sur gel. De plus, afin de se rapprocher d'un contexte plus physiologique, une série d'expériences a été réalisée en présence de matrices ADN contenant plusieurs sites AP accolés ou cluster AP ; Il a été démontré que les *Pabp*ols sont sévèrement bloquées au-delà du premier site AP.

CHAPITRE III : APPLICATIONS
BIOTECHNOLOGIQUES DES *PABPOLS*

I. INTRODUCTION

La méthode d'amplification *in vitro* de séquences nucléiques par PCR (Polymerase Chain Reaction), a été mise au point au début des années 1970, par K. Kleppe et H. Ghobind Khorana, dans le but d'effectuer de la synthèse de gènes (Kleppe *et al.*, 1971). Cependant, ne disposant pas de génomes séquencés, ni de pols thermostables, l'idée fut très vite oubliée. Ce n'est qu'en 1985 que la technique fut nommée PCR et publiée par K. Mullis (Prix Nobel de Chimie en 1993) ; ce fut l'une des plus grandes révolutions technologiques dans le domaine de la biologie au cours de ces 30 dernières années (Saiki *et al.*, 1985. Mullis, 1986 #478). Elle consiste à amplifier un fragment d'ADN cible, de façon exponentielle, en réalisant des cycles successifs d'extension d'amorces afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. La pol initialement utilisée était le fragment de Klenow de la pol I d'*E.coli*. Toutefois, cette enzyme ne résistait pas à l'étape de dénaturation à haute température, nécessitant l'ajout d'enzyme fraîche à chaque cycle avant la phase d'élongation. La technique de PCR a alors connu un grand essor, en 1988, avec l'utilisation de la Taq polymérase, première pol thermostable isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969, Chien *et al.*, 1976). Les applications de cette technique et de ses dérivées (RT-PCR, PCR quantitative...) constituent des outils fondamentaux lors des analyses génétiques et moléculaires. Elles s'étendent à différents secteurs comme la recherche fondamentale (Clonage de gènes, Séquençage, Etude du polymorphisme, Ecologie microbienne), la médecine (Diagnostic de maladies par recherche de mutations), ou encore la criminalistique (Réalisation d'empreintes génétiques). Ainsi pour chacune de ces applications, le choix de la pol utilisée est primordial et basé sur les caractéristiques intrinsèques de l'enzyme telles : sa fidélité, sa processivité ou encore sa rapidité et sa spécificité vis à vis du substrat (Hamilton *et al.*, 2001b, Hübscher *et al.*, 2002, Bebenek & Kunkel, 2004). De nombreuses pols thermostables appartenant aux familles répliquatives A et B ont ainsi été exprimées et caractérisées puis certaines commercialisées (Perler *et al.*, 1996, Hamilton *et al.*, 2001b). La Taq est la pol la plus fréquemment utilisée pour réaliser la technique de PCR bien qu'elle présente deux inconvénients majeurs : elle est peu fidèle car elle est dépourvue d'activité exonucléasique et permet d'amplifier uniquement des fragments de taille inférieure à 5 Kb (Hamilton *et al.*, 2001b). A la différence de la Taq, les pols isolées d'archaea hyperthermophiles sont plus résistantes à l'étape de dénaturation, hautement fidèles grâce à leur fonction exonucléasique 3'→5' et présentent des taux d'erreur

jusqu'à 10 fois inférieurs à celui de la Taq. Parmi elles, se retrouvent par exemple, la Pfu de *Pyrococcus furiosus*, la Vent™ de *Thermococcus litoralis* (Cariello *et al.*, 1991), la Pwo de *Pyrococcus woesei* (Cline *et al.*, 1996, Antranikian *et al.*, 2005), la pol KOD 1 de *Thermococcus kodakarensis* (Hashimoto *et al.*, 2001) ou encore la pol Isis™ / *PabpolB* *exo+* de *Pab* (Dietrich *et al.*, 2002)... A titre d'exemple, la pol KOD 1 est capable d'étendre des fragments allant jusqu'à 6 kb (Hashimoto *et al.*, 2001) ; de même, la pol Isis™ est 40 fois plus fidèle que la Taq (Dietrich *et al.*, 2002).

Actuellement, les industriels tentent de mettre en place des stratégies visant à améliorer les techniques d'amplification d'ADN hautement dégradés : il peut s'agir d'ADN issus d'échantillons rares comme ceux provenant des cheminées hydrothermales mais aussi de fossiles ou encore d'ADN à l'état de trace en criminalistique. Récemment, une équipe a montré, par une variante de la technique de PCR quantitative, que l'efficacité d'amplification de la Taq n'est que légèrement perturbée par la lésion 8-oxo-dG présente sur un oligonucléotide (Sikorsky *et al.*, 2007) ; en revanche, elle est fortement réduite en présence d'un site AP, d'un dimère de pyrimidines ou encore d'une lésion 8-oxo-dA (Sikorsky *et al.*, 2004, Sikorsky *et al.*, 2007). Parallèlement, la fidélité de la Taq décroît lors de l'amplification d'oligonucléotides contenant une lésion 8-oxo-dG ou 8-oxo-dA ou encore un site AP (Sikorsky *et al.*, 2007) : de plus, la présence de ces 2 derniers dommages conduit à l'apparition de délétion n-1 (Sikorsky *et al.*, 2007).

A ce jour, chez *Pab*, *PabpolB* *exo+* est déjà commercialisée par la société MP Biomedicals, sous le nom de Isis™ ; néanmoins *Pabpol D* *exo+* a été brevetée mais n'a fait l'objet d'aucune application pour la technique de PCR, ni d'une commercialisation. Par conséquent, il semble indispensable d'évaluer le potentiel biotechnologique de *PabpolD* *exo+* en amplification d'ADN non endommagé, par la technique de PCR. Compte-tenu de leur haute fidélité et des propriétés translésionnelles démontrées précédemment dans les chapitres I et II, il paraît aussi fortement intéressant de tester l'aptitude des deux *Pabpols* à amplifier de l'ADN endommagé. Ainsi, ce projet biotechnologique a consisté à mettre au point des conditions réactionnelles permettant de réaliser des amplifications d'ADN par PCR avec *PabpolD* *exo+/exo-*. Dans un second temps, des expériences préliminaires d'amplification d'oligonucléotides contenant une lésion AP ou une lésion 8-oxo-dG, par les *Pabpols* *exo+/exo-*, ont été effectuées par la technique de PCR.

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Enzymes

- *PabpolD* exo+ / exo- : ont été clonées, exprimées et purifiées au laboratoire (Chap I-II. et Article).
- *PabpolB* exo+ et exo- : ont été caractérisées au laboratoire (Gueguen *et al.*, 2001 , Dietrich *et al.*, 2002) puis commercialisée par MP Biomedicals sous les noms respectifs Isis™ DNA polymerase et Pyra™ pour la version recombinante dépourvue de fonction exonucléasique.
- *Pfu* : est une pol de la famille B, isolée à partir d'une souche de *Pyrococcus furiosus* qui présente une activité exonucléasique . Elle est utilisée selon le protocole du fabricant (Stratagene®).
- *Taq* : est une pol de la famille A, isolée à partir d'une souche de *Thermus aquaticus* qui ne possède pas d'activité exonucléasique 3'→5'. Elle est utilisée selon le protocole du fabricant (MP Biomedicals®).

Les pols sont diluées aux concentrations désirées dans le tampon de dilution suivant :

20 mM Tris-HCl (pH 7,5), Glycérol (20 %)

2.2. Oligonucléotides

Les différents oligonucléotides utilisés lors de cette étude ont été synthétisés et purifiés par Eurogentec (Tableau 11). Les oligonucléotides 2, 3 et 4 (87 mer AP) présentent respectivement un site AP artificiel (résidu tétrahydrofurane), situé en position 33, 2 sites AP (positions 33 et 34) et 3 sites AP (positions 33, 34 et 35). L'oligonucléotides 5 (87 mer 8-oxo-dG) présente un groupement hydroxyle sur le carbone 8 de la guanine, situé en position 33. L'oligonucléotide 6 est marqué à l'extrémité 5' à la fluorescéine (Voir Chapitre I. 2.3.2 ci-dessus).

Oligonucléotide 1 – 87 mer T

5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA – 3'

Oligonucléotide 2 – 87 mer AP1

5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA – 3'

Oligonucléotide 3 – 87 mer AP2

5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCXXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA – 3'

Oligonucléotide 4 – 87 mer AP3

5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCXXXTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA – 3'

Oligonucléotide 5 – 87 mer 8-oxo-dG

5' – CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTYTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA – 3'

Oligonucléotide 6 – 17 mer

5' – TGCCAAGCTTGCATGCC – 3'

Tableau 11 : Oligonucléotides corrects ou endommagés, utilisés lors de cette étude.

X et Y représentent respectivement les lésions AP et 8-oxo-dG. L'oligonucléotide 6 est marqué en 5' à la fluorescéine.

2.3. Amplification de l'ADN par la technique de PCR

Les réactions de PCR sont effectuées dans un thermocycleur RoboCycler Gradient 96 (Stratagene®).

Le mélange réactionnel (50 µL) contient :

Tampon d'incubation	1 X*
dNTPs (MP Biomedicals®)	200 µM final
pol	0,1 U
Amorce (oligonucléotide 6)	440 nM
ADN	7,4 nM
Eau mQ	qsp 50 µL

*les *Pabpols* sont utilisées dans le tampon commercial de Isis™ (10 X) (*PabpolB* exo+) : 200 mM Tris-HCl (pH 9,0), 250 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgSO₄, 1% Tween 20, 1 mg/mL BSA.

La Pfu et la Taq sont utilisées dans leur tampon commercial respectif.

Le programme PCR réalisé présente les cycles suivants :

	95°C – 1 min	Dénaturation initiale
X 50 cycles	95°C – 50 sec	Dénaturation
	48°C – 1 min	Hybridation*
	68°C – 30 sec	Élongation
	68°C – 5 min	Élongation finale

* Le T_m de l'oligonucléotide 6, estimée selon la formule $2AT+4GC$, est de 50°C ; la température d'hybridation appliquée a été déterminée en réalisant une PCR à gradient de température.

2.4. Révélation des amplicons

Les amplicons sont analysés par électrophorèse en conditions natives sur un gel de polyacrylamide 12 % avec le système Protean®II Xi Cell (Bio-Rad), puis visualisés à l'aide du Phospho-fluorimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences), avec une excitation à 532 nm via le laser vert et le filtre d'émission 526 SP, correspondant aux spectres de la fluorescéine (Figure 23).

Conditions électrophorétiques :

-Tampon de migration : TBE 1 X (Annexe 2)

-Migration à voltage constant : 5 H - 150 V – 4°C

-Marqueur de taille : oligonucléotides mentionnés marqués en 5' à la fluorescéine

III. RESULTATS

Compte tenu des propriétés translésionnelles des *Pabpols* mises en évidence lors des deux études précédentes, l'amplification d'ADN endommagé, par la technique de PCR, a été initiée avec les *Pabpols* *exo-* et *exo+* (Figure 41). Parallèlement, deux *pols* thermostables commercialisées sont utilisées comme référence lors des amplifications : la Taq dépourvue d'activité exonucléasique (famille A) isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* couramment utilisée en PCR de routine et la Pfu (famille B) isolée de l'euryarchaea *Pyrococcus furiosus*, connue pour sa haute fidélité grâce à sa fonction de correction d'erreur (Figure 41) (Lundberg *et al.*, 1991) (Cline *et al.*, 1996). Des matrices oligonucléotidiques de 87 mer, contenant une, deux ou trois lésion(s) AP ou une lésion 8-oxo-dG (Tableau 11. Oligonucléotides 2, 3, 4 et 5), ont ainsi été amplifiées par PCR qualifiée de « non bornée » : seule une amorce de 17 mer a été utilisée (Tableau 11. Oligonucléotide 6).

