



EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR DES COMPLEXES ADN-PROTÉINE

Nathalie Gillard

► To cite this version:

Nathalie Gillard. EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR DES COMPLEXES ADN-PROTÉINE. domain_other. Université d'Orléans, 2005. Français. NNT: . tel-00011412

HAL Id: tel-00011412

<https://theses.hal.science/tel-00011412>

Submitted on 18 Jan 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE
Présentée à l'université d'Orléans
en vue de l'obtention du titre de docteur de l'Université d'Orléans

Discipline :
Biologie et Biophysique Moléculaires et Cellulaires

par

Nathalie GILLARD

EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR DES
COMPLEXES ADN-PROTEINE

Soutenue le 25 novembre 2005

MEMBRES DU JURY :

Pr. Francis DELMOTTE
Dr. Evelyne SAGE
Dr. Thierry DOUKI
Pr. Françoise VOVELLE
Dr. Mélanie SPOTHEIM-MAURIZOT

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans.

Je suis très reconnaissante à Monsieur Francis Delmotte, Professeur à l'Université d'Orléans, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens à remercier également Madame Evelyne Sage, Directeur de Recherche à l'Institut Curie, et à Monsieur Thierry Douki, Chercheur au CEA, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Madame Françoise Vovelle, Professeur à l'Université d'Orléans, d'avoir accepté de faire partie du jury

Je souhaite remercier très chaleureusement Madame Mélanie Spotheim-Maurizot, Chargée de Recherche à l'INSERM, pour m'avoir encadrée et soutenue pendant ces trois années de thèse.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Monsieur Michel Charlier, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe Radiobiologie des Acides Nucléiques et des Protéines ainsi que pour ses nombreux conseils.

Merci également à Mesdames Françoise Culard et Denise Sy ainsi qu'à Messieurs Stéphane Goffinont et Alain Gervais pour leurs aides scientifiques et techniques.

Je remercie également les nombreux collaborateurs de cette étude:

- Monsieur Bertrand Castaing pour le temps passé lors de la purification de la protéine Fpg ainsi que pour les conseils et discussions
- Madame Agnès Delmas et Monsieur Dominique Lelièvre qui m'ont initiée à la synthèse peptidique
- Messieurs Jean-Claude Maurizot et Mathieu Réfrégier, ainsi que Madame Simona Miron pour leur aide dans la partie spectroscopique de ce travail
- Madame Véronique Piller et Monsieur Friedrich Piller
- Mesdames Corine Buré et Martine Cadène de l'équipe de spectrométrie de masse
- Mesdames Maria Begusova et Viktorka Stisova de l'Institut de Physique Nucléaire de Prague (République Tchèque)

Un remerciement tout particulier à Edouard Sèche, Samia Aci, Pierre Aller, Philippe Labrot, Céline Walmacq, Eric Mennesson, Vanessa Bourdeaux, Michael Mockey, Véronique Hamon, Stéphanie Duclos, Gaëlle-Anne Cremer, Pedro DaSilva, Claire Crola, Mélanie Duneau, Natacha Frison, Valérie Vilouin, Laure Gangneux, Karine Pereira de Jesus, Simon Amiard, Yuliya Sedletska, Aurélie Gombault, Béatrice Vallée, Fabienne Godin, Oumarou Soumana-Samna, Aurélien Rapailles....

Merci aussi à Caro, Christelle et aux chimistes.

Pour terminer, je tenais particulièrement à remercier mes parents, ma sœur et Tom qui, par leur confiance et leur soutien quotidien m'ont permis d'en arriver là.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION.....	7
GENERALITES.....	10
1 - LES RAYONNEMENTS IONISANTS	11
1. 1. Généralités sur les radiations ionisantes	11
1. 2. Les types de rayonnements ionisants	12
1. 2. 1. Les radiations indirectement ionisantes	12
1. 2. 2. Les radiations directement ionisantes	15
1. 3. Caractérisation d'un rayonnement ionisant	16
1. 4. La radiolyse de l'eau.....	18
1. 5. La radiolyse de l'ADN.....	21
1. 5. 1. Les coupures de chaînes ou cassures franches	22
1. 5. 2. Les altérations de bases	25
1. 5. 3. Les sites abasiques	26
1. 5. 4. Les pontages ADN-protéines	27
1. 5. 5. Les sites à dommages multiples	28
1. 5. 6. Facteurs modifiant la radiosensibilité de l'ADN.....	29
1. 6. La radiolyse des protéines.....	31
1. 6. 1. Attaque de la chaîne peptidique	31
1. 6. 2. Attaque des chaînes latérales.....	32
1. 6. 3. Transfert de dommages	36
1. 6. 4. Biochimie de l'oxydation des protéines	38
2- LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE	40
2. 1. Structure et fonction du répresseur lac	40
2. 1. 1. Généralités.....	40
2. 1. 2. Séquences opératrices	41
2. 1. 3. Le répresseur lac	42
2. 2. Effet des rayonnements ionisants sur le système de l'opéron lactose.....	48
3- LA FORMAMIDOPYRIDINE-DNA GLYCOSYLASE.....	52
3. 1. Généralités sur les mécanismes de réparation de l'ADN	52
3. 2. Le système BER.....	54
3. 3. La formamidopyrimidine-DNA glycosylase	55
3. 3. 1. Généralités.....	55
3. 3. 2. Activité enzymatique de Fpg.....	57
3. 3. 3. La spécificité de substrat de Fpg	60
MATERIELS ET METHODES	63
1. Expression et purification des protéines	64
1. 1. Préparation du répresseur lactose	64
1. 2. Préparation du peptide headpiece	64
1. 3. Préparation de la protéine Fpg	65
2. Préparation des fragments d'ADN.....	65
2. 1. Préparation de fragments d'ADN portant la séquence opératrice de l'opéron lactose.....	65
2. 2. Préparation de fragments d'ADN portant une modification de nucléotides	67

3. Marquage radioactif des fragments d'ADN.....	67
4. Formation des complexes ADN-protéine.....	68
5. Irradiations des échantillons.....	69
6. Electrophorèse en gel retard.....	69
7. Electrophorèse en gel de séquence.....	69
8. Electrophorèse en gel d'agarose.....	70
9. Electrophorèse en gel SDS-PAGE.....	71
10. Affinité répresseur- inducteur.....	72
11. Fluorescence.....	73
12. Dichroïsme circulaire.....	73
13. Spectrométrie de masse.....	74
RESULTATS ET DISCUSSION	75
1. LE REPRESSEUR DE L'OPERON LACTOSE.....	76
1. 1. Effet de l'irradiation sur le complexe lac répresseur- lac opérateur.....	76
1. 2. Etude des <i>headpieces</i>	81
1. 2. 1. Conformation et activité de la <i>headpiece</i>	81
1. 2. 2. Intégrité de la chaîne peptidique de la <i>headpiece</i> irradiée.....	83
1. 2. 3. Conformation de la <i>headpiece</i> irradiée.....	84
1. 2. 4. Etude par fluorescence de la radiolyse de la <i>headpiece</i>	87
1. 2. 5. Etude des dommages par spectrométrie de masse.....	91
1. 3. Effet de l'irradiation sur l'induction <i>in vitro</i> du système lac répresseur- lac opérateur.....	105
1. 3. 1. Altération de l'induction.....	105
1. 3. 2. Diminution de l'affinité du répresseur irradié pour l'IPTG.....	107
1. 3. 3. Destruction du site IPTG.....	108
1. 3. 4. Endommagement des résidus Tryptophane.....	110
1. 3. 5. Protection par l'IPTG de son site de fixation.....	112
1. 3. 6. Capture des radicaux par l'IPTG.....	113
1. 3. 7. Destruction de l'IPTG par irradiation.....	115
1. 3. 8. Modèle général de radiolyse du répresseur en présence d'IPTG.....	116
1. 3. 9. Modèle: dysfonctionnement du système lac répresseur-lac opérateur après irradiation.....	118
2. LA PROTEINE FPG.....	121
2. 1. Etude d'un mutant : P1G-LIFpg.....	121
2. 1. 1. Effet de l'irradiation sur la complexation de P1G-L/Fpg à un ADN portant une lésion.....	121
2. 2. Etude la protéine Fpg sauvage de <i>Escherichia coli</i>	128
2. 2. 1. Activité et fixation de la protéine non irradiée à un ADN portant une lésion.....	128
2. 2. 2. Activité et fixation de la protéine irradiée à un ADN portant une lésion.....	130
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	141
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	157

Liste des principales abréviations

4-HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C	Cytosine
CDB	Coupure double brin
CSB	Coupure simple brin
DO	Densité optique
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ESI-IT	Spectrométrie de masse sous ionisation électrospray
Fapy	Formamidopyrimidine
Fpg	Formamidopyrimidine ADN-glycosylase
G	Guanine
H2TH	motif hélice-deux tours-hélice
HP	<i>headpiece</i>
HTH	motif hélice-tour-hélice
IPTG	Isopropyl-thio- β -galactoside
<i>lac</i>	lactose
<i>Ll</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
m/z	rapport masse sur charge
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight
MC1	Methanogen Chromosomal protein 1
MS	Spectrométrie de masse
Pb	paire de bases
PDB	Protein Data Bank
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide et Sodium Dodécyl Sulfate
T	Thymine
TEL	Transfert d'énergie linéique
TFA	Acide trifluoroacétique
TRIS	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

Introduction

La radiobiologie étudie les effets des rayonnements ionisants sur les êtres vivants. Ainsi, la radiothérapie est une des armes de traitement des cancers et des progrès restent à faire dans ce domaine. D'autre part, vu le développement de l'imagerie radiologique et de la médecine nucléaire, ainsi que les risques d'exposition potentielle auxquelles sont soumises les populations suite à un incident dans une centrale nucléaire, la radioprotection prend de plus en plus d'importance.

Si l'intérêt des radiobiologistes a porté, pendant des dizaines d'années, sur l'effet nocif des radiations ionisantes sur les cellules et sur la molécule d'ADN (cible critique des radiations), cet effet n'a été que peu étudié sur les systèmes nucléoprotéiques. Or la destruction radio-induite des complexes ADN-protéines peut avoir des conséquences graves dans le cas des systèmes impliqués dans des fonctions cellulaires importantes telles que la régulation de l'expression des gènes ou la réparation de dommages induits par le stress oxydant, le vieillissement ou l'exposition à des agents chimiques.

L'équipe de Radiobiologie des Acides Nucléiques du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, après avoir étudié pendant plusieurs années les dommages radio-induits de l'ADN, seul ou en présence de petits ligands, a commencé à s'intéresser à la radiolyse de systèmes nucléoprotéiques en prenant comme modèle le système de l'opéron lactose. Il a ainsi été montré que l'irradiation du complexe répresseur *lac*-opérateur *lac* rompt la reconnaissance ADN-protéine, l'effet étant dû à l'endommagement des deux partenaires. Il a également été mis en évidence que les dommages critiques pour la destruction du complexe étaient ceux portés par la protéine, plus que portés par l'ADN. Même si les radiations induisent des modifications de bases et des coupures de chaîne de l'ADN, ces modifications ne sont pas les dommages critiques pour la destruction du complexe ADN-protéine. Ce sont les modifications d'acides aminés qui jouent un rôle fondamental dans la perte de fixation du répresseur à sa séquence opératrice.

Cette thèse, qui s'inscrit dans la continuité des travaux de l'équipe, est dédiée à l'étude des effets des radiations ionisantes sur deux systèmes nucléo-protéiques et souhaite répondre à un certain nombre de questions. De manière globale, l'objectif est d'identifier et de caractériser les lésions radio-induites perturbant les interactions protéine-ADN ou protéine-effecteur pour les systèmes étudiés, de confronter ces résultats avec des prévisions basées sur des calculs de simulation d'attaque radiolytique des complexes et finalement, de proposer des mécanismes expliquant les dysfonctionnements radio-induits observés.

Le premier système étudié est un système de régulation de l'expression génique chez *Escherichia coli*, celui de l'opéron lactose, système qui est étudié au sein de l'équipe depuis de nombreuses années. Les radiations ionisantes perturbant les interactions répresseur-opérateur, le premier objectif de ce travail sera donc d'étudier l'endommagement du domaine de fixation du répresseur à l'ADN (domaine appelé également *headpiece*), tant du point de vue de l'intégrité de la chaîne peptidique que de la conformation et des modifications des acides aminés. Dans un deuxième temps, les effets des radiations seront étudiés sur l'induction du système *lac* répresseur-*lac* opérateur afin de déterminer si les interactions inducteur-répresseur sont perturbées au même titre que les interactions répresseur-opérateur au cours de l'irradiation.

Le deuxième système d'intérêt est un système de réparation des dommages oxydatifs de l'ADN ; il est composé de la protéine de réparation Fpg (ou Formamidopyrimidine glycosylase) et d'un fragment synthétique d'ADN porteur d'une lésion. Dans un premier temps, l'effet des irradiations sera étudié sur la reconnaissance et la fixation de la protéine mutante P1G-Fpg sur son substrat afin de déterminer si les interactions au sein de ce complexe sont également perturbées au cours de l'irradiation. Ensuite, l'activité enzymatique de la protéine sauvage irradiée sera examinée afin de détecter d'éventuelles perturbations dues à l'irradiation.

La première partie de cette thèse est dédiée à la présentation des rayonnements ionisants, de leurs effets sur le matériel biologique ainsi que des deux systèmes nucléoprotéiques étudiés. Dans un deuxième chapitre, les méthodes utilisées pour répondre aux questions posées seront présentées puis les résultats obtenus dans le cadre de ce travail seront exposés et discutés dans un troisième et dernier chapitre.

Généralités

1 - Les rayonnements ionisants

1. 1. Généralités sur les radiations ionisantes

Tous les organismes vivant sont exposés en permanence aux rayonnements ionisants, les sources de rayonnements auxquelles les populations peuvent être exposées étant diverses et pour la plupart d'origine naturelle (Figure 1).

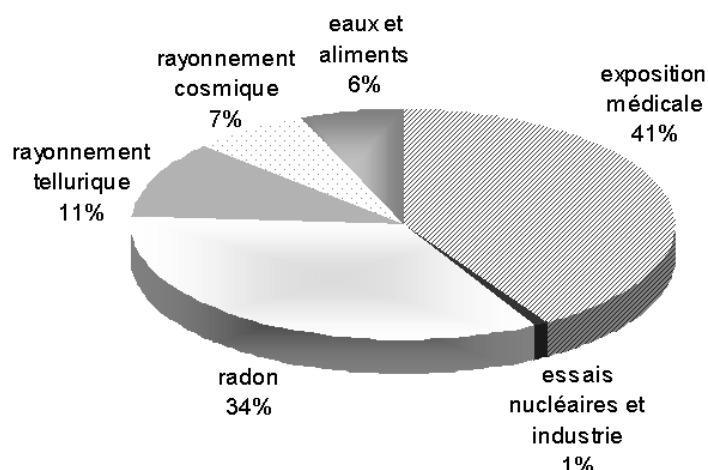


Figure 1. Exposition moyenne de la population aux sources d'exposition radioactives [données venant de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, 2003]

Les sources d'exposition naturelles sont d'origine soit cosmique (réactions nucléaires dans les étoiles et explosion de supernovas), soit terrestre (matériaux naturellement radioactifs contenus dans l'écorce terrestre d'où provient le rayonnement tellurique -rayonnement γ - et d'où émane le radon -gaz radioactif-) ou encore interne (essentiellement ^{40}K et ^{14}C). Certaines de ces expositions sont identiques où que l'on se trouve sur la terre, telle que celle due à l'ingestion de ^{40}K contenu dans les aliments, d'autres sont fortement dépendantes de la localisation. Les rayons cosmiques, par exemple, sont plus intenses à haute altitude tandis que les concentrations en uranium et en thorium dans le sol peuvent être localement très élevées (voir Tableau 1). Les techniques de construction et la ventilation des habitations vont, quant à elles, fortement moduler la concentration en radon. La dose effective moyenne due à des sources naturelles à laquelle est exposé un individu est de 2.4 mSv par an (UNSCEAR, 2000).

L'exposition d'origine artificielle de la population résulte quant à elle de l'activité médicale (radiodiagnostic, médecine nucléaire et radiothérapie), des retombées des essais nucléaires aériens et de l'activité nucléaire civile.

Tableau 1. Doses annuellement reçues par des populations fortement exposées [d'après Cordoliani, 2002]

	Cause	Total annuel (mSv)
Montagne (3500 m)	Altitude	4.0
Bretagne	Granite	3.0
Inde	phosphates	10
Brésil (Espírito Santo)	Throrium	30
Iran	uranium, thorium	100

1. 2. Les types de rayonnements ionisants

Les effets des rayonnements ionisants résultent d'un transfert d'énergie entre ces rayonnements et la matière. Selon leur nature, les rayonnements ionisants interagissent différemment avec le milieu qu'ils traversent.

Les rayonnements ionisants ont la propriété d'ioniser la matière dans laquelle ils pénètrent : l'interaction de particules chargées avec les électrons se trouvant au voisinage de leur trajectoire résulte en l'éjection de ces électrons et donc en l'ionisation du milieu. Les **rayonnements directement ionisants** où les particules chargées (électrons, protons, α) constituent le rayonnement ionisant en lui-même peuvent être distingués des **rayonnements indirectement ionisants** où le rayonnement incident, appelé rayonnement primaire, est constitué de particules non chargées (photons, neutrons) qui produisent des ionisations par l'intermédiaire des particules qu'elles mettent en mouvement (électrons secondaires pour les photons, protons secondaires pour les neutrons).

1. 2. 1. Les radiations indirectement ionisantes

- *Les rayonnements électromagnétiques*

Les rayonnements X et γ sont constitués de photons caractérisés par leur énergie, inversement proportionnelle à leur longueur d'onde. Ces deux rayonnements sont de même nature mais distincts par leur origine et leur spectre. Le rayonnement γ provient de désintégrations nucléaires et son énergie est caractéristique de cette réaction (la désintégration β du ^{137}Cs en ^{137}Ba est accompagnée d'une émission de γ de 660 keV et celle du ^{60}Co en ^{60}Ni est accompagnée d'une double émission de γ de 1.17 et 1.33 MeV) tandis que le rayonnement X naît du transfert énergétique entre un flux d'électron et les atomes d'une cible et est défini par une énergie moyenne. Une des applications des rayonnements électromagnétiques est l'imagerie médicale (rayons X, tomographie d'émission de positon).

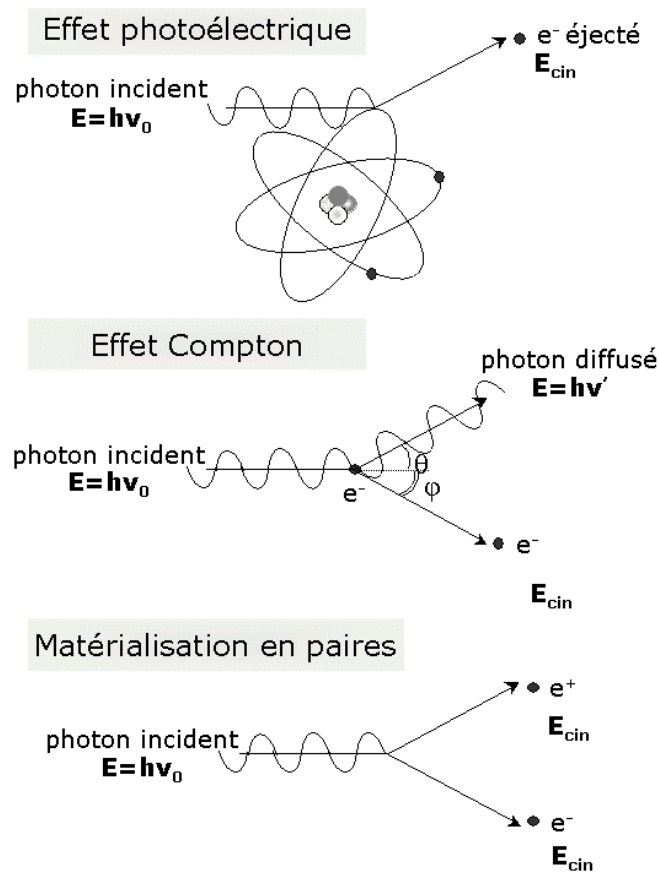


Figure 2. Principaux modes d'interaction photon-matière

Quatre types d'interaction peuvent être rencontrés entre photons de haute énergie et matière condensée, leur répartition dépendant de l'énergie des photons (voir Figure 3). Pour des énergies inférieures à 50 keV, *l'effet photoélectrique* domine : le photon incident interagit avec un électron du cortège électronique d'un atome. Ce dernier absorbe l'énergie du photon et se trouve ainsi éjecté avec une énergie cinétique correspondante (à l'énergie de rupture de la liaison près). Pour des énergies comprises entre 50 keV et 20 MeV, *l'effet Compton* l'emporte. Il résulte d'une collision élastique du photon avec un électron et conduit à l'éjection d'un électron doté d'une énergie dont le photon diffusé sera privé. Pour des énergies supérieures à 1.02 MeV, l'énergie lumineuse peut être matérialisée en paires de particules électron-positon (e^+, e^-) : c'est la *création de paires*. Le dernier mode d'interaction, uniquement pour les énergies très élevées, est *l'effet photonucléaire* : le photon incident est absorbé, non plus par le nuage électronique mais par le noyau, qui passe à un état excité et tend à retrouver un état stable en émettant soit un neutron (réaction γ, n), soit un proton (réaction γ, p). Ce type d'interaction est d'intensité très faible mais comme il présente des dangers d'activation de la matière, il est systématiquement évité dans les applications.

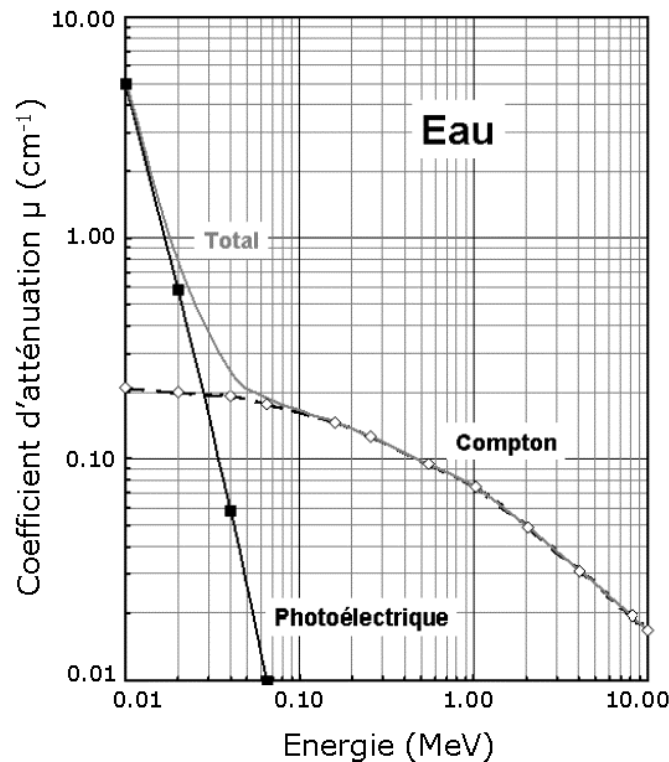


Figure 3. Contribution des effets photoélectrique et Compton lors de l'absorption des photons dans l'eau, en fonction de leur énergie.

- *Les neutrons*

Ces particules, produites de façon artificielle par les cyclotrons ou émis lors de la fission de noyaux lourds, perdent leur énergie par collision avec des noyaux. Le transfert d'énergie étant d'autant plus efficace que la masse du noyau est proche de celle du neutron, les chocs sont donc plus efficaces avec les noyaux d'hydrogène, ce qui provoque leur éjection sous forme de proton. Les protons éjectés peuvent alors ioniser le milieu.

Les réactions de capture de neutrons sont également très courantes : après réaction avec un neutron, le noyau cible ayant capturé ce neutron se désactive soit simplement par émission γ qui peut être accompagnée d'un réarrangement du cortège électronique (émission d'électrons Auger), soit en se scindant en générant une particule α et un noyau résiduel ; la particule et le noyau sont alors susceptibles d'ioniser le milieu. Il faut toutefois noter que, sauf exception (^{10}B , ^{157}Gd), les sections efficaces de capture sont très faibles et d'autant plus faibles que l'énergie du neutron incident est grande (inversement proportionnel à la racine carrée de l'énergie). La thérapie par capture de neutrons par le bore (ou BNCT) est une technique prometteuse pour le traitement du glioblastome.

1. 2. 2. Les radiations directement ionisantes

- *Les électrons*

Ce rayonnement est constitué d'électrons se déplaçant à grande vitesse, provenant soit du rayonnement β^- émis par certains noyaux radioactifs, soit produits par des accélérateurs. Ces électrons mettent en mouvement les électrons des milieux traversés par répulsion électrostatique. Si l'énergie échangée est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron, ce dernier est arraché à la molécule qui est alors ionisée. Si l'énergie échangée est inférieure à l'énergie de liaison, l'électron reste lié à la molécule mais est transféré sur une orbitale supérieure ; la molécule est alors excitée. Ce type de rayonnement est notamment utilisé pour traiter les tumeurs profondes (thoraciques, pelviennes et abdominales).

- *Le rayonnement α*

Il est constitué de particules lourdes, chargées positivement (noyaux d'hélium). Ces particules sont émises spontanément par des noyaux instables et agissent dans les milieux qu'elles traversent en mettant en mouvement des électrons et des protons. Leur parcours est très faible, de l'ordre de quelques millimètres dans l'eau. Bien que leur efficacité biologique soit 5 à 10 fois supérieure à celle des rayons X et des photons γ , leur pénétration faible ne permet pas de les utiliser en clinique (il ne traverse pas une feuille de papier). On utilise par exemple le rayonnement α dans les détecteurs de fumée des systèmes d'alarme incendie automatique.

- *Les protons*

Produits par cyclotrons, les protons agissent en cédant leur énergie au cours de collisions avec les électrons des tissus traversés. La distribution de dose en profondeur se fait sous la forme d'un pic très étroit (pic de Bragg). Ce type de rayonnement est adapté au traitement de tumeurs profondes, de petite taille, au voisinage de tissus sains radio-sensibles, tels que les tumeurs de la base du crâne, du canal rachidien et de l'oeil.

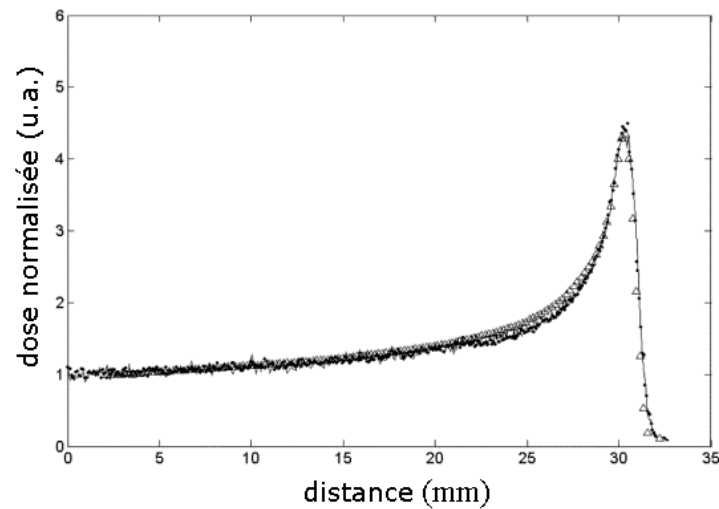


Figure 4. Pics de Bragg obtenus lors de traitements de l'œil par protons thérapie [Laboratori Nazionali del Sud of Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Italie]

1. 3. Caractérisation d'un rayonnement ionisant

Les rayonnements ionisants ayant des propriétés physiques différentes, des paramètres ont été introduits afin de les caractériser. Il s'agit de la dose, du débit de dose et du transfert d'énergie linéique (TEL).

La dose absorbée est la quantité d'énergie communiquée par le rayonnement à la matière traversée par unité de masse. Elle se mesure en Gray (Gy) représentant 1 joule déposé dans 1 kg de matière (anciennement le rad : 1 Gy = 100 rad). Une dose de 5 Gy en irradiation unique représente la DL 50 pour l'Homme. 70 Gy représentent la dose habituellement prescrite dans le traitement des cancers ORL, en radiothérapie exclusive.

Le débit de dose ou intensité est la dose délivrée par unité de temps. Elle s'exprime en Gy/s. Au sein de l'équipe, le débit de dose se mesure à l'aide d'un dosimètre de Fricke.

Le transfert d'énergie linéique (TEL) a été introduit afin de rendre compte de la distribution spatiale des ionisations. Il permet de caractériser la qualité d'un rayonnement par un nombre sans avoir à décrire à chaque fois le type de particule et son énergie. Le TEL est défini comme étant égal à la quantité d'énergie cédée par un rayonnement lorsqu'il parcourt une distance dx et s'exprime en keV par micromètre ($\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$):

$$\text{TEL} = -\frac{dE}{dx}$$

Le TEL est d'autant plus grand que la particule perd beaucoup d'énergie sur une courte distance ; les ionisations provoquées par le passage d'une particule à bas TEL seront donc beaucoup plus éparées que les ionisations provoquées par une particule à haut TEL. Le TEL augmente linéairement avec la densité du milieu et, pour un milieu donné, il croît comme le carré de la charge de la particule et est inversement proportionnel à son énergie cinétique [Ferradini & Pucheault, 1983].

Les électrons secondaires des photons sont des particules à bas TEL (0.2-3 keV.μm⁻¹) alors que les protons secondaires des neutrons et les ions lourds sont des particules à haut TEL.

Le rendement radiolytique G a été introduit afin de quantifier le rendement en espèces radicalaires d'un rayonnement. Il correspond au nombre de moles d'espèce produite par unité d'énergie apportée et est exprimé en mol.J⁻¹ (ou plus couramment en molécules/100eV).

1. 4. La radiolyse de l'eau

L'eau représentant plus de 70% de la masse des organismes vivants, la radiolyse de l'eau a une importance particulière dans les phénomènes d'irradiation indirecte. Les radiations ionisantes interagissent avec l'eau par des phénomènes soit d'ionisation (1), soit d'excitation électronique (2) suivant leur énergie. Les espèces générées par la radiolyse de l'eau ne sont pas stables et vont donc se transformer en espèces plus stables.

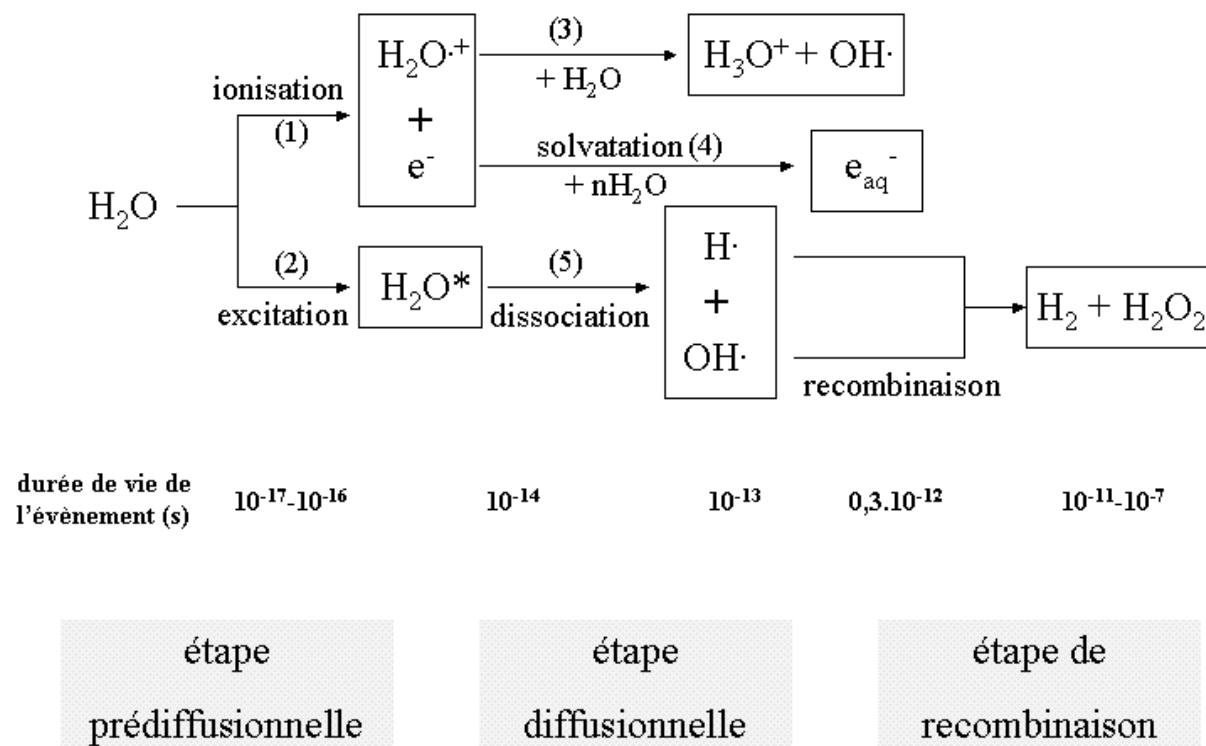
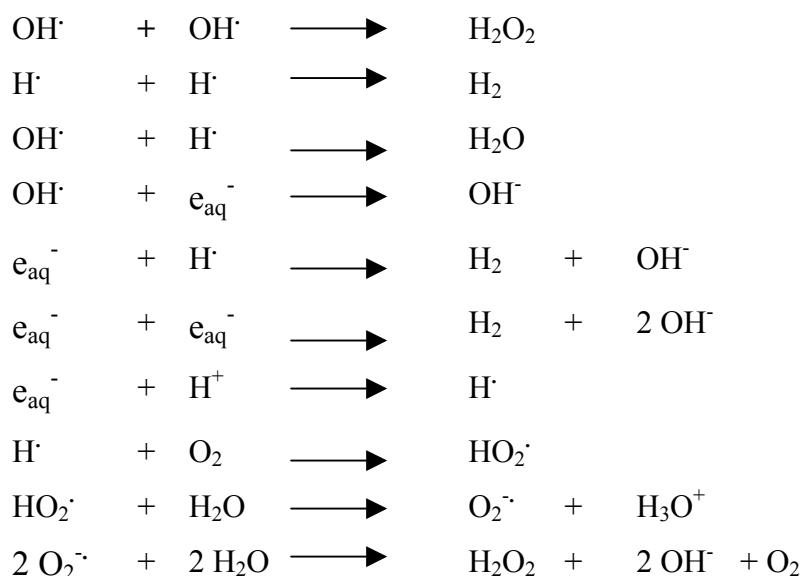


Figure 5. Radiolyse de l'eau d'après [Bensasson *et al.*, 1993]

Les molécules d'eau ionisées se dissocient, engendrant une molécule d'eau cationique et un électron. L'eau cationique est un acide fort qui perd rapidement un proton au profit de l'eau environnante, formant un radical $OH\cdot$ (3). Les électrons arrachés possèdent quant à eux une énergie cinétique initiale suffisante pour parcourir de grandes distances. Ils perdent progressivement cette énergie par collision jusqu'à être suffisamment ralentis pour être « piégés » par les molécules d'eau et deviennent des électrons hydratés e_{aq}^- (4).

Les molécules d'eau excitées par un rayonnement ionisant (2) peuvent soit perdre leur énergie d'excitation (chaleur et vibration) et retomber ainsi à leur état d'énergie fondamental, soit se dissocier et donner deux radicaux $\cdot OH$ et $H\cdot$ (5).

Les radicaux produits par ionisation et excitation peuvent se recombiner, une grande partie étant reconvertie en eau, ou diffuser dans la solution.



Le résultat global de la radiolyse de l'eau est donc l'apparition d'espèces radicalaires et moléculaires distribuées de façon homogène dans le milieu, quelques nanosecondes après le passage du rayonnement.

Comme le montre la Figure 6, les rendements radiolytiques de l'eau varient en fonction du TEL [Magee & Chatterjee, 1987]. La concentration en radicaux est en effet plus grande dans la trace d'une particule à haut TEL, ce qui facilite leur recombinaison.

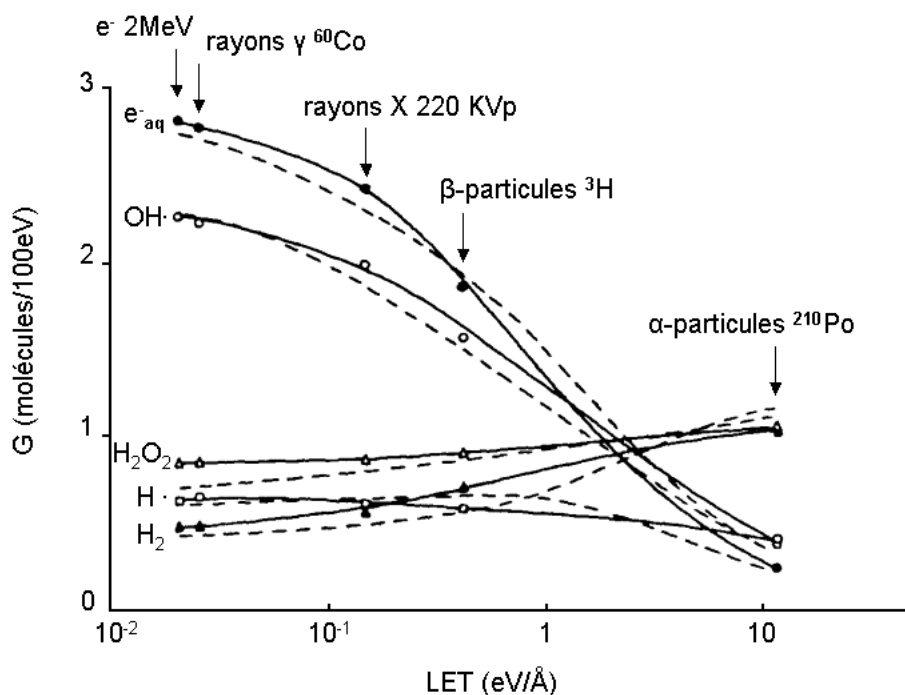


Figure 6. Variation de $G(\text{e}_{\text{aq}}^-)$, $G(\text{OH}\cdot)$, $G(\text{H}_2\text{O}_2)$, $G(\text{H}\cdot)$ et $G(\text{H}_2)$ en fonction du TEL moyen. Valeurs obtenues expérimentalement (traits pointillés) et par calculs théoriques (traits pleins).

Les espèces primaires produites par la radiolyse de l'eau se différencient par leurs propriétés :

- l'électron hydraté e_{aq}^- (4) peut être visualisé comme un électron entouré d'un petit nombre de molécules d'eau orientées et il se comporte comme un anion monovalent. Ce nucléophile voit sa réactivité augmentée par la présence de substituants électrophiles sur les cycles aromatiques ou adjacents à des doubles liaisons.
- l'atome H est un acide faible dont le pK_a est de 9.7. Cette espèce est minoritaire en milieu neutre ou alcalin mais devient l'espèce réductrice majoritaire en solution acide.
- le radical $\cdot OH$ est un puissant oxydant et peut s'additionner sur les doubles liaisons et les cycles aromatiques ou soustraire des atomes H des liaisons C-H.

En milieu normalement aéré (air dissout dans l'eau à la pression atmosphérique normale), c'est-à-dire en présence de $3 \cdot 10^{-4} M$ d'oxygène, l'électron solvaté et le radical hydrogène vont réagir très rapidement avec l'oxygène conduisant à la formation de radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$ et $HO_2^{\cdot}$ ($K = 1,9 \cdot 10^{10}$ et $2,1 \cdot 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) [Buxton, 1988]. Les constantes de vitesse de réaction sont du même ordre de grandeur que celles qui sont obtenues avec les composants de l'ADN, mais étant donné la concentration élevée en oxygène (par rapport à l'ADN), nous pouvons considérer que l'électron solvaté et le radical hydrogène ne réagissent pratiquement pas avec l'ADN en milieu aérobie. $HO_2^{\cdot}$ est ensuite rapidement déprotonné à pH neutre ($pK = 4,8$) et $O_2^{\cdot -}$ est peu réactif vis-à-vis des molécules biologiques [Davies, 1987].

Donc, dans les conditions qui sont les nôtres, c'est-à-dire en aérobie, les dommages causés au matériel biologique proviennent majoritairement des radicaux OH.

1. 5. La radiolyse de l'ADN

Si de nombreux composés biologiques sont sensibles à la radiolyse, l'ADN est une cible cellulaire critique des radiations ionisantes, les dommages ayant des conséquences létales (mort cellulaire suite au blocage de la réplication) ou pro-mutagènes (lésions non-réparées induisant des erreurs de réplication) pour la cellule.

Les rayonnements de faible TEL, tels que les rayons γ , agissent sur l'ADN en solution aqueuse diluée essentiellement par effet indirect, c'est-à-dire par l'intermédiaire des radicaux libres provenant de la radiolyse de l'eau [Von Sonntag, 1987]. En milieu oxygéné et aux doses étudiées, les dommages à l'ADN sont dus principalement aux radicaux hydroxyles (voir précédemment).

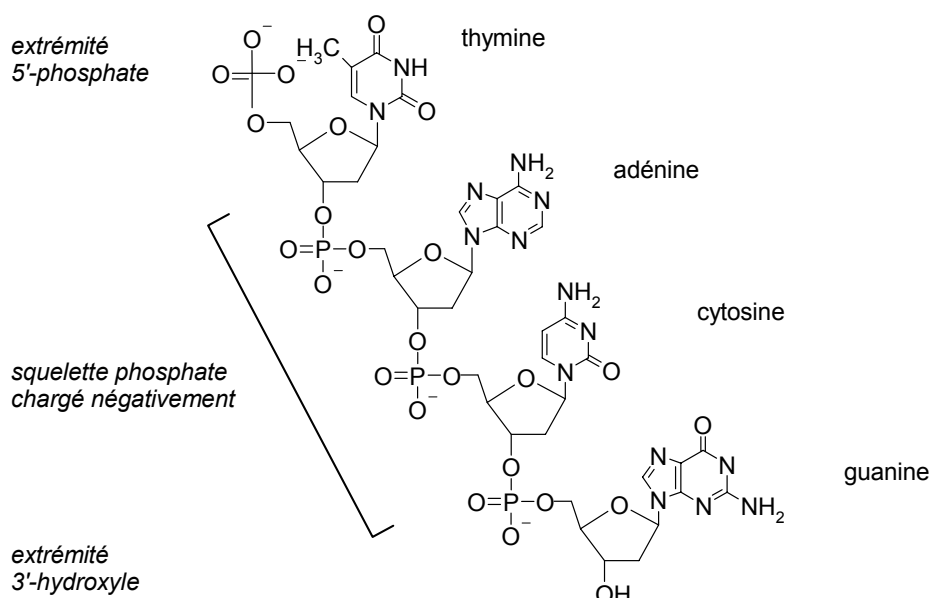


Figure 7. Structure de l'ADN

Bien que la majorité des radicaux $\text{OH}^\bullet$ (80 %) réagissent avec l'ADN en s'additionnant sur les doubles liaisons des bases, une petite partie de ces radicaux (20 %) va réagir avec les sucres en substituant un atome d'hydrogène, formant ainsi des radicaux sucre [Bernhard & Close, 2004]. Diverses lésions peuvent être détectées dans l'ADN suite à l'irradiation : des altérations et pertes de bases (sites abasiques), des modifications de sucres, des coupures de chaînes simple brin (CSB) ou double brin (CDB) et des pontages avec des protéines. Le nombre et la distribution de ces dommages ne sont pas aléatoires mais dépendent du TEL du rayonnement, de la structure de l'ADN (simple, double, triple, quadruple brin, forme Z, courbure) et de certains paramètres tels que la température, la présence de composés protecteurs ou sensibilisateurs [Teoule, 1987 ; Frankenberg-Schwager, 1990].

1. 5. 1. Les coupures de chaînes ou cassures franches

Lorsque ces lésions sont directement observables après irradiation, à pH neutre, elles sont appelées coupures franches (ou FSB pour *Frank Strand Breaks*). Ces coupures surviennent au niveau de la liaison phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose, par abstraction d'un atome H du sucre par le radical $\text{OH}^\bullet$ [pour revue, voir Knapp-Pogozelski & Tullius, 1998]. Lors de la rupture de la liaison phosphodiester, les deux brins s'écartent comme une « fermeture éclair » par pénétration des molécules d'eau dans la brèche et rupture des liaisons hydrogène entre les bases (altération de 3-4 nucléotides).

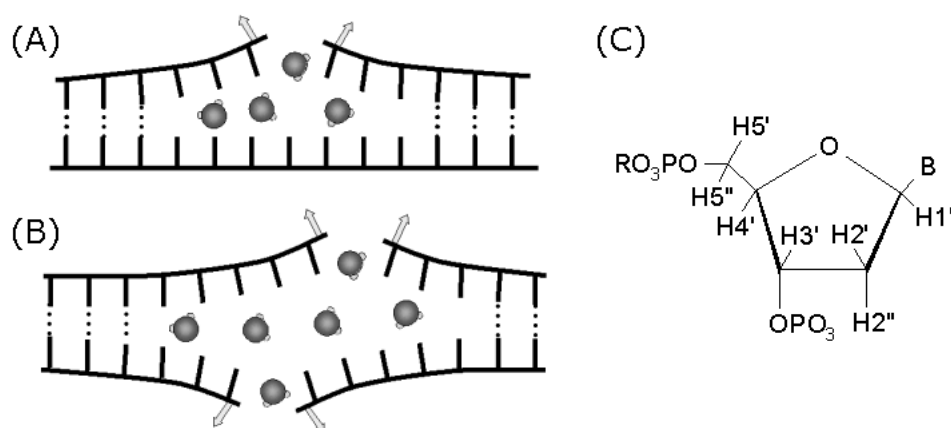


Figure 8. Coupures des chaînes d'ADN (A) coupure simple brin (B) coupure double brin. (droite). (C) Représentation des sept atomes d'hydrogène du désoxyribose.

Bien que tous les atomes hydrogène du désoxyribose soient potentiellement attaquables [Von Sonntag, 1987], il a été démontré expérimentalement [Sy *et al.*, 1997 ; Balasubramanian *et al.*, 1998] et par modélisation [Sy *et al.*, 1997 ; Aydogan *et al.*, 2002] que la probabilité d'attaque variait suivant l'accessibilité des atomes H.

Ainsi, le radical $\text{OH}^\bullet$ réagira préférentiellement avec les H situés en C4' et en C5' (Tableau 1), ce qui augmente les probabilités de coupure à ces positions. D'autre part, tous les radicaux centrés sur le désoxyribose n'évoluent pas avec la même efficacité vers une coupure de chaîne. Sy *et al.* (1997) ont en effet montré qu'un radical centré en C4' a une probabilité trois fois plus importante de provoquer une coupure qu'un radical centré en C5'.

