

# THÈSE

présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

**Biologie Moléculaire**

par

**Vincent PAGÈS**

---

**Quand la fourche de réplication rencontre une lésion *in vivo* :**  
**Analyse moléculaire et cinétique**

---

Soutenue publiquement le 24 Novembre 2003

Membres du jury :

- Directeur de Thèse : M. Robert FUCHS, Directeur de recherches, Strasbourg
- Rapporteur Interne : M. Claude KÉDINGER, Professeur, Strasbourg
- Rapporteur Externe : Mme Bénédicte MICHEL, Directeur de recherches, Jouy-en-Josas
- Rapporteur Externe : Mme Suzanne SOMMER, Professeur, Orsay



## ***Remerciements***

*En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Robert pour m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a 5 ans, et soutenu tout au long de ces années. Merci pour tes conseils, ta rigueur, ta disponibilité et pour toutes ces discussions scientifiques qui m'ont tellement apporté. Il est très agréable et enrichissant de travailler à tes côtés... je pense que le soleil, la mer et les cigales ne gâcheront rien, bien au contraire...*

*Je voudrais remercier Mesdames Suzanne Sommer et Bénédicte Michel, ainsi que Monsieur Claude Kédinger pour avoir accepté de donner de leur temps et qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*C'est l'occasion aussi de remercier toutes les personnes de l'équipe qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre durant ce travail. Nicole pour les plasmides pKB110, les nombreuses discussions et les milliers de clones repiqués qui m'ont permis d'alimenter la discussion. Liliane, toujours disponible pour déjouer les embûches de l'administration. Régine pour les nombreuses souches et leur mode d'emploi. Élisabeth pour ta gentillesse et ton aide durant la période recX. Agnès (C) pour tes précieux avis et conseils. Anne pour l'initiation au système lacZ et tes réponses à mes questions sur le monde des levures. Najat pour les nombreuses boîtes coulées et ton excellent couscous. Marie-Pierre, Sandrine, Sylvie, Hélène, Marc, Shingo, Jérôme, Dominique : merci à tous pour votre soutien et vos encouragements.*

*Je pense aussi à ceux qui ne sont plus là, mais qui ont joué un rôle important durant ces années : Isa qui m'a initié à de nombreuses manips : merci pour tous tes protocoles et "petits trucs", ainsi que pour ton talent d'organisation ; Rita, Nathalie, Olivier dont les manuscrits m'ont été bien utiles dans la rédaction de cette thèse.*

*Sans les citer individuellement, je pense aussi à tous les membres de l'équipe PARP pour les échanges que nous avons pu avoir.*



*Je tiens aussi à remercier Véronique pour les plasmides pCU, tes coups de main très précieux et le travail ensemble très agréable. Je te passe le flambeau : prend bien soin de MARI pendant mon absence... Agnès (T) pour ton expérience et tes conseils en matière de thèse, de post-doc et d'États-Unis ; pour tes brunchs mémorables, ta bonne humeur et ton optimisme. Jean-Baptiste qui s'est embarqué avec moi dans cette aventure il y a 5 ans : partager nos coups de blues autour d'une Guinness a grandement contribué à l'achèvement de cette thèse. Bonne chance pour ton aventure chez les Helvètes...*

*La vie extra-labo étant également essentielle dans l'achèvement d'une thèse, je tiens à remercier ici mes amis. Alexandre qui mène la même aventure au pays du Champagne : merci pour nos échanges en matière de recherche, d'enseignement, d'informatique, de VTT et de tant d'autres choses. Jérôme, mon ami de toujours : qui aurait pensé lorsque nous étions en maternelle ensemble que nous terminerions tous les deux par un doctorat ??? Les irréductibles strasbourgeoises : Valérie, Emmanuelle et Aurélie sans qui la vie à Strasbourg ne serait pas la vie à Strasbourg : merci pour les petits restos, les cinés et autres sorties indispensables après de longues journées passées à la paillasse. Seb et Virginie pour les petits repas et l'initiation à la télévision...*

*Il y a ceux qui ont quitté Strasbourg mais qui sont toujours là : Philippe et Julie pour les nombreux réveillons et vacances à Chamonix, Serge et Caroline pour les conseils juridiques et autres moments gastronomiques, Évelyne et Olivier, Antoine, Vincent, Sylvain et Caroline, Jean-Philippe...*

*Voici venue l'occasion de dire un grand MERCI à mes parents : merci de m'avoir permis de faire ces études et soutenu durant toutes ces années. Merci pour votre aide et votre amour. Merci aussi à Pauline et Olivier qui ont toujours été là, depuis le tout-début...*

*Enfin, de tout mon cœur, je tiens à remercier Sandrine : merci pour ta patience, ton soutien et ton Amour...*



# Table des matières

<b>Partie I.- Introduction Bibliographique .....</b>	<b>1</b>
<b>I. Réplication de l'ADN chez <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Les ADN polymérases d'<i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>2</b>
1.1. Pol I : l'ADN polymérase I.....	2
1.2. Pol II : l'ADN polymérase II .....	3
1.3. Pol III : l'ADN polymérase III.....	4
1.4. Pol IV : l'ADN polymérase IV .....	4
1.5. Pol V ou UmuD <sub>2</sub> C : l'ADN polymérase V .....	5
<b>2. La réplicase bactérienne.....</b>	<b>5</b>
2.1. Pol III core : l'activité polymérase .....	7
2.1.1. La sous-unité $\alpha$ .....	7
2.1.2. La sous-unité $\epsilon$ .....	7
2.1.3. La sous-unité $\theta$ .....	8
2.2. L'anneau $\beta$ : le facteur de processivité.....	8
2.3. Le $\gamma$ -complexe ou complexe DnaX ou <i>clamp loader</i> .....	10
2.3.1. Composition du complexe DnaX.....	10
2.3.2. Modèle d'assemblage du $\gamma$ -complexe et de l'holoenzyme.....	11
2.3.3. Chargement de l'anneau $\beta$ .....	12
2.3.3.1. Le rôle de $\delta$ dans l'ouverture de l'anneau $\beta$ .....	15
2.3.3.2. Le $\gamma$ -complexe : chargement de $\beta$ sur l'ADN .....	16
2.4. L'holoenzyme : une structure asymétrique répliquant le brin leading et le brin lagging .....	18
2.4.1. Asymétrie structurale .....	18
2.4.2. Asymétrie fonctionnelle.....	19
2.5. Les "rôles" de $\tau$ .....	23
2.5.1. Recyclage de la polymérase lagging.....	23
2.5.2. La sous-unité $\tau$ couple les polymérases leading et lagging .....	25
2.5.3. La sous-unité $\tau$ est responsable de la processivité du brin leading.....	25
2.5.4. La sous-unité $\tau$ accélère la progression de la fourche de réplication en contactant l'hélicase DnaB .....	26
2.6. Schéma récapitulatif .....	26
<b>II. Réplication d'un ADN endommagé.....</b>	<b>29</b>
<b>Partie II.- Résultats .....</b>	<b>41</b>
<b>I. Mise au point de la technique MARI (<i>Molecular Analysis of Replication Intermediates</i>) .....</b>	<b>45</b>
<b>1. Transformation des bactéries .....</b>	<b>45</b>
1.1. Compétence.....	45
1.2. Rapport cellules / ADN .....	45
1.3. Co-transformation.....	48
1.4. Association plasmide – cellule.....	49
<b>2. Extraction de l'ADN des cellules.....</b>	<b>53</b>

<b>II. Découplage de la réplication des brins leading et lagging au cours de la synthèse translésionnelle <i>in vivo</i></b> .....	<b>59</b>
<b>III. Biochimie et dynamique de la synthèse translésionnelle</b> .....	<b>65</b>
<b>1. Influence de l'induction du système SOS</b> .....	<b>65</b>
<b>2. Cinétique de la TLS : nature de la lésion et effet du contexte de séquence</b> .....	<b>66</b>
2.1. Effet du contexte de séquence .....	68
2.2. Influence de la nature de la lésion.....	69
<b>3. Activité proofreading de Pol III au cours de la TLS</b> .....	<b>71</b>
3.1. Le modèle actuel.....	72
3.2. Inhibition de l'activité proofreading de Pol III .....	75
3.2.1. La sous-unité $\epsilon$ : mutants déficients dans l'activité proofreading .....	75
3.2.1.1. Allèle <i>mutD5</i> .....	76
3.2.1.2. Allèle <i>dnaQ49</i> .....	76
3.2.2. Étude de la synthèse translésionnelle dans une souche <i>mutD5</i> .....	77
3.2.3. Étude de la souche <i>dnaQ49</i> .....	80
3.3. Inhibition du proofreading de Pol III au cours de la réponse SOS ? .....	81
<b>IV. Structure et dynamique de la fourche de réplication</b> .....	<b>87</b>
1. Jusqu'où l'hélicase DnaB peut-elle progresser lorsque la synthèse est bloquée sur l'un des brins ? .....	87
2. Mise en évidence d'événements de type "contournement de dommages" .....	91
<b>Partie III.- Discussion / Conclusions</b> .....	<b>101</b>
<b>I. Analyse de la TLS <i>in vivo</i> par l'approche clonale : complémentarité avec l'approche moléculaire</b> .....	<b>101</b>
1. Principe de l'analyse clonale .....	101
2. Découplage total de la synthèse des deux brins observé avec les plasmides "courts" .....	101
3. Couplage partiel de la synthèse des deux brins observé avec des plasmides "longs" .....	105
4. Mise en évidence d'événements de type "contournement de dommages" par l'approche génétique .....	107
<b>II. Effets d'une lésion bloquante sur la "géométrie" de la fourche de réplication</b> .....	<b>109</b>
1. Effet d'un blocage sur le brin leading.....	109
2. Effet d'un blocage sur le brin lagging.....	112
3. Conclusion .....	116
<b>III. Reprise de la synthèse : modèles et hypothèses</b> .....	<b>119</b>
<b>1. La synthèse translésionnelle</b> .....	<b>119</b>
1.1. Temps de passage : recrutement des polymérases translésionnelles et nature de la lésion .....	119
1.2. Inhibition de l'activité proofreading de Pol III au cours de la réponse SOS.....	120
1.2.1. Modèle de TLS faisant intervenir l'inhibition de l'activité proofreading de Pol III / exemple du site NarI .....	122
1.2.2. Perspectives .....	123

2. Contournement des dommages : régression de fourche .....	124
<b>Partie IV.- Matériel et Méthodes .....</b>	<b>129</b>
1. Souches utilisées .....	129
2. Mise en compétence / induction du système SOS.....	129
3. Protocole de la technique MARI .....	130
3.1. Transformation des cellules.....	130
3.2. Extraction de l'ADN .....	131
3.3. Séparation sur gel de polyacrylamide .....	132
3.4. Marquage de la sonde .....	134
3.5. Hybridation de la sonde.....	137
3.6. Analyse des résultats .....	138
4. Construction des plasmides .....	140
5. Plasmides utilisés.....	142
<b>Partie V.- ANNEXES .....</b>	<b>145</b>
I. Annexe I : <i>recX</i> , a new SOS gene that is co-transcribed with the <i>recA</i> gene in <i>Escherichia coli</i> .....	145
II. Annexe 2 : Supporting Online Material.....	159
<b>Partie VI.- Bibliographie.....</b>	<b>163</b>



## Partie I.- Introduction Bibliographique

Nous allons nous intéresser au cours de cette thèse à la réplication d'un ADN endommagé chez la bactérie *Escherichia coli*.

Afin de mieux comprendre comment un ADN endommagé est répliqué, nous verrons dans un premier temps le processus de réplication de l'ADN en l'absence de lésions, chez *E.coli*. La réplication peut se diviser en trois étapes successives qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. J'ai choisi de ne pas parler des étapes d'initiation et de terminaison, mais de développer l'étape d'élongation qui nous intéresse plus particulièrement puisque c'est cette étape qui va être perturbée par la présence de lésions sur l'ADN. Nous verrons ensuite comment une lésion présente sur l'ADN est prise en charge par la machinerie répliquative, notamment comment elle est convertie en mutation. Ce deuxième volet de l'introduction sera présenté sous forme d'un article de revue publié dans *Oncogene* (Pagès and Fuchs, 2002).

### I. Réplication de l'ADN chez *Escherichia coli*

Quelle que soit la nature de l'ADN à répliquer (chromosomique, plasmidique, etc...), la réplication est divisée en trois étapes successives : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

L'initiation de la réplication est l'étape durant laquelle a lieu l'ouverture de la double hélice et l'assemblage du complexe répliquatif sur l'ADN pour former la fourche de réplication. Cette initiation prend place en un point précis du chromosome (ou du plasmide) : l'origine de réplication.

Au cours de l'initiation, l'hélicase répliquative, DnaB chez *E.coli*, est chargée sur l'un des deux brins (qui deviendra le brin lagging, dont la synthèse est réalisée de manière discontinue) : l'hélicase DnaB est codée par le gène *dnaB* et forme un hexamère en forme d'anneau constitué de six sous-unités identiques possédant chacune un site de liaison à l'ATP. Elle s'assemble sur un simple-brin et se déplace de 5' vers 3' ouvrant un ADN double-brin à la vitesse d'environ 35 nucléotides par seconde. Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse des

molécules d'ATP, elle rompt les liaisons hydrogène entre les bases, séparant ainsi les deux brins de la double hélice d'ADN pour permettre la réplication. L'hélicase a également pour fonction de recruter la primase (DnaG) dont le rôle est de synthétiser une amorce d'ARN créant ainsi une jonction amorce/matrice qui sera prise en charge par une ADN polymérase pour l'étape d'élongation.

La bactérie *Escherichia coli* dispose de cinq ADN-polymérases actuellement connues : PolI, PolII, PolIII, PolIV et PolV. Ces enzymes comme leur nom l'indiquent ont toutes en commun la propriété de polymériser l'ADN, c'est à dire de catalyser la formation d'une liaison phosphodiester entre le phosphate  $\alpha$  d'un désoxyribonucléotide tri-phosphate (dNTP) et l'extrémité 3'-OH d'une amorce d'ADN (ou d'ARN selon le cas) apparié à une matrice d'ADN. Elles possèdent en outre des caractéristiques différentes liées à leurs fonctions respectives.

L'ADN polymérase III (PolIII), également appelée "polymérase répllicative" ou réplicase, est responsable de la réplication du chromosome bactérien. Pour faire face à cette lourde tâche, PolIII fait partie d'une structure protéique complexe appelée holoenzyme.

Les autres polymérases, pour la plupart non-essentiels à la viabilité de la cellule, viennent assister cette réplicase dans la "maintenance" de l'ADN.

Nous allons voir dans un premier temps une description rapide de ces polymérases. Puis nous nous intéresserons plus particulièrement à la structure et au fonctionnement de PolIII au sein de la fourche de réplication.

## **1. Les ADN polymérases d'*Escherichia coli***

### **1.1. Pol I : l'ADN polymérase I**

Ce fut la première ADN polymérase à avoir été découverte chez *E.coli* par Kornberg et collaborateurs en 1956. C'est une protéine de 103kDa codée par le gène *polA*, présente à environ 400 molécules par cellule (Kornberg and Baker, 1992).

Elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique, constituée de deux domaines portant des activités enzymatiques distinctes. Le domaine carboxy-terminal de 68kDa, connu sous le nom de fragment de Klenow possède l'activité de polymérisation (5'→3') ainsi qu'une activité exonucléasique 3'→5'. Cette dernière catalyse le clivage d'une liaison phosphodiester à l'extrémité 3' d'une amorce mal appariée, libérant ainsi le dernier nucléotide incorporé. Cette

fonction également appelée activité de correction de lecture ou *proofreading* joue un rôle important dans la fidélité de la réplication.

Le domaine amino-terminal de 35kDa possède une activité exonucléasique 5'→3' capable de dégrader l'ADN en mono- ou oligonucléotides (jusqu'à 10Nt) grâce à sa capacité à déplacer des fragments d'ADN. PolI est ainsi capable de s'introduire sur une molécule bicaténaire au niveau d'une coupure simple-brin (ou *nick*), de dégrader la chaîne d'ADN dans le sens 5'→3' et de procéder immédiatement à la synthèse d'ADN dans la même direction. Cette activité appelée *Nick-translation* est essentielle lors de la réplication, pour la dégradation des amorces d'ARN qui ont servi à l'initiation des fragments d'Okazaki. PolI assure également diverses fonctions liées au remplissage des brèches, notamment lors de la réparation par excision de nucléotides (NER) (Savic et al., 1990).

La processivité de PolI (capacité à polymériser un certain nombre de nucléotides sans se détacher de son substrat) est relativement faible : PolI est capable d'incorporer entre 10 et 20 nucléotides par événement d'association à la matrice.

Les mutants de délétion du gène *polA* ne sont pas viables en milieu riche mais sont capables de croître en milieu minimum. L'introduction dans une souche  $\Delta polA$  d'un allèle muté de *recA* ou de *recB* (gènes impliqués dans la recombinaison) devient létale. Cela suggère qu'en absence de Pol I, le traitement des fragments d'Okazaki s'effectue de façon incorrecte ou inefficace, et conduit à l'accumulation de coupures simple brin et de brèches dans l'ADN. Si elles ne sont pas réparées avant d'entamer un nouveau cycle de réplication, cela entraînera la destruction de la fourche de réplication et la formation de cassures double brin. La réparation des cassures et la restauration de la fourche requièrent alors un processus complexe de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue faisant intervenir entre autre les protéines RecA, B, C, D (Cao and Kogoma, 1995).

## 1.2. Pol II : l'ADN polymérase II

Cette protéine de 90kDa, codée par le gène *polB/dinA*, possède une activité polymérase 5'→3' et exonucléase 3'→5' (*proofreading*). La délétion du gène *polB* n'affecte pas la viabilité cellulaire. La régulation du gène *polB* est sous contrôle du système SOS ce qui signifie que sa transcription augmente en réponse aux dommages subits par l'ADN de la bactérie. Ainsi, le niveau basal de PolII est de l'ordre de 20 à 50 molécules par cellules et passe à environ 150 lorsque le système SOS est activé (Qiu and Goodman, 1997). Bien que n'appartenant pas à la

famille Y des ADN polymérase translésionnelles (Ohmori et al., 2001), PolIII est impliquée dans la synthèse translésionnelle (Napolitano et al., 2000) comme nous le verrons par la suite, ainsi que dans le phénomène de "replication restart" (Rangarajan et al., 1999).

### **1.3. Pol III : l'ADN polymérase III**

Il s'agit de la polymérase en charge de la réplication du chromosome de la bactérie. Cette polymérase sera étudiée en détail au paragraphe 2.

### **1.4. Pol IV : l'ADN polymérase IV**

Cette ADN polymérase codée par le gène SOS *dinB* a été découverte en 1999 (Wagner et al., 1999). Il s'agit d'une protéine de 39,5kDa présente à environ 300 molécules par cellule dans les conditions physiologiques normales. L'induction du système SOS conduit à une augmentation d'un facteur 4 de la quantité intracellulaire de PolIV. Elle appartient à la nouvelle famille Y des ADN polymérase (Ohmori et al., 2001). Elle est dépourvue d'activité proofreading, et possède un mode de réplication distributif ce qui signifie qu'elle n'insère qu'un seul nucléotide par événement de liaison à l'ADN. En présence de l'anneau de processivité  $\beta$  de PolIII, sa processivité augmente passant de 1 à 300 nucléotides par événement de liaison à la matrice (Wagner et al., 2000).

La délétion du gène *dinB* n'est pas létale pour la cellule, et entraîne une faible diminution de la mutagenèse spontanée. Des expériences de mutagenèse non-ciblée sur le phage  $\lambda$  ( *$\lambda$  untargeted mutagenesis*) on montré l'implication de PolIV dans la mutagenèse spontanée (on non-ciblée) (Brotcorne-Lannoye and Maenhaut-Michel, 1986). D'autres expériences de sur-expression de PolIV on montré une forte augmentation de la mutagenèse spontanée, notamment par frameshift-1 (Kim et al., 1997).

PolIV est également impliquée (avec PolV) dans la synthèse translésionnelle mutagène et fidèle au niveau de l'adduit majeur que forme le benzo(a)pyrène avec les guanines (Napolitano et al., 2000), ainsi que dans la mutagenèse induite par le 4-NQO (4-nitroquinoline N-oxyde) (Kim et al., 2001).

### 1.5. Pol V ou UmuD'<sub>2</sub>C : l'ADN polymérase V

Cette polymérase appartenant également à la famille Y a été découverte en 1999 (Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999). Elle résulte de l'assemblage de trois protéines : la protéine UmuC (47kDa) qui porte l'activité polymérase, et deux protéines UmuD (15kDa) sous leur forme active UmuD' (12kDa), l'activation étant le résultat du clivage par la protéine RecA\* au niveau du filament que forme RecA avec l'ADN simple-brin. Ainsi, la polymérase V fonctionnelle est l'assemblage UmuD'<sub>2</sub>C.

Les gènes *umuD* et *umuC* sont organisés en opéron : l'opéron *umuDC* est régulé par le système SOS. Alors qu'il n'est pas possible de détecter PolV dans les conditions physiologiques normales, on en trouve environ 15 molécules par cellule suite à l'induction du système SOS.

La délétion des gènes *umuDC* n'affecte pas la viabilité cellulaire, et réduit considérablement la mutagenèse induite par les agents génotoxiques (Friedberg et al., 1995). PolV est impliqué dans la synthèse translésionnelle fidèle ou mutagène de nombreuses lésions.

## 2. La réplicase bactérienne

La réplication du chromosome bactérien présente de nombreux impératifs. La réplicase se charge de dupliquer les  $4,4 \cdot 10^6$  paires de bases du chromosome d'*E.coli*, en un temps relativement court (30 à 40 minutes) et de manière très fidèle. Elle doit également faire face à la polarité de l'ADN : les deux brins complémentaires qu'elle doit répliquer se trouvant chacun dans une polarité opposée. Or, la polymérisation de l'ADN ne peut se faire que de 5' vers 3'. L'un des deux brins sera répliqué dans le sens de progression de la fourche : sa synthèse se fera donc de manière continue (brin leading). L'autre brin dont la polarité est contraire au sens de progression de la fourche sera synthétisé de manière discontinue ou retardée (brin lagging) : l'hélicase DnaB (située sur le brin lagging) recrute la primase DnaG qui va synthétiser une amorce d'ARN tous les 1 à 3kb, permettant la réinitiation de la synthèse du brin lagging. Ces fragments ainsi synthétisés de manière discontinue sont appelés fragments d'Okazaki.

Chez *E.coli*, c'est un assemblage dimérique de la même sous-unité catalytique (PolIII-core) qui assure la synthèse coordonnée des deux brins. En effet, des études récentes ont montré une asymétrie au sein de ce complexe protéique qui permet de créer des fonctions distinctes pour chacune des deux polymérases qui vont répliquer soit le brin leading, soit le brin lagging (pour revue, voir McHenry, 2003).

Toutes les réplicases cellulaires procaryotes ou eucaryotes, se présentent sous forme d'un assemblage protéique complexe comprenant trois éléments essentiels :

- (i) la polymérase répliquative (PolIII-core dans le cas d'*E.coli*)
- (ii) un facteur de processivité qui se présente sous la forme d'un anneau protéique (ou *clamp*) qui maintient la polymérase au niveau de l'ADN (anneau  $\beta_2$  ou  $\beta$ -clamp).
- (iii) un complexe multiprotéique possédant une activité ATPasique dont le rôle est de charger l'anneau autour de l'ADN pour y cibler la polymérase ( $\gamma$ -complexe ou complexe DnaX ou *clamp-loader*).

Chez *E.coli*, 10 sous-unités constituent ces trois éléments que nous allons étudier au cours des paragraphes suivants. Nous nous arrêterons en particulier sur l'étude du complexe DnaX qui est responsable de l'organisation générale de l'holoenzyme et qui est à l'origine de son fonctionnement complexe.

### **Les différentes sous-unités composant la réplicase :**

La réplicase ou PolIII holoenzyme est constituée de 10 sous-unités possédant chacune des fonctions plus ou moins bien définies. Certaines sont essentielles à la viabilité de la bactérie, d'autres non. Grâce à la génétique, la fonction de certaines sous-unités a été mise en évidence. La purification biochimique suivie d'expériences de reconstitution *in vitro* ainsi que la structure cristallographique de certaines sous-unités ont permis d'élargir l'étendue de nos connaissances sur les mécanismes de réplication de l'ADN.

Le Tableau 1 montre les dix sous-unités qui composent l'holoenzyme, ainsi que les différents sous-assemblages qui ont été obtenus par purification biochimique (Kelman and O'Donnell, 1995).

Sous-unité	gène	Masse (kDa)	Fonction	Sous-assemblages			
$\alpha$	<i>dnaE</i>	129,9	DNA polymérase	Pol III core	Pol III'	Pol III*	Pol III Holoenzyme
$\epsilon$	<i>dnaQ/mutD</i>	27,5	Proofreading (3'→5' exo.)				
$\theta$	<i>holE</i>	8,6	Fonction inconnue				
$\tau$	<i>dnaX</i>	71,1	Rôle structural + nombreux rôles	$\gamma$ -complexe			
$\gamma$	<i>dnaX</i>	47,5	Liaison ATP : moteur				
$\delta$	<i>holA</i>	38,7	Clé (ouvrant $\beta$ )				
$\delta'$	<i>holB</i>	36,9	Stator				
$\chi$	<i>holC</i>	16,6	Liaison à SSB				
$\psi$	<i>holD</i>	15,2	Lien entre $\chi$ et $\gamma$				
$\beta$	<i>dnaN</i>	40,6	Anneau de processivité				

Tableau 1 : Sous-unités et sous-assemblages de l'ADN Polymérase III (d'après Kelman and O'Donnell, 1995).

## 2.1. Pol III core : l'activité polymérase

Comme son nom l'indique, il s'agit du noyau catalytique de l'enzyme : c'est elle qui apporte l'activité polymérase 5'→3' responsable de l'élongation de la chaîne d'ADN, ainsi que l'activité exonucléase 3'→5' de correction de lecture (proofreading). Le core est composé de 3 sous-unités :  $\alpha$   $\epsilon$   $\theta$ . Il y a environ 40 copies de PolIII core par cellule (Kelman and O'Donnell, 1995).

### 2.1.1. La sous-unité $\alpha$

Cette sous-unité de 130kDa est codée par le gène *dnaE*. Elle porte l'activité 5'→3' polymérase : elle est capable à elle seule de polymériser de l'ADN à la faible vitesse de 8Nt.s<sup>-1</sup>.

### 2.1.2. La sous-unité $\epsilon$

Cette sous-unité de 27,5kDa, codée par le gène *dnaQ/mutD*. Elle porte l'activité 3'→5' exonucléase responsable de la correction de lecture qui permet d'augmenter la fidélité de

réplication d'un facteur 40 à 200 (Schaaper, 1993). Cette sous-unité en s'associant avec  $\alpha$  permet d'augmenter à la fois l'activité polymérase d' $\alpha$  (qui atteint la vitesse de  $20\text{Nt.s}^{-1}$ ), mais également sa propre activité exonucléasique (d'un facteur 50 à 100) (Kornberg and Baker, 1992). Cette association avec  $\alpha$  apporte non seulement l'activité proofreading nécessaire à la fidélité de la polymérase, mais assure également un rôle structural essentiel à la stabilité du core. L'inactivation du gène *dnaQ* est létale pour la cellule à moins qu'une mutation compensatrice n'apparaisse dans le gène *dnaE* codant pour la sous-unité  $\alpha$  (Fijalkowska and Schaaper, 1996). Ceci est expliqué par le fait qu'en absence d'activité proofreading, le nombre de mutation devient trop important (les auteurs parlent de "catastrophe d'erreurs" liée à la saturation des mécanismes de réparation des mésappariements *Mismatch Repair*) de telle sorte que plus d'un gène essentiel subit une mutation par événement de division cellulaire : ce seuil n'est pas tolérable pour un organisme haploïde.

### 2.1.3. La sous-unité $\theta$

Il s'agit d'une protéine de 10kDa codée par le gène *holE*. La délétion de ce gène n'affecte pas la viabilité de la souche et n'induit aucun phénotype particulier. On ne sait toujours pas à ce jour quelle est la fonction précise de cette sous-unité...

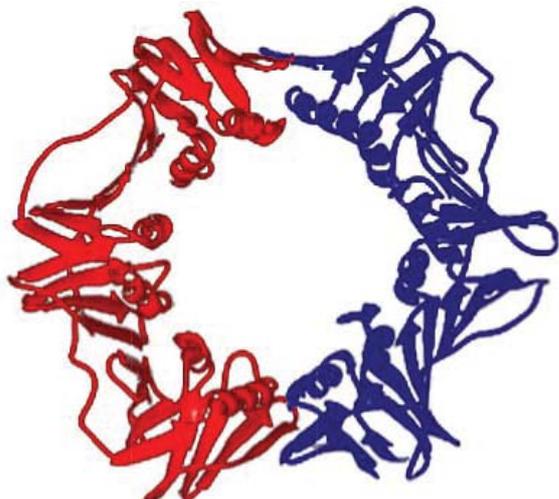
## 2.2. L'anneau $\beta$ : le facteur de processivité

La processivité d'une polymérase se définit comme le nombre de nucléotides qu'elle est capable d'incorporer par événement d'association à la matrice d'ADN. Ainsi, PolIII core que nous venons de définir a une processivité de 11 nucléotides ce qui signifie que chaque fois qu'elle s'associe à une matrice d'ADN, elle incorpore une moyenne de 11 nucléotides avant de s'en détacher.

La sous-unité  $\beta$  est une protéine de 40,6kDa codée par le gène *dnaN*. Elle se dimérise pour former un anneau d'un diamètre intérieur de  $35\text{\AA}$  capable d'encercler l'ADN (Figure 1A.). Cette dimérisation se fait entre le domaine C-terminal d'un monomère et N-terminal de l'autre monomère. Il apparaît que la forme circulaire adoptée par le dimère est imposée par la force de liaison exercée à l'interface entre les deux monomères : l'énergie libre de formation de l'interface est supérieure à l'énergie libre de courbure des monomères. Ceci implique que lorsque l'interface est rompue, la tension au sein des monomères se relâche, ce qui conduit à

une ouverture de l'anneau. Ceci a été mis en évidence par des études structurales montrant une relaxation spontanée de monomères isolés (Jeruzalmi et al., 2001b).

A. Anneau  $\beta_2$



B. PCNA



Figure 1 : Structure de l'anneau  $\beta_2$  (A.) et de l'anneau PCNA (B.)

Chaque sous-unité  $\beta$  présente trois sous-domaines semblables, de telle sorte que l'anneau  $\beta_2$  présente une apparente répétition de six sous-domaines. Cette structure est conservée chez les eucaryotes : l'anneau PCNA (Figure 1B.) est composé de trois monomères présentant chacun deux de ces sous-domaines. La trimérisation de ces monomères conduit à la formation d'un anneau à six sous-domaines superposable à  $\beta_2$ .

On trouve environ 300 anneaux  $\beta_2$  par cellule.

L'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  de PolIII-core se lie à  $\beta$  : cette liaison a pour conséquence de "retenir" ou "d'attacher" la polymérase au niveau de l'ADN encerclé par  $\beta_2$ , ce qui lui permet d'augmenter considérablement à la fois sa vitesse et sa processivité. Ainsi, PolIII core associée à l'anneau  $\beta_2$  acquiert une vitesse d'environ  $750\text{Nt}\cdot\text{s}^{-1}$ , et une processivité supérieure à 100.000 nucléotides par événement de liaison à l'ADN. C'est pour cette raison que cet anneau est appelé facteur de processivité.

Mais  $\beta_2$  n'a pas d'affinité particulière pour l'ADN. Une fois chargé sur une molécule d'ADN, l'anneau peut y circuler librement et se libère lorsqu'il rencontre une extrémité. Sur un ADN circulaire, l'anneau est en quelque sorte "emprisonné" : sa dissociation spontanée se fait avec une demi-vie de plus d'une heure à  $37^\circ\text{C}$ .

L'anneau est chargé sur l'ADN par un processus actif faisant intervenir l'hydrolyse d'ATP par un complexe protéique : le  $\gamma$ -complexe également appelé complexe DnaX ou *clamp loader*.

### 2.3. Le $\gamma$ -complexe ou complexe DnaX ou *clamp loader*

Cet élément est appelé *clamp loader* car il est responsable du chargement et du déchargement de l'anneau de processivité ( $\beta_2$ ) sur l'ADN. Mais en plus de cette fonction, ce complexe protéique assure l'organisation structurale des éléments de l'holoenzyme, et de ce fait la coordination des différentes fonctions assurées par cette réplicase. C'est lui qui crée l'assymétrie au sein de l'holoenzyme permettant aux deux sous unités catalytiques PolIII core pourtant identiques d'assurer les deux fonctions différentes que sont la réplication du brin leading et du brin lagging.

#### 2.3.1. Composition du complexe DnaX

Six sous-unités protéiques codées par cinq gènes composent ce complexe (Tableau 1). Le gène *dnaX* lorsqu'il est transcrit et traduit dans sa totalité conduit à la protéine  $\tau$  (71kDa). Lors de la traduction de l'ARN messager en protéine, il peut se produire un décalage du cadre de lecture conduisant à la lecture d'un codon STOP, et à la synthèse d'une forme tronquée de  $\tau$  : il s'agit de la sous-unité  $\gamma$  (47,5kDa).

Les autres sous-unités composant ce complexe sont  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$  et  $\psi$  codées respectivement par les gènes *holA*, *B*, *C* et *D*.

Les sous-unités  $\delta$ ,  $\delta'$  et  $\gamma$ , ainsi que la partie N-terminale de  $\tau$  commune à  $\tau$  et  $\gamma$  présentent une structure similaire à trois domaines nommés domaines I, II et III, le domaine III étant le domaine C-terminal. Nous verrons par la suite que ces sous-unités interagissent entre elles par ce domaine III. Par ailleurs, la partie C-terminale supplémentaire de  $\tau$  permet à cette sous-unité de contacter la sous-unité  $\alpha$  de PolIII core : c'est pourquoi le sous-assemblage PolIII core- $\tau$  a pu être isolé biochimiquement (sous-assemblage PolIII' – Tableau 1). La même région N-terminale de  $\tau$  est également capable d'interagir avec l'hélicase DnaB (voir plu loin, paragraphe 2.5.4. page 26).

La sous-unité  $\chi$  interagit avec la protéine SSB recouvrant l'ADN simple-brin. Du fait de cette interaction avec SSB,  $\chi$  entre en compétition la primase qui est restée fixée (via une

interaction avec SSB) à l'extrémité 3'-OH de l'amorce qu'elle vient de synthétiser. Du fait de cette interaction compétitive pour SSB,  $\chi$  est capable de déplacer la primase, libérant l'amorce qui pourra ainsi être élonguée par la polymérase (Yuzhakov et al., 1999).

$\psi$  interagit avec  $\chi$  et  $\gamma$  : elle permet ainsi de maintenir  $\chi$  associée au complexe DnaX. La présence d'ADN simple-brin recouvert de SSB étant une caractéristique du brin lagging, ces deux sous-unités ont été associées à la réplication du brin lagging (Kelman et al., 1998).

### 2.3.2. Modèle d'assemblage du $\gamma$ -complexe et de l'holoenzyme

Des expériences d'assemblage *in vitro* des sous-unités purifiées du  $\gamma$ -complexe avaient permis de conclure que les éléments s'associaient selon la stœchiométrie  $\text{DnaX}_4\delta\delta'\chi\psi$ , où DnaX pouvait être soit la forme complète de la protéine ( $\tau$ ), soit sa forme tronquée ( $\gamma$ ) (Dallmann and McHenry, 1995; Onrust et al., 1995).

Plus récemment, il a été montré que la stœchiométrie d'association des protéines DnaX (c'est à dire des protéines  $\tau$  et  $\gamma$ ) dépendait des partenaires en présence (Pritchard et al., 2000).

- Ainsi,  $\tau$  et  $\gamma$  en solution forment un tétramère stable de stœchiométrie variable ( $\tau_4$ ,  $\tau_3\gamma_1$ ,  $\tau_2\gamma_2$ ,  $\tau_1\gamma_3$  ou  $\gamma_4$ ). Ces différents tétramères sont en équilibre avec la forme monomérique de  $\tau$  et  $\gamma$ .

- Lorsque ce tétramère  $\text{DnaX}_4$  interagit avec  $\delta\delta'$ , il se réorganise en un trimère sous la forme  $\text{DnaX}_3\delta\delta'$ .

- Enfin, lorsqu'un tétramère  $\text{DnaX}_4$  comportant au moins deux sous-unités  $\tau$  interagit avec PolIII core, il se transforme en un dimère sous la forme PolIII- $\tau$ - $\tau$ -PolIII (sous-assemblage PolIII')

Mais ces conditions de reconstitution de complexes protéiques *in vitro* ne nous renseignent pas sur le mécanisme d'assemblage réel du  $\gamma$ -complexe et de l'holoenzyme. Afin de répondre à cette question, Pritchard & McHenry (Pritchard and McHenry, 2001) ont observé l'effet des différentes sous-unités composant l'holoenzyme sur la cinétique du co-assemblage de  $\tau$  et  $\gamma$ . Cette étude a conduit au modèle présenté Figure 2.

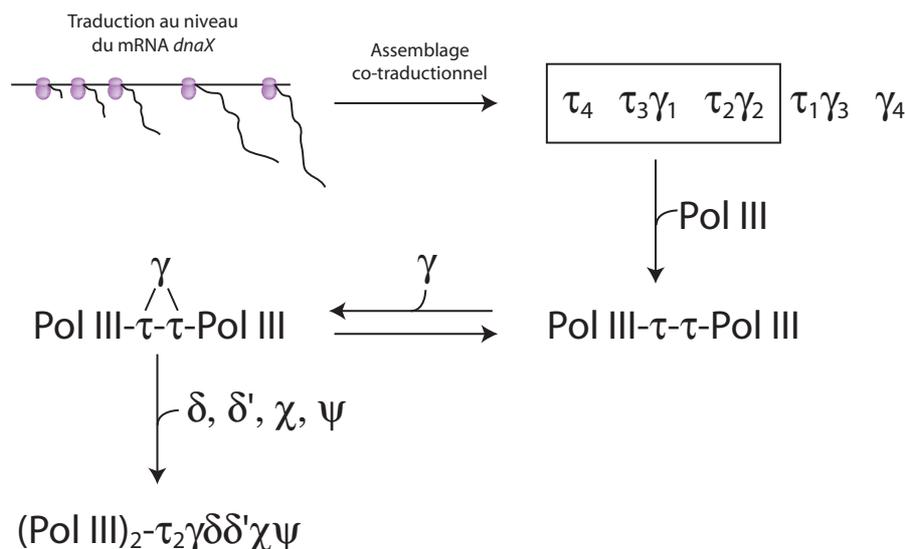


Figure 2 : Modèle d'assemblage de l'holoenzyme (d'après Pritchard and McHenry, 2001).

Dans ce modèle, la traduction de l'ARN messager *dnaX* conduit à une forte concentration locale de  $\gamma$  et  $\tau$ , ce qui favorise leur association en tétramères. Le modèle propose ensuite que PolIII core qui est capable de se lier à l'extrémité C-terminale de  $\tau$  (absente de  $\gamma$ ) se lie aux complexes contenant un nombre supérieur ou égal à deux sous-unité  $\tau$ , induisant une réorganisation du complexe DnaX en dimère  $\tau_2$ . Un monomère  $\gamma$  en équilibre avec la forme tétramérique DnaX<sub>4</sub> peut se lier avec le complexe (PolIII)<sub>2</sub> $\tau_2$  nouvellement formé, mais cette liaison est instable. L'association avec  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$  et  $\psi$  stabilise cette interaction  $\tau_2$ - $\gamma$  conduisant à une forme stable de PolIII holoenzyme privée de ses deux anneaux  $\beta_2$  (sous-assemblage PolIII\* : (PolIII)<sub>2</sub> $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ ).

### 2.3.3. Chargement de l'anneau $\beta$

Nous venons de voir le mécanisme d'assemblage du  $\gamma$ -complexe au sein de l'holoenzyme. Cette structure complète telle qu'elle vient d'être décrite permet d'assurer toutes les fonctions requises par l'holoenzyme (ces fonctions seront détaillées plus loin).

Si l'on s'intéresse maintenant uniquement à la fonction *clamp-loader* du  $\gamma$ -complexe (chargement de l'anneau de manière ATP-dépendante), la présence de tous les éléments de l'holoenzyme n'est pas indispensable pour assurer cette fonction.

Nous avons vu plus haut qu'alors que DnaX s'associait préférentiellement en tétramère *in vitro*, la présence de  $\delta$  et  $\delta'$  dans la solution conduisait à la réorganisation de ces sous-unité

en une forme pentamérique  $\text{DnaX}_3\delta\delta'$  : le complexe  $\text{DnaX}_3\delta\delta'$  composé de n'importe quelle combinaison de  $\gamma$  et  $\tau$  est capable de charger l'anneau  $\beta$  sur l'ADN de manière efficace. Ainsi, la forme  $\gamma_3\delta\delta'$  représente la forme la plus simple du  $\gamma$ -complexe capable d'assurer le rôle de clamp-loader *in vitro*.

La structure cristallographique de ce  $\gamma$ -complexe a été résolue (Jeruzalmi et al., 2001a), ce qui a permis de prédire un mécanisme pour le chargement de l'anneau par le  $\gamma$ -complexe (Jeruzalmi et al., 2001b). Une étude très récente utilisant des mutants des différentes sous-unités a permis de confirmer et d'ajuster le modèle proposé (Indiani and O'Donnell, 2003).

La détermination de la structure des sous-unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\delta'$  a montré que ces protéines présentaient toutes trois une topologie similaire à trois domaines I, II et III. Elles interagissent ensemble par leur domaine III (C-terminal), formant si l'on regarde la face C-terminale (vue "du dessus") une structure circulaire fermée (Figure 3B.). La partie N-terminale composée des domaines I et II adopte une structure plus désordonnée (Figure 3C.) et semble "pendiller" sous le pentamère formé par le domaine III comme sous un parapluie (Figure 3A.). On notera dans cet assemblage que les extrémités N-terminales forment une sorte de croissant relativement fermé terminé par les sous-unités  $\delta$  et  $\delta'$ .

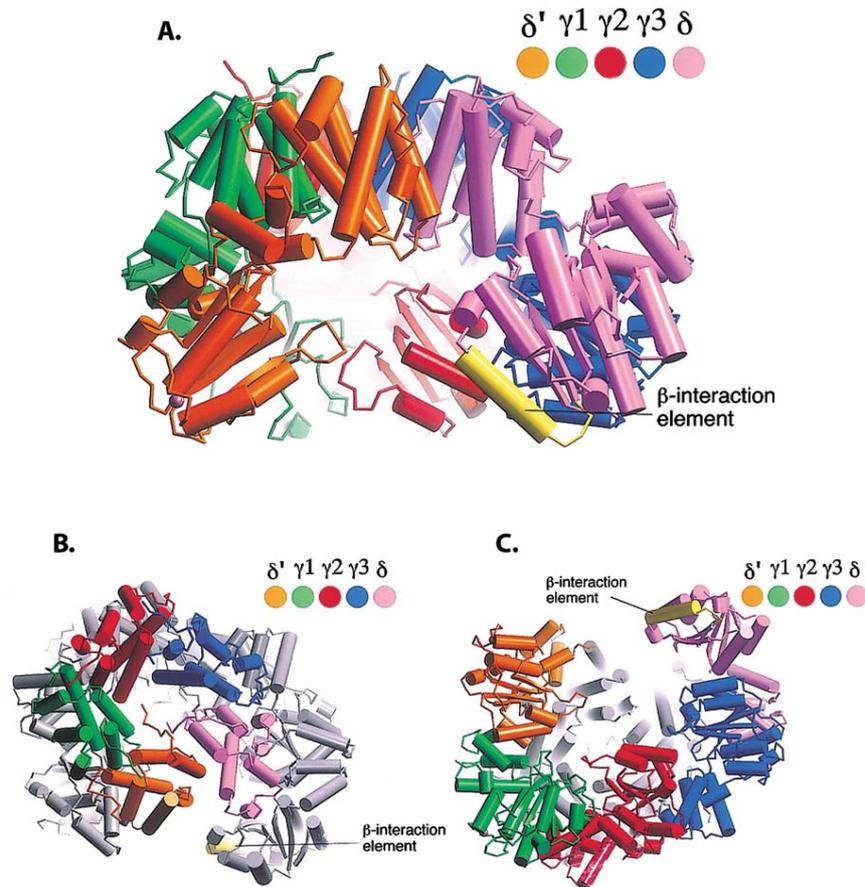


Figure 3 : Structure du  $\gamma$ -complexe. **A:** vue de côté. **B:** Vue du dessus montrant la disposition en collier des domaines III : seuls les domaines III (extrémité C-terminale) sont en couleur. Les domaines I et II sont en gris. **C:** vue du dessous montrant la répartition asymétrique des domaines N-terminaux : seuls les domaines I et II (extrémité N-terminale) sont en couleur. Les domaines III sont en gris. En jaune : le domaine de  $\delta$  qui interagit avec  $\beta$ . (Jeruzalmi et al., 2001a).

Ainsi, ces données structurales permettent de schématiser le  $\gamma$ -complexe de la manière suivante :

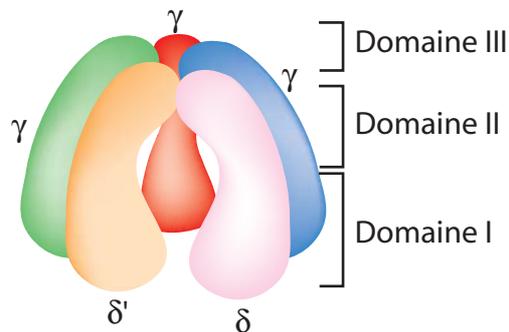


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation des sous-unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\delta'$  au sein du  $\gamma$ -complexe (d'après Indiani and O'Donnell, 2003).

### 2.3.3.1. Le rôle de $\delta$ dans l'ouverture de l'anneau $\beta$

Comment cet assemblage pentamérique est-il capable d'ouvrir l'anneau  $\beta$  de manière ATP-dépendante ?