D'une part, pour la première fois au laboratoire, *PabpolD* a été utilisée en PCR dans le tampon commercial de l'Isis™ (*PabpolB* *exo+*) et a présenté un excellent potentiel d'amplification d'ADN non endommagé, comme en témoigne la présence de bandes intenses correspondant au 87 mer entièrement étendu (Figure 41. A, pistes 2, 6, 9 et 13).

D'autre part, *PabpolD* *exo+/exo-* et *PabpolB* *exo+/exo-* sont également capables d'amplifier l'oligonucléotide présentant un seul site AP car une légère bande de 87 mer est visible sur le gel (Figure 41. A et B, pistes 3 et 10, respectivement). L'intensité de cette bande montre que l'efficacité d'amplification des *pols* dépourvues de fonction exonucléasique est légèrement supérieure à celle des versions sauvages mais reste très faible par rapport aux bandes observées en présence d'ADN non endommagé (Figure 41. A et B, comparer pistes 3 et 10 aux pistes 2 et 9). De plus, lorsque la matrice contient plus d'un site AP, aucun produit d'amplification, correspondant au 87 mer, n'est détecté indépendamment des versions *exo+* ou *exo-* des *Pabpols* (Figure 41. A et B, pistes 4 et 5). La présence de « clusters » AP empêche donc les *Pabpols* d'amplifier la matrice de 87 mer dans sa totalité. Il est intéressant de souligner que les fragments générés par les *Pabpols* *exo+* et les *Pabpols* *exo-* ne migrent pas à la même position. En effet, dans les conditions de PCR, il semblerait que les *Pabpols* *exo+* soient bloquées en amont du site AP alors que les *Pabpols* *exo-* s'arrêtent après incorporation au site AP. Ce résultat nécessiterait d'être approfondi, en utilisant des gels plus résolutifs. A

la différence des *Pabpols*, la Taq et la Pfu sont totalement bloquées par un seul site AP car aucun produit d'amplification n'est détectable au-delà de cette lésion (Figure 41. C, pistes 3 à 5 et 10 à 12).

Par ailleurs, la matrice présentant une lésion 8-oxo-dG est efficacement amplifiée par les *Pabpols* *exo+* et *exo-*, la Taq et la Pfu. Toutefois, des bandes de faible intensité sont détectables au niveau du site endommagé correspondant à un léger blocage à la lésion (Figure 41. A et B, piste 14 ; C, pistes 7 et 14 respectivement).

Ainsi, ces résultats montrent clairement que les deux *Pabpols* présentent des capacités à amplifier de l'ADN endommagé et ces résultats sont d'autant plus importants que de très faibles quantités d'enzyme ont été utilisées (0.1U au lieu de 1U à environ 5U en PCR classique). Cependant, la lésion AP s'avère être davantage bloquante par rapport à la lésion 8-oxo-dG, comme déjà démontré.

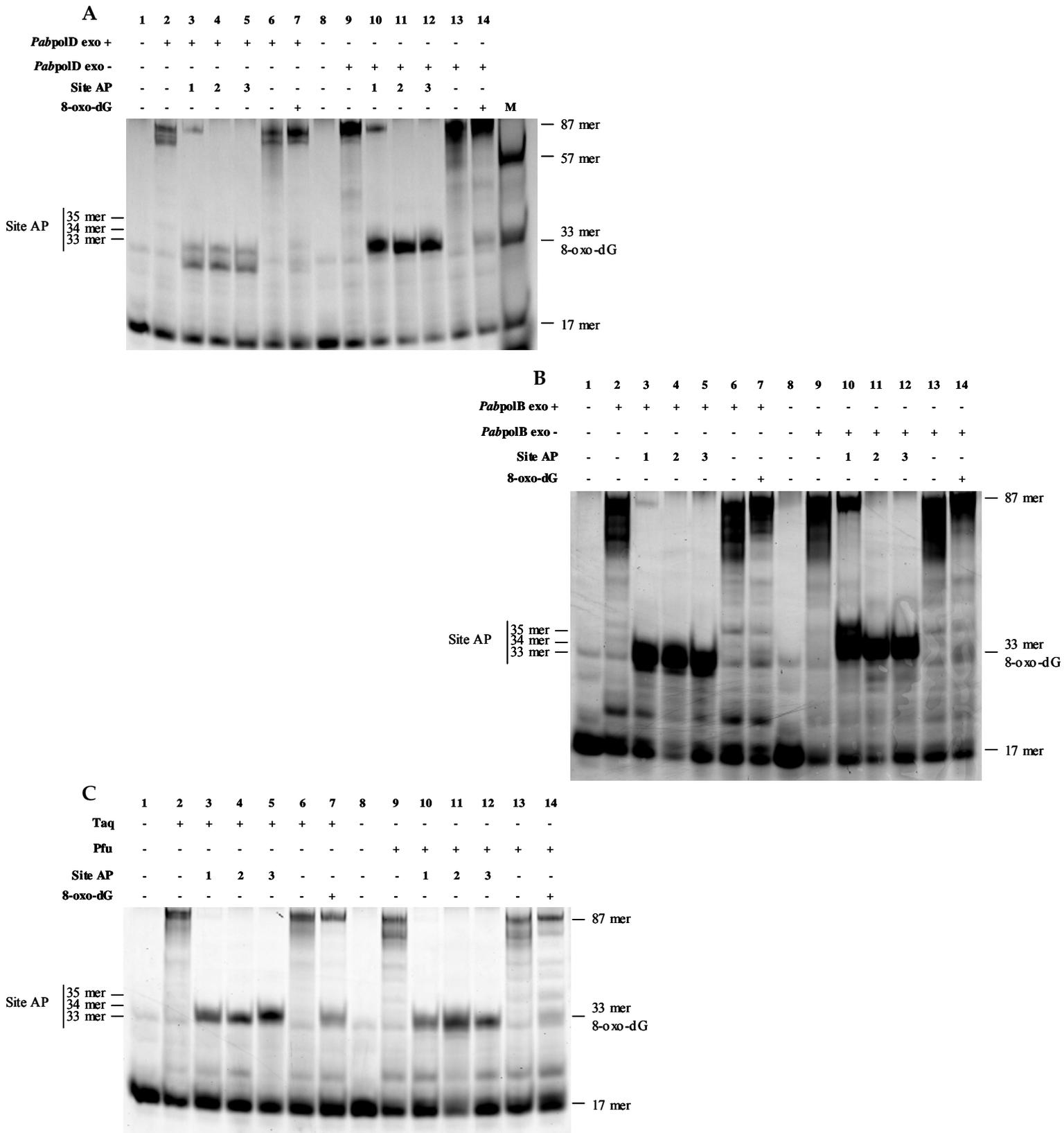


Figure 41 : Amplification par PCR d'oligonucléotides endommagés.

Gels Acrylamide natifs 12 %. Profil électrophorétique obtenu grâce au Typhoon 9400.M : Marqueur de taille. Conditions de PCR : 1 cycle de 95°C - 1min ; 50 cycles de (95°C - 50 sec ; 48°C - 1 min ; 68°C - 50 sec) ; 1 cycle 68°C - 5 min avec 0.1U de pol, 200 µM de dNTPs, 440 nM d'amorce (oligonucléotide 6), 7,4 nM de matrice ADN (oligonucléotide 2, 3 ou 4 contenant respectivement 1, 2 ou 3 sites AP) et les tampons d'incubation commerciaux 1X respectifs. Les pistes 2, 6, 9 et 13 sont les contrôles positifs avec 0,1U de pol et 8.3 nM de matrice ADN non endommagée (oligonucléotide 1).

IV. DISCUSSION

Les *Pabpols* *exo+* présentent un potentiel biotechnologique de part leur thermostabilité ainsi que leur haute fidélité, liée à la présence de la fonction exonucléasique.

Tout d'abord, un point important dans la caractérisation de *PabpolD* a été de montrer que *PabpolD* *exo+/exo-* permettait l'amplification d'ADN non endommagé de façon efficace ; seule 0.1U a suffi à la réaction d'amplification. Il s'agit là de la première pol, constituée de deux sous-unités, à être utilisable en PCR.

De plus, les expériences d'amplification, par la technique de PCR d'oligonucléotides de 87 mer contenant une lésion, mettent en évidence une légère capacité des *Pabpols* *exo+* à amplifier de l'ADN endommagé par rapport aux *Pabpols* *exo-* et aux pols utilisées comme référence (Taq et Pfu) : si les *Pabpols* *exo+* amplifient très légèrement un oligonucléotide contenant un site AP, elles sont toutefois capables d'amplifier efficacement un oligonucléotide présentant une lésion 8-oxo-dG.

Cependant, il faut noter que le nombre de cycles moyen effectué lors de ces expériences (x 50), est très élevé. D'une part, ce paramètre pourrait engendrer une instabilité structurale de l'hétérodimère *PabpolD* ou plus généralement modifier les propriétés fonctionnelles des *Pabpols*. Par exemple, il est possible que les deux sous-unités de *PabpolD* *exo+* se dissocient à cause des nombreux cycles à haute température ; ceci lui permettrait ainsi de franchir plus facilement le site AP. D'autre part, ce nombre élevé de cycles pourrait aussi fortement contribuer à l'apparition de dommages additionnels, notamment des cassures de brins au niveau des sites AP, induits par les cycles de dénaturation à 95°C. Ce nombre de cycles important pourrait ainsi entraîner une diminution significative du rendement de la PCR à cause de ces dommages (Lindahl, 1993, Pienaar *et al.*, 2006). Des protocoles de PCR plus courts pourraient alors être testés afin de diminuer le risque de déstabilisation des *Pabpols* et d'apparition de dommages supplémentaires de l'ADN, comme préconisé par le modèle de Pienaar *et al.* (Pienaar *et al.*, 2006). Ce résultat préliminaire est cependant fort encourageant et mérite d'être approfondi. Il serait utile de séquencer l'ensemble des amplicons générés par les *Pabpols* afin de déterminer la « fidélité » de ces enzymes lors de la PCR ; il paraît également fortement intéressant de pouvoir mesurer les éventuelles modulations d'efficacité

d'amplification par les *Pabpols* en présence d'ADN endommagé, en utilisant, par exemple, une méthode sensible basée sur la PCR quantitative, comme celle décrite par Sikorsky *et al.* (Sikorsky *et al.*, 2007).

⇒ En conclusion, l'aptitude d'amplification des *Pabpols* dépend essentiellement du type de dommage présent. A terme, il serait judicieux de déterminer leur capacité d'amplification en présence d'ADN naturellement dégradés par l'environnement, comme des échantillons d'ADN provenant de cheminées hydrothermales ou des ADN issus de fossiles.

– CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES –

Les archaea hyperthermophiles colonisent des milieux dynamiques comme l'environnement hydrothermal, caractérisé par des gradients abrupts de température, pH et oxygène mais aussi par des taux de radiations élevés. Ces différents paramètres peuvent déstabiliser la double hélice d'ADN en induisant des modifications de sa structure primaire comme des cassures simples ou doubles brins, des pontages ADN•ADN, ADN•Protéine ou des bases modifiées ou encore pertes de base (Lindahl, 1993). Ces microorganismes ont donc du s'adapter à ces conditions qualifiées d'« extrêmes » et mettre en place des stratégies afin de maintenir leur génome intact. En s'appuyant sur le modèle attractif qu'est l'euryarchaea hyperthermophile *Pab*, la démarche entreprise lors de cette thèse a été d'étudier les propriétés intrinsèques des deux pôles répliquatives de *Pab*, en présence de matrices présentant trois types de dommages : la lésion AP, les lésions oxydatives 8-oxo-dG et 8-oxo-dA et le dNTP oxydé 8-oxo-dGTP.

■ La première partie de ce projet nous a amené à nous interroger sur la quantité de sites AP et de lésions 8-oxo-dG, présentes dans le génome de *Pab* car, à ce jour, aucune équipe n'avait entrepris d'évaluer ce nombre de dommages chez les archaea hyperthermophiles, seules des spéculations avaient été formulées. Par conséquent, il nous a été nécessaire de mettre au point des techniques d'extraction d'ADN « douces » afin d'essayer de dénombrer ces deux types de lésions majeures. Le taux de lésions AP et 8-oxo-dG mesuré chez *Pab* paraît légèrement supérieur à celui observé chez la bactérie mésophile *E.coli*. De façon surprenante, ce taux semblerait plus élevé pour les sites AP, en phase exponentielle par rapport à la phase stationnaire de croissance. Or, dans le troisième domaine du vivant, des travaux ont déjà montré que certaines euryarchaea sont polyploïdes, telles *Methanocaldococcus jannaschii* ou encore *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Malandrin *et al.*, 1999, Majernik *et al.*, 2005) ; une étude, réalisée chez les euryarchaea halophiles *Haloferax salinarium* et *Haloferax volcanii*, a aussi récemment démontré que le nombre de copies de génome est directement lié à leur stade de croissance : un nombre plus élevé de copies est observé durant la phase exponentielle par rapport à la phase stationnaire (Breuert *et al.*, 2006). Ainsi, de façon très spéculative, l'hypothèse consisterait à corrélérer, chez *Pab*, l'éventuelle augmentation du nombre de copies du génome lors de la phase exponentielle avec la saturation des mécanismes de maintenance génomique, entraînant ainsi une augmentation du nombre de

lésions AP. Il serait par conséquent extrêmement intéressant de suivre l'évolution du nombre de copies du génome, chez les euryarchaea du genre *Pyrococcus*. Parallèlement, le stress oxydatif, appliqué pour la première fois au sein d'un bioréacteur gas-lift chez *Pab*, a entraîné une diminution importante du nombre de cellules viables corrélées à une augmentation significative du nombre de lésions 8-oxo-dG. Malgré l'effet génotoxique induit par le stress, quelques cellules restent viables. Cette légère tolérance à l'oxygène pourrait conférer à *Pab* un avantage majeur pour coloniser le milieu hydrothermal. Au-delà de l'aspect fondamental, cette démarche expérimentale en bioréacteur gas-lift constitue un premier pas vers des systèmes se rapprochant davantage des caractéristiques du milieu hydrothermal : le bioréacteur gas-lift pourrait à l'avenir s'avérer être un outil puissant pour explorer les mécanismes de résistance à divers agents génotoxiques chez les euryarchaea hyperthermophiles. Il serait intéressant de coupler l'étude de l'influence de différents paramètres physico-chimiques (pH, oxygène, rayonnements ionisants) à une approche protéomique (électrophorèse bidimensionnelle du protéome et spectrométrie de masse) afin d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la maintenance génomique.

■ Dans une seconde partie, les expériences fonctionnelles, réalisées avec les *Pab*pols B et D en présence de matrices ADN contenant une ou plusieurs lésions, ont contribué à la découverte de nouvelles propriétés intrinsèques chez ces pils, lorsqu'elles sont confrontées à un obstacle sur l'ADN. D'une part, les *Pab*pols sont sensibles à la présence de sites AP induits de façon aléatoire sur une matrice ADN circulaire. Elles sont sévèrement bloquées par un site AP indépendamment de la matrice (circulaire/linéaire) alors qu'elles franchissent efficacement les lésions oxydatives 8-oxo-dG et 8-oxo-dA (Tableau 12). Leurs fonctions exonucléasiques 3'→5' jouent alors un rôle primordial en inhibant la translésion d'un site AP, comme leur homologue eucaryote la pol δ (Fazlieva *et al.*, 2009). D'autre part, les *Pab*pols incorporent majoritairement un A en face d'un site AP obéissant ainsi à la loi du « A » indépendamment de l'environnement nucléotidique tandis que leurs comportements diffèrent légèrement en présence des lésions oxydatives (Tableau 12) : si *Pab*polB incorpore majoritairement un A en face de la lésion 8-oxo-dG, elle se montre étonnamment incapable d'insérer un nucléotide en face de la lésion 8-oxo-dA. *Pab*polD insère majoritairement un A mais est également capable d'incorporer un C ou un T en face des dommages 8-oxo-dG et

8-oxo-dA, respectivement. Ces pols répliquatives réussissent aussi à incorporer le 8-oxo-dGTP en face d'un C (Tableau 12). Il faut tout de même souligner que les concentrations en dNTPs utilisées lors de ce projet sont élevées, de l'ordre de 200 μ M final par réaction d'extension d'amorces. Comme la concentration intracellulaire en dNTPs chez *Pab* est à ce jour inconnue, la pertinence physiologique de ces résultats reste difficile à établir. Toutefois, des études récentes chez la levure ont suggéré que l'accumulation de dommages dans l'ADN entraîne une augmentation des concentrations intracellulaires en dNTPs (Chabes *et al.*, 2003) ; les concentrations élevées en dNTPs permettraient alors aux pols répliquatives de franchir certaines lésions de l'ADN afin d'éviter de bloquer la machinerie répliquative (Sabouri *et al.*, 2008). Il sera très certainement judicieux à l'avenir de suivre l'évolution de ces concentrations, chez *Pab*.

	<i>PabpolB</i>	<i>PabpolD</i>
LESION AP		
Incorporation en face de la lésion	A	A
Elongation au-delà de la lésion	+	-
LESION 8-OXO-dG		
Incorporation en face de la lésion	A	A et C
Elongation au-delà de la lésion	+	+
LESION 8-OXO-dA		
Incorporation en face de la lésion	-	A et T
Elongation au-delà de la lésion	+	+
8-OXO-dGTP		
Incorporation en face d'une base de l'ADN	C	C

Tableau 12 : Comparaison des propriétés intrinsèques des *PabpolB* et *D* en présence de matrices ADN endommagées ou d'un dNTP oxydé, découvertes lors de ce projet de thèse.

Les propriétés translésionnelles observées chez ces pols de haute fidélité en présence des deux lésions oxydatives étudiées mériteraient d'être approfondies : il serait fortement intéressant de mettre en œuvre des expériences de mutagenèse dirigée chez les *PabpolB* afin d'identifier les éventuels résidus catalytiques pouvant être impliqués dans la TLS, comme chez les pols de bactériophages appartenant à la famille B (De Vega & Salas, 2007, Zhong *et al.*, 2008).

Idéalement, les expériences réalisées avec les *PabpolB* pourraient également être replacées dans un contexte de fourche de réplication, en présence des différents facteurs accessoires. Il

est probable qu'*in vivo*, ces facteurs tels le PCNA, le RFC et le RPA puissent influencer l'incorporation préférentielle en face d'une lésion de l'ADN. Ce type d'approche pourrait nécessiter la création d'une matrice ADN circulaire présentant une lésion unique, par l'une des stratégies moléculaires décrites dans la littérature, afin de se rapprocher davantage de la physiologie de *Pab* (Napolitano & Fuchs, 1997, Karata *et al.*, 2009). Lors du blocage des *Pab*polys par un site AP, il est aussi envisageable que les *Pab*polys décrochent et que des mécanismes de « switch » prennent le relais, comme cela est le cas pour la pol réplicative δ eucaryote, qui est remplacé par la pol translésionnelle β et la Flap endonucléase 1 (famille X) (Maga *et al.*, 2009) ; ces hypothèses restent encore à élucider.

Parallèlement, il n'est pas exclu que *Pab* privilégie d'autres voies pour faire face à ces lésions AP, 8-oxo-dG et 8-oxo-dA. D'ailleurs, plusieurs protéines identifiées dans son génome constituent des candidates potentielles, susceptibles d'intervenir dans des mécanismes de réparation ou de surveillance des dommages : une protéine homologue de Mut T (NP126274) pourrait intervenir dans l'hydrolyse du 8-oxo-dGTP, au sein d'un processus de surveillance par exemple (Sekiguchi & Tsuzuki, 2002, Cohen *et al.*, 2003). Une endonucléase IV putative (CAB50587) serait impliquée dans la reconnaissance spécifique des sites AP. Le génome de *Pab* code aussi pour une ADN glycosylase putative (Q9UZY0) qui reconnaîtrait spécifiquement la lésion 8-oxo-dG notamment lors du BER. La caractérisation biochimique de ces protéines gagnerait d'être entreprise afin d'ouvrir des axes de recherche futurs dans la maintenance génomique chez les archaea.

Dans tous les cas, il est important de souligner l'importance des conditions réactionnelles, qui constituent une des limites des expérimentations *in vitro*. Dans de tels systèmes, la fidélité des pols est fortement influencée par la concentration en enzyme, le contexte nucléotidique, le pH, la concentration en dNTPs et par de nombreux autres variables (Friedberg, 2000). Ainsi, un réel fossé subsiste entre ces systèmes expérimentaux et les réponses biologiques *in vivo*. Il est donc nécessaire de rester prudent avant de formuler des conclusions sur le comportement des *Pab*polys face aux lésions ; à l'avenir, la validation de ces prédictions fonctionnelles nécessitera probablement un solide apport de l'outil génétique, afin d'établir une corrélation avec les données biochimiques (Allers & Mevarech, 2005). Chez *Pab*, une tentative de création d'un vecteur navette a été entreprise par S. Lucas *et al.* mais l'efficacité de transformation est trop faible (Lucas *et al.*, 2002). Dans l'immédiat, à défaut de

disposer d'un outil génétique optimal chez *Pab*, il peut être envisagé de réaliser des expériences d'immunodéplétion des *Pabpols*. De même, il serait intéressant d'essayer de transformer *Pab* à l'aide de plasmides contenant des lésions et d'étudier leur répllication.

■ Dans une troisième partie plus appliquée, les expériences préliminaires d'amplification par PCR mettent en évidence une légère capacité des *Pabpols* à amplifier de l'ADN endommagé. A l'avenir des expériences de mutagenèse dirigée sur ces pols pourraient être mises en oeuvre pour tenter d'accroître leur aptitude à franchir des lésions (Ghadessy *et al.*, 2004, D'Abbadie *et al.*, 2007). Plus simplement, ces *Pabpols* répllicatives pourraient être associées à des pols translésionnelles dans le mélange réactionnel pour amplifier des ADN dégradés, comme l'a proposé J.P. McDonald en utilisant simultanément une pol de la famille A et une pol de la famille Y (McDonald *et al.*, 2006). Parallèlement, les stratégies actuelles développées pour restaurer des traces d'ADN ancien consistent dans un premier temps, à réparer cet ADN endommagé puis, dans un second temps, à l'amplifier par PCR en utilisant une pol thermostable de haute fidélité (Johnson *et al.*, 2007). Le potentiel biotechnologique des *Pabpols* ne se limitent pas à ces applications en présence d'ADN endommagé ; elles pourraient faire l'objet d'une valorisation en présence d'autres facteurs du complexe de répllication, afin de mettre au point des technologies attractives comme la PCR isotherme (Gill & Ghaemi, 2008).