Tableau 2. Réactivité des atomes H du désoxyribose vis-à-vis du radical hydroxyle vs. accessibilité au solvant [Balasubramanian *et al.*, 1998]

	$\text{H}_{5'} + \text{H}_{5''}$	$\text{H}_{4'}$	$\text{H}_{3'}$	$\text{H}_{2'} + \text{H}_{2''}$	$\text{H}_{1'}$
% réaction avec $\text{OH}^\bullet$	57 ± 10	22 ± 6	17 ± 5	13 ± 3	11 ± 4
% surface accessible au solvant	46	28	14	11	1

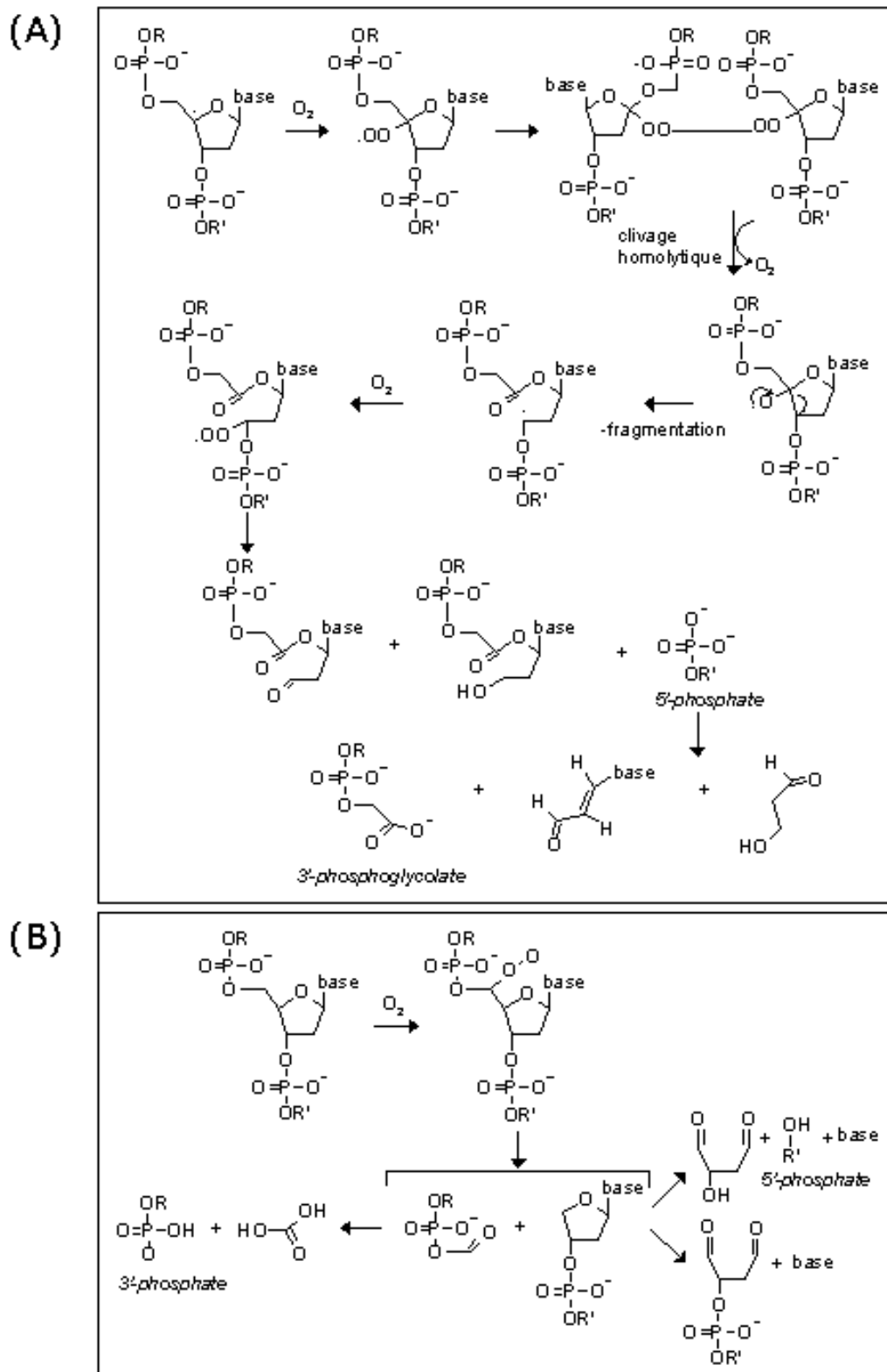


Figure 9. Mécanisme de coupure de chaîne après attaque d'un radical hydroxyle sur le C4' (A) et sur le C5' (B) du désoxyribose [Breen & Murphy, 1995; Von Sonntag *et al.*, 1981]

La **coupure simple brin** (CSB) résulte de la cassure d'un des deux brins d'ADN. Le taux de formation de CSB varie linéairement avec la dose et est plus faible lorsque le TEL du rayonnement augmente [Tubiana *et al.*, 1986].

La réparation des CSB peut être divisée en 4 étapes : le recrutement des enzymes de réparation et leur fixation à l'ADN endommagé, la restauration d'extrémités 3' et 5' normales de part et d'autre de la coupure, le remplacement du nucléotide manquant et finalement la ligation de l'ADN [Caldecott, 2001 ; Caldecott, 2003].

Les **coupures double brin** (CDB) correspondent à des coupures des deux chaînes d'ADN à moins de h nucléotides d'intervalle, le nombre h dépendant de la stabilité des liaisons hydrogène entre les deux brins. Par conséquent, le nombre de CDB produit à une dose donnée sera plus faible à haute force ionique et à basse température.

Une coupure double brin est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de base, hétérologue dans le cas contraire. L'efficacité de leur formation augmente avec le TEL.

Les CDB peuvent être produites suite à l'action d'un seul radical $\cdot\text{OH}$ sur le 2-désoxyribose [Siddiqi & Bothe, 1987] avec transfert du radical sur le deuxième brin ou être dues à l'attaque par plusieurs radicaux dans des zones rapprochées [Ward, 1985].

Ces lésions sont considérées comme étant parmi les plus dommageables et sont létales pour la cellule si elles sont non ou mal réparées. Des erreurs dans leur réparation, en plus de générer de petites mutations par délétion ou insertion, peuvent également résulter en des réarrangements chromosomiques [Varga & Aplan, 2005] et en une instabilité du génome [Elliott & Jasin, 2002; Thompson & Schild, 2002]. De plus, dans certaines circonstances, les CDB peuvent provoquer un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une apoptose [Jackson, 2002; Norbury & Hickson, 2001 ; Rich *et al.*, 2000]. Des protéines spécifiques de la surveillance du cycle cellulaire semblent impliquées dans la balance entre l'arrêt du cycle, la réparation et l'apoptose [Bernstein *et al.*, 2002].

Il y a deux systèmes majeurs de réparation des CDB [Jackson, 2002 ; Ferguson & Alt, 2001]: la réparation par recombinaison homologue et la réparation par appariement de brins (voir plus loin). Des études récentes ont montré que l'absence de ces systèmes chez la souris menait à une instabilité du génome, dont des translocations oncogéniques [Ferguson & Alt, 2001].

1. 5. 2. Les altérations de bases

Les radicaux réagissent également avec les bases en arrachant un atome H ou plus fréquemment en s'additionnant sur les carbones des liaisons π , les bases pyrimidiques étant plus sensibles que les bases puriques à l'attaque des radicaux OH. Ces réactions entraînent des modifications de la structure des bases, comme montré dans la

Figure 10.

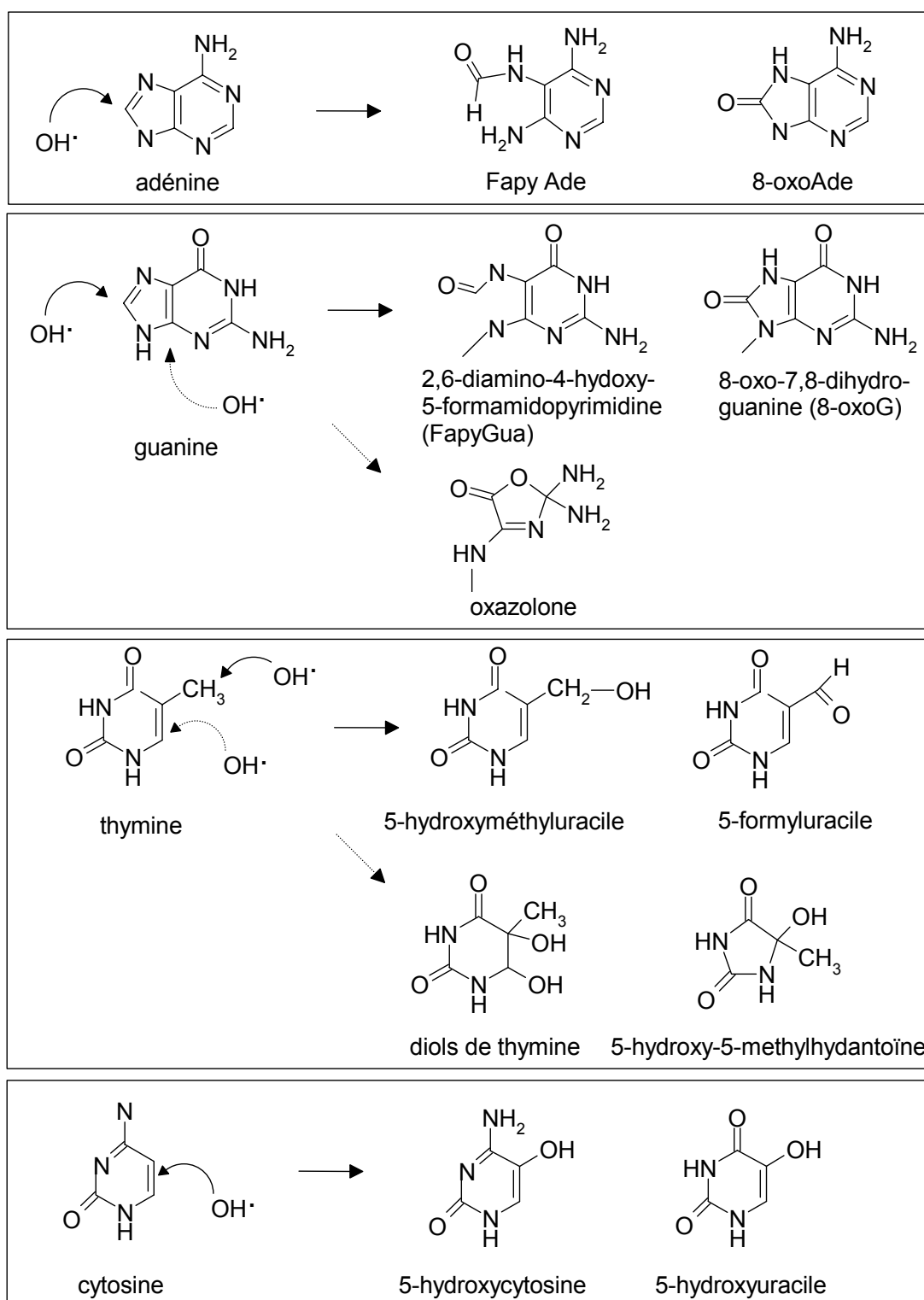


Figure 10. Attaque des bases de l'ADN par le radical OH [Cadet *et al.*, 1997]

Les lésions aux bases sont très nombreuses [Cadet *et al.*, 1997]; la

Figure 10 présente quelques unes de ces lésions. Les modifications des pyrimidines proviennent principalement de l'attaque des radicaux sur le cycle aromatique en C5 et C6. Ainsi, dans le cas de la thymine, 60 % des attaques se feront par addition sur le C5, 35% par addition sur le C6 et 5% par abstraction d'un hydrogène du groupement méthyl [Cadet *et al.*, 1997]. En ce qui concerne les purines, l'addition des radicaux $\cdot\text{OH}$ se fera sur les atomes C4, C5 et C8, ce qui mènera à la formation de formamidopyrimidines ou de dérivés 8-oxo [Cadet *et al.*, 2003].

Les dommages aux bases peuvent avoir des conséquences létales ou mutagènes pour la cellule. Ainsi, les dérivés Fapy bloquent la majorité des ADN polymérases impliquées dans la réplication [O'Connor *et al.*, 1988, Asagoshi *et al.*, 2002] ou peuvent, mais rarement, provoquer des erreurs de lecture mutagène [Wiederholt & Greenberg, 2002] alors que la 8-oxoguanine est principalement une lésion mutagène [Shibutani *et al.*, 1991 ; Moriya *et al.*, 1991 ; Moriya, 1993].

La cellule a toutefois développé des systèmes de réparation efficaces pour réparer ces dommages (voir plus loin) et ces lésions sont réparées à 80% dans les 15 minutes suivant l'irradiation.

1. 5. 3. Les sites abasiques

La radiolyse de l'ADN peut également conduire à la perte de bases. Tel peut être le cas lorsque l'attaque du radical hydroxyle se fait sur les atomes C1', C2' ou C5' du sucre ou sur la base. La liaison N-glycosidique pouvant être brisée sans rupture du squelette phosphodiester, il y a ainsi formation de sites abasiques.

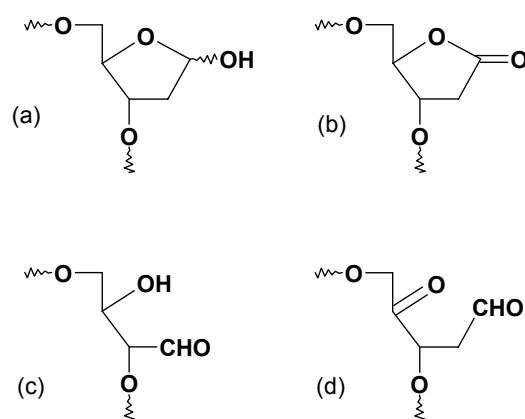


Figure 11. Structure des sites alcali-labiles formés après attaque des radicaux hydroxyles sur la base et sur les atomes C1', C2' et C du sucre [Téoule, 1987]

Si ces lésions ne se traduisent pas par une cassure de la chaîne nucléotidique en milieu neutre, des coupures peuvent toutefois être révélées en milieu alcalin. Ces dommages sont connus sous le nom de « sites alcali-labiles » (ou ARB pour *Alkali Revealed Breaks*). Par traitement à la pipéridine (1M, chauffage à 90°C pendant 30 minutes), la liaison phosphodiester peut être rompue [Chung *et al.*, 1992 ; Cadet *et al.*, 1997], révélant ainsi des coupures dans la chaîne d'ADN.

1. 5. 4. Les pontages ADN-protéines

Des pontages ADN-protéines peuvent être formés de façon naturelle lors de la compaction de l'ADN dans le noyau. L'irradiation des cellules provoque la formation de liaisons covalentes supplémentaires entre l'ADN et les histones ou d'autres protéines nucléaires [Oleinick *et al.*, 1986]. Des travaux ont permis de mettre en évidence la formation de pontages, notamment entre la tyrosine et la cytosine [Gajewski et Dizdaroglu, 1990], la tyrosine et la thymine [Margolis *et al.*, 1988 ; Weir Lipton *et al.*, 1996] et la lysine et la thymine [Dizdaroglu *et al.*, 1989].

A faible dose, l'irradiation de cellules de mammifères provoque quatre fois plus de pontages ADN-protéines que de CDB [Barker *et al.*, 2005]. Pour de plus hautes doses, le nombre de pontages atteint un maximum qui correspond au nombre de sites d'attachement sur la matrice nucléaire [Ramakrishnan *et al.*, 1987]. Les cellules de mammifères sont capables de réparer les pontages ADN-protéines, notamment par excision de nucléotide (NER, voir plus loin), ce qui aboutit à la restauration de la séquence d'ADN [Barker *et al.*, 2005].

1. 5. 5. Les sites à dommages multiples

Lorsqu'un rayonnement ionisant traverse une molécule d'ADN, une combinaison de deux ou plusieurs dommages sur une courte distance (1-4 nm) forme un site à dommages multiples (ou MDS pour *Multiple Damaged Site*). Les lésions impliquées dans ces dommages complexes peuvent être des bases oxydées, des sites abasiques et des cassures simple brin, le type de lésions retrouvées dans les MDS dépendant fortement de l'environnement [Sutherland *et al.*, 2002].

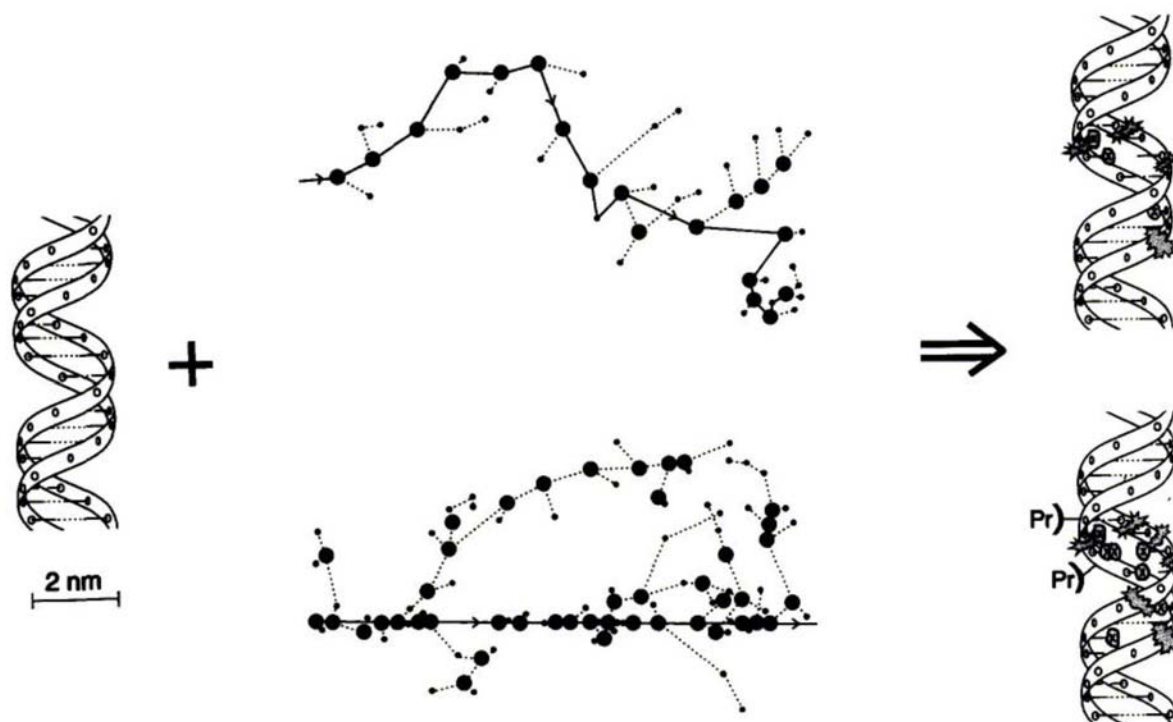


Figure 12. Superposition d'un segment d'ADN et de la projection 2D de traces modélisées d'un électron de faible énergie (500 eV) et d'une particule α (4 MeV). Les sites à dommages multiples générés par cette simulation comprennent, pour exemple, des cassures simple brin, des pontages ADN-protéine (Pr) et des bases endommagées (X) [d'après Goodhead, 1994].

Le concept de sites à dommages multiples a été introduit par Ward en 1988. Leur existence a d'une part été prédite par modélisation des structures de traces [Brenner & Ward, 1992 ; Goodhead, 1994] et elle a d'autre part été mise en évidence par Sutherland *et al.* (2002) *in vitro* sur de l'ADN nu et ainsi que sur de l'ADN de cellules humaines irradiées.

Les sites à dommages multiples sont des lésions graves pour la cellule. En effet, deux CSB formées sur des brins opposés peuvent résulter en une CDB potentiellement létale, la plus simple des MDS. De plus, au contraire des lésions isolées qui sont généralement réparées efficacement, la réparation d'une lésion à l'intérieur d'un site à dommages multiples est nettement plus difficile [pour revue, voir Wallace, 1997] et peut entraîner la formation de

cassures double brin. Blaisdell & Wallace (2001) ont ainsi montré que les sites à dommages multiples formés chez *E.coli* par irradiation sont convertis en cassures double brin par la glycosylase Fpg lors du processus de réparation par excision de base.

Afin de lutter contre les effets délétères des MDS, la cellule a mis en place des processus qui retardent leur formation. Il a en effet été montré qu'une hiérarchisation des processus réparateurs peut empêcher la formation de cassures par les systèmes de réparation eux-mêmes [David-Cordonnier *et al.*, 2000 et 2001 ; Eot-Houllier *et al.*, 2005].

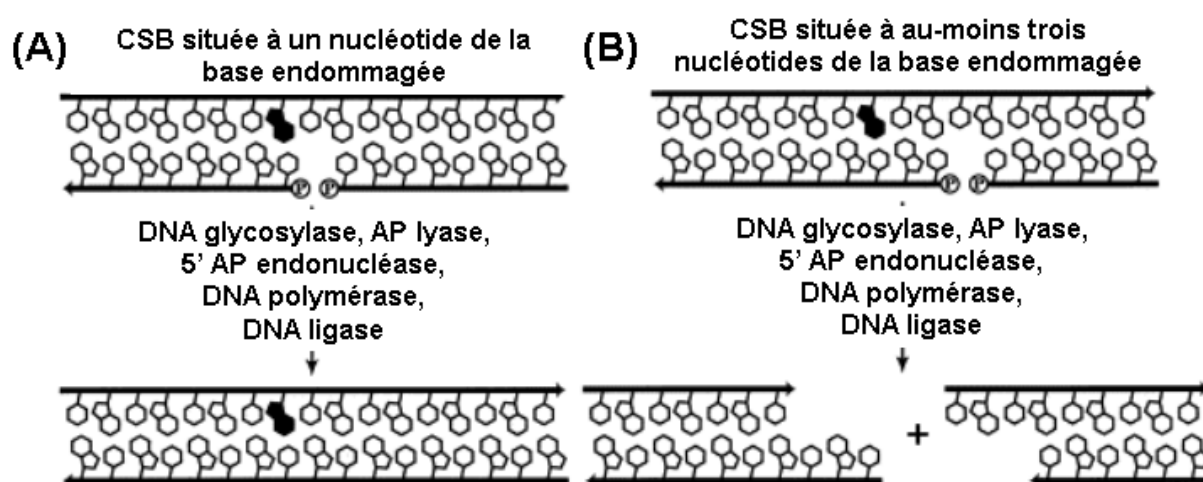


Figure 13. Schéma décrivant le processus de réparation par excision de base de MDS contenant une 8-oxoguanine opposée à une cassure simple brin [Harrison *et al.*, 1999]

1. 5. 6. Facteurs modifiant la radiosensibilité de l'ADN

Un certain nombre de substances modifie l'action des rayonnements ionisants.

Les radio-protecteurs sont des substances qui diminuent les effets de l'irradiation. Plusieurs types de radio-protecteurs ont été étudié, notamment les métaux [Spotheim-Maurizot *et al.*, 1992], les polyamines [Spotheim-Maurizot *et al.*, 1995 ; Sy *et al.*, 1999] et les thiols [Savoye *et al.*, 1997]. Leur action protectrice peut-être due soit à la capture des radicaux hydroxyles, soit à une « réparation chimique » des dommages à l'ADN par don d'un atome d'hydrogène comme dans le cas des thiols [Spotheim-Maurizot *et al.*, 1991]. Les protéines fixatrices de l'ADN telles que MC1 jouent également un rôle radio-protecteur en protégeant très efficacement leur site de fixation contre l'attaque des radicaux hydroxyles ; elles agissent donc par masquage physique [Isabelle *et al.*, 1993].

D'autres substances vont augmenter les effets de l'irradiation, en provoquant une modification de la structure de l'ADN, en inhibant la réparation des lésions produites par l'irradiation ou en bloquant la synthèse de l'ADN. C'est le cas du cuivre [Savoye *et al.*,

1996]. L'oxygène est le plus important des radio-sensibilisateurs dans la cellule [Frankenberger-Schwager, 1990] et il contribue à la fixation des radiolésions [Spotheim-Maurizot *et al.*, 1991]. L'*Oxygen Enhancement Ratio* (OER) permet de quantifier le pouvoir sensibilisateur de l'oxygène. Il représente le rapport des doses nécessaires pour obtenir un effet radiochimique ou biologique pour un système irradié en absence ou en présence d'oxygène. Il faut noter que ce sont surtout les effets des rayonnements à bas TEL qui sont influencés par la présence d'oxygène.

D'autre part, de nombreuses études ont démontré que la probabilité de coupure simple brin induite par irradiation dépend fortement de la structure de l'ADN [Sy *et al.*, 1997] et ce pour des raisons d'accessibilité comme vu précédemment. Des calculs ont été réalisés pour différentes formes d'ADN [Michalik *et al.*, 1995], notamment pour l'ADN en forme Z [Tartier *et al.*, 1994] et en quadruplex [Tartier *et al.*, 1998 ; Begusova *et al.*, 1999].

Les dommages induits par des rayonnements ionisants varient également fortement avec le TEL de la particule.

Tout d'abord, les effets directs semblent augmenter avec le TEL de la particule. Roots *et al.* (1990) ont évalué la proportion d'effet direct dans une cellule à 80% dans le cas de particules à haut TEL et 35% dans le cas de particules à bas TEL.

Ensuite, la complexité des dommages augmentent avec le TEL. Friedland *et al.* (2003) ont simulé l'effet de protons de TEL variable et de leurs électrons secondaires sur une molécule d'ADN et ont montré que les rendements en CDB augmentent avec le TEL des protons. D'autre part, les particules à haut TEL génèrent des grappes d'ionisation beaucoup plus denses que les particules à bas TEL et ces grappes d'ionisation sont probablement impliquées dans la production des dommages complexes [Ward, 1988]. Les proportions relatives de CDB et de dommages multiples augmentent donc avec le TEL de la particule [Michalik, 1991 ; Spotheim-Maurizot *et al.*, 1990 ; Goodhead, 1994 ; Holley & Chatterjee, 1996 ; Rydberg, 1996].

1. 6. La radiolyse des protéines

Les radicaux réagissent avec les acides aminés, les peptides et les protéines par abstraction d'hydrogène, transfert d'électron ou addition. Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisations par pontage intra- ou inter-protéines, aggrégations, fragmentations, réarrangements, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse).

Le radical hydroxyle, groupement électrophile, oxyde préférentiellement les sites à forte densité électronique et ce radical va attaquer soit le squelette peptidique, soit les chaînes latérales. Compte tenu de la diversité des chaînes latérales des acides aminés, de nombreux radicaux peuvent donc être formés suite à l'attaque radicalaire.

Goshe *et al.* (2000) ont montré que la probabilité de réaction du radical hydroxyle était plus grande avec les chaînes latérales qu'avec le C α , parce que les liaisons C-H des chaînes latérales sont plus accessibles au solvant, et donc aux radicaux, que la liaison C α -H.

1. 6. 1. Attaque de la chaîne peptidique

Les radicaux hydroxyles réagissent avec le squelette peptidique par abstraction de l'atome d'hydrogène du C α . Deux voies majeures peuvent mener au clivage du squelette peptidique à partir d'un radical C α ' (voir Figure 14). Elles impliquent toutes deux la formation de radicaux peroxy sur le C α comme intermédiaires obligatoires, ce qui explique la nécessité d'irradier les protéines en présence d'oxygène pour obtenir des rendements significatifs en coupures. La première voie consiste en une élimination de HO $_2$ ' du radical peroxy, l'imine formée étant ensuite hydrolysée pour former des espèces amide et α -dicéto [Garrisson, 1987]. La deuxième voie repose, quant à elle, sur une β -scission du radical alkoxyl, formé soit directement à partir du radical peroxy soit par formation d'hydroperoxide et décomposition [Davies & Dean, 1997]. Il faut également noter que la chaîne peptidique peut être clivée suite à une attaque de chaînes latérales et transfert de dommages (voir plus loin).

Dans le cas de peptides d'alanine, 90 % des radicaux formés le seront sur le C α . Ceci est dû au fait que la chaîne latérale de l'alanine favorise l'adoption d'une conformation plane du radical C α ', ce qui maximise sa stabilisation par les groupements amine et carboxyl voisins [Hawkins & Davies, 1998]. Le pourcentage de radicaux formés sur le C α diminue nettement pour les acides aminés dont les chaînes latérales vont former des radicaux plus stables que le

radical $\text{Ca}^\cdot$ ou tout simplement pour des raisons d'encombrement stérique qui diminue l'accessibilité des radicaux hydroxyles au Ca .

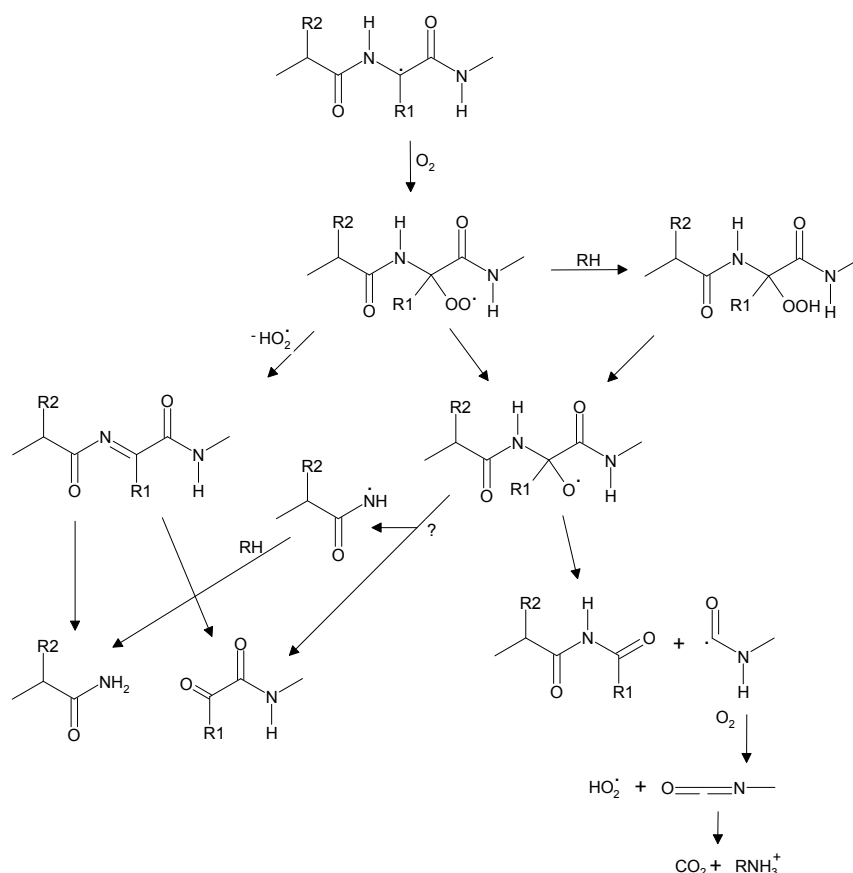


Figure 14. Mécanismes de clivage de la chaîne peptidique après abstraction d'un atome d'hydrogène du C α [d'après Hawkins & Davies , 2001]

Des calculs théoriques ont montré que l'attaque sur le C α variait également en fonction de la structure des protéines. D'une part, les structures secondaires et tertiaires sont déterminantes car elles modulent l'accessibilité des radicaux en solution au squelette peptidique. D'autre part, la stabilité des radicaux centrés sur le C α varie en fonction de la structure secondaire. L'abstraction d'un atome d'hydrogène arrivera ainsi préférentiellement pour un radical C α ' stable. Or, pour une stabilisation maximale par les groupements amine et carboxyl voisins, le radical C α ' doit être coplanaire. Il a ainsi été montré que les structures en feuillets β antiparallèles favorisaient l'attaque sur le C α , au contraire des hélices α [Rauk *et al.*, 1999 ; Rauk & Armstrong, 2000].

1. 6. 2. Attaque des chaînes latérales

1. 6. 2. 1. Attaque des chaînes latérales des acides aminés aliphatiques

Comme cela a été montré précédemment, l'attaque du radical hydroxyle sur les résidus glycine et alanine résulte principalement en l'abstraction de l'atome d'hydrogène du C α . Pour

les autres acides aminés aliphatiques, la chaîne latérale représente la cible préférentielle des réactions radicalaires et la sélectivité d'attaque du radical hydroxyle dépend fortement de la présence de groupements fonctionnels pouvant stabiliser les radicaux nouvellement formés.

L'abstraction d'un atome d'hydrogène arrivera ainsi préférentiellement sur le carbone voisin d'un groupement à forte densité électronique qui stabilisera le radical nouvellement formé. C'est le cas des groupements hydroxy de la sérine et de la thréonine [Rustgi *et al.*, 1977], des fonctions carboxyl de l'aspartate et du glutamate, des fonctions amides de l'asparagine et de la glutamine ainsi que du groupement guanidine de l'arginine.

Au contraire, la présence d'une fonction amine protonée, telles que celles situées sur la chaîne latérale de la lysine ou en C α , défavorise l'attaque radicalaire et ce sont les atomes d'hydrogène des groupements situés loin du groupement amine qui seront préférentiellement perdus. Dans le cas de la lysine, les liaisons C-H en C4 et en C5 seront les sites majeurs de l'abstraction d'H [Hawkins & Davies, 1997].

Dans le cas de la valine et de la leucine, l'oxydation se passe par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthyl. Pour la valine, la réaction menant à un radical centré sur le C3 est légèrement plus favorable [Fu *et al.*, 1995] que celles menant à des radicaux secondaires ou primaires. Pour la lysine, l'amine peut réagir avec un groupement carbonyle nouvellement formé et donner une base de Schiff [Fu & Dean, 1997].

1. 6. 2. 2. Attaque des chaînes latérales des acides aminés aromatiques

La présence d'un cycle aromatique résulte quasi invariablement en une addition du radical $\cdot\text{OH}$ sur ce cycle, l'abstraction d'hydrogène d'un groupement méthylène ne représentant qu'un phénomène minoritaire. Il est important de souligner que la présence de substituants sur le cycle aromatique peut affecter plus ou moins fortement la sélectivité de position.

Dans le cas de la phénylalanine, l'attaque par le radical $\cdot\text{OH}$ donne un mélange d'isomères o-, m- et p-tyrosine [Dizdaroglu & Simic, 1980 ; Maskos *et al.*, 1992b].

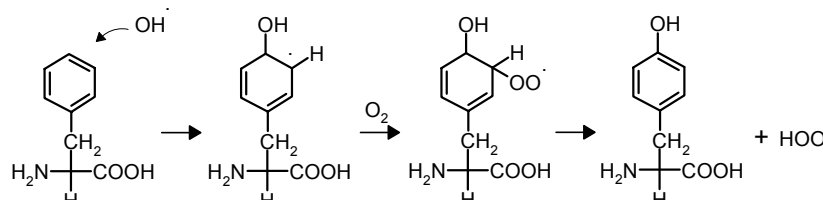


Figure 15. Attaque du radical hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu phénylalanine

Au contraire, l'addition de $\cdot\text{OH}$ sur la tyrosine est beaucoup plus sélective, le substituant hydroxyle ayant un effet directionnel fort [Steenken & O'Neill, 1977]. En présence d'oxygène, l'addition d' O_2 est rapidement suivie d'une élimination de $\text{HOO}\cdot$ et de la

production de 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) [Gieseg *et al.*, 1993 ; Jain *et al.*, 1997]. La dimérisation de radicaux neutres phénoxy donne quant à elle des dityrosines (Karam *et al.*, 1984 ; Audette *et al.*, 2000). Il arrive également mais très rarement que des attaques multiples convertissent la tyrosine en TOPA (2,4,5-trihydroxyphénylalanine). Huggins *et al.* (1993) ont montré que la DOPA et la di-tyrosine sont des indicateurs de dommages oxydatifs des protéines.

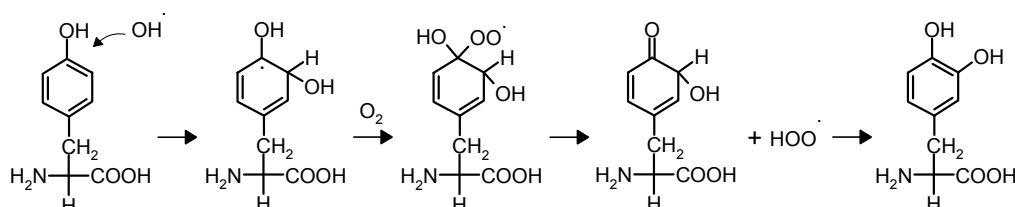


Figure 16. Attaque du radical hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu tyrosine

Dans le cas du tryptophane, le radical OH peut s'additionner sur le cycle benzénique ou sur la liaison C2=C3 du noyau pyrrole [Maskos *et al.*, 1992a], les deux attaques se faisant dans un rapport 40:60 [Solar, 1985]. L'attaque du noyau pyrrole peut mener à une ouverture de cycle et à la formation de N-formylkynurénine, produit de dégradation bien caractérisé [Josimovic *et al.*, 1993 ; Finley *et al.*, 1998].

La formation de N-formylkynurénine pourrait être utilisée comme marqueur de l'oxydation des résidus Trp dans les protéines mais ce n'est pas le cas car ce composé est également généré enzymatiquement [Davies *et al.*, 1999].

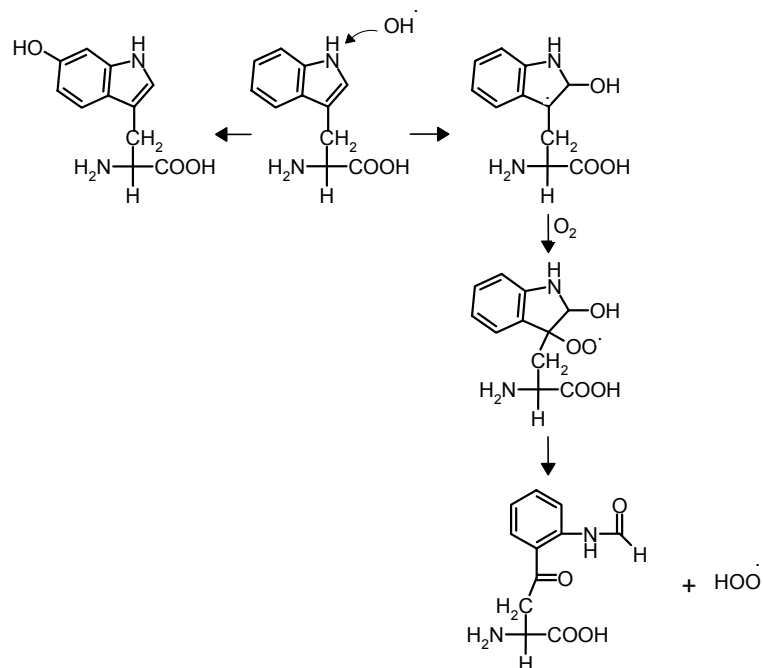


Figure 17. Attaque du radical hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu tryptophane

Les réactions entre les radicaux hydroxyles et l'histidine sont complexes et les produits de ces réactions n'ont pas encore été complètement caractérisés. Les réactions initiales sont des

additions du radical sur le noyau imidazole, principalement sur les carbones C2, C4 et C5. Les radicaux ainsi formés sont stables et vont réagir avec l'oxygène pour former notamment du 2-oxohistidine, de l'asparagine, de l'acide aspartique, des hydroperoxydes et des dérivés hydroxylés [Uchida & Kawakishi, 1993].

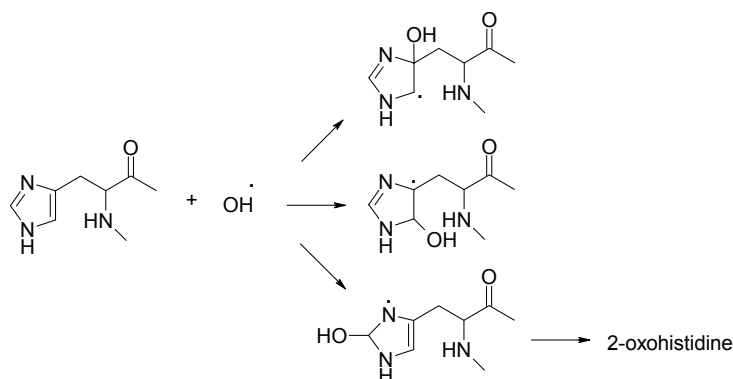
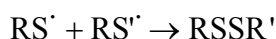
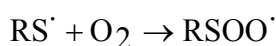


Figure 18. Attaque du radical hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu histidine

1. 6. 2. 3. Attaque des chaînes latérales des acides aminés soufrés

La réaction des résidus cystéine avec les radicaux OH se produit rapidement et quasi uniquement par abstraction de l'hydrogène du groupement thiol [von Sonntag, 1987 ; Wardman and von Sonntag, 1995]. En présence d'oxygène, les radicaux thiyl $\text{RS}\cdot$ ainsi formés donnent des espèces peroxy $\text{RSOO}\cdot$. La dimérisation des radicaux thiyls peut mener à des pontages intra- ou inter-protéines [Wardman & von Sonntag, 1995].



Le groupement thioéther de la méthionine est également attaqué par le radical OH. Asmus (1979) a montré que cette attaque résulte principalement d'une addition sur l'atome S (80 %) et minoritairement d'une abstraction d'un atome d'hydrogène (20 %). En absence ou en présence d'oxygène, les réactions suivant cette attaque sont complexes et mènent à de nombreux produits. Si le clivage des liaisons C-S-C est très peu probable, les décarboxylations sont fréquentes, par transfert des dommages sur les groupements carboxylique ou amine [Hiller *et al.*, 1981; Bobrowski *et al.*, 1991]. En présence d'oxygène, il y a également formation de méthionine sulfoxyde $\text{RS}(\text{O})\text{CH}_3$ et sulfone $\text{RS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ [Asmus, 1979].

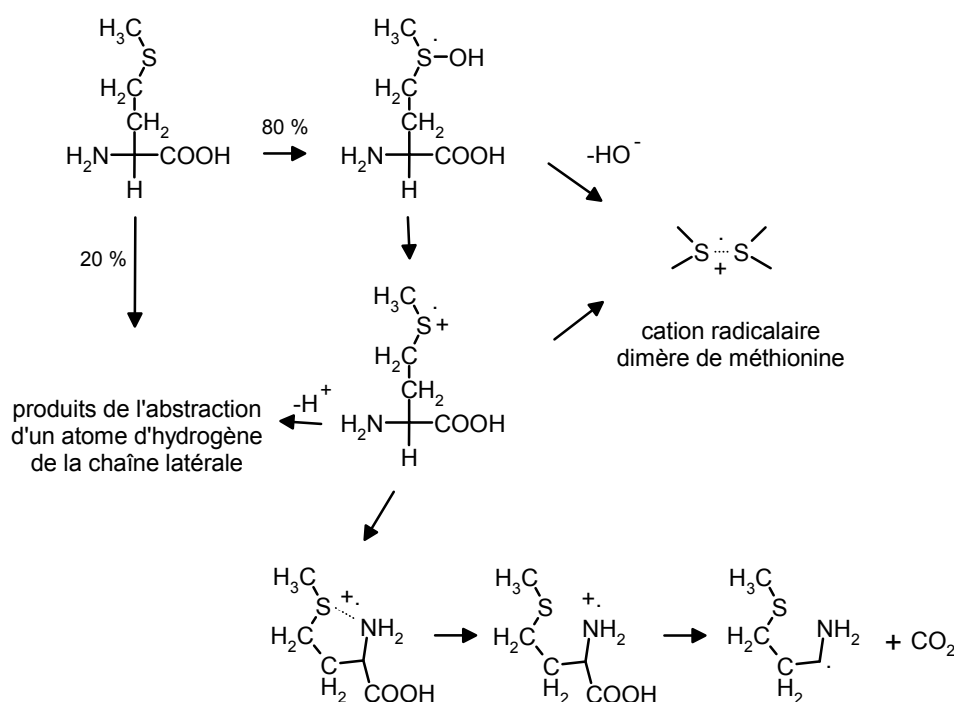


Figure 19. Attaque du radical hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu méthionine

1. 6. 3. Transfert de dommages

a) Transfert entre chaîne latérale et squelette peptidique

Des transferts de dommages entre chaîne latérale et squelette peptidique peuvent se produire, ce qui modifie le rendement en coupures du squelette et les altérations des chaînes latérales : l'attaque de chaînes latérales peut ainsi mener à un clivage du squelette peptidique, ce qui peut être important pour les protéines dont la structure secondaire limite l'accessibilité des radicaux aux C α .

De nombreux travaux montrent le transfert de radicaux des chaînes latérales sur le C α mais peu de transfert vers les chaînes latérales. Le radical C α étant très stable, les transferts ne se produiront probablement qu'avec de très bons donneurs d'hydrogène tels que les thiols [Davies *et al.*, 1993].

Headlam *et al.* (2000) ont démontré que l'attaque initiale de la chaîne latérale de l'alanine en C3 entraîne la formation d'un radical C-3 alkoxyl; la β -scission de ce radical donne un radical centré sur le C α qui mènera au clivage de la chaîne peptique ainsi qu'à la formation de formaldéhyde. Ce type de transfert est un mécanisme retrouvé pour les acides aminés aliphatiques Val (oxydation en C3 et C4), Leu (oxydation en C3, C4 et C5), Glu et Asp (C3) [Headlam & Davies, 2002].

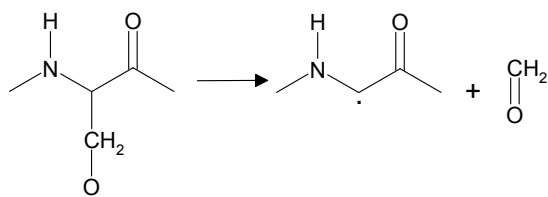


Figure 20. Attaque du C3 de l'alanine menant à une coupure de chaîne

Les radicaux thiyles formés sur un résidu cystéine peuvent également jouer un rôle dans ce type de transfert [Nauser & Schöneich, 2003]. Grierson *et al.* (1992) ont par exemple montré que le radical thyl formé sur le glutathion peut soustraire un H de certains Ca situés adéquatement sur la chaîne peptidique.

b) Transfert entre chaînes latérales

Les réactions de transfert entre chaînes latérales sont de loin celles qui ont été le mieux caractérisées, et plus particulièrement celles impliquant des radicaux dérivés de chaînes latérales aromatiques.

La Figure 21 représente les potentiels de réduction de différents radicaux en fonction du pH. Cela suggère que la cible finale de la radiolyse de protéines soit un résidu tyrosine, ou un résidu tryptophane en absence de tyrosine [Prutz, 1990]. L'oxydation des tyrosines se fait par transfert d'électron, ce qui nécessite un contact direct ou via des intermédiaires appropriés, le squelette peptidique n'étant pas une bonne voie de transfert. Le transfert d'électrons dépend de la structure secondaire des protéines, les feuilletts β constituant des structures plus efficaces pour le transfert d'électrons sur une longue distance que les hélices α [Gray & Winkler, 1996]. Il semble se dérouler via le réseau de liaisons hydrogène.

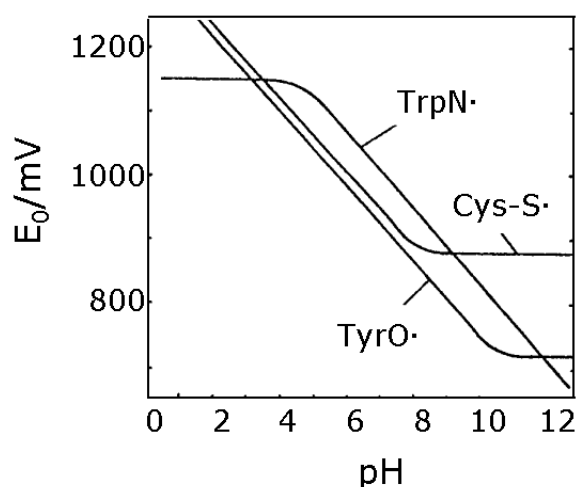


Figure 21. Evolution du potentiel de réduction de différents radicaux peptidiques en fonction du pH [d'après Prutz, 1990].

Ce type de réaction permet d'expliquer la rapidité avec lesquelles certains résidus Tyr, Trp et Phe sont endommagés lors de l'irradiation, alors qu'ils sont enfouis dans le cœur hydrophobe des protéines et donc inaccessibles aux radicaux en solution [Prutz, 1990].

c) Transferts au niveau du squelette peptidique

Les mesures de taux d'amides détectés après radiolyse de certains peptides montrent que les valeurs obtenues sont supérieures à celles attendues. Cela suggère qu'il y aie des transferts de dommages à d'autres sites, par transfert à courte distance et génération de radicaux supplémentaires.

1. 6. 4. Biochimie de l'oxydation des protéines

Certaines modifications décrites ci-dessus sont réversibles. C'est le cas notamment de l'oxydation des résidus méthionine. La réparation des dommages peut se faire via deux voies : l'espèce oxydée est réduite soit par un donneur adéquat, tel que la Trolox C, analogue de tocophérol [Bisbby *et al.*, 1984], soit par la méthionine sulfoxide réductase [Moskovitz *et al.*, 1996]. Les bases de Schiff formées par réaction d'une amine sur un carboxyl sont instables et constituent également un type de lésion réversible [Yim *et al.*, 1995]. Il faut toutefois noter que la formation de bases de Schiff est rapidement suivie de réarrangements d'Amadori et que la fenêtre pendant laquelle la réparation est possible est donc courte.

L'oxydation des protéines a pu être corrélée à différentes pathologies [Dean *et al.*, 1997 ; Shacter, 2000]. Une accumulation de carbonyles a été remarquée dans les tissus lors du vieillissement ainsi que chez les patients atteints de la maladie de Parkinson alors que l'aggrégation des protéines IgG est observée dans les arthrites rhumatoïdes. Enfin, la formation d'hydro(peroxy)leucines est constatée dans les cas de cataracte. Les produits d'oxydation de la valine et la leucine sont déjà utilisés comme indicateurs de l'état d'oxydation de certains tissus biologiques comme les plaques d'athérosclérose à un stade avancé, le plasma de patients diabétiques et le cristallin de patients atteints de cataracte.

Un des phénomènes observés au cours du vieillissement est l'accumulation de protéines oxydées par des radicaux libres. Le fonctionnement normal de la cellule implique une élimination régulière de ces molécules altérées par oxydation. Dans les cellules de mammifères, il existe deux voies principales de dégradation des protéines oxydées, celle des protéases lysosomiales et celle du complexe protéasomiale. Le protéasome est un complexe macromoléculaire réunissant un grand nombre d'activités de dégradation de protéines

endommagées ou porteuses d'autres signaux de dégradation. Une des hypothèses avancées pour expliquer l'accumulation de protéines altérées pourrait être celle de la diminution avec l'âge de l'activité du protéasome [Friguet *et al.*, 2000].