Il se trouve qu'en solution, la sous-unité  $\delta$  est capable d'ouvrir l'anneau  $\beta_2$  sans l'aide d'aucun autre des composants du  $\gamma$ -complexe. La structure cristallographique (Jeruzalmi et al., 2001a; Jeruzalmi et al., 2001b) ainsi que l'analyse de mutants de  $\delta$  et de  $\beta$  (Indiani and O'Donnell, 2003) a permis de mettre en évidence le mécanisme d'ouverture de l'anneau.

Nous avons vu (paragraphe 2.2. ) que l'ouverture de l'anneau  $\beta_2$  dépend simplement de la rupture des liaisons au niveau de l'une des interfaces  $\beta$ - $\beta$ .

Les données cristallographiques ont montré que le domaine I (extrémité N-terminale) de  $\delta$  interagissait avec la région C-terminale de  $\beta$ , à proximité de l'interface  $\beta$ - $\beta$  (Jeruzalmi et al., 2001b). Deux sites de contact ont été mis en évidence :

- Site 1 : il s'agit d'une poche hydrophobe de  $\beta$  où viennent se loger deux résidus hydrophobes de  $\delta$  : Leu<sup>73</sup> et Phe<sup>74</sup>. C'est au niveau de ce site que se localise la plus forte énergie de liaison entre  $\delta$  et  $\beta$ .

- Site 2 : ce site implique l'hélice  $\alpha_4$  de  $\delta$  (en jaune Figure 3) et une boucle reliant l'hélice  $\alpha_1''$  et la boucle  $\beta_2''$  située à l'interface des deux monomères  $\beta$  (appelons cette boucle  $\beta^{\text{loop}}$ ). Jusqu'en 2003, ce deuxième site n'était pas considéré comme un site d'interaction spécifique, mais comme une compétition stérique entre l'hélice  $\alpha_4$  de  $\delta$  et la  $\beta^{\text{loop}}$  de  $\beta$  résultant de la liaison au site 1. Mais l'étude récente de la mutation de la  $\beta^{\text{loop}}$  sur  $\beta$  a montré une diminution de l'affinité de  $\delta$  pour  $\beta$ , ce qui a permis de conclure que cette interaction au niveau du site 2 est bien spécifique (Indiani and O'Donnell, 2003).

Le modèle d'ouverture de  $\beta$  qui se dégage de cette étude est représenté Figure 5

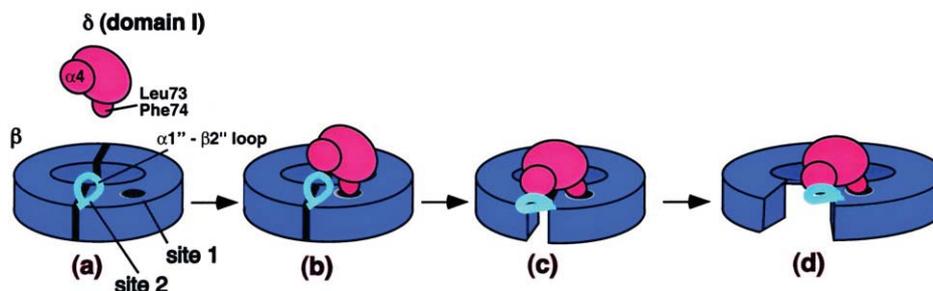


Figure 5 : Mécanisme d'ouverture de l'anneau  $\beta$  par  $\delta$  (Indiani and O'Donnell, 2003).

Dans ce modèle (où seul le domaine I de  $\delta$  est représenté),  $\delta$  agit comme un "pied de biche" ou une "clé" : les résidus Leu<sup>73</sup> et Phe<sup>74</sup> permettent à  $\delta$  de "prendre appui" au niveau de la poche hydrophobe de  $\beta$  en s'y liant fortement (site 1). Cet appui permet au résidu  $\alpha_4$  de  $\delta$  de pousser de manière spécifique grâce à l'interaction au niveau du site 2 de  $\beta$ . L'énergie apportée par ces interactions permet de déstabiliser l'interface  $\beta_2$ . La liaison  $\beta$ - $\beta$  étant rompue, l'anneau s'ouvre spontanément du fait de l'énergie de courbure de chaque monomère.

Dans un autre modèle suggéré par Jeruzalmi et coll. (Jeruzalmi et al., 2001b), l'anneau  $\beta_2$  serait en équilibre rapide entre sa forme ouverte et fermée.  $\delta$  en se liant à la forme ouverte permettrait de la stabiliser et d'empêcher la refermeture de l'anneau.

### 2.3.3.2. Le $\gamma$ -complexe : chargement de $\beta$ sur l'ADN

Nous venons de voir comment la sous-unité  $\delta$  du  $\gamma$ -complexe ouvre l'anneau  $\beta$ . Mais ceci ne nous renseigne pas sur la manière dont l'anneau est chargé sur l'ADN, ce processus impliquant l'ouverture de l'anneau certes, mais également le ciblage sur l'ADN et sa refermeture.

Ces fonctions sont assurées grâce à l'association et à l'action concertée des éléments du  $\gamma$ -complexe. Nous venons de détailler l'action de  $\delta$  qui en jouant un rôle de "pied de biche" ou de "clé" provoque l'ouverture de l'anneau  $\beta$ .

La sous-unité  $\delta'$  qui présente une structure à trois domaines analogue à  $\gamma$  et  $\delta$  est plus rigide : elle joue de ce fait le rôle de stator au sein du  $\gamma$ -complexe. Il a également été montré que  $\delta'$  était capable de bloquer l'interaction  $\beta$ - $\delta$  empêchant l'ouverture de  $\beta$  (Turner et al., 1999).

Les sous-unités  $\gamma$  portent un site de liaison de l'ATP ainsi qu'une activité ATPasique : l'association  $\gamma_3$  au sein du  $\gamma$ -complexe joue ainsi le rôle de moteur.

Ainsi, les 5 sous-unités du  $\gamma$ -complexe s'organisent en un stator ( $\delta'$ ), un moteur ( $\gamma_3$ ) et une clé ( $\delta$ ) afin d'ouvrir et de charger l'anneau  $\beta$  sur l'ADN (Figure 6). Nous avons vu (paragraphe 2.3.3. et Figure 3A.) que le domaine I (N-terminal) de ces sous-unités était organisé en forme de croissant dont les extrémités sont formées par les domaines I et  $\delta$  et de  $\delta'$ . Dans cette conformation  $\delta'$  est suffisamment proche de  $\delta$  pour l'empêcher d'interagir avec  $\beta$  : le complexe est donc incapable d'ouvrir l'anneau (ni même de le lier). Après liaison de

molécules d'ATP par les sous-unités  $\gamma$ , celles-ci subissent un changement de conformation (Podobnik et al., 2003) qui va éloigner  $\delta$  de  $\delta'$ , permettant ainsi à  $\delta$  de lier et d'ouvrir l'anneau  $\beta$ .

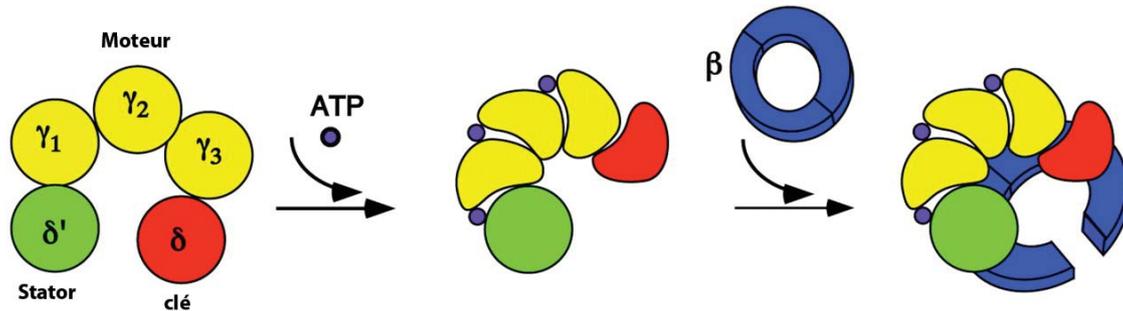
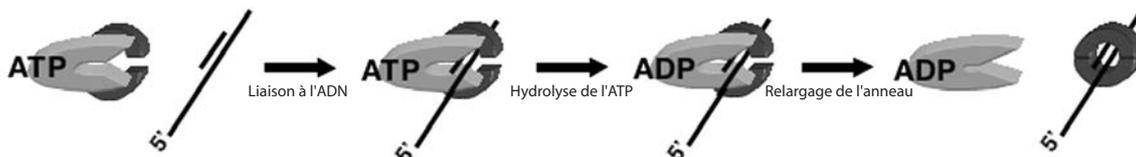


Figure 6 : Mécanisme d'action du  $\gamma$ -complexe permennat de lier et d'ouvrir l'anneau  $\beta$  de manière ATP-dépendante. Le schéma ne représente que les domaines I de chaque sous-unité (Indiani and O'Donnell, 2003).

Nous voilà maintenant avec un anneau ouvert qu'il va falloir charger sur l'ADN, au niveau d'un site d'initiation (c'est-à-dire une jonction amorce/matrice). Le  $\gamma$ -complexe lorsqu'il a fixé l'ATP présente une forte affinité pour l'ADN. De plus, il a été montré récemment (Ason et al., 2003) que la fixation du  $\gamma$ -complexe-ATP au niveau d'une jonction amorce/matrice, induisait l'hydrolyse des molécules d'ATP. Cette hydrolyse provoque le relargage de l'anneau  $\beta$  qui, n'étant plus lié à  $\delta$  peut se refermer, et également une perte d'affinité du  $\gamma$ -complexe-ADP pour l'ADN. Ceci est illustré Figure 7.

**Liaison dynamique au niveau d'un ADN élongable (amorce/matrice)**



**Liaison au niveau d'un ADN non-élongable**



Figure 7 : Le  $\gamma$ -complexe utilise un mécanisme de liaison dynamique pour cibler l'anneau  $\beta$  au niveau d'un ADN prêt à être élongué : sa liaison au niveau d'une jonction amorce/matrice entraîne l'hydrolyse d'ATP et le relargage de l'anneau  $\beta$  (Ason et al., 2003).

Ce mécanisme permet de cibler l'anneau  $\beta$  au niveau des sites d'initiation de la réplication. De plus, la perte d'affinité du  $\gamma$ -complexe-ADP pour  $\beta$  et pour l'ADN empêche une compétition entre le  $\gamma$ -complexe et la polymérase au niveau du site d'initiation où l'anneau vient d'être chargé.

En conclusion, le mécanisme de chargement de l'anneau  $\beta$  sur l'ADN par le  $\gamma$ -complexe peut être résumé selon le schéma suivant :

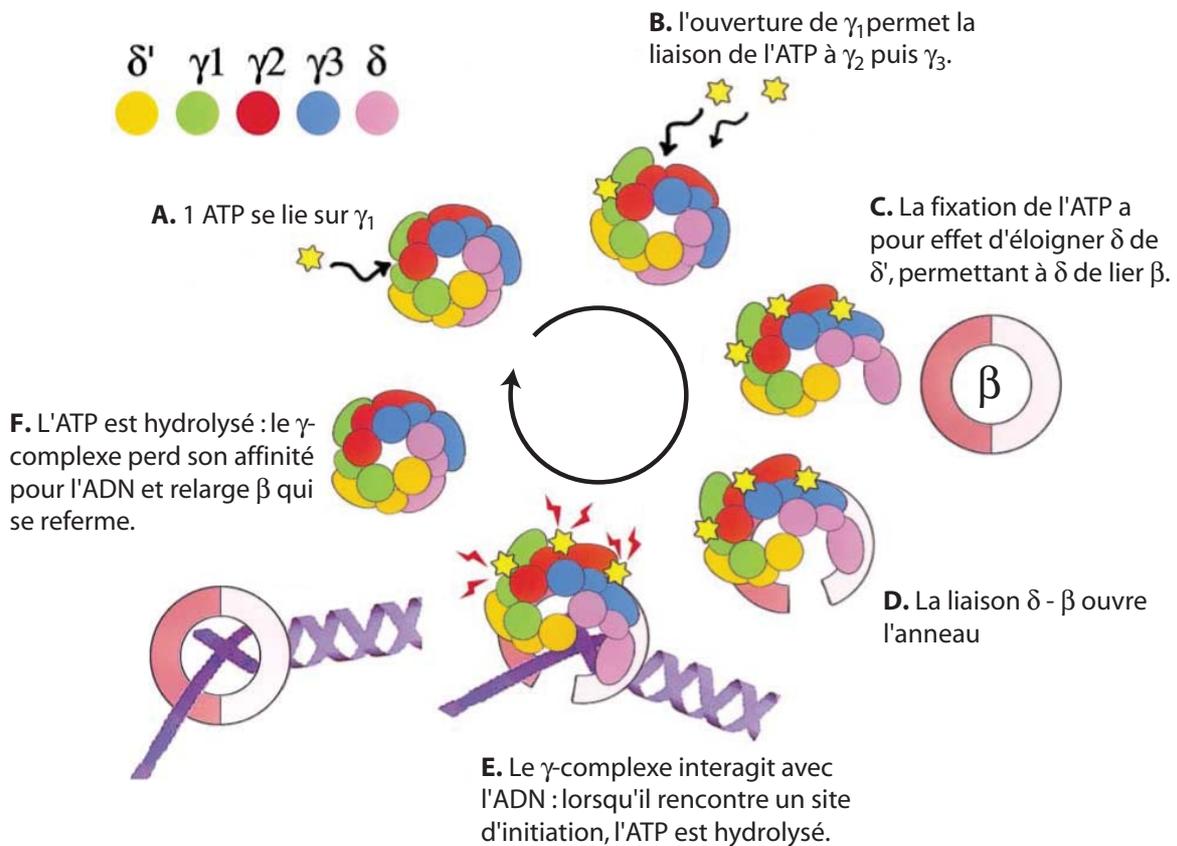


Figure 8 : Schéma récapitulatif représentant le mécanisme du chargement de l'anneau  $\beta$  sur l'ADN par le  $\gamma$ -complexe (d'après Jeruzalmi et al., 2001a).

## 2.4. L'holoenzyme : une structure asymétrique répliquant le brin leading et le brin lagging

### 2.4.1. Asymétrie structurale

Nous venons d'étudier en détail comment *in vitro*, le  $\gamma$ -complexe chargeait l'anneau  $\beta$  sur l'ADN. Ceci se fait de manière ATP-dépendante, et permet à la polymérase PolIII-core de se fixer à l'anneau  $\beta$  ainsi chargé au niveau d'une structure amorce/matrice et d'entreprendre la réplication de l'ADN.

Mais qu'en est-il de ce modèle lorsque l'on se place *in vivo* où la polymérase doit répliquer un brin leading sans se détacher, et un brin lagging où un complexe d'initiation doit être formé toutes les 1-3kb ?

La réponse à cette question est apportée par la présence de la sous-unité  $\tau$  qui, nous l'avons vu (paragraphe 2.3.2. page 11) fait partie intégrante du  $\gamma$ -complexe lorsque l'holoenzyme est assemblée *in vivo*, selon la stœchiométrie  $(\text{PolIII})_2\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ . Le traitement de l'holoenzyme par des agents de pontage a permis de définir l'arrangement de ces sous-unités entre elles. Ces études ont montré que  $\gamma$  interagissait avec  $\psi$  et  $\delta'$ ,  $\tau$  avec  $\delta$ ... Ceci conduisant à une répartition asymétrique présentée Figure 9.

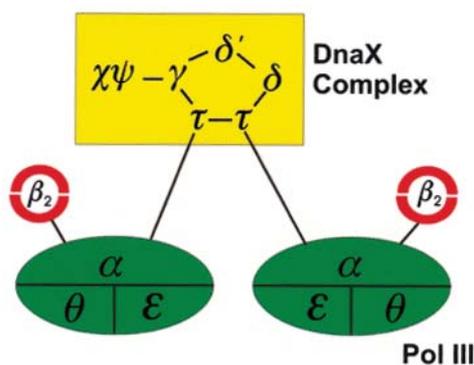


Figure 9 : Organisation des différentes sous-unités de l'holoenzyme montrant l'asymétrie au sein du complexe DnaX (McHenry, 2003).

Cette répartition asymétrique récemment mise en évidence permet d'expliquer l'asymétrie fonctionnelle des deux PolIII-core mise en évidence depuis 1984 (McHenry and Johanson, 1984). Des études plus récentes ont permis de mieux définir cette asymétrie fonctionnelle (voir paragraphe suivant) qui permet à une seule holoenzyme de répliquer à la fois le brin leading et le brin lagging (Glover and McHenry, 2001).

#### 2.4.2. Asymétrie fonctionnelle

L'étude *in vitro* réalisée en utilisant un  $\gamma$ -complexe minimum  $\gamma_3\delta\delta'$  (paragraphe 2.3.3.2. ) a montré que la formation d'un complexe d'initiation était réalisée en deux étapes : (i) le

chargement de l'anneau nécessitant la fixation et l'hydrolyse de molécules d'ATP. (ii) la liaison de PolIII à l'anneau nouvellement chargé après que le  $\gamma$ -complexe se soit dissocié de  $\beta$ .

Or, l'holoenzyme assemblée *in vivo* n'est pas composée de ce  $\gamma$ -complexe minimaliste, mais d'un complexe DnaX comportant deux sous-unités  $\tau$  et liant ainsi PolIII. Le fait que PolIII soit associée au clamp-loader par l'extrémité C-terminale de  $\tau$  permet d'envisager que le chargement de l'anneau et de la polymérase (c'est-à-dire la formation d'un complexe d'initiation) se fasse de manière concertée et non pas en deux étapes successives.

Cette différence entre la réaction "concertée" et la réaction "en deux étapes" est révélée par l'étude de l'assemblage en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP : l'ATP $\gamma$ S.

Il a été montré qu'en présence d'ATP $\gamma$ S, un complexe d'initiation était formé à condition que  $\tau$  soit présent plutôt que  $\gamma$  dans le complexe DnaX. Ceci révèle l'avantage pour PolIII d'être maintenue à proximité du clamp-loader par  $\tau$  au moment du chargement de l'anneau (Dallmann et al., 1995). D'autres études ont montré qu'en présence d'ATP $\gamma$ S, seulement la moitié des complexes d'initiation était formée par rapport à la quantité formée en présence d'ATP. De plus, si l'on ajoutait de l'ATP $\gamma$ S à des complexes d'initiation pré-formés en présence d'ATP, la moitié d'entre eux se dissociait (McHenry and Johanson, 1984). Toutes ces études ont conduit à la conclusion que les deux complexes d'initiation étaient formés de manière différente au sein de l'holoenzyme, suggérant que l'une des polymérases avait pour fonction de répliquer le brin leading, tandis que l'autre s'occupait du brin lagging.

Une étude plus récente a permis de mettre en évidence cette asymétrie fonctionnelle montrant que l'holoenzyme était un dimère asymétrique composé d'une polymérase leading et d'une polymérase lagging (Glover and McHenry, 2001). Dans cette étude, les auteurs montrent que les deux complexes d'initiation qui composent l'holoenzyme sont assemblés successivement. Le premier qui se forme, peut le faire sans hydrolyser l'ATP (c'est-à-dire en présence d'ATP $\gamma$ S). L'assemblage du deuxième complexe d'initiation ne peut se faire en présence d'ATP $\gamma$ S, mais nécessite l'hydrolyse d'ATP, ainsi que la présence de SSB au niveau de l'ADN élongable (couple amorce/matrice). Ceci est illustré Figure 10.

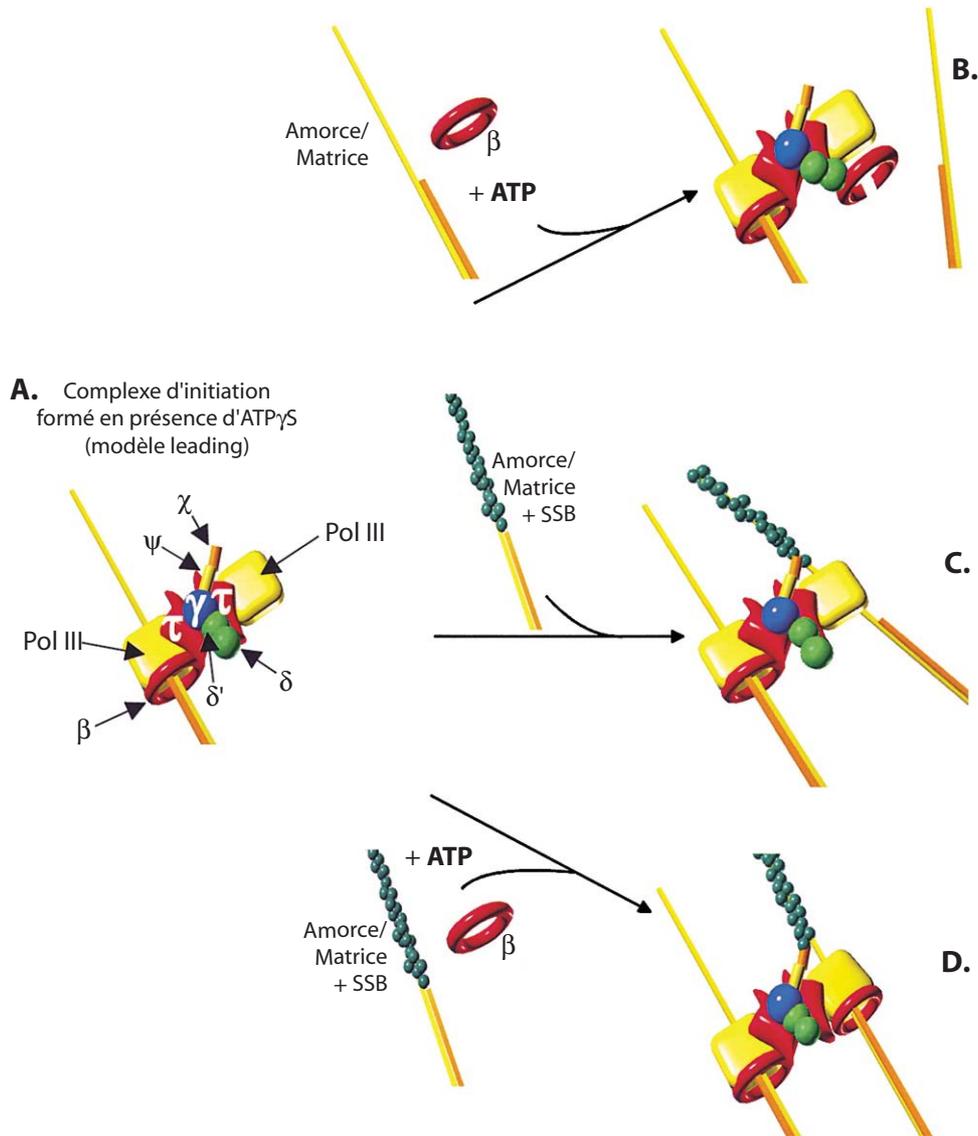


Figure 10 : Modèle de formation du second complexe d'initiation (modèle lagging) nécessitant la présence de  $\beta$ , d'ATP et de SSB au niveau de la jonction amorce/matrice (Glover and McHenry, 2001).

On voit sur ce schéma que suite à la formation d'un premier complexe d'initiation en présence d'ATP $\gamma$ S (modèle leading) (Figure 10A.), l'addition de  $\beta$  et d'ATP n'est pas suffisant pour permettre la liaison et la réplication du second brin (Figure 10B.). La présence de SSB au niveau de la jonction amorce/matrice permet d'y cibler le clamp-loader grâce à l'interaction  $\chi$ -SSB, mais n'entraîne pas la synthèse (Figure 10C.). Enfin, la présence combinée de  $\beta$ , d'ATP et de SSB permet dans un premier temps la liaison entre le second brin et l'holoenzyme grâce à l'interaction SSB- $\chi$ , puis l'initiation de la réplication par hydrolyse de l'ATP et chargement de  $\beta$  (Figure 10D.) (Glover and McHenry, 2001).

Cette étude met en évidence deux formes d'assemblage de l'holoenzyme au niveau de l'ADN. Les deux complexes d'initiation peuvent être formés successivement : le premier en

présence d'ATP $\gamma$ S (appelons-le IC-1 pour *initiation complex-1*), le deuxième en présence d'ATP, de  $\beta$  et de SSB (IC-2). Les auteurs ont utilisé ce même modèle pour étudier la dissociation des complexes d'initiation induite par l'ATP $\gamma$ S. Ils ont ainsi montré que l'ATP $\gamma$ S induit la dissociation du complexe d'initiation IC-2, comme si l'holoenzyme "se rappelait" l'ordre dans lequel se sont formés ces complexes d'initiation et n'autorisait la dissociation et probablement le recyclage que d'un côté. Le "coté" sensible à l'ATP $\gamma$ S pourrait correspondre à la moitié spécialisée dans la réplication du brin lagging, ce qui est conforté par le fait que l'initiation de ce coté nécessite la présence de la protéine SSB (retrouvé spécifiquement sur le brin lagging). Ceci est confirmé dans la même étude, les auteurs ayant observé par des expériences de réplication *in vitro* (de type *rolling-circle*), une inhibition spécifique de la réplication du brin lagging par l'ATP $\gamma$ S (Glover and McHenry, 2001).

Ainsi, l'asymétrie au sein de l'holoenzyme permet à la polymérase leading de rester associée à l'ADN, tandis que la polymérase lagging peut se dissocier pour être recyclée au niveau du prochain fragment d'Okazaki.

Malgré les avancées considérables dans la compréhension du mécanisme d'assemblage différent entre brin leading et brin lagging, il reste encore de nombreuses questions non résolues. Bien que l'on observe de la réplication sans hydrolyse d'ATP au niveau du brin leading, les auteurs n'excluent pas que cette hydrolyse puisse avoir lieu dans les conditions naturelles. L'hydrolyse de l'ATP est par contre nécessaire pour la formation du deuxième complexe d'initiation. Les auteurs suggèrent que cette hydrolyse permette une isomérisation du complexe DnaX, réorientant l'activité clamp-loader vers la moitié lagging de la polymérase. Cette activité clamp-loader resterait ainsi orientée vers le brin lagging, permettant le chargement de  $\beta$  et la réinitiation à chaque fragment d'Okazaki, et prévenant le déchargement de la polymérase au niveau du brin leading.

Dans ce modèle, qu'est ce qui permet à la polymérase lagging de se dissocier pour être recyclée ? À la polymérase leading de ne pas se dissocier ?

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, la sous-unité  $\tau$  semble être la réponse à toutes ces questions.

## 2.5. Les "rôles" de $\tau$

Cette sous-unité résultant de la traduction complète du gène *dnaX* est indispensable à la viabilité de la bactérie *E.coli*. En plus de son rôle structural permettant d'apporter l'asymétrie au complexe DnaX,  $\tau$  remplit de nombreuses autres fonctions.

### 2.5.1. Recyclage de la polymérase lagging

Nous avons vu que l'holoenzyme dissociait préférentiellement la polymérase du brin lagging, permettant ainsi son recyclage. Ce recyclage du core (et de  $\beta$ ) est indispensable car il n'y a qu'une quarantaine de complexes PolIII-core par cellule alors que la réplication du chromosome nécessite entre 2000 et 4000 fragments d'Okazaki.

Une étude récente a montré que la sous-unité  $\tau$ , ou plus exactement la partie C-terminale propre à  $\tau$  était indispensable au recyclage de la polymérase au niveau du brin lagging (Leu et al., 2003). Les auteurs montrent que la polymérase lagging reste fermement liée à l'anneau  $\beta$  jusqu'au dernier nucléotide qu'elle incorpore au niveau du précédent fragment d'Okazaki rencontré. Dès que ce nucléotide est incorporé, la polymérase se dissocie de  $\beta$  pour aller s'associer à un autre anneau préalablement chargé par le complexe DnaX au niveau de l'amorce du fragment d'Okazaki suivant. Les auteurs montrent que la sous-unité  $\tau$  possède une activité de liaison à l'ADN dans sa région C-terminale, dans la même région où se lie PolIII-core. Ils suggèrent donc que par ce site de liaison,  $\tau$  est capable de reconnaître la structure de l'ADN et de différencier un ADN dont la réplication est terminée d'un ADN sous la forme amorce/matrice. L'extrémité C-terminale de  $\tau$  fonctionnerait comme une sorte "d'interrupteur de recyclage" qui fermé empêcherait le détachement de la polymérase lagging de l'anneau, et qui une fois ouvert (lorsque la synthèse du fragment d'Okazaki est terminé) favorisant le décrochage de PolIII-core et son recyclage au niveau du prochain site d'initiation. Ce modèle est représenté Figure 11.

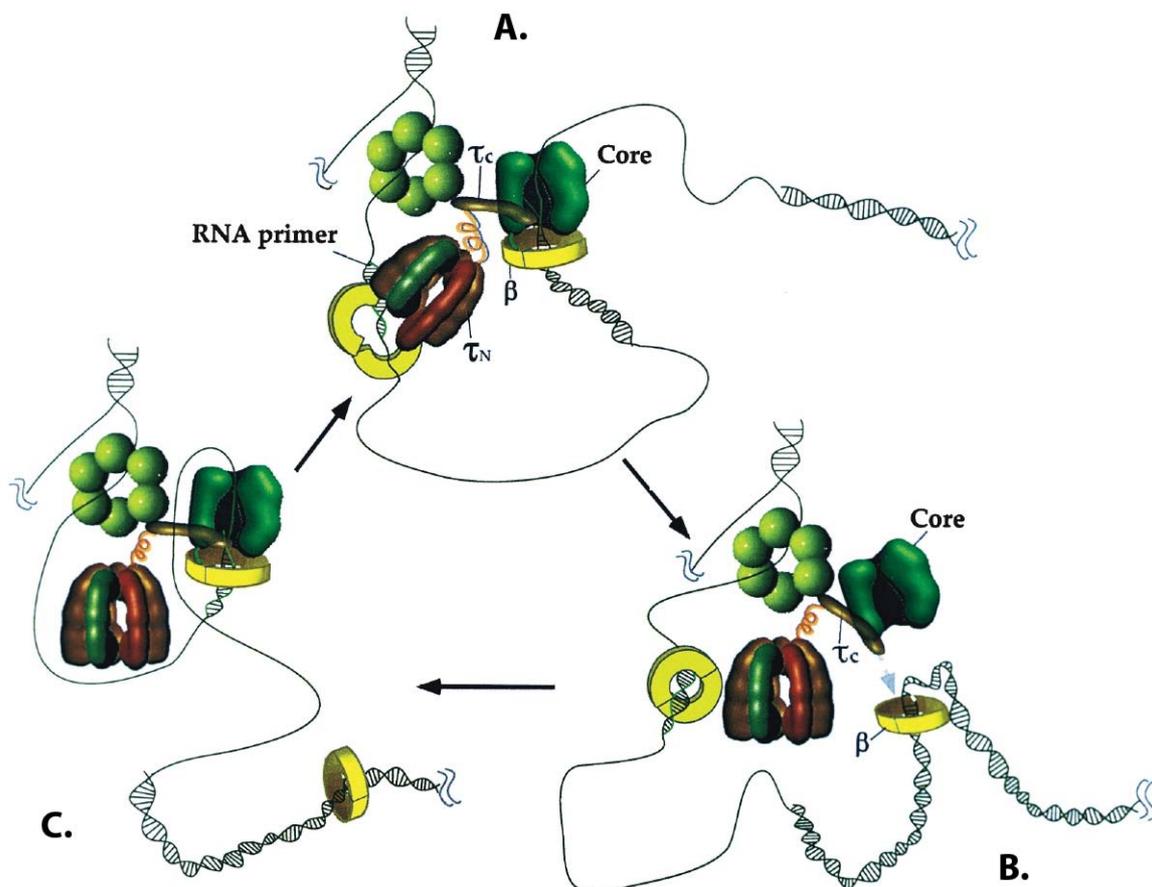


Figure 11 : Mécanisme de recyclage de la polymérase lagging (Leu et al., 2003).

Dans ce modèle,  $\tau$  fonctionne comme un interrupteur. Sur la Figure 11A le clamp-loader charge l'anneau au niveau du prochain site d'initiation tandis que la polymérase réplique un fragment d'Okazaki. L'extrémité C-terminale de  $\tau$  (notée  $\tau_C$ ) contacte l'ADN dans la même région que PolIII-core : durant la réplication,  $\tau$  permet à PolIII-core de rester associée avec  $\beta$ . L'interrupteur est donc en position fermée. Figure 11B : dès que la polymérase a terminé la réplication du fragment d'Okazaki,  $\tau_C$  le détecte (par un processus non défini dans ce modèle) et l'interrupteur passe en position ouverte, entraînant la dissociation de PolIII-core de  $\beta$ . Figure 11C : PolIII-core se réassocie à l'anneau  $\beta$  nouvellement chargé au niveau du prochain site d'initiation.

Ceci n'est pour l'instant qu'un modèle, et le mécanisme précis du fonctionnement de  $\tau$  n'est pas encore élucidé. La structure cristallographique de cette sous-unité ainsi que celle de PolIII-core pourront permettre d'élaborer un mécanisme plus détaillé.

### **2.5.2. La sous-unité $\tau$ couple les polymérase leading et lagging**

Nous venons de voir que  $\tau$  est essentiel à la réplication du brin lagging en permettant le recyclage de la polymérase. Mais  $\tau$  joue un deuxième rôle important dans la réplication du brin lagging. En effet, en maintenant les deux polymérase à proximité dans la structure holoenzyme,  $\tau$  permet le couplage de ces deux polymérase.

Ceci a été mis en évidence par des expériences de dilution de complexe de réplication (Kim et al., 1996b). Dans ces expériences, les complexes réplcatifs sont formés *in vitro* en présence ou en absence de  $\tau$ . Après dilution, seuls les complexes formés en présence de  $\tau$  sont capables de répliquer le brin lagging. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que  $\tau$  est nécessaire pour maintenir la polymérase lagging au sein de l'holoenzyme permettant son ciblage au niveau de la prochaine amorce synthétisée au niveau de la fourche. En l'absence de  $\tau$ , la polymérase lagging qui a terminé la synthèse d'un fragment d'Okazaki va se détacher de l'ADN et sera incapable de retrouver la prochaine amorce si le milieu est trop dilué.  $\tau$  permet de maintenir cette polymérase au niveau de la fourche, dans une interaction stable avec la polymérase leading.

### **2.5.3. La sous-unité $\tau$ est responsable de la processivité du brin leading**

Alors que  $\tau$  favorise la dissociation de la polymérase lagging de l'anneau  $\beta$  afin de permettre son recyclage, cette même sous-unité est responsable de l'effet inverse sur le brin leading. Des expériences de réplication *in vitro* ont montré qu'en l'absence de  $\tau$ , la réplication du brin leading était moins processive (Kim et al., 1996c). Cette même étude a montré qu'en l'absence de  $\tau$ , la taille des fragments leading était proportionnelle à la concentration de  $\beta$  et inversement proportionnelle à la concentration du  $\gamma$ -complexe. Ceci s'explique par le fait qu'en l'absence de  $\tau$ , le  $\gamma$ -complexe est capable d'ouvrir l'anneau  $\beta$  au niveau de la polymérase leading, conduisant à l'arrêt de la réplication.

Les auteurs concluent de cette expérience que  $\tau$  "protège" l'anneau  $\beta$  au niveau du brin leading, en prévenant son ouverture par le clamp-loader. Cette action protectrice confère à la polymérase sa grande processivité.

#### 2.5.4. La sous-unité $\tau$ accélère la progression de la fourche de réplication en contactant l'hélicase DnaB

Nous avons vu que l'hélicase DnaB chargée sur le brin lagging, se déplace de 5' vers 3' en séparant les deux brins de l'ADN.

$\tau$  contacte l'hélicase par son extrémité C-terminale (domaine IV de  $\tau$ ) : cette liaison a pour effet non seulement de coupler l'hélicase à l'holoenzyme permettant de dérouler l'ADN au fur et à mesure de la réplication, mais il a également été montré que  $\tau$  stimulait fortement sa progression, lui permettant d'augmenter sa vitesse d'un facteur supérieur à 10 (Kim et al., 1996a). Cette stimulation résulterait d'une modification de conformation de DnaB qui augmenterait son activité catalytique. L'utilisation de protéines  $\tau$  tronquées et l'étude d'interaction protéiques par le système BIAcore a permis de montrer que le contact d'au moins deux protéines  $\tau$  était nécessaire pour produire l'augmentation d'activité catalytique (Gao and McHenry, 2001). Ceci a permis de conclure qu'à la fois la polymérase leading et lagging étaient couplées à l'hélicase DnaB par l'intermédiaire des deux domaines C-terminaux (IV et V) de la protéine  $\tau$  (Figure 12).

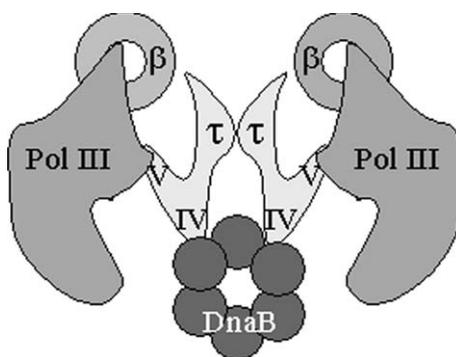


Figure 12 : Couplage des polymérases leading et lagging à l'hélicase DnaB par l'intermédiaire de la protéine  $\tau$  au niveau de la fourche de réplication (Gao and McHenry, 2001)

#### 2.6. Schéma récapitulatif

Nous venons de faire un tour d'horizon de l'état de connaissance actuel sur la réplicase bactérienne. Ces éléments peuvent être résumés sous forme d'un schéma rendant compte de la disposition et de la fonction des constituants de cette machinerie complexe.

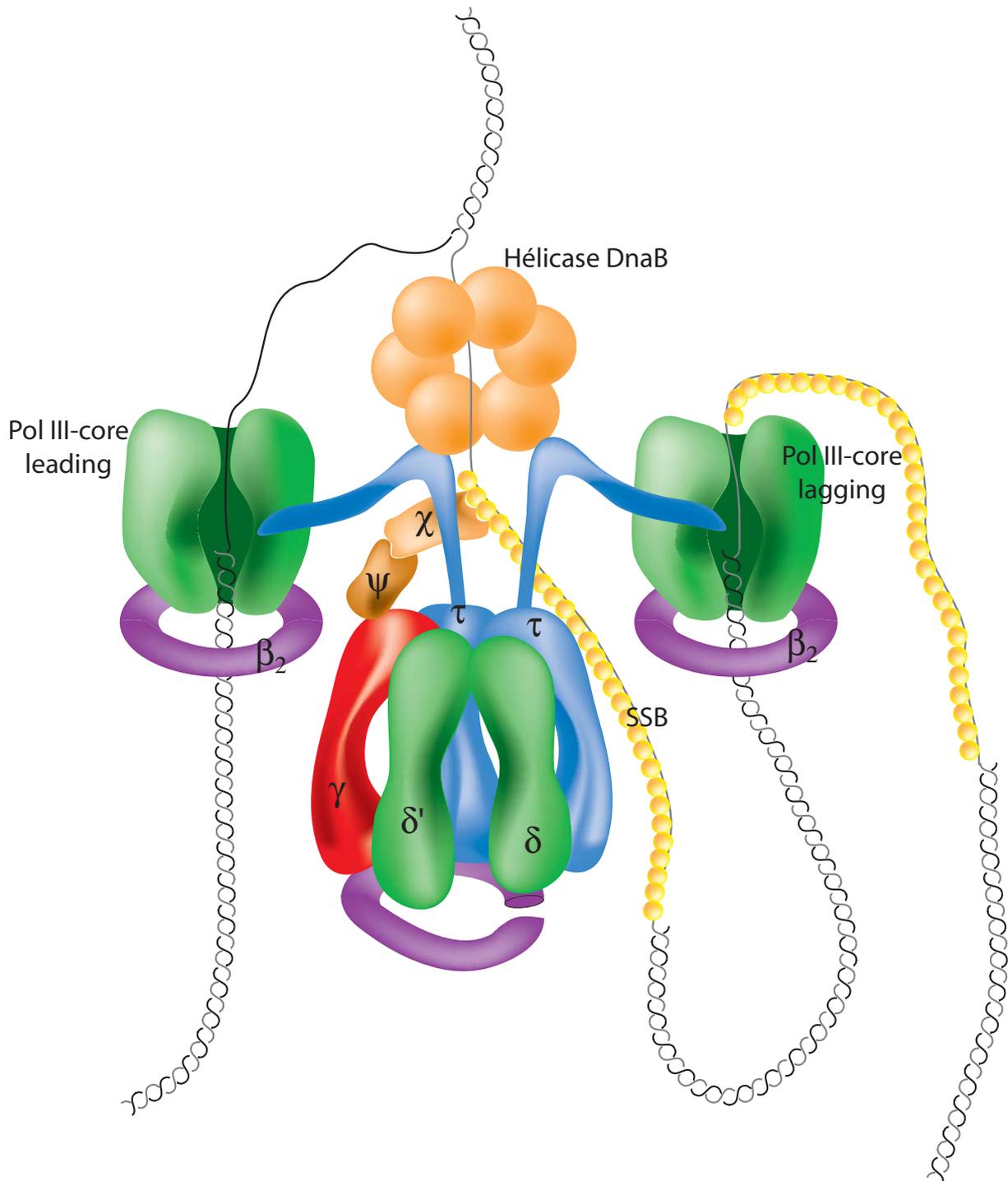


Figure 13 : Schéma récapitulatif des constituants de l'holoenzyme (inspiré de Leu et al., 2003).

Ce schéma rend compte de l'organisation structurale de l'holoenzyme.

La sous-unité  $\tau$  permet la cohésion de la structure de l'holoenzyme en couplant les deux polymérase, le complexe DnaX et l'hélicase DnaB.  $\tau$  protège l'anneau  $\beta$  de la polymérase leading, conférant la grande processivité du système.  $\tau$  en contactant l'hélicase DnaB stimule son activité, permettant d'augmenter la vitesse de progression de l'holoenzyme. Le recyclage

de la polymérase lagging est assuré grâce à  $\tau$  qui en contactant l'ADN au niveau de PolIII-core détecte la terminaison d'un fragment d'Okazaki et autorise alors l'ouverture de l'anneau  $\beta$ .

Le complexe DnaX permet de fixer et d'ouvrir un anneau  $\beta$  afin de le charger au niveau d'une amorce/matrice. Le ciblage au niveau du brin lagging est assuré par la  $\chi$  qui contacte l'ADN reconvert de SSB.  $\chi$  est relié au complexe DnaX par la sous-unité  $\psi$  qui interagit avec  $\chi$  et  $\gamma$ .

## II. Réplication d'un ADN endommagé

Nous venons de voir que la bactérie possède une machinerie très perfectionnée qui lui permet de répliquer son ADN.

Cependant, le génome de tous les organismes vivants est constamment soumis à des agressions : celles-ci peuvent être exogènes (rayonnements UV, agents chimiques), mais aussi endogènes (dommages oxydatifs induits par les produits du métabolisme cellulaire). Ces agressions vont endommager l'ADN en modifiant son intégrité chimique, ce qui risque de perturber ses propriétés codantes.

La cellule possède de nombreux systèmes qui lui permettent de réparer efficacement ces lésions avant que son ADN ne soit répliqué. Cependant, il arrive que certaines lésions puissent échapper à ces mécanismes de réparation et se retrouvent donc présentes au moment de la réplication.

La réplicase, nous l'avons vu, possède une grande vitesse de polymérisation, un grande processivité ainsi qu'une très grande fidélité. Elle est en revanche le plus souvent incapable de répliquer lorsqu'elle rencontre une lésion.

Il a récemment été découvert que la cellule a à sa disposition d'autres ADN polymérases spécialisées qui vont pouvoir assister la polymérase répllicative bloquée au niveau d'une lésion. Ces ADN-polymérases sont moins fidèles que PolIII ce qui leur permet de répliquer à travers la lésion : ce processus est appelé synthèse translésionnelle ou TLS (*Trans Lesion Synthesis*). Les bases endommagées ayant bien souvent perdu leurs propriétés codantes, et les polymérases translésionnelles étant moins fidèles, le processus de TLS est donc générateur de mutations.

La manière dont les lésions sont converties en mutations ainsi que des aspects récents relatifs à la génétique et à la biochimie de la synthèse translésionnelle sont présentés sous forme d'un article de revue paru dans *Oncogene* (Pagès and Fuchs, 2002).



*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Vincent Pages**, and Robert P.P. Fuchs

HOW DNA LESIONS ARE TURNED INTO MUTATIONS WITHIN CELLS ?.

**Oncogene 21 (2002), 8957-8966**

Pages 8957-8966 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/onc/journal/v21/n58/full/1206006a.html&filetype=pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## Partie II.- Résultats

### Introduction

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, l'ADN de la cellule bactérienne est répliqué grâce à une machinerie complexe composée notamment de deux ADN polymérases couplées par des interactions protéiques. Nous nous sommes donc posé la question de savoir ce qu'il advenait de cette fourche de réplication lorsque l'une des deux polymérases qui la compose se retrouvait bloquée au niveau d'une lésion de l'ADN.

Pour répondre à cette question, nous avons mis au point une technique qui permet de suivre la cinétique de synthèse de chacun des brins d'un plasmide, portant une lésion ou non, au sein d'une bactérie. Le principe de la technique est le suivant : nous disposons au laboratoire de plasmides portant une lésion unique sur l'un des brins (brin endommagé ou brin cible), et sur lesquels nous avons introduit sur l'autre brin (brin marqueur), une courte hétérologie (boucle de trois nucléotides) permettant ainsi de différencier le produit de la réplication de chaque brin.

L'origine de réplication de ces plasmides, ori ColE1, a la propriété d'être unidirectionnelle ce qui permet d'identifier chacun des deux brins du plasmide comme étant le brin leading (dont la synthèse se fait de manière continue) ou le brin lagging (dont la synthèse se fait de manière discontinue). Ces constructions plasmidiques sont transformées dans les bactéries par électroporation, puis les cellules sont incubées à 37°C pour permettre la réplication du plasmide. Après différents temps d'incubation, l'ADN est extrait des cellules et digéré par des enzymes de restriction spécifiques. Les fragments ainsi obtenus sont séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec une sonde radioactive de forte activité, spécifique du brin marqueur.