■ Il demeure en outre surprenant qu'aucune pol spécialisée n'ait été découverte, à ce jour, chez les euryarchaea. Néanmoins, l'étude de leurs génomes laisserait penser qu'il existe d'autres pols chez ces microorganismes (Nohmi *et al.*, 2008). La découverte inattendue des pols IV et V chez *E. coli*, suite à l'application d'un stress, suggèrent aussi que certaines pols archéennes puissent être inductibles lorsque la cellule est soumise à un changement d'environnement brutal (Wagner *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 1999). Ainsi, la « pêche » aux nouvelles pols chez les euryarchaea constituera un des challenges futurs à relever par les « répllicants » ! (Scott, 1982).

- ANNEXES -

ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE

□ Milieux liquides

▪ **Milieu TRM modifié** (Thermococcales Rich Medium)D'après (Erauso *et al.*, 1993)

Composants		Quantité pour 1L
Sources de carbone et/ou d'énergie	Extrait de levure	1 g
	Peptone	4 g
Sels et minéraux	NaCl	23 g
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O	5 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
	KCl	0,7 g
	NaBr	0,05 g
	Solution de CaCl ₂ , 2 H ₂ O 2%	1 mL
	SrCl ₂	0,01 g
	Na ₂ WO ₄ 10 mM	1 mL
	Solution de K ₂ HPO ₄ 5 %	1 mL
	Solution de KH ₂ PO ₄ 5 %	1 mL
	Solution de Na ₂ WO ₄ (10 mM)	1mL
Indicateur	Solution de rézazurine (1g L ⁻¹)	0,5 mL
Tampon	Pipes	3,3 g
Accepteur d'électrons	L-Cystéine	25 g
pH ajusté à 7		

▪ **Milieu YPS** (Yeast Peptone Sulphur)

Composants		Quantité pour 1L
Sources de carbone et/ou d'énergie	Extrait de levure	1 g
	Peptone	4 g
Sels et minéraux	NaCl	23 g
	MgCl ₂ , 6 H ₂ O	10,8 g
	Na ₂ SO ₄	4 g
	KCl	0,7 g
	NaHCO ₃	0,2 g
	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,2 g
	KBr	0,09 g
	SrCl ₂	0,025 g
	H ₃ BO ₃	0,025 g
	NaF	0,003 g
	NH ₄ Cl	0,14 g
	KH ₂ PO ₄	0,07 g
	Solution de FeCl ₃ (25 mM)	1 mL
	Solution de Na ₂ WO ₄ (10 mM)	1mL
	Indicateur	Solution de rézazurine (1g L ⁻¹)
Tampon	Pipes	3,46 g
Accepteur d'électrons	Soufre	25 g
pH ajusté à 7		

▪ **Milieu SME modifié**

D'après (Stetter *et al.*, 1983 , Raven *et al.*, 1992 , Godfroy *et al.*, 2006)

Composants		Quantité pour 1L
Sources de carbone et/ou d'énergie	Extrait de levure	1 g
	Peptone	2 g
Sels et minéraux	NaCl	28 g
	Solution de sels de magnésium	10 mL
	Solution A	1 mL
	Solution B	1 mL
	Solution C	1 mL
	Solution D	1 mL
Vitamines	Solution de vitamines	0,5 mL
Indicateur	Solution de rézazurine (1g L ⁻¹)	0,5 mL
Tampon	Pipes (Culture en flacons)	6,05 g
Accepteur d'électrons	Soufre colloïdal (Culture en flacons)	25 g
	ou L-cystéine (Culture en bioréacteur)	0,5 g
Agent réducteur	Na ₂ S 10% (Culture en flacons)	5 mL

pH ajusté à 7

Solution A

Composants	Quantité pour 1 L
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	9 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	2.5 g
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	2.5 g
AlK(SO ₄) ₂ , 12 H ₂ O	0.3 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0.3 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.15 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution C

Composants	Quantité pour 1 L
K ₂ HPO ₄	50 g
H ₃ BO ₃	7.5 g
Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	3.3 g
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.15 g
Na ₂ SeO ₃	0.005 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution de vitamines

Composants	Quantité pour 1 L
Biotine	40 mg
Acide folique	40 mg
Pyridoxine-HCl	200 mg
Thiamine HCl	100 mg
Riboflavine	100 mg
Acide nicotinique	100 mg
DL. Calcium pantothenate	100 mg
Vitamine B12	2 mg
Acide lipoïque	100 mg
Ethanol dans eau distillée 50 % V/V	qsp 1 L

Solution B

Composants	Quantité pour 1 L
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	56 g
NaBr	25 g
KCl	16 g
KI	10 g
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	4 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution D

Composants	Quantité pour 1 L
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	10 g
Acide chlorhydrique 1M	qsp 1 L

Solution de sels de magnésium

Composants	Quantité pour 1 L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	180 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	140 g
Eau milliQ	qsp 1 L

▪ **Milieu LB (Luria-Bertani)**

Composants	Quantité pour 1 L
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Eau milliQ	qsp 1 L
	pH ajusté à 7

□ Milieu solide

▪ **Milieu LB-Agar**

Composants	Quantité pour 1 L
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Eau milliQ	qsp 1 L
	pH ajusté à 7

ANNEXE 2 : ELECTROPHORESE

- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

- **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 0,5M (pH 8)	20 mM
Eau milliQ	qsp 1 L	

- **Gel de polyacrylamide 15 % - Urée 7 M – Formamide**

Composants	Quantité pour 40 mL
Acrylamide-BisAcrylamide 19:1, 40%	15 mL
Urée	16,82 g
TBE 10 X	4 mL
Formamide 99 %	2,5 mL
Eau milliQ	qsp 40 mL
Persulfate d'ammonium (APS) , 10%*	400 µL
TEMED*	60 µL

* A ajouter extemporanément

- Electrophorèse SDS-PAGE

- **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
Eau milliQ	qsp 1 L	

□ Révélation des protéines

▪ Solution de coloration

Composants	Quantité pour 10 mL	Concentration finale
Bleu de Coomassie G250	1 g	0%
Acide acétique	100 mL	10%
Ethanol	500 mL	50%
Eau milliQ	qsp 1 L	

▪ Solution de décoloration

Composants	Quantité pour 10 mL	Concentration finale
Acide acétique	100 mL	10%
Ethanol	300 mL	30%
Eau milliQ	qsp 1 L	

ANNEXE 3 : SEQUENCES PEPTIDIQUE DES PABPOLS

□ *PabpolD*

Petite sous-unité DPI : 619 Aa soit 69,4 kDa ; pI: 4,95 – Activité exonucléasique

MDELVKALERAGYLLTPSAYYLLVDHFKEGKFSLVLELVKFAKSKGVFIIDGDLAYEFLQFLGLGVPQEIKEYSYIS
 TGEAAEKTVESQETRASELEEGGVSQVSSGELQELKEESPEISTTEEEIGGLELVQSSISTGSEVEYNNGENGES
 VVVLDKYGYPILYAPEEIGEEKEYSKYEDVVIENPNSVTPVQIEKNEYVKFDVRQVKLRPPKVKNGSGKEGEIIV
 EAYASLFSKRLSKLKRILRENPEISNVVDIGKLNYSVSGDEEVTIIGLVNSKRETNRGLIFEVEDKTGIVKVFPLK
 DSEDYREAFKVLPAVAVAFKGFYSKKGIFFANKFYLPDVPYRQKQPPLEEKVYAILISDIHVSREFCEKAFK
 FLEWLNHVESKEEEEIVSRVKYLI IAGDVVDGIGIYPGQYSDLVIPDIFDQYEALANLLANVPEHITMFIGP
 HDAARPAIPQPEFYKEYAKPIYKLNKNAIIISNPAVIRLHGRDFLIAHGRGIEDVVSFVPLGTHHKPGLPMVELLK
 MRHLAPTFGGKVP IAPDPEDLLVIEEVPDLVQMGHVHVYDAVVYRQVQLVNSATWQAQTEFQKMNIVPTPAKVP
 VVDVESARVVKVLDVDFSGWC

Intéine

FPGDTRILVQIDGVPQKITLRELYELFEDERYENMVYVRKKPKREIKVYSIDLETGKVVLTIDIEDVIKAPATDHL
 IRFELEDGRSFETTVDHPVLVYENGRFIEKRAFEVKEGDKVLVSELELVEQSSSSQDNPKNENLGSPEHDQLEI
 KNIKYVRANDDFVFSLNAKKYHNVIINENIVTHQC

Grande sous-unité DPII : 1270 Aa soit 144,2 kDa ; pI: 6,48– Activité polymérasique

MELPKEMEEYFEMLQREIDKAYEIAKKARAQKDPVSLDVEIPQATDMAGRVESLVGPPGVAKRIRELVKEYGKEI
 AALKIVDEIIIEGKFGDLGSREKYAEQAVRTALAILTEGIVSAPIEGIANVKIKRNTWADNSEYLALYYAGPIRSS
 GGTAQALSVLVDYVRRKLGDRFKPSEKHIERMVEEVDLYHRAVTRLOQYHPSPEEVRMLAMRNIP I EITGEATDD
 VEVSHRDVPGVETNQLRGGAILVLAEGVLQAKKLVKYIDKMGIEGWELKEFVEAKEKGEKPEEGKEESLAEST
 LEETKVEVDMGFYYSLYQKFKKEE IAPSDKYAKEVIGGRPLFSDPSKPGGFRRLRYGRSRASGFATWGINPATMILV
 DEFLAIGTQLKTERPGKAVVTPVTTIEGPIVKKLDGSLRVDDYNLALKVREDVEEILYLGDVAIAFGDFVENN
 QTLPLANYCEEWWILEFVKALKEIYEVHLEPFTENEEESIEEASDYLEIDPEFLKEMLRDLRVPVLAIHFS
 EVLGIPLHPYTYTLYWNSVEPKDVEKLRWLLKNYAEIEWSNFRGKIFAKKIVISQEKLGDSKRTLELLGLPHTVRD
 GNVIVDYPWAAALLTPLGNLNWFMKAPLYATIDIINENNEIKLRDRGISWIGARMGRPEKAKERKMKPPVQVLF
 PIGLAGGSSRDIKKAAEEGKVAEVEIAFFKCPKCGHVGPEHLCPNCGTRKELLWVCPRCNAEY P ESQAEGYNYTC
 PKCNVKKLRPYAKRKIRPSELLNRAMENVKVGVDKLGVMGMTSGWKMPLEKGLLRANDVYVFKDGTIRFDA
 TDAPITHFRPREIGVSVEKLRRELGYTHDFEGKPLVSEDQIVELKQDIIISKEAGRYLLKVAKFVDDLLEKIFYGL
 PRFYNAEKMEDLIGHLVIGLAPHTSAGIVGRIIGFVDALVGYAHPYFHAARRNCDGEDAVMLLLDALLNFSRY
 YLPEKRGKMDAPLVITTRLDPREVDSEVHNMDIVRYYPLEFYEATYELKSPKELVGVIERVEDRLGKPEMYGYL
 KFTHTDDIALGPKMSLYKQLGDMEEKVRRQLEVAKRIRAVDEHGVAEKILNSHLIPDLRGNLRSFTRQEFRCVK
 CNTKFRPPLNGKCPVCGGKIVLTVSKGAI EKYLGTAKMLVTEYNVKNYTRQRI CLTERDIDSLFENVFPETQLT
 LIVPNNDICQRLVMARTGEVNSGLENLSNGSKKTEKA EKA EKPRKKSDEKPKKRVISLEEFFSRKSK