Tableau 3. Constantes de réaction du radical $\cdot\text{OH}$ et des acides aminés [Buxton *et al.*, 1988] et produits de dégradation connus

acide aminé	$k_{\text{OH}\cdot}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	produits de dégradation	Références
Cystéine	$3.4 \cdot 10^{10}$	RSOOH, cystine	Armstrong (1990), von Sonntag (1990), Berlett & Stadtman (1997)
tryptophane	$1.3 \cdot 10^{10}$	5- ou 7-hydroxytryptophane N-formylkynurenine (NFK) kynurenine (KYN)	Maskos <i>et al.</i> (1992a), Josimovic <i>et al.</i> (1993), Finley <i>et al.</i> , (1998)
Tyrosine	$1.3 \cdot 10^{10}$	di-tyrosine 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA)	Karam <i>et al.</i> (1984), Maskos <i>et al.</i> (1992b), Heinecke <i>et al.</i> (1993), Huggins <i>et al.</i> (1993), Gieseg <i>et al.</i> (1993), Jain <i>et al.</i> (1997), Audette <i>et al.</i> (2000)
Méthionine	$8.5 \cdot 10^9$	méthionine sulfoxyde RSOCH ₃ , methionine sulfone RSO ₂ CH ₃	Asmus (1979), Hiller <i>et al.</i> (1981), Bobrowski <i>et al.</i> (1991), Vogt (1995)
phénylalanine	$6.9 \cdot 10^9$	o-, m- et p-tyrosine	Dizdaroglu & Simic (1980), Maskos <i>et al.</i> (1992b),
Histidine	$5 \cdot 10^9$	2-oxo-histidine, acide aspartique, asparagine	Uchida & Kawakishi (1993)
Arginine	$3.5 \cdot 10^9$	acide 5-hydroxy-2-aminovalérique	Ayala & Cutler (1996)
Isoleucine	$1.8 \cdot 10^9$	hydroperoxydes d'isoleucine	Gebicki & Gebicki (1993),
Leucine	$1.7 \cdot 10^9$	hydroxy- et hydroperoxy-leucines acide isovalérique, isovaléraldéhyde	Fu & Dean (1997)
Valine	$8.5 \cdot 10^8$	Hydroperoxyvalines	Fu <i>et al.</i> (1995)
Lysine	$3.5 \cdot 10^8$	hydroxy- et hydroperoxy-lysines	Morin <i>et al.</i> (1998), Hawkins & Davies (1997)
Proline	$3.1 \cdot 10^8$	hydroxy-et hydroperoxy-prolines, acide 5-hydroxy-2-aminovalérique 2-pyrrolidone	Ayala & Cutler (1996), Uchida & Kamakichi (1990)
Glutamate	$1.6 \cdot 10^8$	hydroperoxyde d'acide glutamide	Simpson <i>et al.</i> (1992), Gebicki & Gebicki (1993)
Glycine	$1.7 \cdot 10^7$	acide 2-amino-malonique	Copley <i>et al.</i> (1992), Wheelan <i>et al.</i> (1989)

2- Le répresseur de l'opéron lactose

Les effets des rayonnements ionisants ont premièrement été étudiés sur un système de régulation de l'ADN, le système de l'opéron lactose.

2. 1. Structure et fonction du répresseur *lac*

2. 1. 1. Généralités

Depuis sa découverte en 1961, le système *lac* répresseur- *lac* opérateur d'*Escherichia coli* est un paradigme pour la compréhension de la régulation génique et des interactions ADN-protéines [Jacob & Monod, 1961].

Les bactéries trouvent normalement leur source de carbone dans le métabolisme des sucres. Bien que la source de carbone préférée de *E.coli* soit le glucose, la bactérie peut également utiliser d'autres sucres tels que les β -galactosides. Leur catabolisme met en jeu trois enzymes: la lactose perméase, la β -galactosidase et la thiogalactoside transacétylase. Les gènes codant pour ces protéines - respectivement *lacZ*, *lacY* et *lacA* - sont organisés en un opéron et leur expression est sous la commande d'une protéine de régulation nommée « répresseur *lac* » (voir Figure 22). Il faut noter que l'opéron *lac* est également sous le contrôle d'un activateur mais ce mécanisme de régulation ne sera pas étudié dans ce travail.

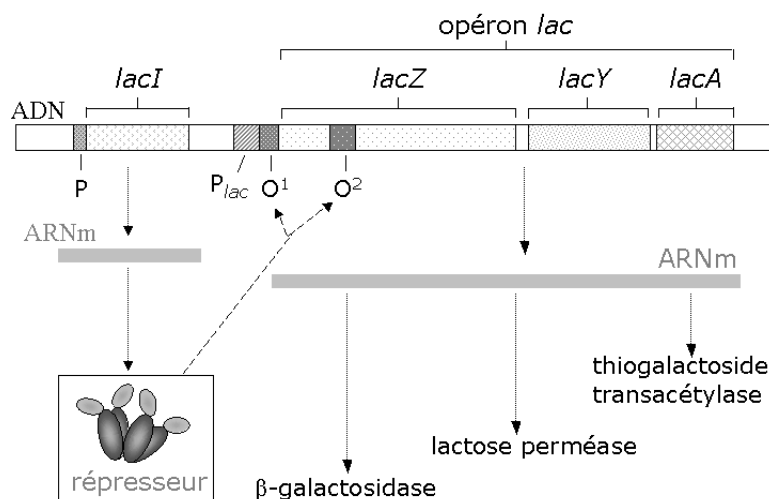


Figure 22. Organisation des gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme du lactose chez *E.coli*.

Le répresseur *lac*, protéine tétramérique, se fixe à des séquences d'ADN appelées opérateurs et désignées O^1 , O^2 et O^3 (voir Tableau 4). En absence de lactose, le répresseur tétramérique est fixé à sa séquence opératrice principale O^1 . L'efficacité de la régulation est augmentée par la présence des séquences opératrices auxiliaires O^2 et O^3 puisque la fixation

simultanée d'un tétramère aux sites O^1 et O^2 (ou O^3) engendre la formation d'une boucle d'ADN, ce qui bloque l'ARN polymérase [Krämer *et al.*, 1987, Oehler *et al.*, 1990 ; Eismann & Müller-Hill, 1990].

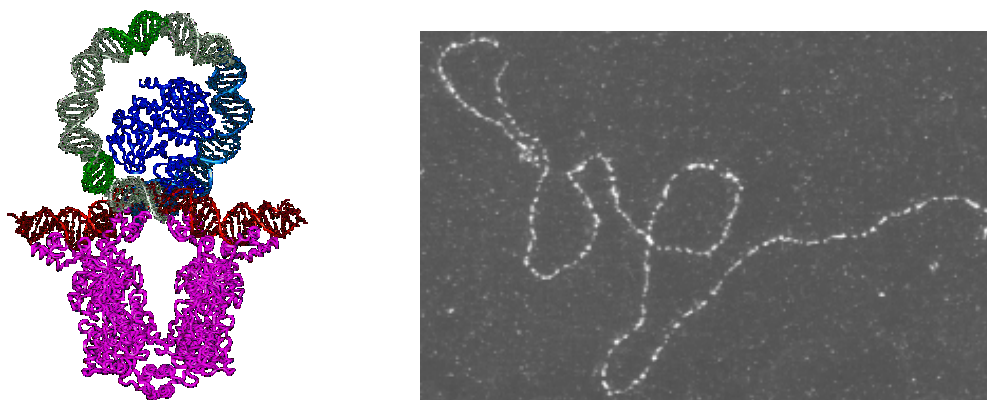


Figure 23. (a) Modèle de boucle de répression [Lewis *et al.*, 1996] dans lequel le répresseur tétramérique (en rose) est fixé sur les séquences opératrices O^1 et O^3 (en rouge) ; une courbure de 40° est appliquée à l'ADN B. (b) Boucle d'ADN formée par le répresseur *lac* fixé sur deux séquences opératrices et observée par micrographie électronique [Krämer *et al.*, 1987].

Lorsque du lactose est présent dans le milieu, une petite partie de ce lactose est catalysée en allolactose. Cet inducteur naturel [Jobe & Bourgeois, 1972] se fixe au répresseur et induit un changement de conformation de ce dernier qui diminue son affinité pour les opérateurs et permet à la polymérase de commencer la transcription. Il existe d'autres sucres inducteurs, appelés inducteurs gratuits, tel que l'isopropyl- β -D-thiogalactoside [Riggs *et al.*, 1970], qui ont le même effet que l'allolactose sur le système.

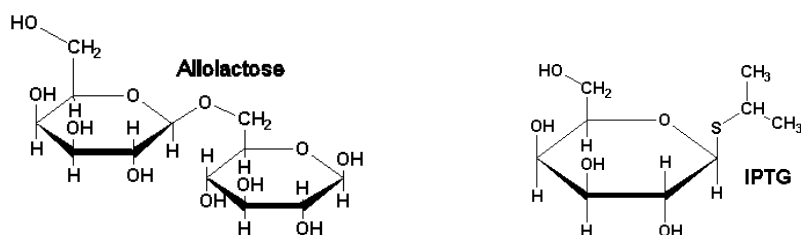


Figure 24. Inducteurs naturel (allolactose) et gratuit (isopropyl- β -D-thiogalactoside ou IPTG) du répresseur au lactose

2. 1. 2. Séquences opérateur

La séquence opérateur O^1 est une séquence quasi-palindromique de 21pb dont la symétrie est brisée par des variations dans les deux demi-séquences opérateurs et par la présence d'une paire de bases centrale G:C (voir Tableau 4). Falcon & Matthews (2000) ont montré que des altérations de la séquence opérateur, telles qu'un changement de la paire de base centrale, une modification de l'espacement entre les demi-opérateurs ou de la symétrie de la séquence, avaient des conséquences importantes sur l'affinité et l'allostérie. Ce travail souligne

l'importance de la séquence d'ADN et de la flexibilité conformationnelle de la protéine pour la complexation. Il a par exemple été montré que le répresseur se fixe avec une affinité environ huit fois plus grande à une séquence symétrique gauche, $O^{\text{sym L}(-1)}$, qu'à la séquence sauvage [Ogata & Gilbert, 1979 ; Sadler *et al.*, 1983].

Tableau 4. Séquences opératrices sauvages (O^1 , O^2 et O^3) et séquences symétriques gauche ($O^{\text{sym L}(-1)}$) et droite ($O^{\text{sym R}(+1)}$)

O^1	5'- A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T -3'	
	3'- T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A -5'	
O^2	5'- A A A T G T G A G C G A G T A A C A A C C -3'	
	3'- T T T A C A C T C G C T C A T T G T T G G -5'	
O^3	5'- G G C A G T G A G C G C A A C G C A A T T -3'	
	3'- C C G T C A C T C G C G T T G C G T T A A -5'	
$O^{\text{sym L}(-1)}$	5'- A A T T G T G A G C G C T C A C A A T T -3'	
	3'- T T A A C A C T C G C G A G T G T T A A -5'	
$O^{\text{sym R}(+1)}$	5'- A A T T G T T A T C C G G A T A A C A A T T -3'	
	3'- T T A A C A A T A G G C C T A T T G T T A A -5'	

La constante d'équilibre de l'interaction répresseur-opérateur dans un tampon standard (force ionique 50 mM) est de l'ordre de 10^{13} M^{-1} [Riggs *et al.*, 1970 ; Culard & Maurizot, 1981]. La fixation de l'inducteur diminue cette constante d'un facteur 1000. Le répresseur interagit également de manière non-spécifique avec des séquences d'ADN non-opérateur [Schnarr *et al.*, 1983] mais ces interactions sont nettement plus faibles ($K = 4.10^4 \text{ M}^{-1}$).

2. 1. 3. Le répresseur *lac*

Le répresseur *lac* de *E.coli* est une protéine homotétramérique (4 x 360 acides aminés) constituée d'un dimère de dimères et composée de domaines fonctionnels distincts (Figure 25), isolables par protéolyse: les *headpieces* (peptides N-terminaux d'environ 60 acides aminés) et le *core* (constitué des extrémités C-terminales des 4 protomères).

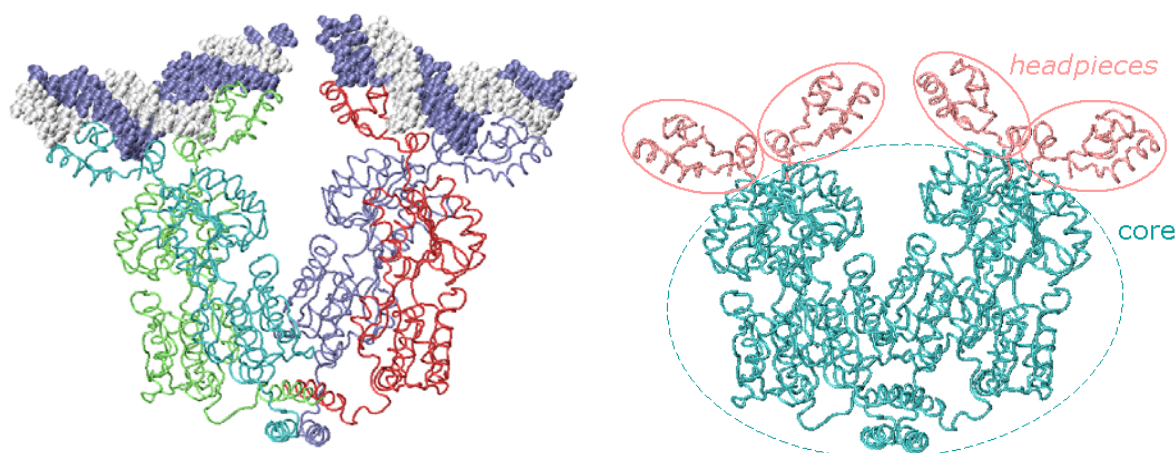


Figure 25. Représentation de la structure tétramérique du répresseur lactose (gauche) et des domaines fonctionnels: les *headpieces* et le *core* (droite) [structure PDB 1LBG d'après Lewis *et al.*, 1996].

MET	LYS	PRO	VAL	THR	LEU	TYR	ASP	VAL	ALA	GLU	TYR	ALA	13
GLY	VAL	SER	TYR	GLN	THR	VAL	SER	ARG	VAL	VAL	ASN	GLN	26
ALA	SER	HIS	VAL	SER	ALA	LYS	THR	ARG	GLU	LYS	VAL	GLU	39
ALA	ALA	MET	ALA	GLU	LEU	ASN	TYR	ILE	PRO	ASN	ARG	VAL	52
ALA	GLN	GLN	LEU	ALA	GLY	LYS	GLN	SER	LEU	LEU	ILE	GLY	65
VAL	ALA	THR	SER	SER	LEU	ALA	LEU	HIS	ALA	PRO	SER	GLN	78
ILE	VAL	ALA	ALA	ILE	LYS	SER	ARG	ALA	ASP	GLN	LEU	GLY	91
ALA	SER	VAL	VAL	VAL	SER	MET	VAL	GLU	ARG	SER	GLY	VAL	104
GLU	ALA	CYS	LYS	THR	ALA	VAL	HIS	ASN	LEU	LEU	ALA	GLN	117
ARG	VAL	SER	GLY	LEU	ILE	ILE	ASN	TYR	PRO	LEU	ASP	ASP	130
GLN	ASP	ALA	ILE	ALA	VAL	GLU	ALA	ALA	CYS	THR	ASN	VAL	143
PRO	ALA	LEU	PHE	LEU	ASP	VAL	SER	ASP	GLN	THR	PRO	ILE	156
ASN	SER	ILE	ILE	PHE	SER	HIS	GLU	ASP	GLY	THR	ARG	LEU	169
GLY	VAL	GLU	HIS	LEU	VAL	ALA	LEU	GLY	HIS	GLN	GLN	ILE	182
ALA	LEU	LEU	ALA	GLY	PRO	LEU	SER	SER	VAL	SER	ALA	ARG	195
LEU	ARG	LEU	ALA	GLY	TRP	HIS	LYS	TYR	LEU	THR	ARG	ASN	208
GLN	ILE	GLN	PRO	ILE	ALA	GLU	ARG	GLU	GLY	ASP	TRP	SER	221
ALA	MET	SER	GLY	PHE	GLN	GLN	THR	MET	GLN	MET	LEU	ASN	234
GLU	GLY	ILE	VAL	PRO	THR	ALA	MET	LEU	VAL	ALA	ASN	ASP	247
GLN	MET	ALA	LEU	GLY	ALA	MET	ARG	ALA	ILE	THR	GLU	SER	260
GLY	LEU	ARG	VAL	GLY	ALA	ASP	ILE	SER	VAL	VAL	GLY	TYR	273
ASP	ASP	THR	GLU	ASP	SER	SER	CYS	TYR	ILE	PRO	PRO	LEU	286
THR	THR	ILE	LYS	GLN	ASP	PHE	ARG	LEU	LEU	GLY	GLN	THR	299
SER	VAL	ASP	ARG	LEU	LEU	GLN	LEU	SER	GLN	GLY	GLN	ALA	312
VAL	LYS	GLY	ASN	GLN	LEU	LEU	PRO	VAL	SER	LEU	VAL	LYS	325
ARG	LYS	THR	THR	LEU	ALA	PRO	ASN	THR	GLN	THR	ALA	SER	338
PRO	ARG	ALA	LEU	ALA	ASP	SER	LEU	MET	GLN	LEU	ALA	ARG	351
GLN	VAL	SER	ARG	LEU	GLU	SER	GLY	GLN					360

Figure 26. Structure primaire d'un monomère de répresseur

Les *headpieces* (Figure 27) constituent les domaines de fixation du répresseur à l'ADN et elles se fixent à raison de 2 *headpieces* par séquence opératrice [Culard *et al.*, 1982]. Chaque *headpiece* forme un petit domaine globulaire dont le cœur hydrophobe est constitué de trois hélices α (résidus 6-13, 17-24 et 32-45), les deux premières hélices formant un motif hélice-tour-hélice (motif HTH) qui va interagir avec le grand sillon de l'ADN. Ce type de motif est rencontré dans de nombreuses protéines de régulation chez les procaryotes [Harrison, 1991]. Des études de RMN [Slijper *et al.*, 1996 ; Spronk *et al.*, 1996, Kalodimos *et al.*, 2001 et 2002] ont montré que la région composée des résidus 50 à 58 est non structurée en absence d'ADN et forme une hélice α lorsque le répresseur est fixé à sa séquence opératrice; l'hélice ainsi formée, appelée l'hélice « charnière », se fixe dans le petit sillon, provoquant une courbure de

l'ADN de 45°C [Chuprina *et al.*, 1993 ; Slijper *et al.*, 1996.]. De plus, Slijper *et al.* (1997) ont également prouvé que la boucle située entre les hélices II et III devient plus rigide en présence d'ADN.

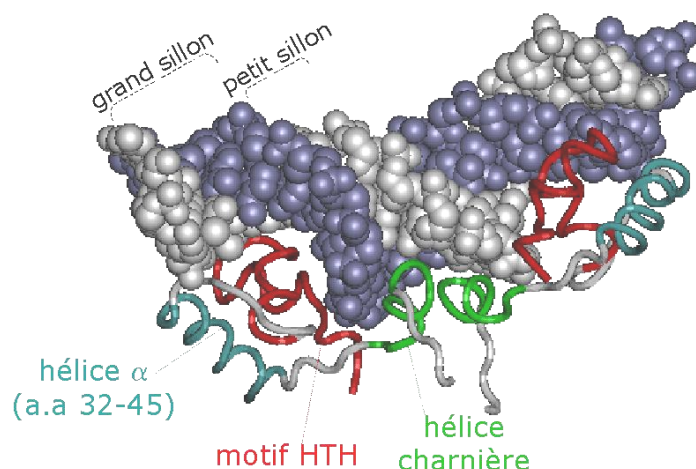


Figure 27. Fixation de deux *headpieces* sur la séquence opératrice [structure PDB 1LBG d'après Lewis *et al.*, 1996]

Les nombreuses interactions observées entre la *headpiece* et l'opérateur peuvent être divisées en deux types : celles impliquant les résidus du motif HTH et celles impliquant les résidus de l'hélice charnière qui interagissent respectivement avec le grand sillon et le petit sillon de l'opérateur [Spronk *et al.*, 1999].

De nombreuses liaisons H sont formées entre les phosphates des sucres et des résidus du motif HTH (Leu6, Ser16, Thr19, Ser21, Asn25, Val30, Ser31 et Thr34). Ces résidus sont également impliqués dans des contacts spécifiques avec des bases situées dans le grand sillon de l'ADN (Thr5, Leu6, Tyr7, Ser16, Tyr17, Gln18, Ser 21, Arg22, Asn25, His29, Thr34 et Tyr 47) et parmi eux, les résidus Tyr17 et Gln18 sont les résidus les plus importants pour la reconnaissance spécifique de l'opérateur.

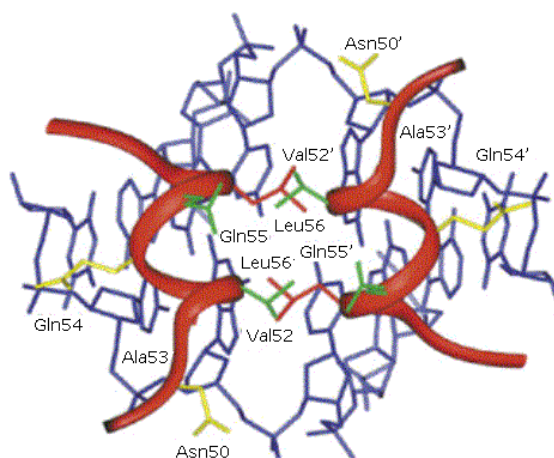


Figure 28. Interactions *headpiece* - *headpiece* entre les hélices charnières d'un dimère [d'après Spronk *et al.*, 1999]

Kalodimos *et al.* (2001) ont mis en évidence le rôle déterminant des hélices charnières pour la stabilité des complexes répresseur-opérateur. Ces hélices forment en effet de nombreuses interactions avec le petit sillon de l'ADN : Asn50 et Glu54 fixent l'hélice à l'ADN via des liaisons H avec les phosphates, Ala53, Leu 56 et Ala57 sont impliquées dans des interactions hydrophobe et Leu56 s'intercale également dans la paire de base centrale et est responsable de la distorsion de l'ADN.

En plus des interactions protéine-ADN, la formation d'une interface protéine-protéine entre les deux hélices charnières d'un même dimère est nécessaire à la stabilité de celles-ci [Spronk *et al.*, 1996]. Ainsi, de nombreux contacts hydrophobes sont établis entre les chaînes latérales des résidus Val52, Ala53, Leu56 et, dans une moindre mesure, Gln55 [Spronk *et al.*, 1999].

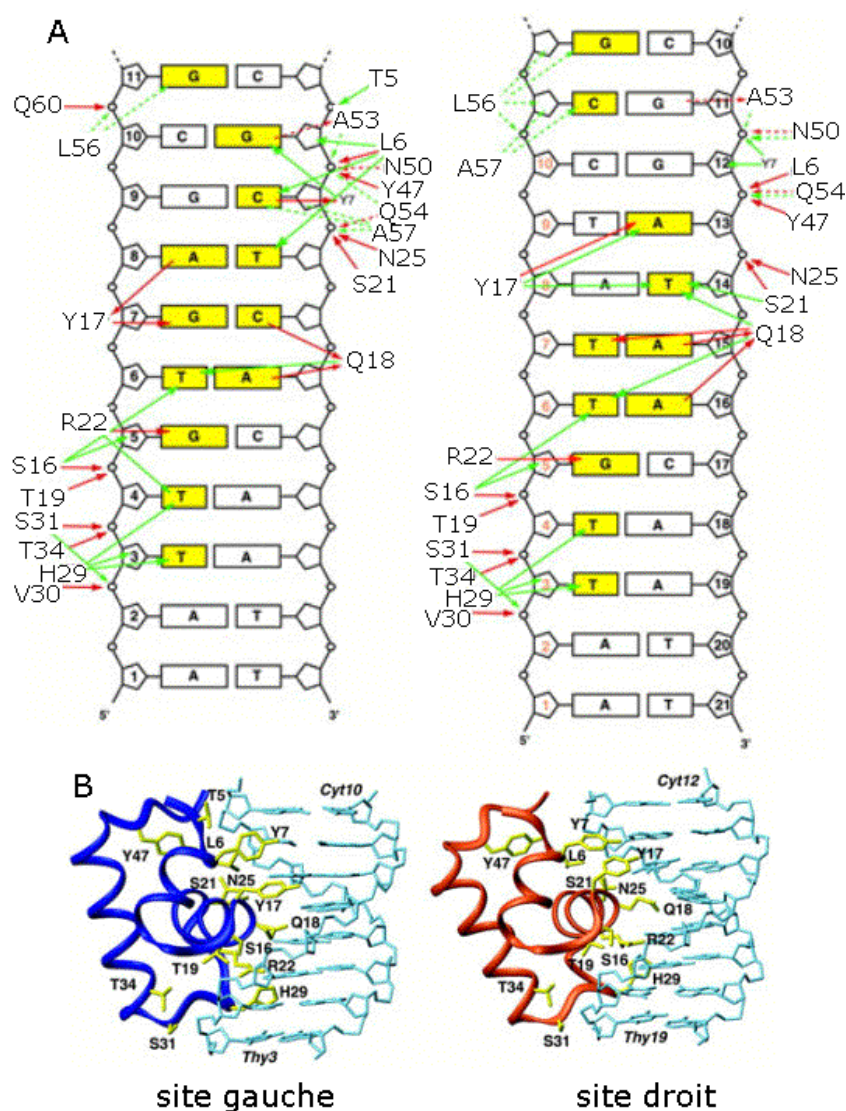


Figure 29. Comparaison des interactions protéine-ADN dans les deux demi-sites du complexe HP62-opérateur. (A) Schéma récapitulatif des interactions dans les demi-sites gauche et droit. (B) Représentation des sous-domaines globulaires droit et gauche (résidus 1-49). Les résidus impliqués dans les interactions protéine-ADN sont représentés en jaune [Kalodimos *et al.*, 2002].

Le core, qui englobe les acides aminés 62-333, est subdivisé en 2 sous-domaines N-terminal (résidus 62-161 et 293-320) et C-terminal (résidus 162-289 et 321-329). Le site de fixation de l'inducteur est localisé à la jonction de ces deux sous-domaines et la structure tétramérique du répresseur est due à des interactions entre résidus du *core*.

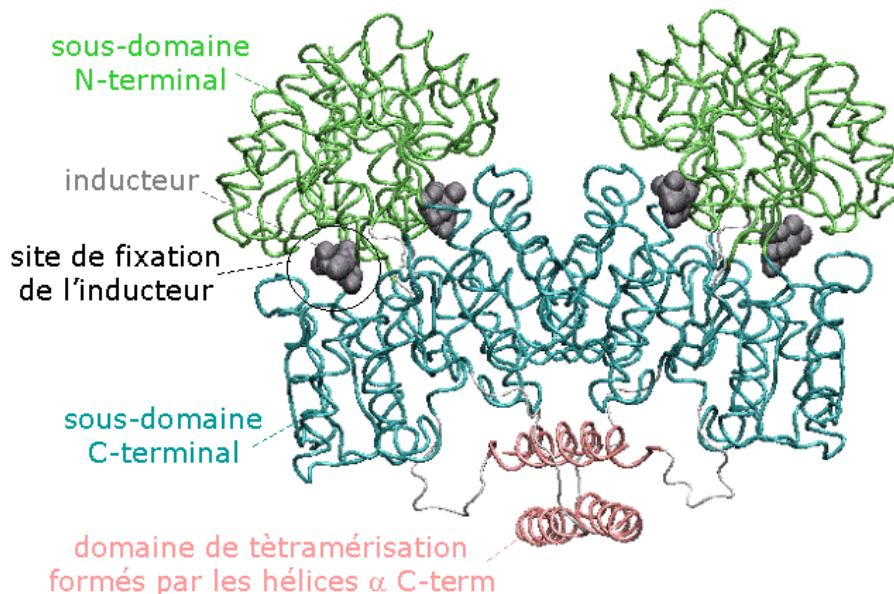


Figure 30. Structure du core et inducteur [structure PDB 1lbh d'après Lewis *et al.*, 1996]

L'organisation de protomères de répresseur en dimères [Lewis *et al.*, 1996] est due à la formation d'interactions entre monomères. La plupart de ces contacts ont lieu au niveau du *core* où quatre clusters d'acides aminés créent une interface monomère-monomère (résidus 70-100, 221-226, 250-260 et 275-285). Des mutations de ces résidus mènent à des protéines monomériques [Chen & Matthews, 1992b ; Chang *et al.*, 1993].

La tétramérisation du répresseur *lac* est due quant à elle à la structuration des hélices α C-terminales (résidus 340-357) qui s'associent en un paquet d'hélices ou « four-helix bundle » [Alberti *et al.*, 1991 ; Chakerian & Matthews, 1991; Chakerian *et al.*, 1991 ; Chen & Matthews, 1992a].

L'hypothèse de transition allostérique dans laquelle la fixation de l'IPTG diminuerait l'affinité du répresseur pour l'ADN est une déduction directe de la comparaison des structures du répresseur fixé à l'ADN [structure PDB 1EFA d'après Bell & Lewis, 2000] et à l'inducteur [structure PDB 1LBH d'après Lewis *et al.*, 1996].

De nombreux travaux ont suggéré que la fixation de l'inducteur provoque une réorientation des sous-domaines N-terminaux du *core*, ce qui altère les interactions spécifiques inter-domaines à l'interface du dimère [Spronk *et al.*, 1999 ; Bell & Lewis, 2000]. Par conséquent, les hélices charnières sont déplacées hors du petit sillon et les interactions

protéine-protéine au niveau de ces hélices sont rompues ; cela provoque la déstructuration de celles-ci et, finalement, une chute drastique de l'affinité du répresseur pour l'opérateur [Lewis *et al.*, 1996 ; Spronk *et al.*, 1996 ; Bell & Lewis, 2000 ; Markiewicz *et al.*, 1994 ; Pace *et al.*, 1997]. Cette théorie est soutenue par les travaux de Falcon [Falcon *et al.*, 1997 ; Falcon & Matthews, 2001] qui montrent qu'en fixant les hélices charnières de deux *headpieces* par un pont disulfure, l'effet allostérique de l'IPTG disparaît.

Il faut également souligner que les interactions formées à l'interface monomère-monomère sont différentes suivant la conformation du répresseur-fixé à l'ADN ou à l'inducteur [Bell & Lewis, 2001]; les résidus de cette interface jouent donc un rôle dans la transition allostérique (Figure 31). Les interactions électrostatiques entre Lys84 et Glu100, Gln117 et Arg118 et His74 et Asp278 sont ainsi observées lorsque l'IPTG est fixé au répresseur, alors que ces mêmes interactions sont absentes lorsque le répresseur est fixé à l'ADN puisque les Ca de ces résidus sont éloignés de 3 Å [Lewis *et al.*, 1996].

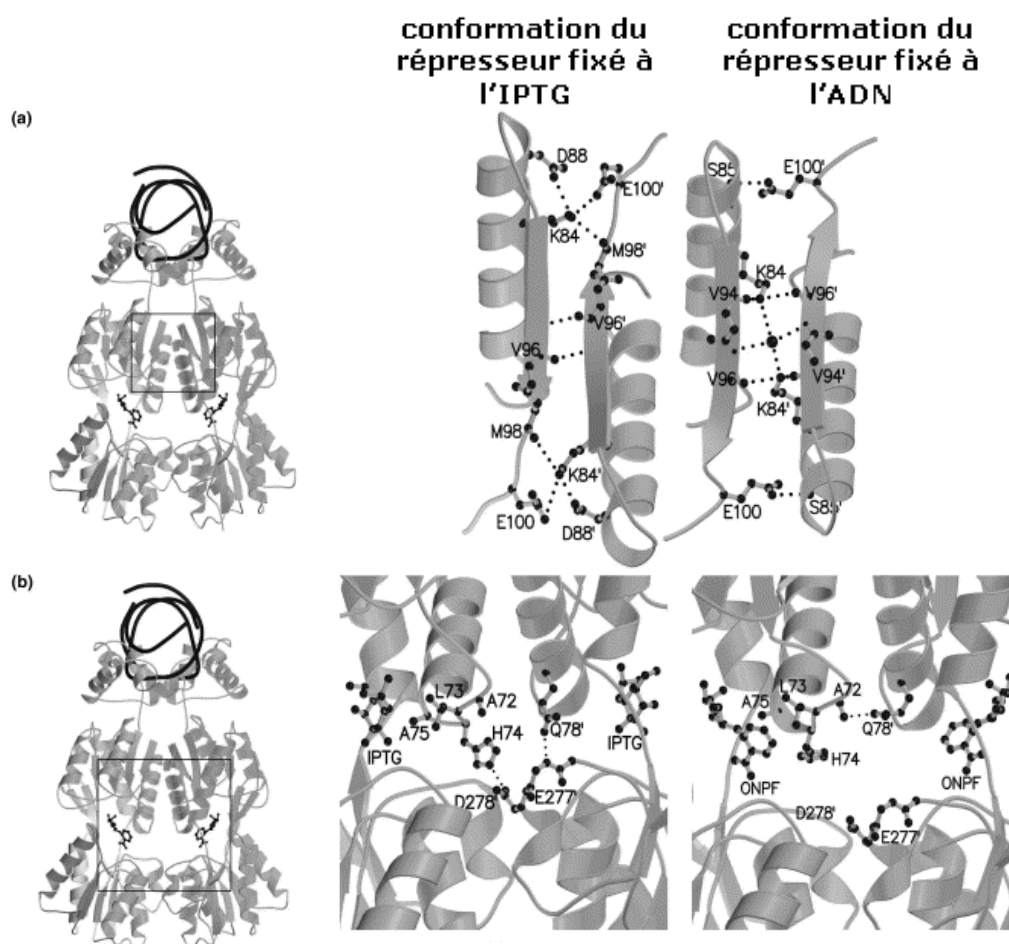


Figure 31. Interactions inter-sous-unités pour le répresseur fixé à l'ADN [structure pdb 1LBG d'après Lewis *et al.*, 1996] et à l'inducteur [structure pdb 1EFA d'après Bell and Lewis, 2000] (a) interactions impliquant Lys84 à l'interface du sous-domaine N-terminal (b) interactions impliquant la liaison His74-Asp278 à l'interface monomère-monomère (c) interactions impliquant Arg118 à l'interface entre le sous-domaine N-terminal du *core* d'un protomère et la *headpiece* du deuxième protomère.

Les structures cristallographiques ne fournissant pas d'information sur les mécanismes sous-tendant le changement de conformation, Flynn *et al.* (2003) ont utilisé la dynamique moléculaire afin de décrire cette transition atome par atome. Il apparaît clairement de ce travail que la dynamique de l'induction du dimère est asymétrique : la fixation d'une molécule d'inducteur à son site sur un protomère induit des changements qui vont se propager tout d'abord sur ce monomère avant d'atteindre le second monomère. Ces résultats sont cohérents avec les données biochimiques, génétiques et structurales accumulées jusque là.

Comme montré à la Figure 30, le site de fixation de l'inducteur est situé dans le *core*. Les résidus importants pour la réponse à l'inducteur peuvent être divisés en deux groupes : les résidus en contact direct avec l'inducteur et ceux faisant partie de l'interface monomère-monomère et donc essentiels pour la transition allostérique.

Les structures résolues par Lewis *et al.* (1996) ont permis de déterminer les résidus impliqués dans la fixation de l'inducteur, soit via des liaisons hydrogène (Asn246 avec O2, Arg 197 avec O3 et O4, Asp149 avec O6), soit via des interactions hydrophobes (Leu73, Ala75, Pro76, Ile79, Trp220, Phe293) ou via des interactions de van der Waals (entre le groupement isopropyl et Trp 220). Les travaux de Chang [Chang *et al.*, 1994 ; Chang & Matthews, 1995] ont également permis de situer Asp274 dans le site de fixation de l'inducteur.

Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer les résidus présents à l'interface monomère-monomère qui jouent un rôle dans l'induction du système. C'est notamment le cas des résidus Arg197 [Spotts *et al.*, 1991], His74 et Asp278 [Barry & Matthews, 1999] et Asp88 [Chang *et al.*, 1994].

La séquence carboxyl-terminal du répresseur contient un motif de glissière à leucines (résidus Leu342, Leu346, Leu349 et Leu356) nécessaire pour la tétramérisation. La substitution ou la délétion de ces leucines donne des formes dimériques [Chakerian *et al.*, 1991 ; Alberti *et al.*, 1991] qui ont la même affinité que le répresseur tétramérique vis-à-vis de l'ADN [Brenowitz, 1991] mais sont moins inductibles [Oehler *et al.*, 1990].

2. 2. Effet des rayonnements ionisants sur le système de l'opéron lactose

La reconnaissance de séquences spécifiques d'ADN par des protéines jouant un rôle très important dans de nombreux processus de régulation, la question s'est posée de savoir si l'exposition de complexes ADN-protéines ou de l'un de leurs composants à un stress

oxydatif, tels que les radiations ionisantes, pouvait affecter le processus de reconnaissance. Afin de répondre à cette question, l'équipe a étudié le comportement du complexe *lac* répresseur-*lac* opérateur sous irradiation.

Dans un premier temps, il a été démontré que l'irradiation diminue la formation du complexe spécifique répresseur-opérateur en milieu aéré [Eon *et al.*, 2001]. Ce complexe peut toutefois être restauré par ajout de protéine non irradiée mais pas par l'ajout d'ADN non irradié, ce qui montre que les dommages qui inhibent la formation du complexe sont ceux infligés à la protéine, plus que ceux à l'ADN (voir Figure 32).

L'irradiation détruit donc le complexe en modifiant la capacité de fixation de la protéine. Cette conclusion a été confirmée par la perte dramatique de capacité de fixation du répresseur irradié vis-à-vis d'ADN non irradié.

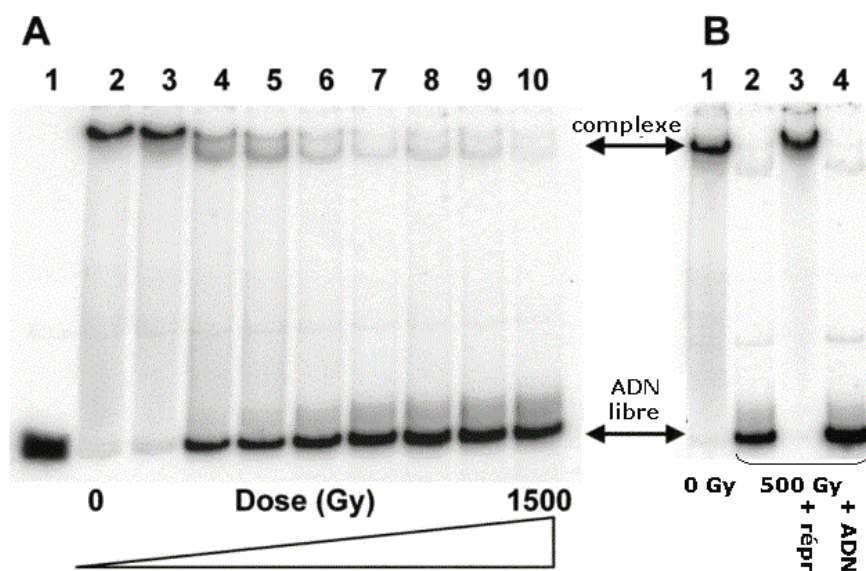


Figure 32. (A) Electrophorèse en gel retard de complexes répresseur-opérateur irradiés. Piste 1 : fragment d'ADN de 80 pb non irradié. Piste 2-10 : complexes répresseur –80 pb irradié (B) Restauration du complexe après addition de répresseur non irradié (piste 3) ou d'ADN non irradié (piste 4) à un complexe irradié avec 500 Gy (piste 2). Piste 1: complexe non irradié. [d'après Eon *et al.*, 2001].

Il est intéressant de noter que la dose nécessaire pour détruire le complexe irradié est plus grande que celle induisant la perte totale de capacité de fixation du répresseur libre (Figure 33). Cette différence de doses montre que la protéine est protégée des rayons γ par l'ADN fixé, ce qui a également été mis en évidence par des calculs d'accessibilité des acides aminés du répresseur aux radicaux OH : la protection est due à la fois à un masquage physique et à des effets conformationnels [Begusova *et al.*, 2001].

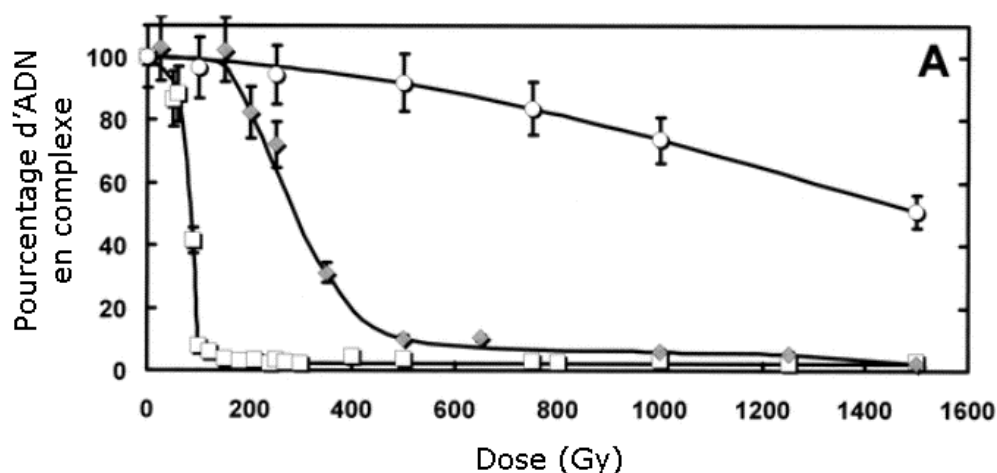


Figure 33. Pourcentage d'ADN fixé au répresseur après irradiation du complexe (losanges), du répresseur libre (carrés) ou de l'ADN libre (cercles) ; résultats obtenus par analyse de gels retard [d'après Eon *et al.*, 2001].

Il a également été montré que l'irradiation du répresseur provoque des clivages de la chaîne peptidique et que les ions lourds induisent plus de coupures que les rayons γ . La fixation de répresseur irradié étant similaire pour les deux types de rayonnement, cela laisse supposer que les coupures de chaîne ne sont pas les dommages critiques pour l'interaction et que ce sont les modifications de chaînes latérales qui jouent un rôle fondamental dans la perte de capacité de fixation du répresseur.

Un modèle a été développé au laboratoire [Charlier *et al.*, 2002] qui permet d'expliquer de manière satisfaisante les résultats expérimentaux ; il postule que deux dommages indépendants sont nécessaires au minimum pour inactiver le répresseur. Ce modèle a été construit en deux étapes. Tout d'abord, le nombre de cassures de la chaîne peptidique est considéré proportionnel à la dose et la distribution du nombre de coupures par protomère suit une loi de Poisson. Deuxièmement, le modèle d'inactivation du répresseur tient compte de la structure quaternaire (dimère de dimères) et de l'organisation en domaines (deux sites de fixation à l'ADN, un par dimère) du répresseur. Des hypothèses ont été posées : un protomère est inactivé par minimum deux dommages, un dimère est inactivé quand au moins un des deux protomères est inactivé et le tétramère est inactivé lorsque les deux dimères le sont (voir Figure 34). En combinant ces deux modèles, il en résulte que les clivages de chaînes ne sont pas responsables de l'inactivation de la protéine, qui doit être principalement due à l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés. Ceci a confirmé ce qui avait été constaté expérimentalement.

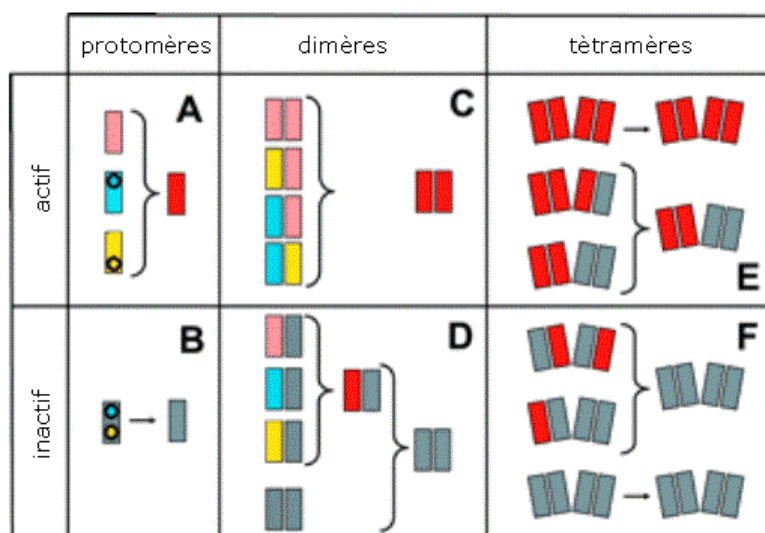


Figure 34. Hypothèses posées lors de l'élaboration du modèle d'inactivation du répresseur en deux dommages. Un protomère actif (rouge) peut être soit intact (rose), soit porté un dommage (bleu ou jaune) alors qu'un protomère inactif porte deux dommages (gris). Un dimère actif (*i.e.* les deux protomères sont actifs) est rouge ; un dimère inactif (*i.e.* au-moins un protomère est inactif) est gris [d'après Charlier *et al.*, 2002].

Certains acides aminés particulièrement oxydables (His, Tyr) sont en effet impliqués dans la fixation de l'opérateur. Un des dommages possibles induits par les radiations est la formation de dityrosines à partir de deux résidus tyrosil proches. Par modélisation moléculaire [Gras *et al.*, 2005], il a été montré que ce type de dommages pouvait partiellement expliquer la perte de capacité de fixation du répresseur à l'ADN.

Il faut remarquer que les radicaux hydroxyles produits par la radiolyse de l'eau peuvent réagir avec l'ADN, les protéines mais également avec de nombreux autres composés. La capacité d'un composé à réagir avec les radicaux OH en solution, c'est à dire sa capacité à capturer les radicaux hydroxyles sera appelée ici son ***pouvoir scavenger***.

3- La formamidopyridine-DNA glycosylase

Les effets des rayonnements ionisants ont également été étudiés dans le cas d'une protéine bactérienne de réparation de l'ADN, la formamidopyrimidine-DNA glycosylase (ou Fpg). Les mécanismes majeurs de réparation de l'ADN seront tout d'abord détaillés, avant de présenter la protéine Fpg.

3. 1. Généralités sur les mécanismes de réparation de l'ADN

Pour pallier les effets délétères des agents endommageant l'ADN, la cellule a mis en place une panoplie de systèmes de réparation de son ADN. Sur leur principe, ces systèmes ont été conservés des procaryotes aux eucaryotes supérieurs [Lloyd & Linn, 1993] mais leur complexité a fortement augmenté au cours de l'évolution, tant du point de vue du nombre d'enzymes impliquées que de la taille des complexes multi-enzymatiques et du nombre de protéines régulatrices.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour contourner l'effet délétère d'une lésion ; les dommages peuvent être réparés par réversion directe, par recombinaison et par excision-resynthèse.

Les systèmes enzymatiques de **réparation par réversion directe** (ou *Direct Reversal Repair*, DRR) éliminent les lésions en catalysant la réaction inverse à celle qui a conduit à former ces lésions. Parmi les enzymes impliquées dans ce type de réparation, les photolyases vont réparer les lésions induites par les UV [Carell *et al.*, 2001]. Les alkyl-DNA transférases vont quant à elles réparer les bases alkylées en catalysant le transfert du groupement alkyl sur le groupement thiol d'une de leurs cystéines [Segwick & Lindhal, 2002 ; Margison & Santibanez-Koref, 2002]. Ces systèmes de réparation ont pour avantage d'être hautement spécifiques, ce qui est également un désavantage puisque leur adaptabilité sera limitée. Ils n'ont donc pas nécessairement été conservés par les organismes supérieurs.

La **recombinaison homologue** et le processus dit "**end-joining**" sont les deux voies principales de réparation des CDB. En général, la recombinaison homologue assure une réparation précise en utilisant le brin intact comme modèle. D'un autre côté, le processus de *end-joining* utilise très peu ou pas les séquences homologues et aligne puis ressoude les extrémités cassées de l'ADN [Cox, 2001 ; Thompson & Schild, 2002].

Les systèmes de **réparation par excision-resynthèse** sont de loin les plus utilisés par les organismes vivants et, contrairement aux systèmes par réversion directe, ils nécessitent l'intervention de plusieurs enzymes ou de complexes multi-enzymatiques. Ils sont caractérisés par une première étape d'excision au cours de laquelle la lésion est reconnue spécifiquement et excisée, puis par une deuxième étape dite de resynthèse qui utilise une polymérase et une ligase pour restaurer la structure d'origine du brin endommagé. Ces systèmes de réparation peuvent être sous-divisés en plusieurs sous-systèmes: la réparation par excision de base (BER pour *Base Excision Repair*), la réparation par excision de nucléotides (NER pour *Nucleotide Excision Repair*) et la réparation de mésappariements introduits dans l'ADN néosynthétisé par l'ADN polymérase (MMR pour *Methyl-directed Mismatch Repair* et VSP pour *Very Short Patch Repair*). Les modifications de bases stériquement peu encombrantes, telles que celles résultant d'oxydation, d'alkylation ou de désamination, sont souvent réparées par des systèmes d'excision de base [Schaerer & Jiricny, 2001]. A *contrario*, les lésions plus volumineuses (et qui peuvent donc bloquer la réplication), tels que les dimères de thymines et les gros adduits formés par différents agents génotoxiques, sont réparées par le système d'excision de nucléotides. Le système MMR reconnaît spécifiquement le brin parental matrice, grâce à la méthylation spécifique de celui-ci. Le système VSP reconnaît quant à lui spécifiquement les mésappariements T:G résultant de la désamination des 5-méthylC en T.

Il faut toutefois noter qu'il existe des redondances dans la prise en charge des lésions entre enzymes à la fois d'un même système de réparation (par exemples entre glycosylases) et de systèmes différents (NER et BER).