La Figure 14A représente la région du plasmide analysée par la technique ainsi que la région sondée. Les enzymes de restrictions utilisées sont BstNI et NlaIII qui coupent de part et d'autre de la région qui nous intéresse. Par ailleurs, la boucle de 3 nucléotides (qui sert de marqueur de brin) contient également un site de restriction NlaIII, non-digestible tant que l'ADN est sous forme d'hétéroduplexe. Après réplication du plasmide, ce site de restriction retrouve une forme homoduplexe et devient donc digestible par NlaIII, ce qui permet de le différencier à la fois du plasmide non répliqué et de l'autre brin qui se réplique et qui ne

possède pas ce site de restriction. Les fragments séparés sur gel et révélés par la sonde sont représentés Figure 14B.

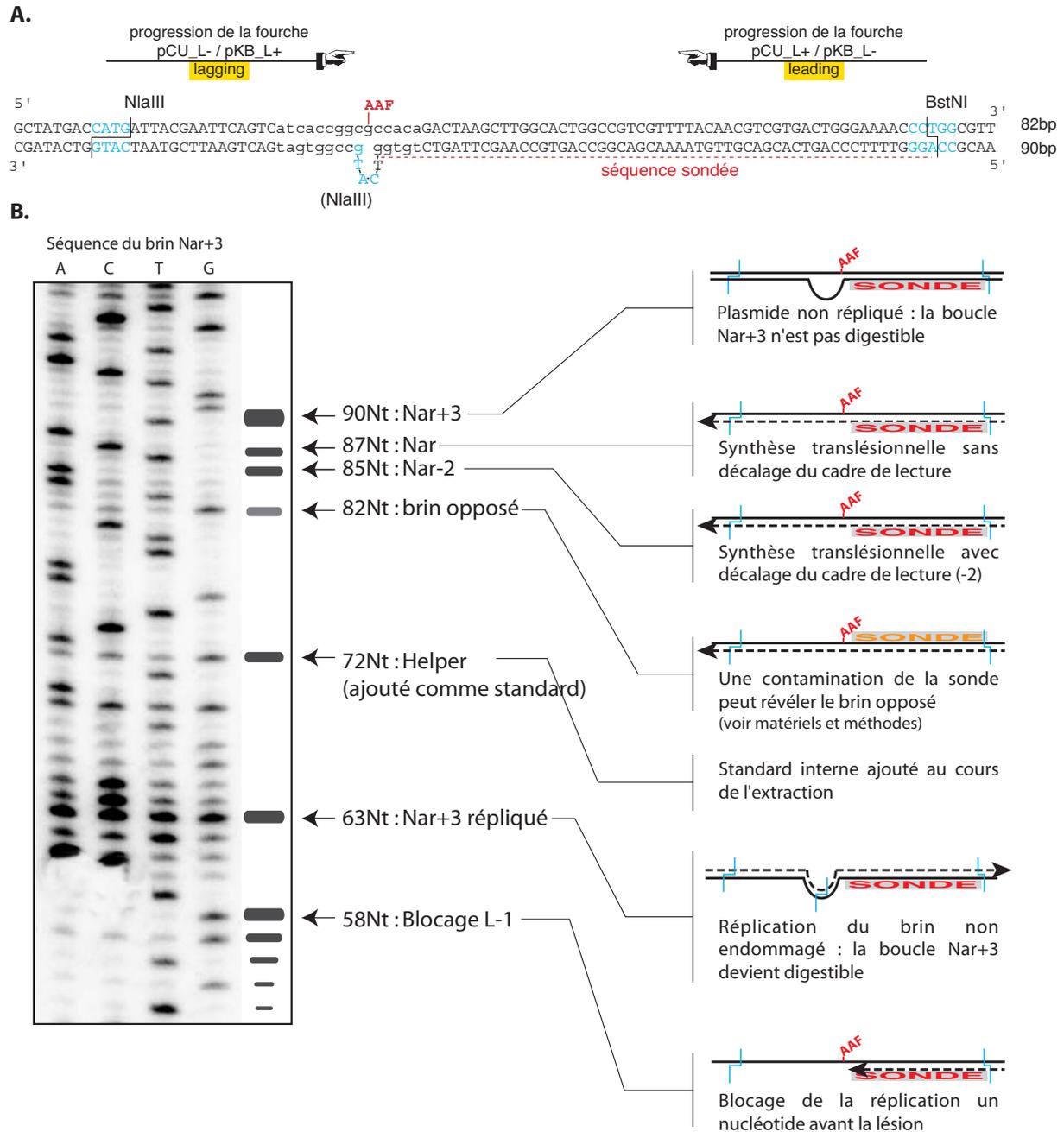


Figure 14 : A. Région du plasmide analysée. Selon le sens de progression de la fourche de réplication, la lésion est portée par le brin leading (pCUL+ ; pKBL-) ou par le brin lagging (pCUL- ; pKBL+). En bleu, les site de restriction utilisée. En rouge, la région sondée. B. Taille des fragments révélés par la sonde après digestion et hybridation de la sonde spécifique.

Ainsi, en fonction de la taille des fragments révélés on peut déterminer la quantité d'ADN qui est entrée dans les cellules et qui n'a pas été répliquée, et suivre la réplication des deux brins du plasmide en fonction du temps de résidence du plasmide au sein des bactéries.

Nous allons désigner cette technique qui permet d'observer de manière précoce les intermédiaires de réplication, technique MARI, pour *Molecular Analysis of Replication Intermediates*.

Ce chapitre "résultats" est composé de quatre grandes parties. La première décrit plusieurs résultats intermédiaires ou préliminaires que j'ai pu obtenir tout au long de la mise au point de la technique. Il s'agit notamment de résultats en rapport avec la transformation des bactéries par un plasmide, et l'efficacité de ré-extraction de ce plasmide après cette phase de transformation.

La deuxième partie, présentée sous forme d'un article, traite de l'étude de la cinétique de réplication des deux brins d'un ADN plasmidique lorsque l'un des deux brins est endommagé par une lésion AAF (Acétyl Aminofluorène).

Les troisième et quatrième parties présentent des résultats non encore publiés : d'une part, l'analyse de l'activité de proofreading de PolIII au cours de la réponse SOS, d'autre part la mise en évidence d'événements de contournement des lésions.



# I. Mise au point de la technique MARI (*Molecular Analysis of Replication Intermediates*)

## 1. Transformation des bactéries

### 1.1. Compétence

Au cours des études préliminaires de faisabilité du projet MARI, il était clair que l'obtention d'une efficacité de transformation optimale des cellules était déterminante. Nous avons donc opté pour la préparation de cellules compétentes en les cultivant à 18°C, ces conditions de culture ayant montré une forte augmentation du taux de transformabilité (Chuang et al., 1995). De même, il a été observé que le taux de transformation était multiplié par 10 si les cellules étaient diluées dans du milieu de culture préchauffé juste après le choc électrique (Eynard et al., 1992). En combinant ces deux "astuces", j'ai pu observer une forte augmentation de transformabilité avec des cellules de fond génétique JM103 et un plasmide de type pCU19 comme représenté dans le Tableau 2.

Température de culture	37°C	18°C	37°C → 18°C
Compétence (clones/pg)	~ 1.000	> 30.000	> 30.000

Tableau 2 : efficacité de transformation exprimée en clones par picogramme d'ADN transformé (plasmide de type pUC19) en fonction de la température de culture des cellules (JM103). Ces résultats ont été obtenus en transformant 1ng de plasmide dans 40µl de cellules compétentes. La case notée 37°C → 18°C signifie que les cellules ont été cultivées à 37°C jusqu'à  $DO^{600}=0,3$  puis à 18°C jusqu'à  $DO^{600}=0,4$ .

En conclusion, il suffit de cultiver les cellules à 18°C juste avant la mise en compétence, pour observer une augmentation de leur transformabilité d'un facteur supérieur à 30 par rapport aux conditions "classiques". C'est donc ce protocole qui sera utilisé tout au long des expériences qui vont suivre.

### 1.2. Rapport cellules / ADN

Nous venons de voir la manière d'obtenir des cellules fortement compétentes. Mais le taux de transformabilité des cellules ne dépend pas uniquement des propriétés physiologiques

des cellules, mais également de la quantité respective de molécules d'ADN et de cellules mises en présence dans la cuve à électroporer. Il semblait donc intéressant de corréler l'efficacité de transformation au rapport cellules/ADN pour se placer dans un rapport optimal lors des expériences de MARI.

J'ai donc réalisé l'expérience suivante : à 40µl de cellules compétentes (JM103), j'ai mélangé des quantités croissantes de plasmide pUC19 (1-10-100-1000ng) que j'ai électroporé. Les mélanges d'électroporation ont été étalés sur boîtes LB avant et après électroporation pour déterminer le nombre de cellules viables mis en jeu, ainsi que sur boîte ampicilline pour déterminer le nombre de transformant.

Les résultats ont montré que les 40µl de cellules compétentes contenaient  $2,27.10^9$  cellules. Après électroporation, seules  $1,34.10^9$  cellules étaient encore viables, ce qui correspond à une mortalité de 40% due au choc électrique, ce qui n'est pas négligeable. La compétence des cellules en fonction de la quantité d'ADN mise en jeu est représentée sur la Figure 15.

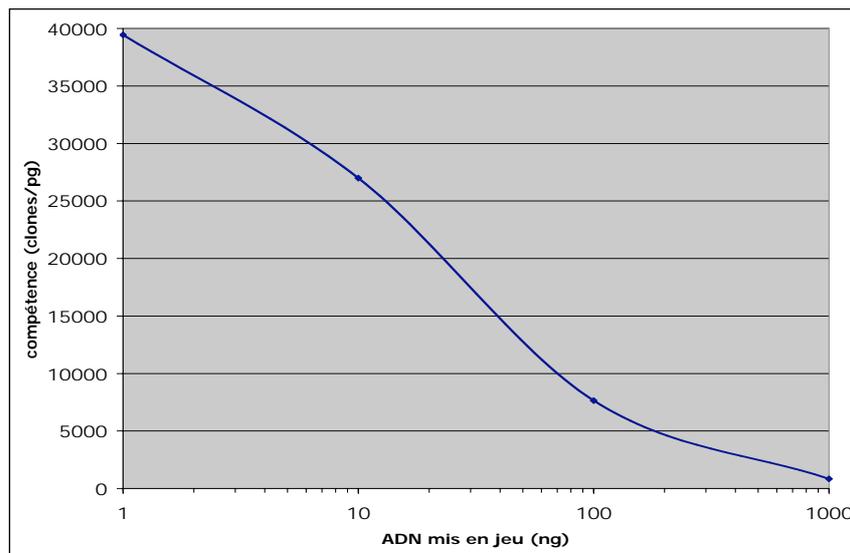


Figure 15 : Efficacité de transformation en fonction de la quantité d'ADN mise en jeu pour une quantité donnée de cellules.

Comme on le voit sur le graphique, l'efficacité de transformation exprimée en colonies/pg diminue rapidement quand on augmente la quantité de plasmide mis en jeu. Les Figure 16 et Figure 17 montrent deux autres représentations du même résultat.

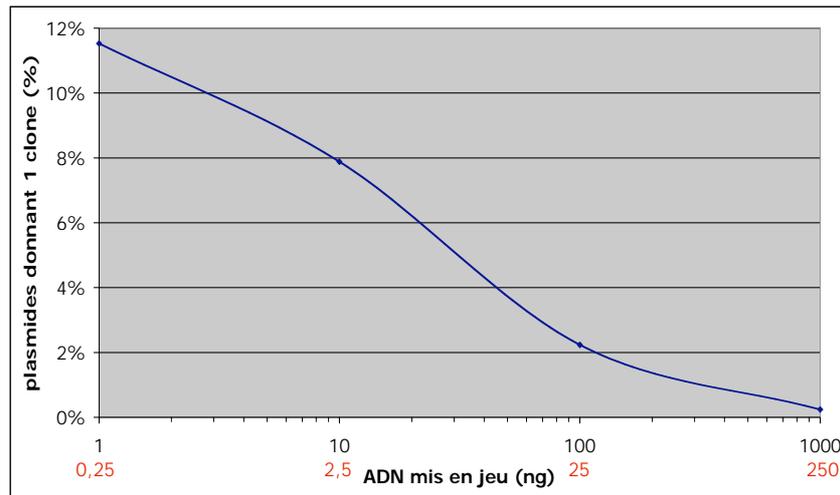


Figure 16 : Pourcentage des plasmides mis en jeu qui vont donner un clone lors de l'électroporation. Les chiffres en rouge représentent le rapport du nombre de molécules d'ADN / nombre de cellules.

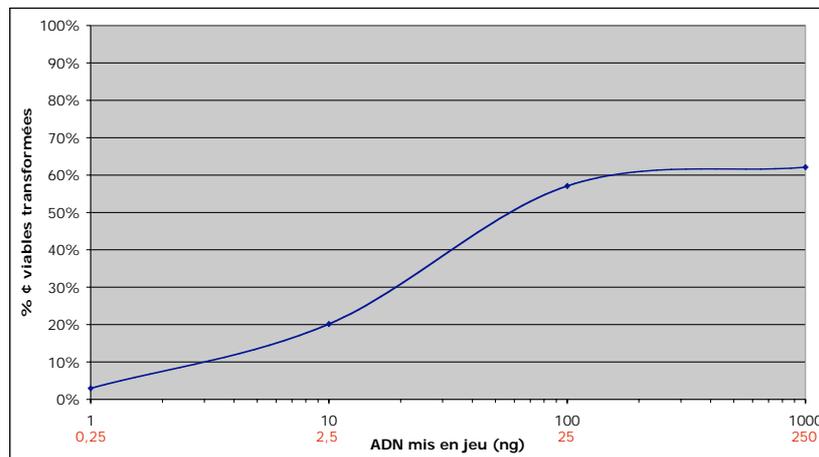


Figure 17 : Pourcentage des cellules viables qui sont transformées en fonction de la quantité d'ADN mis en jeu. Les chiffres en rouge représentent le rapport du nombre de molécules d'ADN / nombre de cellules.

Ces graphiques montrent qu'au maximum (dans les conditions expérimentales mises en œuvre), 12% des molécules de plasmide mises en jeu vont s'établir dans les cellules. Ce maximum est atteint lorsque le nombre de cellule est en excès (d'un facteur 4) par rapport au nombre de molécules d'ADN. À l'opposé, on atteint un maximum de bactéries viables transformées de 60% quand la quantité d'ADN est en large excès par rapport aux cellules. Il nous a donc fallu trouver un compromis entre ces deux extrêmes (maximum de cellules transformées et maximum de plasmide transformant). Les conditions que j'ai jugées optimales se situent en quelques sortes à l'intersection des deux courbes : je transforme pour chaque point de cinétique 40ng de plasmide dans 20 $\mu$ l de cellules compétentes, ce qui équivaut à un

rapport ADN/cellules de 20. Dans ces conditions, environ 3% des plasmides vont s'établir, et 55% des cellules viables vont établir un plasmide.

La quantité de plasmide qui s'établit est donc :

$$\frac{40.10^3 \text{ pg} \times 10.000 \text{ transf/pg}}{N} = 6.6410^{-16} = 664 \text{ amol}$$

ou encore :

$$\frac{40.10^{-9} \text{ g}}{660 \text{ g.mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1} \times 2665 \text{ bp}} \times 3\% = 6.8210^{-16} = 682 \text{ amol}$$

### 1.3. Co-transformation

Dans ces conditions où le plasmide est en excès par rapport aux cellules (20 fois), nous sommes demandé si plusieurs plasmides pouvaient s'établir dans une même bactérie. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux plasmides dérivés de pUC19, ayant en commun la même origine de répllication ColE1, ainsi que la résistance à l'ampicilline, mais possédant en plus chacun sa propre résistance à un autre antibiotique (le chloramphénicol pour le pUC AC-2 ; la kanamycine pour le pUC 4K). Un mélange équimolaire de ces deux plasmides a été transformé dans une souche JM103 soit dans les condition "classiques" d'électroporation c'est-à-dire un rapport ADN/cellules de 0,25 soit dans les conditions décrites plus haut déterminées pour optimiser le protocole MARI, c'est-à-dire un rapport ADN/cellules de 20. Pour éviter tout biais, les transformants ont été sélectionnés sur ampicilline uniquement, puis j'ai recherché les co-transformant en repiquant les clones Amp<sup>®</sup> (résistants à l'ampicilline) sur chloramphénicol, sur kanamycine et sur un milieu contenant les deux antibiotiques. Les colonies à la fois Cm<sup>®</sup> et Kan<sup>®</sup> ont établis les deux plasmides : leur comptage me permet donc d'estimer le taux de co-transformation dans les deux conditions de rapport ADN/cellules. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 3.

Rapport ADN/cellules	Conditions "classiques" 0,25	Conditions "MARI" 20
Co-transformants	<0,2%	5%

Tableau 3 : Évaluation de taux de co-transformation en fonction du rapport ADN/cellules (500 colonies analysées).

Ces résultats montrent que contrairement aux conditions classiques d'électroporation où nous n'avons détecté aucun co-transformants, dans les conditions utilisées dans le protocole

MARI, 5% des cellules établissent plus d'un plasmide. Ce taux, relativement faible, n'est pas gênant pour notre étude puisqu'elle ne porte pas sur des clones individuels, mais sur une population de cellules.

#### 1.4. Association plasmide – cellule

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que seulement 3% du plasmide mis en jeu lors de l'électroporation va s'établir dans nos conditions, et au mieux 12% dans des conditions plus favorables où les cellules sont en excès. Qu'advient-il des autres molécules d'ADN ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un plasmide de type pUC19 marqué radioactivement de manière à pouvoir suivre l'ADN plasmidique au cours de l'électroporation, mais également au cours de l'extraction qui suit. Ce plasmide marqué a d'ailleurs également permis de mettre au point un protocole d'extraction comme il sera décrit plus loin au paragraphe 2. Le marquage du plasmide a été réalisé en hybridant deux plasmides homologues excepté pour une séquence d'une vingtaine de nucléotides : ces plasmides ont été dénaturés, puis hybridés l'un à l'autre, créant une brèche de 20 nucléotides dans le duplex formé. Cette brèche est ensuite comblée par une polymérase en présence de dNTP radioactif et refermée par une ADN-ligase.

Les cellules compétentes sont mélangées avec ce plasmide radioactif, transférées dans une cuve à électroporer. Un lot témoin ne recevra pas de décharge électrique, tandis que le reste est soumis à la décharge de l'électroporateur. Immédiatement après, les cellules sont centrifugées et lavées deux fois à l'eau par resuspension et centrifugation. Après ces étapes, l'activité radioactive des lavages ainsi que des culots cellulaires est quantifiée dans un compteur à scintillation. Les résultats du comptage sont représentés dans le Tableau 4.

Lot de cellules Répartition de la radioactivité	Témoin non électroporé	Cellules électroporées
Dans le culot	1%	20%
Dans les lavages	99%	80%

Tableau 4: Répartition de l'ADN plasmidique après électroporation.

Ces résultats montrent que 20% de l'ADN plasmidique reste associé aux cellules après électroporation, alors que les autres 80% sont éliminés par de simples lavages à l'eau (un nombre supérieur à deux lavages ne change pas la répartition). On montre aussi que cette association est strictement dépendante de la décharge électrique puisqu'en l'absence de celle-ci, quasiment toutes les molécules d'ADN sont éliminées dans les lavages. Appelons cette fraction qui reste associée aux cellules "uptake".

Nous venons de voir que 20% de l'ADN est associé aux cellules suite à l'électroporation. Or, nous avons vu précédemment que seulement 3% des plasmides mis en jeu s'établissait dans la cellule. Qu'en est-il des 17% restants ? Sont-ils simplement associés à la paroi bactérienne et pourquoi ne se répliquent-ils pas ? Ou bien ces molécules sont-elles à l'intérieur de la bactérie mais incapables de s'établir ? Afin d'essayer de répondre à ces questions, nous avons augmenté la stringence des lavages des culots cellulaires en utilisant non plus de l'eau, mais une solution de NaCl 0,5M, et les cellules ont également été incubées avec de la DNase afin de voir si une fraction des 17% de plasmide associé aux cellules pouvait être digérée, ce qui nous donnerait une indication sur la localisation intra- ou extra-cellulaire de cet ADN. Les conditions de traitement des cellules sont inspirées d'expériences similaires réalisées chez *Haemophilus influenzae* (Goodgal and Mitchell, 1990; Sisco and Smith, 1979). Pour ces expériences, je n'ai pas utilisé de plasmide radioactif comme précédemment, mais une construction plasmidique pCUL+ Nar0/Nar+3 que j'ai extrait après transformation et visualisée sur gel par la technique MARI. Le gel obtenu est représenté Figure 18.

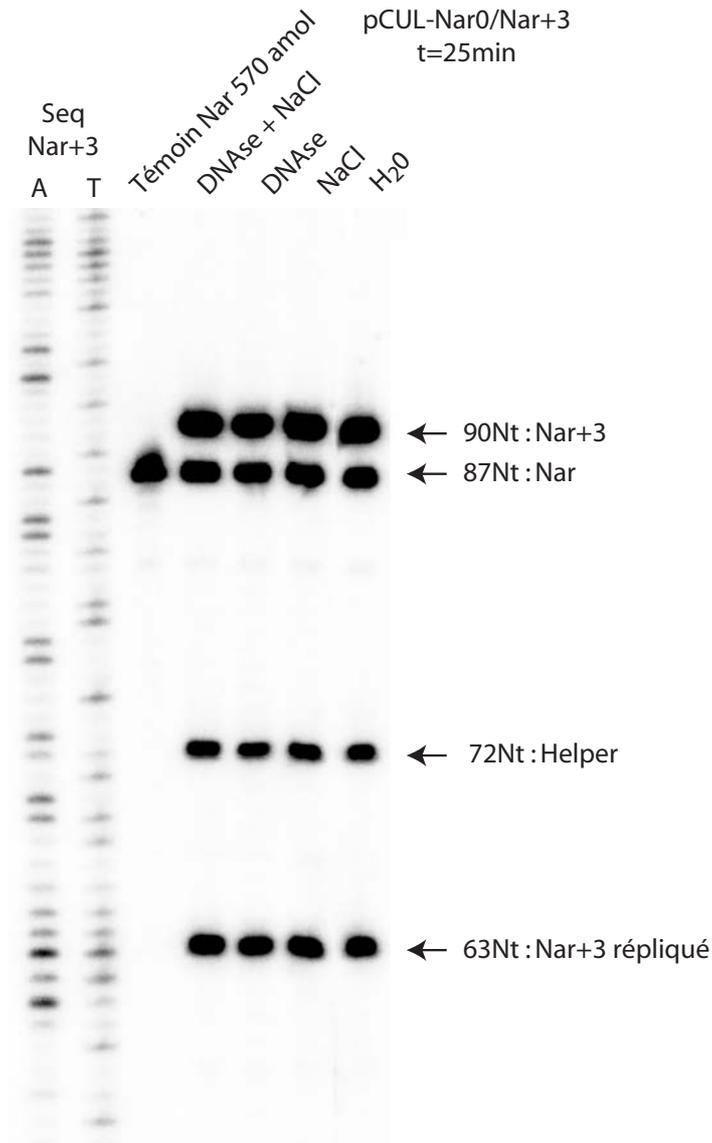


Figure 18 : Analyse de la quantité d'ADN associée aux cellules. Accessibilité aux lavages et à la DNase.

On s'intéresse sur ce gel à la bande de 90 nucléotides qui correspond à l'uptake. La variation d'intensité de cette bande n'est pas flagrante à l'œil. Par contre, en la quantifiant de manière précise et en normalisant par rapport au standard interne (72Nt), on voit que la quantité d'ADN qui reste associée aux cellules varie en fonction du traitement (Figure 19).

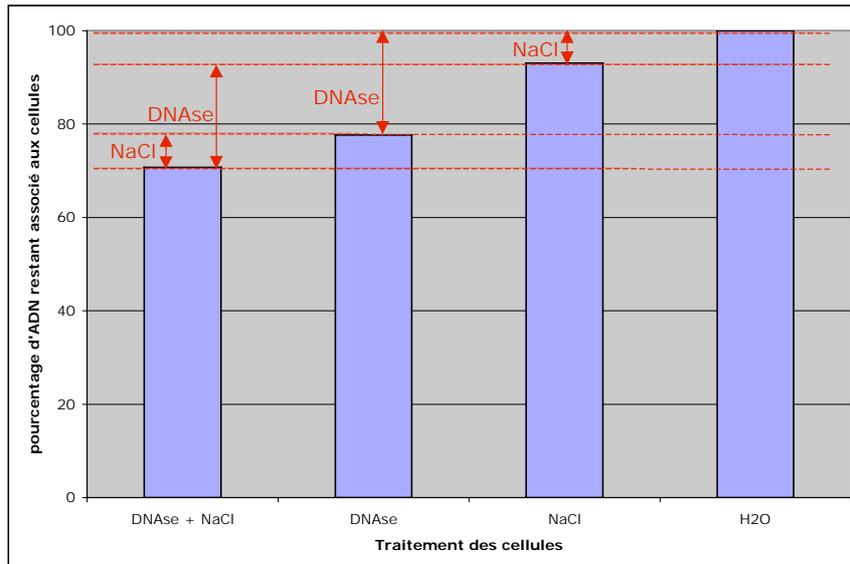


Figure 19 : Quantification de la quantité d'ADN qui reste associé aux cellules (uptake) en fonction du traitement. Les chiffres sont donnés en pourcentage d'ADN restant associé aux cellules par rapport à un lavage classique à l'eau.

En prenant 100% pour la quantité de plasmide restant associés aux cellules après deux lavages à l'eau (colonne H<sub>2</sub>O), on observe qu'un lavage plus strigent avec 0,5M NaCl permet d'éliminer 7% des plasmides (voir différence H<sub>2</sub>O/NaCl et DNase/DNase+NaCl). De même, un traitement à la DNase des cellules permet d'éliminer 22% de l'ADN qui reste associé (voir différence H<sub>2</sub>O/DNase et NaCl/DNase+NaCl). Au total, environ 30% de l'ADN qui reste associé aux cellules après électroporation peut être éliminer par un lavage plus stringent et un traitement des cellules avec une DNase : ces résultats suggèrent que cette portion d'ADN n'est pas entrée dans les cellules, mais y est associée d'une manière inconnue. Il est à noter également que cette association est strictement dépendante du choc électrique lié à l'électroporation puisqu'en l'absence de celui-ci, tout l'ADN est éliminé par de simples lavages des cellules à l'eau.

*Remarque* : Je ne retiendrai par la suite que le lavage NaCl, le traitement à la DNase étant impossible à mettre en œuvre pour des temps très précoces d'extraction.

Tous ces résultats sont résumés dans la Figure 20 qui montre le devenir de 100 molécules plasmidiques transformées par électroporation.

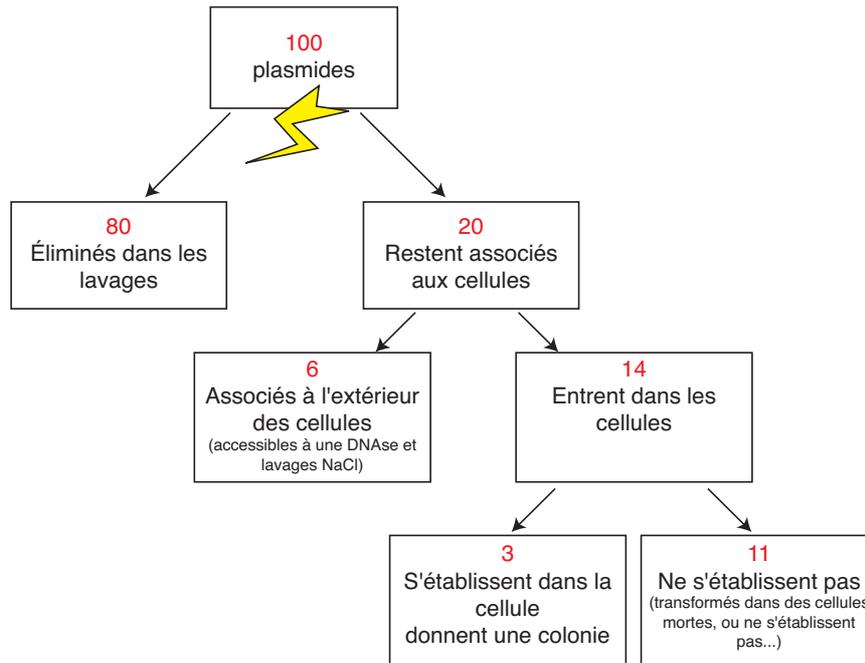


Figure 20 : Récapitulatif : devenir de 100 molécules de plasmides au cours de l'électroporation.

Ces résultats concernent des cellules non irradiées. En utilisant des cellules irradiées aux UV pour l'induction du système SOS, la survie à l'irradiation est d'environ 10%. De ce fait, seul 0,3% des plasmides mis en jeu lors de l'électroporation vont donner lieu à une colonie. Pourtant en regardant la quantité de plasmide qui se réplique sur gel MARI, on observe qu'elle est similaire pour les cellules irradiées ou non (à conditions que l'irradiation ne soit pas trop forte). Ceci signifie que certaines cellules irradiées sont incapables de donner une colonie du fait probablement d'un trop grand nombre de lésion UV sur leur chromosome ; pourtant un plasmide transformé est capable de se répliquer dans ces cellules pourtant non viables.

## 2. Extraction de l'ADN des cellules

Après ces considérations sur la transformation des bactéries, un deuxième point critique était à envisager : celui du protocole d'extraction de l'ADN qui devait se faire immédiatement ou très peu de temps après la transformation du plasmide. Cette extraction devait permettre de récupérer quantitativement une très faible quantité de plasmide parmi une grande quantité d'ADN génomique, et une grande quantité de cellules. De plus, il fallait autant que possible que les intermédiaires de répllication ne soient pas dégradés au cours de l'extraction.

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, la quantité de plasmide qui s'établit et donc qui se réplique est très faible (seulement 3% de l'ADN mis en jeu). Dans les conditions

retenues, 40ng de plasmide sont mis en jeu : seuls 1,2ng vont donc se répliquer ce qui équivaut pour un pUC de 2660bp à environ 700amol ( $1\text{amol}=10^{-18}\text{mol}$ ). Cette quantité de plasmide à extraire est très faible, d'autant plus que la quantité de cellules dans laquelle il est dilué est très importante. Comme nous l'avons déjà vu au paragraphe Partie II.- I. 1.2. page 45, dans nos conditions, seuls 55% des cellules viables sont transformées, et seuls 60% des cellules sont viables après le choc électrique, ce qui signifie que seulement 33% des cellules vont établir un plasmide. Les 67% restants sont présents au cours de l'extraction, apportant leur ADN génomique, leurs protéines et tous les autres éléments cellulaires qui vont gêner l'extraction de la très faible quantité d'ADN plasmidique. De plus, le plasmide que l'on souhaite récupérer est en cours de répllication, et donc probablement associé à la machinerie cellulaire de répllication.

Afin de mettre au point un protocole d'extraction qui permette d'obtenir le meilleur rendement, nous avons utilisé un plasmide de type pUC19 marqué radioactivement (déjà utilisé au paragraphe Partie II.- I. 1.4. , page 49). L'utilisation de ce plasmide radioactif permet de suivre sa présence au cours des différentes étapes de chaque protocole testé, et ainsi de déterminer le protocole le mieux adapté.

J'ai dans un premier temps essayé de mettre au point une lyse cellulaire au sarkosyl. Mais au cours de cette extraction, une grande partie de la radioactivité et donc de l'ADN était perdue au niveau du culot formé par le précipité des protéines et des polysaccharides de la membrane avec le sarkosyl. L'extraction au phénol de l'ADN de ce précipité n'a pas permis d'obtenir un rendement satisfaisant, car à nouveau une grande partie de la radioactivité était éliminée dans la phase phénolique. Nous avons finalement abandonné cette méthode pour tester en parallèle deux autres techniques : une préparation plasmidique classique par lyse alcaline (type minipréparation d'ADN), et une préparation totale d'ADN par lyse au lysozyme et précipitation des protéines et des polysaccharides au CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium). Ces deux techniques ont rapidement donné des résultats beaucoup plus satisfaisants : en effet, quasiment toute la radioactivité qui restait associée au culot cellulaire après les lavages se retrouvait dans la préparation finale d'ADN, ce qui signifie que le rendement d'extraction du plasmide est proche de 100%.

Ces deux protocoles permettent d'extraire tout l'ADN qui est entré ou qui est associé aux cellules, mais ces premiers tests ne nous renseignent pas sur la qualité de cet ADN : il peut en effet être dégradé au cours de l'extraction, ou son degré de pureté ne permet peut-être pas de

le digérer et d'en séparer correctement les fragments sur un gel de polyacrylamide comme l'exige la technique. J'ai donc mis ces deux protocoles à l'épreuve en transformant cette fois-ci un plasmide pCUL-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar non radiomarké qui a été extrait immédiatement après l'électroporation par les deux méthodes, puis digéré pour le visualiser sur gel après transfert et hybridation selon le protocole MARI décrit plus haut. À la différence du protocole classique, la partie haute du gel a également été transférée afin d'observer d'éventuels digests partiels. De même, j'ai utilisé deux souches différentes pour la transformation, l'une étant la JM103 qui sera utilisé tout au long des expériences, l'autre étant la souche STL140 portant une copie chromosomique du gène *lacZ*, qui sera donc révélé par la sonde utilisée. Le gel obtenu est représenté à la Figure 21.

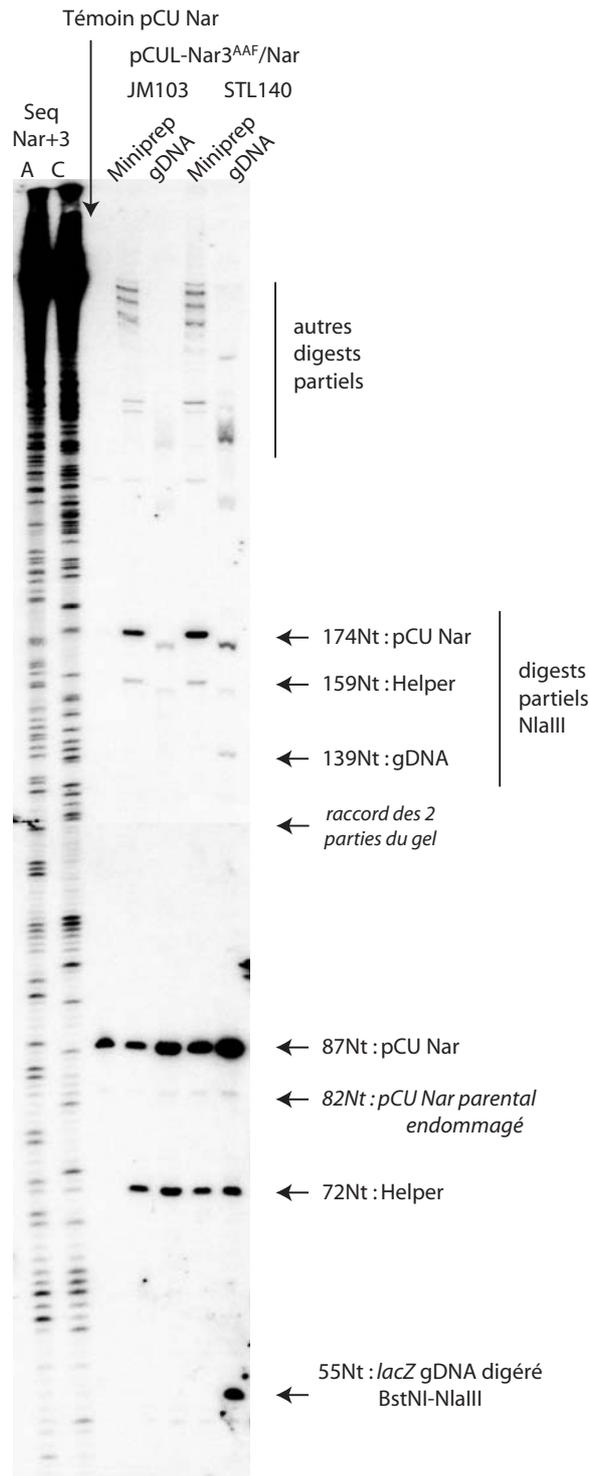


Figure 21 : Visualisation de l'efficacité de la digestion et de la qualité de la séparation d'un plasmide pCU transformé dans les souches JM103 et STL140 en fonction du mode d'extraction de l'ADN. Miniprep : extraction par lyse alcaline ; gDNA : extraction au CTAB/NaCl

Le plasmide utilisé ne possédant pas de boucle sur le brin opposé à la lésion, on n'observe pas de bande à 63Nt représentant la répliation du brin Nar+3. On observe sur ce gel, que lorsque l'ADN est extrait par la lyse alcaline (miniprep), la digestion par les enzymes

de restriction BstNI et NlaIII est moins efficace que lorsque l'extraction est faite par le protocole au CTAB/NaCl (gDNA). La migration des fragments d'ADN dans la partie haute du gel (fragments > 100Nt) est plus rapide pour l'extraction au CTAB/NaCl que pour la lyse alcaline. Cette différence de migration est difficilement explicable : peut-être que les nombreux petits fragments issus de la digestion de l'ADN génomique ont un effet entraîneur sur ces fragments plus longs, ce qui accélérerait leur migration. Quoi qu'il en soit, dans la zone qui nous intéresse la migration des ADN issus des deux modes d'extraction est identique.

Cette expérience a permis d'opter pour le protocole d'extraction au CTAB/NaCl. J'ai réalisé d'autres expériences similaires de contrôle de la qualité de l'extraction en modifiant certaines étapes du protocole afin de le simplifier tout en gardant un résultat au moins équivalent : ces expériences ont conduit au protocole final décrit dans la section "matériel et méthodes".



## II. Découplage de la réplication des brins leading et lagging au cours de la synthèse translésionnelle *in vivo*

Au cours de ce paragraphe, nous allons nous intéresser à la cinétique de réplication d'un plasmide portant une lésion unique dans un contexte de séquence donné. La lésion qui nous intéresse plus particulièrement est la lésion causée par le N-2-acétylaminofluorène (AAF). Ce cancérigène chimique est une amide aromatique qui se fixe préférentiellement sur le carbone 8 des guanines ( $G^{AAF}$ ), générant une lésion bloquante. Cette lésion a été beaucoup étudiée au laboratoire : il a été montré qu'elle induisait une perturbation locale de la structure de la double hélice décrite par le modèle d'insertion-dénaturation (Fuchs and Daune, 1972). Dans ce modèle, l'encombrement stérique du groupe acétyl de l'AAF provoque la rotation de la guanine autour de son lien glycosidique, adoptant une conformation *syn*. Le noyau aromatique fluorène vient s'intercaler dans la double-hélice rejetant ainsi la guanine à l'extérieur : l'appariement C: $G^{AAF}$  est rompu (Figure 22).

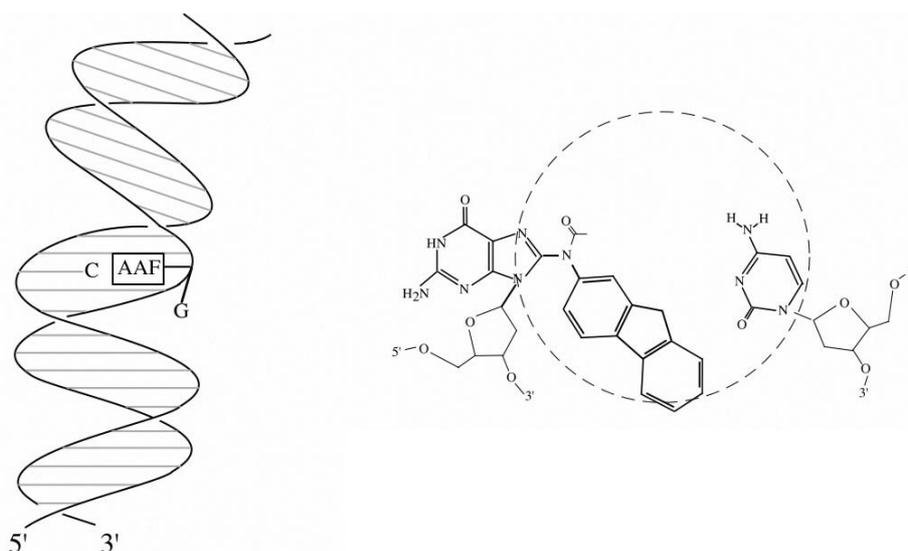


Figure 22 : Perturbation de la structure de l'ADN par l'adduit AAF. La guanine est en conformation *syn* : l'appariement l'appariement C: $G^{AAF}$  est rompu

Le fait que la base codante soit rejetée à l'extérieur de l'hélice d'ADN (conformation *syn*) explique le fort pouvoir bloquant de cette lésion. Il existe cependant un équilibre dynamique entre les conformations *syn* et *anti* : bien que la conformation *syn* soit prédominante, la guanine passe de temps en temps en conformation *anti* permettant ainsi

l'incorporation d'une cytosine par une ADN polymérase. La forme non-acétylée de cette lésion, l'aminofluorène (AF) permet à la guanine endommagée de rester préférentiellement en conformation *anti* : cette lésion est de ce fait beaucoup moins bloquante comme l'ont montré des études faites *in vitro* (Lindsley and Fuchs, 1994).

Le contexte de séquence dans lequel se situe l'AAF a une forte incidence sur le pouvoir mutagène de la lésion. Ainsi, la séquence correspondant au site de restriction NarI (5'-GGCGCC-3') s'est révélée être un point chaud de mutagenèse lorsque la troisième guanine de cette séquence était modifiée par l'AAF (5'-GGCG<sup>AAF</sup>CC-3'), entraînant un fort taux de mutagenèse par perte de deux nucléotides et donc décalage du cadre de lecture (*frameshift* -2) (Fuchs et al., 1981; Koffel-Schwartz et al., 1984). Cependant, toutes les études cinétiques de réplication au travers de la lésion (ou TLS : *Trans Lesion Synthesis*) réalisées jusqu'à présent ont été faites *in vitro*. Des études génétiques *in vivo* ont également été réalisées, permettant d'attribuer un rôle aux polymérases translésionnelles PolIII et PolV, mais l'aspect cinétique ne pouvait pas être abordé dans ces études.

Nous avons donc mis au point la technique décrite précédemment qui permet de suivre *in vivo* et en fonction du temps, la réplication des deux brins d'un plasmide monomodifié par une lésion de notre choix. Nous verrons dans un premier temps les résultats obtenus pour la lésion AAF portée par un plasmide de type pUC où nous montrons le découplage de la synthèse des deux brins d'un même plasmide au cours de la synthèse translésionnelle.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à suivre la cinétique de réplication des brins continu (*leading*) et discontinu (*lagging*) d'un plasmide de type pUC portant ou non une lésion unique AAF au niveau du site NarI. Les résultats sont présentés sous forme d'un article qui a été publié dans la revue *Science* (Pagès and Fuchs, 2003). D'autres résultats qui n'apparaissent pas dans l'article ainsi qu'une discussion plus approfondie seront exposés par la suite.

*[signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Vincent Pages**, and Robert P.P. Fuchs

UNCOUPLING OF LEADING- AND LAGGING-STRAND DNA REPLICATION  
DURING LESION BYPASS IN VIVO.

**Science 300 (2003), 1300-1303**

Pages 1300-1303 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/300/5623/1300.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

### III. Biochimie et dynamique de la synthèse translésionnelle

#### 1. Influence de l'induction du système SOS

Tous les résultats de réplication montrés dans cet article ont été obtenus dans des cellules préalablement irradiées aux UV afin d'induire leur système SOS. Les mêmes expériences ont également été réalisées dans des bactéries dont le système SOS n'était pas induit. Les résultats sont présentés Figure 23.

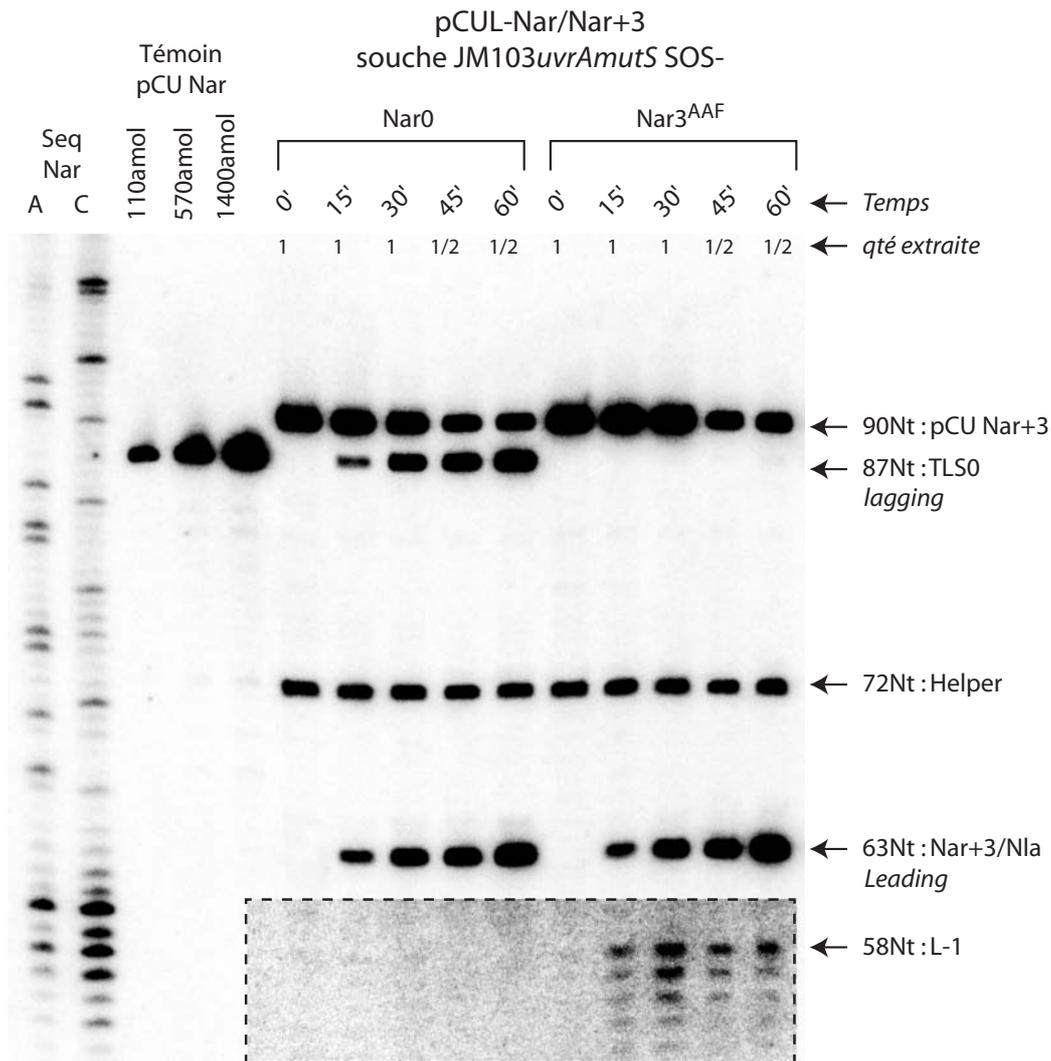


Figure 23 : Cinétique de réplication d'un plasmide non-endommagé (pCUL-Nar0/Nar+3) et d'un plasmide endommagé (pCUL-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3) dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS n'est pas induit (SOS-). Le contraste de l'image a été augmenté dans la zone encadrée de pointillés afin d'améliorer la visibilité des bandes de faible intensité.