□ *PabpolB*

771 Aa soit 75 kDa ; pI: 8,42

MIIDADYITEDGKPIIRIFKKEKGEFKVEYDRTPFPYIYALLKDDSAIDEVKKITAERHGKIVRITVEKQKFF
 LGRPIEVWKLYLEHPQDVPAIREKIREHPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLTPMEGNEELTFLAVDIEETLYHEGE
 EFGKGPIMISYADEEGAKVITWKSIDL PYVEVVSEREMIKRLVKVIREKDPDVIITYNGDNFDFPYLLKRAEK
 LGIKLPLGRDNSEPKMQRMGDSLAVEIKGRIHFDFLPVIRRTINLPTYTLEAVYEAIFGKSKEKVYAHEIAEAWE
 TGKGLERVAKYSMEDAKVTFELGKEFFPMEAQLARLVGQPVDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYERNELAPNKPDER
 EYERRLRESYEGGYVKEPEKGLWEGIVSLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNRENCKEYDVAPQVGHFRCKDFPGFI
 PSLGNLLEERQKIKKRMKESKDPVEKLLLDYRQRAIKILANSYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIDL
 RRELESRGFKVLYIDTDGLYATIPGAKHEEIKEKALKFVEYINSKLPGLLELEYEGFYARGFFVTKKKYALIDEE
 GKIVTRGLEIVRRDWEI AKETQAKVLEAILKHGNVDEAVKIVKEVTEKLSKYEIPPEKLVIEYQITRPLSEYKA
 IGHVAVAKRLAAKGVKVKPMVIGYIVLRGDGPI SKRAIAIEEFDPKKHKYDAEYIENQVLP AVERILRAFGY
 RKEDLKYQKTKQVGLGAWLKF

– BIBLIOGRAPHIE –

A

- Akcha, F., S. Ruiz, C. Zamperon, P. Vernier, T. Burgeot, J. Cadet & J. F. Narbonne, (2000) Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* : measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation. *Biomarkers* **5**: 355-367.
- Allers, T. & M. Mevarech, (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* **6**: 58-73.
- Amersham, B., (2000). In: Fluorescence Imaging: principles and methods. pp. Appendix 2.
- Ames, B. N., (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* **7**: 121-128.
- Ames, B. N. & L. S. Gold, (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* **250**: 3-16.
- Antranikian, G., C. E. Vorgias & C. Bertoldo, (2005) Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **96**: 219-262.
- Arana, M. E., M. Seki, R. D. Wood, I. B. Rogozin & T. A. Kunkel, (2008) Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic Acids Res* **36**: 3847-3856.
- Aravind, L. & E. V. Koonin, (1998) Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res* **26**: 3746-3752.
- Asami, S., T. Hirano, R. Yamaguchi, Y. Tomioka, H. Itoh & H. Kasai, (1996) Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res* **56**: 2546-2549.
- Avery, O. T., C. M. MacLeod & M. McCarty, (1995) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *Mol Med* **1**: 344-365.

B

- 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 U S A* **93**: 9188-9193.
- Barry, E. R. & S. D. Bell, (2006) DNA replication in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 876-887.
- Bebenek, K. & T. A. Kunkel, (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **69**: 137-165.
- Berquist, B. R., P. DasSarma & S. DasSarma, (2007) Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp NRC-I. *BMC Genet.* **8**.
- Bessman, M. J., A. Kornberg, I. R. Lehman & E. S. Simms, (1956) Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* **21**: 197-198.
- Bjelland, S. & E. Seeberg, (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* **531**: 37-80.
- Böhlke, K., F. M. Pisani, M. Rossi & G. Antranikian, (2002) Archaeal DNA replication: spotlight on a rapidly moving field. *Extremophiles* **6**: 1-14.
- Boisson, F., J. C. Miquel, O. Cotret & S. W. Fowler, (2001) ²¹⁰Po and ²¹⁰Pb cycling in a hydrothermal vent zone in the coastal Aegean sea. *Sci Total Environ* **281**: 111-119.
- Bolin, C. & F. Cardozo-Pelaez, (2007) Assessing biomarkers of oxidative stress: analysis of guanosine and oxidized guanosine nucleotide triphosphates by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **856**: 121-130.
- 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 poleta. *Nucleic Acids Res* **29**: 4607-4616.

- Boudsocq, F., R. J. Kokoska, B. S. Plosky, A. Vaisman, H. Ling, T. A. Kunkel, W. Yang & R. Woodgate, (2004) Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *J Biol Chem* **279**: 32932-32940.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braithwaite, D. K. & J. Ito, (1993) Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **21**: 787-802.
- Breen, A. P. & J. A. Murphy, (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* **18**: 1033-1077.
- Breuert, S., T. Allers, G. Spohn & J. Soppa, (2006) Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS ONE* **1**: e92.
- Briebe, L. G., B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S. Doublet, T. A. Kunkel & T. Ellenberger, (2004) Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *Embo J* **23**: 3452-3461.
- 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.
- Brock, T. D. & H. Freeze, (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* **98**: 289-297.
- Brown, J. A., W. W. Duym, J. D. Fowler & Z. Suo, (2007) Single-turnover kinetic analysis of the mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine during gap-filling synthesis catalyzed by human DNA polymerases lambda and beta. *J Mol Biol* **367**: 1258-1269.
- Brown, J. R. & W. F. Doolittle, (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 456-502.
- Bruck, I., M. F. Goodman & M. O'Donnell, (2003) The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem* **278**: 44361-44368.
- Bruskov, V. I., L. V. Malakhova, Z. K. Masalimov & A. V. Chernikov, (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* **30**: 1354-1363.
- 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.

C

- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat & S. Sauvaigo, (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* **424**: 9-21.
- Cadet, J., T. Douki, D. Gasparutto & J. L. Ravanat, (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* **531**: 5-23.
- Cadet, J., T. Douki & J. L. Ravanat, (2008) Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res* **41**: 1075-1083.
- Cann, I. K., 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., 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., 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. & Y. Ishino, (1999) Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* **152**: 1249-1267.
- Cann, I. K., 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 U S A* **95**: 14250-14255.
- Cariello, N. F., J. A. Swenberg & T. R. Skopek, (1991) Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **19**: 4193-4198.
- Cavalier-Smith, T., (2006) Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol Direct* **1**: 19.
- Chaban, B., S. Y. Ng & K. F. Jarrell, (2006) Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* **52**: 73-116.
- Chabes, A., B. Georgieva, V. Domkin, X. Zhao, R. Rothstein & L. Thelander, (2003) Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**: 391-401.
- Charbonnier, F., P. Forterre, G. Erauso & D. Prieur, (1995) Purification of Plasmids from Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea. In: *Archaea: A Laboratory Manual*. A. R. P. F.T. Robb (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 87-90.
- Charmasson, S., P. M. Sarradin, A. Le Faouder, M. Agarande, J. Loyen & D. Desbruyeres, (2009) High levels of natural radioactivity in biota from deep-sea hydrothermal vents: a preliminary communication. *Journal of Environmental Radioactivity* **100**: 522-526.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura & L. A. Loeb, (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* **267**: 166-172.
- Cherry, R., D. Desbruyeres, M. Heyraud & C. Nolan, (1992) High level of natural radioactivity in hydrothermal vent polychaetes. *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. III-Sci. Vie-Life Sci.* **315**: 21-26.
- Chevaldonne, P., D. Desbruyeres & M. Lehaitre, (1991) Time-series of temperature from the deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **38**: 1417-1430.
- Chien, A., D. B. Edgar & J. M. Trela, (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**: 1550-1557.
- Cline, J., J. C. Braman & H. H. Hogrefe, (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic 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, J. Van der Oost, J. Weissenbach, Y. Zivanovic & P. Forterre, (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**: 1495-1512.
- Collins, A. R., S. J. Duthie, L. Fillion, C. M. Gedik, N. Vaughan & S. G. Wood, (1997) Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem Soc Trans* **25**: 326-331.
- Connolly, B. A., (2009) Recognition of deaminated bases by archaeal family-B DNA polymerases. *Biochem Soc Trans* **37**: 65-68.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu & J. Lunec, (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* **17**: 1195-1214.
- Crespan, E., U. Hubscher & G. Maga, (2007) Error-free bypass of 2-hydroxyadenine by human DNA polymerase lambda with Proliferating Cell Nuclear Antigen and Replication Protein A in different sequence contexts. *Nucleic Acids Res* **35**: 5173-5181.

D

- D'Abbadie, M., M. Hofreiter, A. Vaisman, D. Loakes, D. Gasparutto, J. Cadet, R. Woodgate, S. Paabo & P. Holliger, (2007) Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nat Biotechnol* **25**: 939-943.
- Datukishvili, N., D. Pokholok, F. Lottspeich, D. Prangishvili & V. Rechinsky, (1996) The DNA polymerase-encoding gene from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Gene* **177**: 271-273.
- De Vega, M. & M. Salas, (2007) A highly conserved Tyrosine residue of family B DNA polymerases contributes to dictate translesion synthesis past 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res* **35**: 5096-5107.
- DeLong, E. F., (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5685-5689.
- DeLong, E. F. & N. R. Pace, (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**: 470-478.
- 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., 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.
- Duarte, V., J. G. Muller & C. J. Burrows, (1999) Insertion of dGMP and dAMP during *in vitro* DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res* **27**: 496-502.
- Einolf, H. J. & F. P. Guengerich, (2001) Fidelity of nucleotide insertion at 8-oxo-7,8-dihydroguanine by mammalian DNA polymerase delta. Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis. *J Biol Chem* **276**: 3764-3771.
- Einolf, H. J., N. Schnetz-Boutaud & F. P. Guengerich, (1998) Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine triphosphate incorporation and extension by replicative and repair DNA polymerases. *Biochemistry* **37**: 13300-13312.
- Elie, C., A. M. De Recondo & P. Forterre, (1989) Thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification, characterization and immunological properties. *Eur J Biochem* **178**: 619-626.
- 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., S. Marsin, N. Benbouzid-Rollet, M. F. Baucher, T. Barbeyron, Y. Zivanovic, D. Prieur & P. Forterre, (1996) Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J Bacteriol* **178**: 3232-3237.
- 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.

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.