Les systèmes de réparation sont essentiels pour la survie des organismes et des mutations au sein de gènes codant pour des enzymes de réparation sont la cause de certaines maladies génétiques. C'est le cas notamment du syndrome de Cockayne [de Boer & Hoeijmakers, 2000] et du *Xeroderma Pigmentosum* qui sont dus à des défauts de fonctionnement du système NER. Certains cancers du colon, de l'endomètre et des ovaires ont également été associés à des mutations de gènes impliqués dans le MMR chez l'homme [Fisher *et al.*, 1993].

La protéine Fpg appartenant au systèmes BER des eubactéries, cette stratégie de réparation va maintenant être détaillée, les autres systèmes étant volontairement éludés.

3. 2. Le système BER

La réparation par excision de base est initiée par les ADN glycosylases, enzymes qui reconnaissent spécifiquement et éliminent les bases endommagées dans l'ADN en clivant la liaison N-glycosidique entre la base lésée et le désoxyribose. Les sites abasiques qui en résultent sont ensuite traités par des endonucléases, polymérase et ligase afin de restaurer la séquence originale de l'ADN. Ce traitement du site AP peut se faire via deux voies enzymatiques (voir Figure 35), une voie courte et une voie longue (SPR pour *Short-Patch Repair* et LPR pour *Long-Patch Repair*). La voie qui domine est la voie SPR, la voie LPR étant utilisée comme alternative de secours pour éliminer des sites AP modifiés résistants à l'activité dRpase de Pol β [Klungland & Lindahl, 1997].

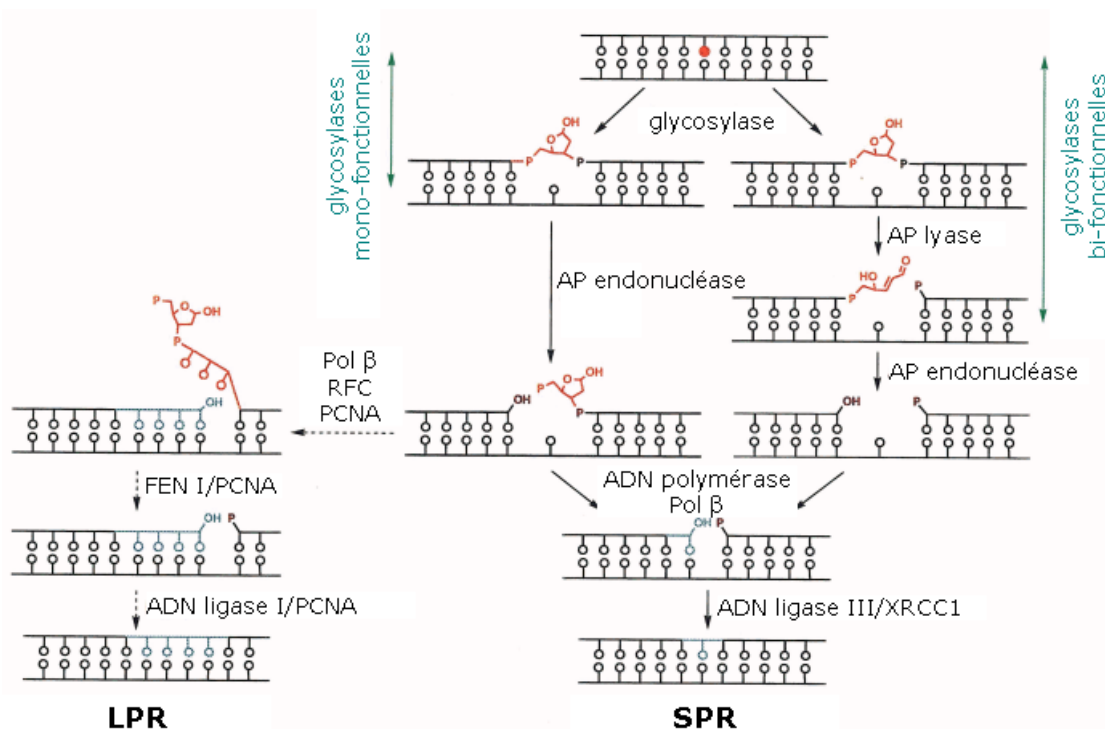


Figure 35. Différentes voies du système BER [d'après Ide & Kotera, 2004]

Les ADN glycosylases peuvent être classées en deux catégories principales, qui diffèrent d'après leur mécanisme catalytique. Les glycosylases monofonctionnelles catalysent l'élimination de la base endommagée en une seule étape, par une attaque d'une molécule d'eau sur le C1' du substrat. Les glycosylases bifonctionnelles utilisent quant à elle une de leurs amines nucléophiles pour attaquer le C1'; le complexe covalent protéine-ADN (type base de Schiff) ainsi formé subit des réactions en cascade qui mène à une coupure de la chaîne nucléotidique en 3' par un mécanisme de β -élimination, suivi dans certains cas par une coupure en 5'.

Les bases oxydées sont généralement prises en charge par des enzymes bifonctionnelles tandis que les bases alkylées et l'uracile sont excisés par des enzymes monofonctionnelles.

Quatre superfamilles structurales d'ADN glycosylases ont été identifiées jusqu'à présent : les superfamilles des uracile ADN glycosylases (UDG), des alkyladénine ADN glycosylases (AAG), des formamidopyrimidine ADN glycosylases (MutM/Fpg) et des HhH-GDP (famille dont les membres possèdent un site actif porteur du motif hélice-hairpin-hélice suivi par une boucle riche en Gly/Pro et d'un résidu aspartate catalytique) [Thayer *et al.*, 1995 ; Nash *et al.*, 1996].

Les enzymes de la superfamille de Fpg sont caractérisées par un motif d'interaction avec l'ADN, le motif hélice-deux tours-hélice (H2TH), et par une extrémité N-terminale très conservée contenant un résidu Pro1 que tous les membres de cette superfamille utilisent comme clé de l'attaque nucléophile.

3. 3. La formamidopyrimidine-DNA glycosylase

3. 3. 1. Généralités

Si l'activité Fpg a été initialement découverte chez les bactéries [Chetsanga & Lindahl 1979], des activités similaires ont été plus récemment découvertes chez la levure [de Oliveira *et al.* 1994 ; Auffret van der Kemp *et al.*, 1996 ; Roldan-Arjona *et al.* 1997] et chez les mammifères [Bessho *et al.* 1993a ; Bessho *et al.* 1993b ; Radicella *et al.* 1997]. Cette glycosylase bi-fonctionnelle fait partie d'un système d'élimination des 8-oxoG appelé « système GO », système, qui fait intervenir au moins deux autres enzymes, MutY et MutT [Michaels *et al.*, 1992].

Cette glycosylase bi-fonctionnelle est une protéine monomérique basique, d'environ 31 kDa, dont la structure primaire est bien conservée chez les procaryotes (voir Figure 36).

Les études structurales montrent que les protéines appartenant à la famille Fpg présentent des similarités de structure et permettent de décrire une structure « générale » pour cette famille. La protéine de type Fpg est structurée en deux domaines globulaires nettement séparés par une boucle flexible et ces deux domaines délimitent une cavité large et profonde dans laquelle se fixe l'ADN. Il faut noter que cette structure en domaines ainsi que la flexibilité de la boucle permettent à la protéine de changer de conformation lorsqu'elle se fixe à l'ADN [Fedorova *et al.*, 2002] et de s'adapter à une large gamme de substrats [Fromme & Verdine, 2002]. Le domaine N-terminal est composé de huit feuillets β antiparallèles formant

un sandwich, celui-ci étant bordé à son extrémité par deux hélices α . L'hélice α N-terminale contient deux résidus fonctionnels importants, Pro1 et Glu2 et cette hélice pointe vers la poche de fixation de l'ADN. Le domaine C-terminal est riche en hélices α ; il contient entre autres un motif « doigt de zinc » formé par deux brins β anti-parallèles et un motif hélice-deux tours-hélice. Ces deux sous-domaines participent à la reconnaissance et à la fixation de dommages à l'ADN.

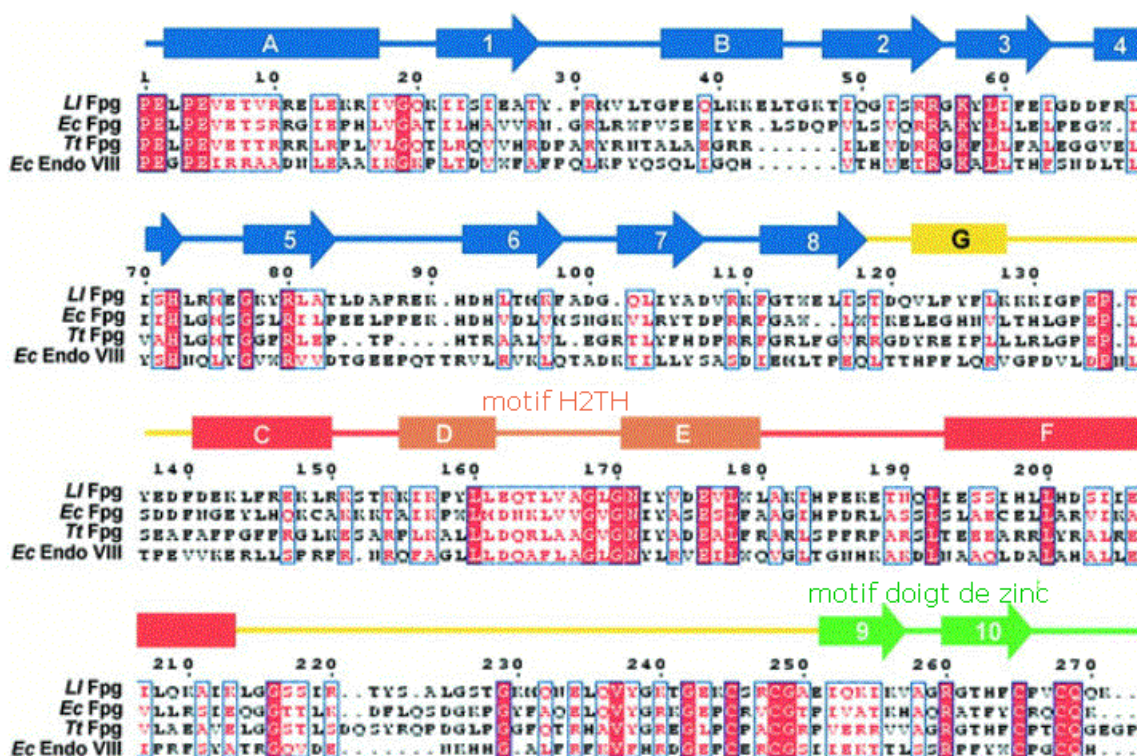


Figure 36. Alignement des séquences Fpg de *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus* et de l'Endo VIII de *Escherichia coli*. Les résidus identiques sont représentés en blanc sur fond rouge, les homologues en rouge sur fond blanc. Les flèches et rectangles schématisent respectivement les feuillets et hélices de la structure de L/Fpg [d'après Serre *et al.*, 2002].

Le motif doigt à zinc de Fpg est composé par la séquence Cys244-X2-Cys247-X16-Cys264-X2-Cys267-X3-COOH et un atome de zinc est fixé par molécule. Il a été montré qu'une modification chimique des résidus cystéine impliqués dans le doigt de zinc inhibait les activités glycosylase et AP lyase de Fpg [O'Connor *et al.*, 1993]. D'autre part, des études de mutagenèse dirigée ont prouvé que des mutations de ces résidus cystéine, bien que n'altérant pas significativement la structure secondaire de la protéine, avaient des effets dramatiques sur la fixation de l'ADN endommagé et sur l'activité de Fpg [O'Connor *et al.*, 1993 ; Tchou *et al.*, 1993]. Chez *E.coli*, la protéine Fpg comprend deux résidus cystéine supplémentaires situés hors du doigt de zinc (Cys147 et Cys195) mais des mutations de ces résidus ne modifient pas l'activité enzymatique de Fpg [O'Connor *et al.*, 1993].

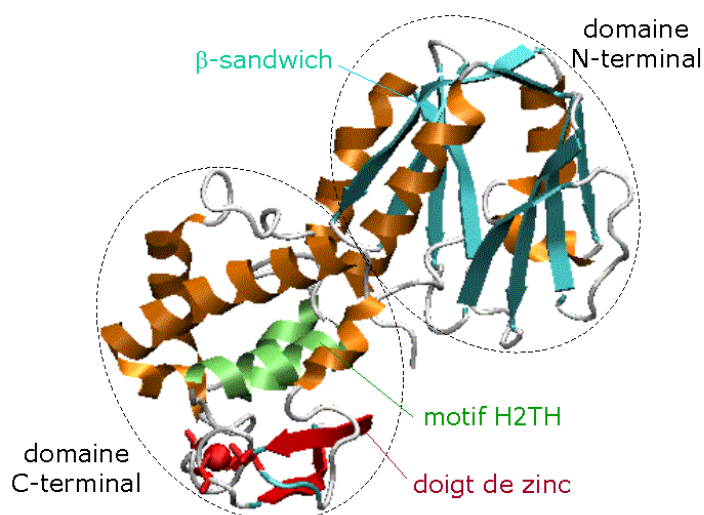


Figure 37. Structure secondaire de la formamidopyrimidine-ADN glycosylase [structure PDB 1PJJ d'après Serre *et al.*, 2002].

3. 3. 2. Activité enzymatique de Fpg

La protéine Fpg a plusieurs activités enzymatiques. Son activité **DNA glycosylase** lui permet d'exciser les purines oxydées par clivage de la liaison N-glycosylique entre le désoxyribose et la base modifiée tandis que son activité **AP lyase** lui permet de couper l'ADN en 3' et en 5' d'un site abasique par un mécanisme de β/δ -élimination. Elle possède également une activité désoxyribo-phosphodiesterase (**dRPase**) qui lui permet d'éliminer les phosphates des désoxyriboses en 5'-terminal de l'ADN pré-coupé par des enzymes hydrolytiques telles que les AP endonucléases Xth (ExoIII) et Nfo (EndoIV) de *Escherichia coli* [Graves *et al.*, 1992].

La combinaison des résultats venant d'études biochimiques avec les données structurales obtenues par diffraction des rayons X de cristaux a permis de proposer un mécanisme moléculaire de reconnaissance de la base altérée par Fpg.

Tout d'abord, la reconnaissance des lésions par Fpg peut être divisée en deux étapes [Zharkov *et al.*, 2003]: la lésion doit premièrement être localisée par l'enzyme parmi un large excès de bases normales (reconnaissance dynamique) puis la lésion doit être placée dans le site actif de l'enzyme (reconnaissance statique).

Il semble que Fpg diffuse le long de la molécule d'ADN et interagisse avec l'ADN via le grand sillon : la tête de lecture de Fpg interagit avec N⁷ et/ou O⁸ pour distinguer les bases endommagées des bases normales [Tchou *et al.*, 1994 ; Perlow-Poehnelt *et al.*, 2004]. Les données de modélisation et dynamique moléculaires, ainsi que la mutagenèse dirigée

impliquent plusieurs résidus de Fpg (Met73, His89, Arg 108 et Lys217) dans la reconnaissance spécifique des dommages et donc de O⁸ et N⁷ [Zaika *et al.*, 2004].

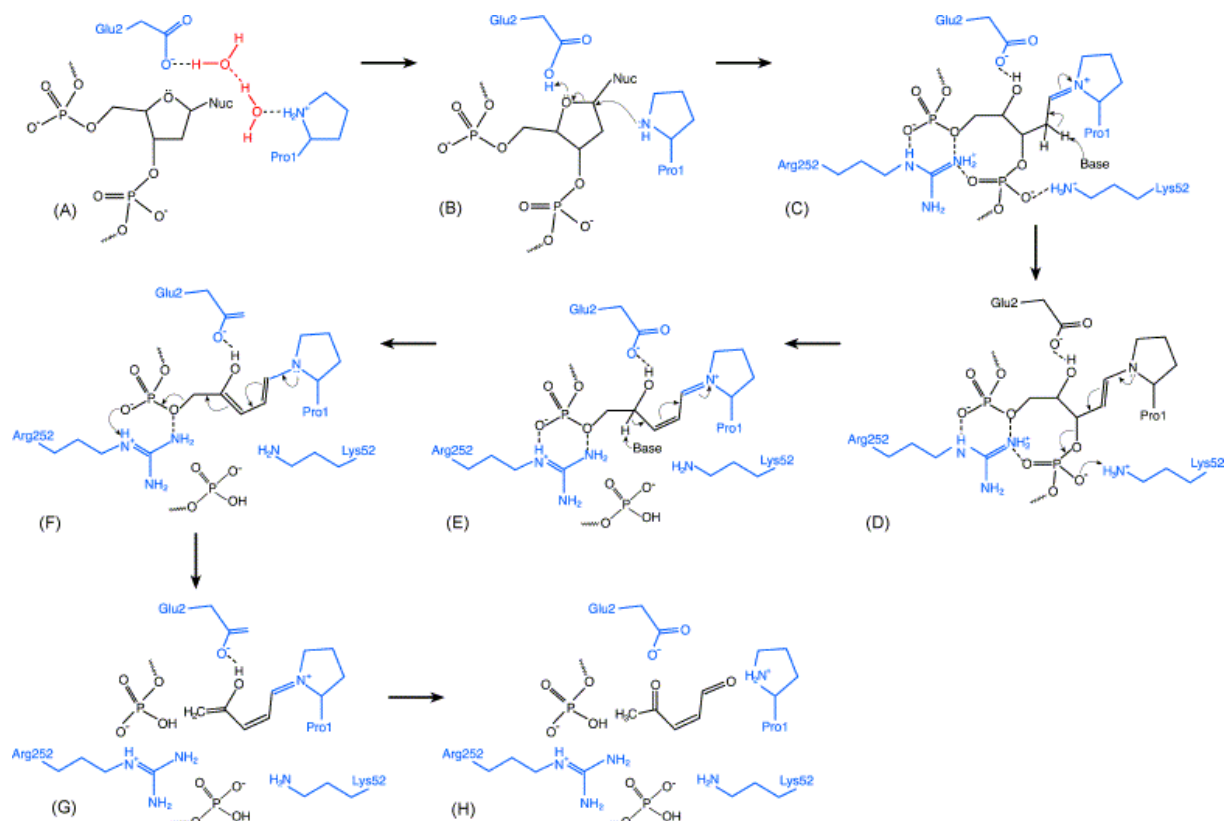


Figure 38. Mécanisme de réaction de Fpg proposé par Zharkov [Zharkov *et al.*, 2003]. Pro1 et Glu2 doivent être activés (A) pour réaliser respectivement l'attaque nucléophile du C1' du nucléotide endommagé (B) et la protonation de O4' par Glu2. (C) L'attaque nucléophile peut concurrencer la protonation de O4'. Une base non identifiée soustrait un proton ce qui entraîne la β -élimination du 3'-phosphate. (E) Stabilisation par Lys 52 et/ou Arg252 (D). Une déprotonation en C4' par une autre base provoque l'élimination du 5'-phosphate (F). La base de Schiff est finalement hydrolysée (G), l'enzyme est recyclée et le sucre est relargué (H).

Une fois la lésion localisée, Fpg insère via le petit sillon trois résidus N-terminaux (M75-R109-F111 pour *L.lactis* Fpg [Serre *et al.*, 2002]) au niveau de la lésion et expulse la base endommagée de la double hélice via le grand sillon. Le nucléoside endommagé est alors stabilisé par l'enzyme dans une conformation extra-hélicale, dans une poche du site actif de l'enzyme où elle se trouve exposée pour la catalyse. La poche de fixation de l'ADN est fermée par la triade d'intercalation, ce qui isole le nucléoside endommagé du reste du squelette nucléotidique et empêche donc la réinsertion de la base endommagée dans le grand sillon. D'autre part, de nombreuses interactions entre l'enzyme et l'ADN vont également stabiliser le nucléoside endommagé, comme par exemple celles établies par le résidu Arg260 du doigt de zinc. La cytosine faisant face au dommage est quant à elle maintenue à l'intérieur de l'hélice afin d'éviter un effondrement local de la structure de l'ADN. La fixation dissymétrique de Fpg sur les deux brins d'ADN - Fpg établit de nombreux contacts avec le

brin portant la lésion et ne reconnaît que la cytosine sur l'autre brin – et l'intercalation de la triade provoquent une torsion de l'ADN d'environ 60-70°, centrée sur la lésion.

Il faut souligner que l'extraction de bases endommagées hors de l'hélice est un mécanisme retrouvé chez d'autres glycosylases tels que Ogg1 [Bruner *et al.*, 2000], la 3-méthyladénine DNA glycosylase [Lau *et al.*, 1998] et la protéine Alka de *E.coli* [Hollis *et al.*, 2000].

Fpg utilise ensuite son amine N-terminale Pro1 [Sidorkina & Laval, 2000] pour effectuer une attaque nucléophile sur le C1' du nucléoside endommagé. Cette attaque mène à un complexe covalent, type base de Schiff, entre l'enzyme et l'ADN [Tchou & Grollman, 1995 ; Zharkov *et al.*, 1997]. Cet intermédiaire peut être piégé de manière covalente par réduction d'un intermédiaire de la base de Schiff par du borohydrure de sodium [Tchou & Grollman, 1995 ; Zharkov *et al.*, 1997], ce qui a permis de déterminer sa structure par cristallographie [Gilboa *et al.*, 2002].

L'interaction de Fpg avec l'ADN se fait principalement via de nombreuses interactions entre les résidus de la protéine et le squelette phosphodiester de l'ADN du brin portant la lésion [Serre *et al.*, 2002 ; Fromme & Verdine, 2002] : Arg260, Tyr238 et Lys57 coopèrent pour forcer l'ADN à se courber. De nombreux résidus forcent la base à rester dans la poche de fixation (Glu2, Glu5, Met75, Glu76, Ser217, Ile219, Tyr238). Tous ces résidus, à l'exception de Glu76 sont strictement conservés dans la famille Fpg. Fpg reconnaît la face Watson-Crick de FapyG via des liaisons hydrogène impliquant 4 résidus (Glu2, Glu5, Ser217, Ile219). En plus de ces interactions, Fpg contacte d'autres groupements par l'intermédiaire de molécules d'eau (Figure 39).

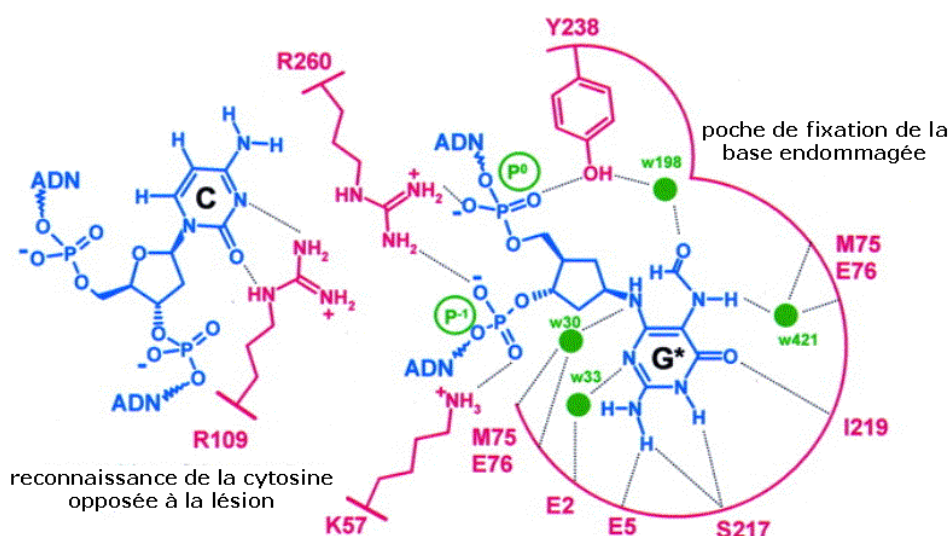


Figure 39. Représentation schématique des interactions entre un cFapydG et L/Fpg. Les résidus de la protéine impliqués dans la reconnaissance sont représentés en rouge, l'ADN en bleu. C: cytosine opposée à la lésion. p° et p¹: groupements phosphate bordant la lésion. Cercles verts: molécules d'eau. Pointillés noirs: liaisons hydrogène [Coste *et al.*, 2004].

Il faut également souligner que des protéines de type « mutant inactif » ont été obtenues en substituant le résidu Pro1 par une glycine [Serre *et al.*, 2002]. Ces protéines mutantes conservent la capacité de se fixer spécifiquement à leurs substrats mais ont perdu leur activité enzymatique ; elles permettent donc d'étudier la fixation de Fpg sur des substrats « vrais ».

3. 3. 3. La spécificité de substrat de Fpg

La protéine FPG a été identifiée chez les eubactéries comme étant une ADN glycosylase spécifiquement impliquée dans l'excision des purines à cycle imidazole ouvert (résidus formamidopyrimidiques ou Fapy) d'où son nom [Chetsanga & Lindalh 1979]. Des travaux ultérieurs ont montré que cette enzyme est capable de fixer et d'exciser d'autres types de dommages oxydatifs des purines tels que la 8-oxoguanine (8-oxoG) [Michaels *et al.*, 1992 ; Boiteux, 1993 ; Castaing *et al.*, 1993], l'oxazolone, produit de l'oxydation secondaire de la 8-oxoG, mais également la 5-hydroxycytosine [Hatahet *et al.*, 1994].

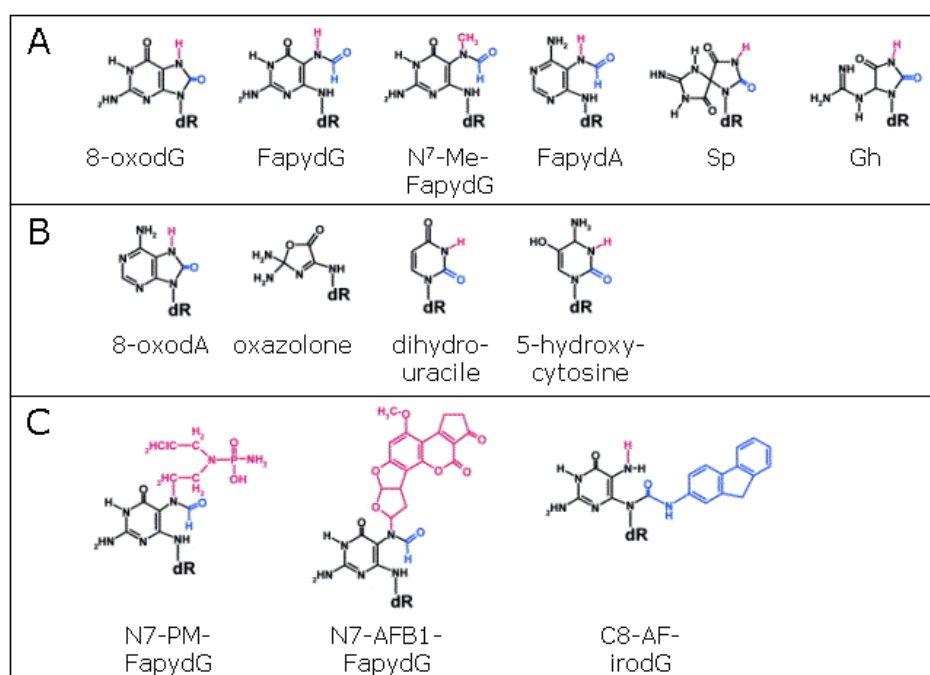


Figure 40. Différents substrats de Fpg excisés avec une efficacité élevée (A), moyenne (B) et faible (C).

D'autre part, les études cristallographiques ont permis de découvrir plusieurs analogues nucléotidiques abasiques, cycliques et non cycliques, qui sont reconnus par Fpg avec une grande affinité (voir Figure 41). La protéine reconnaît vraisemblablement un trou dans l'ADN au niveau du site AP et la taille de ce trou est critique : le plus petit site reconnu par Fpg est un site 1,3-propanediol. La plupart des atomes de l'hétérocycle ne sont pas indispensables à

une bonne reconnaissance puisqu'un tétrahydrofurane est moins bien fixé que le propanediol [Castaing *et al.*, 1999].

Tous les substrats ne sont pas traités avec la même efficacité (Figure 40). Parmi les dommages reconnus par Fpg, certains ne sont pas excisés [Perlow-Poehnelt *et al.*, 2004] ; c'est le cas des 8-oxonebularine, 6-O-méthyl-8-oxoguanine et 8-oxoadénine.

Il apparaît également que la nature de la base opposée à la lésion module fortement la fixation de Fpg à l'ADN et donc la catalyse enzymatique: les paires 8-oxodG:T et 8-oxodG:G sont ainsi nettement mieux reconnues qu'une 8-oxodG:C, la 8-oxodG:A étant le substrat le plus médiocre [Castaing *et al.*, 1993 ; Tchou *et al.*, 1994]. La disposition stérique du groupement céto en C8 a été corrélée à la fixation de Fpg et explique pourquoi la 8-oxoG n'est pas un substrat de Fpg lorsqu'elle est appariée à un A. En effet, dans une paire Watson-Crick telle que la 8-oxodG:C, la conformation de la guanine est anti et le groupement oxo en C8 émerge de la double hélice par le grand sillon. *A contrario*, un appariement 8-oxodG:A est de type Hoogsteen : la guanine se trouve alors en conformation syn et le groupement oxo en C8 émerge par le petit sillon. La fixation est beaucoup moins forte dans cette configuration.

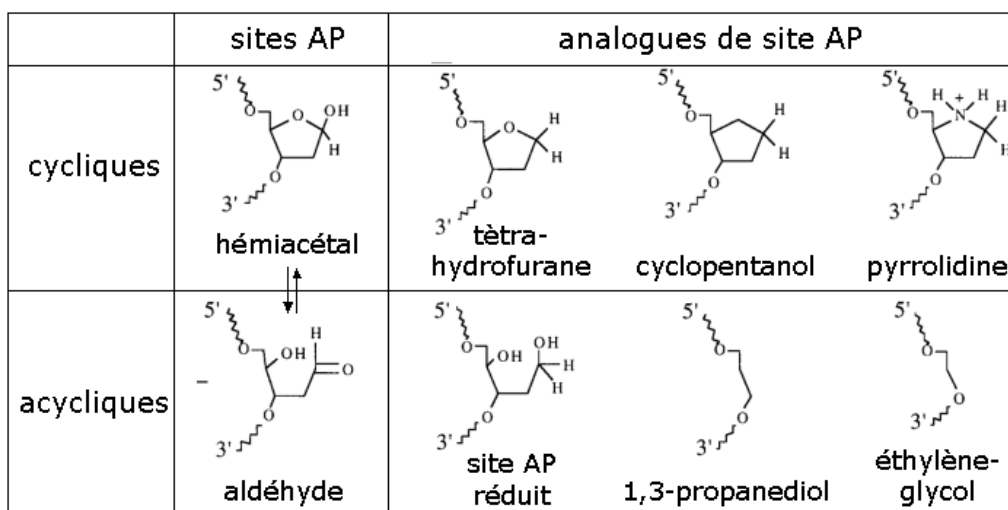


Figure 41. Structures des sites AP substrats et analogues de substrats de Fpg [d'après Castaing *et al.*, 1999].

D'autre part, il ressort d'études structurales que les stratégies utilisées pour reconnaître différents types de dommages sont variables alors que le processus catalytique est le même (Figure 42). En effet, bien que la position du C1' soit similaire pour des lésions FapydG et 8-oxodG et que donc ces lésions présentent une même exposition à l'attaque nucléophile, la conformation de la base exclue (syn/anti) constitue une différence majeure entre ces lésions [Coste *et al.*, 2004].

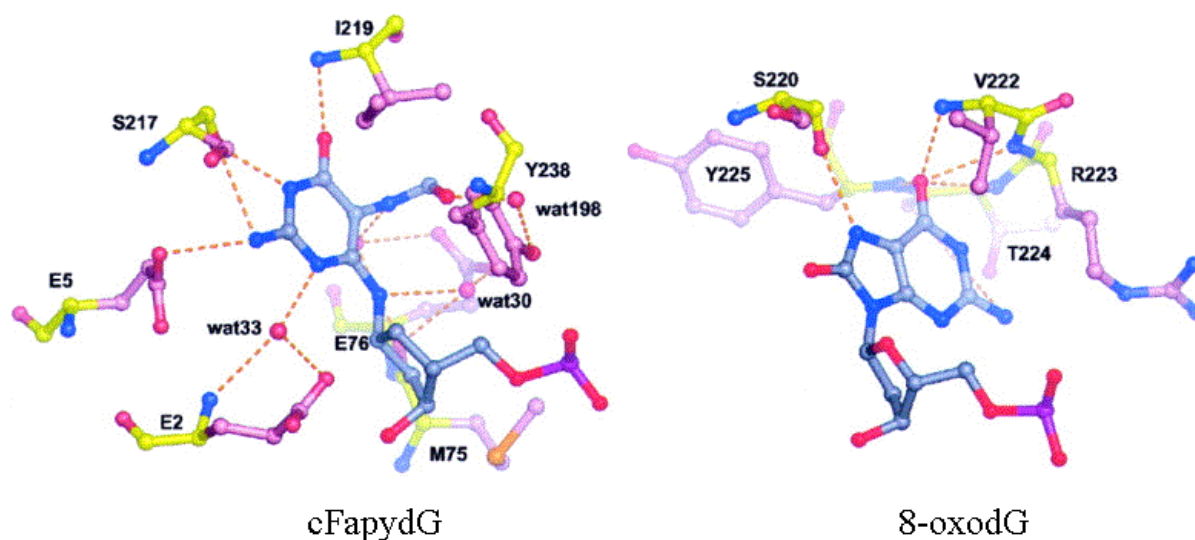


Figure 42. Comparaison des modes de reconnaissance par Fpg des FapydG et 8-oxodG. Représentation des sites actifs de *L.lactis* Fpg et *B.stearothermophilus* Fpg fixés respectivement à de l'ADN contenant un résidu cFapydG et 8-oxodG [d'après Coste *et al.*, 2004].

Matériels et méthodes

1. Expression et purification des protéines

1. 1. Préparation du répresseur lactose

Le répresseur lactose a été préparé au laboratoire à partir de la souche surproductrice BMH 493 de *E.coli* (obtenue auprès du Dr B.Müller-Hill). Les cellules sont lysées dans le tampon TMS II¹ puis le répresseur est précipité au sulfate d'ammonium. Après centrifugation (15 minutes à 10 000 rpm), le culot est récupéré et resuspendu dans 50 ml de tampon TMS II puis l'extrait est dialysé toute la nuit contre 5 litres de tampon II² afin d'éliminer le sel. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 10 000 rpm et le surnageant est récupéré. L'extrait dialysé est ensuite déposé sur une colonne de phosphocellulose (Whatman-Cellulose Phosphate Exchanger P11) préalablement équilibrée dans le tampon I³. La colonne est longuement lavée avec le tampon II puis la protéine est éluée par un gradient de tampon II/tampon III⁴ et collectée en fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur Gradifrac. Les fractions contenant la protéine sont détectées par gel SDS-PAGE ; ces fractions sont rassemblées puis précipitées au sulfate d'ammonium. Le répresseur est finalement dialysé contre le tampon de conservation⁵ avant d'être congelé à -20°C. Le tampon de conservation contenant 20 % de glycérol, il est nécessaire de dialyser longuement le répresseur contre un tampon 200 mM phosphate de potassium (pH 7.25) avant toute utilisation. La concentration finale en protéine est mesurée par spectrométrie d'absorption (coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{ nm}} = 85\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ par tétramère).

1. 2. Préparation du peptide *headpiece*

La *headpiece* a été préparée à partir de souches surproductrices construites au laboratoire. L'ADN codant pour la *headpiece* a été inséré dans le plasmide pET24a(+) (Novagen) et le peptide a été exprimé dans une souche BL21(DE3) (Stratagène). Après expression, les cellules sont lysées dans le tampon de lyse⁶ (6 g cellules/60 ml tampon) par sonication puis centrifugées 30 minutes à 12000 rpm. Le surnageant est récupéré et les protéines sont précipitées au sulfate d'ammonium, sur glace pendant 30 minutes. Après centrifugation (30 minutes à 12000 rpm), le culot est resuspendu dans 1 litre de tampon SP0⁷. L'extrait est

¹ Tampon TMS II : 200 mM KCl, 10 mM acétate de magnésium, 40 mM Tris-Cl pH 7.45, 100 mM mercapto-éthanol, 1 mM EDTA

² Tampon II : 100 mM phosphate de potassium (pH 7.25), 100 mM mercapto-éthanol, 5 % glycérol

³ Tampon I : 50 mM phosphate de potassium (pH 7.25), 10 mM mercapto-éthanol

⁴ Tampon III : 400 mM phosphate de potassium (pH 7.25), 100 mM mercapto-éthanol, 5 % glycérol

⁵ Tampon de conservation : 1M Tris-Cl (pH 7.45), 10 mM dithioerythritol, 20 % glycérol

⁶ Tampon de lyse HP : 50 mM phosphate de potassium (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM mercapto-éthanol, 5 % glycérol

⁷ Tampon SP0 : 50 mM tampon phosphate pH 7.5, 1 mM PMSF, 5 mM mercapto-éthanol , 5% glycérol

ensuite déposé sur une colonne sulfopropyl échangeuse de cations (HiLoadTM 16/10 SP SepharoseTM HP, Amersham Biosciences) préalablement équilibrée dans le tampon SP1⁸. La colonne est longuement lavée avec le tampon SP1 puis la protéine est éluée par un gradient de tampon SP1/SP2⁹. Les fractions contenant la protéine sont déterminées par gel SDS-PAGE. Ces fractions sont rassemblées puis précipitées au sulfate d'ammonium (75 %). Le culot protéique est repris dans 4 ml de tampon AcA¹⁰ et l'échantillon est déposé sur une colonne de gel filtration (Ultrogel® AcA 54). Après élution avec le tampon AcA, les fractions contenant la protéine sont rassemblées puis précipitées au sulfate d'ammonium et la *headpiece* est finalement reprise dans le tampon de conservation¹¹ avant d'être congelée à -20°C.

Le tampon de conservation contenant 20 % de glycérol, il est nécessaire d'échanger ce tampon avant toute utilisation. Le changement de tampon est réalisé par élution de la protéine sur une mini-colonne de Sephadex G-25 préalablement équilibrée avec le tampon adéquat. La concentration finale en *headpiece* est mesurée par spectrométrie d'absorption (coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{ nm}} = 4800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

1. 3. Préparation de la protéine Fpg

La protéine mutante P1G-Fpg de *Lactococcus lactis* a été préparée par Bertrand Castaing comme décrit par Serre *et al.* (2002) et la protéine Fpg sauvage de *Escherichia coli* (EcFpg-wt) a été préparée comme décrit par Boiteux *et al.* (1990).

2. Préparation des fragments d'ADN

2. 1. Préparation de fragments d'ADN portant la séquence opératrice de l'opéron lactose

Le fragment de 199 pb a été obtenu par amplification PCR du plasmide pUC19 dans lequel a été inséré un fragment de 203 pb comprenant la séquence opératrice du répresseur *lac*. Les amorces utilisées pour la PCR sont appelées 199a (5' - CGA TTC ATT AAT GCA GCT GG - 3') et 199b (5' - GTG AAT CCG TAA TCA TGG TCA - 3'). La réaction PCR a lieu dans un volume final de 50 µl contenant 1.5 µM d'ADN, 1.5 unité d'ADN polymérase Pfu (Promega), 1x tampon Pfu (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄,

⁸ Tampon SP1 : 50 mM tampon phosphate pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM mercapto-éthanol, 5% glycérol

⁹ Tampon SP2 : 50 mM tampon phosphate pH 7.5, 600 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM mercapto-éthanol, 5% glycérol

¹⁰ Tampon AcA : 25 mM Hepes (pH7.5), 1 M NaCl, 5 mM mercapto-éthanol, 0.1 mM PMSF, 5% glycérol

¹¹ Tampon de conservation HP : 1M Tris-Cl (pH 7.45), 10 mM dithioerythritol, 20 % glycérol

20 mM MgSO₄, 1.0% Triton[®] X-100 et 1 mg/ml BSA), 10 mM dNTPs (Promega), 1 μM amorce 199a (Eurogentec) et 1 μM amorce 199b (Eurogentec). La réaction PCR est réalisée par un thermocycleur MasterCycler (Eppendorf). Cette réaction comprend une dénaturation à 95°C pendant 2 minutes suivie de 31 cycles de 3 étapes : 95°C (dénaturation) pendant 1 minute, 53°C (appariement) pendant 1 minute, 72°C (élongation) pendant 1 minute. L'amplification est terminée par un chauffage à 72°C pendant 3 minutes.

Le produit PCR ainsi obtenu est soumis à une extraction au phénol-chloroforme puis précipité à l'éthanol avant d'être purifié sur un gel préparatif à 6 % acrylamide/bisacrylamide (19/1). Après migration 3h à 1230 V m⁻¹, le gel est déposé sur une plaque de silice fluorescente et la position de la bande correspondant au fragment de 199 pb est révélée par exposition aux rayons ultraviolets. Cette bande est découpée puis incubée toute la nuit à 54 °C dans un tampon de faible force ionique¹². L'ADN élué est ensuite purifié sur une mini-colonne échangeuse d'ions (ELUTIP®, Schleicher & Schuell) : les colonnes sont lavées avec le tampon de faible force ionique puis l'échantillon est chargé sur la colonne à l'aide d'une seringue ; les contaminants sont éliminés par lavage, toujours avec le tampon de faible force ionique et l'ADN est finalement récupéré par élution avec un tampon de forte force ionique¹³. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol puis repris dans de l'eau ultrapure.

Le fragment de 80 pb, sur lequel est centré la séquence opératrice, est obtenu par digestion du fragment de 199 pb. Le fragment de 199 pb est marqué (voir protocole de marquage) puis digéré par l'enzyme de restriction HpaII (Eurogentec) pendant 2h à 37 °C. Les fragments de 80 pb et 120 pb issus de cette digestion sont séparés sur un gel préparatif de 7% acrylamide/bisacrylamide (19/1) en TBE. La migration s'effectue durant 2 h 30 à 1230 V m⁻¹. Le gel est ensuite autoradiographié (film KODAK) pendant 30 minutes à température ambiante afin de repérer les positions respectives des différentes bandes (199 pb non digéré, 80 pb et 120 pb). La bande correspondant au fragment de 80 pb est découpée puis incubée toute la nuit à 54 °C dans un tampon de faible force ionique et l'ADN est ensuite purifié sur mini-colonne ELUTIP (voir précédemment).

Les fragments doubles brins de 23 pb et 60 pb, sur lequel est centré la séquence opératrice, sont obtenus à partir d'oligonucléotides synthétisés par Eurogentec. Dans un premier temps, les brins d'ADN, repris dans un tampon de charge dénaturant (50% TE, 50 % formamide, bleu de bromophénol) puis chauffés 3 minutes à 95°C, sont purifiés sur un gel

¹² tampon de faible force ionique : 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.4)

¹³ tampon de forte force ionique : 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.4)

dénaturant d'acrylamide/bisacrylamide 12 % (19/1, 7 M urée). Après migration pendant 5h à 2860 Vm^{-1} , les bandes correspondant aux oligonucléotides sont repérées et découpées comme précédemment (voir 199 pb).

Après marquage d'un des brins, celui-ci est hybridé avec son oligonucléotide complémentaire : le mélange brin marqué/brin froid (1:4) est chauffé 5 minutes à 95°C et refroidit lentement jusqu'à 4°C . L'hybridation est contrôlée sur gel de polyacrylamide.

Tableau 5. Séquences des oligodésoxynucléotides utilisés pour l'opéron lactose

Nom de la séquence	Séquence
60a	5'- CCG GCT CGT ATG TTG TGT GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAA GCT A-3'
60b	5'-ATA GCT GTT TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TCC ACA CAA CAT ACG AGC CGG-3'
23a	5'-GAA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TT-3'
23b	5'-AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TC-3'

2. 2. Préparation de fragments d'ADN portant une modification de nucléotides

Les fragments doubles brins porteurs de dommages (Pr : site 1,3-propanediol) ont été obtenus à partir d'oligonucléotides synthétisés par Eurogentec, sauf pour le brin portant une 8-oxoguanine qui a été synthétisé par Didier Gasparutto du Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (CEA, Grenoble). Les brins d'ADN sont purifiés, marqués et hybridés comme expliqué ci-dessus.

Tableau 6. Séquences des oligodésoxynucléotides utilisés pour étudier l'activité de Fpg

Nom de la séquence	Séquence
59mer-Pr	5'- AGC TTA CTC TAG AAG AAT TCT CAC TCT TT Pr TTT CTC ACT GGA TCC ACA GAT ATC ACA CA -3'
59mer-C	5'- AGC TTG TGT GAT ATC TGT GGA TCC AGT GAG AAA C AAA GAG TGA GAA TTC TTC TAG AGT A -3'
13mer-Pr	5'- CTC TTT Pr TTT CTC -3'
13mer-8oxoG	5'- CTC TTT 8oxoG TTT CTC -3'
13mer-C	5'- GAG AAA C AAA GAG -3'

3. Marquage radioactif des fragments d'ADN

L'ADN est marqué au ^{32}P aux extrémités 5'-terminales par la T4 polynucleotide kinase (BioLabs) et du $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham). Les fragments d'ADN ($6\mu\text{g}$) sont incubés 30 minutes à 37°C en présence de 4 unités de kinase et de $5\mu\text{l}$ de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (activité spécifique $>110 \text{ TBq/mmol}$). Le $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ non fixé est éliminé afin d'éviter la radiolyse de l'ADN soit

par filtration sur membrane de cellulose MICROCON® (Millipore), soit par élution sur une petite colonne SEPHADEX G50 pour les fragments de 13 pb.

a) Membrane MICROCON

Les échantillons sont déposés sur les membranes préalablement lavées avec 100 µl d'eau (centrifugation pendant 10 minutes à 13000 g). Ils sont ensuite rincés 3 fois avec un tampon 0.1x TE (centrifugation pendant 10 minutes à 13000 g). Les fragments marqués sont récupérés dans 80 µl d'eau ultrapure en retournant les filtres (centrifugation pendant 5 minutes à 2500g).

b) Colonne SEPHADEX G-50

La colonne est fabriquée en introduisant de la résine Sephadex G50 préalablement hydratée dans une seringue de 1 ml. Après une première centrifugation (3 minutes à 2800 rpm), la colonne est hydratée avec 200 µl de tampon puis centrifugée (3 minutes à 2800 rpm). Les échantillons de marquage sont déposés sur la colonne puis centrifugés pendant 3 minutes à 2800 rpm. La concentration de l'ADN ainsi purifié est déterminée par spectrométrie d'absorption.

4. Formation des complexes ADN-protéine

a) complexes ADN-répresseur

Des échantillons de 10 µl contenant 5 nM d'ADN marqué (*i.e.* sites opérateur) et 0.8 µM de tétramères de répresseur sont incubés 20 minutes sur glace dans un tampon 100 mM phosphate de potassium (pH 7.25). En présence d'IPTG, le protocole est identique, en rajoutant 5mM d'IPTG aux tampons de complexation et de migration ainsi qu'au tampon se trouvant dans le réservoir supérieur du dispositif d'électrophorèse.

b) complexes *Ll* P1G Fpg - ADN

Des échantillons de 10 µl contenant 50 nM d'ADN marqué et 0.4 µM de P1G-Fpg sont incubés 20 minutes sur glace dans un tampon 25 mM phosphate de potassium (pH 7.2), 200 mM KCl.

c) complexes *E.coli* Fpg^{wt} - ADN

Des échantillons de 10 µl contenant 0.1 nM d'ADN marqué et 1.6 µM de *wt*Fpg sont incubés 20 minutes sur glace dans un tampon 30 mM phosphate de potassium (pH 7.6), 80 mM NaCl, 5% glycérol.

5. Irradiations des échantillons

Les échantillons sont contenus dans des tubes de polypropylène siliconés (Eppendorf 1,5 ml). Les tubes sont immergés dans un bain de glace et irradiés par les photons γ du ^{137}Cs d'un irradiateur IBL437 (CIS Bio International, Saclay, France). Il contient trois sources scellées ayant une activité de 189 TBq. Le ^{137}Cs se transforme en ^{137}Ba excité avec émission d'un rayonnement β^- . La désexcitation du ^{137}Ba vers son niveau fondamental provoque l'émission d'un rayonnement γ d'énergie 0.6 MeV dont le TEL moyen dans l'eau est de 0.3 KeV μm^{-1} . Le débit de dose est de 9 Gy min^{-1} .

6. Electrophorèse en gel retard

L'électrophorèse en gel retard permet d'étudier la fixation de protéines sur des fragments d'ADN et est basée sur la différence de vitesse de migration entre l'ADN libre et les complexes.

Après formation des complexes, les échantillons additionnés de 0.2 volume de tampon de charge (0.01 % bleu de bromophénol, 50% glycérol dans TE) sont déposés sur gel d'acrylamide/bisacrylamide (pour les caractéristiques des gels, voir Tableau 7). Après migration à 1220 V m^{-1} pendant 3 h à 4°C, les gels sont séchés et scannés à l'aide du β -scanner Storm (Molecular Dynamics). Les bandes correspondant à l'ADN libre ou en complexe sont quantifiées à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageQuant (Molecular Dynamics).