Dans l'expérience présentée ici, la lésion est localisée sur le brin lagging. En l'absence d'induction du système SOS, on ne détecte aucun produit de TLS, ce qui signifie que le brin

lagging qui porte la lésion n'est pas répliqué. Malgré le blocage définitif de la réplication de ce brin, le brin leading est répliqué de manière très efficace, avec la même cinétique de réplication que les deux brins du plasmide non endommagé. La même expérience a été réalisée avec un plasmide portant la lésion AAF sur le brin leading : dans ce cas, alors que la réplication du brin leading est totalement bloquée dans ces cellules non induites, le brin lagging n'est pas retardé. Le découplage observé en conditions SOS+ est retrouvé ici en conditions SOS-. Il n'est donc pas dépendant de l'induction du système SOS.

Quels sont le (ou les) facteurs SOS nécessaires à la TLS ?

Nous avons vu (Figure 3 de l'article) que la présence de PolIII est indispensable pour réaliser la synthèse translésionnelle mutagène (TLS-2), et que celle de PolIV était responsable de la TLS0 (fidèle). Bien que ces deux polymérases codées par des gènes contrôlés par le système SOS soient indispensables dans les deux voies de TLS, rien ne prouve que leur présence soit suffisante. En effet, nous discuterons dans la suite de cette thèse (paragraphe 3. ) de résultats obtenus avec la technique MARI mettant en évidence une inhibition partielle de la fonction exonucléase associée à PolIII au cours de l'induction du système SOS.

## **2. Cinétique de la TLS : nature de la lésion et effet du contexte de séquence**

Nous venons de voir que le temps de passage d'une lésion AAF était de 50 minutes. J'ai testé d'autres plasmides portant soit une lésion AF (aminofluorène) soit une lésion AAF dans le contexte de séquence 5'-GGG-3', l'adduit étant lié à guanine en gras de la séquence et positionné sur le brin lagging. La cinétique de réplication de ces deux plasmides ainsi que celle du plasmide non modifié correspondant, a été étudiée dans la souche JM103 $uvrAmutS$  SOS+. Les résultats sont présentés Figure 24.

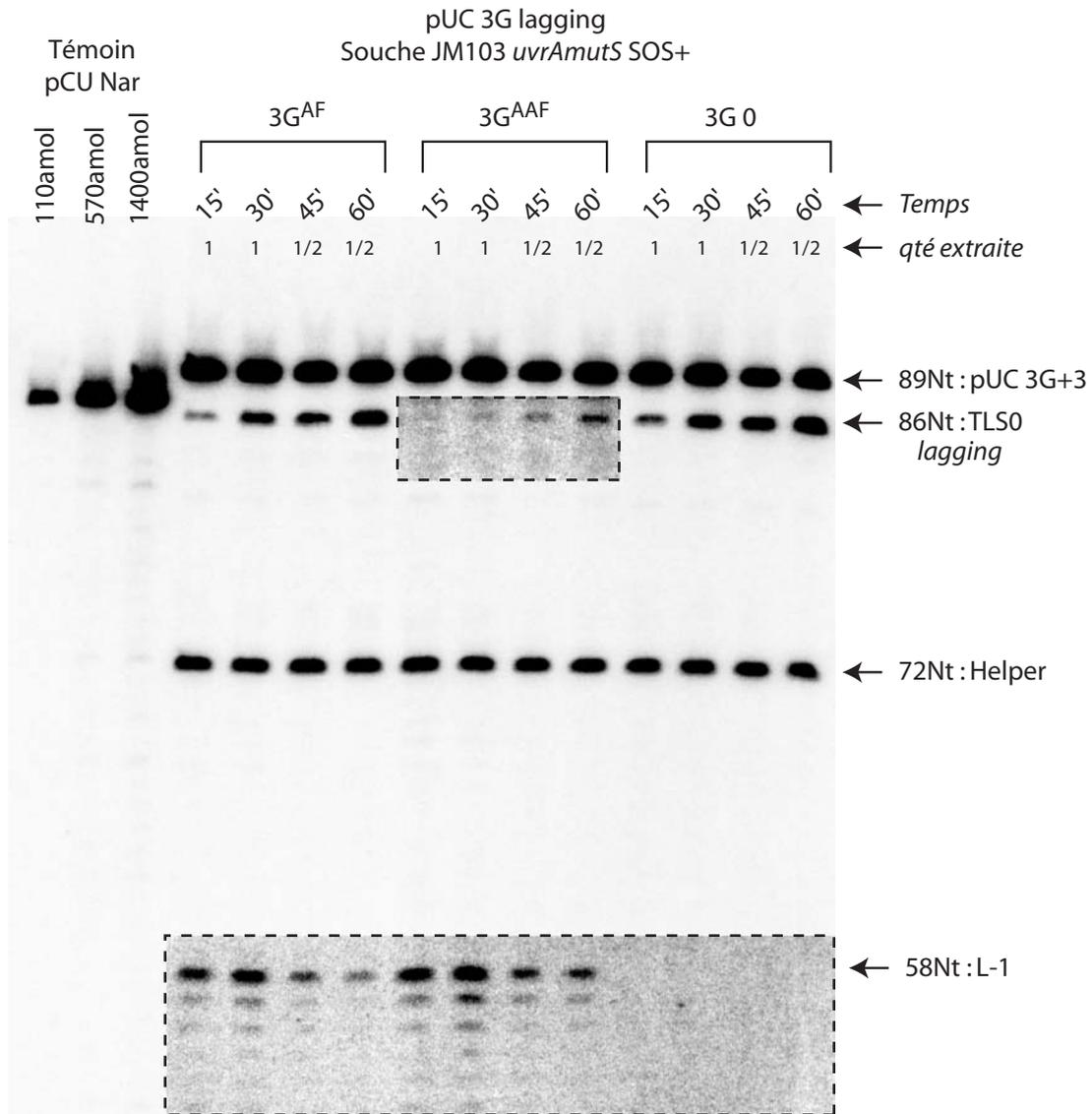


Figure 24 : Cinétique de réplication d'un plasmide non endommagé (3G 0), portant une lésion AF (3G<sup>AF</sup>) ou portant une lésion AAF (3G<sup>AAF</sup>) dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS est induit.

Les plasmides utilisés dans cette expérience présentent également une boucle de 3 nucléotides en face de la lésion (3G+3), mais cette boucle n'est pas digestible par une enzyme de restriction. Il n'est donc pas possible de visualiser la réplication du brin non endommagé qui porte cette boucle, puisque le produit de réplication de ce brin se trouve confondu avec le plasmide qui ne s'est pas répliqué (89Nt : 3G+3). On peut néanmoins suivre la réplication du brin endommagé de ces plasmides (86Nt). On remarquera tout d'abord qu'il n'y a qu'un produit de TLS de la lésion AAF (86Nt). En effet, dans ce contexte de séquence, le glissement ne peut pas avoir lieu comme dans le site NarI : le passage de la lésion se fait donc essentiellement sans décalage du cadre de lecture. La représentation graphique de la quantification des bandes de TLS (86Nt) est présentée Figure 25.

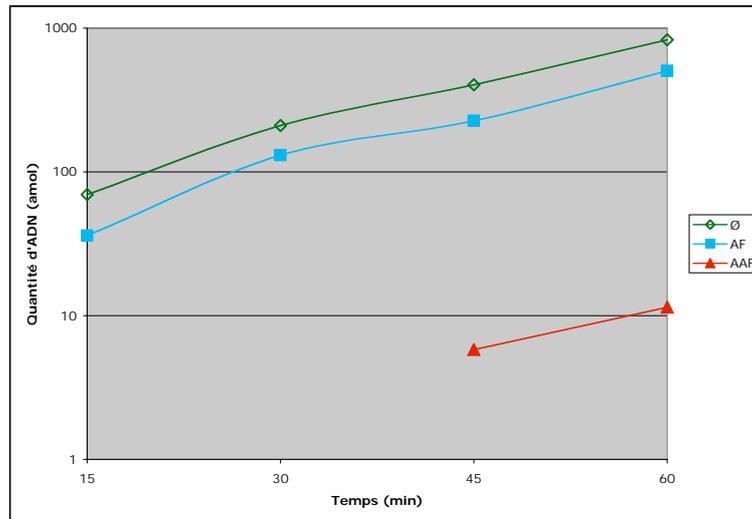


Figure 25 : Représentation graphique de la quantification du gel présenté à la Figure 24 représentant la cinétique de réplification du plasmide pUC3G non endommagé (Ø), portant une lésion AF ou une lésion AAF.

La cinétique de réplification du plasmide ne portant pas de lésion est similaire à celle observée avec les autres plasmides utilisés jusqu'à présent (pCU et pKB110), le temps de doublement étant d'environ 11 minutes.

## 2.1. Effet du contexte de séquence

Le retard pris par le brin portant la lésion AAF est de l'ordre de 80 minutes, ce qui est nettement supérieur au retard mesuré pour cette même lésion dans le contexte de séquence NarI. Ce résultat est à prendre avec précaution car l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois (d'où l'absence de barres d'erreur).

Ce temps de passage plus long peut toutefois s'expliquer par le fait que le glissement est moins favorable dans le contexte de séquence 3G. Le glissement  $-2$  favorisé dans le site NarI conduisait à un fort taux de mutagenèse  $-2$ . Le temps de passage de 50 minutes déterminé pour le site NarI a été calculé en additionnant les deux produits de TLS : TLS0 produite par PolV et TLS-2 produite par PolIII.

Au niveau du site 3G, un glissement  $-1$  peut se produire, mais avec une fréquence  $\sim 20$  fois inférieure au glissement  $-2$  observé dans le site NarI. Le seuil de détection de la technique MARI ne permet pas de mettre en évidence ce produit de TLS-1. Seul le mode de passage non-glissé permet donc de répliquer à travers la lésion dans ce contexte de séquence : ceci peut expliquer que le temps de passage soit plus long.

D'autre part, on peut très bien imaginer qu'un contexte de séquence puisse être plus ou moins favorable à l'insertion en face de la lésion ainsi qu'à l'élongation par les différentes polymérases.

## 2.2. Influence de la nature de la lésion

Le brin portant la lésion AF semble être retardé d'environ 10 minutes par rapport au même brin du plasmide non endommagé. Là encore, ce résultat est à prendre avec précaution parce qu'il s'agit du résultat d'une seule expérience. Il est clair en tous cas que le passage de la lésion AF est beaucoup plus efficace que celui de l'AAF ce qui est en accord avec les données obtenues *in vitro* (Lindsley and Fuchs, 1994) et *in vivo* (Bichara and Fuchs, 1985 ; Koffel-Schwartz et al., 1984). Cette grande efficacité à répliquer au travers de la lésion AF peut s'expliquer en termes structuraux : bien que son encombrement stérique soit proche de celui de l'AAF, l'absence de groupement acétyl de l'AF permet à la guanine de rester dans sa conformation habituelle (*anti*) (Figure 26) contrairement à l'AAF qui induit le passage de la guanine en conformation *syn* (Figure 22, page 59). Dans le cas de l'AF, la guanine peut être recopiée plus rapidement par la polymérase par insertion d'une cytosine et formation de l'appariement G:::C "classique".

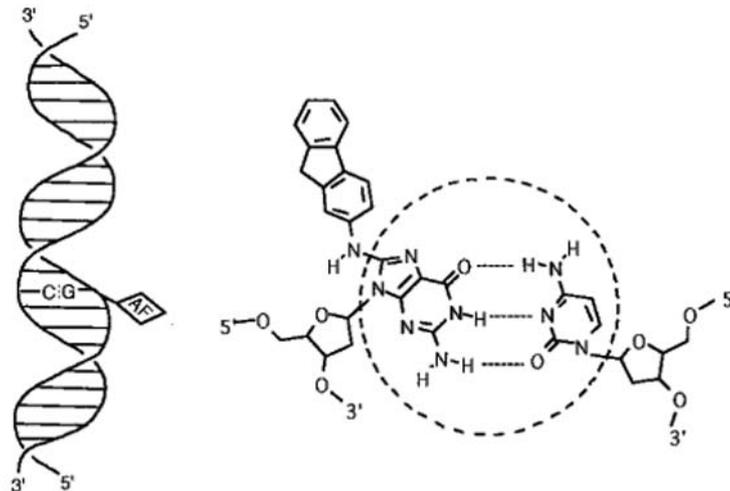


Figure 26 : Conformation d'un ADN portant une lésion AF : l'adduit ne perturbe pas trop la structure de l'ADN et n'empêche pas l'appariement C::G<sup>AF</sup>

Vue la très grande efficacité de réplification à travers la lésion AF observée ci-dessus, nous nous sommes demandé si l'induction du système SOS était nécessaire au passage, voire

même si l'induction des polymérase translésionnelles ne pouvait pas avoir pour effet d'augmenter le temps de passage de cette lésion par la mise en place dans la cellule de mécanismes de changement de polymérase. J'ai donc réalisé cette même expérience dans des cellules non induites pour le système SOS. Les résultats sont présentés Figure 27.

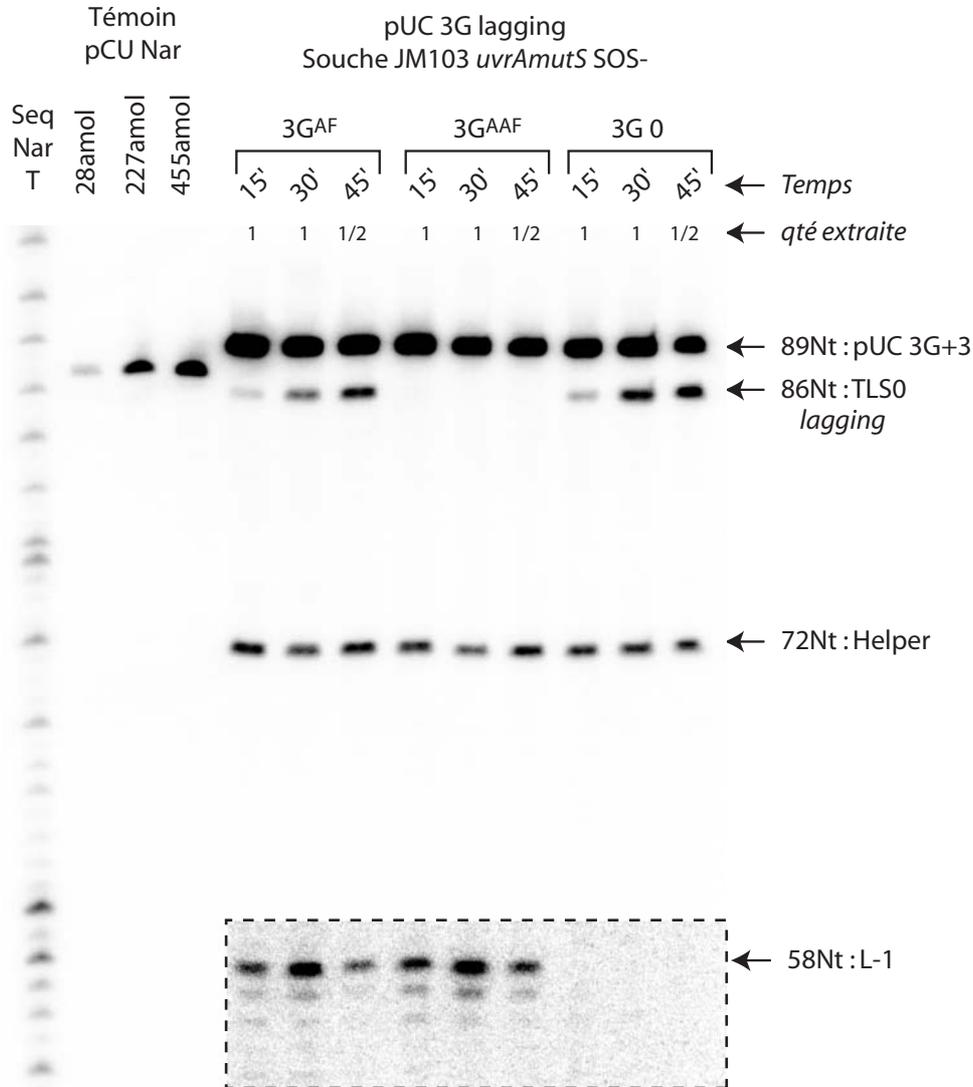


Figure 27 : Cinétique de répllication d'un plasmide non endommagé (3G 0), portant une lésion AF (3G<sup>AF</sup>) ou portant une lésion AAF (3G<sup>AAF</sup>) dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS n'est pas induit.

En l'absence d'induction du système SOS, on observe, comme attendu, aucun passage de la lésion AAF, par contre, la cinétique de répllication de l'AF n'est pas modifiée (données non-présentées). Ceci suggère donc que les polymérase SOS ne sont pas nécessaires à la répllication de cette lésion dans ce contexte de séquence. Ces résultats sont en accord avec les expériences réalisées *in vitro* où il était montré que l'ADN polymérase T7 était capable de répliquer seule au travers de cette lésion AF et de manière relativement efficace, alors qu'elle était complètement bloquée par la lésion AAF (Lindsley and Fuchs, 1994). Ces résultats sont

également en accord avec les expériences *in vivo* réalisées au laboratoire (Bichara and Fuchs, 1985; Koffel-Schwartz et al., 1984).

Si l'on s'intéresse aux intermédiaires de réplication bloquées au niveau de la lésion, ou plus exactement 1 nucléotide avant la lésion (bande 58Nt, Figure 24 et Figure 27), il est très surprenant d'observer un blocage presque aussi important pour la lésion AF que pour l'AAF alors que l'efficacité de TLS est bien plus importante pour l'AF. Comment expliquer un tel blocage pour l'AF alors que l'efficacité d'élongation semble très bonne ? Une explication envisageable serait que les constructions utilisées dans cette expérience sont anciennes (une dizaine d'années). Il se peut alors que l'adduit  $G^{AF}$ , moins stable que l'AAF s'oxyde en dérivé "FaPy" (ouverture du cycle imidazole de la guanine) qui est connu pour être fortement bloquant. On peut donc envisager qu'une fraction des constructions utilisées ici soit dégradée sous cette forme et constitue donc un fort blocage à la réplication. La fraction non dégradée serait répliquée très efficacement par la polymérase. Si tel est le cas, le temps de passage estimé à 10 minutes est alors à revoir à la baisse car le décalage de la courbe ne serait dans ce cas pas dû à un retard de réplication (décalage vers la droite), mais à une diminution de la quantité de plasmide qui se réplique (décalage vers le bas de la courbe).

En conclusion, nous pouvons dire que le temps de passage de la lésion AF dans le contexte de séquence 3G est inférieur ou égal à 10 minutes, ce qui est nettement plus rapide que le passage de la lésion AAF. Il faudrait approfondir cette étude en commençant par construire de nouveaux plasmides monomodifiés et en prenant soin de définir une boucle possédant un site de restriction qui permettra de suivre la réplication des deux brins comme nous l'avons vu précédemment pour l'AAF.

### **3. Activité proofreading de Pol III au cours de la TLS**

Au cours de ce paragraphe, nous allons nous intéresser aux étapes de la TLS (insertion et élongation) au niveau de la lésion AAF localisée dans le site NarI. Un modèle faisant intervenir les polymérases translésionnelles PolIII et PolV a déjà été décrit précédemment (Becherel and Fuchs, 2001; Napolitano et al., 2000), mais de nouveaux éléments obtenus grâce à la technique MARI ont permis d'apporter certaines modifications à ce modèle.

Je décrirai dans un premier temps le modèle actuel basé sur des expériences de répllication *in vitro*, ainsi que sur des expériences de génétique confirmées par la technique MARI.

J'apporterai ensuite les nouveaux éléments obtenus grâce à la technique MARI et à l'utilisation de souches déficientes pour la fonction exonucléasique de correction de lecture (ou *proofreading*) de l'ADN polymérase répllicative PolIII. Ces nouveaux éléments nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une compétition entre l'activité exonucléase de proofreading de PolIII et l'activité d'élongation de PolII.

Enfin, l'analyse de l'activité proofreading à l'aide de la technique MARI nous a permis de proposer un modèle où l'activité exonucléasique de PolIII serait partiellement inhibée lors de l'induction du système SOS favorisant ainsi l'activité d'élongation de PolII au dépend de l'activité proofreading de PolIII. De façon plus générale, l'inhibition partielle de l'activité proofreading de PolIII au cours de la réponse SOS devrait faciliter le franchissement de nombreuses lésions. Ce point sera discuté dans la partie "Discussion".

### 3.1. Le modèle actuel

Nous avons vu précédemment qu'en l'absence d'induction du système SOS dans une souche sauvage, aucun événement de TLS n'était observé au niveau du site Nar3<sup>AAF</sup>. Des expériences antérieures de génétique avaient montré qu'il existait malgré tout un peu de passage (TLS-2 surtout) au travers de la lésion en condition SOS-, mais en proportion faible (de l'ordre de 1-2%)(Fuchs et al., 2001). Le niveau basal de frameshift -2 dépend entièrement de PolII présent à son niveau basal (Fuchs et al., 2001).

L'induction du système SOS conduit à une forte augmentation de synthèse translésionnelle à la fois fidèle (TLS0) et mutagène par frameshift-2 (TLS-2) qui atteignent chacune des taux d'environ 20%. L'utilisation de mutants de polymérase PolII et PolV a permis d'attribuer un rôle à chacune de ces polymérases dans le franchissement de la lésion AAF : PolII est responsable de la synthèse mutagène (TLS-2) tandis que PolV est responsable de la synthèse fidèle (TLS0). Ces résultats ont été obtenus par des analyses génétiques (Fuchs et al., 2001 ; Napolitano et al., 2000) et confirmés par la technique MARI (Pagès and Fuchs, 2003).

•**Niveau d'expression de PolIII et PolIV :**

L'induction du système SOS a pour effet d'augmenter la transcription du gène *polB* codant pour PolIII. Le niveau d'expression de PolIII a été mesuré au laboratoire par Western et estimé à environ 20 et 110 molécules de PolIII par cellule en conditions SOS- et SOS+ respectivement (O. Bécherel). Ces chiffres, bien que sensiblement plus faibles, sont globalement en accord avec ceux publiés précédemment : le niveau basal de PolIII avait été estimé à ~20-50 molécules par cellules (Qiu and Goodman, 1997) et augmentait d'un facteur 7 après activation de la réponse SOS.

L'opéron *umuDC* est lui aussi SOS-inductible. Le niveau basal de la protéine UmuD est estimé à 180 molécules par cellules, et passe à 2400 en conditions SOS+ (Woodgate and Ennis, 1991). Alors qu'il n'est pas possible de détecter la protéine UmuC en conditions SOS-, on estime à 60 le nombre de copies par cellule après induction du système SOS (S. Sommer). De plus, l'induction du système SOS permet l'activation de la protéine RecA qui sous sa forme activée RecA\* induit le clivage de la protéine UmuD en UmuD', le complexe UmuD'<sub>2</sub>C constituant PolIV. La protéine UmuC s'associant également avec la forme non clivée d'UmuD, on peut considérer que l'induction du système SOS conduit à la formation d'environ 15 molécules de PolIV (UmuD'<sub>2</sub>C) par cellule, alors que cette polymérase est absente en conditions SOS-.

Ainsi, l'induction du système SOS a pour effet d'augmenter le niveau intracellulaire des deux polymérases PolIII et PolIV responsables de la TLS au niveau du site Nar<sup>AAF</sup>.

Des expériences de mutagenèse menées en parallèle dans une souche sauvage et dans une souche  $\Delta umuDC$  ont montré que l'absence de PolIV s'accompagnait d'une diminution de 20 à 30% de la TLS-2 réalisée par PolIII, suggérant que PolIV contribue partiellement à la TLS-2 dépendante de PolIII (Fuchs et al., 2001).

En plus de ces données obtenues *in vivo*, des expériences réalisées *in vitro* ont confirmées que PolIV en présence de RecA et de l'anneau de processivité  $\beta$  était capable d'insérer un nucléotide en face de la lésion AAF (S.Fuji & R.P.Fuchs, données non publiées), et que PolIII était capable d'élonger efficacement un intermédiaire glissé -2 (Becherel and Fuchs, 2001).

Tous ces résultats ont conduit à l'élaboration du modèle présenté Figure 28.

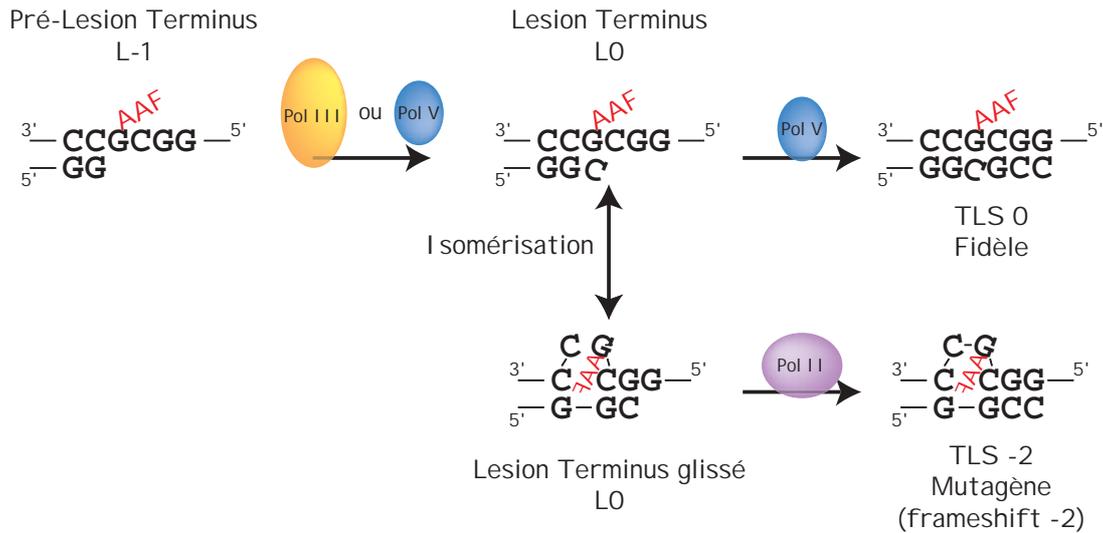


Figure 28 : Modèle actuel du passage de la lésion Nar3<sup>AAF</sup> : PolIII ou PolV réalisent l'étape d'insertion en face de la lésion. Le "lesion-terminus" obtenu peut être élongé par PolV conduisant à de la TLS0, ou après isomérisation, par PolIII conduisant à de la TLS-2.

Dans ce modèle, les polymérases PolIII et PolV sont capables de réaliser l'étape d'insertion conduisant à l'intermédiaire L0. Ainsi, lorsque le système SOS est induit, l'augmentation de quantité de PolV permet d'augmenter la formation de L0 qui pourra être pris en charge par PolV ou PolIII, ce qui conduira à augmenter la TLS à la fois fidèle et mutagène. De même, l'augmentation du niveau d'expression de PolIII lié à l'induction SOS permet d'augmenter le niveau de TLS-2. En conditions SOS-, PolIII produit un peu de L0. Le niveau basal de PolIII peut prendre en charge ce L0 dans sa forme glissée pouvant expliquer les 2% de TLS-2 qui sont observés dans ces conditions.

Par ailleurs, il a été montré que suite à l'inactivation (partielle ou totale) de la fonction proofreading de PolIII, la mutagenèse -2 n'était plus dépendante de l'induction du système SOS, mais restait dépendante de PolIII. Par contre, l'inactivation du proofreading ne stimule pas la voie non-glissée (TLS0) qui continue de dépendre de PolV (Fuchs and Napolitano, 1998).

Au contraire, il a récemment été montré que l'inactivation du proofreading de PolIII permettait à cette polymérase de répliquer à travers une lésion T-T CPD (dimère de Thymine *cis-syn* cyclobutane) s'affranchissant ainsi de PolV qui est normalement nécessaire au franchissement de cette lésion (Borden et al., 2002).

La technique MARI permet d'observer les intermédiaires de réplication bloqués au niveau de la lésion. Dans le cas de la lésion AAF, nous avons observé jusqu'à présent une bande de 58Nt correspondant à un intermédiaire bloqué en L-1, ainsi que des produits de dégradation de cette bande allant jusqu'à L-5 (nous verrons plus tard que ces produits résultent de l'activité exonucléase 3'→5' de la sous-unité  $\epsilon$ ). Par contre, aucun intermédiaire bloqué au niveau L0 n'a été observé. Cette observation suggère que la production de L0 soit l'étape limitante.

Afin d'essayer de mettre en évidence cet intermédiaire L0 et de caractériser ces produits de dégradation des intermédiaires L-1, j'ai utilisé des souches dans lesquelles la fonction exonucléasique 3'→5' liée à la sous-unité  $\epsilon$  de PolIII était soit inactivée (souche *mutD5*), soit inhibée (souche *dnaQ49*).

## 3.2. Inhibition de l'activité proofreading de Pol III

### 3.2.1. La sous-unité $\epsilon$ : mutants déficients dans l'activité proofreading

Nous avons vu dans l'introduction que PolIII core était composée de trois sous-unités dont la sous-unité  $\epsilon$  codée par le gène *dnaQ* ou *mutD*. Cette sous-unité possède une activité 3'→5' exonucléase dont la fonction est de corriger les erreurs d'incorporation (proofreading) de la polymérase.

$\epsilon$  joue aussi un rôle structural important au sein de PolIII core (association  $\alpha$ - $\epsilon$ - $\theta$ ) de telle sorte qu'une délétion complète de cette sous-unité est létale, sauf en présence d'une mutation compensatrice sur la sous-unité  $\alpha$  (gène *dnaE*). Il existe par ailleurs de nombreuses mutations du gène *dnaQ* (ou *mutD*) qui entraînent une inactivation quasi-totale ou partielle de l'activité proofreading sans affecter la fonction polymérase de PolIII. Ces mutations sont compatibles avec la viabilité des cellules. Elles ont par contre pour effet d'augmenter énormément le niveau de mutagenèse spontanée. Ces mutations peuvent être classées en allèles dominants ou récessifs à l'aide d'un test de complémentation : dans ce test, l'allèle mutant (porté par le chromosome) est complémenté à l'aide d'un plasmide à faible nombre de copies (type mini-F), portant l'allèle sauvage *dnaQ*. Si la mutation est récessive, la complémentation rétablit un niveau de mutagenèse spontanée bas. Si la mutation est dominante, le taux de mutagenèse spontanée reste élevé (Taft-Benz and Schaaper, 1998). Ceci est illustré Figure 29 pour les mutants *mutD5* et *dnaQ49*.

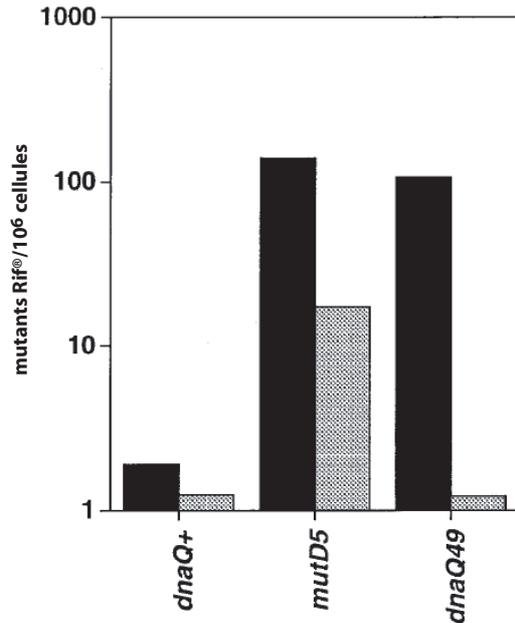


Figure 29 : Complémentation des allèles *dnaQ* (sauvage), *mutD5* et *dnaQ49*. Les barres noires représentent le taux de mutagenèse de l'allèle en question. Les barres grises représentent le taux de mutagenèse de l'allèle complétement par l'allèle *dnaQ* sauvage porté par un plasmide à faible nombre de copies (type mini-F : 1 ou 2 copies par cellule) (Taft-Benz and Schaaper, 1998).

### 3.2.1.1. Allèle *mutD5*

Cet allèle présente une mutation ponctuelle C967→T conduisant à la substitution Thr-15-Ile (Takano et al., 1986). Cette mutation est dominante (voir Figure 29) et n'altère pas les interactions avec les autres sous-unités de la polymérase. Elle a pour effet d'inactiver la fonction exonucléase (Fijalkowska and Schaaper, 1996). On voit Figure 29 que cette mutation entraîne une augmentation de la mutagenèse spontanée d'un facteur proche de 100 par rapport à une souche sauvage. D'autres études de mutagenèse spontanée ont montré des fréquences de mutation de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  au-dessus d'une souche sauvage (Kornberg and Baker, 1992).

### 3.2.1.2. Allèle *dnaQ49*

Cet allèle présente une mutation ponctuelle A725→C conduisant à la substitution Val-96-Gly (Takano et al., 1986). Contrairement à l'allèle *mutD5*, cette mutation est récessive (voir Figure 29). La mutation Val-96-Gly a un effet au niveau de la structure de la sous-unité  $\epsilon$  qui va de ce fait interagir plus faiblement avec les autres éléments de PolIII core ( $\alpha$  et  $\theta$ ) (Jonczyk et al., 1998). C'est la perte d'interaction entre  $\alpha$  et  $\epsilon$  qui pourrait rendre compte de la baisse d'activité proofreading : lorsque la polymérase n'insère pas le bon nucléotide ou

rencontre un lésion, elle a tendance à se dissocier avant que l'exonucléase n'ait pu agir (Takano et al., 1986).

### 3.2.2. Étude de la synthèse translésionnelle dans une souche *mutD5*

Comme nous venons de le voir, la mutation *mutD5* a pour effet d'inactiver la fonction exonucléasique de la sous-unité  $\epsilon$  de l'ADN polymérase III. La Figure 30 montre la cinétique de réplication d'un plasmide pCUL-Nar3<sup>AAE</sup>/Nar+3 qui a été transformé dans trois souches différentes dont le système SOS n'a pas été induit. Il s'agit de la souche sauvage (WT), d'une souche portant la mutation *mutD5*, et une souche portant à la fois la mutation *mutD5* et la délétion du gène *polB* codant pour PolII.

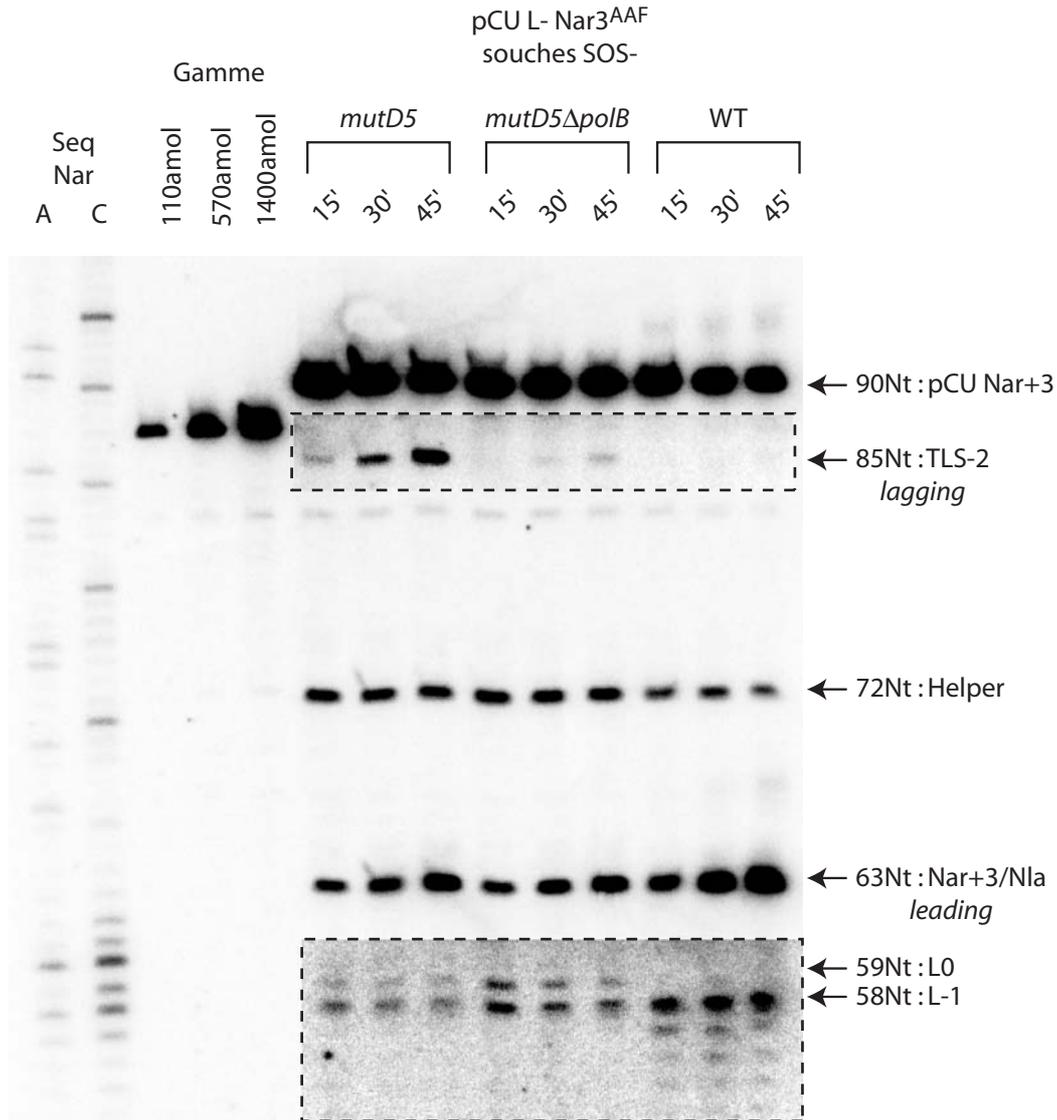


Figure 30 : Cinétique de réplication d'un plasmide pCUL-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 dans les souches *mutD5*, *mutD5ΔpolB*, et sauvage (*WT*).

Intéressons-nous dans un premier temps aux intermédiaires de réplication bloqués au niveau de la lésion. Dans la souche sauvage, le blocage est observé un nucléotide avant la lésion (L-1, bande de 58Nt), et l'on observe des intermédiaires de dégradation allant jusqu'à L-5. En inactivant l'activité exo (souche *mutD5*), ces produits de dégradation (L-2 à L-5) disparaissent complètement, ce qui nous permet d'attribuer la dégradation des intermédiaires bloqués observée dans une souche sauvage à l'activité proofreading de PolIII. De plus, dans cette souche *mutD5*, on observe également du blocage au niveau du L0 : ceci nous permet de supposer que PolIII a réalisé l'étape d'insertion, et qu'en l'absence de proofreading, le nucléotide incorporé en face de la lésion n'a pas pu être excisé. Il est surprenant de constater que l'activité exonucléasique de proofreading dans une souche sauvage n'enlève pas

uniquement le nucléotide mal apparié (en L0) générant du L-1, mais peut exciser 1, 2, 3, 4, ou 5 nucléotides (voire plus encore).

On observe également dans la souche *mutD5* un fort taux de mutagenèse –2 (TLS-2), de l'ordre de 30% (Fuchs and Napolitano, 1998). En inactivant PolII dans cette même souche (*mutD5ΔpolB*), ce taux de TLS mutagène diminue fortement, et la quantité d'intermédiaires bloqués en L0 augmente, ce qui signifie que PolII utilise cet intermédiaire L0 en conformation "glissée" pour le convertir en produit TLS-2 (Bécherel et al., manuscrit en préparation ; Figure 28). Cette observation confirme ce qui était suggéré dans le modèle actuel décrit au paragraphe précédent : PolII utilise le L0 pour réaliser l'élongation glissée. Ce qui est très surprenant par contre, c'est qu'ici nous sommes dans des conditions SOS- : c'est donc le niveau basal de PolII qui est suffisant pour réaliser cette étape d'élongation (Fuchs and Napolitano, 1998). Le niveau d'expression de PolII déterminé par Western Blot est identique dans la souche sauvage et dans la souche *mutD5* (E. Bertrand). Dans une souche sauvage en conditions SOS-, le niveau basal de PolII est incapable de réaliser efficacement la TLS-2 (2%) probablement par manque d'intermédiaire L0. Nous proposons qu'il y ait compétition au niveau du substrat L0 entre l'activité d'élongation par PolII et l'exonucléase liée à PolIII.

Cette observation nous conduit à envisager une nouvelle hypothèse pour le modèle décrit au paragraphe 3.1. : l'augmentation de mutagenèse –2 en conditions SOS+ serait due à une inhibition de l'activité de proofreading de PolIII, ce qui permettrait à PolII de "gagner" la compétition et de réaliser l'élongation glissée du L0 conduisant à la mutagenèse –2. Ceci avait déjà été suggéré par le passé (Woodgate et al., 1987) sans que toutefois les auteurs n'aient pu apporter la preuve moléculaire de cette inhibition.

Pourtant, même en conditions SOS+, nous n'avons jamais pu observer d'intermédiaires L0, ce qui indique que l'inhibition du proofreading, si elle a lieu, n'est que partielle. Est-ce que ce modèle reste valable si l'inhibition de l'exonucléase n'est que partielle ? Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé le même type d'expériences dans une souche où l'activité proofreading n'est pas inactivée, mais réduite : cette souche porte la mutation *dnaQ49*.

*Remarque* : dans la souche *mutD5* en l'absence de PolII, on observe encore un faible taux de mutagenèse –2 qui a pu être réalisée par PolIII. En effet, PolIII a été montrée capable de réaliser cette extension mutagène in vitro (S.Fuji & R.P.Fuchs, données non publiées). Dépourvue ici de son activité proofreading, on imagine aisément qu'elle puisse réaliser cette même extension in vivo.

### 3.2.3. Étude de la souche *dnaQ49*

Nous avons vu que la mutation *dnaQ49* réduit l'activité proofreading en déstabilisant la structure de PolII core (Jonczyk et al., 1998). La Figure 31 montre la cinétique de réplication d'un plasmide pCUL+Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 transformé dans les souches *dnaQ49* et *dnaQ49ΔpolB* dont le système SOS n'est pas induit.

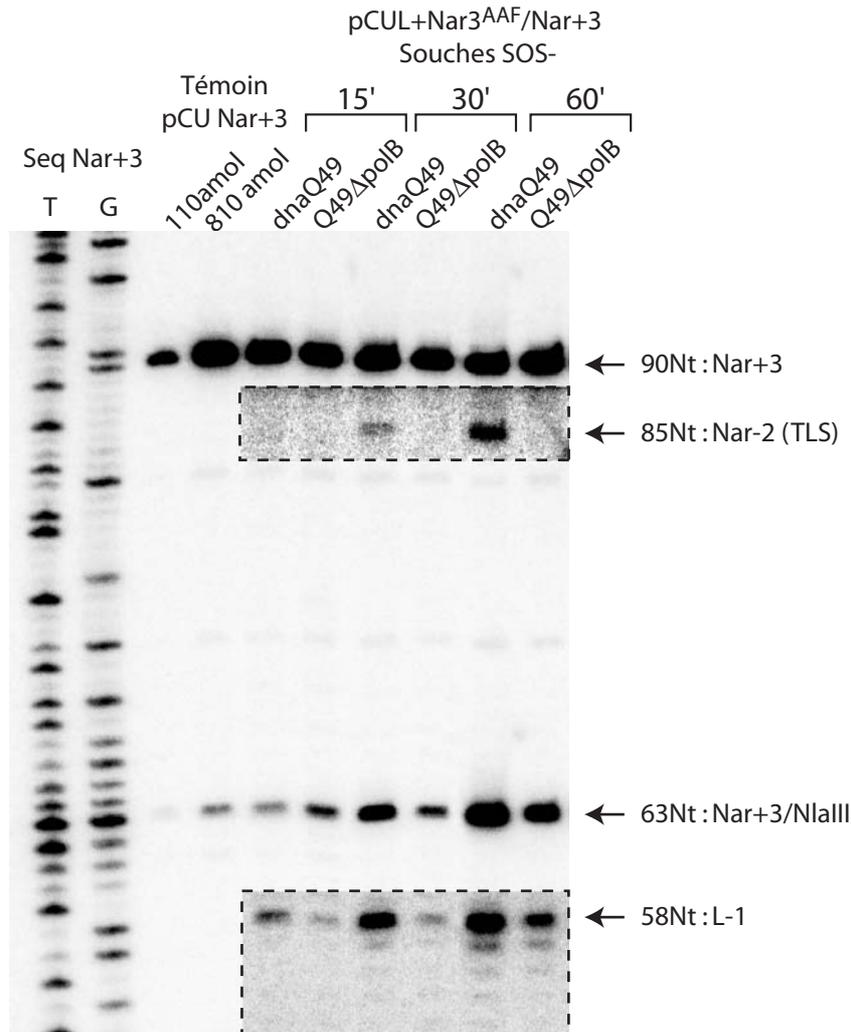


Figure 31 : Cinétique de réplication des plasmides pCUL- et L+ Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 dans les souches *dnaQ49* et *dnaQ49ΔpolB*

Dans la souche *dnaQ49*, on observe une forte intensité au niveau des intermédiaires bloqués en L-1. L'activité exonucléase bien que toujours présente (L-2 → L-5) est beaucoup plus faible que celle observée dans une souche sauvage (Figure 30).