F

- Fazlieva, R., C. S. Spittle, D. Morrissey, H. Hayashi, H. Yan & Y. Matsumoto, (2009) Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase delta and its effects on lesion-bypass

- DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* **37**: 2854-2866.
- Fiala, K. A., C. D. Hypes & Z. Suo, (2007) Mechanism of abasic lesion bypass catalyzed by a Y-family DNA polymerase. *J Biol Chem* **282**: 8188-8198.
- Fiala, K. A. & Z. Suo, (2007) Sloppy bypass of an abasic lesion catalyzed by a Y-family DNA polymerase. *J Biol Chem* **282**: 8199-8206.
- 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.
- 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. & H. Philippe, (1999) The last universal common ancestor (LUCA), simple or complex? *Biol Bull* **196**: 373-375; discussion 375-377.
- Fouquet, Y., A. Wafik, P. Cambon, C. Mevel, G. Meyer & P. Gente, (1993) Tectonic setting and mineralogical and geochemical zonation in the snake pit sulfide deposit (mid-Atlantic ridge at 23-degrees-N). *Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists* **88**: 2018-2036.
- 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.
- Freisinger, E., A. P. Grollman, H. Miller & C. Kisker, (2004) Lesion (in)tolerance reveals insights into DNA replication fidelity. *Embo J* **23**: 1494-1505.
- Friedberg, E. C., (2000) Biological responses to DNA damage: a perspective in the new millennium. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 593-602.
- Friedberg, E. C., R. Wagner & M. Radman, (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* **296**: 1627-1630.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz & T. Ellenberger, (2006a) Biological Responses to DNA Damage. In: DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D.C. (ed). pp. 3-7.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz & T. Ellenberger, (2006b) DNA Damage. In: DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D.C. (ed). pp. 9-69.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz & T. Ellenberger, (2006c) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D.C. (ed). p. 1118.
- Fuchs, R. P., S. Fujii & J. Wagner, (2004) Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv Protein Chem* **69**: 229-264.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum & A. A. Davis, (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148-149.
- Furge, L. L. & F. P. Guengerich, (1997) Analysis of nucleotide insertion and extension at 8-oxo-7,8-dihydroguanine by replicative T7 polymerase exo- and human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase using steady-state and pre-steady-state kinetics. *Biochemistry* **36**: 6475-6487.
- ## G
- Gendron, J. F., J. F. Todd, R. A. Feely, E. T. Baker & D. C. Kadko, (1994) Excess ²²²Rn above the cleft segment of the Juan de fuca Ridge. *J. Geophys. Res.-Solid Earth* **99**: 5007-5015.
- Ghadessy, F. J., N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate & P. Holliger, (2004) Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. *Nat Biotechnol* **22**: 755-759.
- Gill, P. & A. Ghaemi, (2008) Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**: 224-243.
- Glansdorff, N., Y. Xu & B. Labedan, (2008) The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biol Direct* **3**: 29.

- Godfroy, A., A. Postec & N. Raven, (2006) Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. In: *Methods in Microbiology*. pp. 93-108.
- Goodman, M. F., (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**: 17-50.
- Grabowski, B. & Z. Kelman, (2003) Archaeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* **57**: 487-516.
- Graham, D. E., R. Overbeek, G. J. Olsen & C. R. Woese, (2000) An archaeal genomic signature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3304-3308.
- 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.
- Grogan, D. W., (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol. Microbiol.* **28**: 1043-1049.
- Grogan, D. W., (2004) Stability and repair of DNA in hyperthermophilic Archaea. *Curr Issues Mol Biol* **6**: 137-144.
- Grogan, D. W., G. T. Carver & J. W. Drake, (2001) Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7928-7933.
- Grunden, A. M., F. E. Jenney, Jr., K. Ma, M. Ji, M. V. Weinberg & M. W. Adams, (2005) *In vitro* reconstitution of an NADPH-dependent superoxide reduction pathway from *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1522-1530.
- Gruz, P., F. M. Pisani, M. Shimizu, M. Yamada, I. Hayashi, K. Morikawa & T. Nohmi, (2001) Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C. *J Biol Chem* **276**: 47394-47401.
- Gruz, P., M. Shimizu, F. M. Pisani, M. De Felice, Y. Kanke & T. Nohmi, (2003) Processing of DNA lesions by archaeal DNA polymerases from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res* **31**: 4024-4030.
- 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.
- Guschlbauer, W., A. M. Duplaa, A. Guy, R. Teoule & G. V. Fazakerley, (1991) Structure and *in vitro* replication of DNA templates containing 7,8-dihydro-8-oxoadenine. *Nucleic Acids Res* **19**: 1753-1758.

H

- Hamilton, M. L., Z. Guo, C. D. Fuller, H. Van Remmen, W. F. Ward, S. N. Austad, D. A. Troyer, I. Thompson & A. Richardson, (2001a) A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Res* **29**: 2117-2126.
- Hamilton, S. C., J. W. Farchaus & M. C. Davis, (2001b) DNA polymerases as engines for biotechnology. *Biotechniques* **31**: 370-376, 378-380, 382-373.
- Hanes, J. W., D. M. Thal & K. A. Johnson, (2006) Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* **281**: 36241-36248.
- Haracska, L., S. Prakash & L. Prakash, (2003) Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol Cell Biol* **23**: 1453-1459.
- Haracska, L., I. Unk, R. E. Johnson, E. Johansson, P. M. Burgers, S. Prakash & L. Prakash, (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev* **15**: 945-954.

- Hashimoto, H., M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue & Y. Kai, (2001) Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J Mol Biol* **306**: 469-477.
- Hayashi, I., K. Morikawa & Y. Ishino, (1999) Specific interaction between DNA polymerase II (PolD) and RadB, a Rad51/Dmc1 homolog, in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **27**: 4695-4702.
- Helbock, H. J., K. B. Beckman, M. K. Shigenaga, P. B. Walter, A. A. Woodall, H. C. Yeo & B. N. Ames, (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 288-293.
- Henneke, G., D. Flament, U. Hubscher, 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.
- Hidaka, K., M. Yamada, H. Kamiya, C. Masutani, H. Harashima, F. Hanaoka & T. Nohmi, (2008) Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase ϵ . *DNA Repair (Amst)* **7**: 497-506.
- Hogrefe, H. H., C. J. Hansen, B. R. Scott & K. B. Nielson, (2002) Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 596-601.
- 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 U S A* **96**: 3600-3605.
- Hsu, G. W., M. Ober, T. Carell & L. S. Beese, (2004) Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature* **431**: 217-221.
- Huber, H., M. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. Wimmer & K. Stetter, (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Huber, H., M. J. Hohn, K. O. Stetter & R. Rachel, (2003) The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res Microbiol* **154**: 165-171.
- Huber, R., P. Stoffers, J. L. Cheminee, H. H. Richnow & K. O. Stetter, (1990) Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald seamount. *Nature* **345**: 179-182.
- Hübscher, U., G. Maga & S. Spadari, (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163.
- Hutchinson, F., (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **32**: 115-154.

I

- Imlay, J. A., (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.
- Inoue, M., H. Kamiya, K. Fujikawa, Y. Ootsuyama, N. Murata-Kamiya, T. Osaki, K. Yasumoto & H. Kasai, (1998) Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. New evaluation method for mutagenesis by damaged DNA precursors *in vivo*. *J Biol Chem* **273**: 11069-11074.
- Ishibashi, J., D. Grimaud, Y. Nojiri, J. M. Auzende & T. Urabe, (1994) Fluctuation of chemical compositions

of the phase-separated hydrothermal fluid from the North Fiji Basin Ridge. *Mar. Geol.* **116**: 215-226.

Ishino, Y., K. Komori, I. K. O. Cann & Y. Koga, (1998) A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol.* **180**: 2232-2236.

Ito, J. & D. K. Braithwaite, (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res* **19**: 4045-4057.

J

Jenney, F. E., Jr., M. F. Verhagen, X. Cui & M. W. Adams, (1999) Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* **286**: 306-309.

Johnson, N. A., R. McKenzie, L. McLean, L. C. Sowers & H. M. Fletcher, (2004) 8-oxo-7,8-dihydroguanine is removed by a nucleotide excision repair-like mechanism in *Porphyromonas gingivalis* W83. *J Bacteriol* **186**: 7697-7703.

Johnson, S., M. Hebsgaard, T. Christensen, M. Mastepanov, R. Nielsen, K. Munch, T. Brand, M. Gilbert, M. Zuber, M. Bunce, R. Rønn, D. Gilichinsky, D. Froese & E. Willerslev, (2007) Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14401-14405.

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. *Nucleic Acids Res* **32**: 2430-2440.

Jolivet, E., (2002) Etudes physiologiques et moléculaires de la résistance aux rayonnements ionisants d'archaea hyperthermophiles isolées de sources hydrothermales océaniques profondes. In: Thèse. Institut universitaire Européen de la Mer. Brest: Université de Bretagne Occidentale, pp. 216.

Jolivet, E., F. Matsunaga, Y. Ishino, P. Forterre, D. Prieur & H. Myllykallio, (2003) Physiological responses of the hyperthermophilic archaeon "*Pyrococcus abyssi*" to DNA damage caused by

ionizing radiation. *J Bacteriol* **185**: 3958-3961.

Joyce, C. M. & T. A. Steitz, (1994) Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **63**: 777-822.

K

Kamiya, H., (2003) Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res* **31**: 517-531.

Kamiya, H. & H. Kasai, (1995) Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation. *J Biol Chem* **270**: 19446-19450.

Kamiya, H., H. Miura, N. Murata-Kamiya, H. Ishikawa, T. Sakaguchi, H. Inoue, T. Sasaki, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Nishimura, (1995) 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells. *Nucleic Acids Res* **23**: 2893-2899.

Kandler, O. & H. König, (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* **54**: 305-308.

Karata, K., A. E. Vidal & R. Woodgate, (2009) Construction of a circular single-stranded DNA template containing a defined lesion. *DNA Repair (Amst)* **8**: 852-856.

Kasai, H., (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* **387**: 147-163.

Kasai, H., (2002) Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* **33**: 450-456.

Kasai, H., M. H. Chung, D. S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, H. Kamiya, E. Ohtsuka & S. Nishimura, (1991) 8-Hydroxyguanine, a

- DNA adduct formed by oxygen radicals: its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis. *J Toxicol Sci* **16 Suppl 1**: 95-105.
- Keeling, P. J., H. P. Klenk, R. K. Singh, M. E. Schenk, C. W. Sensen, W. Zillig & W. F. Doolittle, (1998) *Sulfolobus islandicus* plasmids pRN1 and pRN2 share distant but common evolutionary ancestry. *Extremophiles* **2**: 391-393.
- Kelly, M. C., B. White & M. R. Smyth, (2008) Separation of oxidatively damaged DNA nucleobases and nucleosides on packed and monolith C18 columns by HPLC-UV-EC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **863**: 181-186.
- Kelman, Z., (2000) DNA Replication in the Third Domain (of Life). *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**: 139-154.
- Kelman, Z., S. Pietrokovski & J. Hurwitz, (1999) Isolation and characterization of a split B-type DNA polymerase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH. *J Biol Chem* **274**: 28751-28761.
- Khare, V. & K. A. Eckert, (2002) The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat Res* **510**: 45-54.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux & H. G. Khorana, (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* **56**: 341-361.
- Klimczak, L. J., F. Grummt & K. J. Burger, (1985) Purification and characterization of DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res* **13**: 5269-5282.
- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice & T. A. Steitz, (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790.
- Kool, E. T., (2002) Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **71**: 191-219.
- Koonin, E. V., K. S. Makarova & L. Aravind, (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol* **55**: 709-742.
- Kornberg, A. & T. A. Baker, (1992) DNA replication. In: DNA replication. New York, pp. xiv, 931.
- Kulaeva, O. I., E. V. Koonin, J. P. McDonald, S. K. Randall, N. Rabinovich, J. F. Connaughton, A. S. Levine & R. Woodgate, (1996) Identification of a DinB/UmuC homolog in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mutat Res* **357**: 245-253.
- Kunkel, T. A., (2004) DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**: 16895-16898.
- Kunkel, T. A., R. M. Schaaper & L. A. Loeb, (1983) Depurination-induced infidelity of deoxyribonucleic acid synthesis with purified deoxyribonucleic acid replication proteins *in vitro*. *Biochemistry* **22**: 2378-2384.