Tableau 7. Caractéristiques des gels acrylamide/bisacrylamide utilisés dans les expériences d'électrophorèse en gel retard.

Protéine	ADN	Caractéristiques du gel
répresseur	80 pb	7 % (75/1) Acry/Bis 1xTBE
	60 pb	8 % (75/1) Acry/Bis 1xTBE
headpiece	23 pb	7 % (30/1) Acry/Bis 0.5xTBE
<i>Ll</i> P1G-Fpg	59 pb	10 % (80/1) Acry/Bis 1xTBE
<i>E.coli</i> Fpgwt	13 pb	10 % (80/1) Acry/Bis 1xTB

7. Electrophorèse en gel de séquence

Après irradiation des complexes (ADN-répresseur ou ADN-Fpg), l'ADN est extrait du complexe par l'action d'un mélange phénol/chloroforme. Il est ensuite précipité à l'éthanol, séché et repris dans quelques μl de tampon TE (pH 7.6). Les échantillons peuvent ainsi être conservés à 4°C pendant quelques jours (le Tris et l'EDTA protègent l'ADN contre l'auto-

radiolyse due au rayonnement β émit par le ^{32}P). Avant électrophorèse, les échantillons sont séchés et repris dans le tampon de charge (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.025 % bromophénol) puis chauffés 5 minutes à 95°C.

Afin d'identifier les différentes bandes, les fragments sont séquencés par la méthode de Maxam-Gilbert [Sambrook *et al.*, 1989] et déposés sur le gel.

Les échantillons sont chargés sur un gel dénaturant d'acrylamide/bisacrylamide 8 % (19/1, 7M urée en TBE) de 0.4 mm d'épaisseur et de 40 cm de longueur. La migration se fait à puissance constante (35 watts) pendant 1 heure. Le gel est ensuite analysé comme les gels retard.

8. Electrophorèse en gel d'agarose

Afin de déterminer le pouvoir *scavenger* de certains produits (IPTG, cacodylate d'ammonium), un plasmide a été irradié en présence ou en absence de ces produits.

Des échantillons de plasmide pBR322 d'une concentration de 20 ng/ μl dans un tampon 10 mM phosphate (pH 7.2) sont irradiés en absence ou en présence de produit *scavenger*, puis déposés sur un mini-gel horizontal d'agarose 0.85 % (Invitrogen Life Technologies) dans du tampon 0.5 x TAE¹⁴ ; la migration dure 1h à 1600 V m^{-1} . L'électrophorèse sépare les formes surenroulée, circulaire relâchée et linéaire obtenues après irradiation du plasmide. Après coloration du gel au bromure d'éthidium et exposition aux ultraviolets, l'image du gel en fluorescence est enregistrée par une caméra vidéo (Bioprobe systems). La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de BEt intercalé dans chaque forme de plasmide et donc à la quantité d'ADN de chaque espèce. Le fait que l'intercalation du BEt soit 1.5 fois plus faible dans un plasmide surenroulé que dans l'ADN circulaire relâché ou linéaire a été pris en compte dans les calculs. Les gels sont analysés par le logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics) afin de déterminer le pourcentage de chacune des formes.

En considérant que les sites de coupure sont aléatoires, les nombres moyens x de coupures simple brin (CSB) et y de coupures double brin (CDB) par plasmide en fonction de la dose d'irradiation peuvent être déterminés. Si le nombre de coupures reste faible (*i.e.* très inférieur au nombre de sites de coupure potentiels, et donc ici au nombre de bases), la fraction de molécules $P(i,j)$ portant i CSB et j CDB obéit à une loi de Poisson :

$$P(i,j) = \frac{(x)^i (y)^j}{i! j!} e^{-(x+y)}$$

¹⁴ 0.5 x TAE : 20 mM Tris-cl, 10 mM acétate de sodium, 1mM EDTA (pH 8)

Les fractions respectives de forme linéaire (molécules présentant une CDB), circulaire relâchée (plusieurs CSB et pas de CDB) et surenroulée (ni CSB ni CDB) sont :

$$L = \sum_{i=0}^{\infty} P(i,1) = ye^{-y} \quad C = \sum_{i=1}^{\infty} P(i,0) = (1 - e^{-x})e^{-y}$$

$$S = P(0,0) = e^{-y}e^{-x} \quad T = L + C + S = (y + 1)e^{-y}$$

où T est la fraction totale de molécules détectées.

Les plasmides dégradés, c'est à dire présentant plusieurs CDB, n'étant pas détectées sur le gel, les fractions de molécules détectables L', C' et S' sont donc :

$$L' = \frac{L}{T} = \frac{y}{y+1} \quad C' = \frac{C}{T} = \frac{(1 - e^{-x})}{y+1} \quad S' = \frac{S}{T} = \frac{e^{-x}}{y+1}$$

Il est déduit de ces équations que :

$$x = \ln \left[\frac{(1-L')}{S'} \right] \quad y = \frac{L'}{(1-L')}$$

9. Electrophorèse en gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées par la technique SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) avec un système d'électrophorèse discontinu, l'appareillage utilisé étant le Mini-PROTEAN® 3 Cell (BIO RAD). Le type de gel est adapté à la taille de la protéine étudiée.

Le répresseur *lac* et la protéine Fpg sont analysés sur un gel Tris-glycine. Les échantillons sont déposés sur un gel de concentration de 5% acrylamide/bisacrylamide (19/1) en 0.125 M Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH 6.8. Les protéines, ainsi concentrées sur une fine bande, sont ensuite séparées sur un gel de résolution de 12 % acrylamide/bisacrylamide (19/1) en 0.375 M Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH 8.8. Les échantillons sont dilués dans le tampon de charge (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 18 % glycérol, 6% 2-mercaptoéthanol, 0.1 % bleu de bromophénol) et chauffés 3 minutes à 95 °C avant d'être chargés sur le gel. Le marqueur moléculaire utilisé est le Precision Plus Protein™ Standards de BIO RAD (10-250 kDa). La migration se fait pendant 1h à 3330 Vm⁻¹, dans 25 mM Tris, 0.1 % SDS, 200 mM glycine (pH 8.3).

La *headpiece* est analysée sur un gel Tris-tricine. Les échantillons sont déposés sur un gel de concentration de 4% acrylamide/bisacrylamide (19/1) en 0.75 M Tris-HCl, 0.075 % SDS, pH 8.45. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel de résolution de 16 % acrylamide/bisacrylamide (19/1) en 1 M Tris-HCl, 0.1 % SDS (pH 8.45). Les échantillons

sont dilués dans un rapport [1:1] dans le tampon de charge Tricine Sample Buffer de BIORAD (200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 40% glycérol, 0.04% Coomassie Blue G) et chauffés 3 minutes à 95 °C avant d'être chargés sur le gel. Le marqueur moléculaire utilisé est le Polypeptide SDS PAGE Standards de BIO RAD (1.4-26.6 kDa). La migration se fait pendant 1h à 3330 Vm⁻¹ avec un tampon 0.2 M Tris (pH 8.9) comme tampon d'anode et un tampon 0.1 M Tris, 0.1 % SDS, 0.1 M tricine (pH 8.25) comme tampon de cathode.

Au terme de la migration, le gel est lavé à l'eau (3 x 5 minutes) afin d'éliminer le SDS libre et les bandes protéiques sont visualisées par coloration au EZBlue™ (Sigma-Aldrich).

10. Affinité répresseur- inducteur

L'affinité du répresseur pour l'IPTG a été étudiée par équilibre de dialyse. Des échantillons de 400 µl de répresseur sont placés dans des boudins de dialyse puis dialysés toute la nuit à 4°C contre un tampon 100 mM phosphate de potassium (pH 7.25), 0.5 µM IPTG contenant du ¹⁴C-IPTG pour une activité finale de 160 kBq par litre.

Après la dialyse, des échantillons de 100 µl sont prélevés à l'intérieur et à l'extérieur des boudins de dialyse, mélangés à 1 ml de solution de Bray et la radioactivité des échantillons est comptée dans un compteur à scintillation Beckman. La radioactivité A_i à l'intérieur du boudin est proportionnelle à la somme des concentrations d'IPTG libre et complexé au répresseur, I_l et C respectivement. A l'extérieur du boudin de dialyse, la radioactivité A_{ext} est proportionnelle à la concentration d'IPTG libre.

La formation du complexe répresseur-inducteur peut être écrite par l'équation :



Et donc :

$$\frac{C}{(R_a - C) \times I_l} = K \Leftrightarrow C = K \times I_l \times (R_a - C) \Leftrightarrow C = \frac{K \times I_l \times R_a}{1 + (K \times I_l)} \quad [1]$$

où C est la concentration en complexe, R_a la concentration initiale en protomère, et I_l la concentration en IPTG libre.

Dans les conditions expérimentales utilisées ici, la concentration en IPTG libre I_l est considérée constante et (K x I_l) peut être négligée devant 1, ce qui donne:

$$C = K \times R_a \times I_l \quad [2]$$

L'activité du répresseur vis-à-vis de l'IPTG est définie comme étant:

$$\frac{C}{I_l} = \frac{A_{\text{ext}} - A_{\text{int}}}{A_{\text{ext}}} = K \times R_a \quad [3]$$

Cette valeur est proportionnelle à la fois à la constante d'affinité K et à la concentration en protomères actifs R_a .

11. Fluorescence

La spectroscopie d'émission par fluorescence a été utilisée pour étudier la destruction des résidus tryptophane (Trp201 et Trp 220) du répresseur, ainsi que la destruction des résidus tyrosine des *headpieces* (Tyr7, Tyr12, Tyr 17 et Tyr47) et la formation de di-tyrosines. Les spectres d'émission (largeur de bande : 5 nm) ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 5 mm de côté, à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon Fluoromax 2. La concentration des échantillons de répresseur était de 3.2 μM en protomère dans 100 mM tampon phosphate (pH 7.25). Afin d'étudier la fluorescence du répresseur en conditions dénaturantes, les échantillons ont été dilués au cinquième dans 8 M de chlorure de guanidine. Pour l'étude des *headpieces*, l'irradiation et les mesures de fluorescence ont été réalisées sur des échantillons de concentration égale à 29 μM en protéine dans un tampon 25 mM cacodylate (pH 7.25).

Tableau 8. Conditions spectrales de fluorescence

	observation	excitation	émission
répresseur	destruction des résidus tryptophane	280	270-450 nm
<i>headpiece</i>	destruction des résidus tyrosine	280	270-400 nm
	formation de di-tyrosines	320	350-500 nm

12. Dichroïsme circulaire

La conformation des *headpieces* a été étudiée par dichroïsme circulaire à l'aide d'un dichrographe JASCO's J-810. Les spectres (200-250 nm) ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 mm de côté. L'irradiation et les mesures de dichroïsme ont été réalisées sur des échantillons de concentration égale à 29 μM en protéine dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium (pH 7.25).

La fixation des *headpieces* sur un poly(dAT) a également été étudiée par dichroïsme circulaire. Une solution de 135 μM de poly(dAT) est titrée par une solution de 94 μM de *headpiece* dans un tampon de faible force ionique (5 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25). Les spectres ont été enregistrés de 200 à 300 nm afin de pouvoir observer des modifications dues à l'ajout de protéine (200-250 nm) et au changement de conformation du polydésoxynucléotide (250-300 nm).

13. Spectrométrie de masse

Les modifications induites sur les chaînes latérales de la *headpiece* irradiée ont été étudiées par spectrométrie de masse.

a) analyse des échantillons en MALDI-TOF

Les solutions de 29 μM de *headpiece* sont digérées par des endoprotéinases afin de réduire la taille des peptides à analyser. Les digestions sont réalisées dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, 10 mM CaCl_2 , 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl (pH7.6) pendant 150 minutes, à 37 °C et dans un rapport enzyme-*headpiece* de [1:25] pour ArgC et à 25 °C et dans un rapport enzyme-*headpiece* de [1:10] pour GluC.

Les échantillons protéolysés sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'identifier les fragments porteurs de modifications. La plaque est préparée selon la méthode dite de la couche ultra-mince développée par Cadène & Chait (2000). Les échantillons protéolysés sont dilués au vingtième dans une solution de matrice (solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique dans une solution eau-acétonitrile [2 :1]) contenant un standard interne (mélange de bradykinine, neurotensine et insuline ayant respectivement une masse moyenne de 904.5 Da, 1672.9 Da et 3494.6 Da) et un aliquot (0.5 μl) est déposé sur la plaque, préalablement préparée comme décrit ci-dessus. Après apparition de co-cristaux d'analytes et de matrice, l'excès de liquide est aspiré. L'analyse MALDI-TOF (Autoflex, Brüker) des échantillons est réalisée en mode linéaire, avec extraction après délai (500 ns). Pour chaque échantillon, les spectres acquis au cours de 200 tirs de laser (laser N2 à 337 nm) sont moyennés par le programme Autoflex (Brüker).

b) analyse des échantillons par ESI-IT (MS/MS)

Les échantillons protéolysés comme précédemment sont tout d'abord dessalés sur une résine de silice greffée en C18 et contenue dans un cône de pipette P10 (ZIP-TIPTM Millipore). La résine est tout d'abord mouillée par une série d'aspiration-refoulement (au-moins quatre fois) d'une solution eau-acétonitrile [1:1]. La résine est ensuite équilibrée toujours par une série d'aspiration-refoulement d'une solution eau 0.1% TFA. L'échantillon (10 μl), préalablement acidifié par de l'acide formique (2 % en final) est ensuite fixé sur la résine par une série d'aspiration-refoulement (au-moins dix fois). L'échantillon est dessalé en pipetant une solution méthanol-eau [5:95], 0.1% TFA, toujours par une série d'aspiration-refoulement. Les peptides sont finalement élués en prélevant 10 μl d'une solution eau-acétonitrile [1:1] 0.1% acide formique. Les échantillons ainsi dessalés sont dilués cinq fois dans une solution eau-acétonitrile [1:1] 0.1% acide formique puis analysés par ESI-IT (Esquire HCT, Brüker) afin d'obtenir les spectres de fragmentation des peptides issus de la digestion.

Résultats et discussion

1. Le répresseur de l'opéron lactose

1. 1. Effet de l'irradiation sur le complexe *lac* répresseur- *lac* opérateur

Le répresseur *lac* de *E.coli* se fixe spécifiquement aux sites opérateurs de l'opéron lactose. Afin d'étudier l'effet des radiations sur cette reconnaissance, des complexes ont été formés entre le répresseur et un fragment d'ADN de 80 pb portant la séquence opératrice O¹.

Dans un premier temps, des expériences de titration du fragment d'ADN par le répresseur ont été réalisées dans le but de fixer les conditions expérimentales. Des solutions d'ADN de concentration constante (0.05 μ M) sont incubées avec des concentrations croissantes de répresseur (de 0 à 1.6 μ M) dans un tampon 100 mM phosphate de potassium (pH 7.2), puis les échantillons sont analysés par électrophorèse en gel retard. La Figure 43 montre que le rapport de concentration auquel tous les fragments d'ADN ont fixé une molécule de répresseur est de 16. Il faut noter que le type de tampon choisi ainsi que sa concentration sont importants d'une part pour limiter les effets de capture des radicaux par le tampon et d'autre part pour maintenir une force ionique suffisamment élevée pour favoriser les interactions spécifiques ADN-protéine.

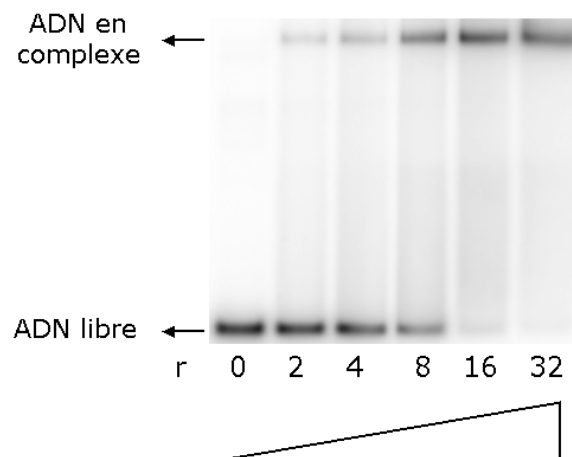


Figure 43. Titration du fragment d'ADN de 80 pb par le répresseur *lac*. Gel retard montrant les complexes formés lorsque des concentrations croissantes de répresseur (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 et 1.6 μ M) sont incubées en présence d'une concentration constante d'ADN (0.05 μ M).

Les conditions de complexation étant fixées, l'effet du rayonnement γ a été étudié sur ce complexe répresseur-80 pb.

Dans un premier temps, le complexe répresseur-fragment de 80 pb est irradié en solution dans une gamme de dose allant de 0 à 2000 Gy.

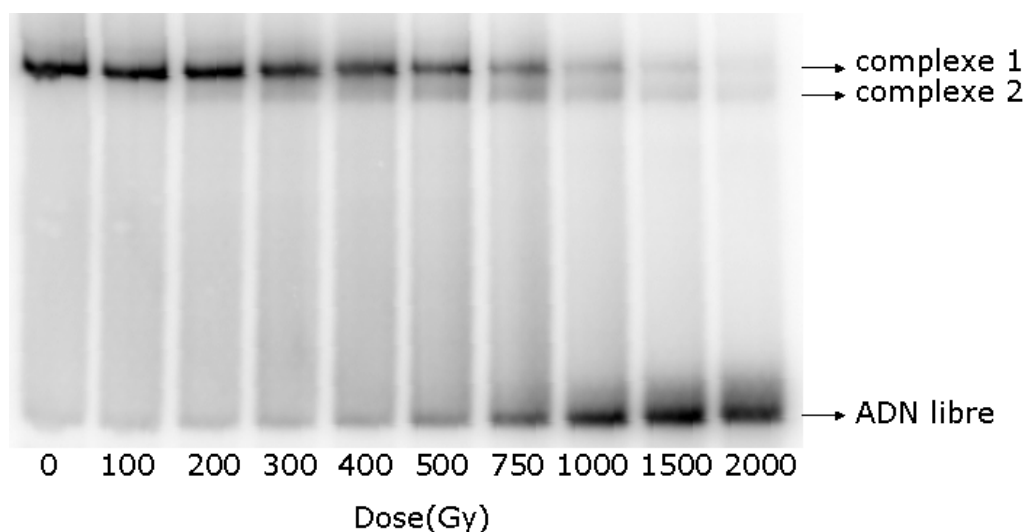


Figure 44. Gel retard: analyse des complexes entre un fragment de 80 pb ($0.05 \mu\text{M}$) et le répresseur ($0.8 \mu\text{M}$) après irradiation de ces complexes (doses : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500 et 2000 Gy).

Il ressort de cette expérience que la proportion d'ADN en complexe diminue au cours de l'irradiation (Figure 44). De plus, un deuxième complexe apparaît au cours de l'irradiation avant d'également être détruit. L'évolution des deux complexes, déterminée par analyse des gels retard, est représentée à la Figure 45.

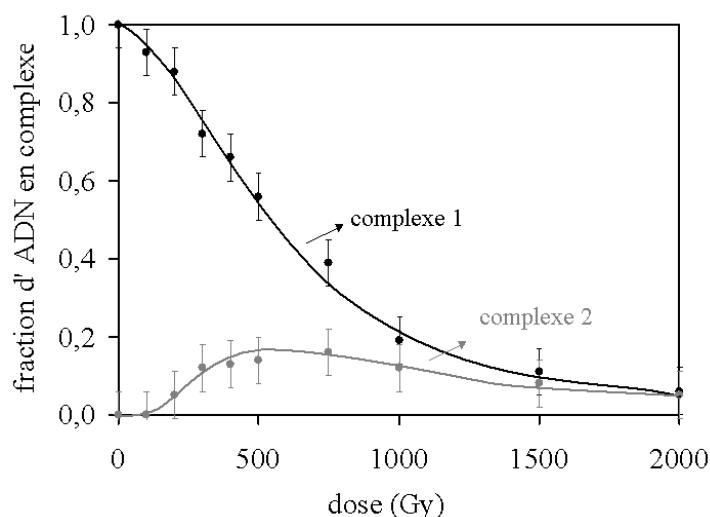


Figure 45. Fraction d'ADN en complexe en fonction de la dose après irradiation du complexe répresseur-fragment de 80 pb (moyenne de 3 expériences).

Au vu de cette expérience, il apparaît qu'au moins un des deux partenaires de l'interaction est endommagé lorsque le complexe est irradié. Afin de déterminer si des dommages à l'un des deux partenaires sont critiques pour la complexation, l'ADN et la protéine ont été irradiés séparément.

Lorsque le répresseur est irradié seul puis incubé avec de l'ADN non irradié, le pourcentage de complexe observé, après incubation et analyse par électrophorèse en gel retard, diminue rapidement au cours de l'irradiation. Ceci montre que, sous irradiation, la protéine perd sa capacité à fixer l'ADN. D'autre part, tout comme pour le complexe irradié, une deuxième bande de complexe apparaît au cours de l'irradiation.

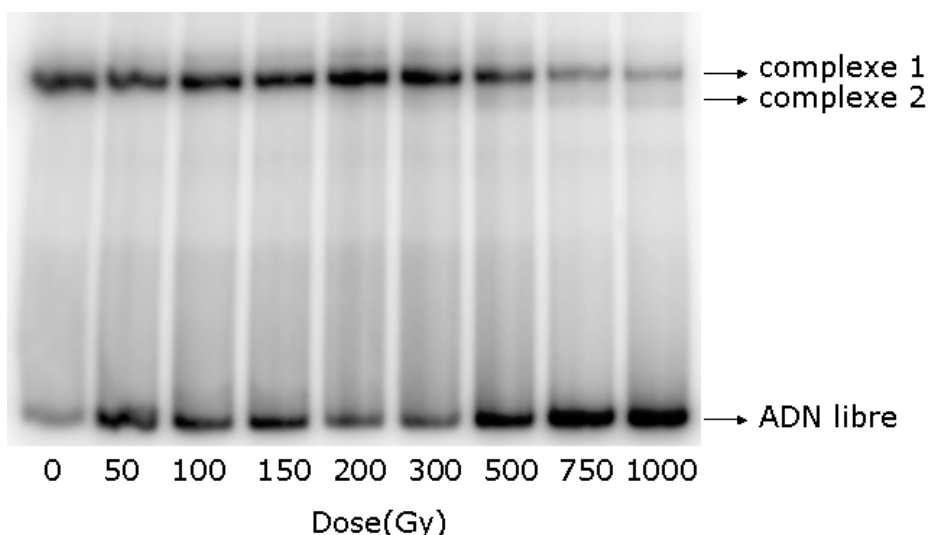


Figure 46. Gel retard: analyse des complexes entre un fragment de 80 pb non irradié (0.05 μ M) et le répresseur irradié (0.8 μ M) (doses : 0, 50, 100, 150, 200, 300, 500, 750 Gy).

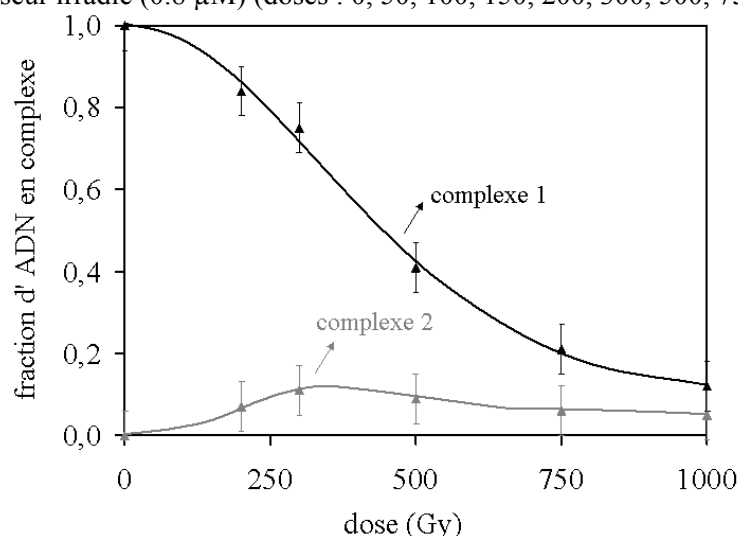


Figure 47. Fraction d'ADN en complexe en fonction de la dose après irradiation du répresseur et incubation de ce dernier avec le fragment de 80 non irradié (moyenne de 3 expériences).

Enfin, le fragment d'ADN est irradié en solution dans une gamme de dose allant de 0 à 2000 Gy puis est incubé avec le répresseur non irradié. L'analyse des complexes par électrophorèse en gel retard (Figure 48) montre que la capacité de fixation au répresseur de l'ADN irradié ne diminue que légèrement lorsque la dose augmente. Il faut également noter qu'il n'y a pas d'apparition de deuxième bande de complexe.

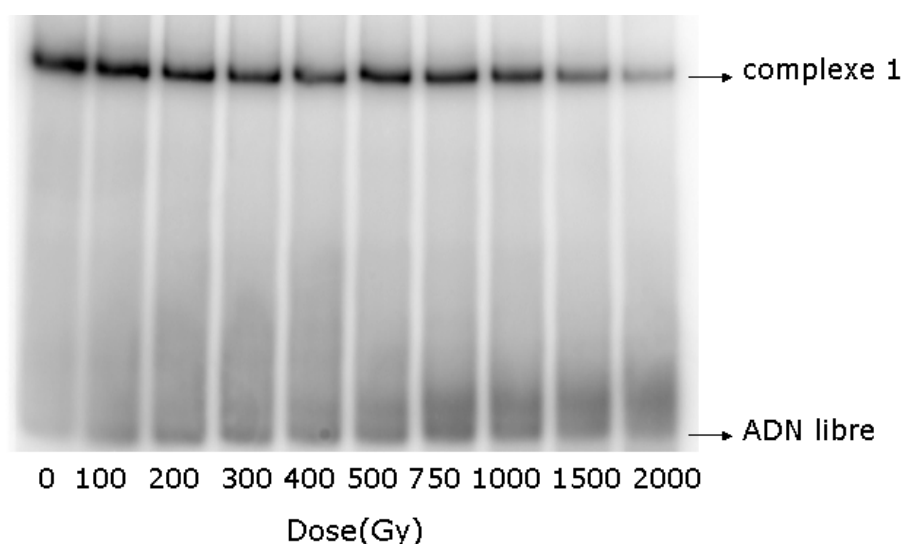


Figure 48. Gel retard: analyse des complexes entre un fragment de 80 pb irradié (0.05 μ M) et le répresseur non irradié (0.8 μ M) (doses : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500 et 2000 Gy).

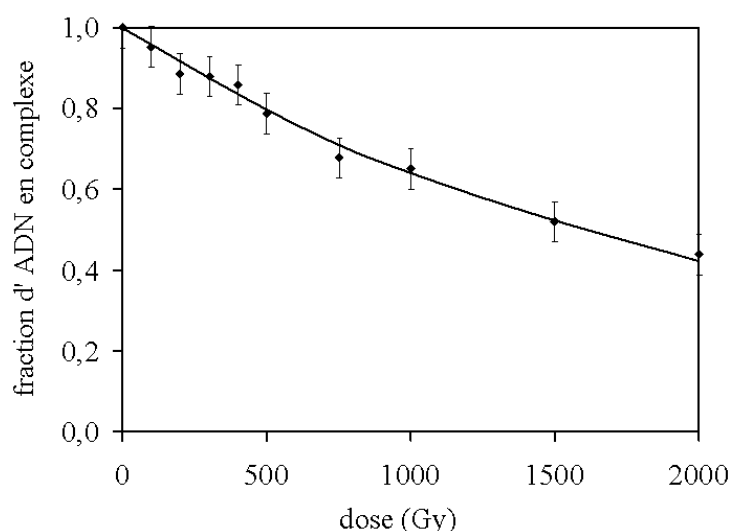


Figure 49. Fraction d'ADN en complexe en fonction de la dose après irradiation du fragment d'ADN de 80 pb et incubation de ce dernier avec le répresseur non irradié (moyenne de 3 expériences).

La deuxième bande observée correspond donc à un complexe formé entre un fragment d'ADN et une molécule de répresseur endommagé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'apparition d'un deuxième type de complexe au cours de l'irradiation.

Premièrement, l'irradiation peut provoquer des dommages dans le domaine de fixation du répresseur à l'ADN, appelé *headpiece*. Le répresseur *lac* étant une protéine allostérique, des dommages au sein du *core* peuvent également perturber la fixation à l'ADN. Ces dommages peuvent donc modifier les interactions ADN-protéine et par là même, la courbure du fragment d'ADN. Ce complexe migrera donc dans le gel différemment du complexe formé par un répresseur intact. De tels résultats ont été obtenus par Culard *et al.* (2003) pour la protéine MC1 de *Methanosarcina sp.* CHT155. La protéine irradiée forme, avec l'ADN, un complexe

différent de celui formé par la protéine native, où la courbure provoquée sur l'ADN par la protéine est nettement plus faible. Ce nouveau complexe migre, lors de l'électrophorèse, différemment du complexe natif. Une autre hypothèse plausible est que l'irradiation provoque des dommages au domaine de tétramérisation du répresseur, ce qui aurait pour conséquence de mener à une forme dimérique de la protéine. Il a en effet été montré qu'un dimère de répresseur [Hsieh & Brenowitz, 1997] ou de *headpiece* [Kalodimos *et al.*, 2001] pouvait former un complexe avec la séquence opératrice. La deuxième bande correspondrait alors à un complexe entre l'ADN et un répresseur dimérique.

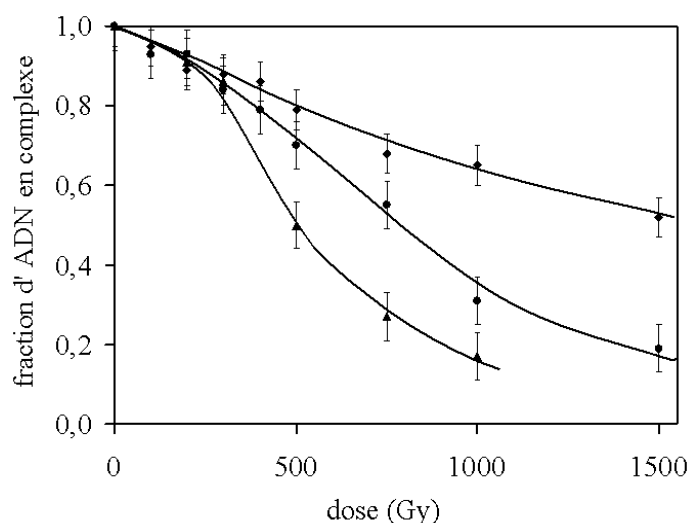


Figure 50. Comparaison des fractions d'ADN en complexe en fonction de la dose d'irradiation du complexe (cercles), du répresseur libre (triangles) et de l'ADN libre (losanges).

Comme le montre la Figure 50, la dose nécessaire à la destruction du complexe est supérieure à celle induisant la perte totale de la capacité de fixation du répresseur irradié libre : la protéine est donc protégée par l'ADN. Comme cela a été souligné par Eon *et al.* (2001), les coupures de chaîne ne sont pas les dommages critiques mais ce sont les modifications des chaînes latérales des acides aminés qui jouent un rôle fondamental dans la perte de capacité de fixation du répresseur à l'ADN. Un modèle a également été proposé au sein de l'équipe [Charlier *et al.*, 2002] qui tend à prouver que deux dommages indépendants sont nécessaires au minimum pour inactiver le répresseur ; il confirme aussi que l'inactivation de la protéine est principalement due à l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés.

Le domaine de fixation du répresseur à l'ADN est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine et est composé d'environ 60 acides aminés. Ce domaine, appelé *headpiece*, a été plus particulièrement étudié afin d'identifier les dommages responsables de la perte de capacité de fixation du répresseur irradié à l'opérateur.

1. 2. Etude des *headpieces*

1. 2. 1. Conformation et activité de la *headpiece*

Un peptide de 60 acides aminés correspondant au domaine de fixation du répresseur à l'ADN a été exprimé chez *E.coli* et purifié. Avant d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur le peptide ainsi obtenu, la conformation de la *headpiece* ainsi que son activité vis-à-vis de l'ADN ont été vérifiées.

a) Conformation de la *headpiece*

Les *headpieces* présentent une structure secondaire connue dont les éléments prépondérants sont des hélices α [Schnarr & Maurizot, 1982a ; Spronk *et al.*, 1999]: chaque *headpiece* forme en effet un petit domaine globulaire dont le cœur hydrophobe est constitué de trois hélices α ; la région composée des résidus 50 à 58 est non structurée en absence d'ADN et forme une hélice α (hélice « charnière ») lorsque le répresseur est fixé à sa séquence opératrice. Afin de vérifier que le peptide exprimé est correctement repley, sa structure secondaire a été analysée par dichroïsme circulaire.

Le spectre de dichroïsme circulaire de la *headpiece* (29 μ M dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25) a été enregistré de 200 à 250 nm, l'échantillon étant contenu dans une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique.

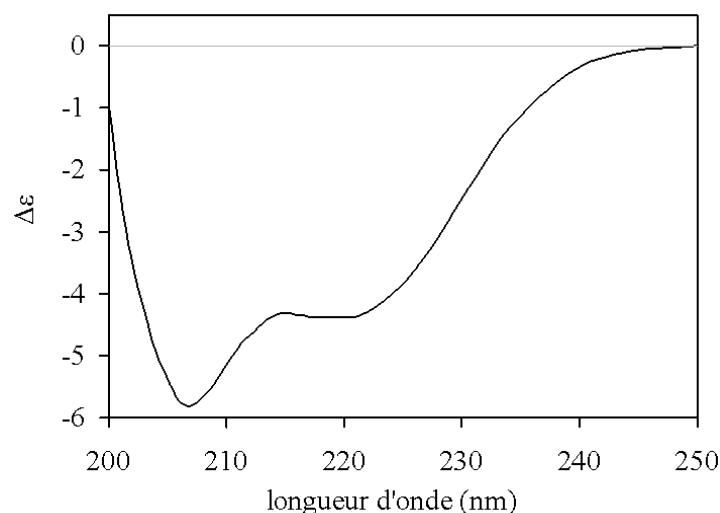


Figure 51. Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution de *headpiece* (conditions expérimentales : [*headpiece*]=29 μ M, dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25, irradiation et mesure de DC à 4°C).

Comme le montre la Figure 51, le peptide exprimé et purifié est bien structuré : la *headpiece* présente en effet un spectre de dichroïsme circulaire comparable à celui obtenu par Schnarr & Maurizot (1981) avec deux maxima d'ellipticité à 208 et 220 nm, caractéristiques de la présence de structures hélicoïdales.

b) Activité de la *headpiece* vis-à-vis de l'ADN

La constante d'association du complexe formé par la *headpiece* et la séquence opératrice est nettement plus faible que celle du complexe formé par le répresseur entier. L'étude de l'interaction entre la *headpiece* et l'ADN ne pouvant pas être réalisée par électrophorèse en gel retard, elle l'a été par dichroïsme circulaire. En effet, la fixation de la *headpiece* à de l'ADN opérateur ou non-opérateur induit un changement de conformation de l'ADN et donc des modifications du spectre de dichroïsme circulaire de ce dernier dans la gamme de longueur d'onde 260-300 nm [Culard & Maurizot, 1981 ; Schnarr *et al.*, 1983].

Afin de vérifier l'activité de la *headpiece* envers l'ADN, sa fixation non spécifique a été étudiée sur un polydésoxynucléotide, le poly(dAT). Une solution de poly(dAT) (134 μ M) est titrée par une solution de *headpiece* (94 μ M) dans des conditions de faible force ionique (tampon 5 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25). Il a en effet été montré précédemment [Schnarr *et al.*, 1983] que l'interaction entre la *headpiece* et les acides nucléiques est plus forte à très faible force ionique. Le pH, quant à lui, n'influence pas l'interaction s'il est compris entre 5.2 et 9.0.

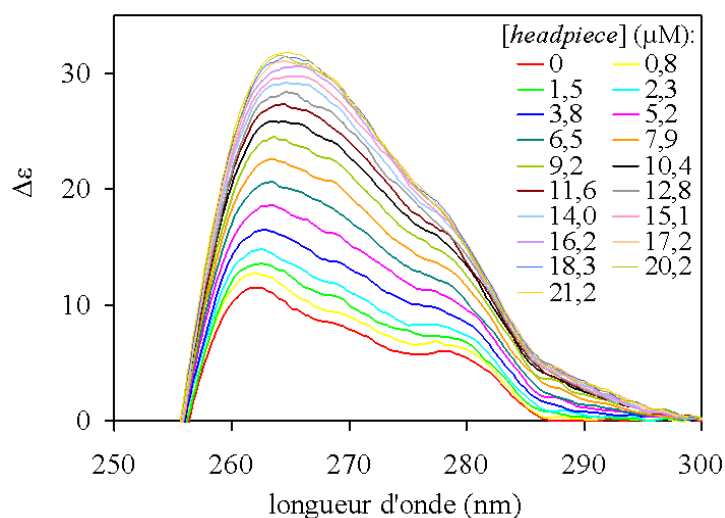


Figure 52. Spectres de dichroïsme circulaire de polydAdT (134 μ M) en absence et en présence de concentrations croissantes de *headpiece* (conditions expérimentales : 22°C, tampon 5 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25).

La *headpiece* reconnaît le poly(dAT) puisque le spectre de DC du polydésoxynucléotide varie au cours de la titration (voir Figure 52). La Figure 53 montre l'augmentation relative d'intensité de DC du poly(dAT), à 262 nm, en fonction de la concentration en *headpiece*. A de faibles concentrations en peptide, la courbe est linéaire : la variation de DC due à l'ajout de protéine est indépendante de la concentration en ADN ce qui signifie que toutes les molécules de *headpiece* sont fixées au poly(dAT). A de plus fortes concentrations en *headpiece*, la

courbe n'est plus linéaire. Ceci montre que les protéines ajoutées ne se fixent pas toutes au poly(dAT) et que les protéines fixées perturbent un plus grand nombre de nucléotides [Schnarr *et al.*, 1983].

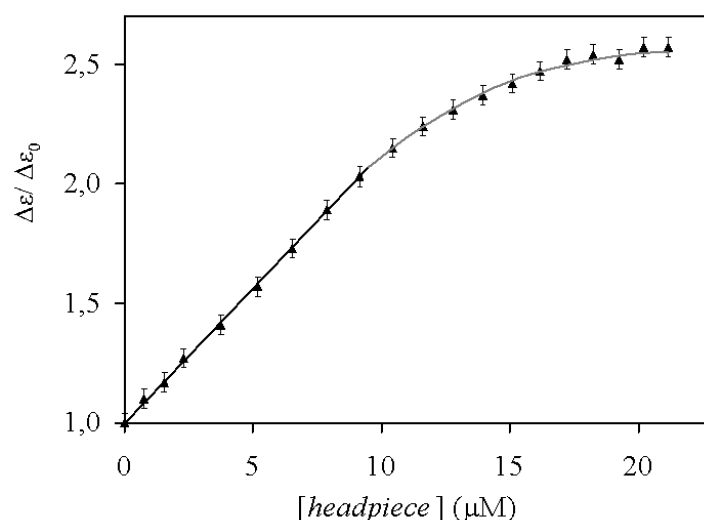


Figure 53. Augmentation de l'intensité relative de dichroïsme circulaire à 262 nm du poly(dAT) (134 μM) en fonction de la concentration en *headpiece* (moyenne de 2 expériences).

La *headpiece* exprimée et purifiée au laboratoire possède donc la conformation attendue, vérifiée par dichroïsme circulaire, et reconnaît un polydésoxynucléotide, preuve de son activité vis-à-vis de l'ADN. Les effets de l'irradiation vont donc être étudiés sur ce peptide.

1. 2. 2. Intégrité de la chaîne peptidique de la *headpiece* irradiée

L'irradiation d'une protéine ou d'un peptide provoquant des cassures de chaîne, l'intégrité de la chaîne peptidique de la *headpiece* a été étudiée au cours de l'irradiation.

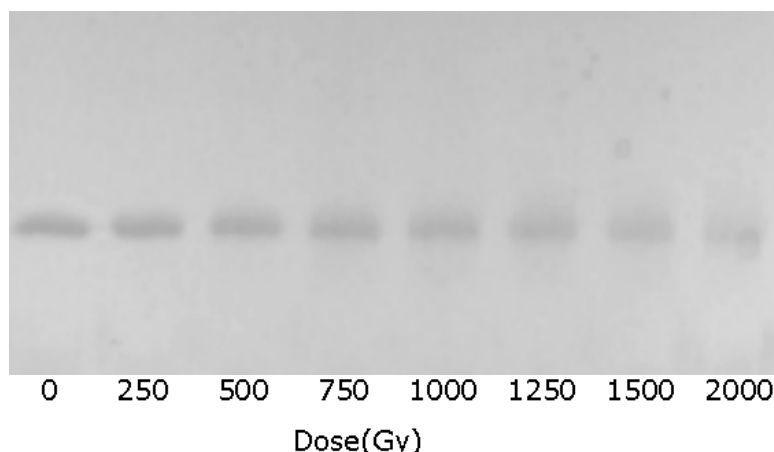


Figure 54. Effet de l'irradiation de la *headpiece* sur l'intégrité de la chaîne peptidique : électrophorèse en gel SDS-PAGE du peptide irradié à différentes doses (conditions expérimentales : [headpiece]=29 μM, dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25 ; irradiation à 4°C).

Les échantillons de *headpiece* sont irradiés dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium (pH 7.25) puis analysés par SDS-PAGE. Comme le montre la Figure 54, la préparation de *headpiece* obtenue au laboratoire présente une très grande pureté : aucune bande de plus faible ou plus haute masse moléculaire n'est en effet observée pour le peptide non irradié.

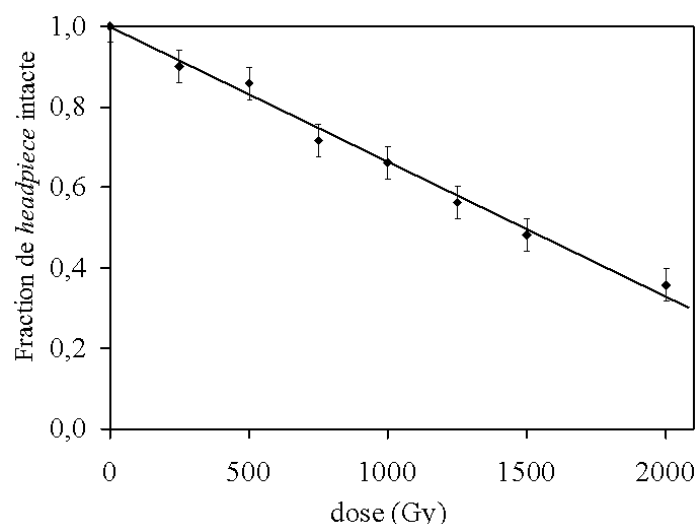


Figure 55. Effet de l'irradiation de la *headpiece* sur l'intégrité de la chaîne peptidique : fraction de peptide intact en fonction de la dose (moyenne de 4 expériences).

Une diminution de la proportion de *headpiece* intacte est observée au cours de l'irradiation (voir Figure 55). De plus, l'augmentation de la dose s'accompagne d'une diffusion de la bande dans le gel ; ce phénomène correspond à l'apparition d'un *smear* sous la bande de *headpiece* intacte et donc à la formation de peptides de masse moléculaire plus petite. L'exposition de la *headpiece* aux rayons γ induit donc des coupures de sa chaîne peptidique. Il faut noter qu'il n'y a ni apparition de bandes de masse inférieure à celle de la *headpiece*, donc pas de site de coupure préférentielle de la *headpiece* par les radicaux hydroxyles, ni apparition de bandes de masse supérieure, donc pas d'agrégation de ce peptide dans la gamme de doses étudiée.

1. 2. 3. Conformation de la *headpiece* irradiée

Les coupures de la chaîne peptidique peuvent entraîner des changements dans la structure secondaire de la *headpiece*, tout comme certaines modifications des chaînes latérales des acides aminés. La conformation de la *headpiece* a donc été analysée par dichroïsme circulaire afin de suivre d'éventuels changements de sa structure au cours de l'irradiation.

Un échantillon de *headpiece* (29 μ M dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25) est irradié dans une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique. Les spectres de DC de

l'échantillon irradié à différentes doses (de 0 à 2000 Gy) ont été enregistrés dans cette même cuve dans une gamme de longueurs d'onde de 200 à 250 nm.

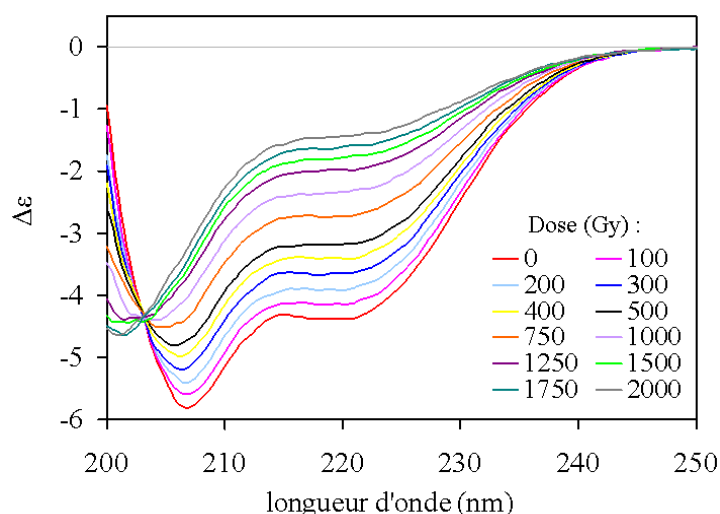


Figure 56. Spectres de dichroïsme circulaire de la *headpiece* au cours de l'irradiation (conditions expérimentales : $[headpiece]=29 \mu M$, dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25, irradiation et mesure de DC à 4°C)

Comme le montre la Figure 56, l'intensité de dichroïsme circulaire de la *headpiece* diminue au cours de l'irradiation et le maximum d'intensité est déplacé vers les plus courtes longueurs d'onde: l'irradiation provoque donc une déstructuration du peptide.

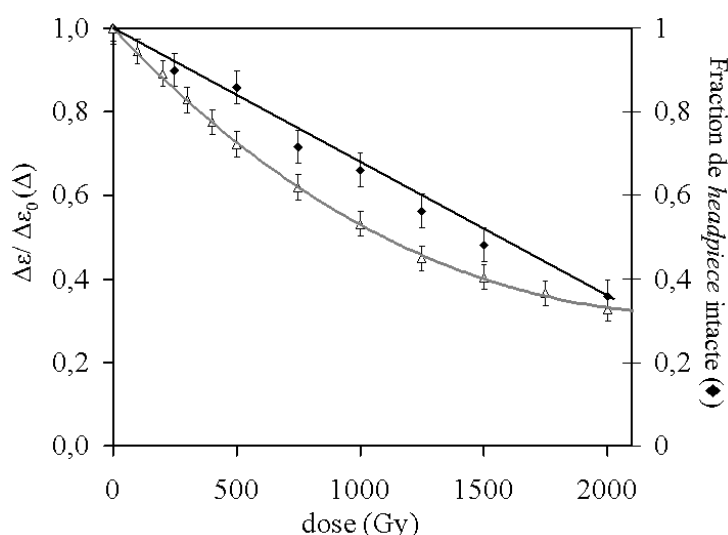


Figure 57. Intégrité de la chaîne peptidique *versus* diminution de l'intensité relative de dichroïsme circulaire (à 220 nm) d'une solution de *headpiece* au cours de l'irradiation (moyenne de 3 expériences pour le DC).

L'intégrité de la chaîne peptidique et l'intensité de DC évoluent conjointement au cours de l'irradiation. Les coupures de chaîne entre résidus impliqués dans des structures telles que les hélices α peuvent en effet mener à des pertes de la structure ; Schnarr & Maurizot (1982a) ont par exemple montré que la protéolyse de la *headpiece* par la trypsine provoque une

diminution de l'intensité du signal de DC. L'écart entre les deux courbes peut être expliqué par le fait que toutes les coupures ne provoquent pas de perte supplémentaire de conformation. En effet, si une coupure de la chaîne peptidique au sein d'une hélice provoque sa déstructuration, une deuxième coupure au sein de la même hélice n'induirait pas de modification supplémentaire puisque l'hélice est déjà déstructurée.

Des dénaturations de la *headpiece* ont également été observées par la chaleur [Schnarr & Maurizot, 1982b] et par ajout de concentrations croissantes d'urée [Schnarr & Maurizot, 1981] ; ces dénaturations sont réversibles, ce qui n'est pas le cas des dénaturations radio-induites de la *headpiece*. Il a donc semblé intéressant d'examiner la dénaturation thermique de la *headpiece* irradiée et de regarder si celle-ci garde son caractère réversible.

La *headpiece*, irradiée dans une cuve en quartz de 1 mm de trajet optique, a été dénaturée et renaturée thermiquement dans le dichrographe : la température est portée de 4°C à 74°C puis inversement, avec un gradient de 2°C/min. L'intensité de DC de la *headpiece* à 208 nm est enregistrée automatiquement tous les incréments de 0.2°C. Afin de quantifier la fraction de *headpiece* structurée en chaque point du cycle, les états structuré et dénaturé du peptide ont été définis : la conformation adoptée par le peptide non irradié à 4°C est considérée comme étant l'état natif et le peptide est considéré complètement déstructuré à 74°C, même si Schnarr & Maurizot (1982a) ont démontré que la dénaturation thermique de la *headpiece* ne mène pas à un état complètement dénaturé, comme c'est le cas pour d'autres protéines.