La TLS-2 est également très importante dans cette souche (~30%) et toujours dépendante de PolII. Ainsi, malgré que l'inactivation de l'activité proofreading ne soit que

partielle dans cette souche *dnaQ49*, le niveau basal de PolIII (nous sommes en conditions SOS-) est suffisant pour "gagner" la compétition contre l'activité exonucléase réduite pour la prise en charge du L0.

Ceci confirme l'hypothèse émise précédemment (paragraphe précédent et Fuchs and Napolitano, 1998). L'augmentation de mutagenèse -2 en conditions SOS+ pourrait être en partie due à une inhibition de l'activité de proofreading de PolIII, permettant à PolIII de gagner la compétition et de réaliser l'élongation glissée du L0 conduisant à la mutagenèse -2.

J'ai donc essayé de visualiser cette hypothétique inhibition de proofreading induite par l'activation du système SOS.

*Remarque : Il est difficile dans cette expérience de comparer les intermédiaires bloqués entre les deux souches utilisées (dnaQ49 et dnaQ49ΔpolB) puisque pour un temps donné, l'intensité de réplication du brin non endommagé (63Nt) est plus faible pour le double mutant (dnaQ49ΔpolB) que pour la souche dnaQ49. La capacité de réplication du lot de cellules compétentes dnaQ49 est supérieure à celle du lot dnaQ49ΔpolB ce qui est confirmé par ailleurs par un taux de compétence différent pour ces deux souches. De ce fait, l'intensité de blocage sera elle aussi différente. Cette divergence peut s'expliquer par le fait que les deux lots de cellules compétentes n'ont pas été préparés en même temps, ce qui peut expliquer la différence de compétence d'un lot à l'autre. On peut néanmoins comparer le niveau de ces intermédiaires bloqués en normalisant leurs intensités au niveau de réplication des cellules qui est estimé par la bande de 63Nt représentant la réplication du brin non-endommagé.*

### **3.3. Inhibition du proofreading de Pol III au cours de la réponse SOS ?**

#### **•Estimation de l'activité proofreading**

Nous avons décidé d'estimer l'activité de la fonction proofreading dans une souche donnée au cours de la réponse SOS en mesurant l'intensité de la bande L-1 (et L0 le cas échéant), et en normalisant l'intensité de cette bande par rapport à l'activité de réplication de la souche. Nous avons vu que l'activité proofreading entraînait une dégradation des intermédiaires bloqués allant au-delà de L-5. Ainsi, on peut considérer que la bande L-1 représente les intermédiaires bloqués qui n'ont pas été dégradés par la fonction exonucléase de PolIII : en d'autres termes, l'intensité de cette bande serait "inversement proportionnelle" à l'activité de proofreading.

Nous venons de voir qu'en inhibant soit totalement (*mutD5*) soit partiellement (*dnaQ49*) l'activité proofreading, le niveau basal de PolIII reste suffisant pour produire un fort taux de TLS-2. Ceci qui nous a conduit à analyser l'efficacité de la fonction proofreading au cours de l'induction du système SOS.

Afin de conduire cette analyse, j'ai étudié les intermédiaires de réplication bloqués (après 20 minutes) au niveau du site Nar3<sup>AAF</sup> ainsi que leur dégradation dans une souche sauvage induite ou non aux UV (50 et 90 J.m<sup>-2</sup>). Cette même expérience a été réalisée en parallèle dans une souche délétée pour les deux polymérase translésionnelles impliquées ici (PolIII :  $\Delta polB$  et PolV :  $\Delta umuDC$ ) afin d'éviter une éventuelle prise en charge de L-1 par PolV ou de L0 par PolIII ou PolV. Ces résultats sont présentés Figure 32. Dans cette expérience, les produits de TLS ne sont pas visibles pour la souche sauvage car l'analyse a été réalisée à un temps court (20min).

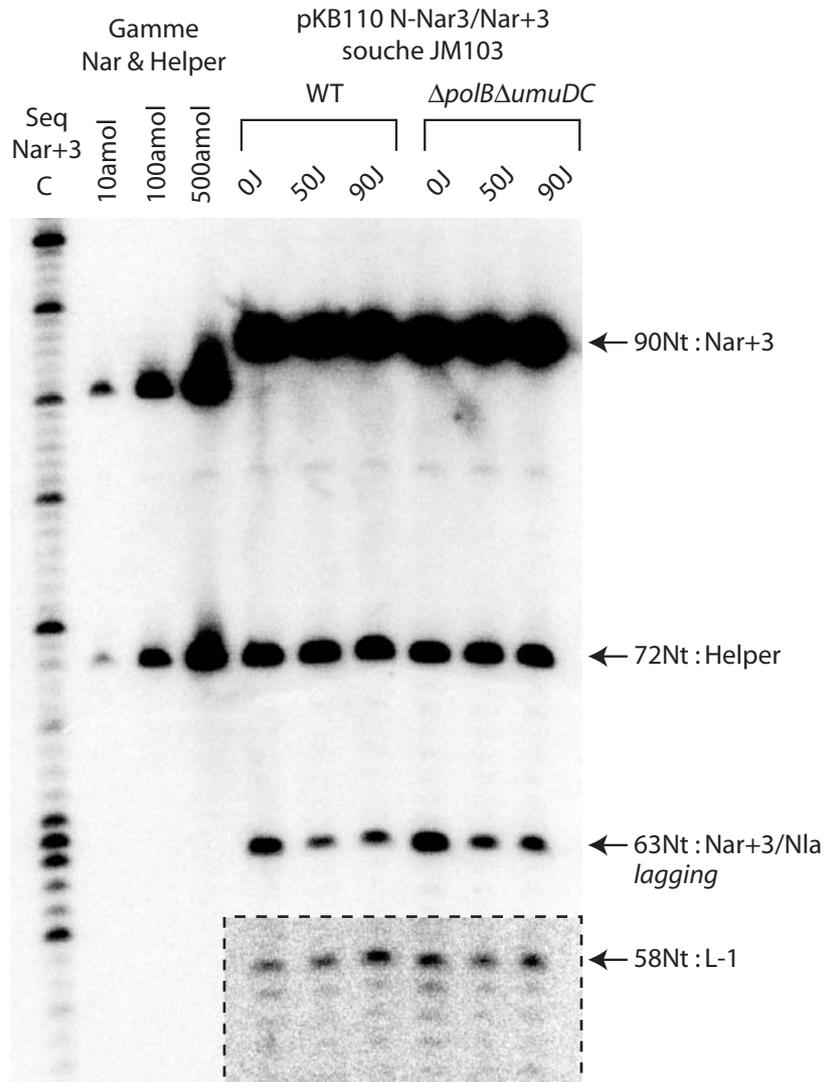


Figure 32 : Visualisation de l'effet de l'induction SOS sur l'activité proofreading : le système SOS est induit par irradiation aux UV (50 ou 90 J.m<sup>-2</sup>). L'inhibition du proofreading est estimée par le niveau d'intermédiaires de réplication bloqués en L-1 non dégradés.

Au cours de cette expérience, les cellules ont été irradiées par de fortes doses UV, ce qui a conduit à un taux de survie relativement faible : de l'ordre de 2-3% pour la dose de 50J et 0,1-0,3% pour la dose de 90J. De ce fait, l'activité de réplication de ces lots de cellules a été fortement affectée comme le montre l'intensité de réplication du brin non endommagé (bande de 63Nt) si l'on compare la souche non-irradiée aux deux souches irradiées.

Malgré ceci, on peut quantifier le niveau de blocage (Figure 33) en normalisant l'intensité de la bande L-1 par rapport à l'activité de réplication des cellules estimée grâce à la bande de 63Nt. On observe alors que le blocage est bien supérieur (d'un facteur 3 à 5) pour les cellules induites que pour les cellules non-induites.

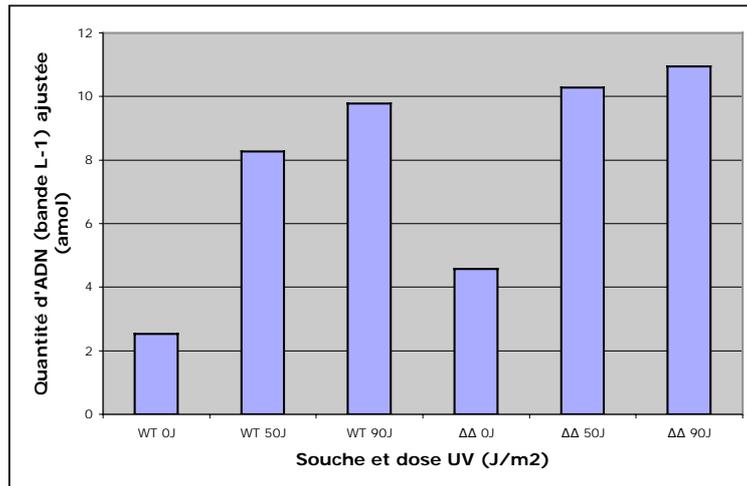


Figure 33 : Quantification des intermédiaires de réplication L-1 en fonction de l'induction du système SOS (exprimée en dose d'UV). La quantité d'ADN est normalisée par rapport au niveau de réplication du brin non endommagé (63Nt). WT=souche sauvage. ΔΔ=double mutant ΔpolBΔumuDC.

Pour un même niveau de réplication, l'intensité des bandes L-1 est supérieure quand le système SOS est induit : les intermédiaires bloqués sont moins dégradés dans ces conditions ce qui tend à confirmer notre hypothèse : l'activité proofreading serait partiellement inhibée lorsque le système SOS est induit.

La même expérience a été réalisée dans une autre souche (JM103*uvrAmutS*) induite ou non aux UV (5J.m<sup>-2</sup> ; 10% de survie). Dans cette expérience (présentée Figure 34), tous les points ont été dupliqués (préparation de deux lots de cellules compétentes).

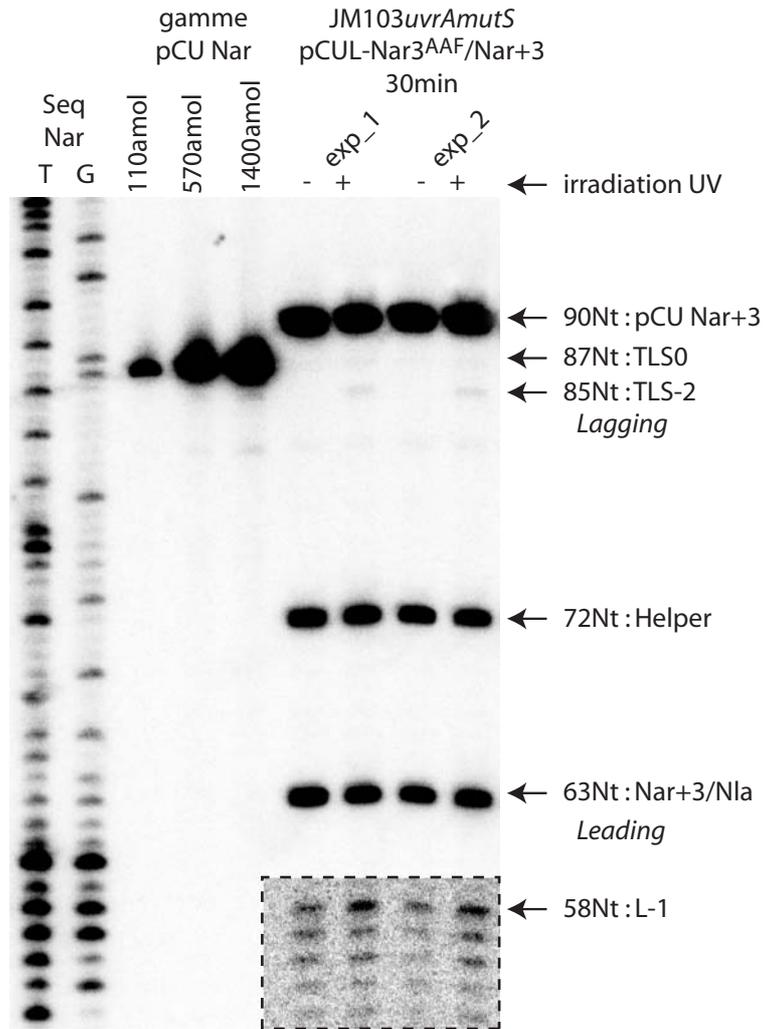


Figure 34 : Visualisation de l'inhibition du proofreading par l'induction SOS. Le plasmide pCUL-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 est transformé dans des cellules JM103uvrAmutS (2 expériences indépendantes exp\_1 et exp\_2) induites (+) ou non (-) aux UV (5J.m<sup>-2</sup> ; 10% de survie). L'ADN est extrait après 30 minutes.

Dans cette expérience, l'irradiation à 5J.m<sup>-2</sup> conduit à une survie cellulaire d'environ 10%. De ce fait, les deux lots de cellules SOS- et SOS+ présentent un niveau de réplication comparable, la réplication du brin non endommagé (63Nt) étant similaire. On peut donc visuellement comparer directement l'intensité des bandes de blocage (58Nt et inférieures) entre elles (Figure 35).

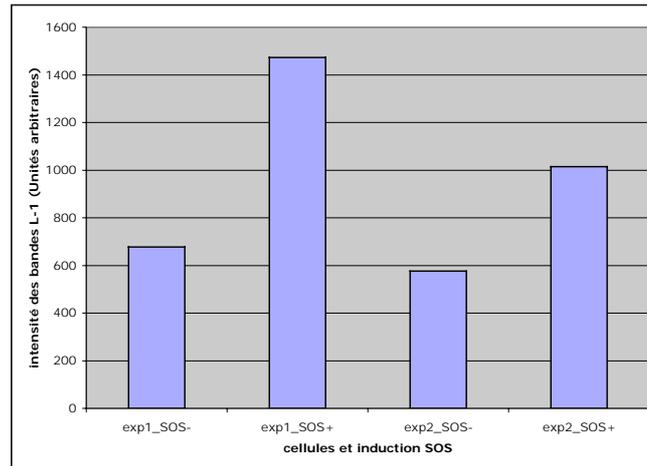


Figure 35 : Quantification des bandes L-1. L'intensité de ces bandes est inversement proportionnelle à l'activité proofreading

Après quantification du gel, on observe à nouveau dans ces deux expériences indépendantes une augmentation d'un facteur 2 à 3 du niveau des intermédiaires bloqués (L-1) dans les cellules induites aux UV.

Cette observation confirme l'hypothèse émise plus haut : l'activité exonucléasique de proofreading est inhibée lorsque le système SOS est induit.

## **IV. Structure et dynamique de la fourche de réplication**

### **1. Jusqu'où l'hélicase DnaB peut-elle progresser lorsque la synthèse est bloquée sur l'un des brins ?**

La réplication normale des deux brins d'un ADN non-endommagé se fait de manière coordonnée. En effet, nous avons observé que la cinétique de réplication des brins leading et lagging d'un plasmide non-endommagé est identique (Figure 1 de l'article et Figure 23), ce qui est compatible avec un couplage de la synthèse des deux brins.

Au contraire, les plasmides monomodifiés utilisés jusqu'ici présentent un découplage total de la synthèse des brins leading et lagging. La distance séparant la lésion de la fin du plasmide dans ces constructions est d'environ 1kb (plasmide pCU). Le découplage observé implique que l'hélicase DnaB soit capable de dérouler l'ADN sur cette distance bien que l'une des polymérases de l'holoenzyme soit bloquée.

Suite à cette première série d'expériences, nous avons souhaité voir l'effet de l'augmentation de la distance entre la lésion bloquante et le terminus de réplication sur la synthèse coordonnée des deux brins. En d'autres termes, sur quelle distance l'hélicase DnaB est-elle capable de progresser avant de s'arrêter ?

Ne disposant pas encore à l'heure actuelle d'une technologie permettant de placer une lésion unique sur le chromosome bactérien, nous avons essayé de répondre à cette question en utilisant des plasmides plus longs. Il s'agit de plasmides de la série pKB110 : ces plasmides portent la même origine de réplication unidirectionnelle (ColE1) ainsi que la résistance à l'ampicilline. Ils sont plus longs (4,6kb) et présentent une distance entre la lésion et la fin du plasmide de 3,3kb. La Figure 36 montre la localisation de la lésion par rapport à l'origine de réplication et la fin du plasmide pour les plasmide pCU et pKB (ces plasmides sont décrit plus en détail dans la partie matériels et méthodes).

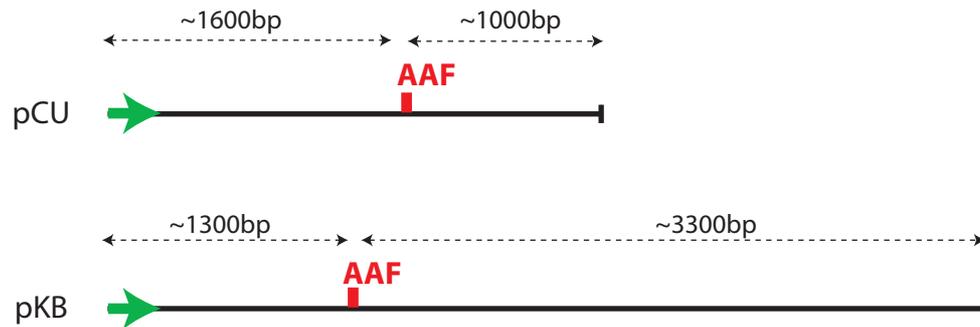


Figure 36 : Carte simplifiée des plasmides pCU et pKB indiquant la distance entre l'origine de réplication et la lésion, ainsi qu'entre la lésion et la fin du plasmide.

Les résultats obtenus avec ce type de plasmide portant une lésion sur le brin leading (pKB110\_L-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3) dans une souche JM103*uvrAmutS* induite pour le système SOS sont présentés dans la Figure 37, ainsi que leur quantification Figure 38.

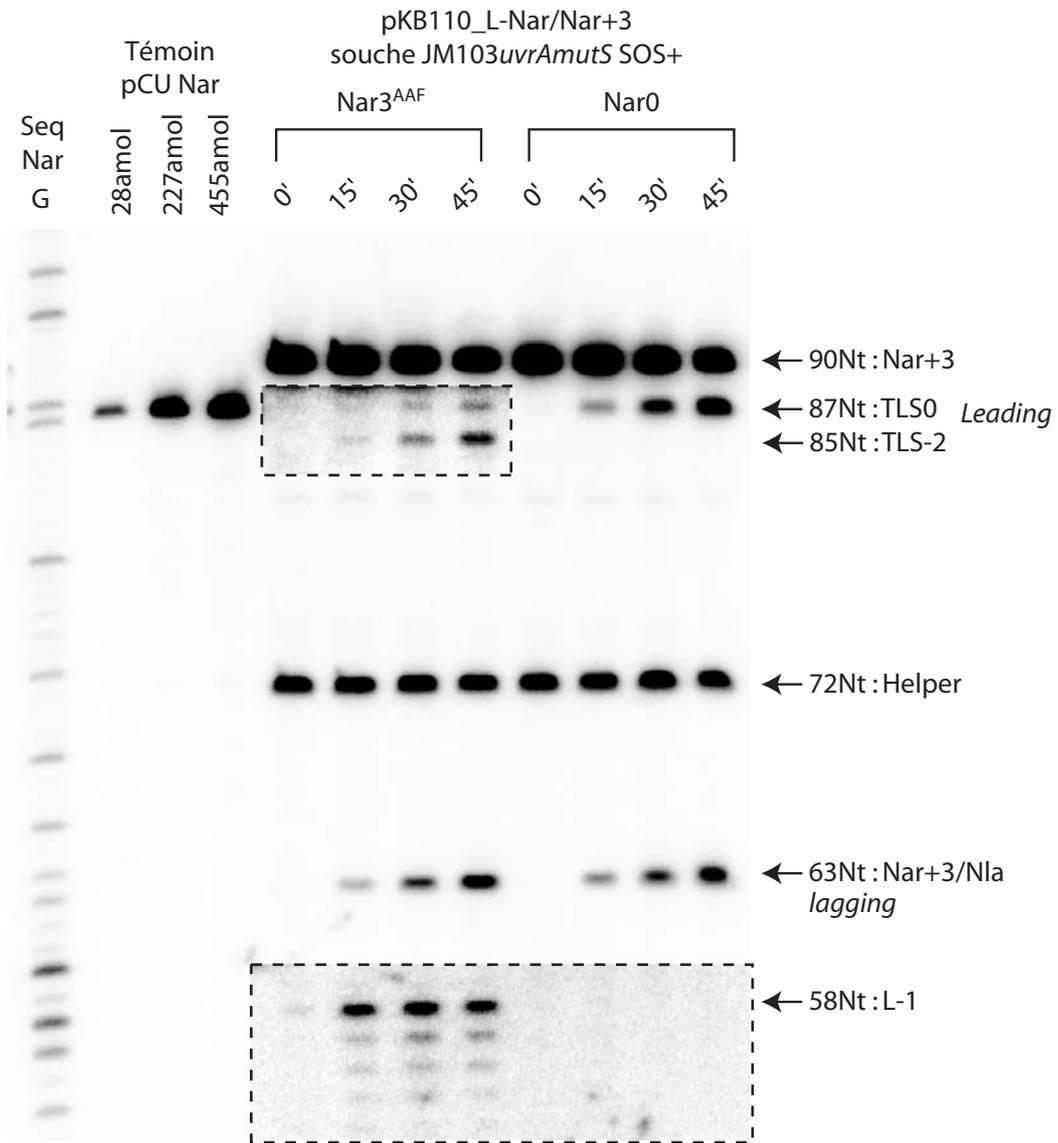


Figure 37 : Cinétique de réplication d'un plasmide non-endommagé (pKB110L-Nar0/Nar+3) et d'un plasmide portant une lésion AAF sur le brin leading (pKB110L-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3) dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS est induit (SOS+).

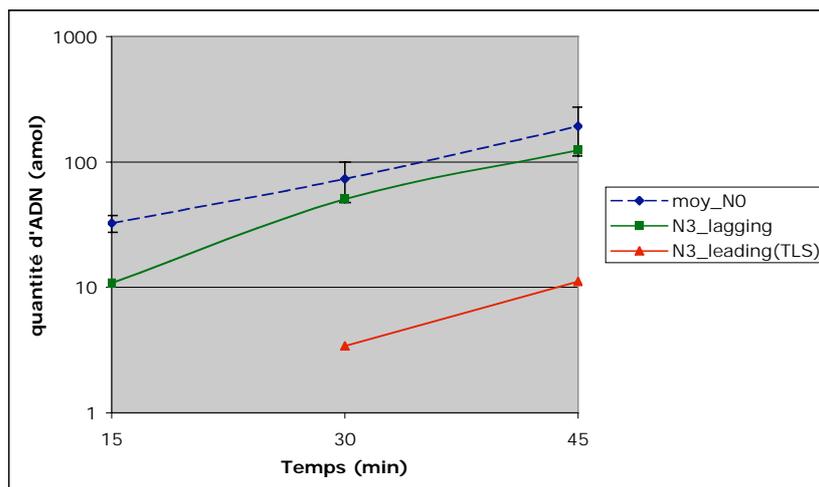


Figure 38 : Représentation graphique (après quantification du gel Figure 37) de la cinétique de réplication des plasmides pKB110 portant ou non une lésion sur le brin leading. moy\_NO : cinétique moyenne de réplication des deux brins du plasmide non-endommagé. N3\_lagging : cinétique de réplication du brin non endommagé (lagging) du plasmide pKB110Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3. TLS : cinétique de la synthèse translésionnelle.

Les points représentés sur ce graphique sont issus d'une seule expérience d'où l'absence de barres d'erreur pour le plasmide endommagé. Pour le plasmide non-endommagé, nous avons moyenné les valeurs correspondant à la synthèse des brins leading et lagging.

L'analyse de ces résultats préliminaires nous permet de tirer les conclusions suivantes qui devront être confirmées par des expériences supplémentaires.

Le temps de doublement de ces plasmides est le même que celui précédemment mesuré pour les plasmides pCU, c'est-à-dire de 11 minutes. Le décalage de la courbe représentant la TLS (réplication du brin endommagé) par rapport à la réplication des deux brins du plasmide non-endommagé est toujours d'environ 50 minutes : le temps de passage de la lésion AAF n'a pas changé. Par contre, le décalage entre les deux brins du plasmide endommagé n'est plus que d'environ 30 minutes. Nous suggérons que le "retard" d'environ 15 minutes que prend le brin lagging du plasmide endommagé par rapport aux deux brins du plasmide non-endommagé reflète un "couplage partiel" de la synthèse des deux brins du plasmide endommagé.

Ce retard de 15 minutes du brin lagging pourrait être la conséquence du blocage de la réplication du brin leading. Pourtant, le brin lagging n'est pas totalement bloqué puisqu'il apparaît plus tôt que le brin leading qui porte la lésion. Ceci peut s'expliquer de deux manières:

(i) Le découplage entre brin leading et lagging a toujours lieu, mais il s'installe après un certain délai. L'hélicase continue sa progression sur les 3,3kb restant à répliquer, mais elle est

ralentie ce qui explique le retard de 15 minutes pris par le brin non-endommagé. On peut dans ce cas parler de "retard au découplage". Cette hypothèse paraît peu probable. En effet, la vitesse de progression de l'hélicase lorsqu'elle n'est pas stimulée par la polymérase est de 35Nt/s (Kim et al., 1996a). En admettant que les 3,3kb restant à répliquer en aval de la lésion soient répliqués à cette vitesse, le retard pris par le brin lagging sera de l'ordre de 90s. Or, nous observons ici un retard de l'ordre de 15 minutes.

(ii) Dans l'autre hypothèse, on peut imaginer que l'hélicase est ralentie par le blocage de la polymérase leading, et que dans certains cas elle s'arrête complètement entraînant l'arrêt de la réplication du brin lagging et par conséquent un blocage de la fourche. Dans d'autres cas, sa progression sera suffisante pour atteindre la fin du plasmide, et le produit de réplication obtenu pourra être amplifié. On parlera dans ce cas de "**découplage partiel**" par opposition au découplage total observé précédemment avec des plasmides plus courts (série pCU). On peut également parler de "**couplage partiel**" par opposition au couplage total observé avec le plasmides ne portant pas de lésion.

Cette dernière hypothèse faisant intervenir la notion de "découplage partiel" ou de "couplage partiel" (nous utiliserons indifféremment les deux appellations) paraît plus plausible.

Nous verrons au cours de la discussion que l'analyse de données obtenues par une approche génétique viendra conforter ce modèle de couplage partiel.

## **2. Mise en évidence d'événements de type "contournement de dommages"**

Les évènements de contournement de dommage ou DA (*Damage Avoidance*) s'apparentent à des évènements de recombinaison car il y a transfert de matériel génétique d'un brin à l'autre. La mise en évidence d'un éventuel échange d'information génétique entre brins requiert la présence de marqueurs de brin au voisinage de la lésion.

Les plasmides utilisés jusqu'à présent ne permettaient pas de mettre en évidence ce type de mécanismes. En effet, le contournement du brin endommagé au niveau de la lésion entraîne "l'incorporation" de la boucle de 3 nucléotides qui se trouve en face de la lésion. De

ce fait, le produit de DA devient digestible par NlaIII après répliation et co-migre avec le produit de répliation du brin non endommagé.

Nous avons donc décidé de construire une nouvelle série de plasmides semblables aux précédents de la série pKB110, mais possédant un marqueur supplémentaire sous forme d'une boucle de 2 nucléotides en 5' de la boucle de 3 nucléotides sur le brin marqueur. Il s'agit des plasmides pKB110 L- et L+ Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3+2 portant respectivement la lésion AAF sur le brin leading et lagging. Ces plasmides ainsi que les produits de TLS et de DA qui en sont théoriquement issus sont représentés Figure 39.

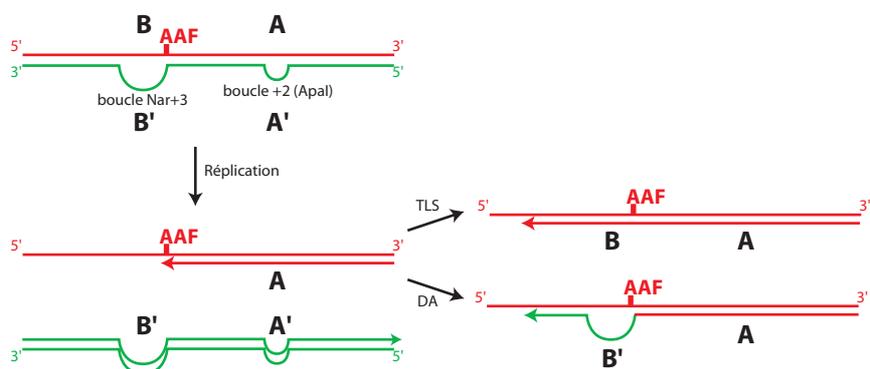


Figure 39 : Position des boucles des plasmides pKB110Nar/Nar+3+2. A, A', B et B' représentent les marqueurs qui seront échangés au cours des mécanismes de DA. Le brin bloqué au niveau de la lésion a deux issues : la synthèse translésionnelle (TLS), ou le contournement de la lésion (DA) prenant ainsi le marqueur B' (boucle +3). Ce dernier est différenciable du produit de répliation du brin non endommagé qui possède en plus la boucle +2 (marqueur A').

Ainsi, alors qu'un produit de TLS portera les marqueurs A et B, un produit de DA présentera les marqueurs A et B'. Les produits de répliation du brin non-endommagé présenteront les marqueurs A' et B'.

Ces constructions portant une lésion AAF sur le brin leading (pKB110 L-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3+2) ou ne portant pas de lésion (pKB110 L- Nar0/Nar+3+2) ont été introduites dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS a été préalablement induit aux UV. La cinétique de répliation de ces plasmides a été suivie par la technique MARI : le résultat est représenté Figure 40. Le produit de contournement de dommages attendu (combinaison des marqueurs A et B') apparaît sur le gel au niveau de la bande de 63Nt.

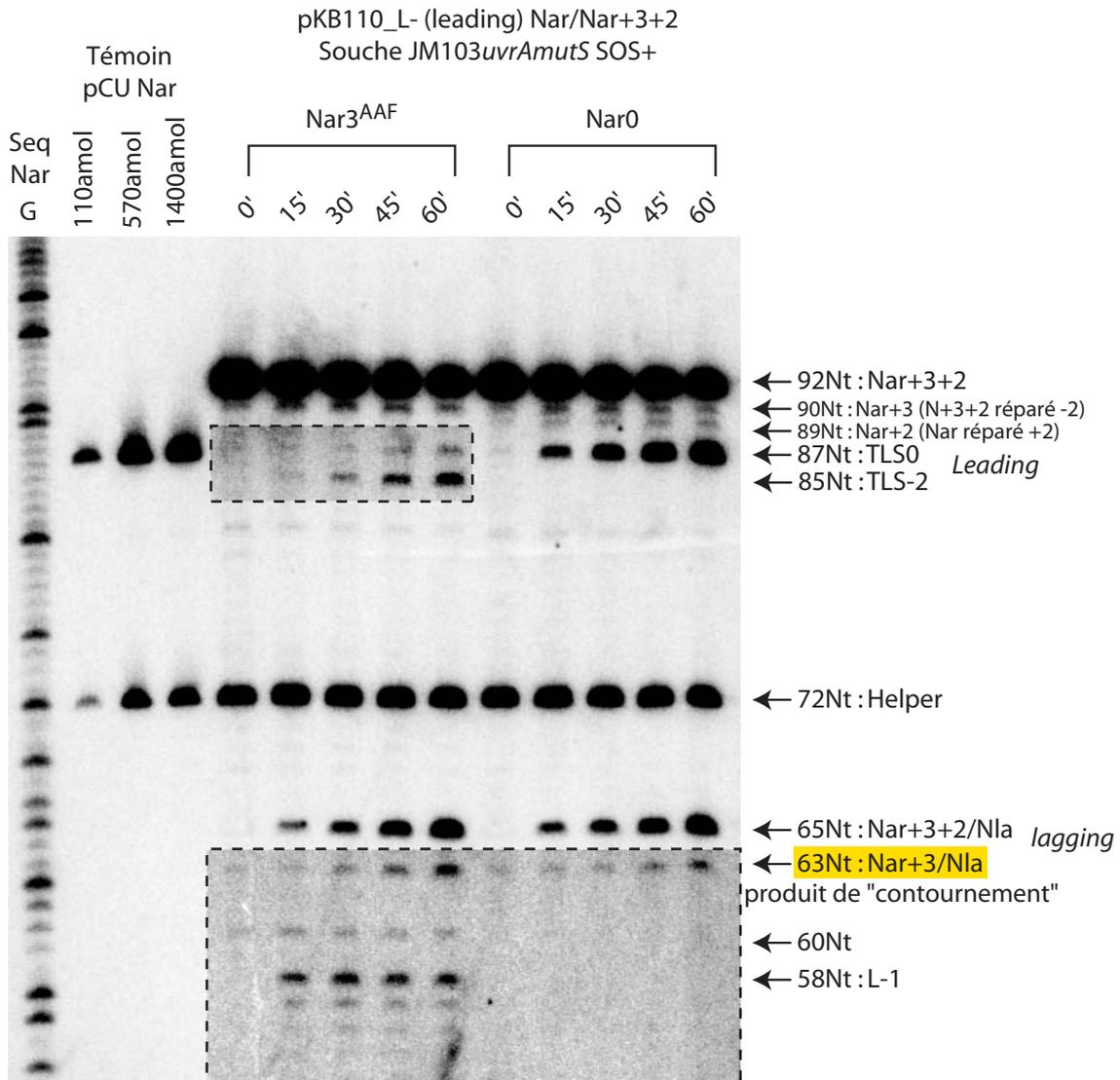


Figure 40 : Analyse de la TLS et du contournement de dommages : cinétique de réplication d'un plasmide non endommagé (Nar0) ou portant une lésion AAF (Nar3<sup>AAF</sup>) dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS est induit

On observe sur ce gel la bande attendue à 63Nt qui correspond à la combinaison des marqueurs A et B' sur un même brin. Pourtant, il est surprenant d'observer également cette bande pour le plasmide non-endommagé. On peut expliquer l'apparition de cette bande en l'absence de lésion par des mécanismes de réparation "parasite" de type mismatch repair qui agissent sur la boucle +2, et ce malgré l'utilisation d'une souche portant un allèle *mutS* inactivé. La réparation de la boucle +2 au niveau du brin marqueur conduit à la transformation du marqueur A' en A : on aura donc sur ce brin la combinaison A-B' sans qu'il y ait eu de phénomènes de contournement de dommages. On peut supposer que cette même réparation s'est produite à un taux similaire sur le plasmide endommagé.

Cependant, l'intensité de ces bandes (63Nt) est plus importante pour le plasmide portant l'AAF que pour le plasmide non-endommagé. On peut donc supposer que la différence représente effectivement les phénomènes de contournement de dommages que nous avons souhaité mettre en évidence.

*Remarque : malgré l'utilisation d'allèles uvrA et mutS mutés, nous venons de voir que la boucle +2 du marqueur A' est réparée partiellement. D'autres événements de réparation se sont également produits et sont visibles sur le gel. La Figure 41 montre les espèces moléculaires attendues lors des différents événements de réplication, de blocage, ou de contournement de lésion dans le cas attendu où les boucles ne sont pas réparées, mais également les différentes possibilités de réparation des boucles et les fragments qui en résultent.*

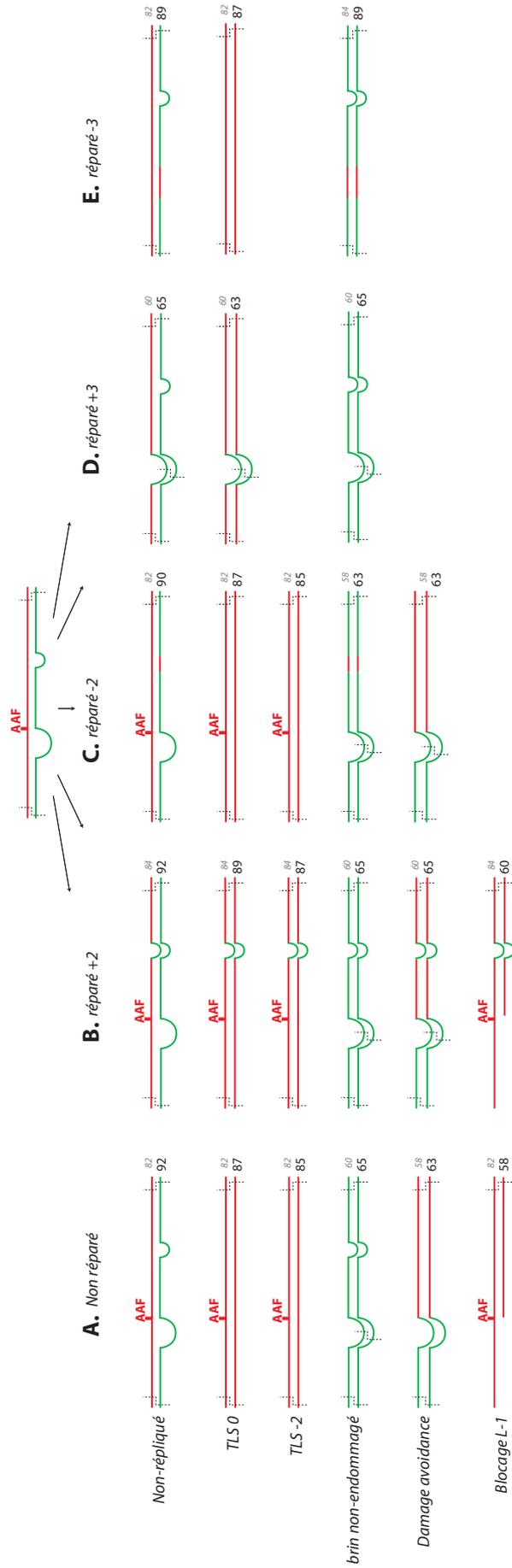


Figure 41 (page précédente) : Différentes espèces moléculaires attendues selon les événements survenus dans la cellule (TLS – blocage – Contournement du dommage) lors de la réplication du plasmide pKB110Nar/Nar+3+2 non réparé, ou après réparation de l'une ou l'autre des boucles

Les différentes bandes obtenues sur le gel (Figure 40) peuvent s'expliquer (en fonction des prédictions de la Figure 41) de la manière suivante :

-**92Nt** : cette bande de forte intensité et constante au cours du temps représente le plasmide resté associé aux cellules mais qui n'est jamais répliqué (*uptake*).

-**90Nt** : cette bande n'est pas attendue pour un plasmide non réparé. Elle est constante au cours du temps et peut s'expliquer comme étant une fraction du plasmide non répliqué (bande majeure à **92Nt**) dont la boucle de deux nucléotides a été réparée (Figure 41C.). Une grande partie de ce plasmide réparé -2 ne s'est pas répliquée et apparaît sous la forme de cette bande constante à **90Nt**. Une faible fraction va se répliquer et se retrouver de ce fait comme la bande de **63Nt** que l'on voit apparaître en fonction du temps. Cette bande de **63Nt** ne peut pas être issu de mécanismes de contournement de dommages pour le plasmide qui ne porte pas de lésion.

-**89Nt** : cette bande non plus n'est pas attendue pour un plasmide non réparé. Son intensité augmente en fonction du temps, et elle n'apparaît que pour le plasmide ne portant pas de lésion. Elle peut s'expliquer par la réplication du brin leading après qu'une faible fraction ait été "réparée" par l'incorporation de la boucle +2 présente sur le brin opposé (Figure 41B.). On ne voit pas apparaître cette bande pour le plasmide endommagé car le taux de TLS nécessaire à l'apparition de la bande est trop faible. On voit par contre le produit de blocage de ce plasmide réparé qui apparaît à **60Nt**.

Cette bande peut également être issue de la réparation de la boucle +3 (Figure 41E.). Cette réparation n'a pu se produire qu'en l'absence de lésion, car il paraît difficile de réparer une boucle en utilisant une séquence endommagée comme matrice. Ceci explique également qu'on ne voit apparaître cette bande que pour le plasmide non endommagé.

-**87Nt** : il s'agit de produit de réplication attendu du plasmide non-endommagé, ainsi que du produit de TLS0 du plasmide portant la lésion (Figure 41A.).

-**85Nt** : TLS-2 attendue pour le plasmide endommagé (Figure 41A.).

-**65Nt** : produit de réplication du brin lagging non réparé.

-**63**Nt : Nous l'avons vu, cette bande est le résultat des événements de contournement de dommages (Figure 41A.). Elle peut également être issue de la réparation de la boucle +2 (Figure 41C.).

Cependant, cette bande peut également refléter la réparation par excision de type NER et incorporation de la boucle +3 qui se serait produite sur le plasmide non endommagé, ou sur le plasmide portant la lésion AAF, réparant ainsi cette lésion (Figure 41E.). Dans ce cas, l'augmentation de la bande de **63**Nt en présence de la lésion pourrait s'expliquer par une augmentation de ces phénomènes de réparation induite par la lésion, et non plus par des mécanismes de DA... Néanmoins, ces phénomènes restent très peu probables dans nos conditions pour deux raisons : (i) le système NER est inactivé dans les souches utilisées par la mutation *uvrA6*. (ii) il a été montré que la lésion AAF dans une structure ADN hétéroduplexe était résistante à la réparation par NER (Delagoutte et al., 1996).

-**60**Nt : cette bande n'apparaît que pour le plasmide portant une lésion, et semble d'intensité constante. Elle peut s'expliquer comme nous l'avons vu précédemment par le blocage au niveau de la lésion (L-1) d'une fraction du plasmide ayant été "réparé" par incorporation de la boucle +2 (Figure 41B.).

-**58**Nt : blocage au niveau de la lésion (L-1).

La même expérience a été réalisée dans la même souche (JM103*uvrA*mutS) non induite pour le système SOS, en utilisant des plasmides non-endommagés, portant une lésion AAF sur le brin leading (pKB110 L-) ou sur le brin lagging (pKB110 L+). Les résultats sont présentés Figure 42.

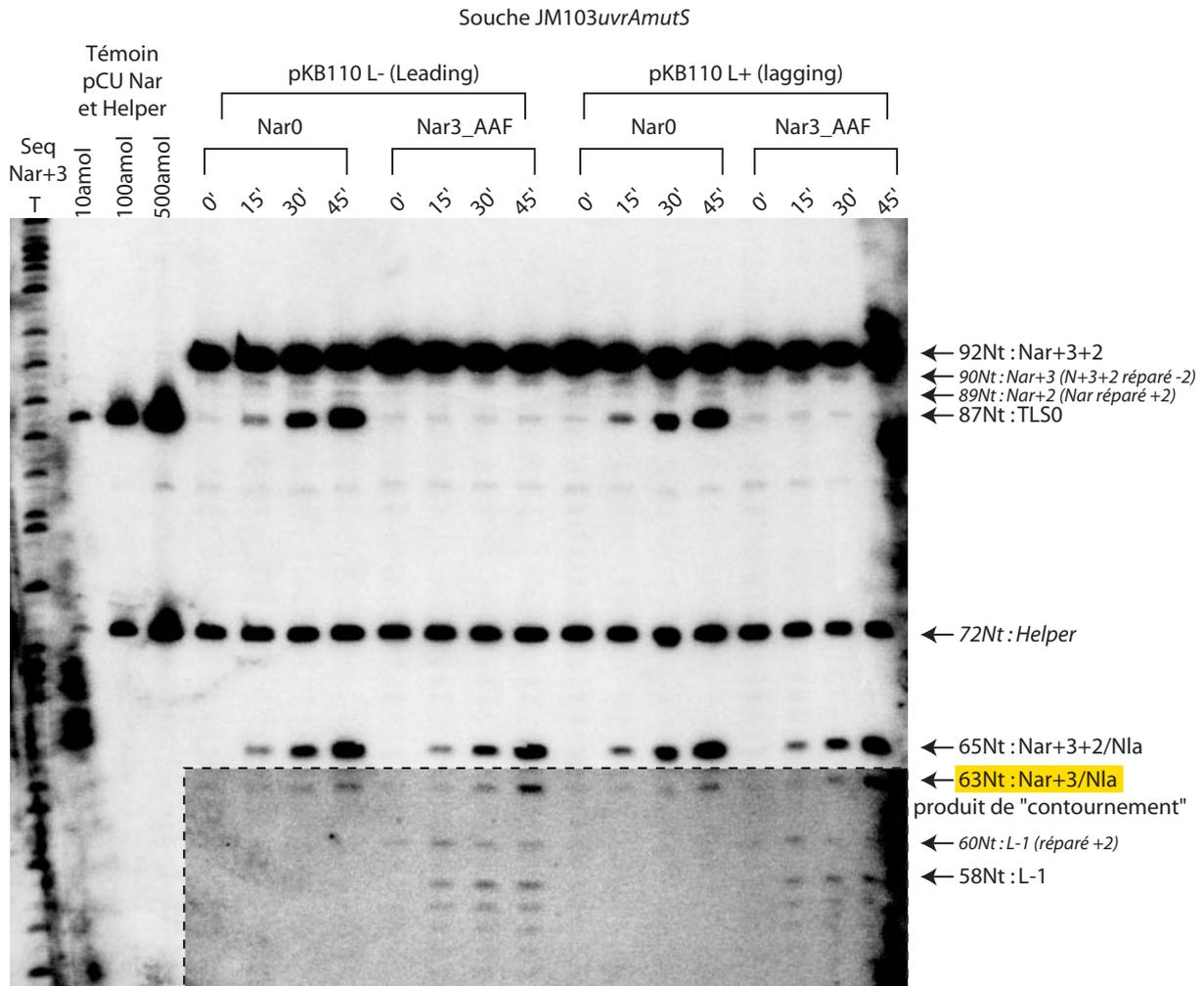


Figure 42 : Analyse de la TLS et du contournement de dommages : cinétique de réplication d'un plasmide non endommagé (NarO) ou portant une lésion AAF (Nar3<sup>AAF</sup>) sur le brin leading ou lagging, dans une souche JM103uvrAmutS dont le système SOS n'est pas induit

Dans ces conditions où le système SOS n'est pas activé, le niveau de réparation des boucles est identique à celui observé en condition SOS+, quelle que soit l'orientation du plasmide (leading ou lagging). L'intensité de la bande de 63Nt (réparation -2 et/ou DA) est toujours supérieure en présence de la lésion, ce qui laisse supposer que des phénomènes de contournement de dommages se sont effectivement produits. Il apparaît en plus ici une bande de 87Nt d'intensité constante au cours du temps dont l'origine peut être la co-réparation des deux boucles du brin marqueur.