L

- Lasken, R. S., D. M. Schuster & A. Rashtchian, (1996) Archaeobacterial DNA polymerases tightly bind uracil-containing DNA. *J Biol Chem* **271**: 17692-17696.
- Lawrence, C. W., (2004) Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem* **69**: 167-203.
- Lee, J. W., L. Blanco, T. Zhou, M. Garcia-Diaz, K. Bebenek, T. A. Kunkel, Z. Wang & L. F. Povirk, (2004) Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* **279**: 805-811.
- Lenton, K. J., H. Therriault, T. Fulop, H. Payette & J. R. Wagner, (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* **20**: 607-613.
- Leonard, G. A., A. Guy, T. Brown, R. Teoule & W. N. Hunter, (1992) Conformation of guanine-8-oxoadenine base pairs in the crystal structure of

- d(CGCGAATT(O8A)GCG). *Biochemistry* **31**: 8415-8420.
- Lin, X., J. Trang, T. Okuda & S. B. Howell, (2006) DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair. *Clin Cancer Res* **12**: 563-568.
- Lindahl, T., (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715.
- Lindahl, T. & D. E. Barnes, (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 127-133.
- Lindahl, T. & O. Karlstrom, (1973) Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* **12**: 5151-5154.
- Ling, H., F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate & W. Yang, (2003) Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution. *Nature* **424**: 1083-1087.
- Ling, H., F. Boudsocq, R. Woodgate & W. Yang, (2001) Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell* **107**: 91-102.
- Ling, H., F. Boudsocq, R. Woodgate & W. Yang, (2004) Snapshots of replication through an abasic lesion; structural basis for base substitutions and frameshifts. *Mol Cell* **13**: 751-762.
- Loeb, L. A., B. D. Preston, E. T. Snow & R. M. Schaaper, (1986) Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis. *Basic Life Sci* **38**: 341-347.
- Lowe, L. G. & F. P. Guengerich, (1996) Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of dNTP insertion opposite 8-oxo-7,8-dihydroguanine by *Escherichia coli* polymerases I exo- and II exo. *Biochemistry* **35**: 9840-9849.
- Lucas, S., L. Toffin, Y. Zivanovic, D. Charlier, H. Moussard, P. Forterre, D. Prieur & G. Erauso, (2002) Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5528-5536.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. 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.

M

- MacNeill, S. A., (2001) Understanding the enzymology of archaeal DNA replication: progress in form and function. *Mol Microbiol* **40**: 520-529.
- Madigan, M. T. & J. M. Martinko, (2007) Le pseudopeptidoglycane, les couches S et les parois d'archaea. In: Biologie des Micro-organismes. P. E. France (ed). Prentice Hall. pp. 78.
- Maga, G. & U. Hubscher, (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* **116**: 3051-3060.
- Maga, G., I. Shevelev, K. Ramadan, S. Spadari & U. Hubscher, (2002) DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. *J Mol Biol* **319**: 359-369.
- Maga, G., B. van Loon, E. Crespan, G. Villani & U. Hubscher, (2009) The block of DNA polymerase delta strand displacement activity by an abasic site can be rescued by the concerted action of DNA polymerase beta and Flap endonuclease 1. *J Biol Chem* **284**: 14267-14275.
- Maga, G., G. Villani, E. Crespan, U. Wimmer, E. Ferrari, B. Bertocci & U. Hubscher, (2007) 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature* **447**: 606-608.
- Majernik, A. I., M. Lundgren, P. McDermott, R. Bernander & J. P. Chong, (2005) DNA content and nucleoid distribution in *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *J Bacteriol* **187**: 1856-1858.
- Malandrin, L., H. Huber & R. Bernander, (1999) Nucleoid structure and partition in *Methanococcus jannaschii*: an archaeon with multiple copies of

- the chromosome. *Genetics* **152**: 1315-1323.
- Marteinson, V. T., P. Moulin, J. Birrien, A. Gambacorta, M. Vernet & D. Prieur, (1997) Physiological Responses to Stress Conditions and Barophilic Behavior of the Hyperthermophilic Vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1230-1236.
- McAuley-Hecht, K. E., G. A. Leonard, N. J. Gibson, J. B. Thomson, W. P. Watson, W. N. Hunter & T. Brown, (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry* **33**: 10266-10270.
- McDonald, J. P., A. Hall, D. Gasparutto, J. Cadet, J. Ballantyne & R. Woodgate, (2006) Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs. *Nucleic Acids Res* **34**: 1102-1111.
- Meselson, M. & F. Stahl, (1958) The replication of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **23**: 9-12.
- Miller, H., R. Prasad, S. H. Wilson, F. Johnson & A. P. Grollman, (2000) 8-oxodGTP incorporation by DNA polymerase beta is modified by active-site residue Asn279. *Biochemistry* **39**: 1029-1033.
- Moon, A. F., M. Garcia-Diaz, V. K. Batra, W. A. Beard, K. Bebenek, T. A. Kunkel, S. H. Wilson & L. C. Pedersen, (2007) The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1709-1725.
- Murata-Kamiya, N., H. Kamiya, M. Muraoka, H. Kaji & H. Kasai, (1997) Comparison of oxidation products from DNA components by gamma-irradiation and Fenton-type reactions. *J Radiat Res (Tokyo)* **38**: 121-131.
- 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
- Nakajima, M., T. Takeuchi & K. Morimoto, (1996) Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis* **17**: 787-791.
- Nakamura, J., V. E. Walker, P. B. Upton, S. Y. Chiang, Y. W. Kow & J. A. Swenberg, (1998) Highly sensitive apurinic /apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res* **58**: 222-225.
- Napolitano, R. L. & R. P. Fuchs, (1997) New strategy for the construction of single-stranded plasmids with single mutagenic lesions. *Chem Res Toxicol* **10**: 667-671.
- Nohmi, T., (2006) Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annual Review of Microbiology* **60**: 231-253.
- Nohmi, T., M. Yamada & P. Gruz, (2008) DNA Repair and DNA Damage Tolerance in Archaeal Bacteria: Extreme Environments and Genome Integrity. In: *Archaea: New models for prokaryotic biology*. P. Blum (ed). pp. 147-169.
- ## O
- Ogata, N. & T. Miura, (1998) Creation of genetic information by DNA polymerase of the archaeon *Thermococcus litoralis*: influences of temperature and ionic strength. *Nucleic Acids Res* **26**: 4652-4656.
- Ohmori, H., E. C. Friedberg, R. 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. Wang & R. Woodgate, (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* **8**: 7-8.
- ## 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.
- Park, D., (2007) Genomic DNA isolation from different biological materials. *Methods Mol Biol* **353**: 3-13.
- Pavlov, Y. I., P. V. Shcherbakova & I. B. Rogozin, (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int Rev Cytol* **255**: 41-132.
- Perler, F. B., (1998) Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell* **92**: 1-4.
- Perler, F. B., E. O. Davis, G. E. Dean, F. S. Gimble, W. E. Jack, N. Neff, C. J. Noren, J. Thorner & M. Belfort, (1994) Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res* **22**: 1125-1127.
- Perler, F. B., S. Kumar & H. Kong, (1996) Thermostable DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **48**: 377-435.
- Pienaar, E., M. Theron, M. Nelson & H. J. Viljoen, (2006) A quantitative model of error accumulation during PCR amplification. *Comput Biol Chem* **30**: 102-111.
- 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, G. Manco & M. Rossi, (1998) Domain organization and biochemical features of *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase. *Extremophiles* **2**: 171-177.
- Pisani, F. M., C. De Martino & M. Rossi, (1992) A DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* shows sequence similarity to family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **20**: 2711-2716.
- Pursell, Z. F., J. T. McDonald, C. K. Mathews & T. A. Kunkel, (2008) Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. *Nucleic Acids Res* **36**: 2174-2181.

R

- Ramadan, K., I. Shevelev & U. Hubscher, (2004) The DNA-polymerase-X family: controllers of DNA quality? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1038-1043.
- Ravanat, J. L., T. Douki, P. Duez, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, L. Lasserre, C. Saint-Pierre, A. Favier & J. Cadet, (2002) Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* **23**: 1911-1918.
- Raven, N., N. Ladwa, D. Cossar & R. Sharp, (1992) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 263-267.
- Reuven, N. B., G. Arad, A. Maor-Shoshani & Z. Livneh, (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem* **274**: 31763-31766.
- Rivera, M. C., R. Jain, J. E. Moore & J. A. Lake, (1998) Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6239-6244.
- Robbins, J. B., M. C. Murphy, B. A. White, R. I. Mackie, T. Ha & I. K. Cann, (2004) Functional analysis of multiple single-stranded DNA-binding proteins from *Methanosarcina acetivorans* and their effects on DNA synthesis by DNA polymerase BI. *J Biol Chem* **279**: 6315-6326.
- Rodriguez, A. C., H. W. Park, C. Mao & L. S. Beese, (2000) Crystal structure of a pol a family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J. Mol. Biol.* **299**: 447-462.

- Romano, V., A. Napoli, V. Salerno, A. Valenti, M. Rossi & M. Ciaramella, (2007) Lack of strand-specific repair of UV-induced DNA lesions in three genes of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* **365**: 921-929.
- Rossi, M., R. Rella, M. Pensa, S. Bartolucci, M. Derosa, A. Gambacorta, C. A. Raia & N. D. Orabona, (1986) Structure and properties of a thermophilic DNA-polymerase isolated from *Sulfolobus Solfataricus* Syst. Appl. Microbiol. **7**: 337-341.
- 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., 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.
- Roussel, E. G., M. A. Bonavita, J. Querellou, B. A. Cragg, G. Webster, D. Prieur & R. J. Parkes, (2008) Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* **320**: 1046.
- 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.
- Scharer, O. D. & J. Jiricny, (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* **23**: 270-281.
- Scott, R., (1982) Blade Runner. United States: Warner Bros.
- Sekiguchi, M. & T. Tsuzuki, (2002) Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* **21**: 8895-8904.
- Shearman, C. W. & L. A. Loeb, (1977) Depurination decreases fidelity of DNA synthesis *in vitro*. *Nature* **270**: 537-538.
- Shen, Y., K. Musti, M. Hiramoto, H. Kikuchi, Y. Kawarabayashi & I. Matsui, (2001) Invariant Asp-1122 and Asp-1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem* **276**: 27376-27383.
- Shevelev, I. V. & U. Hubscher, (2002) The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 364-376.
- Shibutani, S., V. Bodepudi, F. Johnson & A. P. Grollman, (1993) Translesional synthesis on DNA templates containing 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyadenosine. *Biochemistry* **32**: 4615-4621.
- Shibutani, S., M. Takeshita & A. P. Grollman, (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434.
- Shibutani, S., M. Takeshita & A. P. Grollman, (1997) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the "A rule". *J Biol Chem* **272**: 13916-13922.
- Shimizu, M., P. Gruz, H. Kamiya, S. R. Kim, F. M. Pisani, C. Masutani, Y. Kanke, H. Harashima, F. Hanaoka & T. Nohmi, (2003) Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases. *EMBO Rep* **4**: 269-273.

S

- Sabouri, N., J. Viberg, D. K. Goyal, E. Johansson & A. Chabes, (2008) Evidence for lesion bypass by yeast replicative DNA polymerases during DNA damage. *Nucleic Acids Research* **36**: 5660-5667.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim, (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sartori, A. A. & J. Jiricny, (2003) Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem* **278**: 24563-24576.
- Savino, C., L. Federici, K. A. Johnson, B. Vallone, V. Nastopoulos, M. Rossi, F.