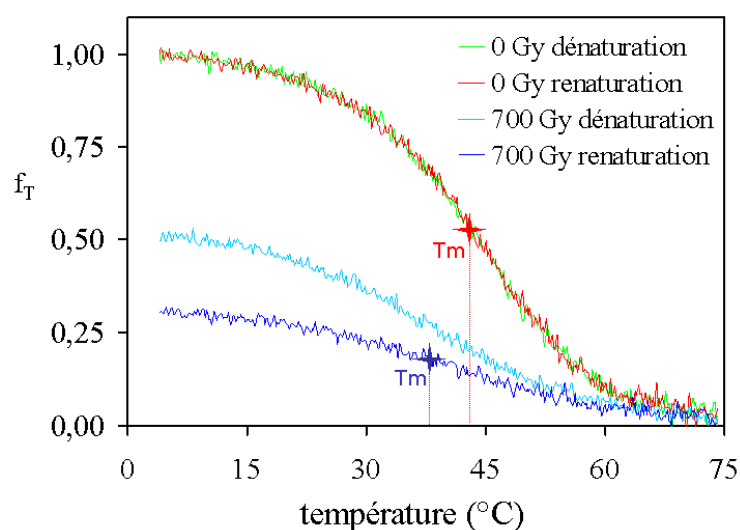


Figure 58. Fraction de *headpiece* structurée ($f_T = (\Delta\epsilon_T - \Delta\epsilon_d)/(\Delta\epsilon_{nd} - \Delta\epsilon_d)$) avec $\Delta\epsilon_T$, $\Delta\epsilon_d$, $\Delta\epsilon_{nd}$ les ellipticités, à 220 nm, de la *headpiece* à la température T , respectivement à l'état dénaturé et non dénaturé) en fonction de la température.

La Figure 58 montre l'évolution de la fraction de *headpiece* structurée en fonction de la température pour des solutions non irradiée et irradiée de peptide.

Pour la *headpiece* non irradiée, la dénaturation est tout à fait réversible puisque les courbes de dénaturation et de renaturation sont identiques.

Dans le cas de la *headpiece* irradiée, la fraction de peptide structuré à 4°C est nettement plus faible que pour la *headpiece* non irradiée : une dose de 700 Gy provoque une perte de 50% de l'état natif. De plus, lorsque la *headpiece* irradiée est dénaturée puis renaturée, il apparaît que le peptide ne reprend pas sa conformation d'origine : seule une fraction égale à 30% de l'état natif est retrouvée à la fin de la renaturation thermique. Le cycle de dénaturation-renaturation thermique provoque donc une perte supplémentaire de structure. Une hypothèse plausible expliquant ce phénomène est que toutes les coupures du squelette peptidique ne provoque pas de modification de la structure à 4°C, par exemple parce que la structure secondaire du peptide est maintenue par un réseau d'interactions intramoléculaires, et ce même si la chaîne peptidique est clivée. Le chauffage de la *headpiece* provoque une rupture des interactions et, lors du refroidissement, le peptide ne retrouve pas sa conformation.

Il apparaît également sur la Figure 58 que le T_m du peptide est légèrement réduit lorsque celui-ci est irradié. Cette variation de T_m laisse supposer que le signal de DC observé après irradiation est dû à des peptides endommagés mais pas complètement dénaturés et dont la stabilité thermique est plus faible que celle de la *headpiece* native. En effet, si l'irradiation avait induit une déstructuration totale des peptides endommagés, l'échantillon aurait consisté en un mélange de deux populations, des *headpieces* natives et des *headpieces* complètement dénaturées, et le T_m des échantillons n'aurait pas été modifié par l'irradiation.

Les coupures de chaîne ne sont pas les seuls dommages induits au cours de l'irradiation. Il a été montré [Eon *et al.*, 2001] que les modifications de chaînes latérales se produisent avant les coupures de chaînes. Les dommages aux chaînes latérales ont donc également été étudiés.

1. 2. 4. Etude par fluorescence de la radiolyse de la *headpiece*

La *headpiece* possède un spectre d'émission de fluorescence qui est dû uniquement à la présence de quatre résidus tyrosine (Tyr7, Tyr12, Tyr17 et Tyr47). Les résidus tyrosine étant particulièrement sensibles à l'attaque radicalaire ($k = 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), leur état a été suivi au cours de l'irradiation. Il faut noter que, dans le répresseur entier, le spectre des tyrosines

interfère avec celui des résidus Trp201 et Trp220 présents dans le *core*, d'où l'intérêt de travailler sur la *headpiece* isolée.

Les dommages causés aux résidus tyrosine lors de l'irradiation ont donc été suivis par mesure de la fluorescence intrinsèque de la *headpiece*. Un échantillon de *headpiece* (29 μ M dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25) est irradié dans une cuve en quartz de 5 mm de côtés. Les spectres d'émission du peptide irradié à différentes doses (de 0 à 2000 Gy) ont été enregistrés dans cette même cuve dans une gamme de longueurs d'onde de 270 à 400 nm, la longueur d'onde d'excitation étant 280 nm.

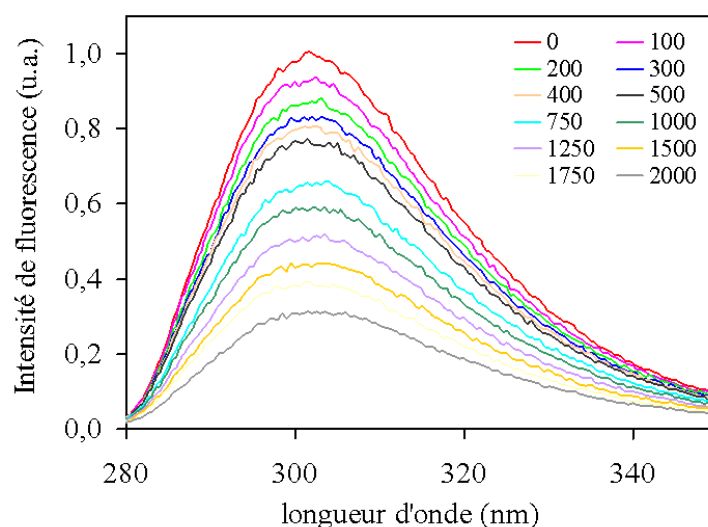


Figure 59. Spectres d'émission de fluorescence de la *headpiece* en fonction de la dose, exprimée en Gy sur la figure (λ excitation= 280 nm).

Comme montré à la Figure 59, le spectre de la *headpiece* non irradiée présente un maximum de fluorescence à 301 nm. L'intensité de fluorescence de la *headpiece* diminue au cours de l'irradiation sans qu'il n'y ait de modification dans la forme du spectre. Ainsi, à 2000 Gy, il ne reste que 30% de la fluorescence initiale. Ceci prouve donc que les résidus tyrosine sont endommagés au cours de l'irradiation. Des modifications de la conformation de la *headpiece* au cours de l'irradiation aurait également pu expliquer les modifications d'intensité de fluorescence observées. Cependant, les intensités de fluorescence en conditions natives et dénaturantes étant semblables (résultats non communiqués), il apparaît que les changements de conformation observés précédemment n'influencent pas la fluorescence de la *headpiece* irradiée.

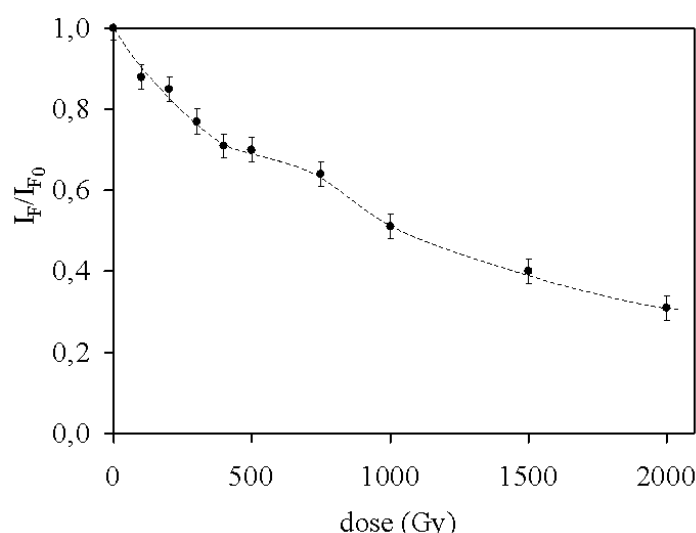


Figure 60. Diminution de l'intensité de fluorescence relative de la *headpiece* en fonction de la dose (moyenne de 3 expériences).

La représentation des aires normalisées des spectres en fonction de la dose montre que cette diminution ne suit pas une simple courbe exponentielle (Figure 60). Il semble donc que un ou plusieurs résidus soient endommagés préférentiellement au cours de l'irradiation.

Les dommages causés aux tyrosines lors de l'irradiation peuvent mener à l'apparition de composés telles que la DOPA ou les dityrosines (voir introduction bibliographique), ces composés émettant également de la fluorescence. La fluorescence de la DOPA ayant un maximum à 314 nm (λ excitation = 280 nm), son éventuelle formation ne peut être suivie puisque son spectre aurait été masqué par celui des tyrosines. Seule celle des dityrosines a pu être étudiée (λ excitation = 320 nm, maximum d'émission à 407 nm).

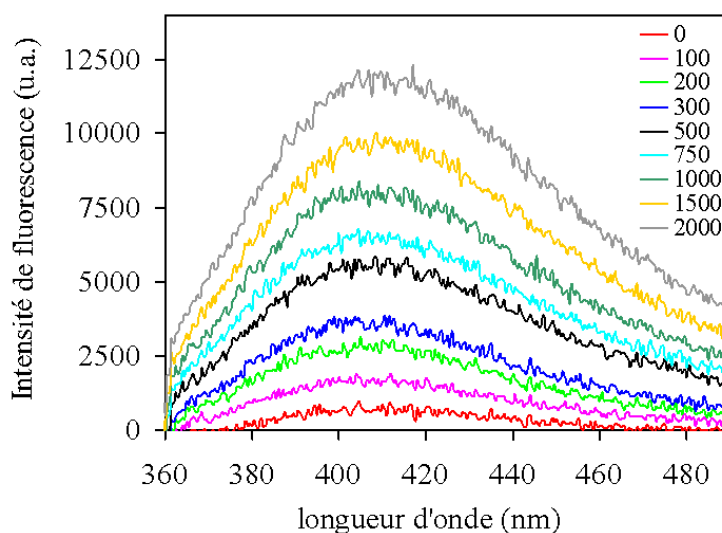


Figure 61. Spectres d'émission de fluorescence de la *headpiece* en fonction de la dose, exprimée en Gy sur la figure (λ excitation= 320 nm).

La Figure 61 montre que l'intensité de fluorescence dans la bande d'émission des dityrosines augmente avec la dose, ce qui suggère que l'irradiation entraîne leur formation. La perte de la capacité de fixation du répresseur irradié pourrait donc être due, au moins partiellement, à la formation de dityrosines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gras *et al.* (2005) qui ont montré par modélisation moléculaire que le complexe répresseur-ADN est déstabilisé suite à la formation d'une dityrosine.

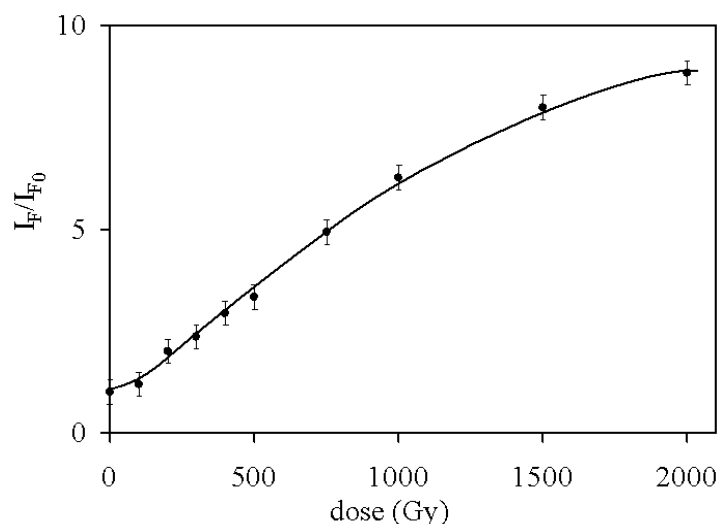


Figure 62. Augmentation de l'intensité de fluorescence relative des dityrosines en fonction de la dose en conditions natives (moyenne de 3 expériences).

La formation de dityrosines est possible entre deux résidus tyrosine suffisamment proches dans l'espace. Chaque *headpiece* contient quatre résidus tyrosine : Tyr7, Tyr12, Tyr17 et Tyr47. Tyr7 et Tyr17, qui appartiennent respectivement à la première et à la seconde hélice, sont suffisamment proches (environ 4 Å) pour participer à la formation de dityrosines intramoléculaires. De plus, ces deux résidus présentent des accessibilités élevées aux radicaux [Eon *et al.*, 2001].

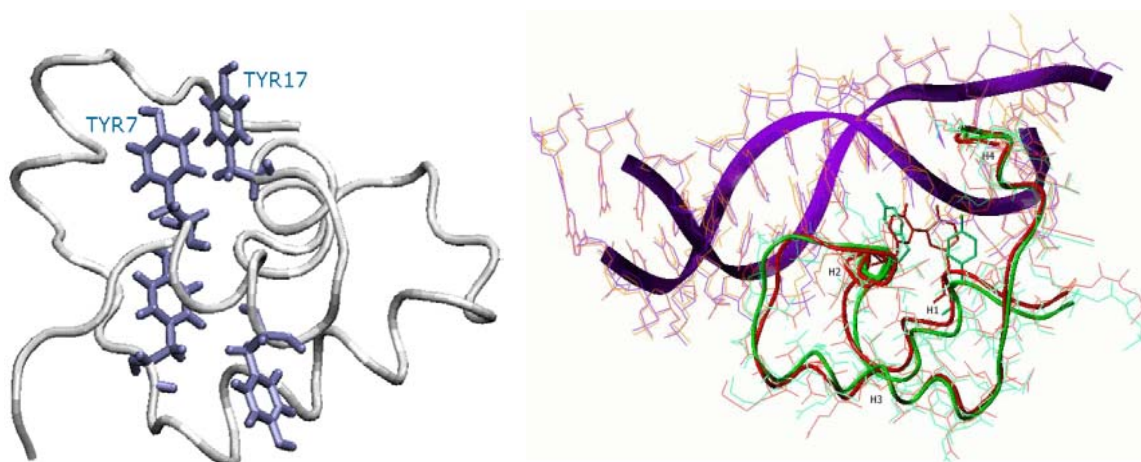


Figure 63. (gauche) Représentation de la *headpiece* et des résidus tyrosine [structure PDB 1c1g d'après Slijper *et al.*, 1997]. (droite) Superposition des structures des *headpieces* native (en vert) et portant une dityrosine (en rouge) [d'après Gras *et al.*, 2005].

Les dityrosines peuvent également être formées entre deux résidus de peptides différents. L'analyse de la *headpiece* irradiée n'a toutefois pas révélé de pontages intermoléculaires mais uniquement des coupures de chaîne. Il est donc peu probable que les dityrosines formées soient d'origine intermoléculaire.

1. 2. 5. Etude des dommages par spectrométrie de masse

L'étude de l'état des résidus tyrosine par mesure de fluorescence a montré que ceux-ci sont endommagés au cours de l'irradiation. La *headpiece* comprend, en plus des tyrosines, d'autres acides aminés hautement oxydables par les radicaux hydroxyles, tels que les résidus méthionine ($k=8.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), histidine ($k=5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) et arginine ($k=3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Les calculs réalisés par Marie Begusova (Institut de Physique Nucléaire, Prague) montrent quels sont les acides aminés de la *headpiece* dont les probabilités de réaction avec le radical hydroxyle sont les plus élevées (Figure 64).

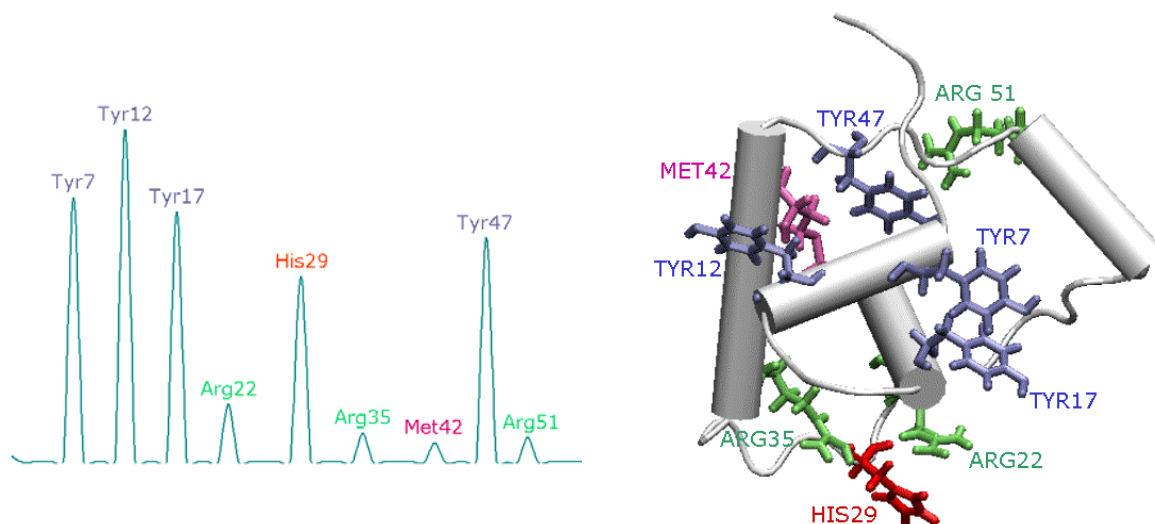


Figure 64. (gauche) Probabilités relatives de réaction du radical hydroxyle avec les résidus de la *headpiece*, calculées avec le modèle théorique RADACK (communication personnelle de Marie Begusova) [d'après la structure PDB 1JWL, Bell & Lewis, 2001]. (droite) Structure de la *headpiece* (structure PDB 1CJG d'après Spronk *et al.*, 1999). Les acides aminés représentés sont ceux dont la probabilité de réaction avec le radical OH est la plus grande.

Ces calculs sont réalisés à l'aide du modèle RADACK qui permet d'évaluer les probabilités relatives de réaction entre le radical OH et les atomes d'hydrogène des acides aminés. Ces calculs tiennent compte d'une part de la réactivité des radicaux avec les acides aminés et d'autre part de l'accessibilité des résidus au solvant et donc aux radicaux. Les réactions chimiques des radicaux hydroxyles sont simulées à l'aide de la théorie de Smoluchowski. Pour chaque site de réaction, une sphère est centrée sur l'atome cible, dont le rayon est proportionnel à la vitesse de réaction entre le radical hydroxyle et l'atome

correspondant ; la taille de cette sphère est inversement proportionnelle à la somme des constantes de diffusion de l'atome cible et du radical. Tous les atomes non réactifs sont représentés par des sphères de van der Waals et le radical hydroxyle ne peut pas pénétrer ce volume. Lorsqu'un radical OH rencontre la sphère de Smoluchowski d'un atome réactif, la réaction est comptabilisée. Les probabilités relatives de réaction des différents sites sont obtenues en faisant le rapport entre le nombre de réaction comptabilisées pour le site et le nombre total de réactions.

La *headpiece* irradiée a été étudiée par spectrométrie de masse pour déterminer si d'autres acides aminés, en plus des résidus tyrosine, sont endommagés lors de l'irradiation.

La *headpiece* a dans un premier temps été irradiée dans une gamme de doses allant de 0 à 1000 Gy avant d'être analysée par MALDI-TOF.

Tout d'abord, l'analyse de la *headpiece* non irradiée par MS révèle la présence d'adduits de sodium (M+23) et de potassium (M+39). La technique MALDI-TOF étant relativement tolérante aux sels, les échantillons n'ont en effet pas été dessalés avant analyse, ce qui explique la présence de ces adduits.

D'autre part, l'analyse de la *headpiece* irradiée montre que celle-ci est oxydée : l'irradiation du peptide est en effet accompagnée par l'apparition de pics avec un décalage de masse de 16 Da (Figure 65). A 200 Gy, trois oxydations de la *headpiece* sont observées alors qu'à 500 Gy, cinq oxydations sont visibles. Il faut noter que l'intensité des pics limite la détection des espèces oxydées : chaque modification supplémentaire diminue en effet l'intensité des pics (par effet de distribution) et à 1000 Gy, celle-ci est telle qu'ils se confondent avec le bruit de fond.

L'analyse du peptide entier ne permet cependant pas de déterminer quel(s) résidu(s) sont oxydés au cours de l'irradiation. Les échantillons de *headpiece* ont donc été digérés en fragments plus petits puis analysés par MALDI-TOF. L'apparition de pics avec un décalage de 16 Da sur certains peptides issus du clivage devrait donc permettre de localiser plus précisément les dommages.

a) Digestion de la *headpiece* non irradiée par des endoprotéinases

La *headpiece* a été digérée par les endoprotéinases Arg-C et Glu-C, clivant respectivement après les résidus arginine et acide glutamique. Les profils de digestion attendus sont représentés à la Figure 66.

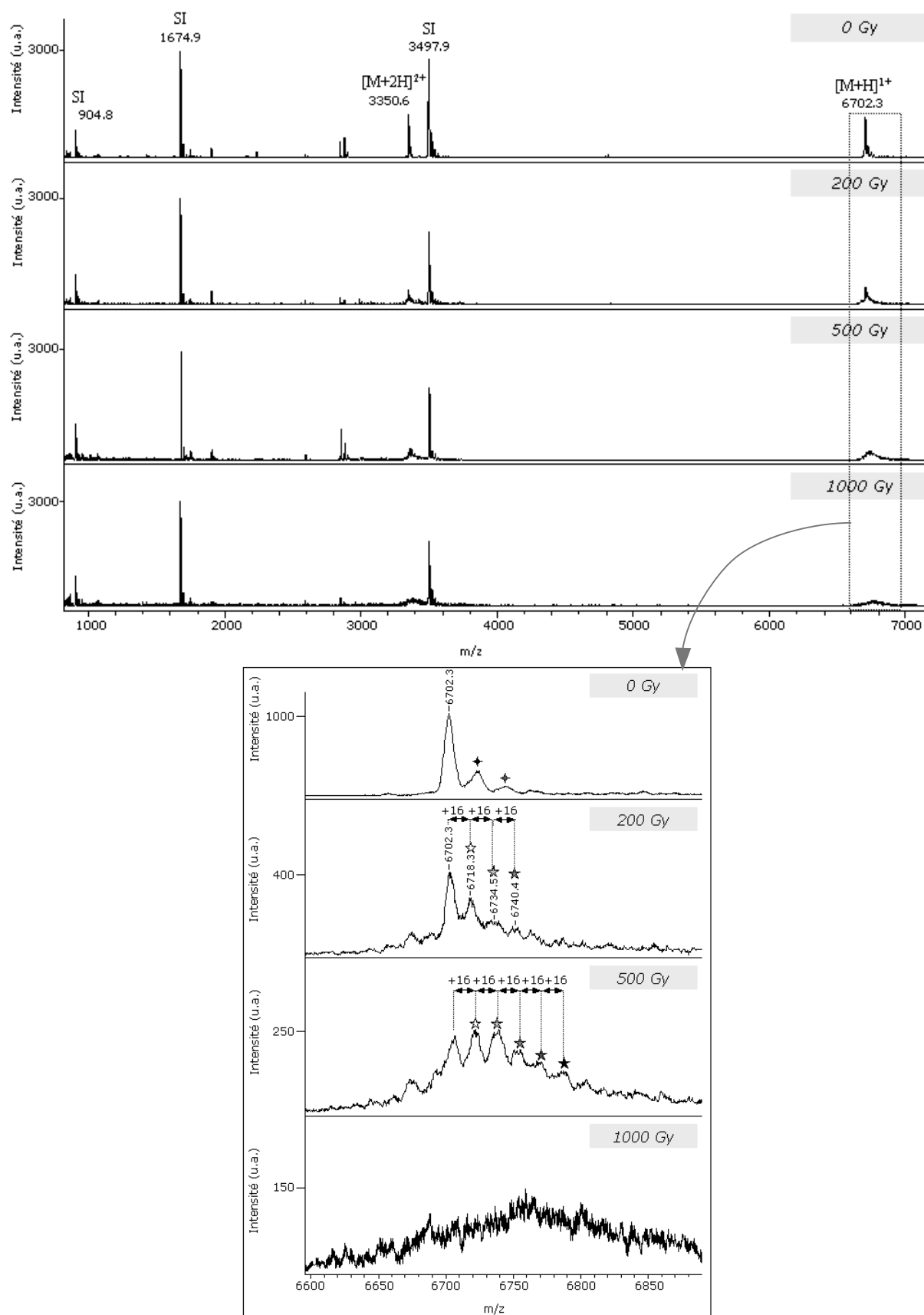


Figure 65. Spectres MALDI-TOF du répresseur irradié à différentes doses (0, 200, 500 et 1000 Gy) et analysé en présence d'un standard interne (SI). Les croix marquent les adduits de sodium et potassium et les étoiles indiquent les espèces oxydées. (conditions expérimentales : [headpiece] irradiation : 29 μ M dans un tampon 25 mM cacodylate d'ammonium, pH 7.25)

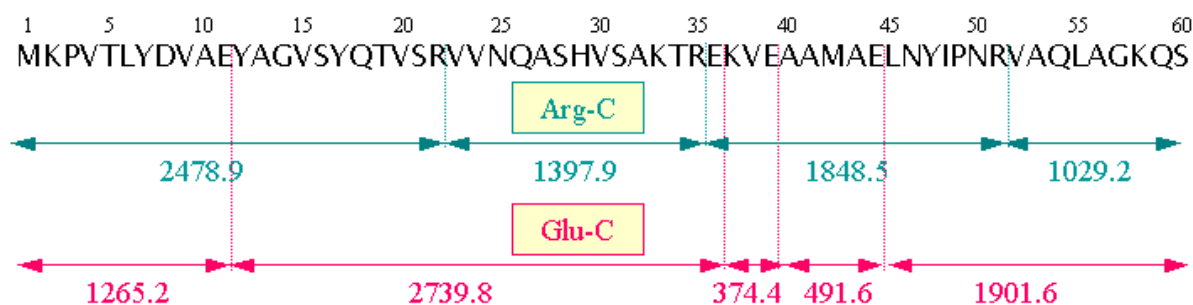


Figure 66. Profils théoriques de digestion de la *headpiece* par les endoprotéinases Arg-C et Glu-C et m/z attendus pour des ions chargé une fois.

Il faut toutefois souligner que les petits fragments voient leur pic masqué par le bruit de fond dû à la matrice et ne sont donc pas visualisés lors de l'analyse MALDI-TOF ; c'est le cas des fragments de m/z 374.4 et 491.6 issus de la digestion par Glu-C. Le peptide de m/z 1029.2 issu de la digestion de la *headpiece* par Arg-C n'est pas non plus visible sur le spectre MALDI-TOF malgré sa taille, ce qui pourrait être dû à une mauvaise ionisation de ce dernier ou à un effet des sels. D'autre part, la digestion n'étant pas complète, des peptides de masse supérieure sont observés (voir Figure 67), de m/z 3227.8 pour Arg-C (fragment V23-R51) et 3096.4 pour Glu-C (fragment Y12-E39).

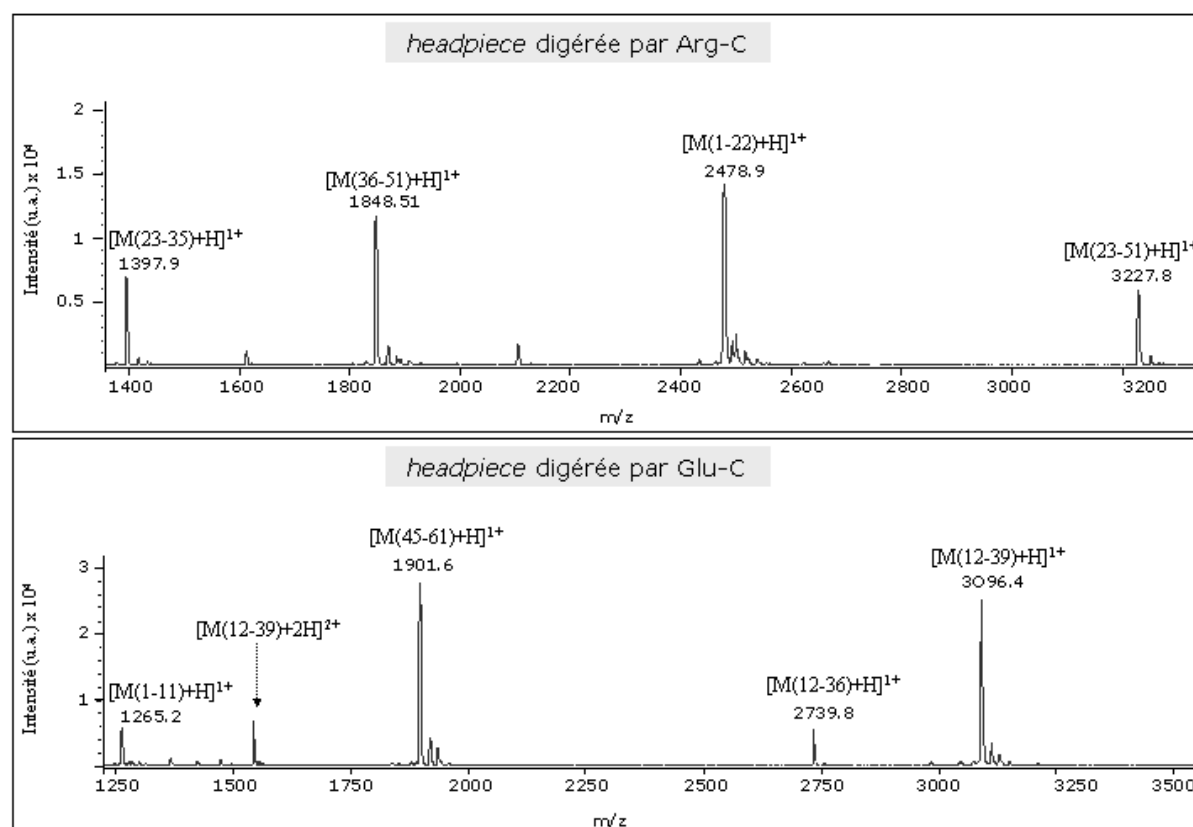


Figure 67. Spectres MALDI-TOF de la *headpiece* non irradiée digérée par les endoprotéinases Arg-C et Glu-C.

b) Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) de la *headpiece* irradiée et digérée

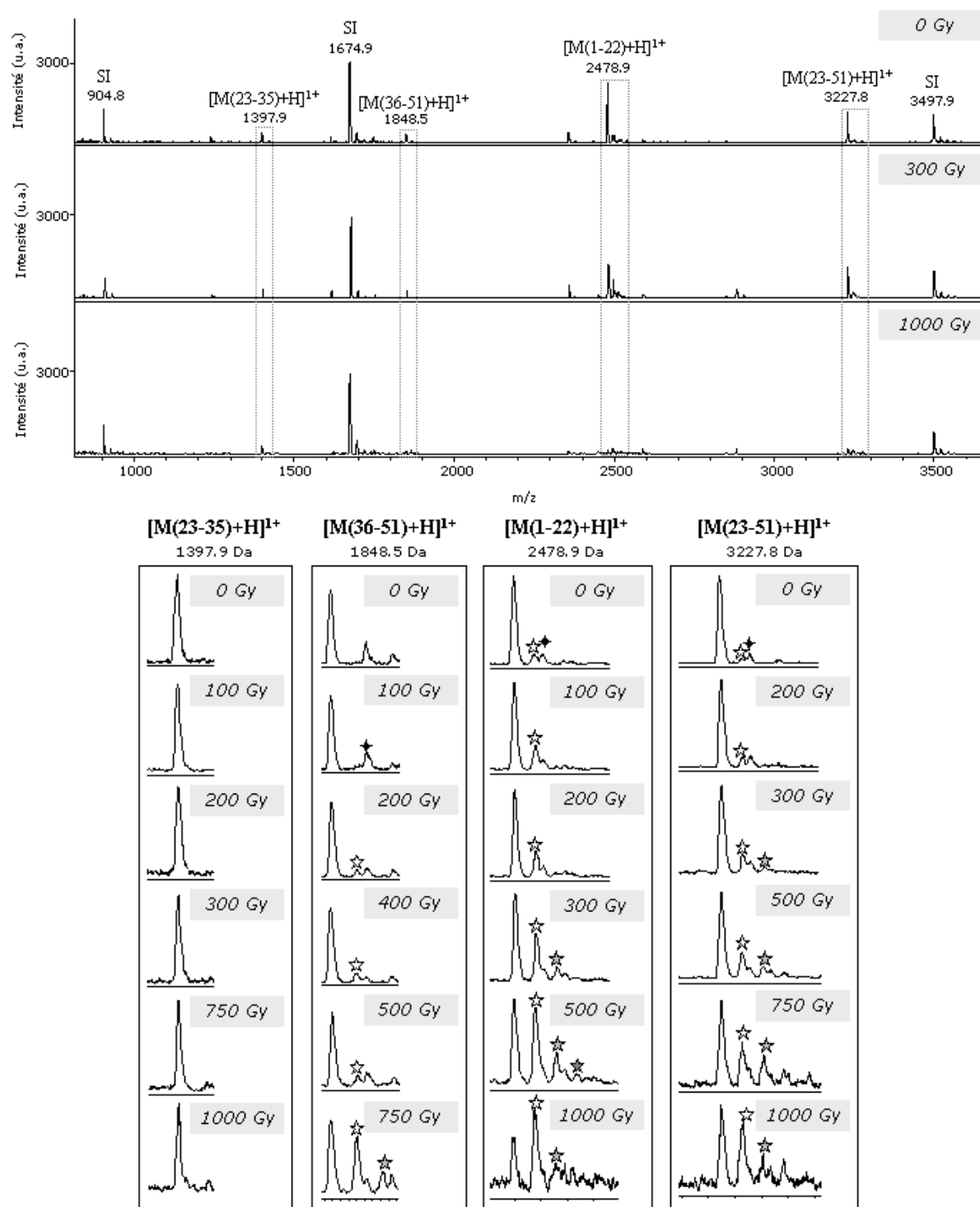


Figure 68. Analyse par MALDI-TOF des peptides obtenus après irradiation et digestion de la *headpiece* par l'endoprotéinase Arg-C (SI : standard interne). Les croix marquent les adduits de sodium et potassium et les étoiles indiquent les espèces oxydées

Lorsque les peptides obtenus après protéolyse par Arg-C (Figure 68) et par Glu-C (Figure 69) de la *headpiece* irradiée sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, il apparaît que certains des fragments sont oxydés. Des recoupements entre ces résultats (voir

Figure 70) et la comparaison avec les calculs réalisés précédemment permettent de poser des hypothèses quant aux résidus endommagés.

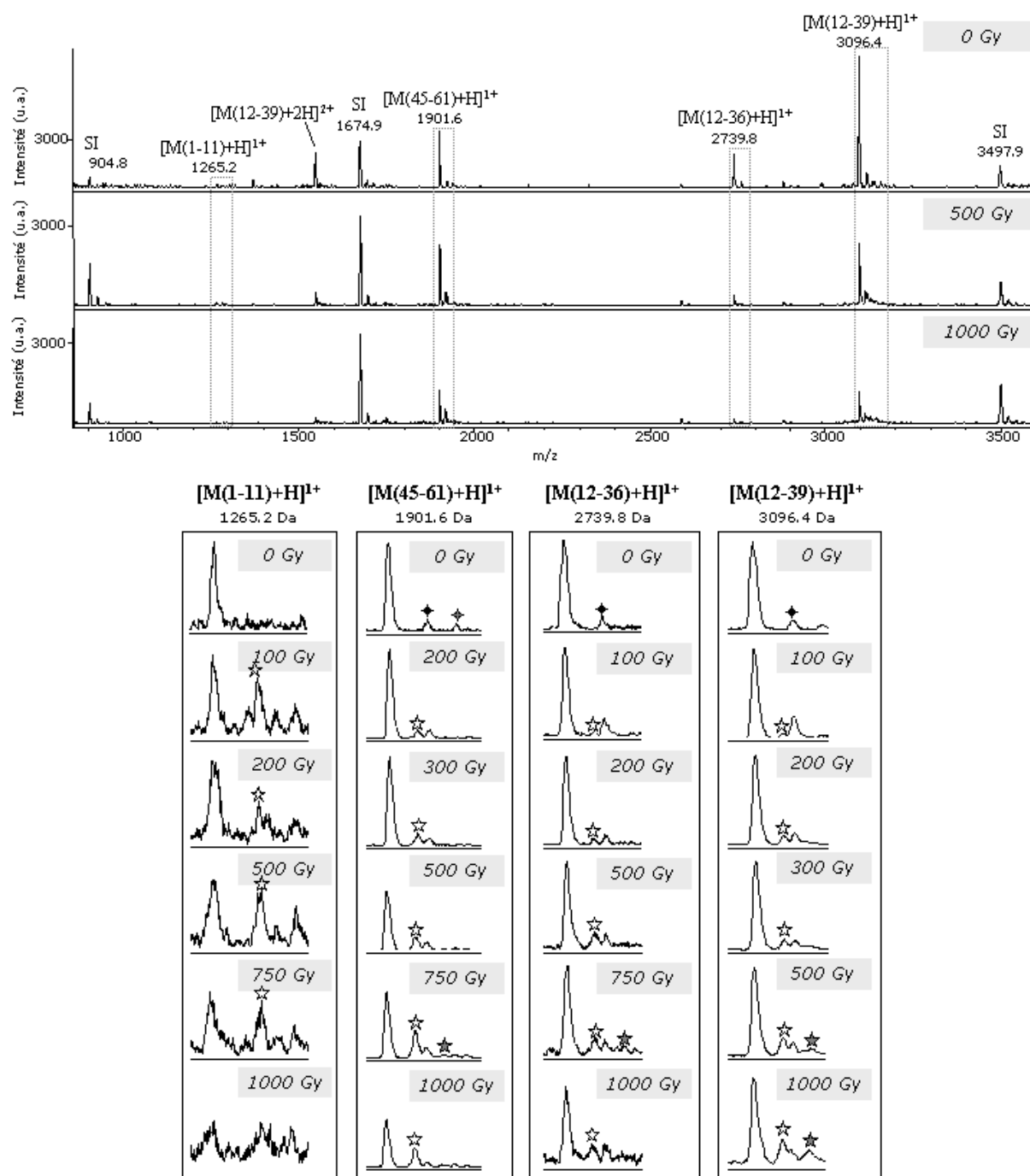


Figure 69. Analyse par MALDI-TOF des peptides obtenus après irradiation et digestion de la *headpiece* par l'endoprotéinase Glu-C (SI : standard interne). Les croix marquent les adduits de sodium et potassium et les étoiles indiquent les espèces oxydées

Une seule oxydation est observée sur le fragment de m/z 1265.2. D'après les calculs, il semble que ce soit la Tyr7 qui soit oxydée. Il faut toutefois noter que la Met1 n'a pas été prise en compte dans les calculs et que les résidus Met présentent également une réactivité élevée avec les radicaux hydroxyles.

Etonnament, aucune oxydation n'est observée sur le fragment de m/z 1397.9 : ni His29 ni Arg35 ne semblent donc être des cibles majeures d'oxydation, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par calcul. La non-oxydation de His29 pourrait s'expliquer par le fait que l'oxydation des résidus His entraîne la précipitation du peptide [Schöneich, communication personnelle], raison pour laquelle aucun fragment portant une histidine oxydée n'est visible.

Si les résidus His29 et Arg35 ne sont pas oxydés, les deux oxydations observées sur les fragments de m/z 2739.8 et 3096.4 seront portées par les résidus Tyr12, Tyr17 ou Arg22. Etant donné que les calculs montrent que le résidu Arg22 présente une probabilité de réaction réduite avec le radical hydroxyle par rapport à ces deux résidus tyrosine, il ne serait donc pas une cible majeure.

L'analyse du fragment de m/z 1901.6 fait ressortir deux oxydations, certainement celles de Tyr47 et Arg51. Or si ces deux résidus sont oxydés, les deux oxydations observées sur les fragments m/z 1848.5 et 3227.8 correspondent aux mêmes dommages. Le résidu Met42 ne serait donc pas oxydé.

Les trois oxydations détectées sur le fragment de m/z 2478.9 correspondent d'une part à celle de Met1 ou Tyr7, oxydation déjà observée sur le fragment de m/z 1265.2, et d'autre part, certainement à des dommages aux résidus Tyr12 et Tyr17. En effet, les calculs montrent que les deux résidus tyrosine sont les cibles préférentielles de l'attaque radicalaire.

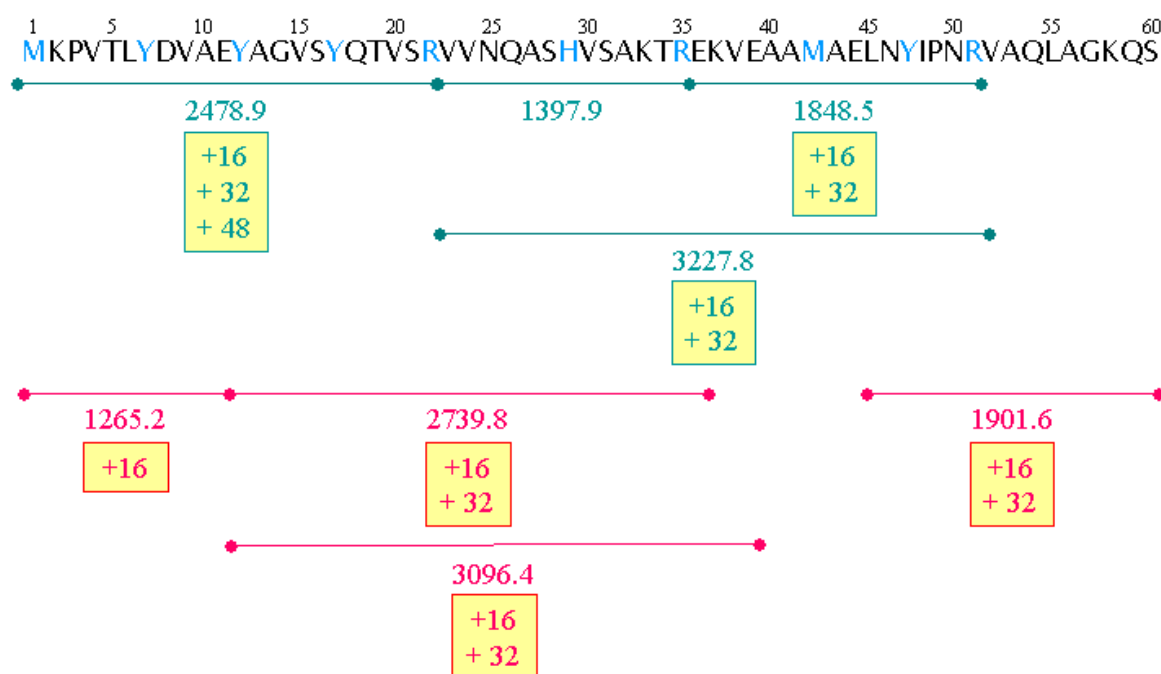


Figure 70. Récapitulatif des modifications de masse observées par analyse MALDI-TOF (indiquées dans les rectangles jaunes) à partir des cartes peptidiques de la *headpiece* irradiée avec une dose de 1000 Gy et digérée par Arg-C (en vert) et par Glu-C (en rouge). Les acides aminés dont les probabilités de réaction avec le radical hydroxyle sont les plus élevées, ainsi que le résidu Met1, sont représentés en bleu sur la séquence.

c) Analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ESI-IT)

Des analyses de spectrométrie de masse en tandem ont été réalisées afin de déterminer plus précisément quels sont les acides aminés endommagés au cours de l'irradiation. En effet, cette technique permet de fragmenter les peptides et ainsi de caractériser les modifications éventuelles des acides aminés.

Dans un premier temps, des échantillons de *headpiece* ont été irradiés à 500 Gy puis digérés, soit par l'endoprotéinase Arg-C, soit par Glu-C. Les échantillons digérés puis dessalés ont ensuite été analysés par ESI-IT.

Le spectre MS obtenu lors de l'analyse du peptide irradié et digéré par Arg-C montre que l'électrospray produit des ions multiplement chargés (Figure 71). Il apparaît également que certains fragments sont oxydés, ce qui avait été montré par MALDI-TOF. Il faut également noter qu'aucun ion correspondant aux fragments de m/z 1029.2 et 1396.6 n'est observé sur ce spectre. Le fragment de m/z 1396.6 étant cependant visible en MALDI-TOF, cette disparition pourrait être expliquée par une compétition lors de l'ionisation électrospray entre les différents peptides issus de la digestion, situation défavorable à l'ionisation de ce fragment.

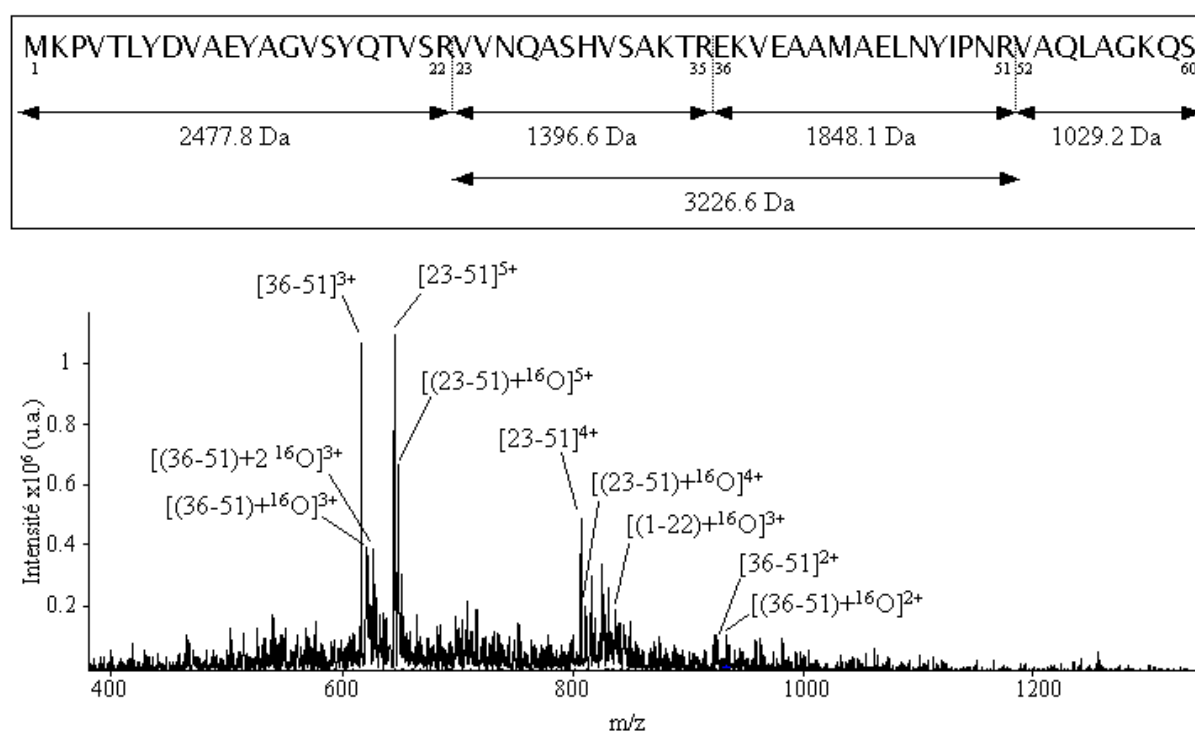


Figure 71. Spectre ESI-IT (MS) de la *headpiece* irradiée (500 Gy), digérée par Arg-C puis dessalée.

Les fragments issus de la digestion de la *headpiece* irradiée par Arg-C, qui portent une seule oxydation, sont ensuite fragmentés afin d'obtenir leur spectre MS/MS.

Les ions issus de la fragmentation ont été annotés d'après Steen & Mann (2004) qui ont réactualisé la nomenclature de Roepstorff-Fohlmann-Biemann [Roepstorff & Fohlmann, 1984 ; Biemann, 1992]. Cette nomenclature est présentée à la Figure 72. La chaîne peptidique se fragmente préférentiellement au niveau de la liaison amide, ce qui produit des ions-b lorsque la charge est portée par l'extrémité N-terminale et des ions-y lorsqu'elle est portée par l'extrémité C-terminale. Les ions N-terminaux sont appelés a_m , b_m et c_m où m représente le nombre de groupements R que ces ions contiennent. Les ions C-terminaux sont appelés $z_{(n-m)}$, $y_{(n-m)}$ et $x_{(n-m)}$ où $(n-m)$ est le nombre de groupements R que ces ions contiennent (n étant le nombre total de résidus). Il faut également souligner qu'en plus de ces fragmentations, les ions peuvent également perdre une molécule d'eau ou d'ammoniaque.