En conclusion de ces deux expériences, nous avons pu observer que malgré l'utilisation de souche déficientes pour le NER (Nucleotide Excision Repair : gène *uvrA*) et pour le MMR (Mismatch repair : gène *mutS*), de la réparation partielle des boucles subsiste et vient

perturber l'analyse des événements de contournement de dommages pour laquelle étaient conçus ces plasmides. Est ce que cette réparation résiduelle est due au fait que les allèles utilisés (*uvrA6* et *mutS srl::Tn10*) autorisent une activité résiduelle de ces gènes, ou bien existe-t-il une autre fonction de réparation dans la cellule ?

L'utilisation de nouvelles souches où l'activité de réparation de boucle et d'excision de nucléotides seront totalement inactivées sera nécessaire pour clarifier cette étude. On peut malgré tout supposer que des mécanismes de contournement de dommages se sont produits dans les plasmides portant une lésion AAF. Nous discuterons l'existence de ces événements sur la base d'expériences de génétique au cours de la discussion.



## **Partie III.- Discussion / Conclusions**

### **I. Analyse de la TLS *in vivo* par l'approche clonale : complémentarité avec l'approche moléculaire**

#### **1. Principe de l'analyse clonale**

Les plasmides de la série pCU (utilisés au paragraphe Partie II.- II. ) ont été mis au point et utilisés antérieurement dans des études génétiques de mutagenèse induite (Broschard et al., 1999; Koffel-Schwartz et al., 1996 ). Ils permettent l'étude de la TLS par analyse des colonies issues de la transformation par ces vecteurs. L'analyse de la TLS mutagène est faite de la façon suivante : le site de restriction NarI qui porte la lésion AAF, est localisé au début de la séquence codante du gène *lacZ'* de façon à décaler le cadre de lecture de deux nucléotides par rapport à la séquence sauvage du gène *lacZ'*, inactivant ainsi l'expression de ce gène. Les bactéries transformées par ce plasmide poussent sur ampicilline puisque le plasmide apporte la résistance à cet antibiotique, et forment des colonies "blanches" sur milieu indicateur puisque le gène *lacZ'* est hors phase.

Si au cours de la réplication du plasmide dans la cellule, une mutation par délétion de deux nucléotides se produit, le gène *lacZ'* sera exprimé et la colonie présentera une couleur bleue sur milieu indicateur X-gal.

Le rapport des colonies bleues sur le nombre total des colonies permet d'obtenir le taux de mutagenèse qui correspond à des événements de TLS mutagène.

#### **2. Découplage total de la synthèse des deux brins observé avec les plasmides "courts"**

Au cours de la partie "Résultats", nous avons observé grâce à la technique MARI la réplication d'un plasmide pCU portant une lésion AAF dans des cellules dont le système SOS était induit. Nous avons pu mettre en évidence par cette étude des événements de TLS-2 (bande de 85Nt). L'intensité de cette bande de 85Nt représente environ 3% de la bande de 63Nt qui correspond au produit de réplication du brin non-endommagé.

Appelons les plasmides issus des événements de TLS-2 "plasmides bleus", et les autres "plasmides blancs", ces deux appellations correspondant au phénotype lié à chacun de ces plasmides.

Le fait que les plasmides bleus ne représentent que 3% des plasmides blancs reflète la durée moyenne qu'il a fallu pour faire la TLS (50 minutes). Pendant ces 50 minutes, alors que le brin endommagé était bloqué, le découplage de la synthèse des deux brins a permis au brin non-endommagé de se répliquer et de s'amplifier avec un temps de doublement de 11 minutes. L'installation du déséquilibre de synthèse entre les deux brins lié au découplage est illustrée Figure 43.

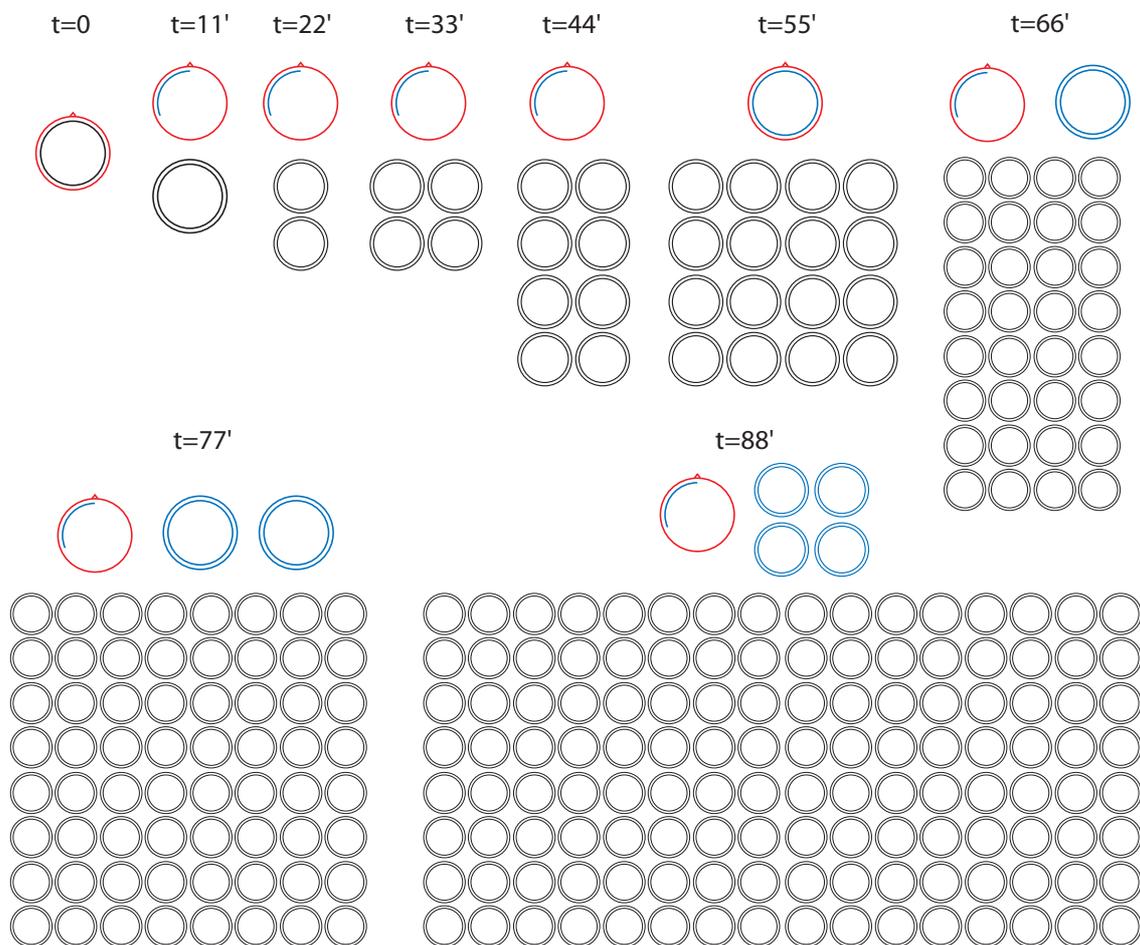


Figure 43 : Illustration du déséquilibre entre "plasmide bleu" et "plasmide blanc" au cours de la synthèse translésionnelle. Ce déséquilibre est dû aux 50 minutes qui sont nécessaires à la répllication du brin endommagé. Les plasmides bleus représentent environ 3% des plasmides blancs ("clone moyen").

Cette illustration issue des expériences MARI donne une représentation des événements moléculaires qui se sont produit sur l'ensemble des cellules transformées. Elle représente donc ce qui s'est produit au niveau de la moyenne des clones, ou au niveau "d'un clone moyen".

Cette **approche moléculaire** ne donne pas accès aux événements qui se sont produits au niveau de clones individuels. Ainsi, certains clones auront pu réaliser la TLS en un temps supérieur ou inférieur à 50 minutes, conduisant à un déséquilibre plus ou moins important entre plasmides bleus et plasmides blancs au sein d'une même cellule (Figure 44).

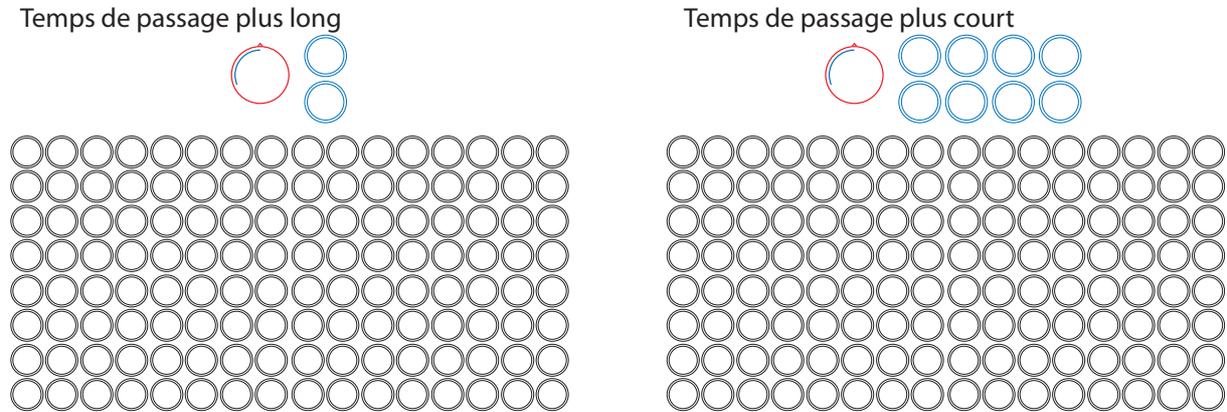


Figure 44 : Variation du déséquilibre entre plasmides bleus et plasmides blancs selon le temps nécessaire au passage de la lésion d'un clone à un autre.

L'analyse génétique permet d'appréhender les mêmes phénomènes par une **approche clonale** par opposition à l'approche moléculaire (analyse de moyenne) que permet la technique MARI.

L'analyse clonale (analyse de distribution) est faite selon le schéma suivant (Figure 45) :

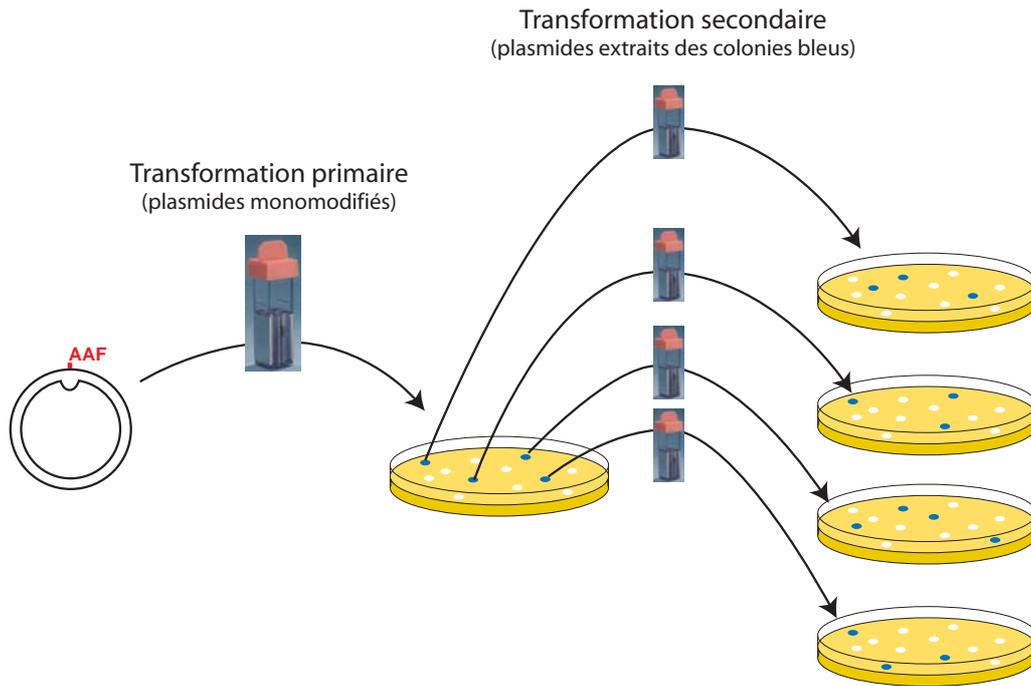


Figure 45 : Analyse génétique de la TLS : à l'issue d'une transformation primaire, les plasmides monomodifiés, s'ils sont répliqués de manière mutagène vont donner lieu à des colonies bleues. L'extraction des plasmides de ces colonies bleues et leur re-transformation (transformation secondaire) permet de déterminer le nombre de plasmides bleus et de plasmides blancs présents au départ dans une colonie "primaire" bleue : la distribution des colonies secondaires blanches et bleues reflète le temps nécessaire à la TLS.

Les plasmides monomodifiés sont électroporés dans des cellules dont le système SOS est induit. Cette transformation primaire nous permet après étalement sur milieu indicateur et comptage des clones bleus, de déterminer le nombre de cellules ayant établi un plasmide de manière mutagène. Ce taux de mutagenèse ainsi observé est d'environ 20% dans nos conditions.

Il est important de noter ici que le phénotype bleu conféré par les plasmides ayant fait de la TLS-2 est dominant. En effet, quelque soit le nombre de plasmides n'ayant pas subi d'événements mutagènes ("plasmides blancs") contenus dans la cellule, il suffit d'un seul plasmide ayant fait de la TLS-2 ("plasmide bleu") pour que la cellule présente le phénotype bleu.

Il semblait donc intéressant de déterminer le rapport entre plasmides bleus et plasmides blancs au sein des colonies bleues issus de la transformation primaire. Cette analyse a été réalisée sur quelques centaines de colonies bleues afin d'établir un histogramme de distribution (N. Koffel). L'historgramme obtenu est représenté Figure 46.

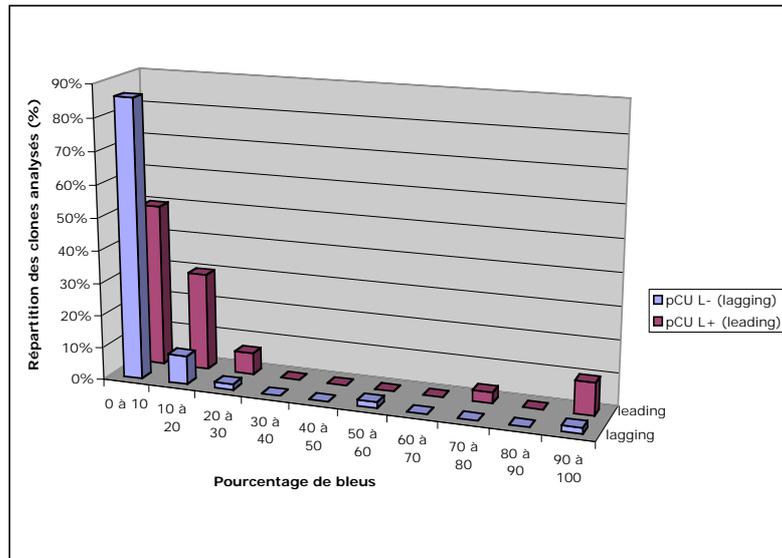


Figure 46 : Répartition des plasmides "blancs" et "bleus" au sein des clones bleus issus de la transformation primaire pour les plasmide pCU\_L+Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 (lésion sur le leading) et pCU\_L-Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 (lésion sur le lagging) – environ 100 colonies analysées. (N. Koffel)

Il ressort de cette analyse que dans la majorité des cas, les clones qui ont établi un plasmide de manière mutagène (clones bleus) contiennent 10% de plasmides bleus et 90% de plasmides blancs. Ce déséquilibre entre le nombre de plasmides bleus et le nombre de plasmides blancs au sein d'un même clone traduit le délai qu'il a fallu pour faire la TLS dans ce clone (voir Figure 43).

Ainsi, cette étude génétique a montré que 20% des clones établissaient un plasmide de manière mutagène, et que ces clones bleus comportaient en moyenne 10% de plasmides bleus ce qui nous permet de retrouver ( $20\% \times 10\% = 2\%$ ) approximativement les 3% de plasmides bleus obtenus par l'approche moléculaire (MARI).

L'approche clonale (étude génétique) et l'approche moléculaire (technique MARI) sont globalement en accord tout en apportant des informations complémentaires.

### 3. Couplage partiel de la synthèse des deux brins observé avec des plasmides "longs"

La réplication des deux brins d'un plasmide ne portant pas de lésion se fait de manière couplée. L'analyse moléculaire de la réplication d'un plasmide non-endommagé a montré une cinétique identique pour la synthèse des deux brins traduisant ce couplage (voir paragraphe Partie II.- II. ). Une analyse clonale a été réalisée en utilisant un plasmide hétéroduplexe

présentant sur un des brins le gène *lacZ* fonctionnel (phénotype bleu), et sur l'autre brin un gène *lacZ* non fonctionnel (phénotype blanc). L'histogramme de répartition issu de cette analyse (réalisée dans une souche déficiente pour la réparation de mésappariements) a montré que toutes les colonies contenaient environ 50% de plasmides bleus et 50% de plasmides blancs (R. Janel) : le couplage entre la synthèse des deux brins est total dans un plasmide non-endommagé.

L'utilisation de plasmides pCU (plasmides "courts") portant une lésion a montré un découplage total de la synthèse des deux brins.

L'utilisation des plasmides de la série pKB110 où la distance entre la lésion et la fin du plasmide est allongée par rapport au plasmides pCU nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un couplage partiel de la synthèse des deux brins lorsque le brin leading rencontre une lésion. Le modèle proposé stipule que l'hélicase est ralentie par le blocage de la polymérase "leading". Dans certains cas elle s'arrête complètement entraînant un blocage de la réplication du brin lagging et par conséquent un blocage de la fourche. Dans d'autres cas, sa progression sera suffisante pour atteindre la fin du plasmide, et le produit de réplication obtenu pourra être amplifié.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'analyse clonale de la TLS a été réalisée avec ces plasmides. À l'issue de la transformation primaire, le taux de mutagenèse  $-2$  est identique à celui obtenu avec les plasmides pCU, c'est-à-dire d'environ 20%. Par contre, l'analyse de la répartition des plasmides bleus au sein des colonies bleues primaires est très différente de celle obtenue pour les plasmides pCU (N. Koffel). La Figure 47 montre l'histogramme de répartition pour les plasmides pCU et pKB portant tous deux la lésion sur le brin leading.

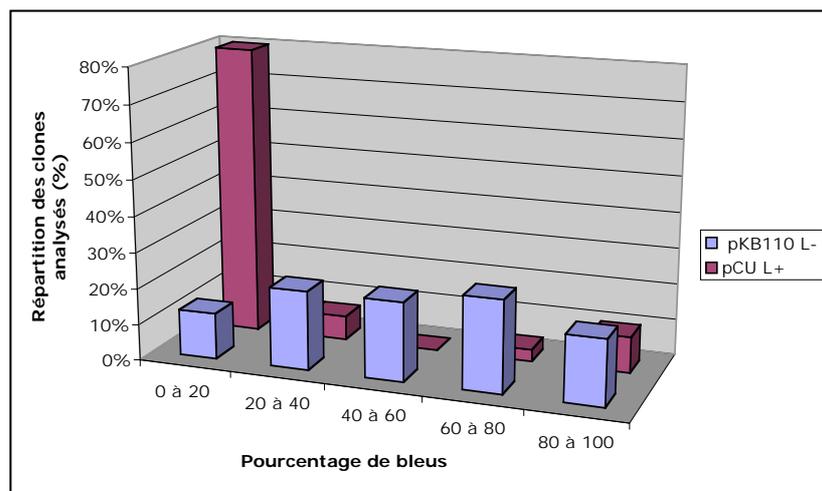


Figure 47 : Répartition des plasmides "blancs" et "bleus" au sein des clones bleus issus de la transformation primaire pour les plasmide pCU<sub>L+Nar3<sup>AAF</sup></sub>/Nar+3 (lésion sur le leading) et pKB110<sub>L-Nar3<sup>AAF</sup></sub>/Nar+3 (lésion sur le leading) – environ 100 colonies analysées. (N. Koffel)

Alors que pour les plasmides courts (pCU), la majorité des clones bleus ne contenait en moyenne que 10% de plasmides bleus, la répartition des plasmides bleus est beaucoup plus large pour des plasmides plus longs (pKB110). Nous avons vu que le déséquilibre entre plasmides bleus et plasmides blanc au sein d'un même clone reflétait le temps nécessaire à la réplication du brin endommagé alors que le brin non-endommagé se répliquait normalement. Le fait que ce déséquilibre soit moins important ici suggère que la réplication des deux brins du plasmide s'est faite dans un temps plus rapproché.

La distribution dispersée des clones analysés est en accord avec l'hypothèse de "couplage partiel" émise plus haut : dans certains clones, le découplage s'est produit de manière précoce entraînant un fort déséquilibre en faveur des plasmides blancs. Dans d'autres clones, la fourche s'est arrêtée entraînant une répartition plus équilibrée des plasmides bleus et blancs au sein de la colonie. Il est par contre assez surprenant d'observer dans certaines colonies un déséquilibre en faveur des plasmides bleus. On peut imaginer que le redémarrage de la fourche bloquée dans ces clones s'est fait avec un retard du brin lagging et par conséquent un déficit en plasmides blancs.

En conclusion, on observe un découplage de la synthèse des deux brins dans ces plasmides plus longs, mais ce découplage n'est plus que partiel. Pour certaines molécules, un blocage au niveau de la réplication du brin leading semble gêner la progression de l'hélicase jusqu'à la stopper. Pour d'autres molécules, la progression de l'hélicase reste possible sur les 3,3kb restant à répliquer dans ces plasmides : le découplage est donc partiel.

Nous discuterons plus loin (paragraphe II. ) l'incidence de ce découplage partiel sur la structure de la fourche de réplication.

#### **4. Mise en évidence d'événements de type "contournement de dommages" par l'approche génétique**

Au paragraphe 'Partie II.- IV. 2. ', nous avons utilisé des plasmides portant quatre marqueurs de brins (A-B-A'-B') afin de mettre en évidence des événements de types "contournement de dommages". Bien que des phénomènes de réparation soient venus

perturber cette analyse, nous pouvons soupçonner l'existence de ce type d'événements sur la base de l'apparition d'une bande spécifique de 63Nt.

Ces mêmes plasmides ont été utilisés dans des expériences de type "approche clonale" (N. Koffel) : la distribution des marqueurs de brins (A, A', B et B') a été déterminée par l'hybridation de sondes oligonucléotidiques spécifiques de ces marqueurs sur les colonies primaires issues de la transformation des plasmides monomodifiés. La présence des marqueurs A, A' et B' au sein d'une même colonie représente la signature d'événements de contournements de dommages. L'analyse par transformation secondaire des plasmides contenus dans ces colonies a permis de montrer la présence de deux plasmide distincts portant les couples de marqueurs A-B' et A'-B' respectivement. Le plasmide portant le couple de marqueur A-B' est issu d'événements de contournement de dommages, alors que le plasmide portant le couple A'-B' est issu de la répllication du brin non-endommagé. Ceci confirme qu'un échange de matériel génétique a eu lieu entre brin endommagé et brin non-endommagé. Ces expériences ont permis d'estimer que ces événements de contournement de dommages s'étaient produits dans environ 10% des colonies dans les conditions où le système SOS n'est pas induit.

L'approche clonale a permis de détecter les événements de contournement de dommages de manière non ambiguë malgré les événements parasites de réparation partielle des boucles. La résolution des problèmes liés à la réparation partielle des boucles permettra de poursuivre cette étude par la technique MARI, ce qui permettra d'étudier la cinétique de cette voie de tolérance des lésions. Par ailleurs, il sera intéressant d'étudier la génétique de ces mécanismes afin de préciser les gènes impliqués dans cette voie.

## **II. Effets d'une lésion bloquante sur la "géométrie" de la fourche de réplication**

### **1. Effet d'un blocage sur le brin leading**

L'utilisation des plasmides de la série pCU (plasmides "courts") portant une lésion sur le brin leading nous a conduit à la conclusion suivante : alors que la polymérase leading reste bloquée au niveau de la lésion, la polymérase lagging poursuit la réplication, impliquant la progression de l'hélicase DnaB qui sépare les deux brins de l'ADN non encore répliqué. La polymérase leading étant toujours immobilisée au niveau de la lésion, il va se former une région d'ADN simple brin au niveau du brin leading déroulé par l'hélicase. La structure de la fourche de réplication peut donc être représentée comme dans la Figure 48.

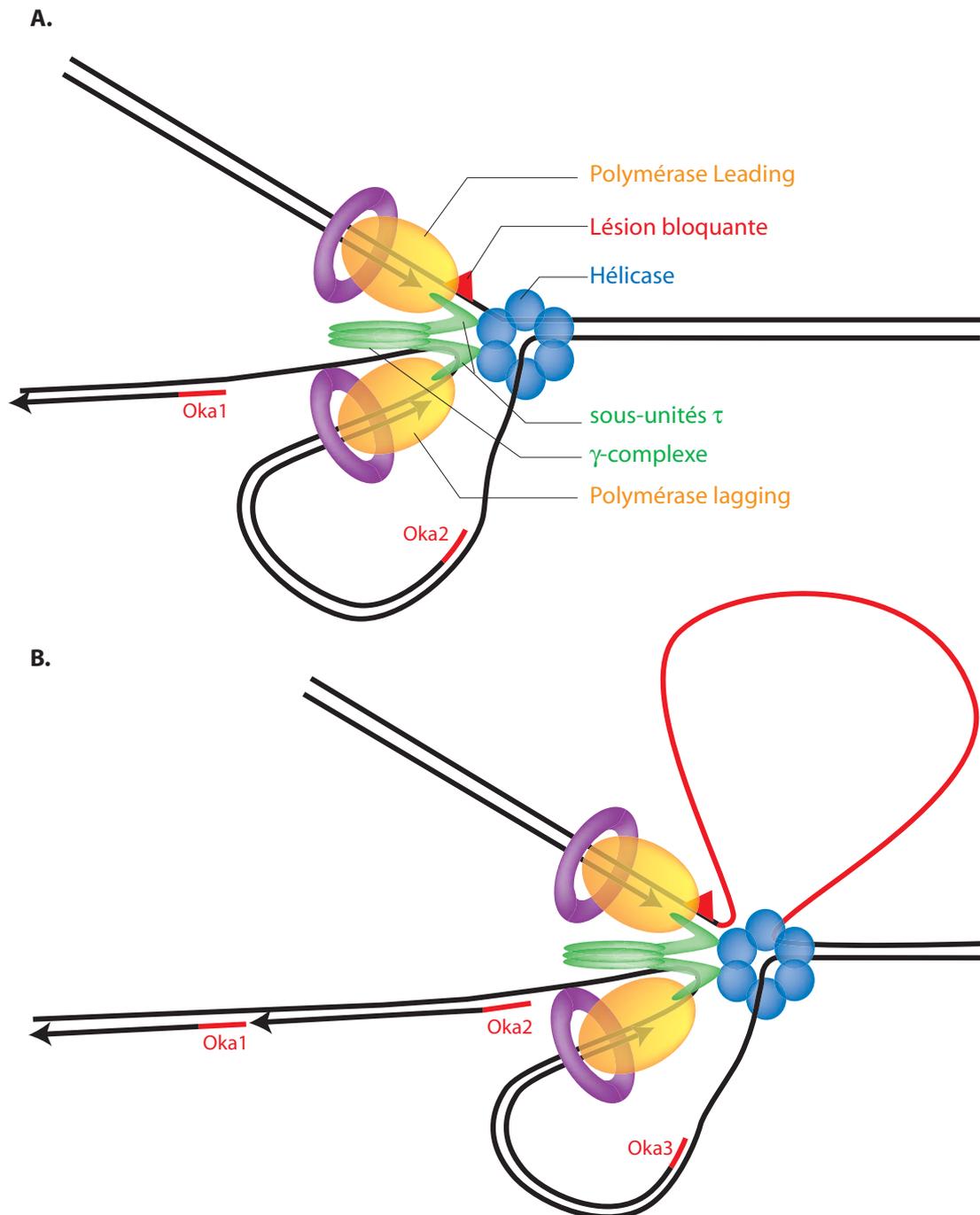


Figure 48 : A.- Modèle de structure de la fourche de réplication : les deux polymérase leading et lagging sont couplées par les deux sous-unités  $\tau$  du  $\gamma$ -complexe. B.- Lorsque la polymérase leading rencontre une lésion bloquante (triangle rouge), la synthèse de ce brin s'arrête. La synthèse de l'autre brin (lagging) se poursuit, ce qui implique la progression de l'hélicase qui déroule l'ADN. Ceci va générer une portion d'ADN simple-brin au niveau du leading bloqué par la lésion.

Dans ce modèle, la fourche de réplication n'est pas bloquée puisqu'elle continue de progresser jusqu'à la fin du plasmide (1kb) malgré le blocage du brin leading.

L'utilisation de plasmides plus longs (série pKB110) a montré qu'au-delà de cette distance de 1kb, la réplication du brin lagging commençait à être affectée par le blocage du

leading, ce qui pouvait *in fine* entraîner un blocage de la fourche. Dans cette situation, le découplage n'est plus que partiel : certaines molécules sont découplées, ce qui permet de terminer la réplication du brin lagging malgré le blocage du brin leading ; d'autres restent couplées, le blocage au niveau du leading aura pour conséquence de bloquer le brin lagging.

Ces données nous permettent de penser qu'en augmentant encore la longueur de nos plasmides, nous parviendrons à mettre en évidence un blocage complet de la fourche de réplication. Il paraît évident que la présence d'une lésion sur le chromosome conduira inévitablement au blocage de la fourche. Cependant, nous savons maintenant que ce blocage n'est pas immédiat puisque la réplication du brin non endommagé peut se poursuivre sur une distance allant jusqu'à 3kb, générant ainsi une structure de fourche compatible avec la production de fourche régressée (voir paragraphe III. 2. page 124).

Une étude récente menée par Maki et collaborateurs décrit la réplication *in vitro* d'un plasmide portant un site abasique unique (Higuchi et al., 2003). Dans cette étude, le système de réplication d'*E.coli* a été reconstitué à partir de 18 protéines purifiées. Les auteurs observent la structure des intermédiaires de réplication du plasmide grâce à des gels d'agarose natifs en deux dimensions (gel 2D) ainsi que la réplication des brins leading et lagging sur un gel de séquence (la réplication ayant été réalisée en présence de dNTP radioactifs). Dans cette étude, la distance entre la lésion et la fin du plasmide est de 1,7kb.

Cette étude montre (en accord avec nos résultats) un blocage partiel de la fourche de réplication lorsque la lésion est portée par le brin leading. Ce blocage n'est pas un blocage net de la réplication des deux brins au niveau de la lésion puisque les auteurs montrent que le brin lagging est capable de "prendre de l'avance" sur le brin leading bloqué, impliquant la progression de l'hélicase DnaB. Ils observent en outre un ralentissement de la progression de la polymérase lagging caractérisé par la production de fragments d'Okazaki plus courts. Selon eux, la réplication du brin lagging peut se poursuivre sur plus de 1000 bases pour finalement ralentir et s'arrêter.

L'effet d'une lésion bloquante sur le brin leading peut être représenté de la manière suivante (Figure 49) :

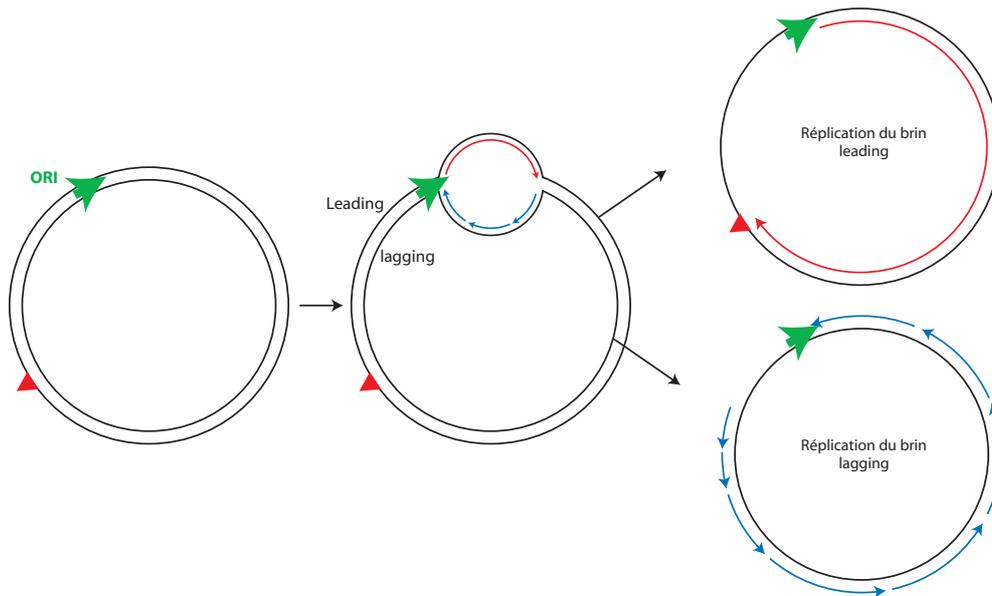


Figure 49 : Réplication d'un plasmide portant une lésion bloquante sur son brin leading : le brin lagging est capable de poursuivre sa synthèse sur une certaine distance pour finalement ralentir et s'arrêter (d'après Higuchi et al., 2003).

L'ensemble de ces données permet de conclure que suite à un blocage au niveau du brin leading, la polymérase lagging est capable de prendre de l'avance en répliquant une distance de quelque 1kb. Au-delà de cette distance, la progression de l'hélicase devient plus difficile : la réplication du brin lagging devient donc plus aléatoire.

## 2. Effet d'un blocage sur le brin lagging

L'utilisation de plasmides pCU (plasmides courts) portant une lésion sur le brin lagging a conduit à la même observation que lorsque la lésion était située sur le brin leading : un découplage total de la synthèse des deux brins. Le fait qu'une lésion bloquante sur le brin lagging n'empêche pas la progression de la fourche n'est pas trop surprenant a priori. En effet, on peut facilement imaginer que lorsque la polymérase lagging rencontre une lésion et se retrouve bloquée, il se produit le même processus que lorsque cette polymérase rencontre l'extrémité 5' du fragment d'Okazaki précédent, et par conséquent ré-initie le prochain fragment d'Okazaki en laissant une brèche au niveau de la lésion. Cette brèche sera comblée plus tard par synthèse translésionnelle. Dans ce modèle, la structure de la fourche peut être représentée de la manière suivante (Figure 50) :

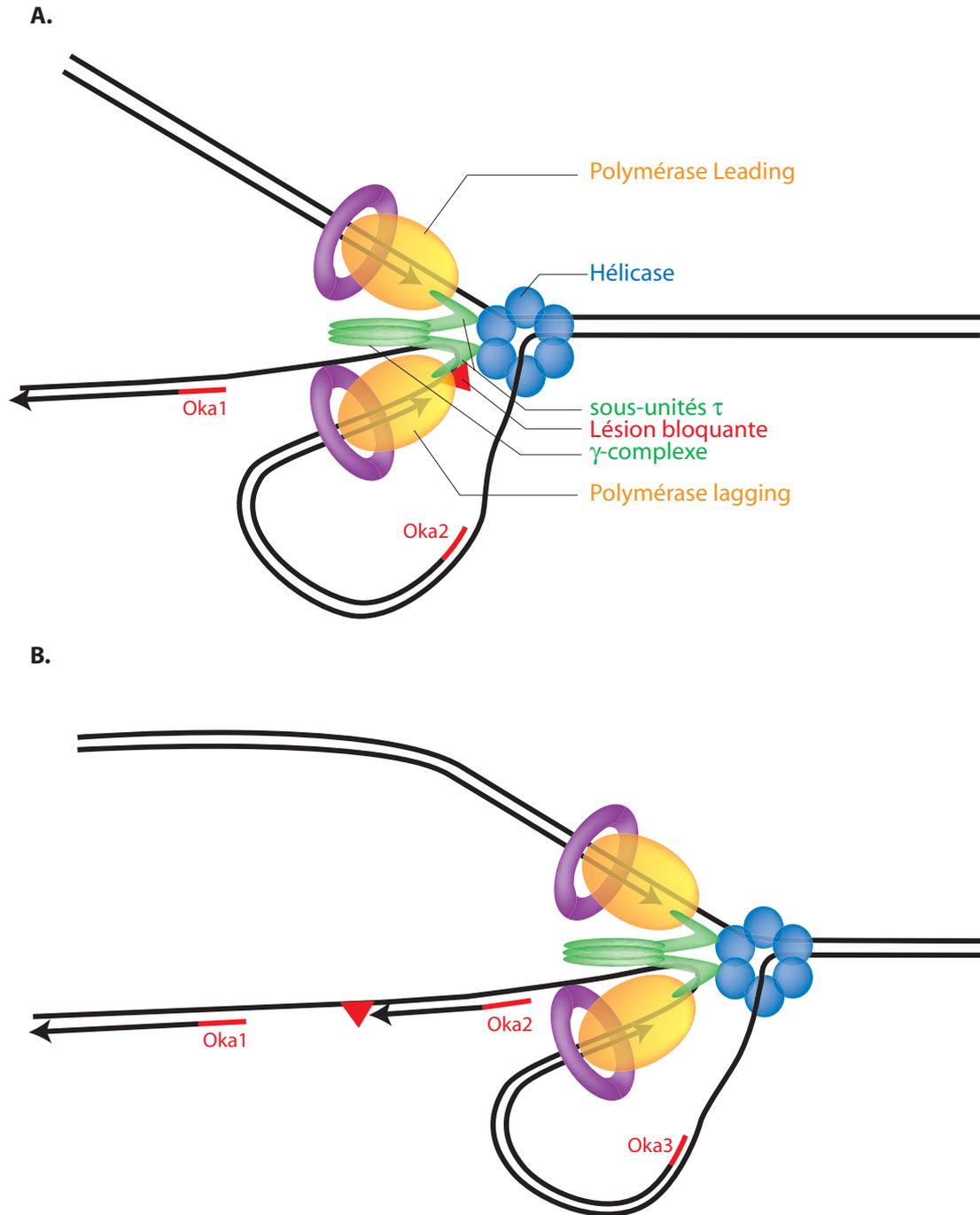


Figure 50 : Modèle de structure de la fourche de réplication rencontrant une lésion sur le brin lagging. A. La synthèse du fragment d'Okazaki (Oka2) s'arrête au niveau de la lésion. B. La synthèse du fragment d'Okazaki Oka2 est abandonnée et la polymérase lagging reprend la réplication au niveau du fragment d'Okazaki suivant (Oka3), laissant une brèche d'ADN simple-brin.

Dans l'étude réalisée *in vitro* par Maki et collaborateurs (Higuchi et al., 2003), les auteurs n'observent pas de structure de fourche bloquée par l'analyse en gels 2D lorsque la lésion est portée par le brin lagging. De plus, en utilisant des sondes radiomarquées spécifiques de différentes régions du brin lagging, les auteurs ont pu mettre en évidence la

brèche laissée en aval de la lésion, ainsi que la réinitiation au niveau des fragments d'Okazaki suivants.

Compte tenu de ces résultats, on peut représenter la réplication d'un plasmide portant une lésion sur le brin lagging de la façon suivante (Figure 51) :

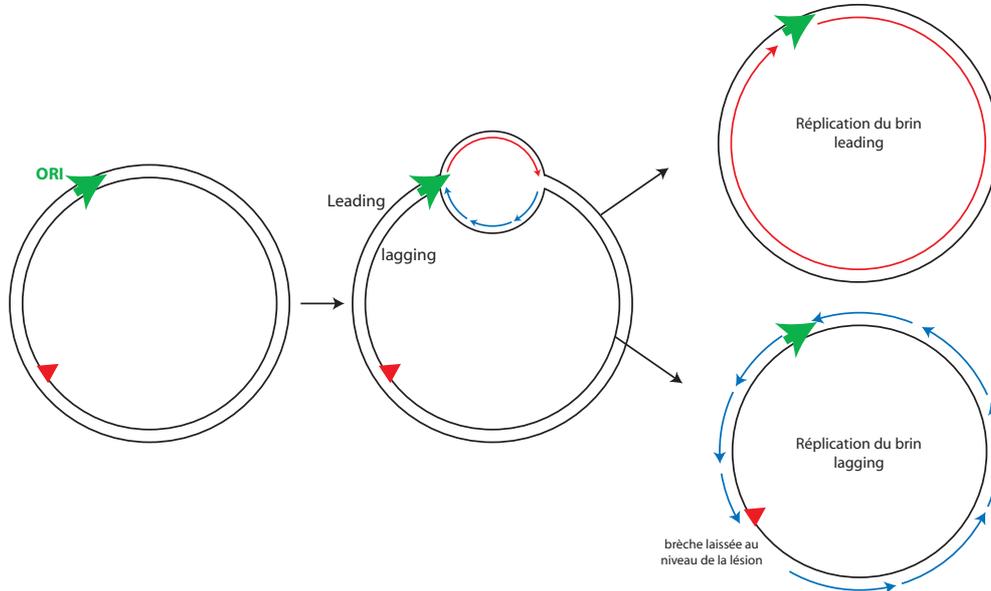


Figure 51 : Réplication d'un plasmide portant une lésion bloquante sur son brin lagging : la polymérase lagging bloquée au niveau de la lésion laisse une brèche et ré-initie la réplication au niveau du prochain fragment d'Okazaki (d'après Higuchi et al., 2003).

Nos plasmides de la série pKB110 (plasmides plus longs) portant une lésion sur le brin lagging (L+) n'ont pas été testés par la technique MARI. Selon le modèle présenté ci-dessus, nous ne devrions pas observer de ralentissement de la synthèse du brin leading.

Pourtant, l'étude de ces plasmides portant une lésion sur le brin lagging par l'approche clonale (N. Koffel) a montré une distribution des plasmides bleus au sein des clones bleus, semblable à celle obtenue lorsque la lésion était sur le brin leading, ce qui traduit un découplage partiel Figure 52.

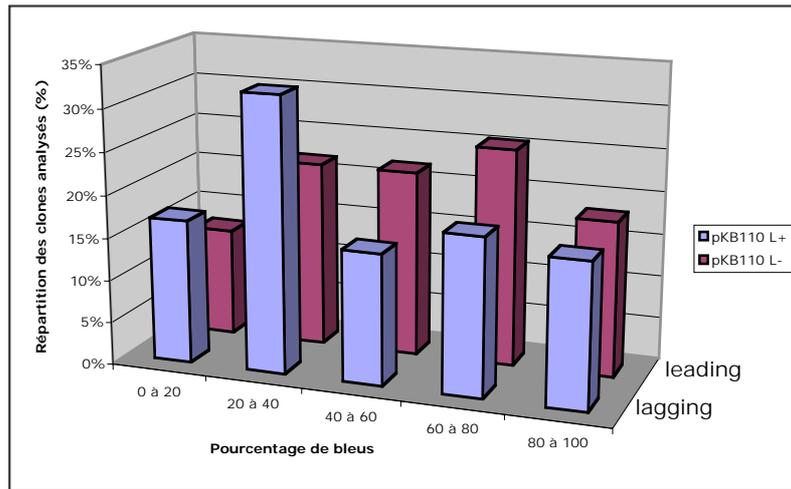


Figure 52 : Répartition des plasmides bleus au sein des clones bleus issus de la transformation primaire pour les plasmides pKB110\_L- (lésion sur le leading) et L+ (lésion sur le lagging)  $Nar3^{AAF}/Nar+3$  (N. Koffel).

Lorsque l'adduit est sur le brin lagging, la distribution des plasmides bleus au sein des colonies bleues est également dispersée, ce qui reflète un couplage partiel de la synthèse des deux brins. Cependant, contrairement aux plasmides portant une lésion sur le leading, on trouve une majorité de colonies où les plasmides bleus sont minoritaires, ce qui signifie que le découplage a eu lieu dans ces clones.

Ceci signifie que lorsque la lésion est située sur le brin lagging, le découplage entre les deux brins se fait plus facilement ou plus fréquemment que lorsque la lésion est sur le brin leading. On observe malgré tout avec ces constructions, un certain nombre de molécules où la synthèse des deux brins semble être couplée.

On peut expliquer ce couplage partiel lié à une lésion sur le brin lagging de deux manières :

(i) Le blocage du brin lagging au niveau d'une lésion ne serait pas "perçu" comme si la polymérase venait de compléter un fragment d'Okazaki et par conséquent n'autoriserait pas son recyclage au niveau du prochain fragment d'Okazaki. Nous avons vu au cours de l'introduction que la sous-unité  $\tau$  du complexe DnaX fonctionnait comme un interrupteur capable de détecter la structure de l'ADN au sein de la polymérase, autorisant ou non son recyclage. On peut imaginer que "l'interrupteur  $\tau$ " ne soit pas capable de s'ouvrir lorsqu'il rencontre une lésion, interdisant ainsi le recyclage de la polymérase lagging.

Dans ce modèle, la polymérase lagging serait donc bloquée au niveau de la lésion de la même manière que l'était la polymérase leading, entraînant un blocage partiel de la synthèse du brin leading dans ces plasmides plus longs.

(ii) Dans l'autre modèle, la polymérase lagging qui rencontre une lésion laisse une brèche et entreprend la réplication du fragment d'Okazaki suivant. Cette brèche constituée d'ADN simple-brin sera recouverte par SSB. On peut imaginer qu'à chaque recyclage de la polymérase en fin de synthèse de fragment d'Okazaki, la brèche simple brin laissée au niveau de la lésion puisse servir de site d'initiation pour la polymérase lagging. L'initiation répétée au niveau de la lésion bloquante pourra entraîner un ralentissement de la fourche et par conséquent un retard du brin leading. Ceci n'a pas été observé avec les plasmides pCU car un seul événement de recyclage de la polymérase lagging permet de terminer la réplication de ces plasmides plus courts.

Aucun de ces deux modèles n'est compatible avec les données de Maki et collaborateurs qui observent la synthèse de nouveaux fragments d'Okazaki en aval de la lésion, et qui n'observent pas de structure de fourche bloquée ou ralentie dans leurs expériences.