- Shimizu, M., P. Gruz, H. Kamiya, C. Masutani, Y. Xu, Y. Usui, H. Sugiyama, H. Harashima, F. Hanaoka & T. Nohmi, (2007) Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase ϵ . *Biochemistry* **46**: 5515-5522.
- Sikorsky, J. A., D. A. Primerano, T. W. Fenger & J. Denvir, (2004) Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 823-830.
- Sikorsky, J. A., D. A. Primerano, T. W. Fenger & J. Denvir, (2007) DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **355**: 431-437.
- Steitz, T. A., (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**: 231-232.
- Stetter, K. O., (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* **452**: 22-25.
- Stetter, K. O., H. König & E. Stackebrandt, (1983) *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *System. Appl. Microbiol* **4**: 535-551.
- Strauss, B. S., (1991) The 'A rule' of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *Bioessays* **13**: 79-84.
- Strauss, B. S., (2002) The "A" rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair (Amst)* **1**: 125-135.
- Summit, M. & J. A. Baross, (1998) Thermophilic subseafloor microorganisms from the 1996 North Gorda Ridge eruption. *Deep Sea Research: Topical Studies in Oceanography* **45**: 2751-2766.
- Sutherland, B. M., P. V. Bennett, N. Cintron-Torres, M. Hada, J. Trunk, D. Monteleone, J. C. Sutherland, J. Laval, M. Stanislaus & A. Gewirtz, (2002a) Clustered DNA damages induced in human hematopoietic cells by low doses of ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo)* **43 Suppl**: S149-152.
- Sutherland, B. M., P. V. Bennett, J. C. Sutherland & J. Laval, (2002b) Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiat Res* **157**: 611-616.
- Sutherland, J. C., D. C. Monteleone, J. G. Trunk, P. V. Bennett & B. M. Sutherland, (2001) Quantifying DNA damage by gel electrophoresis, electronic imaging and number-average length analysis. *Electrophoresis* **22**: 843-854.

T

- Tajiri, T., H. Maki & M. Sekiguchi, (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat Res* **336**: 257-267.
- Takeuchi, T., N. Kato, K. Watanabe & K. Morimoto, (2000) Mechanism of oxidative DNA damage induction in a strict anaerobe, *Prevotella melaninogenica*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 133-138.
- Takeuchi, T., Y. Nakaya, N. Kato, K. Watanabe & K. Morimoto, (1999) Induction of oxidative DNA damage in anaerobes. *FEBS Lett* **450**: 178-180.
- Tang, M., X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate & M. F. Goodman, (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8919-8924.
- 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* **43**: 11818-11827.

U

- Uemori, T., Y. Ishino, H. Doi & I. Kato, (1995) The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium occultum* has two alpha-like DNA polymerases. *J Bacteriol* **177**: 2164-2177.

Uemori, T., Y. Ishino, H. Toh, K. Asada & I. Kato, (1993) Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **21**: 259-265.

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 Cells* **2**: 499-512.

V

Van de Vossenberg, J. L., A. J. Driessen & W. N. Konings, (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**: 163-170.

Voituron, Y., S. Servais, C. Romestaing, T. Douki & H. Barre, (2006) Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. *Cryobiology* **52**: 74-82.

W

Wagner, J., P. Gruz, S. R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. Fuchs & T. Nohmi, (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell* **4**: 281-286.

Walsh, D. A., M. E. Boudreau & W. F. a. B. Doolittle, (2007) The root of the tree: lateral gene transfer and the nature of the domains. In: *Archaea Evolution, Physiology, and molecular biology*. Blackwell Publishing, pp. 29-38.

Ward, D. E., C. J. Donnelly, M. E. Mullendore, J. van der Oost, W. M. de Vos & E. J. Crane, 3rd, (2001) The NADH oxidase from *Pyrococcus furiosus*. Implications for the protection of anaerobic hyperthermophiles against oxidative stress. *Eur J Biochem* **268**: 5816-5823.

Wardle, J., P. M. Burgers, I. K. 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. *Nucleic Acids Res* **36**: 705-711.

Waters, L. S., B. K. Minesinger, M. E. Wiltrout, S. D'Souza, R. V. Woodruff & G. C. Walker, (2009) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 134-154.

Watson, J. D. & F. H. Crick, (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**: 123-131.

Weinberg, M. V., F. E. Jenney, Jr., X. Cui & M. W. Adams, (2004) Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase. *J Bacteriol* **186**: 7888-7895.

Wessel, N., S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou & F. Akcha, (2007) Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat Toxicol* **85**: 133-142.

Williams, E., T. M. Lowe, J. Savas & J. Diruggiero, (2007) Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles* **11**: 19-29.

Woese, C. R. & G. E. Fox, (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **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 U S A* **87**: 4576-4579.

Y

Yamada, M., T. Nunoshiba, M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, H. Harashima & T. Nohmi, (2006) Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 4992-4995.

- Yang, W., (2005) Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett* **579**: 868-872.
- Yung, C., T. Suzuki, Y. Okugawa, A. Kawakami, D. Loakes, K. Negishi & T. Negishi, (2007) Nucleotide incorporation against 7,8-dihydro-8-oxoguanine is influenced by neighboring base sequences in TLS DNA polymerase reaction. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 49-50.
- Zillig, W., D. Prangishvilli, C. Schleper, M. Elferink, I. Holz, S. Albers, D. Janekovic & D. Gotz, (1996) Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiol Rev* **18**: 225-236.

Z

- Zhao, Y., D. Jeruzalmi, I. Moarefi, L. Leighton, R. Lasken & J. Kuriyan, (1999) Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure* **7**: 1189-1199.
- Zhong, X., L. C. Pedersen & T. A. Kunkel, (2008) Characterization of a replicative DNA polymerase mutant with reduced fidelity and increased translesion synthesis capacity. *Nucleic Acids Res* **36**: 3892-3904.
- Zhou, B. L., J. D. Pata & T. A. Steitz, (2001) Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell* **8**: 427-437.

RESUME

Les archaea hyperthermophiles sont inféodées à des biotopes hostiles, où sévissent des conditions extrêmes de température, de pH, de pression et des radiations ionisantes. Ces environnements sont propices à l'apparition de lésions dans l'ADN, telles que les sites apuriques (AP) ou encore les lésions oxydatives comme la 8-oxo-dG ou la 8-oxo-dA. Dans le cadre de ce projet, l'euryarchaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* (*Pab*) a été utilisée comme modèle attractif pour étudier l'impact de ces lésions sur la maintenance de l'intégrité génomique.

La première partie consacrée à la détection des dommages dans le génome de *Pab* a permis de démontrer que :

- *Pab* possède un taux légèrement plus élevé de sites AP et de lésions 8-oxo-dG que ceux mesurés chez *Escherichia coli*, en phase exponentielle.
- Suite à un stress oxydatif appliqué en bioréacteur gas-lift pour la première fois, l'augmentation du taux de 8-oxo-dG observée est corrélée à une diminution importante de la survie cellulaire, soulignant l'effet génotoxique du stress chez *Pab*.

Le second objectif a été d'élucider le comportement des deux ADN polymérases répliquatives de *Pab*, *PabpolB* (Famille B) et *PabpolD* (Famille D), en présence de matrices ADN endommagées. Les résultats sont les suivants :

- Bien que les *Pabpols* réussissent à franchir les lésions 8-oxo-dG et 8-oxo-dA, elles sont sévèrement bloquées par le site AP.
- Les paramètres cinétiques d'incorporation ont mis en évidence la très haute fidélité des *Pabpols* en présence d'ADN non endommagé. Néanmoins, elles sont sensibles à la présence de la lésion AP et favorisent majoritairement l'incorporation d'un dAMP face à ce dommage, indépendamment du contexte nucléotidique. Leur fonction exonucléasique joue alors un rôle important dans la protection contre la mutagenèse, car elle agit comme une barrière cinétique à l'incorporation illégitime en face de cette lésion.
- L'incorporation du dAMP est aussi privilégiée en face de la lésion 8-oxo-dG par les deux *Pabpols*. En revanche, face à la lésion 8-oxo-dA, *PabpolD* incorpore majoritairement un dAMP et un dTMP alors que *PabpolB* n'insère aucun nucléotide.
- Les *Pabpols* insèrent également le dGTP oxydé 8-oxo-dGTP, majoritairement en face d'un C.

La troisième partie, focalisée sur les applications biotechnologiques des *Pabpols* a souligné la capacité des *Pabpols* à amplifier de l'ADN endommagé, par la technique de PCR. Ces enzymes pourraient à l'avenir constituer d'excellents outils pour amplifier, par exemple, de l'ADN endommagé, issu de fossiles, d'échantillons hydrothermaux ou encore d'ADN en médecine légale...

MOTS-CLES : ADN polymérases, Archaea, sites AP, 8-oxo-dG, 8-oxo-dA, 8-oxo-dGTP, Translésion, Détection de lésions, Bioréacteur gas-lift, PCR sur ADN endommagé

ABSTRACT

Hyperthermophilic archaea cope with harsh conditions such as high temperatures, high pressures, pH shifts and ionising radiations. Such environments favour the apparition of DNA lesions like apurinic (AP) sites or oxidized DNA bases (8-oxo-dG and 8-oxo-dA). Here, *Pyrococcus abyssi* (*Pab*) was used as an attractive model to analyse the impact of such lesions onto the maintenance of genome integrity.

The first part aimed at detecting DNA damages in the genome of *Pab*:

- Endogenous AP sites and the oxidized DNA base 8-oxo-dG persist at a slightly higher level in *Pab* genome compared with *Escherichia coli*.
- Under oxydative stress conditions performed in a gas-lift bioreactor for the first time, the 8-oxo-dG increasing rate is correlated to the important cell survival diminution, assessing the genotoxic effects of this stress on *Pab*.

The second objective was to unravel the behaviour of the two replicative DNA polymerases from *Pab*, *PabpolB* (Family B) and *PabpolD* (Family D), in the presence of damaged DNA. The significant results are the following:

- Both *Pabpols* are able to bypass 8-oxo-dG and 8-oxo-dA whereas they are strongly blocked by the AP site.
- Steady-state kinetics reinforced that *Pabpols* are high-fidelity DNA polymerases onto undamaged DNA. Moreover, *Pabpols* preferentially inserted dAMP opposite an AP site independently of the nucleotidic sequence context, albeit inefficiently. Their exonuclease function seemed to endow with an important role in the protection against mutagenesis since it acts as a kinetic barrier, preventing from miscoding insertion in front of an AP site.
- The preferential incorporation of the dAMP is also favoured in front of 8-oxo-dG by both *Pabpols*. However, *PabpolD* bypass 8-oxo-dA by inserting a dAMP or a dTMP opposite the lesion while *PabpolB* could not insert a dNTP.
- *Pabpols* can also incorporate the oxidized dGTP, 8-oxo-dGTP, opposite template cytosine.

The third part focused on biotechnological applications of the *Pabpols* and showed that both *Pabpols* are able to amplify damaged DNA by PCR. In the future, these enzymes could be used as powerful tools in order to amplify, for example, forensic or ancient DNA, DNA from hydrothermal vents or clinical specimens damaged DNA...

KEYWORDS : DNA polymerases, Archaea, AP sites, 8-oxo-dG, 8-oxo-dA, 8-oxo-dGTP, Translesion, Detection of lesions, Gas-lift bioreactor, PCR on damaged DNA