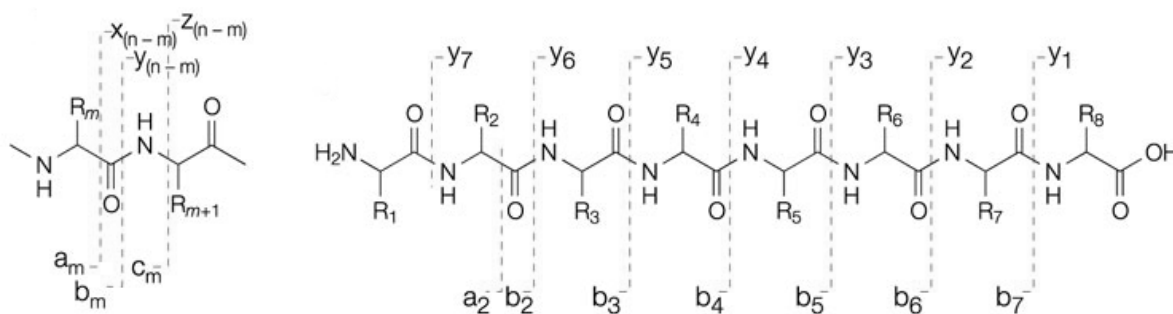


Figure 72. Nomenclature de la fragmentation peptidique [d'après Steen & Mann, 2004]

Il faut souligner que si un même fragment est détecté à la fois oxydé et non oxydé (par exemple b_2 et $b_2+^{16}O$ dans la Figure 73), cela prouve que l'échantillon consiste en un mélange de peptides parents oxydés sur au moins deux voire plusieurs acides aminés. C'est le cas pour tous les fragments issus de la digestion par Arg-C de la *headpiece* irradiée, portant une seule oxydation et qui ont été analysés par MS/MS ESI-IT.

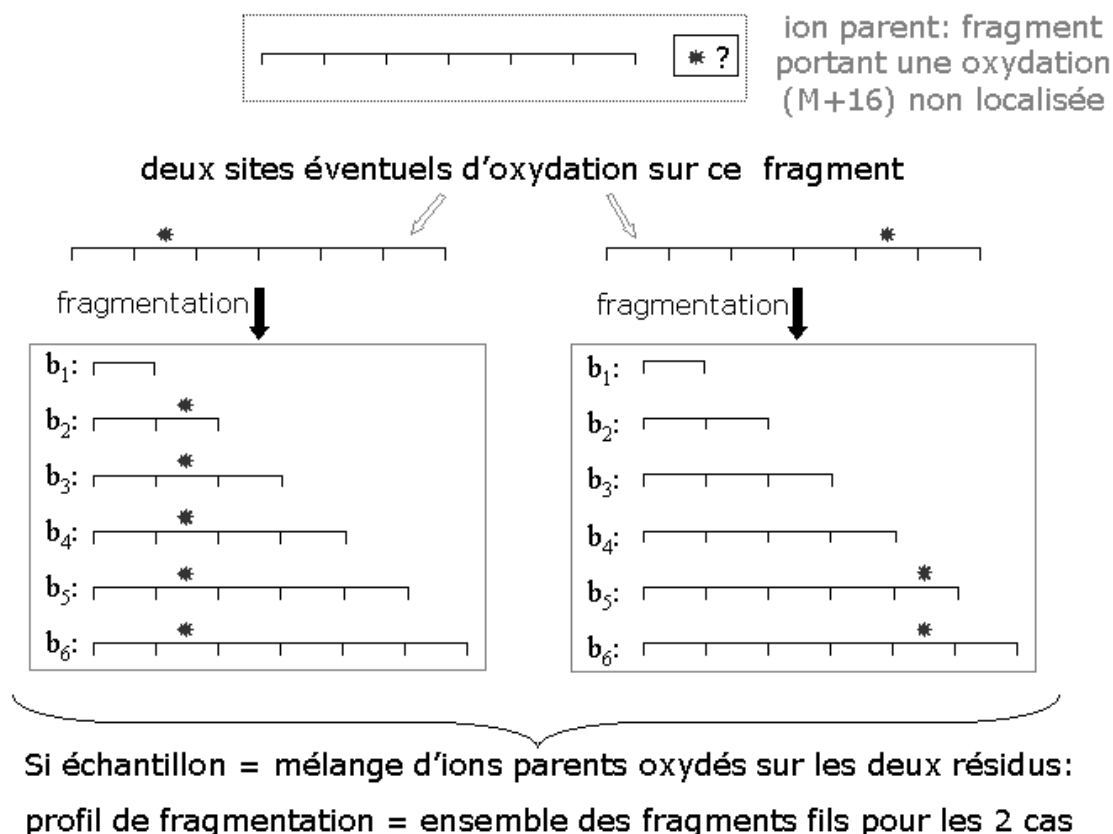


Figure 73. Fragments attendus après isolement et fragmentation d'un ion précurseur mono-oxydé (M+16). Cet ion précurseur peut être oxydé sur deux résidus différents, chacune des oxydations donnant un profil de fragmentation différent. Si ces deux résidus sont endommagés au cours de l'irradiation, l'échantillon sera composé des ions provenant des deux types de fragmentations et certains fragments seront observés à la fois oxydés et non oxydés.

De nombreux fragments des séries b_n et y_n sont présents sur les spectres MS/MS des produits de digestion de la *headpiece* par Arg-C (Figure 74 à Figure 76), certains étant oxydés. Les ions visibles sur le spectre sont annotés sur la séquence; les fragments non oxydés et oxydés détectés sont respectivement notés b_n , y_n et b_n^* , y_n^* . Les pics intenses non annotés correspondent à des fragments internes, c'est à dire des fragments ayant perdu leurs extrémités N- et C-terminales.

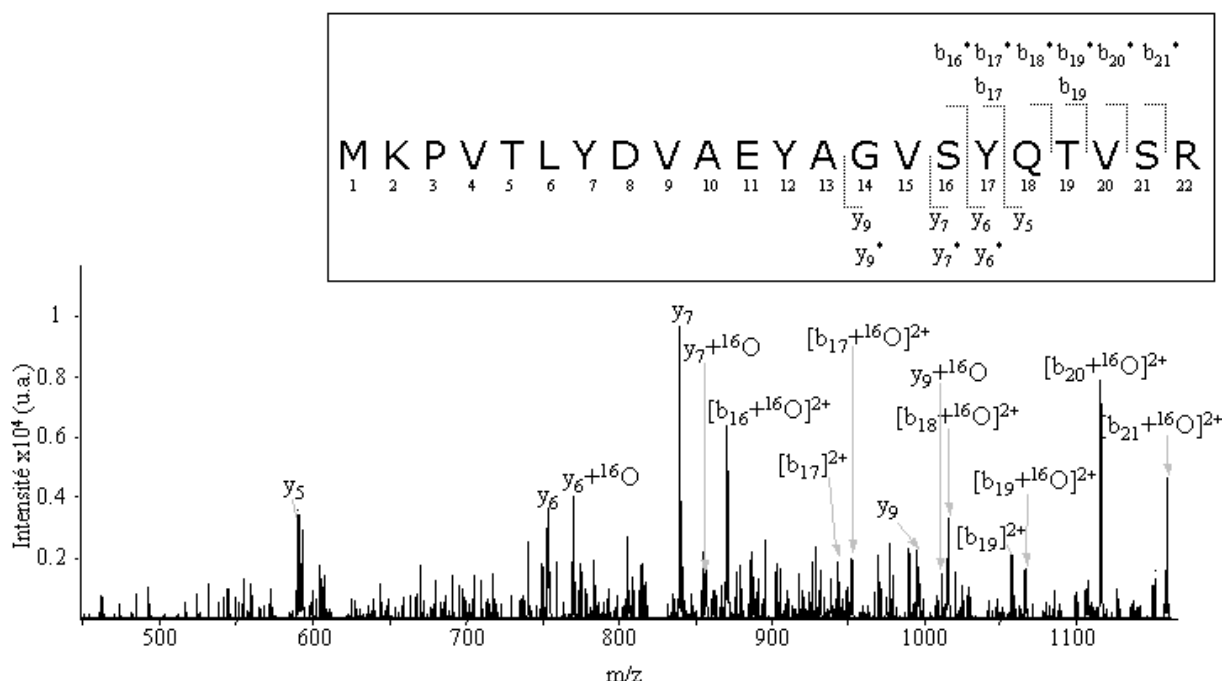


Figure 74. Spectre MS/MS ESI-IT obtenu par fragmentation du peptide Met1-Arg22, portant une oxydation et chargé trois fois (ion précurseur $m/z = 832.2$). Les ions observés sur le spectre et correspondant à des fragments non oxydés sont annotés sur la séquence (b_n , y_n), tout comme ceux correspondant à des fragments portant une oxydation (b_n^* , y_n^*).

En ce qui concerne le peptide précurseur de m/z 2494.6 (peptide Met1-Arg22 qui porte une oxydation, voir Figure 74), il apparaît tout d'abord que l'échantillon est en réalité un mélange de peptides portant une oxydation sur des résidus différents puisque certains ions fragments sont détectés à la fois oxydés (b_n^* , y_n^*) et non oxydés (b_n , y_n).

L'analyse de la série y permet de détecter une oxydation sur la séquence [Y17-R22] puisque le fragment y_6 est détecté oxydé. D'autre part, au moins une autre espèce portant une oxydation sur la séquence [M1-S16] est présente puisque le fragment b_{16} est détecté oxydé (la présence des fragments b_{17}^* - b_{21}^* est compatible avec cette hypothèse); la présence de y_9 non oxydé semble indiquer que cette oxydation est localisée sur la séquence [M1-A13]. Il faut également noter que la présence de b_{19} non oxydé laisse supposer qu'une espèce portant une oxydation sur [V20-R22] est également présente dans l'échantillon.

Ces résultats montrent donc l'existence d'au moins deux espèces oxydées sur des résidus différents et seraient également compatibles avec la présence de trois espèces oxydées ou plus.

L'analyse de ce fragment irradié à 500 Gy par MALDI-TOF avait révélé trois oxydations radio-induites, donc trois sites potentiels d'oxydation. La première ayant été localisée sur le résidu Met1 ou Tyr7 (voir MALDI-TOF), les calculs de probabilité laissent supposer que Tyr12, Tyr17 et Arg22 soient les autres cibles d'oxydation. Puisque l'échantillon analysé est

en réalité un mélange de peptides oxydés sur différents résidus, l'oxydation de Arg22 (prouvée par b_{19}) n'exclut pas celle de Tyr17.

En conclusion, l'analyse MS/MS du peptide de m/z 2494.6 ne permet donc pas de localiser sans ambiguïté l'ensemble des résidus endommagés.

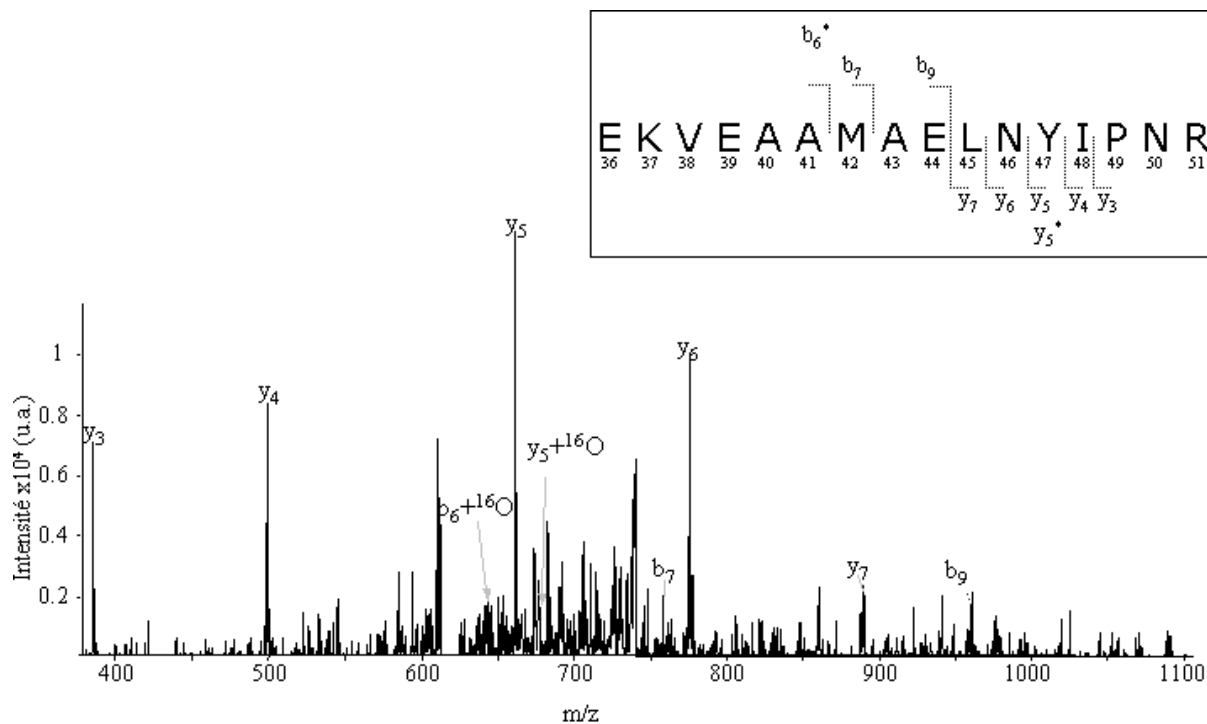


Figure 75. Spectre MS/MS ESI-IT obtenu par fragmentation du peptide Glu36-Arg51 qui porte une oxydation et est chargé trois fois (ion précurseur m/z = 621.9)

Pour le peptide précurseur de m/z 1864.5 (peptide Glu36-Arg51 qui porte une oxydation, voir Figure 75), l'échantillon est majoritairement composé d'un peptide portant une oxydation sur la séquence [E36-E44] puisque les fragments y_3 , y_4 , y_5 , y_6 et y_7 sont détectés non oxydés et que ces pics dominent le spectre. D'autre part, la présence des fragments oxydés y_5^* et b_6^* montre que certains peptides mineurs sont oxydés respectivement sur les séquences [Y47-R51] et [E36-A41].

Cette dernière observation est surprenante car les calculs n'avaient mis aucun des résidus de la séquence [E36-A41] en évidence comme cibles de l'attaque radicalaire. Au contraire, les calculs suggèrent plutôt qu'un peptide contenant le résidu Met42 oxydé pourrait correspondre à l'espèce majoritaire détectée en MS/MS. Il faut noter que l'interprétation des résultats MALDI-TOF, qui excluait l'oxydation de Met42, reposait sur l'hypothèse que chaque espèce mono-oxydé soit endommagée sur un résidu unique. L'analyse MS/MS montre que ce n'est pas le cas et, par conséquent, l'oxydation de Tyr47 et/ou Arg51 n'exclut pas celle de Met42.

En ce qui concerne la ou les oxydations localisées à l'extrémité C-terminale de la séquence, les calculs suggèrent que Tyr47 et Arg51 soient les cibles potentielles.

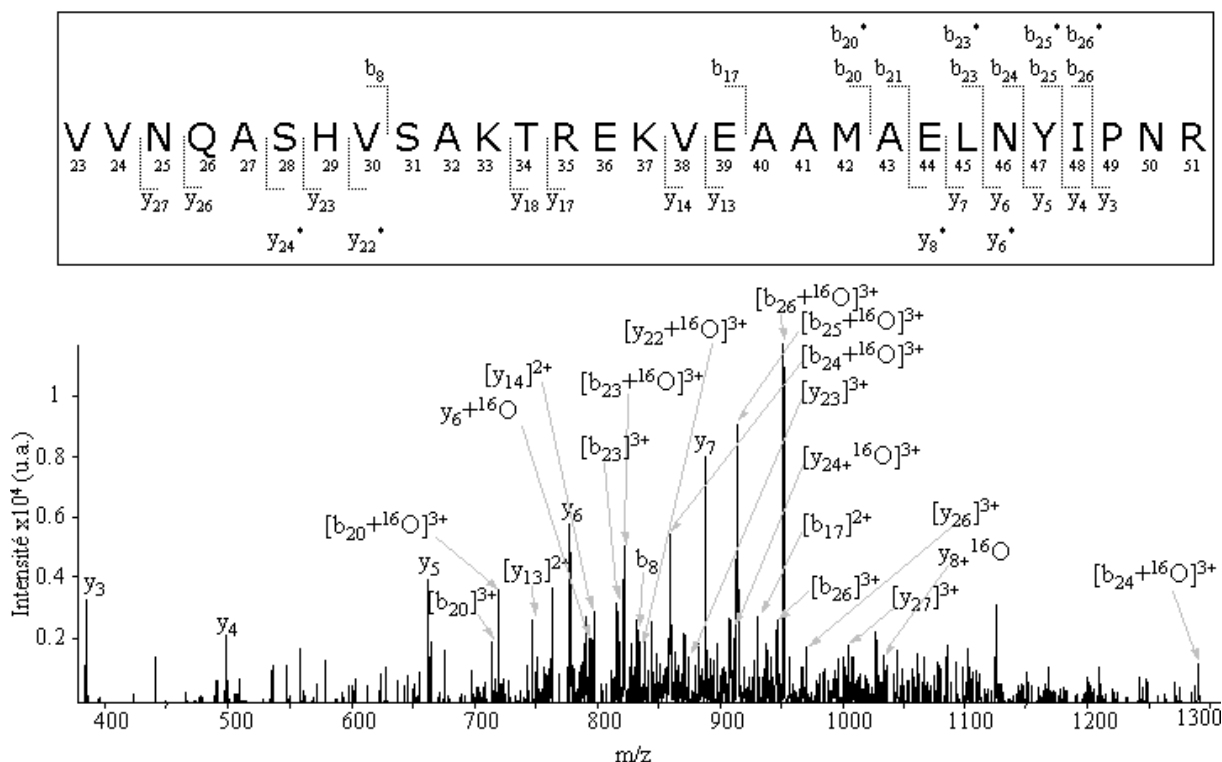


Figure 76. Spectre MS/MS ESI-IT obtenu par fragmentation du peptide Val23-Arg51, qui porte une oxydation et est chargé quatre fois (ion précurseur $m/z = 811.5$)

En ce qui concerne le peptide précurseur de m/z 3227.8 (peptide Val23-Arg51 qui porte une oxydation, voir Figure 76), l'échantillon est également un mélange de fragments oxydés.

Il semble que l'irradiation conduise à au-moins une oxydation sur la séquence C-terminale et notamment sur la séquence [N46-R51], comme le suggère le fragment y_6^* . De plus, la présence de b_{26} non oxydé tend à prouver qu'une oxydation est localisée sur les trois derniers résidus P49, N50 ou R51. D'autre part, la présence de b_{20}^* montre qu'une autre oxydation est présente sur la séquence [V23-M42]. La présence de y_{27} non oxydé est surprenante et laisse penser à une oxydation sur V_{23} ou V_{24} .

Les calculs montrent que, au sein de la séquence [Y47-R51], les résidus Tyr47 et Arg51 sont les plus réactifs vis-à-vis du radical hydroxyl, avec une plus grande probabilité de réaction pour Tyr47. Par comparaison avec l'analyse MS/MS, il est probable qu'une oxydation soit localisée sur Arg51, résultat qui n'est pas incompatible avec une oxydation de Tyr47. Comme supposé lors de l'analyse du fragment de m/z 1864.5 (voir ci-dessus), Met42 pourrait également être oxydée, ce qui est cohérent avec les fragments b_{20}^* et y_3-y_7 détectés.

En conclusion, l'analyse de la *headpiece* par spectrométrie de masse montre que cette dernière est bien oxydée sur plusieurs sites au cours de l'irradiation. La comparaison des calculs de probabilité de réaction entre les différents résidus et le radical hydroxyle avec les résultats de MALDI-TOF et de ESI-IT tendent à prouver que les résidus Met1 (ou Tyr7), Tyr12, Tyr17, Arg22, Met42, Tyr47 et Arg51 sont probablement endommagés au cours de l'irradiation. D'autre part, les calculs suggèrent une oxydation de His29 et Arg35, qui n'ont pas été visualisées par MALDI-TOF. Toutefois ces hypothèses doivent être confirmées, par exemple par des digestions supplémentaires à l'aide d'autres endoprotéinases et par l'analyse des espèces multi-oxydées par MS/MS.

1. 3. Effet de l'irradiation sur l'induction *in vitro* du système *lac* répresseur- *lac* opérateur

L'expression des gènes de l'opéron *lac* est sous la commande du répresseur et en absence de lactose, le répresseur tétramérique est fixé à sa séquence opératrice. Il a été montré que l'exposition de complexes spécifiques répresseur-opérateur à un rayonnement γ perturbe le processus de reconnaissance ADN-protéine, principalement via des dommages à la protéine.

Ce système est également sous le contrôle d'un inducteur : lorsque du lactose est présent dans le milieu, une petite partie de ce lactose est catalysée en allolactose ; cet inducteur naturel se fixe au répresseur et induit un changement de conformation de ce dernier qui diminue son affinité pour l'ADN. La question se pose maintenant de savoir si l'induction *in vitro* du système *lac* répresseur-*lac* opérateur est également perturbée sous irradiation et si oui, quels sont les dommages responsables de la perte d'induction.

Pour répondre à cette question, des complexes répresseur-opérateur ont été étudiés en absence et en présence d'un inducteur gratuit, l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). L'interaction entre le répresseur et cet inducteur a également été examinée.

1. 3. 1. Altération de l'induction

Afin de déterminer si l'induction du système *lac* répresseur-*lac* opérateur est perturbée sous irradiation, le répresseur irradié seul en solution (de 0 à 1000 Gy) est incubé avec un fragment d'ADN de 80 pb en absence (Figure 77A) et en présence de 5 mM d'IPTG (Figure 77B). Les complexes répresseur-ADN sont ensuite analysés par électrophorèse en gel retard.

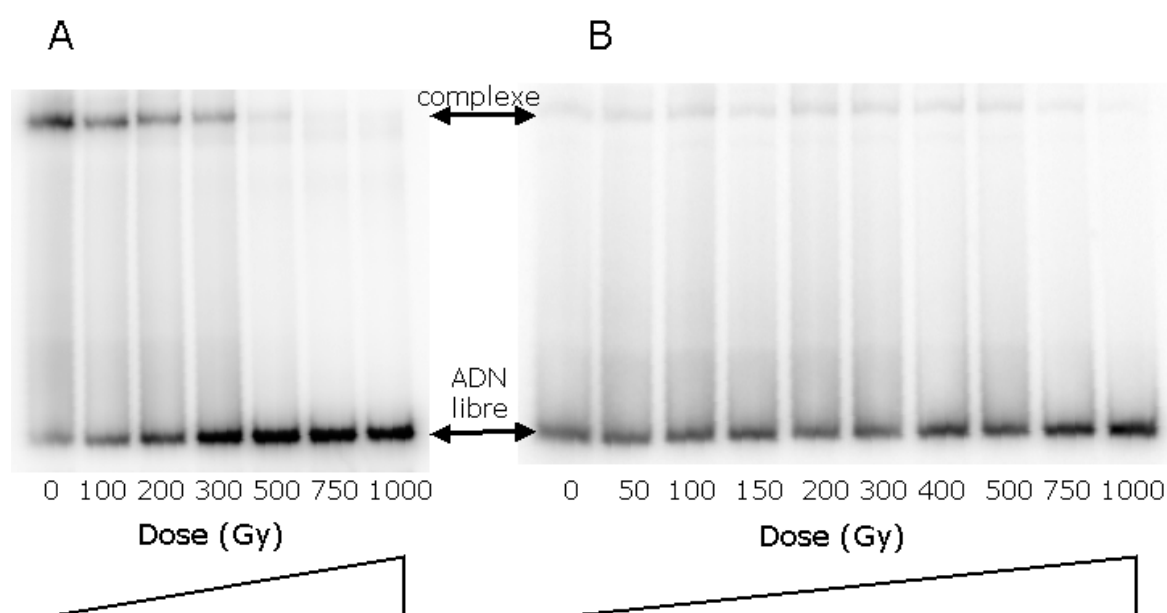


Figure 77. Gel retard montrant les complexes formés en incubant le répresseur irradié et le fragment d'ADN de 80 pb non irradié, en absence (A) ou en présence (B) de 5 mM IPTG.

Dans le cas du répresseur non irradié (premières pistes des gels A et B, Figure 77), l'ajout d'inducteur provoque une dissociation du complexe répresseur-opérateur qui se manifeste par une chute drastique de la quantité d'ADN en complexe en présence de 5mM IPTG. Compte-tenu de la constante d'affinité du répresseur pour l'IPTG (de l'ordre de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), des concentrations en protomères ($3.2 \text{ } \mu\text{M}$) et en IPTG (5 mM), tous les sites de fixation de l'inducteur sont supposés saturés et donc aucun complexe ne devrait être observé dans ces conditions. Il apparaît toutefois qu'une petite fraction d'ADN (3%) est fixée par le répresseur non irradié. Ce résultat surprenant peut être expliqué par la présence d'une fraction de répresseur non inductible, par exemple suite à l'oxydation des résidus Trp pendant la préparation de la protéine. Une deuxième explication possible serait une perturbation de l'induction dans le gel, entraînant un relargage non quantitatif de l'ADN.

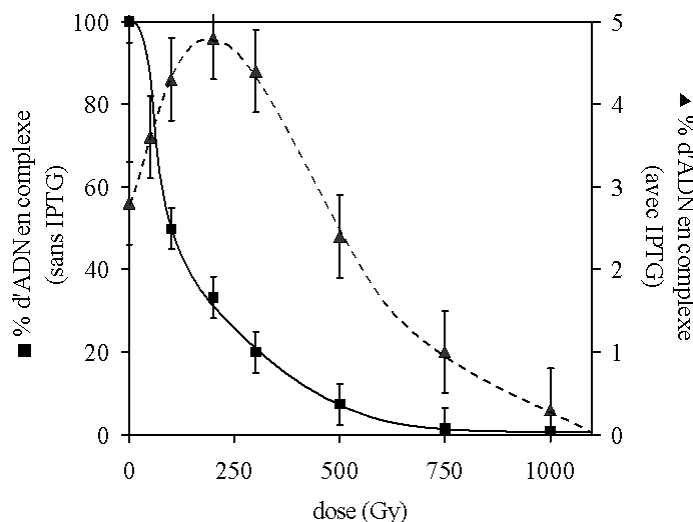


Figure 78. Evolution du pourcentage d'ADN en complexe au cours de l'irradiation en absence (carrés) ou en présence d'IPTG (triangles), comme déterminé par analyse des gels retard (moyenne de 3 et 4 expériences respectivement dans les conditions 0 et 5mM IPTG).

Comme démontré précédemment, la capacité de fixation du répresseur irradié à l'ADN, en absence d'IPTG, diminue lorsque la dose augmente.

En présence de 5 mM d'IPTG, la quantité d'ADN en complexe suit une courbe en cloche : elle augmente pour de faibles doses puis diminue à de plus hautes doses. Une extrapolation de ces résultats au rôle joué *in vivo* par le système répresseur-opérateur-inducteur semble montrer qu'aux doses auxquelles le répresseur irradié est toujours capable de se lier à l'ADN, l'induction commence à perdre son efficacité.

Ce dysfonctionnement de l'induction peut avoir deux origines. La première hypothèse suppose que le répresseur irradié perde sa capacité de fixation de l'IPTG. La deuxième est que le répresseur irradié soit toujours capable de fixer l'IPTG mais qu'une fois celui-ci fixé, la

transmission du signal allostérique du site de fixation de l'IPTG vers le site de fixation de l'ADN ne se fait plus correctement ; la fixation de l'IPTG n'entraîne alors pas de dissociation du complexe répresseur-ADN.

1. 3. 2. Diminution de l'affinité du répresseur irradié pour l'IPTG

Afin de mesurer la capacité du répresseur irradié à fixer l'inducteur, des expériences d'équilibre de dialyse ont été réalisées. Des solutions de répresseur irradié dans une gamme de dose de 0 à 1000 Gy sont dialysées contre un tampon 100 mM phosphate de potassium (pH 7.25), 0.5 μ M IPTG contenant du 14 C-IPTG. Après dialyse, les radioactivités de la solution de répresseur (intérieur du boudin de dialyse) et du tampon de dialyse (extérieur du boudin) sont comptées ; la fraction de protomères en complexe avec l'IPTG est calculée à partir de ces mesures de radioactivité.

La Figure 79 montre que le répresseur perd sa capacité de fixer l'IPTG au cours de l'irradiation. Une courbe exponentielle peut être superposée aux données expérimentales. L'équation de cette exponentielle est $F = \exp(-\lambda_1.D)$ où F est la fraction de protomères actifs vis-à-vis de l'IPTG, D la dose et $\lambda_1 = 0.00145 \text{ Gy}^{-1}$ le taux de destruction de la capacité de fixation de l'IPTG. Le coefficient de corrélation entre la courbe calculée et les données expérimentales est de 0.99.

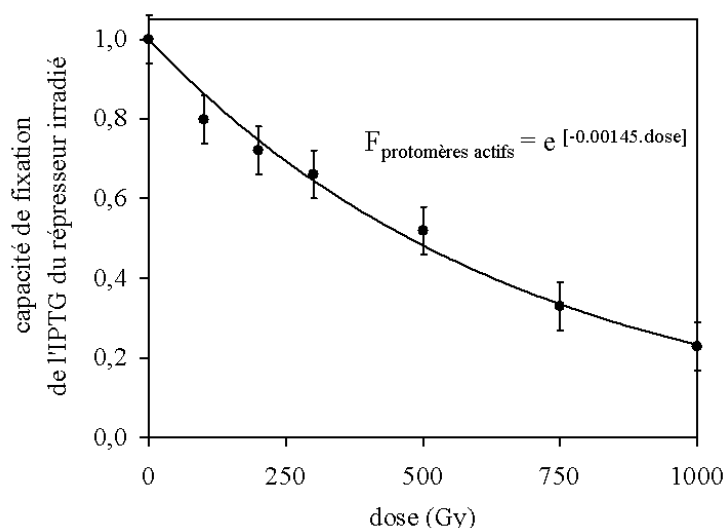


Figure 79. Capacité de fixation de l'IPTG au répresseur en fonction de la dose (coefficient de corrélation $R = 0.99$ entre la courbe exponentielle $F = \exp[-0.00145 \cdot \text{dose}]$ et les valeurs expérimentales ; moyenne de 3 expériences).

Le dysfonctionnement de l'induction est donc majoritairement dû à une perte d'affinité du répresseur pour l'IPTG et non à des perturbations de l'allostérie de la protéine.

1. 3. 3. Destruction du site IPTG

Si le répresseur n'est plus complètement actif, cela peut-être dû à :

- soit à une diminution de la constante d'affinité K , qui devient mK ($m < 1$), toutes les molécules restant actives vis-à-vis de l'IPTG
- soit à une baisse du nombre de sites de fixation, c'est à dire qu'une partie des protomères ne sont plus actifs et que R_a devient nR_a ($n < 1$), les protomères actifs gardant leur affinité pour l'IPTG intacte.

Afin de répondre à cette question, des expériences d'équilibre de dialyse du répresseur ont été réalisées contre des tampons de concentration variable en IPTG (2×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} , 1×10^{-7} et 5×10^{-8} M). La fraction de répresseur en complexe avec l'IPTG est appelée r , avec $r = C/R_a$. La représentation de r/I_{libre} en fonction de r est une droite dont la pente est $-mK$, et d'abscisse à l'origine n . Cette représentation est appelée « diagramme de Scatchard ».

$$\frac{r}{I_1} = mK(n - r)$$

[4]

Ces expériences ont été réalisées d'une part avec du répresseur natif et d'autre part avec du répresseur irradié (300 Gy).

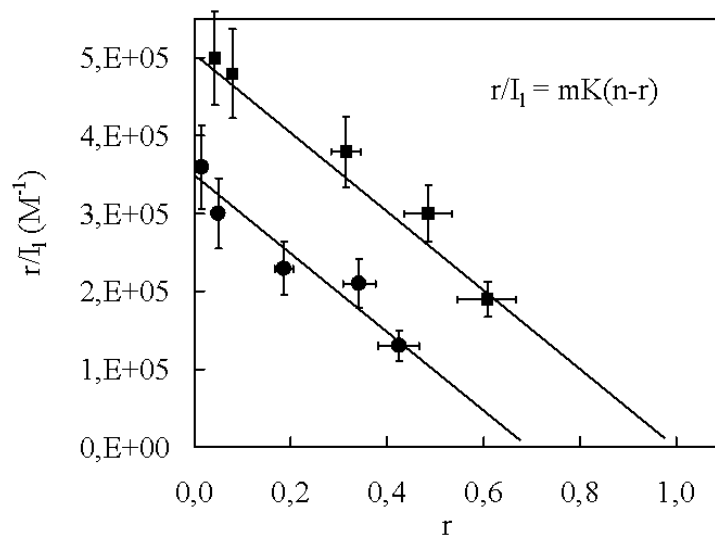


Figure 80. Diagramme de Scatchard de r en fonction de r/I_1 pour du répresseur natif (carrés) et irradié par une dose de 300 Gy (cercles) (moyenne de 2 expériences).

Les deux courbes obtenues sont linéaires et parallèles, c'est à dire de constantes d'affinité K (calculée d'après l'inverse de la pente) identiques et égales à $5 \times 10^5 M^{-1}$. Pour le répresseur natif, l'extrapolation de la droite donne $r = 1.0$, valeur attendue pour une protéine totalement active alors que dans le cas de la protéine irradiée, l'extrapolation donne $r = 0.7$. La

conclusion de cette expérience est donc que la constante d'affinité du répresseur pour l'IPTG ne varie pas au cours de l'irradiation mais que le nombre de sites de fixation diminue, ce qui explique la baisse de capacité de fixation de l'IPTG. Des résultats similaires avaient été observés pour du répresseur irradié par rayonnement ultra-violet [Charlier *et al.*, 1977].

L'échantillon de répresseur irradié comprend donc deux populations de protomères : des protomères intacts, c'est à dire actifs vis-à-vis de l'IPTG et des protomères dont le site IPTG a été totalement détruit.

Afin d'identifier les dommages responsables de la perte de fixation de l'inducteur, les acides aminés en contact ou proches de l'inducteur ont été examinés sur la structure cristalline du répresseur fixé à l'IPTG (structure PDB 1LBH). Parmi les acides aminés situés à moins de 0.45 nm de l'IPTG, certains sont très sensibles à l'attaque par les radicaux OH ; il s'agit notamment des résidus Trp220, Phe293, Arg101 et Arg197 (Figure 81). De plus, un deuxième résidu tryptophane, un peu plus éloigné, se trouve également dans le voisinage de l'IPTG. Ces résidus ont des constantes de réaction élevées avec les radicaux OH : $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le tryptophane, $6.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la phénylalanine et $3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour l'arginine. Les résidus tryptophane étant les plus réactifs vis-à-vis des radicaux OH, ils vont être plus particulièrement étudiés.

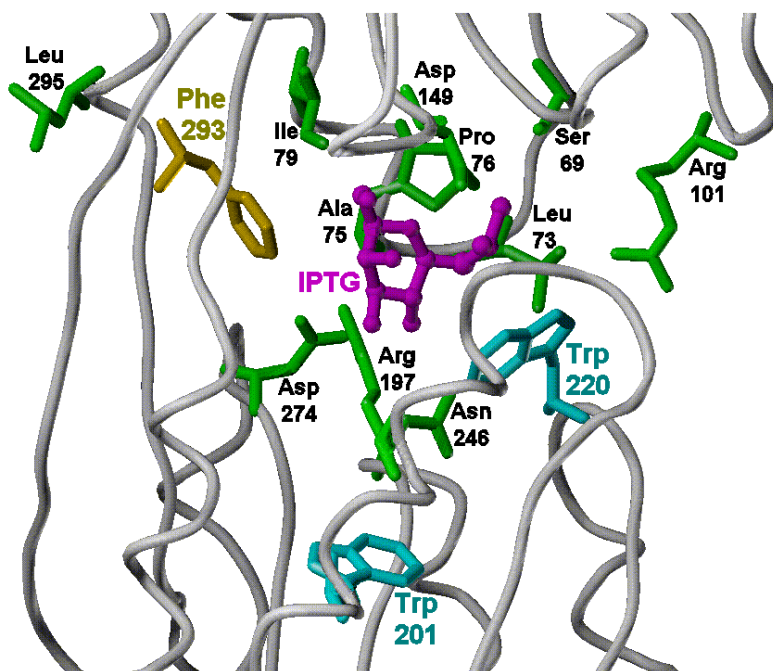


Figure 81. Représentation du site IPTG [d'après la structure PDB 1LBH de Lewis *et al.*, 1996]. Les résidus représentés en vert sont ceux situés à moins de 0.45 nm de la molécule d'IPTG. Les résidus phénylalanine et tryptophane sont représentés respectivement en jaune et en cyan. La molécule d'IPTG figure en mauve sur le dessin.

1. 3. 4. Endommagement des résidus Tryptophane

Les dommages causés aux résidus tryptophane (Trp201 et Trp220) lors de l'irradiation ont été suivis par mesure de la fluorescence intrinsèque du répresseur, principalement due à ces deux résidus. Le spectre d'émission de la protéine irradiée a été enregistré de 270 à 450 nm, la longueur d'onde d'excitation étant de 280 nm.

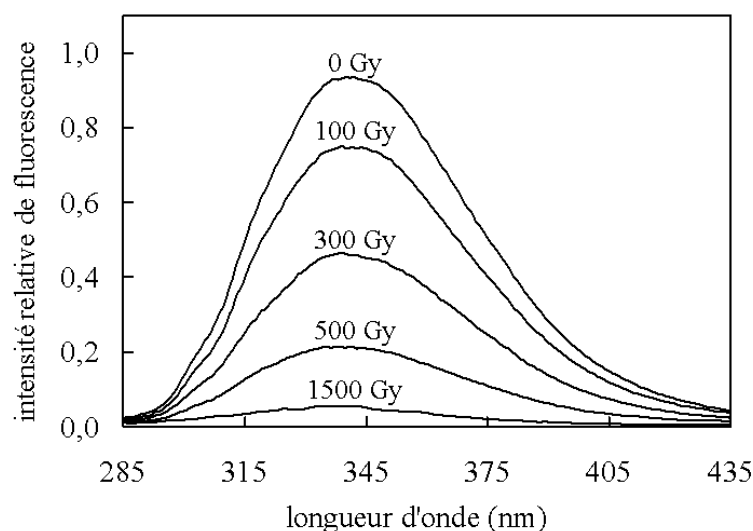


Figure 82. Evolution du spectre d'émission de fluorescence du répresseur irradié en fonction de la dose, exprimée en Gy sur chaque spectre (conditions expérimentales : 32 μ M en protomères, mesure de fluorescence à 25°C).

Comme montré à la Figure 82, la fluorescence de la protéine diminue au cours de l'irradiation sans qu'il n'y ait de modification dans la forme du spectre. Cette diminution montre que les noyaux indole des résidus Trp201 et Trp220 sont détruits. L'attaque de ces noyaux par les radicaux OH peut se faire via des additions sur le cycle benzénique ou sur la liaison C2=C3 et mener à la formation de N-formylkynurénine et d'hydroxytryptophanes.

Afin de déterminer si les deux résidus Trp sont endommagés à la même vitesse, l'intensité de fluorescence du répresseur a été mesurée en conditions dénaturantes. En effet, l'intensité de fluorescence du répresseur mesurée en conditions non dénaturantes est la somme des spectres d'émission de chaque résidu Trp pondérés par leur rendement quantique ; des transferts d'énergie peuvent se passer entre noyaux indols, ce qui complique l'analyse des résultats. En conditions dénaturantes (8M chlorure de guanidine), les résidus Trp présentent tous le même spectre avec un même rendement ; dans ces conditions, la fluorescence mesurée reflète le contenu en tryptophane de la protéine.

La comparaison des intensités de fluorescence relative du répresseur en conditions natives et dénaturantes (Figure 83) montre que les taux de destruction des deux résidus tryptophane

sont du même ordre de grandeur. Une même courbe exponentielle $I_F = I_{F0} \exp(-\lambda_{Trp} \cdot D)$ peut en effet être superposée aux deux séries de données, où I_F est l'intensité de fluorescence du répresseur irradié, I_{F0} l'intensité de fluorescence du répresseur non irradié, $\lambda_{Trp} = 0.00144 \text{ Gy}^{-1}$ le taux de dégradation du tryptophane et D la dose.

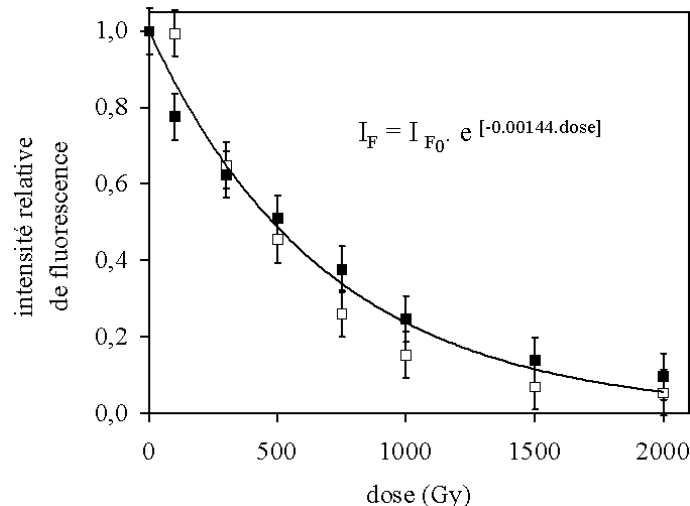


Figure 83. Diminution de l'intensité de fluorescence relative du répresseur en fonction de la dose en conditions natives (carrés noirs) et dénaturantes (carrés blancs) (moyenne de 3 expériences).

La Figure 84 montre que la destruction des résidus tryptophane est fortement corrélée à la perte de fixation de l'IPTG (coefficient de corrélation égal à 0.97). Ceci prouve le rôle joué par l'oxydation des résidus Trp dans la perte de fixation de l'IPTG.

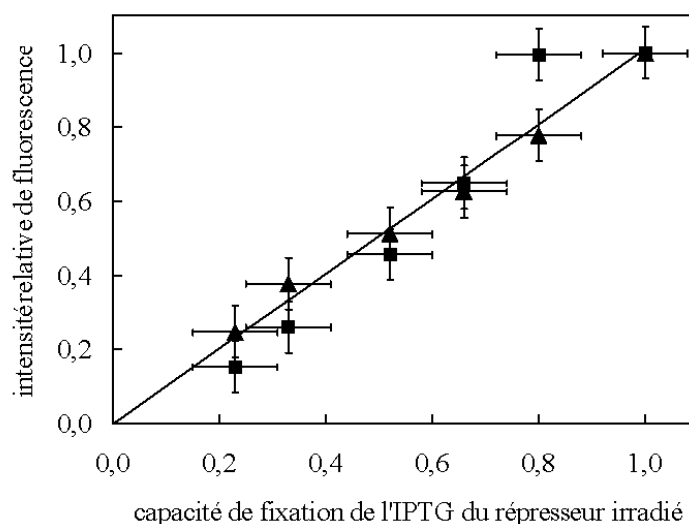


Figure 84. Corrélation entre la diminution de l'intensité relative de fluorescence et de la perte de fixation de l'IPTG du répresseur irradié.

Des dommages à d'autres acides aminés situés dans le site de fixation de l'IPTG, non détectés par fluorescence, peuvent également contribuer à la perte de la capacité de fixation de l'inducteur par le répresseur irradié. Par exemple, les résidus Phe293, Arg197 et Arg101

présentent des réactivités élevées avec OH $\cdot$. Ces réactivités demeurent cependant inférieures à celle des résidus Trp (deux fois pour la phénylalanine et quatre fois pour l'arginine) et seul Arg101 présente une accessibilité deux à trois fois supérieure à celle des résidus Trp et peut être endommagé à la même vitesse. Au vu de la très bonne corrélation observée à la Figure 84, il semble toutefois que la destruction radiolytique d'acides aminés autre que le tryptophane ne joue pas de rôle majeur dans la perte de la capacité de fixation à l'inducteur du répresseur irradié.

1. 3. 5. Protection par l'IPTG de son site de fixation

Puisque le répresseur est protégé par l'ADN opérateur lors de l'irradiation des complexes [Eon *et al.*, 2001], il est tout à fait possible que l'IPTG joue également un rôle de protecteur vis-à-vis de son site de fixation sur le répresseur.

Des solutions de répresseur ont donc été irradiées en absence et en présence de 10 μ M d'IPTG puis dialysées contre un tampon 100 mM phosphate de potassium (pH 7.25) pour éliminer l'IPTG irradié. Les solutions de répresseur irradié ont ensuite été dialysées toute la nuit contre un tampon (100 mM phosphate de potassium pH 7.25, 0.5 μ M IPTG contenant du 14 C-IPTG) non irradié. La fraction de protomères inductibles, c'est à dire fixant l'inducteur, a été calculée à partir des mesures de radioactivité, comme précédemment.

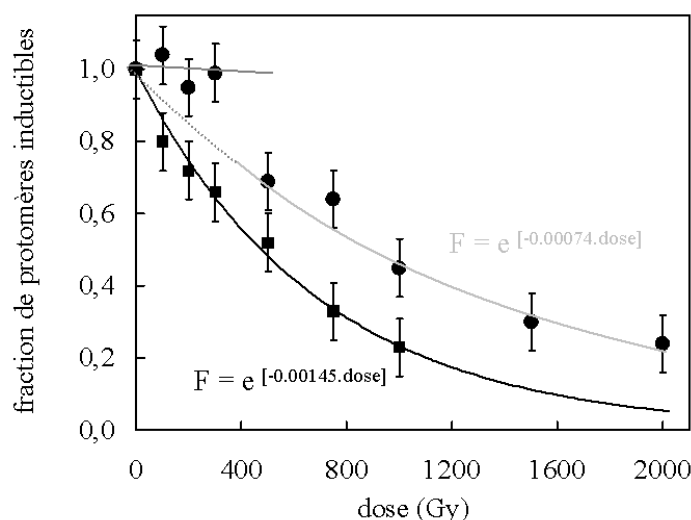


Figure 85. Fraction de protomères inductibles en fonction de la dose, après irradiation du répresseur en absence (carrés) et en présence de 10 μ M d'IPTG (cercles) (moyenne de 3 expériences).

Comme le montre la Figure 85, la perte de la capacité de fixation à l'inducteur du répresseur irradié en présence d'IPTG ne suit plus une simple courbe exponentielle :

- pour de faibles doses (< 400 Gy), le site de fixation de l'IPTG semble être efficacement protégé puisque le taux de fixation d'IPTG ne varie pas significativement. L'IPTG fixé au répresseur protège fortement son site de fixation.
- pour de plus hautes doses (> 400 Gy), la perte de fixation suit une courbe exponentielle. Le taux de destruction de la capacité de fixation de l'IPTG λ est de 0.00074 Gy^{-1} pour le répresseur irradié en présence de $10 \text{ }\mu\text{M}$ d'IPTG, soit la moitié de la valeur λ_1 obtenue pour le répresseur irradié seul. Cette perte de la capacité de fixation de l'inducteur deux fois plus lente en présence d'IPTG suggère que l'IPTG puisse agir comme un capteur de radicaux OH, ce qui se justifie par la structure même de ce galactoside.

1. 3. 6. Capture des radicaux par l'IPTG

La capacité de l'IPTG à réagir avec les radicaux hydroxyles a été testée par une méthode connue : l'induction de coupures simple brin (CSB) sur un plasmide. Le plasmide utilisé ici est le pBR22. Comme l'IPTG ne se fixe pas à l'ADN, seule la capacité de l'IPTG à réagir avec les radicaux OH en solution est observée.

La relaxation et la linéarisation du plasmide irradié permettent de déterminer des valeurs moyennes de coupures simple brin et double brin par plasmide et, par là même, le pouvoir *scavenger* de l'IPTG vis-à-vis de l'ADN, α_{ADN} .

Le système peut être décrit par les équations suivantes :



Dans ce schéma simplifié, les CSB et CDB sont considérées comme étant uniquement dues à l'attaque de l'ADN par les radicaux OH [6], ces radicaux pouvant être piégés par des impuretés [7] ou par un *scavenger* spécifique, l'IPTG dans ce cas-ci [8].

En présence d'ADN et de concentrations suffisantes d'IPTG, les effets de capture des radicaux dus aux impuretés et au tampon sont négligeables.