Ces incompatibilités peuvent trouver une explication dans la différence de taille des plasmides utilisés. En effet, dans nos plasmides de type pKB110, il reste 3,3kb à répliquer après la lésion contre 1,7kb dans les conditions de Maki et collaborateurs. On peut imaginer que dans nos plasmides, le nombre de ré-initiations de la polymérase lagging sera plus important, augmentant le nombre de "fausses initiations" au niveau de la lésion et par conséquent le retard de la fourche. Ce phénomène s'il a lieu sera encore plus important pour une lésion localisée sur le chromosome.

### **3. Conclusion**

Nous avons pu montrer que la présence d'une lésion sur le brin leading entraînait un blocage de la fourche de réplication après un découplage temporaire de la réplication des deux brins, permettant au brin lagging de prendre de l'avance sur le brin leading.

L'approche clonale laisse supposer qu'une lésion localisée sur le brin lagging aura également pour effet de bloquer la fourche de réplication, bien que ces données ne soient pas en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par Maki et collaborateurs. La poursuite de

l'analyse de la réplication des plasmides pKB110 par la technique MARI pourra peut-être éclaircir ce point.

L'analyse des intermédiaires de réplication obtenus *in vivo* avec ces plasmide pKB110 par des gels 2D est en cours de mise au point. Cette approche permettra de montrer de manière non ambiguë si une lésion sur le brin lagging conduit ou non au blocage de la fourche.

Le découplage temporaire qui permet à un brin de prendre de l'avance sur le brin bloqué suivi du blocage définitif de la fourche de réplication sont des phénomènes essentiels pour la mise en place de structures de "fourches régressées". Nous allons voir par la suite que la régression de fourche est un mécanisme important permettant d'assurer la continuité du brin endommagé.



### III. Reprise de la synthèse : modèles et hypothèses

Grâce au découplage mis en évidence dans ces études, la synthèse du brin non-endommagé a pu se poursuivre, au moins sur une certaine distance. Cependant sur l'autre brin, la réplication s'est arrêtée au niveau de la lésion, engendrant une structure de fourche inhabituelle avec des régions d'ADN simple-brin. Il faudra "réparer" cette fourche en assurant notamment la continuité du brin fils dont la réplication est temporairement bloquée.

Deux mécanismes permettent de secourir cette fourche : la synthèse translésionnelle et les mécanismes de contournement de dommages par utilisation de la chromatide sœur.

#### 1. La synthèse translésionnelle

Que la lésion bloquante soit localisée sur le brin leading ou lagging, la TLS qui implique le recrutement de polymérases spécialisées, représente un mécanisme qui permet d'assurer la continuité des brins fils. Ce mécanisme est inévitablement générateur de mutations.

##### 1.1. Temps de passage : recrutement des polymérases translésionnelles et nature de la lésion

Nous avons pu estimer le temps de passage de la lésion AAF à 50 minutes. Plusieurs facteurs peuvent s'additionner pour expliquer ce temps relativement long :

(i) On peut imaginer que cette pause reflète en partie le temps nécessaire au recrutement des polymérases translésionnelles PolIII et PolV responsables du passage de cette lésion.

Il a été montré récemment que toutes les polymérases translésionnelles d'*E.coli* interagissaient avec l'anneau de processivité  $\beta$  et qu'*in vivo*, les activités de TLS associées à PolIII et PolV (mais aussi PolIV) étaient dépendantes de cette interaction entre les polymérases et l'anneau  $\beta$  (Becherel et al., 2002; Lenne-Samuel et al., 2002 ). Ceci nous a conduit à proposer un modèle où les polymérases translésionnelles seraient soit en permanence liées à l'anneau  $\beta$ , soit recrutées de manière séquentielle au niveau de  $\beta$ . Dans les deux cas, il est plus probable que les polymérases ne soient pas recrutées "intelligemment" en fonction de la nature de la lésion à franchir. Nous envisageons le scénario suivant : la polymérase répliquative PolIII bloquée au niveau de la lésion se décroche de la matrice,

laissant ainsi la place libre à une autre polymérase qui va venir "tenter sa chance" d'insérer un nucléotide en face de la lésion. Si cette étape s'avère inefficace pour la lésion considérée, la polymérase spécialisée ainsi recrutée va à son tour se détacher, laissant la place à une autre polymérase, et ainsi de suite, le passage de la lésion se faisant ainsi selon le modèle "essai et erreur".

(ii) Comme nous l'avons vu, le temps d'incorporation en face de la lésion et d'élongation de cet intermédiaire, dépend également de la nature de la lésion ainsi que du contexte de séquence où se trouve cette lésion. Il est fort probable que pour une polymérase donné le temps de franchissement sera différent en fonction de la lésion à franchir. Ainsi, alors qu'il faut 50 minutes pour franchir la lésion AAF, nous avons vu que le franchissement de la lésion aminofluorène (AF) était de l'ordre de 10 minutes. Le franchissement de la lésion AF ne nécessite pas l'induction des polymérases translésionnelles. Il est fort probable par conséquent que le franchissement de cette lésion ne nécessite pas le recrutement des polymérases accessoires, ce qui peut expliquer le temps de passage plus court.

## **1.2. Inhibition de l'activité proofreading de Pol III au cours de la réponse SOS**

L'analyse moléculaire de plasmides portant un adduit unique nous a permis de "visualiser" l'activité proofreading *in vivo* au niveau d'une lésion bloquante (paragraphe 'Partie II.- III. 3. ').

Le premier résultat surprenant est que nous avons pu observer une "échelle" de dégradation des intermédiaires de réplication bloqués allant de L-1 à L-5. Ceci signifie que l'exonucléase de proofreading n'excise pas simplement le nucléotide mal apparié au niveau de la lésion, mais en enlève 2, 3, 4 ou plus. On peut en principe, imaginer deux modèles pour expliquer ces nombreux intermédiaires : un modèle distributif où l'exonucléase excise un seul nucléotide, laissant à chaque fois à la polymérase l'opportunité de ré-insérer un autre nucléotide à la place ; ou un modèle processif où une fois que le brin fils se trouve localisé dans la sous-unité exonucléasique, celle-ci enlève 1, 2, 3 ou plusieurs nucléotides d'un coup. Ces deux modèles sont présentés Figure 53.

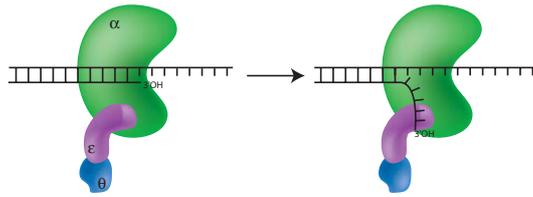
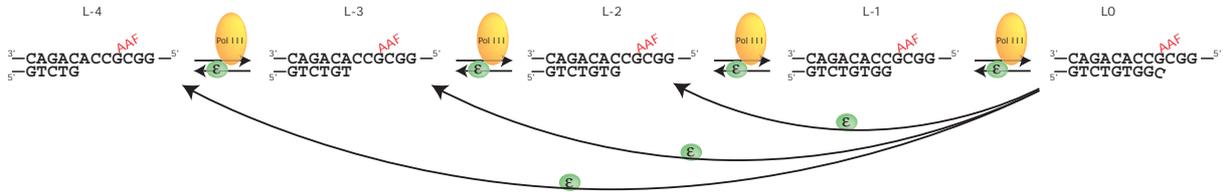
A. Passage de la sous-unité polymérase ( $\alpha$ ) à la sous-unité exonucléase de proofreading ( $\epsilon$ )B. Modèle distributif ou processif pour l'excision de nucléotides par la sous-unité  $\epsilon$ 

Figure 53 : A. L'ADN en cours de synthèse peut se trouver un niveau de la sous-unité  $\alpha$  (polymérisation) ou  $\epsilon$  (proofreading). B. Modèle distributif ou processif pour l'excision de nucléotides par la sous-unité epsilon

Le modèle distributif ne peut pas rendre compte de l'échelle observée. En effet, si l'exonucléase n'enlève qu'un seul nucléotide à la fois et remet l'amorce à disposition de la polymérase (modèle distributif), la polymérase va rapidement élonger cet intermédiaire L-2 en L-1 avant que l'exo ne puisse produire du L-3 car l'insertion à partir des intermédiaires précédant le L-1 (L-2, L-3, etc...) ne pose pas de problème à la polymérase puisque la lésion n'est pas présente à ce niveau. On ne devrait donc observer que du blocage en L-1 dans ce modèle.

Si par contre l'exonucléase enlève 1, 2, 3 ou plusieurs nucléotides d'un coup sans remettre l'amorce à disposition de la polymérase, on pourra observer ces intermédiaires, ce qui est le cas.

Ce modèle est conforté par des expériences réalisées *in vitro* qui consistent à mesurer l'activité proofreading par le suivi du relargage de dNMP (désoxynucléotides monophosphates issus de l'activité exonucléase) dans le milieu réactionnel (Maki et al., 1991). Les auteurs ont montré dans cette étude que la polymérase sauvage produisait environ 5% de dNMP par rapport aux dNTP incorporés. Ceci revient à dire en considérant le modèle distributif que la polymérase passe en mode exonucléase tous les 20 nucléotides incorporés pour exciser un nucléotide, malgré l'absence de mésappariement terminal, la fidélité de la sous-unité  $\alpha$  étant de l'ordre de  $10^{-5}$ . Il paraît plus plausible que la polymérase passe en mode exonucléase moins fréquemment, mais qu'elle enlève alors un nombre supérieur à 1 nucléotide (selon le modèle processif). Dans cette même étude, les auteurs montre qu'en utilisant l'allèle *mutD5*, la

polymérase ne produit plus que 0,1% de dNMP (Maki et al., 1991), la mesure de la quantité de dNMP produit reflète donc bien l'activité de proofreading.

### 1.2.1. Modèle de TLS faisant intervenir l'inhibition de l'activité proofreading de Pol III / exemple du site NarI

Il ressort de cette étude que l'activité exonucléasique de proofreading serait partiellement inhibée par l'induction du système SOS. Cette observation permet d'affiner le modèle présenté Figure 54.

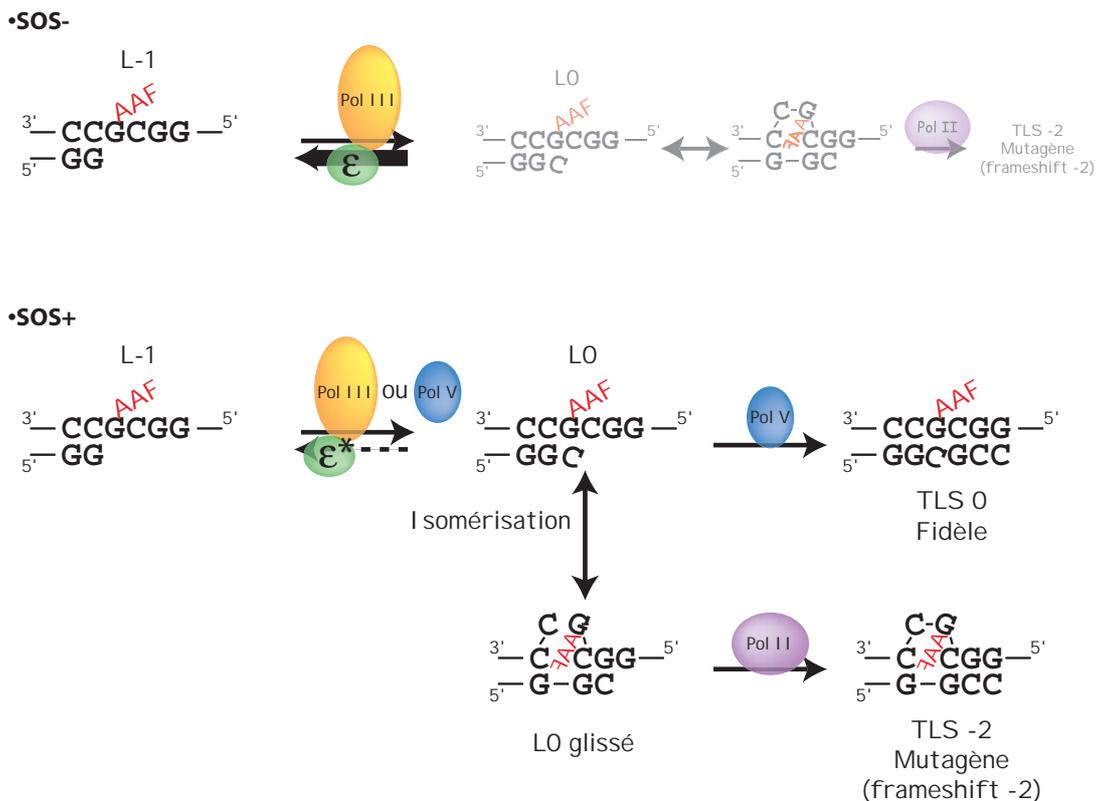


Figure 54 : Nouveau modèle de TLS au niveau du site Nar3<sup>AAF</sup>.

Dans ce modèle, en conditions SOS<sup>-</sup> l'activité de correction de lecture est maximale : de ce fait, peu de L0 est produit et par conséquent, PolIII pourtant présente aura peu de substrat à élonguer. Il en résulte un faible niveau de TLS-2 (2%). De plus, PolIV est absente dans ces conditions SOS<sup>-</sup>, elle ne peut donc pas assurer la TLS fidèle (TLS0).

Lorsque le système SOS est induit, l'activité exonucléasique d'ε serait partiellement inhibée (ε\*) comme nous venons de le montrer. De ce fait, PolIII disposera d'une quantité plus important de L0 qu'elle pourra élonguer après glissement conduisant à la TLS-2. De plus,

dans ces conditions SOS+ PolV est présente : elle est capable de réaliser l'extension non mutagène du L0, conduisant à la TLS0.

Ce modèle présenté ici dans le cas du passage de la lésion AAF pourra s'appliquer d'une manière plus générale au passage d'autres lésions. En effet, l'inhibition du proofreading de PolIII mise en évidence ici pourra faciliter le passage de nombreuses lésions en permettant à PolIII de réaliser l'étape d'insertion et/ou d'élongation.

### 1.2.2. Perspectives

L'étude de l'activité proofreading *in vivo* a conduit à mettre en évidence une inhibition de cette activité lorsque le système SOS de la bactérie est activé.

Cette inhibition du proofreading a été observée après irradiation aux UV. Or l'irradiation aux UV a pour conséquence certes d'activer le système SOS, mais également d'autres systèmes. L'inactivation partielle du proofreading observé dans nos expériences n'est donc peut-être pas due à l'activation du système SOS, mais à un autre système de régulation dépendant des UV. Afin d'examiner cette éventualité, il faudra réaliser les expériences complémentaires suivantes :

On pourra réaliser le même type d'expérience dans une souche dont l'induction du système SOS a été rendue impossible par une inactivation génétique : on pourra utiliser une souche de type *lexA(ind-)* où la protéine LexA n'est plus clivable et donc joue son rôle de répresseur de manière permanente, ou des souches où le gène *recA* a été inactivé soit par une mutation "ambre" insérant un codon STOP au début du gène (*recA99*), ou bien totalement délété (*ΔrecA306*). Si l'irradiation aux UV de ce type de souches n'entraîne plus d'inhibition du proofreading, nous pourrions alors conclure à une régulation SOS de ce phénomène.

Il sera possible aussi d'utiliser une souche où au contraire des précédentes le système SOS est constitutivement induit. Dans une souche de type *LexA(Def)* dont la fonction inhibitrice de la protéine LexA est déficiente, le système SOS étant constitutivement induit, on devrait observer une inhibition de l'activité proofreading, indépendante de l'irradiation aux UV.

Si la régulation SOS est prouvée, ou si au contraire ces expériences conduisent à un modèle de régulation du proofreading par les UV, il sera intéressant dans les deux cas d'élucider le mécanisme qui permet d'inhiber partiellement ou transitoirement l'activité de l'exonucléase de PolIII.

Par ailleurs, afin d'appuyer le modèle présenté Figure 54, il serait intéressant de contrôler si la seule inhibition du proofreading en condition SOS+ est suffisante pour augmenter la mutagenèse  $-2$  sans qu'il soit nécessaire d'augmenter le niveau de PolII. On pourra par exemple se placer dans un double mutant  $\Delta polB \Delta umuDC$  qui exprime PolII à partir d'un promoteur modulable de type arabinose. Dans cette situation, PolV n'est pas là pour produire l'intermédiaire L0. De plus, on peut contrôler de façon précise le niveau de PolII, de manière à exprimer cette protéine à son niveau basal, indépendamment de l'induction du système SOS. On mesurera alors dans cette souche le niveau de TLS-2 en fonction de l'induction du système SOS. Si selon notre attente, la mutagenèse augmente de manière SOS-dépendante, on pourra alors l'attribuer à l'inhibition de l'activité proofreading et confirmer ainsi notre modèle

## **2. Contournement des dommages : régression de fourche**

Comme nous l'avons vu, lorsque la lésion est située sur le brin leading, bien que l'hélicase continue à avancer sur une certaine distance ( $\geq 1\text{kb}$ ), la progression de la fourche va finir par être interrompue. En ce qui concerne le brin lagging, il n'est pas clair pour l'instant si son blocage va, *in fine*, également induire un blocage de la fourche. Si la fourche se bloque, on peut alors imaginer une dissociation partielle de la machinerie répliquative et la formation d'une "fourche régressée". Ce type de structure (représenté Figure 55) a été décrit depuis 1976 (Higgins et al., 1976 ; Seigneur et al., 1998).

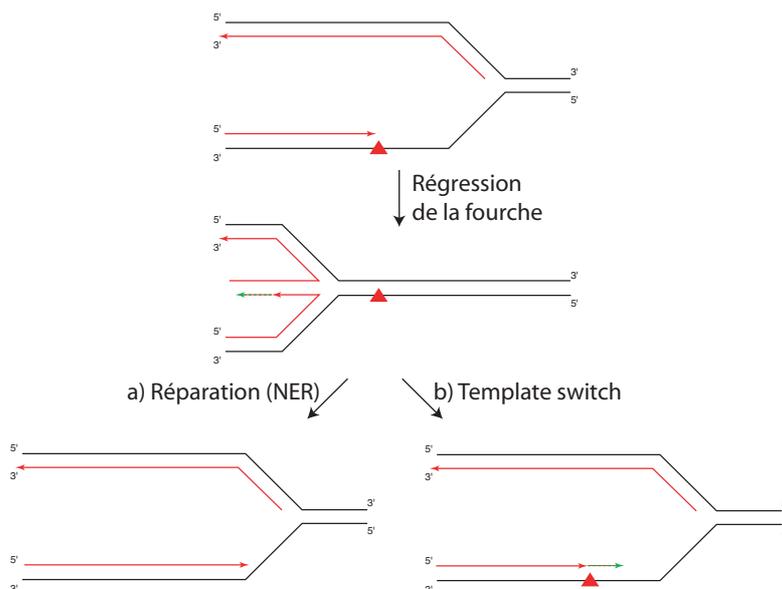


Figure 55 : Modèle de régression de fourche permettant d'assurer la continuité du brin fille de deux manières : (a) en offrant une deuxième chance au système NER de réparer la lésion qui se retrouve à nouveau dans une structure double-brin ; (b) en utilisant le brin lagging nouvellement synthétisé comme matrice à condition que celui-ci ait pris de l'avance sur le brin leading.

Cette structure régressée de la fourche représente un intermédiaire de réplication qui permet d'assurer la continuité du brin fils de deux manières différentes (Figure 55a et b).

#### a) Réparation de la lésion

La régression de la fourche de réplication permet de ré-associer les brins parentaux, reconstituant ainsi un substrat pour la réparation des lésions par excision de nucléotides (NER : *Nucleotide Excision Repair*) ou par excision de bases (BER : *Base Excision Repair*) le cas échéant. Dans une étude récente, il a été montré par des gels 2D, que ces structures de fourches régressées apparaissaient *in vivo* suite à l'induction de lésions UV sur un plasmide (Courcelle et al., 2003). Les résultats de ces expériences sont présentés Figure 56.

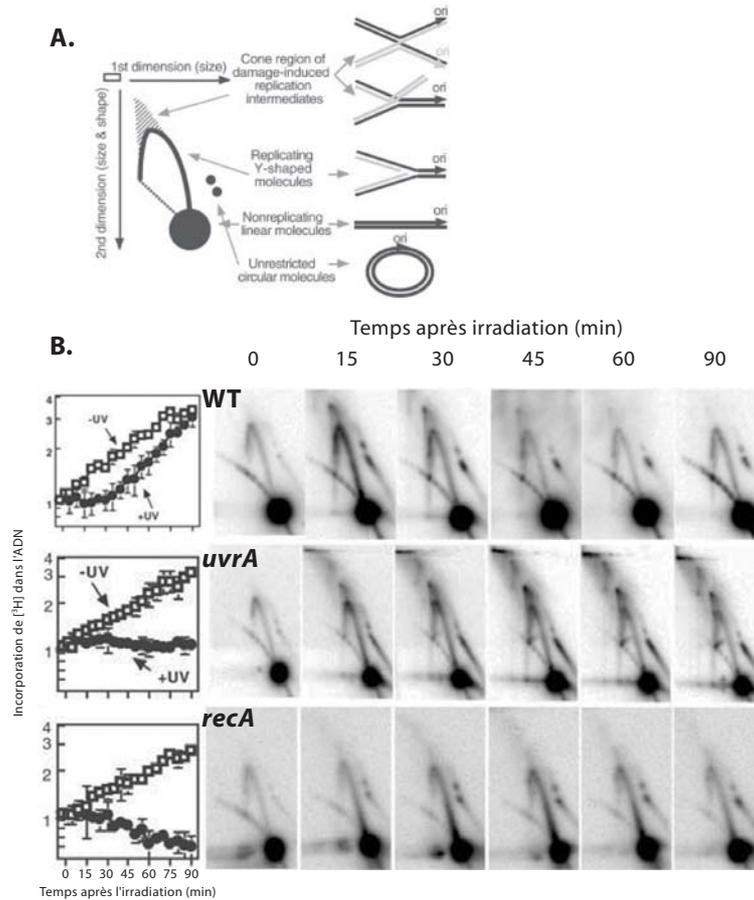


Figure 56 : A. Schéma représentant la migration du plasmide étudié en cours de réplication. B. Analyse de la structure des intermédiaires de réplication obtenus après irradiation des cellules aux UV dans une souche sauvage (WT),  $\Delta uvrA$  ou  $\Delta recA$ . Le graphique à gauche montre l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN reflétant le niveau de réplication des cellules (Courcelle et al., 2003).

La Figure 56A. est un schéma explicatif du profil de migration en deux dimensions du plasmide étudié. Le plasmide est digéré en un site unique puis séparé sur un gel d'agarose : la première dimension sépare les espèces moléculaires en fonction de leur taille, la deuxième dimension en fonction de leur taille et de leur forme. Ainsi, l'arc principal représente les intermédiaires de réplication en forme de "Y" : il s'agit des plasmides en cours de réplication (ces plasmides ayant une origine de réplication uni-directionnelle). La région supérieure en forme de cône représente des structures en "X" caractéristique des phénomènes de régression de fourche induits par les UV dans cette expérience.

La Figure 56B. montre l'analyse dans différentes souches des structures plasmidiques au cours du temps suite à une irradiation des cellules aux UV, ainsi que le niveau de réplication de l'ADN des cellules. Ainsi, dans une souche sauvage (WT), on observe l'apparition de structures de fourches réversées (cône) rapidement après l'irradiation aux UV. Ces structures disparaissent en même temps que la reprise de la réplication. En l'absence du gène *uvrA* (gène

appartenant au système NER), ces structures persistent et la réplication ne reprend pas. En l'absence du gène *recA*, ces structures n'apparaissent pas et la réplication ne reprend pas plus.

Les auteurs proposent le modèle suivant pour expliquer l'ensemble de leurs données : suite au blocage de la réplication au niveau des lésions UV, la fourche prend une structure régressée pour permettre à UvrA et aux autres acteurs du NER de réparer les lésions afin que la réplication puisse redémarrer. Dans leur modèle, RecA joue un rôle essentiel en stabilisant ces structures régressées, prévenant ainsi leur dégradation.

Ces expériences peuvent s'interpréter sur la base d'un couplage fonctionnel entre RecA et UvrA : RecA stabilise la fourche régressée pour permettre au système de réparation par excision (UvrA) de réparer les lésions. Ce couplage avait déjà été suggéré en 1969 suite à des études génétiques utilisant des mutants de ces deux gènes (Howard-Flanders et al., 1969) dont les résultats sont présentés Figure 57.

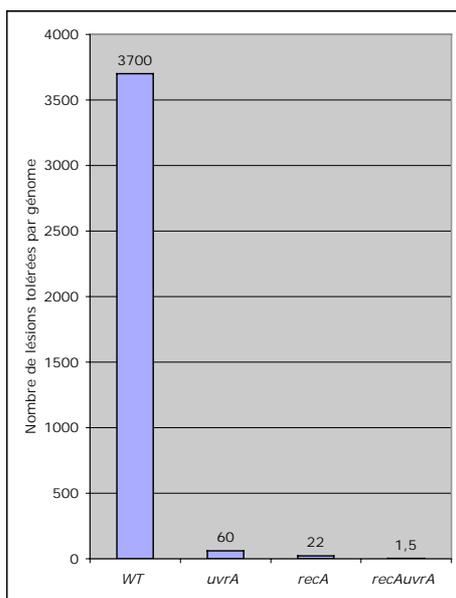


Figure 57 : Action combinée de RecA et d'UvrA. Le graphique représente le nombre de lésions UV par génome conduisant à la létalité pour la souche sauvage (WT), le mutant *recA*, le mutant *uvrA*, et le double mutant *recAuvrA*. (D'après Howard-Flanders et al., 1969)

Sur ce graphique, alors qu'une souche sauvage peut tolérer jusqu'à 3700 lésions UV, les mutants *uvrA* et *recA* n'en supportent respectivement que 60 et 22. Ceci signifie qu'en l'absence d'UvrA, RecA est capable seule de prendre en charge 60 lésions, et qu'en l'absence de RecA, UvrA est capable de réparer 22 lésions. Ces deux chiffres sont très faibles sachant

que l'action combinée des deux voies permet de débarrasser le chromosome de 3700 lésions. Par ailleurs, en l'absence de RecA et d'UvrA, la cellule n'a plus aucun moyen de se débarrasser des lésions UV de telle sorte qu'une seule lésion devient létale.

Ces résultats illustrent bien la synergie entre les voies RecA et d'UvrA démontrée plus haut.

#### b) "Template switch"

La régression de fourche permet également, lorsque la lésion est située sur le brin leading, de contourner la lésion en utilisant le brin lagging nouvellement synthétisé comme matrice (Figure 55b) : ce modèle de changement de matrice ou *template switch* (Higgins et al., 1976) n'est possible qu'à la condition où le brin lagging peut prendre de l'avance sur le brin leading, ce que nous avons démontré précédemment.

Ces deux mécanismes (réparation et *template switch*) permettent d'assurer la continuité du brin fils de manière **fidèle**, par opposition à la synthèse translésionnelle qui elle est potentiellement **mutagène**. Alors que les voies de TLS sont actuellement étudiées très activement, notamment à la suite de la découverte en 1999 des polymérases de la famille Y, les mécanismes de contournement des lésions restent pour l'essentiel à élucider en termes de génétique et de biochimie. La façon dont ces différentes stratégies de tolérance des lésions sont régulées entre elles au sein d'une cellule est un sujet de très grand intérêt en termes de santé humaine. En effet, si l'on pouvait orienter ces stratégies de tolérance vers l'utilisation préférentielle des voies fidèles de contournement, on diminuerait la mutagenèse liée à l'utilisation des voies de TLS, et par conséquent le risque d'induction de maladies comme le cancer.

## Partie IV.- Matériel et Méthodes

### 1. Souches utilisées

Le Tableau 5 donne une liste des souches utilisées, ainsi que le nom des allèles modifiés. Les souches portant plusieurs mutations n'y sont pas décrites : elles ont été obtenues en combinant les allèles décrits dans ce tableau.

Nom de la souche	Gène modifié	Résistance antibiotique	Référence / Origine
JM103			Stratagène (Yanisch-Perron et al., 1985)
JM103 <i>uvrAmutS</i>	<i>uvrA6</i> $\lambda$ mbB::Tn5 <i>mutS</i> srl::Tn10	Chloramphénicol Tétracycline	(Toman et al., 1985)
JM103 $\Delta$ <i>polB</i>	$\Delta$ <i>polB</i> :: $\Omega$	Spectinomycine	
JM103 $\Delta$ <i>umuDC</i>	$\Delta$ ( <i>umuDC</i> )595::cat	Chloramphénicol	
JM103 <i>mutD5</i>	<i>mutD5</i> <i>zaf13</i> ::Tn10	Tétracycline	
JM103 <i>dnaQ49</i>	<i>dnaQ49</i> <i>zae502</i> ::Tn10	Tétracycline	(Fuchs and Napolitano, 1998)

Tableau 5 : Description des souches et des allèles mutés

### 2. Mise en compétence / induction du système SOS

L'induction du système SOS des bactéries se fait au moment de leur mise en compétence, de telle sorte qu'à l'étape de transformation du plasmide monomodifié dans les cellules, celui-ci puisse être immédiatement pris en charge par les acteurs du système SOS qui sont déjà présents dans les bactéries du fait de cette induction préalable.

-250ml de LB sontensemencés avec au 1/100<sup>ème</sup> avec une préculture et mis en culture à 37°C jusqu'à DO<sup>700</sup>=0,4

-Les cellules sont collectées par centrifugation (15min 4000rpm), et le culot est repris dans 210ml de MgSO<sub>4</sub> 10mM (solution transparente aux UV permettant l'irradiation des cellules)

-La suspension cellulaire est divisé en 3 aliquots de 70ml, le premier n'étant pas irradié, les deux autres étant irradiés à deux doses UV différentes grâce à une lampe UV dont la

longueur d'onde est de 254nm. L'irradiation se fait dans une grande boîte de Pétri sous agitation.

-Après irradiation, une fraction des cellules irradiées ou non est étalée sur milieu LB-Agar afin de déterminer le taux de survie lié à l'irradiation. On considère qu'une survie comprise entre 10 et 20% traduit une induction satisfaisante du système SOS.

-Les suspensions cellulaires sont ensuite diluées dans un volume égale de LBx2 et remises en culture pour permettre l'expression des gènes SOS. Classiquement, cette expression se fait pendant 20 à 30 minutes à 37°C. Pour les expériences MARI, cette expression est réalisée à 18°C pour augmenter l'efficacité de transformation des cellules (Chuang et al., 1995). Le temps d'expression est de ce fait adapté à la vitesse de croissance des cellules plus lente à cette température, et se fera donc pendant 90 minutes.

-La mise en compétence pour l'électroporation est réalisée par une série de lavages des cellules à l'eau d'abord (dans 1 volume puis 1/2 volume), puis avec une solution de glycérol à 10% (1/50 Volume). Les cellules sont enfin resuspendues dans 1/500<sup>ème</sup> du volume de départ de glycérol 10% et aliquotées dans des tubes pré-refroidis sur carboglace et stockées à -80°C.

### **3. Protocole de la technique MARI**

Le principe de la technique a déjà été décrit dans la partie "Résultats".

Ce paragraphe décrit le protocole expérimental détaillé ainsi que des éléments de mise au point et des remarques diverses concernant la technique MARI. La mise au point de ce protocole a été inspirée d'anciennes expériences dites de "genomic sequencing" (Church and Gilbert, 1984).

#### **3.1. Transformation des cellules**

Pour  $n$  points de cinétique :

-20 $n$   $\mu$ l de cellules compétentes sont mélangées à 40 $n$  ng de plasmide monomodifié et transférés dans une cuvette à électroporation.

-Immédiatement après la décharge électrique (2,5kV – 200 $\Omega$  – 25 $\mu$ FD) j'ajoute  $n$  ml de SOC (bacto Tryptone 2%, Yeast extract 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM Glucose 10mM) préchauffé à 37°C. Le fait de diluer les cellules dans un milieu de culture préchauffé augmente le taux de transformation (Eynard et al., 1992).

-Pour le point de cinétique  $t=0$  900 $\mu$ l sont prélevés immédiatement et mis sur glace. Le reste de la suspension cellulaire est mis en culture à 37°C sous agitation.

-À chaque temps  $t$ , 900 $\mu$ l de suspension cellulaires sont prélevés pour l'analyse.

*Remarque* : Pour les points de cinétique  $\geq 45$  minutes, je n'utilise que 10n  $\mu$ l de cellules, 20n ng de plasmide et 0,5n ml de SOC, ceci afin de ne pas saturer les bandes sur le gel.

### 3.2. Extraction de l'ADN

Comme décrit précédemment (Partie II.- I. 2. page 53), après avoir testé plusieurs protocoles d'extraction, j'ai opté pour un protocole d'extraction d'ADN total utilisant le CTAB. Le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) est un détergent cationique qui a la propriété, dans les solutions de forte force ionique (nous utiliserons ici le NaCl), de former un complexe avec les protéines et les polysaccharides, sans précipiter les acides nucléiques. Ce composé est de ce fait particulièrement utile pour la purification d'ADN dans les organismes qui produisent de grosses quantités de polysaccharides, ce qui est le cas d'*E.coli*.

*Remarque* : Comme de nombreux détergents, le CTAB possède des propriétés antiseptiques et est utilisé comme antiseptique local en pharmacie sous le nom de Savlon® et Cétavlon®.

-Les 900 $\mu$ l de cellules prélevées sont lavés deux fois par centrifugation (1min 14.000rpm 0°C) et resuspension dans 1ml de NaCl 0,5M.

-Le culot est repris dans 572 $\mu$ l de TE.

-Sont ajoutés 3 $\mu$ l de protéinase K (20mg/ml), 15 $\mu$ l de SDS 20% et 10 $\mu$ l de standard interne (pCU Helper non digéré à 0,1ng/ $\mu$ l) : le tout est incubé 1h à 37°C

-100 $\mu$ l de NaCl 5M sont ensuite ajoutés pour augmenter la force ionique de la solution ce qui permettra au CTAB de complexer protéines et polysaccharides sans précipiter l'ADN

-80 $\mu$ l de CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,7M NaCl) sont ajoutés avant incubation 10 minutes à 65°C

-Le complexe CTAB-protéines-polysaccharides est éliminé par une extraction aux solvants organiques, tandis que l'ADN (génomique + plasmidique) reste dans la phase aqueuse. Cette extraction est réalisée dans une premier temps avec 700 $\mu$ l de Sevag

(Chloroforme/Alcool isoamylique 24:1), puis 700µl de phénol (Phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25:24:1), suivi encore de deux extractions au Sevag.

-L'ADN est ensuite précipité avec 700µl d'isopropanol.

-L'ARN est dégradé par l'action d'une RNase, puis l'ADN est digéré dans un premier temps avec l'enzyme de restriction NlaIII, puis après précipitation pour permettre un changement de tampon, par l'enzyme de restriction BstNI. Cette dernière digestion est réalisée dans un volume final de 20µl de telle sorte que la préparation puisse être chargée directement sur gel d'acrylamide sans concentration préalable de l'échantillon.

### **3.3. Séparation sur gel de polyacrylamide**

Les fragments obtenus par la digestion NlaIII-BstNI sont séparés sur un gel de polyacrylamide 8% en conditions dénaturantes (urée 8,3M). 8 des 20µl de la réaction de digestion sont mélangés à 5µl de formamide (contenant du bleu de bromophénol et du xylène cyanol), incubés 5min à 95°C avant d'être déposés sur le gel. La migration s'effectue pendant environ 2h à 80W (jusqu'à ce que le xylène cyanol ait atteint 27-28cm des poches).

La partie basse du gel est alors transférée sur une membrane de nylon (Hybond N+) en utilisant un électro-blotter semi-sec (BioRad – TranBlot® Semi Dry) dans du tampon TBE 0,5x (1h – 1A – 20V). Après transfert, la membrane est incubée sur du papier filtre imbibé de NaOH 0,4M, rincée dans du SSC x2, et chauffée à 80°C dans un four pendant 1h, dans le but de fixer l'ADN.

J'ai réalisé la mise au point de ce protocole de transfert et de fixation en utilisant des produits de séquençage radioactif que j'ai séparés sur un gel d'acrylamide 8% et transféré sur membrane de nylon selon le protocole décrit plus haut. Ainsi, j'ai chargé les réactions de séquence en double sur le gel, une partie étant destinée à être transférée sur membrane et fixée selon différents protocoles, l'autre partie étant séchée sert de témoin. Les résultats sont présentés à la Figure 58.

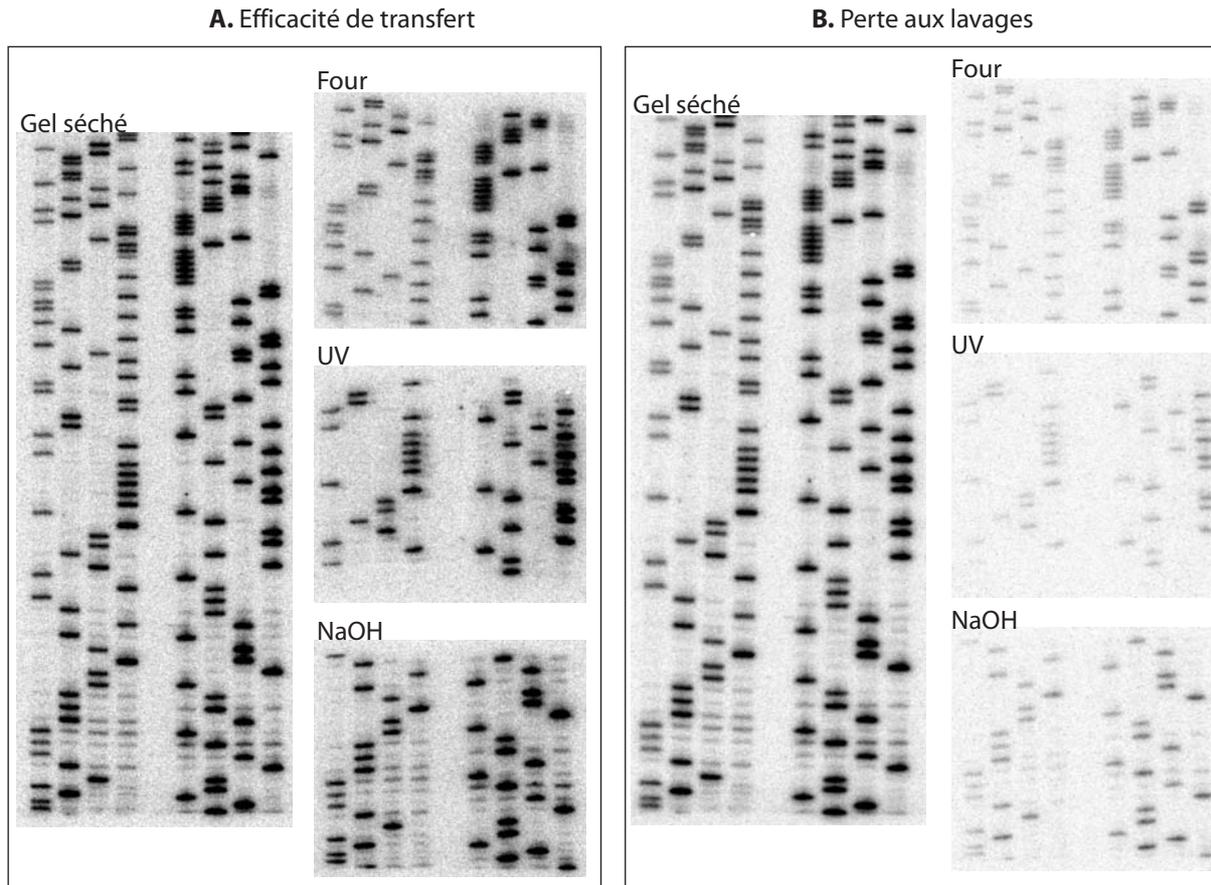


Figure 58 : Mise au point du protocole de transfert et de fixation de l'ADN sur membrane. Deux réactions de séquençage sont chargées en double sur un gel PAGE. Une partie est séchée et sert ainsi de témoin. L'autre partie est divisée en 3 pour être transférée sur 3 membranes de nylon où l'ADN sera fixé de différentes manières : par incubation au four, par crosslink aux UV, par la soude. La partie A. montre l'efficacité du transfert de l'ADN. La partie B. montre la perte d'ADN après lavage des membranes.

La quantification des bandes de la Figure 58A montre que le transfert d'ADN depuis le gel vers la membrane est total : l'intensité des bandes transférées est identique à l'intensité des bandes sur le gel témoin. La partie du gel ayant été transférée a été séchée et exposée : aucune trace de radioactivité n'y a été détectée (résultats non présentés). L'ADN a ensuite été fixé sur la membrane selon différents protocoles : par fixation à la soude (NaOH 0,4M), par crosslink des acides nucléiques aux UV et enfin par incubation au four à 80°C. Les 3 membranes ont ensuite été incubées dans la solution d'hybridation (sans sonde radioactive) à 68°C et lavées selon le protocole d'hybridation. L'exposition de ces membranes ainsi lavées et la comparaison de l'intensité des bandes à la portion du gel séché (Figure 58B) montre que la perte d'ADN est relativement importante, de l'ordre de 70 à 80%.

Cette perte d'ADN au cours de l'hybridation n'est pas gênante d'un point de vue quantitatif puisque la gamme standard utilisée pour quantifier les différentes bandes est également transférée et subit donc la même perte. Ce défaut de fixation est par contre gênant

du point de vue du seuil de détection : celui-ci pourrait être augmenté d'un facteur 4 ou 5 s'il était possible de fixer 100% de l'ADN transformé.

J'ai finalement retenu la combinaison fixation alcaline et incubation au four pour le protocole MARI (sans avoir testé si cette combinaison augmentait l'efficacité de fixation). Il serait intéressant de poursuivre les investigations pour optimiser le protocole de fixation de l'ADN à la membrane.

### 3.4. Marquage de la sonde

Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'hybridation, nous avons opté pour l'utilisation d'une sonde radioactive de forte activité et relativement longue (58Nt) couvrant la totalité de la région entre l'extrémité générée par la coupure BstNI et la lésion. Cette sonde est obtenue par l'élongation *in vitro* d'un oligonucléotide de 10 mers (Primer 58) hybridé à un oligonucléotide de 58 mers (Matrice 58) en présence d' $\alpha$ -[ $^{32}$ P]dCTP pur (3000Ci/mmol) et des trois autres dNTP non radioactifs. La Figure 59 montre la séquence de ces deux oligonucléotides ainsi que leur positionnement par rapport à la séquence sondée du fragment NlaIII-BstNI.



Figure 59 : Séquence des deux oligonucléotides Primer58 et Matrice58 utilisés pour le marquage de la sonde. Les deux oligonucléotides sont positionnés par rapport à la région NlaIII-BstNI des plasmides étudiés.

Environ 1pmol de Matrice58 et 8pmol de Primer58 (préalablement purifiés sur gel) sont mélangés dans du tampon d'hybridation (20mM Tris HCl pH8 / 50mM NaCl) en présence de MgCl<sub>2</sub> (5mM), incubé 10 minutes à 65°C, puis refroidi lentement jusqu'à 20°C. Une fois cette hybridation réalisée dans un volume final de 5µl, sont ajoutés 0,2µl de BSA (10mg/ml), 2µl du mélange des trois dNTP (dATP-dTTP-dGTP 0,5mM), 0,7µl de DTT (100mM), 1,5µl de tampon klenow (x10), 0,6µl de Klenow polymérase *exo-* (5U/µl) et 10µl d' $\alpha$ -[ $^{32}$ P]dCTP (3000Ci/mmol – 10Ci/ml ; ce qui équivaut à 1,6µM final). L'élongation est réalisée pendant 40 minutes à 25°C. L'excès de dNTP est éliminé par purification sur colonne MicroSpin™ G-25 (Pharmacia Biotech).

Utilisée telle quelle, j'ai pu observé que la sonde révélait non seulement le brin attendu, mais également avec une intensité moins importante le brin complémentaire qui ne devait pas être révélé. Ceci est dû à deux possibilités d'hybridation non attendues de l'oligonucléotide Matrice58 sur lui-même, pouvant donner lieu à une élongation (Figure 60). Ceci conduit donc au marquage radioactif de cet oligonucléotide (formation d'un 67mer et d'un 92mer) qui va pouvoir s'hybrider au brin complémentaire, ce qui va perturber l'analyse.

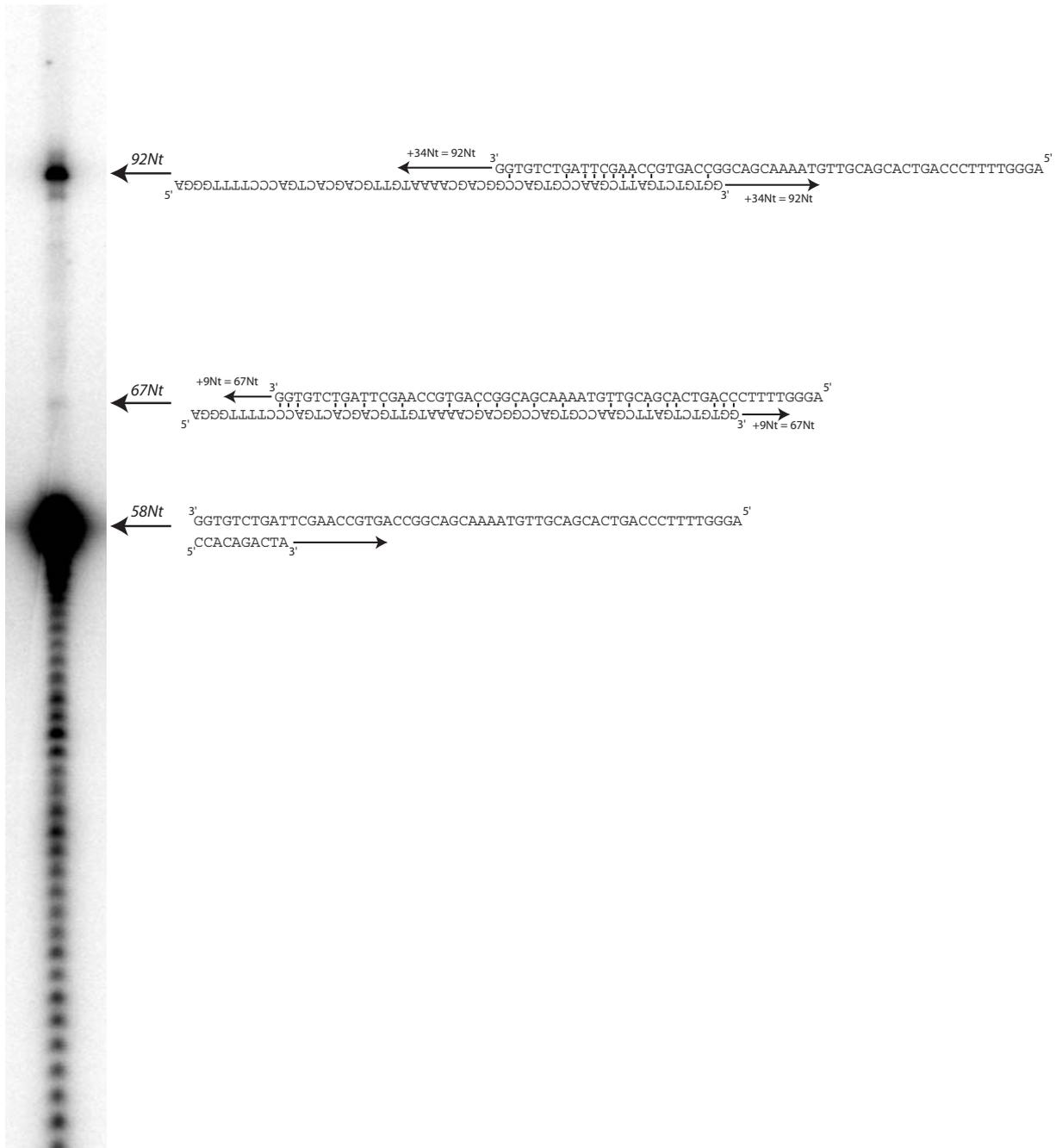


Figure 60 : Marquage de la sonde : l'hybridation du primer sur la matrice conduit à l'élongation du produit radiomarqué attendu de 58Nt. L'hybridation inattendue de l'oligonucléotide Matrice58 sur lui-même conduit à la formation d'un 67mer et d'un 92mer et par conséquent au marquage radioactif de cet oligonucléotide.

Il peut paraître surprenant vue les prédictions de stabilité des duplex formés, que l'intensité du produit de 92Nt soit supérieure à celle du produit de 67Nt. En fait, cette différence d'intensité ne reflète pas uniquement la quantité relative des deux espèces, mais aussi leur activité spécifique. Or, l'élongation du 67mer n'incorpore que 3 nucléotides radioactifs (dCTP), tandis que le 92mer en incorpore 9. L'activité de ce dernier est donc 3 fois supérieure à celle du 67mer ce qui explique la différence d'intensité.

Pour cette raison, après marquage de la sonde selon le protocole indiqué plus haut, la sonde est purifiée sur gel de manière à éliminer les produits d'élongation non spécifiques. La Figure 61 montre deux images d'une même membrane hybridée une première fois avec la sonde non-purifiée sur gel, puis après déshybridation réhybridée avec la sonde purifiée sur gel d'acrylamide. On voit sur cette figure une nette diminution de la bande de 82Nt, ainsi que celle de 58Nt, après purification de la sonde, ces deux bandes provenant du brin complémentaire au brin sondé révélé par la sonde contaminante. Cependant, les bandes parasites sont toujours visibles après purification de la sonde car celle-ci présente toujours des traces de contaminants dues à des phénomènes d'entraînement lors de la purification sur gel.

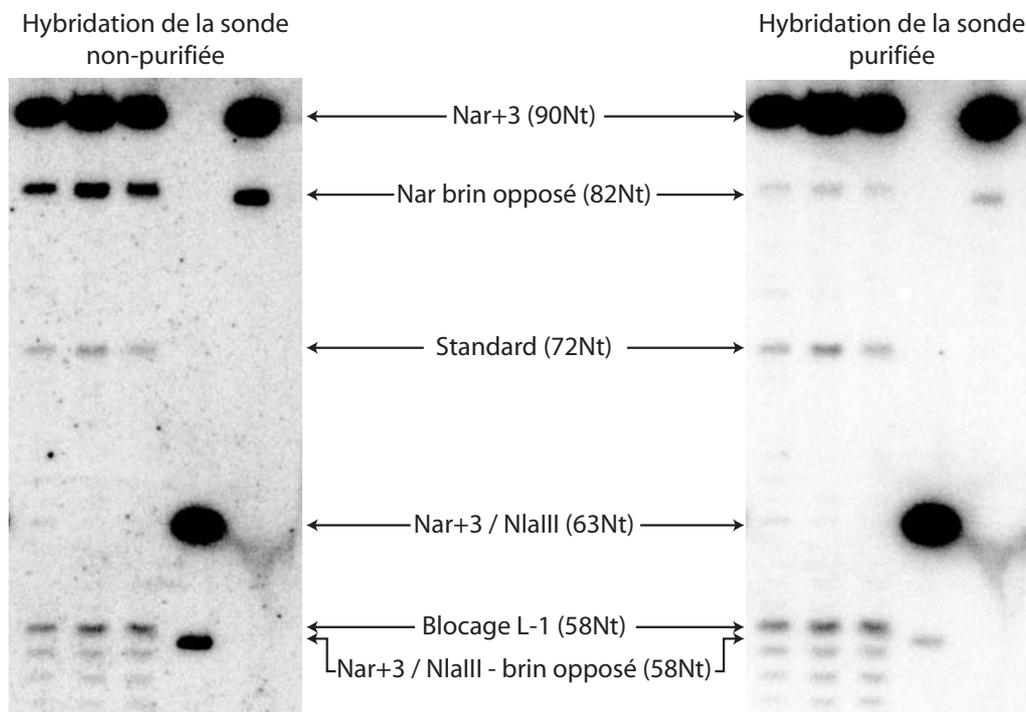


Figure 61 : hybridation d'une même membrane avec la sonde non-purifiée (à gauche) ou après purification de la sonde sur gel d'acrylamide (à droite).

### 3.5. Hybridation de la sonde

Après fixation de l'ADN sur la membrane, celle-ci est rincée dans du SSC x6, puis pré-hybridée 15 minutes à 68°C dans 20ml de solution APH (Aqueous Prehybridization – Hybridization buffer : SSC x5 ; Denhart x5 ; SDS 1% ; ADN de sperme de saumon dénaturé 0,1mg/ml). Après ces 15 minutes, la solution APH est éliminée et remplacée par 20 ml de solution APH préchauffée à 68°C auxquels a été ajoutée la sonde radioactive. La membrane est ainsi hybridée durant la nuit sous agitation à 68°C, puis lavée 2 fois 5 minutes à

température ambiante dans la solution Wasch1 (SSC x2 – SDS 0,1%), 2 fois 5 minutes dans la solution Wasch2 (SSC 0,2x – SDS 0,1%), rincée dans du SSCx2, emballée dans un film plastique (type saran) et mise à exposer sur un écran phosphore Kodak.

### 3.6. Analyse des résultats

L'écran phosphore est scanné par un Personal Molecular Imager® FX de BioRad, et les données sont analysées à l'aide du logiciel de quantification Quantity-One® (BioRad). Le bruit de fond est soustrait selon le mode "local background" qui permet de soustraire un bruit de fond propre à chaque région de la membrane où est effectuée la quantification. Les trois bandes de la gamme standard permettent d'effectuer une régression linéaire : l'équation de régression obtenue permet d'attribuer une quantité d'ADN à chaque bande. Toutes les bandes de chaque colonne (correspondant à une extraction) sont corrigées en fonction de l'intensité du standard interne ajouté au moment de l'extraction (bande de 72Nt). Un facteur multiplicatif est appliqué aux points où l'extraction n'a été effectuée que sur la moitié ou le quart des cellules (ceci afin de ne pas saturer les bandes sur la membrane).

Les données ainsi collectées sont ensuite reportées sur un graphique en fonction du temps où s'est faite l'extraction, comme montré dans la partie Résultats. L'échelle des ordonnées est de type logarithmique puisque les courbes suivent une équation exponentielle de type :

$$Q = Q_0 \cdot e^{k \cdot t}$$

où  $Q$  représente la quantité d'ADN au temps  $t$ ,  $Q_0$  la quantité d'ADN au temps  $t=0$  et  $k$  la constante qui définit la pente de la droite (en coordonnées semi-log)

Ainsi le temps de doublement ( $t_d$ ) se définit comme suit :

$$t_d = \frac{\ln 2}{k}$$

Soient A et B deux courbes de cinétique d'équation respectives :

$$Q = Q_A \cdot e^{k_A \cdot t}$$

$$Q = Q_B \cdot e^{k_B \cdot t}$$

On obtient le retard de B par rapport à A de la manière suivante :

$$t_{retard} = \frac{\ln \frac{Q_A}{Q_B}}{k_B}$$

Nous prendrons comme exemple la cinétique de répliation du plasmide pCUL+Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3 (Pagès and Fuchs, 2003), dont les trois premiers points de cinétique sont reportés à la Figure 62.

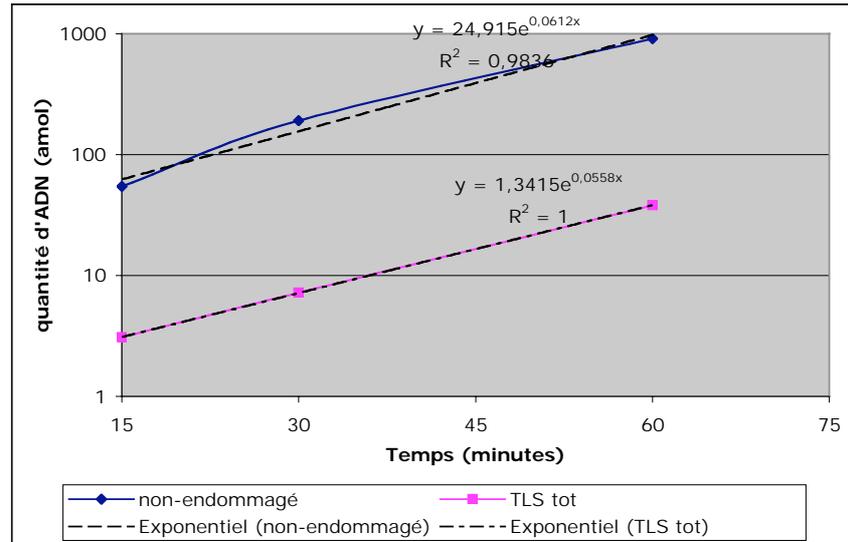


Figure 62 : Cinétique de répliation du plasmide pCUL+Nar3<sup>AAF</sup>/Nar+3, et équation des courbes de tendance.

Les équations correspondant aux courbes de quantification sont calculées par le logiciel Excel.  $R^2$  représente le coefficient de détermination.

On a donc pour la répliation du brin non endommagé :

$$Q_A=24,915 \text{ et } k_A=0,0612$$

Le temps de doublement est donc de  $t_d = \ln 2/k = 11,3$  minutes

Et pour la TLS :

$$Q_B=1,341 \text{ et } k_B=0,0558$$

Le temps de doublement est donc de  $t_d = \ln 2/k = 12,4$  minutes

Le retard est de :

$$t_{retard} = \frac{\ln \frac{Q_A}{Q_B}}{k_B} = \frac{\ln \frac{24,91}{1,34}}{0,056} = 52 \text{ min}$$

## **4. Construction des plasmides**

Les plasmides contenant une lésion unique AAF et une boucle en face de cette lésion sont construits comme décrit précédemment (Broschard et al., 1999) et selon le schéma représenté Figure 63. Deux plasmides qui ne diffèrent qu'au niveau d'une séquence de 18 nucléotides, sont linéarisés par deux enzymes de restriction différentes (A), dénaturés puis renaturés pour former un hétéroduplexe contenant une brèche de 18 nucléotides partiellement complémentaire à l'oligonucléotide Nar de 15 mer contenant une lésion AAF unique (B). La ligation de cet oligonucléotide permet d'obtenir un vecteur circulaire fermé qui peut être isolé par centrifugation en gradient de chlorure de césium (C).

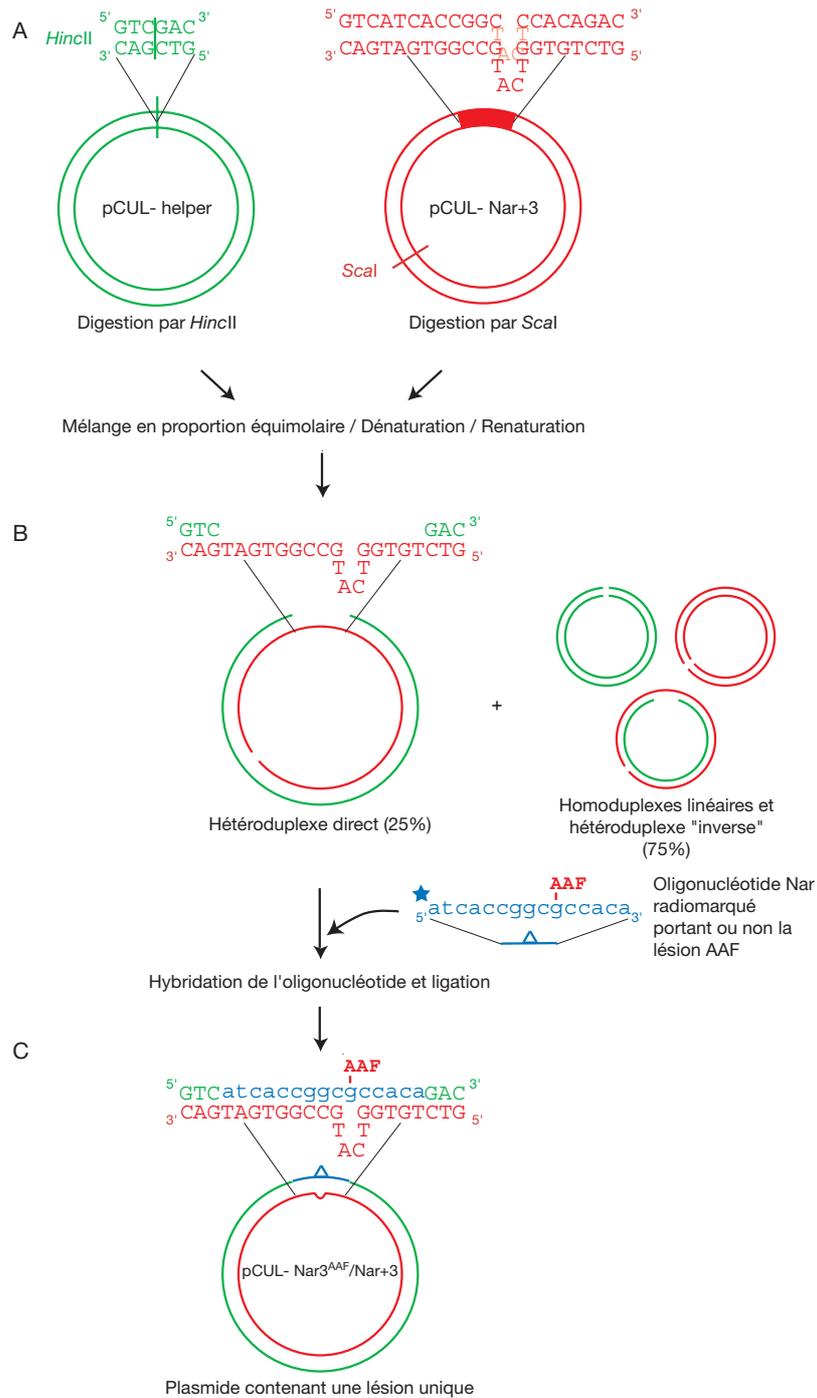


Figure 63 : Principe de construction des plasmides pCUNar/Nar+3 (Gasser and Fuchs, 2003)

Les plasmides pKB110 Nar/Nar+3 et pKB110 Nar/Nar+3+2 sont construits selon le même principe, en utilisant le même oligonucléotide Nar<sup>3AAf</sup>.

50µg de plasmide pCU Nar+3 ou pKB110 Nar+3 ou encore pKB110 Nar+3+2 sont digérées par *Scal*, et 50µg du plasmide Helper correspondant sont digérés par *HincII*. Après

contrôle des digestions, et précipitation, 25µg de chaque plasmide sont mélangés dans un volume final de 5ml de Tampon GM x1 (10mM TrisHCl pH7, 10mM NaCl, 1mM EDTA), incubé 3'30 à 99°C en agitant pour bien dénaturer les plasmides, puis refroidis rapidement sur glace (5 minutes). 40µl de NaCl 5M sont ajoutés au mélange avant incubation 1h30 à 55°C. On laisse ensuite le mélange redescendre lentement à température ambiante pour permettre l'hybridation et donc la formation des Gap-duplexes.

L'oligonucléotide Nar0 ou Nar3<sup>AAF</sup> (obtenu par modification chimique puis purification sur colonne HPLC) est marqué par une kinase au <sup>32</sup>P et purifié sur gel d'acrylamide. Le rendement de purification est estimé par quantification de l'oligonucléotide au compteur à scintillation.

L'oligonucléotide ainsi obtenu est mélangé aux 5ml de Gap-duplex précédemment obtenu (rapport oligonucléotide/gap-duplex  $\geq 1$ ) et sont ajoutés 0,5ml de Tampon de ligation x10 (100mM TrisHCl pH7,5 ; 100mM MgCl<sub>2</sub> ; 100mM DTT). Ce mélange est incubé 2 minutes à 65°C, puis 30 minutes à 20°C pour permettre l'hybridation de l'oligonucléotide dans la brèche. On ajoute 50µl d'ATP 0,1M et le mélange est équilibré pendant 10 minutes à 16°C. La T4 DNA ligase (400U) est alors ajoutée : le temps de ligation ne dure que 3 minutes pour limiter au minimum la ligation des plasmides parentaux sur eux-même. Les plasmides circulaires ainsi obtenus sont purifiés par une ultra-centrifugation dans un gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (BET). La quantification des plasmides se fait dans un premier temps par un comptage de radioactivité en scintillation (l'oligonucléotide incorporé étant radioactif), puis cette estimation est ajustée par quantification sur gel d'agarose en présence de BET. Toutes les étapes de ce protocole sont contrôlées sur gel d'agarose.

## 5. Plasmides utilisés

Au cours de la partie résultats, j'ai utilisé dans un premier temps les plasmides pCU L- et L+ Nar/Nar+3 (construits par Véronique Gasser). J'ai ensuite utilisé des plasmides semblables, mais dont la distance séparant la lésion de la fin du plasmide était rallongée afin d'essayer d'observer un blocage de la réplication d'un brin non endommagé : il s'agit des plasmides pKB110 L- et L+ Nar/Nar+3 (construits par Nicole Koffel). Enfin, j'ai réalisé la construction des plasmides pKB110 L- et L+ Nar/Nar+3/+2 possédant une hétérologie de séquence supplémentaire (boucle +2) dans le but d'étudier les phénomènes de contournement

de dommages. Les cartes de ces plasmides indiquant l'orientation de l'origine de réplication et du gène *lacZ'*, ainsi que la distance séparant la lésion de l'origine sont représentées à la Figure 64.

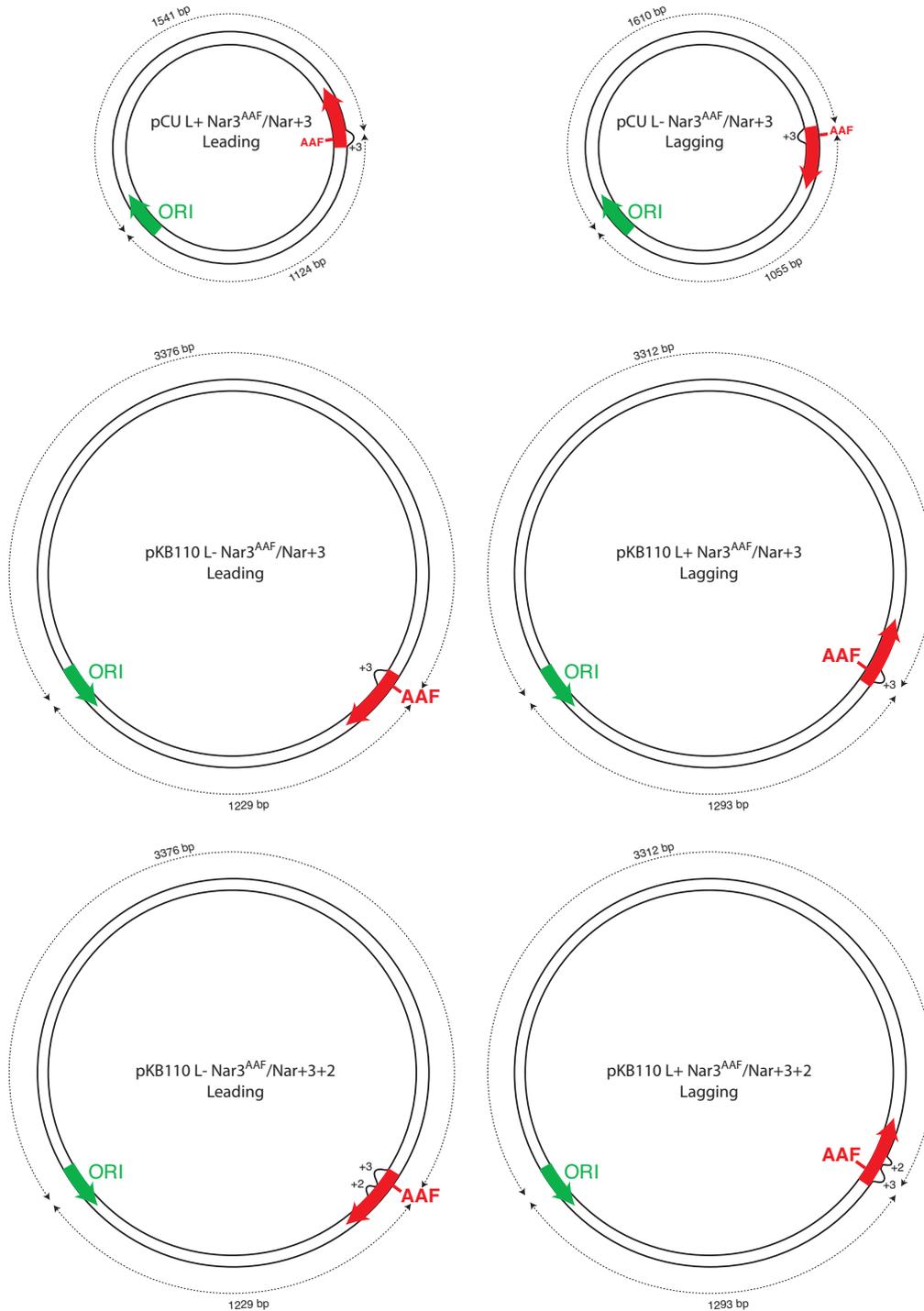


Figure 64 : Cartes des différents plasmides utilisés. La flèche verte représente l'origine de réplication ColE1. La flèche rouge représente le gène *lacZ'* où se site la lésion AAF ainsi que les boucles +3 et +2.

La Figure 65 représente la séquence de la région BstNI-NlaIII analysée pour chacun de ces plasmides.

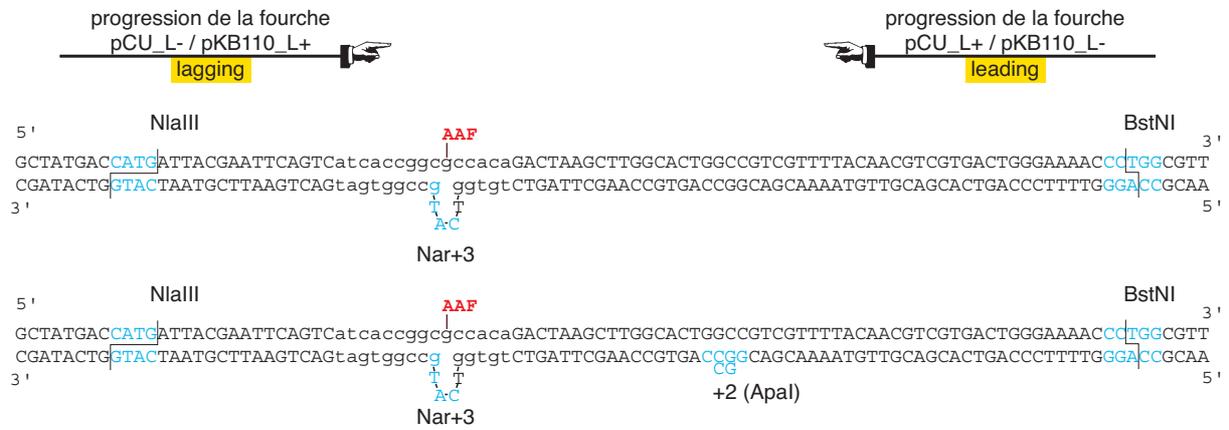


Figure 65 : Séquence de la région analysée des plasmides pCU et pKB110.

## Partie V.- ANNEXES

### I. Annexe I : *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*

Avant de me consacrer au projet qui vient d'être décrit, je me suis attaché à l'étude du gène *recX* potentiellement impliqué dans la mutagenèse chez *Escherichia coli*.

Le point de départ de cette étude a été l'observation suivante : dans deux mutants de *recA* différents, nous avons observé une différence de la fréquence de mutagenèse induite au niveau du site de restriction NarI (un point chaud de mutagenèse).

Dans la souche *recA99* où le sixième codon du gène *recA* est muté en un codon STOP, la mutagenèse est augmentée d'un facteur 4 par rapport à une souche sauvage pour l'allèle *recA*. Dans la souche  $\Delta recA306$ , où la délétion déborde le cadre du gène *recA*, le facteur d'augmentation de la mutagenèse par rapport à la souche sauvage est cette fois-ci de 8. Nous nous sommes donc intéressés aux gènes voisins de *recA* qui pouvaient avoir été modifiés dans cette souche  $\Delta recA306$ , et non dans la souche *recA99*, ce qui expliquerait la différence de phénotype entre les deux souches. Nous avons choisi d'étudier le gène *recX* (également appelé *oraA*), situé 68 nucléotides en aval de *recA* chez *Escherichia coli*. Ce gène a déjà été étudié chez de nombreux organismes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Sano, 1993), *Mycobacterium tuberculosis* (Papavinasundaram et al., 1998), *Streptomyces lividans* (Vierling et al., 2000), etc..., mais aucune de ces études n'a permis d'attribuer une fonction précise au gène *recX*.

J'ai d'abord réalisé l'étude transcriptionnelle de *recX* par les techniques de Northern et d'extension d'amorce, ce qui a permis de montrer que *recX* est un gène SOS, dont l'expression est donc dépendante des protéines LexA et RecA. Une étude plus poussée de la transcription de *recX*, à l'aide de fusions transcriptionnelles entre la région en amont de *recX* et le gène reporter *lacZ*, a montré que la région minimum nécessaire à la transcription du gène *recX* incluait le gène *recA* en entier, ainsi que son promoteur et son opérateur. *recX* est donc co-transcrit avec *recA* dans un opéron SOS-inductible : la transcription de *recX* se fait au travers du site de terminaison de la transcription de *recA* dans une proportion de 5 à 10% du transcrit *recA*.

Je me suis ensuite attaché à rechercher une fonction à la protéine RecX : j'ai dans un premier temps inactivé le gène au niveau chromosomique en insérant la cassette kanamycine dans la séquence codante du gène de manière à l'interrompre. La recherche d'un phénotype simple chez ces mutants n'a pas permis de voir de modification de la sensibilité aux UV, ni une incidence sur l'expression de *recA* comme cela avait été suggéré par certains auteurs. Cette étude du gène *recX* a fait l'objet d'une publication présentée ici (Pagès et al., 2003).

[signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

**Vincent Pages**, Nicole Koffel-Schwartz and Robert P.P. Fuchs

RecX, a new SOS gene that is co-transcribed with the recA gene in *Escherichia coli*.

**DNA Repair vol. 2 (2003), 273-284**

Pages 273-284 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://dx.doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00217-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00217-3)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).



## II. Annexe 2 : Supporting Online Material

### Supporting Online Material

#### Material and methods :

**Plasmid constructions.** Single adducted plasmids are constructed by ligation of an oligonucleotide containing a single G-AAG adduct (5'-ATCACCGGCG<sup>AAF</sup>CCACA-) into a 'gapped-duplex' plasmid constructed *in vitro* as described in details elsewhere (S1). Covalently closed circular constructions are isolated by centrifugation on CsCl/Ethydium bromide gradients. All plasmids are pUC derivatives (~2700 nt long) containing a single G-AAF adduct located at ~1600 nt from the unidirectional ColE1 origin of replication. The constructions contain a local sequence heterology shown in figure 1.

**Strains and *in vivo* manipulations.** All strains used in this study are derived from the wild type JM103 strain. The previously described null alleles of *polB* (S2) and *umuDC* (S3) were introduced into strain JM103 by P1 transduction. In order to prevent excision repair of the lesion and mismatch correction of the sequence heterology we introduced *uvrA6-lamB::Tn5* and *mutS-srl::Tn10* alleles respectively. Highly electroporation competent cells were obtained by culturing bacteria at 18°C until OD<sup>600</sup>=0,5. Cells were harvested by centrifugation, resuspended into MgSO<sub>4</sub> and UV-irradiated with a 254nm wavelength lamp at a UV dose leading to about 10% survival (S1). Cells were then diluted in LBx2 and cultivated under aeration at 18°C for expression of the SOS response. After 90 min of expression, competent cells were obtained by the classical procedure (S1).

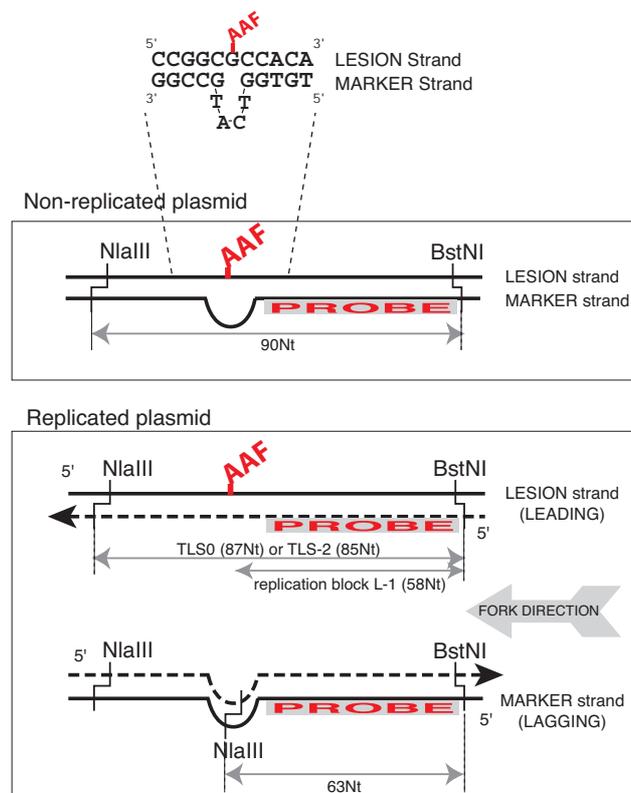
**Replication product analysis.** Following electroporation of 20 µl of competent cells with 40 ng of plasmid construction per time point (ratio plasmid / cell: 15:1), cells were grown in

complete medium at 37°C. At selected time points, aliquots of the cell suspension were centrifuged and washed twice with NaCl 0,5M to eliminate excess plasmid molecules that did not enter the cells. After addition of 1ng of an internal standard circular plasmid, total DNA was extracted from the cells using a classical genomic DNA preparation protocol. Total DNA (~10µg) was digested successively by restriction enzymes *Nla*III and *Bst*NI in a final volume of 20µl. Samples (8µl) were analysed by 8% PAGE at 80W for 2 hours. The gel was then transferred to a Hybond N+ nylon membrane using a semi-dry electro-blotter.

A high specific activity radio-labelled probe was obtained by elongation with KF polymerase (from Biolabs®) of a 10 mers oligonucleotide primer hybridized to a 58-mer template identical to the MARKER strand sequence in the presence of 1.6µM of α-32P-dCTP (3000 Ci/mmmole) and a mixture of dATP, dTTP and dGTP (50µM each). Full length probe was purified by PAGE. The nylon membrane was hybridized with this probe at 68°C in APH (Aqueous Hybridization-Prehybridization buffer) for 16 h and washed two times with SSC x2 / SDS 0.1% and two times with SSC x0.2 / SDS 0.1% at room temperature. Data were analysed with Personal Molecular Imager® FX from Bio-Rad after exposition to Kodak phosphor screen. Quantification was performed with Quantity-One® software from Bio-Rad.

**Supplemental references :**

- S1. T. H. Broschard, N. Koffel-Schwartz, R. P. P. Fuchs, J. Mol. Biol. 288, 191 (1999).
- S2. M. Escarcellar et al., J. Bacteriol. 176, 6221 (1994).
- S3. R. Woodgate, Mut. Res. 281, 221 (1992).

**Figure S1 : Strategy for the analysis of plasmid replication products****Figure S1 : Strategy for the analysis of plasmid replication products.**

Plasmids contain a unidirectional origin of replication derived from ColE1 and a single G-AAF adduct (see material and methods) (S1). The single adduct is located within a short sequence heterology. Following introduction within bacteria, total DNA is extracted and plasmid replication products are analysed by Southern with a probe complementary to the MARKER strand. The key feature that allows both MARKER and LESION strands replication products to be distinguished from non-replicated parental MARKER strand stems from the presence of a +3 nucleotides bulge in the MARKER strand that introduces a new *NlaIII* restriction sequence. This sequence is resistant to *NlaIII* digestion when present in the heteroduplex construct and becomes sensitive only following resolution of the heteroduplex by replication. In the example shown here, fork direction proceeds from the right side, the G-AAF lesion being thus located in the leading strand

## Partie VI.- Bibliographie

- Ason, B., Handayani, R., Williams, C. R., Bertram, J. G., Hingorani, M. M., O'Donnell, M., Goodman, M. F., and Bloom, L. B. (2003). Mechanism of loading the Escherichia coli DNA polymerase III beta sliding clamp on DNA. Bona fide primer/templates preferentially trigger the gamma complex to hydrolyze ATP and load the clamp. *J Biol Chem* 278, 10033-10040.
- Becherel, O. J., and Fuchs, R. P. (2001). Mechanism of DNA polymerase II-mediated frameshift mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8566-8571.
- Becherel, O. J., Fuchs, R. P., and Wagner, J. (2002). Pivotal role of the beta-clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in E. coli cells. *DNA Repair (Amst)* 1, 703-708.
- Bichara, M., and Fuchs, R. P. (1985). DNA binding and mutation spectra of the carcinogen N-2-aminofluorene in Escherichia coli. A correlation between the conformation of the premutagenic lesion and the mutation specificity. *Journal of Molecular Biology* 183, 341-351.
- Borden, A., O'Grady, P. I., Vandewiele, D., Fernandez de Henestrosa, A. R., Lawrence, C. W., and Woodgate, R. (2002). Escherichia coli DNA polymerase III can replicate efficiently past a T-T cis-syn cyclobutane dimer if DNA polymerase V and the 3' to 5' exonuclease proofreading function encoded by dnaQ are inactivated. *J Bacteriol* 184, 2674-2681.
- Broschard, T., Koffel-Schwartz, N., and Fuchs, R. P. P. (1999). Sequence-dependant modulation of frameshift mutagenesis at *NarI*-derived mutation hot spots. *Journal of Molecular Biology* 288, 191-199.
- Brotcorne-Lannoye, A., and Maenhaut-Michel, G. (1986). Role of RecA protein in untargeted UV mutagenesis of bacteriophage lambda: evidence for the requirement for the dinB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3904-3908.
- Cao, Y., and Kogoma, T. (1995). The mechanism of recA polA lethality: suppression by RecA-independent recombination repair activated by the lexA(Def) mutation in Escherichia coli. *Genetics* 139, 1483-1494.
- Chuang, S. E., Chen, A. L., and Chao, C. C. (1995). Growth of E. coli at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res* 23, 1641.
- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1991-1995.
- 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*.
- Dallmann, H. G., and McHenry, C. S. (1995). DnaX complex of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme. Physical characterization of the DnaX subunits and complexes. *J Biol Chem* 270, 29563-29569.
- Dallmann, H. G., Thimmig, R. L., and McHenry, C. S. (1995). DnaX complex of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme. Central role of tau in initiation complex assembly and in determining the functional asymmetry of holoenzyme. *J Biol Chem* 270, 29555-29562.

- Delagoutte, E., Bertrand-Burggraf, E., Lambert, I. B., and Fuchs, R. P. (1996). Binding and incision activities of UvrABC excinuclease on slipped DNA intermediates that generate frameshift mutations. *J Mol Biol* 257, 970-976.
- Eynard, N., Sixou, S., Duran, N., and Teissie, J. (1992). Fast kinetics studies of Escherichia coli electrotransformation. *Eur J Biochem* 209, 431-436.
- Fijalkowska, I. J., and Schaaper, R. M. (1996). Mutants in the Exo I motif of Escherichia coli dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2856-2861.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis, 1<sup>o</sup> edn (Washington, ASM Press).
- Fuchs, R., and Daune, M. (1972). Physical studies on deoxyribonucleic acid after covalent binding of a carcinogen. *Biochemistry* 11, 2659-2666.
- Fuchs, R. P., Koffel-Schwartz, N., Pelet, S., Janel-Bintz, R., Napolitano, R., Becherel, O. J., Broschard, T. H., Burnouf, D. Y., and Wagner, J. (2001). DNA polymerases II and V mediate respectively mutagenic (-2 frameshift) and error-free bypass of a single N-2-acetylaminofluorene adduct. *Biochem Soc Trans* 29, 191-195.
- Fuchs, R. P., Schwartz, N., and Daune, M. P. (1981). Hot spots of frameshift mutations induced by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Nature* 294, 657-659.
- Fuchs, R. P. P., and Napolitano, R. L. (1998). Inactivation of DNA proofreading obviates the need for SOS induction in frameshift mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13114-13119.
- Gao, D., and McHenry, C. S. (2001). tau binds and organizes Escherichia coli replication proteins through distinct domains. Domain IV, located within the unique C terminus of tau, binds the replication fork, helicase, DnaB. *J Biol Chem* 276, 4441-4446.
- Gasser, V., and Fuchs, R. (2003). Étude de la synthèse translésionnelle de lésions UV-induites chez *E.coli* (Rapport de DEA) (Strasbourg, UPR 9003 du CNRS - Université Louis Pasteur - Strasbourg).
- Glover, B. P., and McHenry, C. S. (2001). The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell* 105, 925-934.
- Goodgal, S. H., and Mitchell, M. A. (1990). Sequence and uptake specificity of cloned sonicated fragments of Haemophilus influenzae DNA. *J Bacteriol* 172, 5924-5928.
- Higgins, N. P., Kato, K., and Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 101, 417-425.
- Higuchi, K., Katayama, T., Iwai, S., Hidaka, M., Horiuchi, T., and Maki, H. (2003). Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication in vitro. *Genes Cells* 8, 437-449.
- Howard-Flanders, P., Theriot, L., and Stedford, J. B. (1969). Some properties of excision-defective recombination-deficient mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 97, 1134-1141.
- Indiani, C., and O'Donnell, M. (2003). Mechanism of the {delta} Wrench in Opening the {beta} Sliding Clamp. *J Biol Chem* 278, 40272-40281.
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (2001a). Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell* 106, 429-441.
- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (2001b). Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell* 106, 417-428.

- Jonczyk, P., Nowicka, A., Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., and Ciesla, Z. (1998). In vivo protein interactions within the Escherichia coli DNA polymerase III core. *J Bacteriol* *180*, 1563-1566.
- Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* *64*, 171-200.
- Kelman, Z., Yuzhakov, A., Andjelkovic, J., and O'Donnell, M. (1998). Devoted to the lagging strand-the chi subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly. *Embo J* *17*, 2436-2449.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S., and Marians, K. J. (1996a). Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* *84*, 643-650.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S., and Marians, K. J. (1996b). tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the Escherichia coli DNA replication fork. *J Biol Chem* *271*, 21406-21412.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S., and Marians, K. J. (1996c). Tau protects beta in the leading-strand polymerase complex at the replication fork. *J Biol Chem* *271*, 4315-4318.
- Kim, S. R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T., and Ohmori, H. (1997). Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in Escherichia coli: an overexpression of dinB/dinP results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13792-13797.
- Kim, S. R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., and Nohmi, T. (2001). Roles of chromosomal and episomal dinB genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in Escherichia coli. *Mol Genet Genomics* *266*, 207-215.
- Koffel-Schwartz, N., Coin, F., Veaute, X., and Fuchs, R. P. P. (1996). Cellular strategies for accomodating replication-hindering adducts in DNA: control by the SOS response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 7805-7810.
- Koffel-Schwartz, N., Verdier, J. M., Bichara, M., Freund, A. M., Daune, M. P., and Fuchs, R. P. (1984). Carcinogen-induced mutation spectrum in wild-type, uvrA and umuC strains of Escherichia coli. Strain specificity and mutation-prone sequences. *J Mol Biol* *177*, 33-51.
- Kornberg, A., and Baker, T. A. (1992). DNA replication, Second edn (New York, W.H. Freeman and Company).
- Lenne-Samuel, N., Wagner, J., Etienne, H., and Fuchs, R. P. (2002). The processivity factor beta controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis in vivo. *EMBO Rep* *3*, 45-49.
- Leu, F. P., Georgescu, R., and O'Donnell, M. (2003). Mechanism of the E. coli tau Processivity Switch during Lagging-Strand Synthesis. *Mol Cell* *11*, 315-327.
- Lindsley, J. E., and Fuchs, R. P. (1994). Use of single-turnover kinetics to study bulky adduct bypass by T7 DNA polymerase. *Biochemistry* *33*, 764-772.
- Maki, H., Mo, J. Y., and Sekiguchi, M. (1991). A strong mutator effect caused by an amino acid change in the alpha subunit of DNA polymerase III of Escherichia coli. *J Biol Chem* *266*, 5055-5061.
- McHenry, C. S. (2003). Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol* *49*, 1157-1165.
- McHenry, C. S., and Johanson, K. O. (1984). DNA polymerase III holoenzyme of Escherichia coli: an asymmetric dimeric replicative complex containing distinguishable leading and lagging strand polymerases. *Adv Exp Med Biol* *179*, 315-319.

- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R. P. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, pol IV and pol V) are involved in induced mutagenesis. *Embo J* 19, 6259-6265.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., *et al.* (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 8, 7-8.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Naktinis, V., Turner, J., Fang, L., and O'Donnell, M. (1995). Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. I. Organization of the clamp loader. *J Biol Chem* 270, 13348-13357.
- Pagès, V., and Fuchs, R. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 21, 8957-8966.
- Pagès, V., and Fuchs, R. P. (2003). Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science* 300, 1300-1303.
- Pagès, V., Koffel-Schwartz, N., and Fuchs, R. P. (2003). *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2, 273-284.
- Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., and Davis, E. O. (1998). Construction and complementation of *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Molecular Microbiology* 30, 525-534.
- Podobnik, M., Weitze, T. F., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (2003). Nucleotide-induced conformational changes in an isolated *Escherichia coli* DNA polymerase III clamp loader subunit. *Structure (Camb)* 11, 253-263.
- Pritchard, A. E., Dallmann, H. G., Glover, B. P., and McHenry, C. S. (2000). A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of  $\delta\delta'$  with DnaX(4) forms DnaX(3) $\delta\delta'$ . *Embo J* 19, 6536-6545.
- Pritchard, A. E., and McHenry, C. S. (2001). Assembly of DNA polymerase III holoenzyme: co-assembly of gamma and tau is inhibited by DnaX complex accessory proteins but stimulated by DNA polymerase III core. *J Biol Chem* 276, 35217-35222.
- Qiu, Z., and Goodman, M. F. (1997). The *Escherichia coli* polB locus is identical to *dinA*, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant. *J Biol Chem* 272, 8611-8617.
- Rangarajan, S., Woodgate, R., and Goodman, M. F. (1999). A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9224-9229.
- Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A., and Livneh, Z. (1999). The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 31763-31766.
- Sano, Y. (1993). Role of the *recA*-related gene adjacent to the *recA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 175, 2451-2454.
- Savic, D. J., Jankovic, M., and Kostic, T. (1990). Cellular role of DNA polymerase I. *J Basic Microbiol* 30, 769-784.
- Schaaper, R. M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 23762-23765.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., and Michel, B. (1998). RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95, 419-430.
- Sisco, K. L., and Smith, H. O. (1979). Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 972-976.

- Taft-Benz, S. A., and Schaaper, R. M. (1998). Mutational analysis of the 3'→5' proofreading exonuclease of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* 26, 4005-4011.
- Takano, K., Nakabeppu, Y., Maki, H., Horiuchi, T., and Sekiguchi, M. (1986). Structure and function of *dnaQ* and *mutD* mutators of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 205, 9-13.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., and Goodman, M. F. (1999). UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8919-8924.
- Toman, Z., Dambly-Chaudiere, C., Tenenbaum, L., and Radman, M. (1985). A system for detection of genetic and epigenetic alterations in *Escherichia coli* induced by DNA-damaging agents. *J Mol Biol* 186, 97-105.
- Turner, J., Hingorani, M. M., Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1999). The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *Embo J* 18, 771-783.
- Vierling, S., Weber, T., Wohlleben, W., and Muth, G. (2000). Transcriptional and Mutational Analyses of the *Streptomyces lividans* *recX*. *Journal of Bacteriology* 182, 4005-4011.
- Wagner, J., Fujii, S., Gruz, P., Nohmi, T., and Fuchs, R. P. (2000). The beta clamp targets DNA polymerase IV to DNA and strongly increases its processivity. *EMBO Rep* 1, 484-488.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.-R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. P., and Nohmi, T. (1999). The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA Pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular Cell* 4, 281-286.
- Woodgate, R., Bridges, B. A., Herrera, G., and Blanco, M. (1987). Mutagenic DNA repair in *Escherichia coli*. XIII. Proofreading exonuclease of DNA polymerase III holoenzyme is not operational during UV mutagenesis. *Mutat Res* 183, 31-37.
- Woodgate, R., and Ennis, D. G. (1991). Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for in vivo UmuD cleavage. *Mol Gen Genet* 229, 10-16.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1999). Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell* 96, 153-163.