A l'équilibre :

$$\frac{d[\text{Coupure}]}{d\text{Dose}} = \frac{G_{\text{OH}} k_1 [\text{ADN}]}{k_1 [\text{ADN}] + k_3 [\text{IPTG}]} \quad [9]$$

L'ADN et l'IPTG étant peu endommagés dans la gamme de doses étudiée (0-10 Gy), leur concentration est considérée constante ; l'équation [5] peut alors être résolue comme une fonction linéaire :

$$\frac{d\text{Dose}}{d[\text{coupure}]} = \frac{1}{G_{\text{OH}}} + \frac{k_3}{G_{\text{OH}} k_1 [\text{ADN}]} [\text{IPTG}] = \frac{1}{G_{\text{OH}}} (1 + \alpha_{\text{ADN}} [\text{IPTG}]) \quad [10]$$

avec $\alpha_{\text{ADN}} = \frac{k_3}{k_1 [\text{ADN}]}$

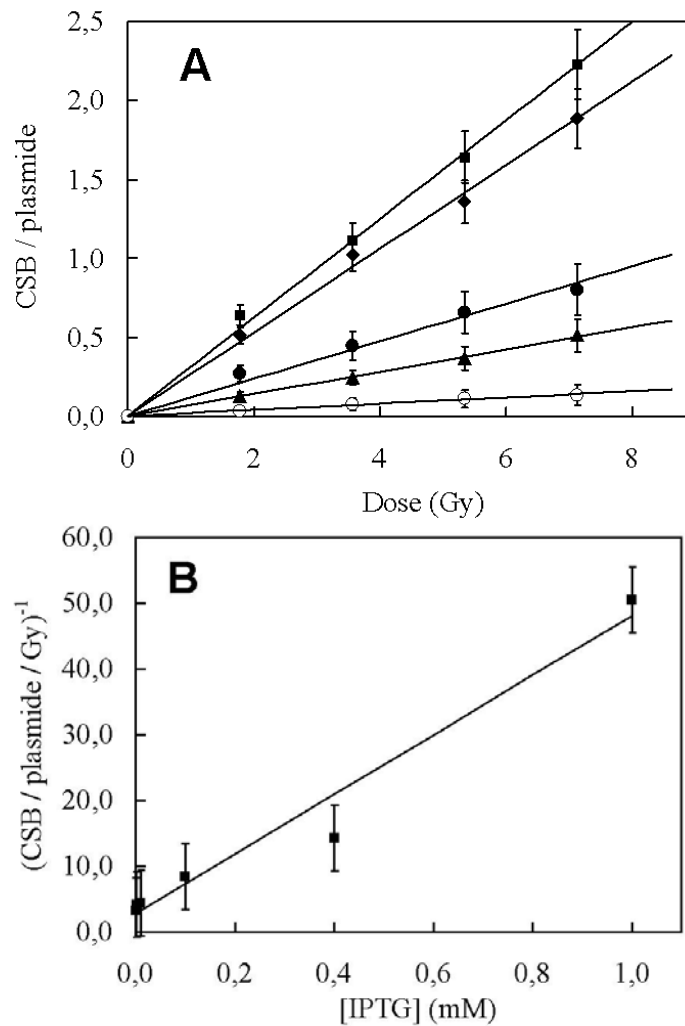


Figure 86. (A) Rendement en CSB en fonction de la dose, en présence de 10⁻³M (cercles blancs), 4 x 10⁻⁴M (triangles), 10⁻⁴M (cercles noirs), 10⁻⁵M (losanges) et 10⁻⁶M (carrés) IPTG. (B) Inverse des pentes des droites en fonction de la concentration en IPTG (moyenne de 3 expériences).

Des solutions d'ADN (20 ng/μl, soit 63 μM en désoxyribose) sont irradiées en présence de différentes concentrations d'IPTG (0, 10⁻³, 4 x 10⁻⁴, 10⁻⁴, 10⁻⁵ et 10⁻⁶M) dans une gamme

de doses de 0 à 10 Gy. Les courbes représentant le nombre de coupures par plasmide en fonction de la dose sont des droites (Figure 86) dont les pentes correspondent aux rendements en cassures par plasmide et par Gy. Le tracé des inverses des pentes en fonction de la concentration en IPTG est une droite. Le rapport r entre sa pente et son ordonnée à l'origine est égal à α_{ADN} .

Le pouvoir *scavenger* de l'IPTG déterminé graphiquement α_{ADN} est égal à $(1.6 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. La concentration en ADN étant de $63 \mu\text{M}$, l'IPTG est donc 100 fois plus efficace que les désoxyriboses de l'ADN pour capturer les radicaux OH, ce qui confirme l'hypothèse que l'IPTG est un bon scavenger.

Il faut noter que cette valeur α_{ADN} ne peut pas être directement appliquée à la capture des radicaux OH par rapport au répresseur. Cependant, α_{ADN} permet d'avoir un ordre de grandeur de $\alpha_{\text{répresseur}}$, paramètre qui sera ajusté pour obtenir une bonne adéquation entre le modèle et les valeurs expérimentales.

1. 3. 7. Destruction de l'IPTG par irradiation

Il a été montré que l'IPTG est un bon scavenger des radicaux OH. Si l'IPTG réagit avec les radicaux hydroxyles, il est fort probable qu'il soit endommagé au cours de cette réaction.

Des solutions de $10 \mu\text{M}$ d'IPTG contenant du ^{14}C -IPTG ont été irradiées dans une gamme de dose allant de 0 à 750 Gy. Les échantillons sont ensuite dilués jusqu'à une concentration de $0.5 \mu\text{M}$ en IPTG afin de réaliser des expériences d'équilibre de dialyse avec du répresseur non irradié. La fraction d'IPTG irradié toujours capable de se fixer au répresseur peut ainsi être calculée.

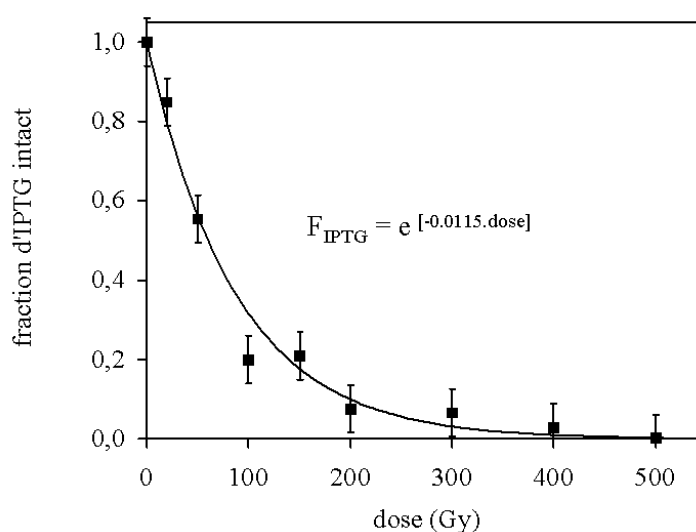


Figure 87. Fraction d'IPTG intact mesuré par équilibre de dialyse, en fonction de la dose, après irradiation de $10 \mu\text{M}$ d'IPTG (moyenne de 3 expériences).

La Figure 87 montre que la fraction d'IPTG intact F_{IPTG} diminue rapidement au cours de l'irradiation. Une courbe exponentielle peut être superposée aux valeurs expérimentales : $F_{\text{IPTG}} = e^{-\lambda_0 D}$ où D est la dose et $\lambda_0 = 0.0115 \text{ Gy}^{-1}$ le taux de dégradation de l'IPTG (coefficient de corrélation 0.90).

L'IPTG étant endommagé lors de l'irradiation, qu'en est-il de son pouvoir scavenger après irradiation à de fortes doses ? Afin de répondre à cette question, des solutions de 0.1 mM et 1mM IPTG ont été irradiées dans une gamme de dose de 0 à 750 Gy et le pouvoir scavenger de l'IPTG irradié est déterminé comme précédemment. Bien que l'IPTG irradié ne soit plus capable de se fixer au répresseur, il apparaît de cette expérience que celui-ci garde le même pouvoir scavenger que l'IPTG non irradié.

1. 3. 8. Modèle général de radiolyse du répresseur en présence d'IPTG

La courbe expérimentale montrée à la Figure 85 peut être expliquée comme suit.

A de faibles doses, les molécules d'IPTG intact occupent leur site de fixation sur les protomères et le protègent donc de la radiolyse. Dans cette gamme de doses, les points expérimentaux sont situés sur une droite quasi horizontale, signe que les sites de fixation de l'inducteur dans la population de protomères ne sont pratiquement pas endommagés.

A de plus hautes doses, l'IPTG endommagé ne se fixe plus sur son site et celui-ci est alors détruit avec un taux inférieur à celui du répresseur irradié seul puisque l'IPTG endommagé possède toujours la propriété de piéger les radicaux OH.

Le système peut être décrit par les équations suivantes :



L'inactivation du site de fixation de l'inducteur est dû à l'attaque de ce site par les radicaux OH [13]. D'autre part, les radicaux peuvent également attaquer d'autres sites de la protéine [14] ou être piégés par l'IPTG présent en solution [12]. Les effets de capture par les impuretés sont considérés ici comme étant négligeables.

De ces équations, il apparaît que :

$$\frac{d[\text{SiteIPTG}]}{[\text{SiteIPTG}]} = - \frac{G_{OH} k_4}{\sum k_i [\text{Protéine}] + k_3 [\text{IPTG}]} dDose \quad [14]$$

Lorsque le répresseur est irradié en absence d'IPTG, la fraction de protomères intacts est:

$$F = e^{-\lambda_1 D} \quad \text{où} \quad \lambda_1 = \frac{G_{OH} k_4}{\sum k_i [\text{Protéine}]}$$

En présence d'IPTG, l'inducteur *scavenge* les radicaux hydroxyles et l'équation peut être réécrite :

$$\frac{d[\text{siteIPTG}]}{[\text{siteIPTG}]} = - \frac{\lambda_1}{1 + \alpha_{rep} \cdot [\text{IPTG}]} \cdot dDose \quad [15]$$

$$F = e^{-\lambda'_1 D} \quad \text{où} \quad \lambda'_1 = \frac{G_{OH} k_4}{\sum k_i [\text{Protéine}] + k_3 [\text{IPTG}]} \quad \text{ou encore} \quad \lambda'_1 = \frac{\lambda_1}{1 + \alpha [\text{IPTG}]}$$

Une partie de l'IPTG présent en solution est fixée au répresseur, sur son site de fixation. Les sites occupés par l'IPTG sont protégés des radicaux OH par deux mécanismes : par capture des radicaux hydroxyles, tout comme pour les molécules d'IPTG libres en solution et par masquage des sites, c'est-à-dire par réduction de leur accessibilité. Le taux de destruction des sites occupés par une molécule d'inducteur est donc $\lambda_2 = \lambda'_1 / FP$, où FP, le facteur de protection, est un paramètre ajustable.

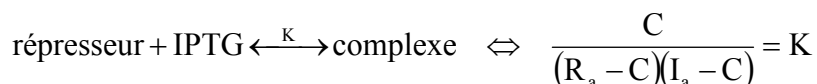
En résumé, la concentration en sites IPTG intact varie en fonction de la dose. Cette variation peut être exprimée comme la somme de deux termes. Le premier, $[\lambda'_1 (R_a - c)]$, concerne la destruction des sites non occupés par l'inducteur avec un taux λ'_1 et le second, $[\lambda'_2 c]$, concerne la destruction des sites occupés par l'IPTG avec un taux λ'_2 . L'équation différentielle donnant R_a en fonction de la dose est donc la suivante :

$$-\frac{dR_a}{dDose} = \lambda'_1 (R_a - c) + \lambda'_2 c \quad [16]$$

où est R_a et c sont les concentrations respectives en protomères actifs et en complexe répresseur-inducteur.

Cette équation différentielle peut être résolue numériquement en considérant que :

1. La concentration en IPTG intact varie en fonction de la dose : $F_{IPTG} = e^{-(0.0115 \cdot dose)}$.
2. La formation du complexe répresseur-opérateur obéit à la loi :



La constante d'affinité K calculée d'après le diagramme de Scatchard est égale à $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. La concentration en complexe peut ainsi être calculée pour chaque dose, c'est à dire pour chaque concentration en IPTG intact.

3. L'IPTG et son/ses produit(s) de dégradation ont le même pouvoir *scavenger*.
4. Les paramètres α_{REP} et FP sont ajustés pour obtenir la meilleure adéquation avec les valeurs expérimentales.

La Figure 88 montre que l'introduction des valeurs $\alpha_{\text{rep}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ et $\text{FP} > 20$ donne une courbe qui s'ajuste bien aux données expérimentales. Cette figure permet également de vérifier que le pouvoir *scavenger* de l'IPTG est constant au cours de l'irradiation puisque l'ajustement de la courbe calculée dans ce cas (courbe pleine) est meilleure que lorsque le produit de dégradation de l'IPTG est considéré comme non *scavenger* (courbe en pointillé).

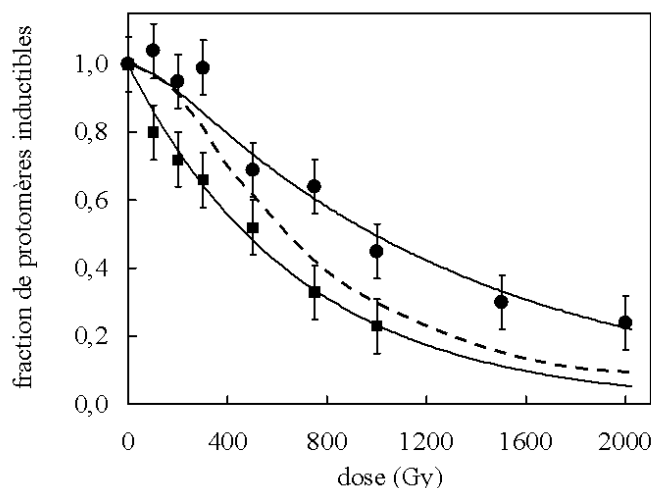


Figure 88. Fraction de protomères actifs en fonction de la dose après irradiation du répresseur en absence (carrés) et en présence de $10 \mu\text{M}$ d'IPTG (cercles). Les courbes pleines correspondent à la résolution de l'équation [7]. La courbe en pointillé correspond à la résolution de l'équation [7] en considérant que l'IPTG irradié ne scavenge plus les radicaux hydroxyles.

1. 3. 9. Modèle: dysfonctionnement du système lac répresseur-lac opérateur après irradiation

Comme montré à la Figure 78, l'irradiation du répresseur provoque un dysfonctionnement de l'induction par l'IPTG du système *lac* répresseur-*lac* opérateur. La fraction d'ADN en complexe, après irradiation du répresseur, dépend de la fraction de tétramères toujours inductibles. Afin d'expliquer les données expérimentales, le nombre de tétramères inductibles doit donc être déterminé en fonction de la dose. Ces valeurs peuvent être calculées à partir du nombre de protomères inductibles.

Les protomères inductibles sont définis ici comme des protomères dont le site IPTG est intact ; lorsque l'IPTG est fixé, ces protomères sont considérés incapables de fixer la demi-séquence opératrice. Des tétramères inductibles sont des molécules de répresseur capables de fixer suffisamment de molécules d'IPTG pour être incapables de fixer l'ADN.

Un tétramère contenant i protomères inductibles peut adopter C_4^i configurations différentes et seules certaines de ces configurations mènent à des tétramères inductibles. Pour calculer la fraction S_c de tétramères inductibles, deux hypothèses sont envisagées:

- a – la fixation d'une molécule d'IPTG par dimère est suffisante pour empêcher la fixation de ce dimère à l'opérateur.
- b – deux molécules d'IPTG par dimère, soit une par protomère, sont nécessaires pour empêcher la fixation du dimère à l'ADN.

Soit P_p et P_t respectivement les fractions de protomères et de tétramères inductibles. Alors :

$$P_t = \sum_{i=1}^{i=4} S_c C_4^i [P_p]^i (1 - P_p)^{(4-i)} \quad [17]$$

i	Tétramère	C_4^i	S_c
4		1	1
3	   	4	a : 1 b : 1/2
2	 	2	1/2
	   	4	a : 1 b : 0
1	   	4	a : 1/2 b : 0
0		1	0

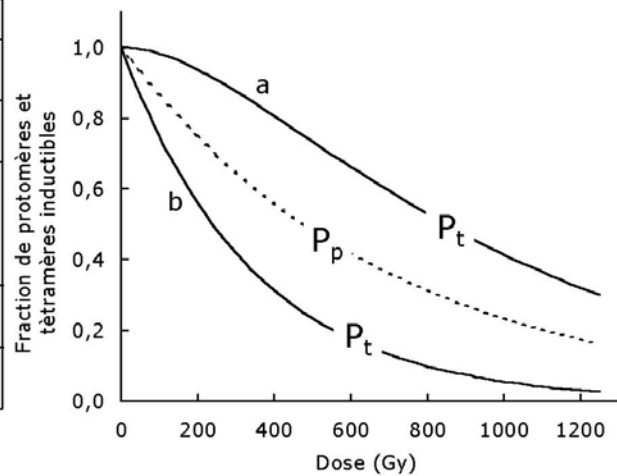


Figure 89. Représentation des différents types de tétramères contenant i protomères intacts (rectangles blancs). Dans la colonne S_c , la distinction est faite entre les cas a et b (deux hypothèses envisagées, voir texte ci-dessus). Lorsque les tétramères sont formés d'un dimère inductible et d'un dimère non-inductible, la valeur de S_c est $\frac{1}{2}$ à cause de l'indépendance de l'attaque radicalaire sur les deux domaines et l'égale probabilité de fixer l'opérateur sur les deux dimères.

La fraction de tétramères inductibles en fonction de la dose est calculée, pour les hypothèses a et b, à partir de l'équation [17] (voir Figure 89). Cette courbe est obtenue en considérant que la variation de protomères inductibles suit une loi exponentielle.

La courbe calculée représentée à la Figure 90 est la convolution de l'activité du répresseur irradié vis-à-vis de l'ADN (voir Figure 78) et de la fraction de tétramères non-inductibles dans les cas a et b ; cette courbe correspond donc à la fraction de tétramères toujours capables de se fixer à l'ADN mais n'étant plus induits par l'IPTG. Dans les deux cas considérés, les courbes calculées présentent une forme et une amplitude similaires aux valeurs expérimentales.

Il semble donc qu'une seule molécule d'inducteur soit nécessaire pour empêcher la fixation d'un dimère à l'opérateur. Les travaux de dynamique moléculaire de Flynn *et al.* (2003) ont montré que la fixation d'une molécule d'IPTG entraîne la propagation du signal allostérique du site de fixation de l'inducteur jusqu'au domaine de fixation de l'ADN, et ce au niveau des deux monomères du dimère ; ceci porte également à croire que la fixation d'une seule molécule d'inducteur est suffisante pour empêcher la fixation du dimère à l'ADN.

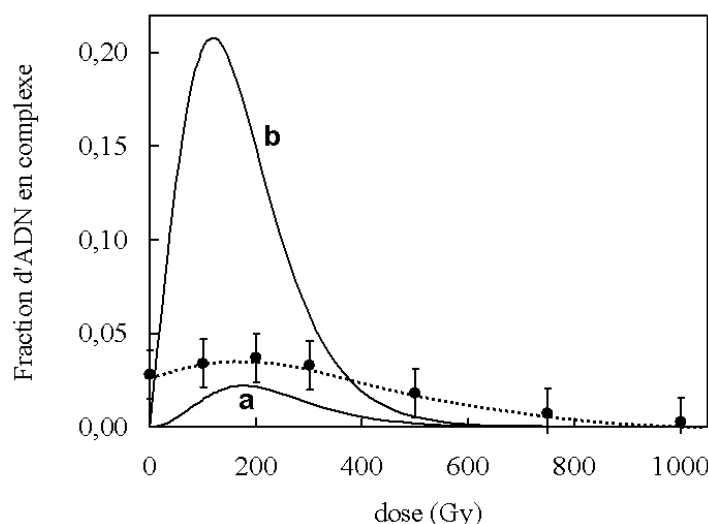


Figure 90. Fraction de complexe ADN-répresseur irradié en présence de 5 mM d'IPTG en fonction de la dose: valeurs expérimentales (cercles) et calculées (lignes continues a et b).

2. La protéine Fpg

2. 1. Etude d'un mutant : P1G-L/Fpg

La formamidopyrimidine-ADN glycosylase (ou Fpg) est une enzyme de réparation de l'ADN, comme cela a été rappelé précédemment. Afin de déterminer si l'exposition de ce système de réparation aux radiations ionisantes perturbe la reconnaissance des lésions par Fpg, le complexe formé par le mutant P1G-Fpg de *Lactococcus lactis* et le site 1,3-propanediol a été étudié.

2. 1. 1. Effet de l'irradiation sur la complexation de P1G-L/Fpg à un ADN portant une lésion

Le complexe étudié est donc formé du mutant P1G-Fpg de *Lactococcus lactis* et d'un site 1,3-propanediol. P1G-Fpg est une protéine de type « mutant inactif » obtenue en substituant le résidu Pro1 par une glycine [Serre *et al.*, 2002] : cette protéine mutante conserve sa capacité de se fixer spécifiquement à ses substrats mais a perdu son activité enzymatique. Elle a l'avantage d'être plus stable que la forme sauvage et montre la même affinité que cette dernière vis-à-vis de l'ADN. Ce type de protéine permet donc d'étudier la fixation de Fpg sur des substrats « vrais ». Toutefois, pour des raisons de disponibilité de substrats, le substrat utilisé lors de cette étude est un analogue de substrat de haute affinité, le 1,3-propanediol. Ce site est placé au centre d'un fragment d'ADN double brin de 59 pb.

Dans un premier temps, le complexe Fpg-ADN a été irradié dans une gamme de doses allant de 0 à 750 Gy puis les échantillons sont analysés par électrophorèse en gel retard. Comme le montre la Figure 91, la proportion d'ADN en complexe diminue rapidement au cours de l'irradiation.

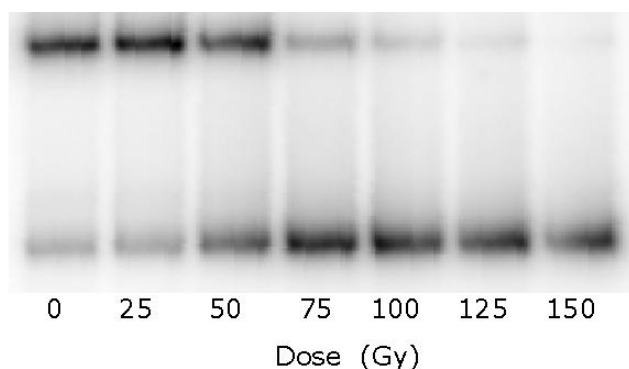


Figure 91. Gel retard : analyse des complexes entre un fragment de 59 pb portant le site 1,3-Pr (50 nM) et la protéine P1G-Fpg (0.4 μ M) après irradiation de ces complexes (doses : 0, 25, 50, 75, 100, 125 et 150 Gy).

Il a été montré que, dans le cas du répresseur de l'opéron lactose, les dommages responsables de la disparition du complexe lors de l'irradiation de celui-ci sont ceux portés par la protéine plutôt que ceux portés par l'ADN. Afin de vérifier si le même phénomène se passe pour le système Fpg, les deux partenaires du complexe ont été irradiés séparément.

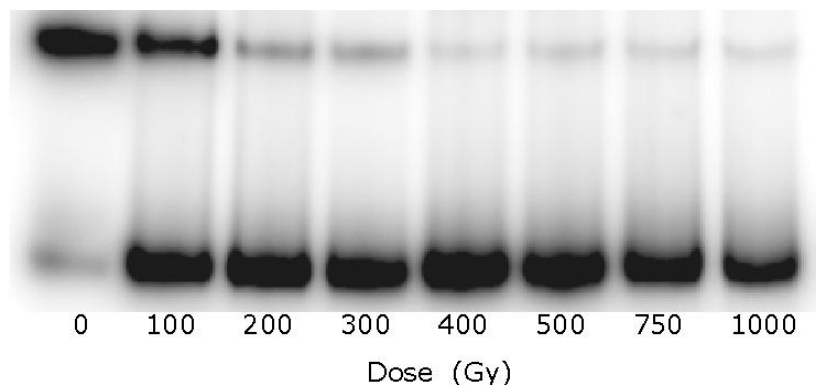


Figure 92. Gel retard : analyse des complexes entre un fragment d'ADN non irradié de 59 pb portant le site 1,3-Pr (50 nM) et la protéine P1G-Fpg irradiée (0.4 μ M) (doses : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 750 et 1000 Gy).

Lorsque la protéine est irradiée seule, dans une gamme de doses de 0 à 1000 Gy, puis est incubée avec le fragment d'ADN non-irradié, il apparaît que l'intensité de la bande correspondant au complexe diminue brutalement avec la dose d'irradiation (voir Figure 92).

Lorsque l'ADN est irradié seul (0 à 750 Gy) puis est incubé avec la protéine non-irradiée, la bande correspondant au complexe diminue également avec la dose, mais beaucoup plus faiblement.

Ces trois expériences -l'irradiation du complexe, de la protéine et de l'ADN seuls- ont été réalisées en marquant soit le brin d'ADN porteur du site Pr, soit le brin complémentaire : des résultats identiques ont été obtenus dans les deux cas.

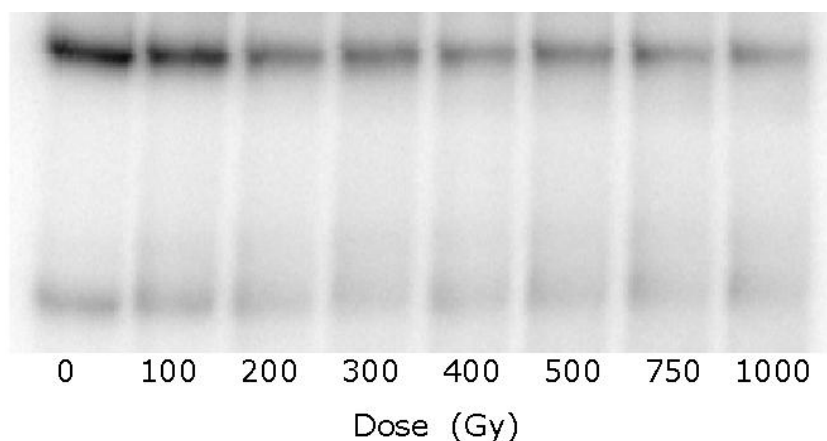


Figure 93. Gel retard : analyse des complexes entre un fragment d'ADN irradié de 59 pb portant le site 1,3-Pr (50 nM) et la protéine P1G-Fpg non irradiée (0.4 μ M) (doses : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 750 et 1000 Gy).

De plus hautes doses sont donc nécessaires pour détruire le complexe que pour détruire la capacité de fixation à l'ADN de la protéine irradiée (voir Figure 94). De plus, de très hautes doses sont nécessaires pour diminuer l'affinité de l'ADN irradié pour la protéine non-irradiée. En conclusion, tout comme pour le système de l'opéron lactose, ce sont les dommages à la protéine Fpg qui sont critiques dans la disparition du complexe et la protéine en complexe est partiellement protégée des effets délétères de l'irradiation par l'ADN.

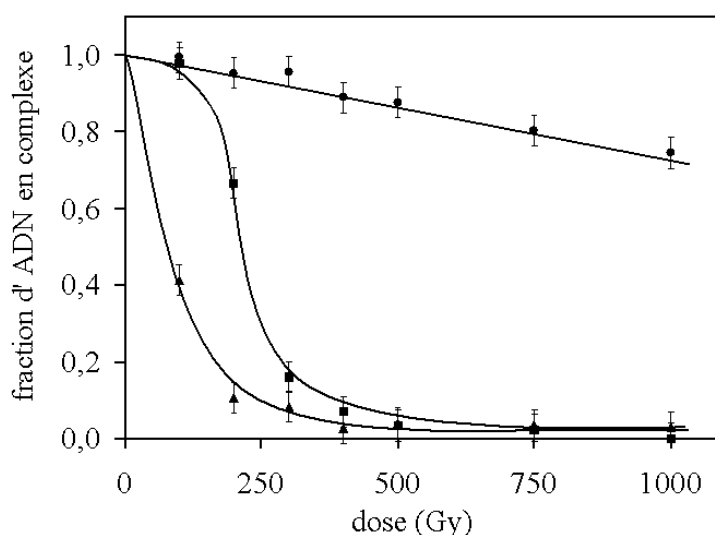


Figure 94. Fraction d'ADN complexé à la protéine Fpg après irradiation de la protéine libre (triangles), des complexes (cercles) et de l'ADN libre (carrés) comme déterminé par analyse des gels retard (moyenne de 3 expériences pour chaque cas).

Afin de déterminer pourquoi l'ADN irradié est moins bien reconnu par la protéine Fpg non irradiée, l'état du double brin d'ADN a été examiné par électrophorèse en gel dénaturant. Le pourcentage d'ADN intact, c'est à dire ne portant aucune coupure, diminue avec la dose. En comparant la proportion d'ADN intact à celle toujours capable de se fixer à la protéine non irradiée (Figure 95), il apparaît qu'alors que l'ADN présente des lésions (cassures simple brin), il est toujours fixé par Fpg. Ceci peut être expliqué par la petite taille des régions de l'ADN impliquées dans la fixation (5 ou 6 nucléotides autour du propanediol et un seul nucléotide, le C situé face au Pr, sur le brin complémentaire). De plus, puisque l'irradiation de l'ADN endommage celui-ci, certaines lésions peuvent être reconnues par Fpg et ainsi augmenter le taux de fixation de l'enzyme à l'ADN.

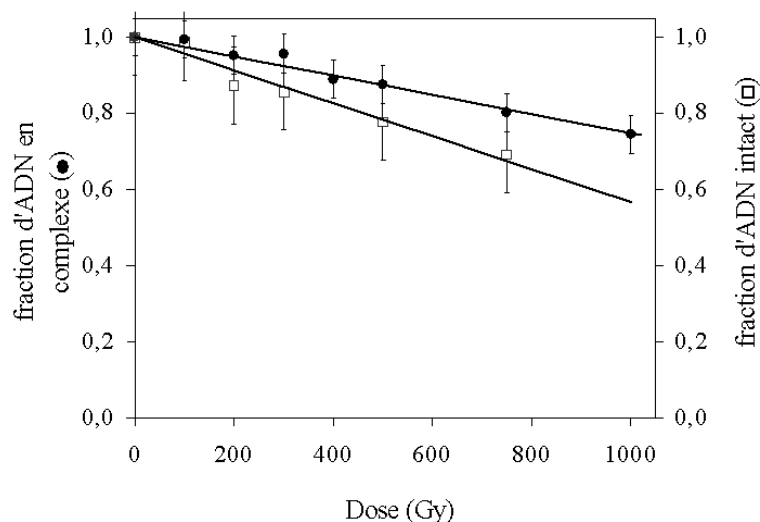


Figure 95. Fraction d'ADN irradié libre toujours capable de fixer la protéine Fpg non irradiée (cercles noirs) comparée à la proportion d'ADN irradié libre intact -c'est-à-dire ne présentant aucune cassure simple brin - après irradiation (carrés blancs) (moyenne de 3 expériences).

Comme cela a été souligné par Eon *et al.* (2001), les coupures de chaîne ne sont pas les dommages critiques mais ce sont les modifications des chaînes latérales des acides aminés qui jouent un rôle fondamental dans la perte de capacité de fixation du répresseur à l'ADN. Afin de comprendre l'origine de la perte de la capacité de fixation de la protéine Fpg irradiée à l'ADN, l'intégrité de la chaîne peptidique a été étudiée par SDS-PAGE.

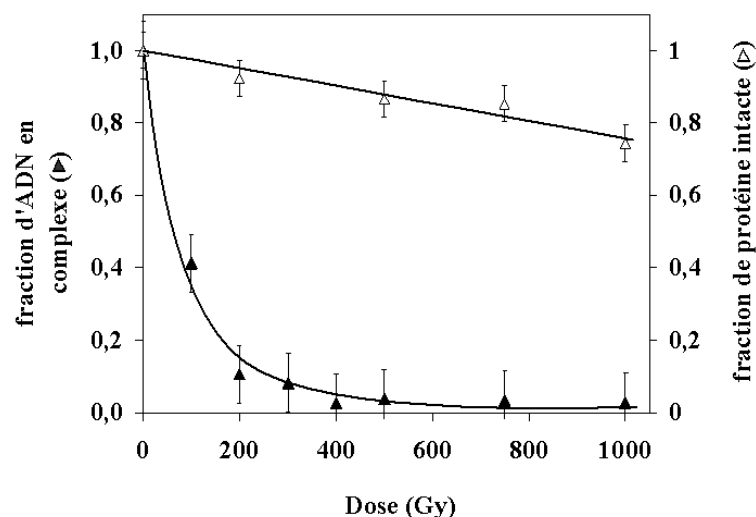


Figure 96. Fraction de protéine Fpg irradiée libre ne présentant pas de cassures de la chaîne peptidique (triangles noirs) comparée à la proportion d'ADN non irradié fixant toujours la protéine Fpg irradiée libre (triangles blancs) (moyenne de 3 expériences).

La Figure 96 montre que la fraction de protéine intacte diminue légèrement au cours de l'irradiation. La comparaison de ces résultats avec la perte de la capacité de fixation à l'ADN confirme que les cassures de la chaîne peptidique n'expliquent pas entièrement l'inactivation de Fpg. En plus des coupures de chaîne, la protéine porte également des dommages sur les

chaînes latérales de ses acides aminés. Bien que ces dommages ne puissent pas être quantifiés expérimentalement, le modèle RADACK développé par Marie Begusova à l'Institut de Physique Nucléaire (Prague, République Tchèque) permet d'évaluer les probabilités relatives de réaction entre le radical OH et les atomes d'hydrogène des acides aminés (voir précédemment).

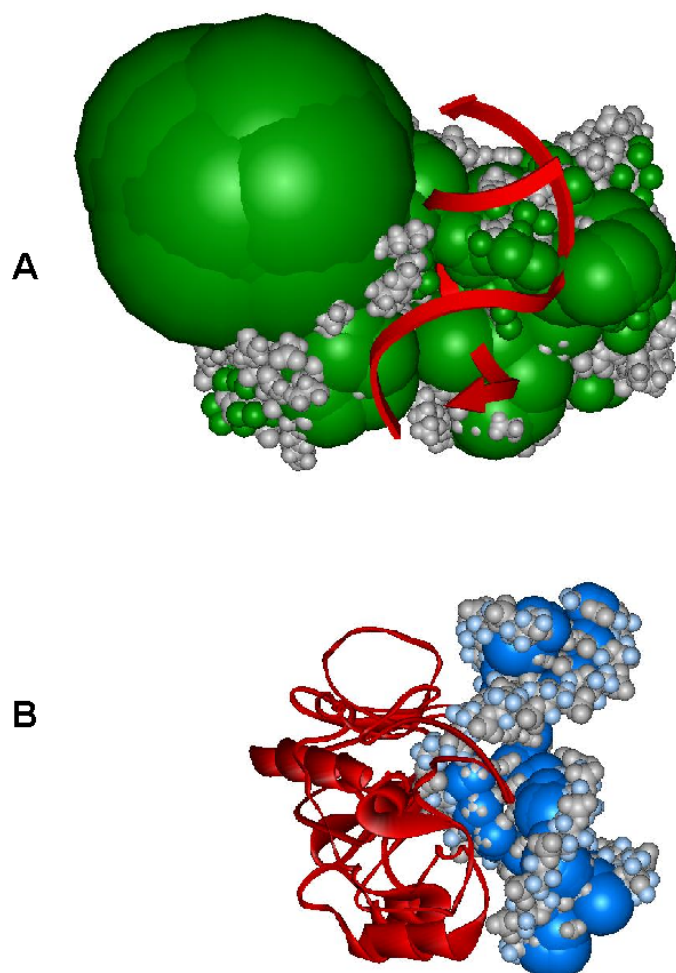


Figure 97. Complexe entre la protéine Fpg de *Lactococcus lactis* et un duplex d'ADN portant un site propanediol représenté avec des sphères de Smoluchowski pour les atomes réactifs et des sphères de Van der Waals pour les autres atomes. (A) Représentation de la protéine (en vert et gris) et du squelette de l'ADN (ruban rouge). (B) Représentation de l'ADN (en bleu et gris) et du squelette peptidique de Fpg (ruban rouge)

Les calculs montrent que sur l'ensemble des réactions entre le radical et la protéine, 81% impliquent les chaînes latérales et seulement 19% des radicaux réagissent avec l'hydrogène α de la chaîne peptidique. Ce sont donc très probablement les dommages aux chaînes latérales qui sont responsables de l'inactivation de Fpg.

D'autre part, certains acides aminés présentent des probabilités plus élevées que d'autres d'être endommagés lors de la radiolyse. D'après les calculs, c'est le cas de certains résidus impliqués dans la fixation à l'ADN. Des dommages causés à ces acides aminés peuvent

empêcher la fixation de la protéine à son substrat, soit directement en modifiant les interactions ADN-protéine, soit via des changements de conformation de la protéine.

A partir de structures cristallographiques, plusieurs éléments structuraux de Fpg ont été identifiés comme étant impliqués dans la fixation des substrats d'ADN. Par exemple, la triade Met75-Arg109-Phe111 s'insère dans le trou laissé dans la double hélice d'ADN par l'exclusion de la base endomagée. Cette étape est essentielle pour la fixation de l'ADN et pour l'activité enzymatique qui s'en suit. D'autre part, Tyr238 interagit directement avec le phosphate en 5' de la lésion alors que, dans le doigt de zinc, Lys256 et Arg260 stabilisent le site Pr dans sa conformation « expulsée ».

Bien que les résidus Cys245, Cys248, Cys265 et Cys268 du doigt de zinc ne soient pas impliqués directement dans la fixation de l'ADN, leur destruction, hautement probable compte tenu de leur réactivité élevée vis-à-vis des radicaux hydroxyles, a pour conséquence la perte du zinc endogène et la déstructuration du motif, ce qui peut conduire en final à la perte de la capacité de fixation à l'ADN.

Protection de la protéine par l'ADN

La Figure 98 montre les probabilités relatives de réaction entre le radical hydroxyle et les acides aminés de la protéine Fpg libre ou en complexe avec l'ADN. Une première observation est que les probabilités de réaction des acides aminés en contact avec l'ADN diminuent lorsque la protéine est fixée à son substrat, ce qui n'est pas le cas pour les autres résidus (voir Figure 98). Ainsi, les probabilités de réaction de OH[•] avec les résidus Phe111, Arg260, His91 diminuent respectivement de 95%, 70% et 66% alors que d'autres acides aminés situés loin du site de fixation de l'enzyme ne sont pas protégés de la radiolyse.

De plus, les chaînes latérales de Fpg sont protégées plus efficacement que la chaîne peptidique puisqu'elles sont en contact étroit avec l'ADN. D'une manière globale, le ratio entre les réactions impliquant H_α et celles impliquant les chaînes latérales de Fpg passe de 19:81 pour la protéine irradiée libre à 21:79 pour la protéine irradiée en complexe. La protection des chaînes latérales est particulièrement visible pour certains résidus (voir Figure 98).

Il a été montré [Serre *et al.*, 2002] que la conformation de la protéine Fpg ne change pas suite à la fixation de l'ADN. La protection observée est donc due uniquement à un masquage de la protéine par l'ADN. Ce masquage est à la fois stérique, puisque la fixation de l'ADN diminue l'accessibilité des sites de la protéine aux radicaux, et chimique, puisque l'ADN réagit lui-même avec OH[•].

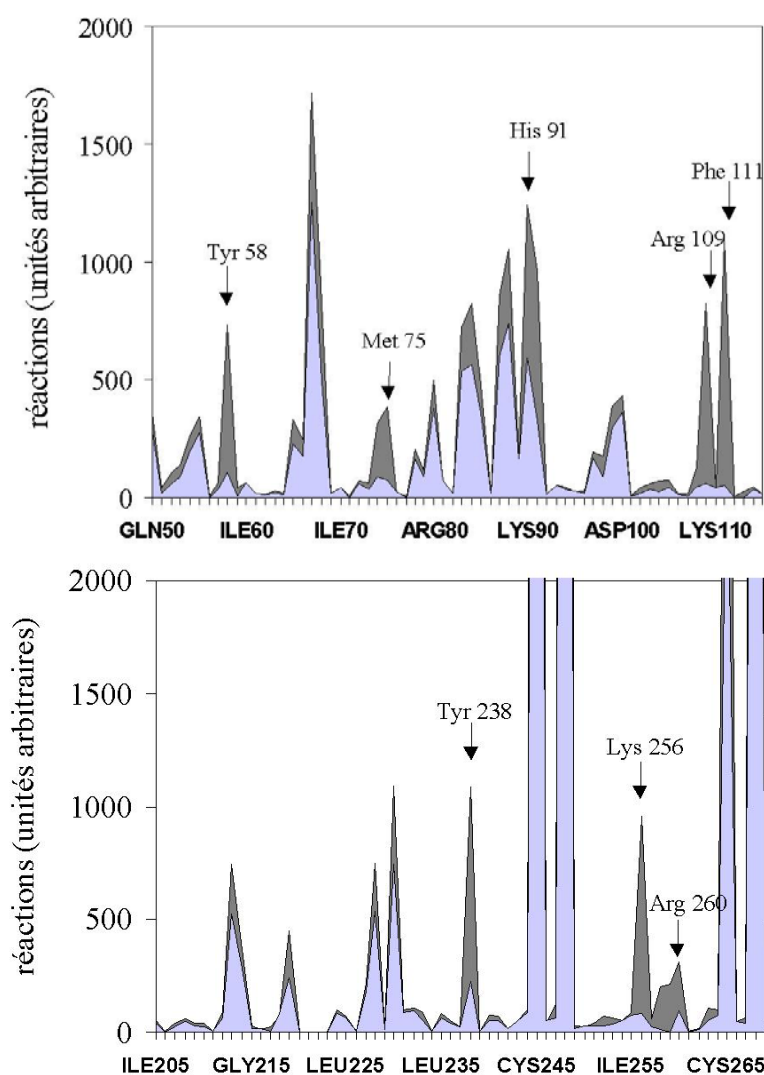


Figure 98. Probabilités relatives calculées de réaction des radicaux OH avec chaque acide aminé de la protéine Fpg libre (aires noires) et complexée (aires grises).

En conclusion, l'exposition aux rayonnements ionisants d'un système de réparation de l'ADN peut perturber la réparation en diminuant l'efficacité de reconnaissance des lésions par la protéine. La question prolongeant ce travail est évidemment de savoir si, en plus de perturber la reconnaissance des lésions, les radiations modifient également l'activité enzymatique de la protéine Fpg.

2. 2. Etude la protéine Fpg sauvage de *Escherichia coli*

Afin d'étudier l'effet des radiations sur l'activité enzymatique de la protéine Fpg, des complexes ont été formés entre la protéine sauvage *wtFpg* de *Escherichia coli* et des fragments d'ADN de 13 pb porteurs de lésions.

Deux stratégies ont été utilisées dans ces travaux.

La première consiste à étudier un complexe abortif de type [enzyme/analogue] formé par la protéine *wtFpg* et un fragment d'ADN de 13 pb porteur d'un analogue de site abasique (site 1,3-propanediol). La protéine sauvage reconnaît en effet cette lésion sans l'exciser, ce qui permet d'étudier la première étape du processus de réparation, la reconnaissance et la fixation de la lésion par Fpg.

La deuxième stratégie repose sur l'étude d'un deuxième complexe, formé par *wtFpg* et un substrat vrai, la 8-oxoguanine. Un fragment de 13 pb portant la 8-oxoG en son centre a été synthétisé par Didier Gasparutto du Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (CEA, Grenoble). La reconnaissance de la 8-oxoguanine par *wtFpg* est suivie par l'excision de la lésion. L'étude de l'intégrité du fragment d'ADN sous rayonnement γ permet donc d'étudier l'influence des radiations sur l'activité enzymatique de Fpg.

2. 2. 1. Activité et fixation de la protéine non irradiée à un ADN portant une lésion

Dans un premier temps, des expériences de titration des fragments d'ADN par Fpg ont été réalisées dans le but de fixer les conditions expérimentales.

a) Fixation de *wtFpg* sur le site Pr

Pour l'étude de la fixation de *wtFpg* sur le site Pr, des solutions d'ADN de concentration constante (0.1 nM) sont incubées 20 minutes sur glace avec des concentrations croissantes de *wtFpg* (de 0 à 16.4 μ M), dans un tampon 30 mM phosphate de potassium (pH 7.6), 80 mM NaCl, 5% glycérol avant d'être analysées par électrophorèse en gel retard (Figure 99). Le type de tampon choisi ainsi que sa concentration sont importants pour limiter les effets de capture des radicaux hydroxyles par le tampon et d'autre part pour maintenir l'intégrité de la protéine Fpg, la protéine sauvage étant moins stable que sa forme mutante.

L'effet des radiations sur la fixation de l'ADN sera étudiée sur un complexe dont les caractéristiques sont une concentration en protéine de 1.6 μ M et une concentration en ADN de 0.1 nM ; ces concentrations correspondent à une complexation de 30% de l'ADN marqué.

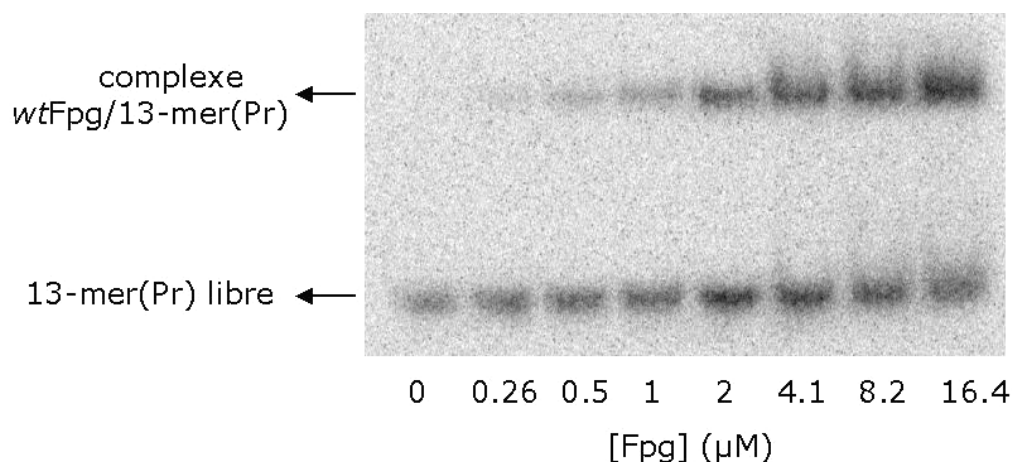


Figure 99. Titration du fragment d'ADN de 13 pb portant un site Pr par la protéine *wtFpg*. Gel retard montrant les complexes formés lorsque des concentrations croissantes de protéine (0, 0.26, 0.5, 1, 2, 4.1, 8.2 et 16.4 μM) sont incubées en présence d'une concentration constante d'ADN (0.1 nM), pendant 20 minutes sur glace.

b) Activité de *wtFpg* sur la 8-oxoG

Pour étudier l'activité de *wtFpg* sur le site 8-oxoG, des solutions d'ADN de concentration constante (0.1 nM) sont incubées 10 minutes à 37°C avec des concentrations croissantes de *wtFpg* (de 0 à 8.2 μM), dans un tampon 30 mM phosphate de potassium (pH 7.6), 80 mM NaCl, 5% glycérol. La réaction est arrêtée par l'ajout d'un volume de tampon de charge (80% formamide, 10 mM EDTA, bleu de bromophénol) et incubation 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes.

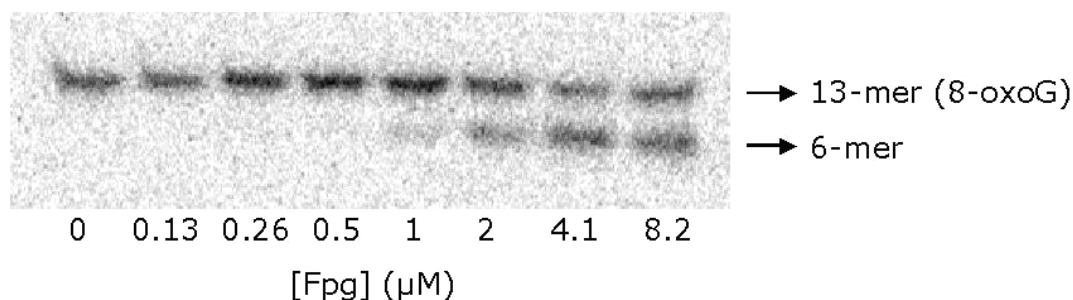


Figure 100. Titration du fragment d'ADN de 13 pb portant une 8-oxoG par la protéine *wtFpg*. Gel dénaturant montrant le clivage du brin d'ADN lorsque des concentrations croissantes de protéine (0, 0.26, 0.5, 1, 2, 4.1, 8.2 et 16.4 μM) sont incubées en présence d'une concentration constante d'ADN (0.1 nM), pendant 20 minutes à 37°C.

L'effet des radiations sur l'activité de *wtFpg* sur l'ADN portant un dommage sera étudié sur des solutions à 1.6 μM en *wtFpg* et 0.1 nM en ADN; ces concentrations correspondent à un clivage de 15% de l'ADN marqué.

2. 2. 2. Activité et fixation de la protéine irradiée à un ADN portant une lésion

a) Fixation de *wtFpg* sur le site Pr

Lorsque la protéine est irradiée seule, dans une gamme de dose de 0 à 750 Gy, puis est incubée avec le fragment d'ADN non-irradié, il apparaît que l'intensité de la bande correspondant au complexe diminue au cours de l'irradiation.

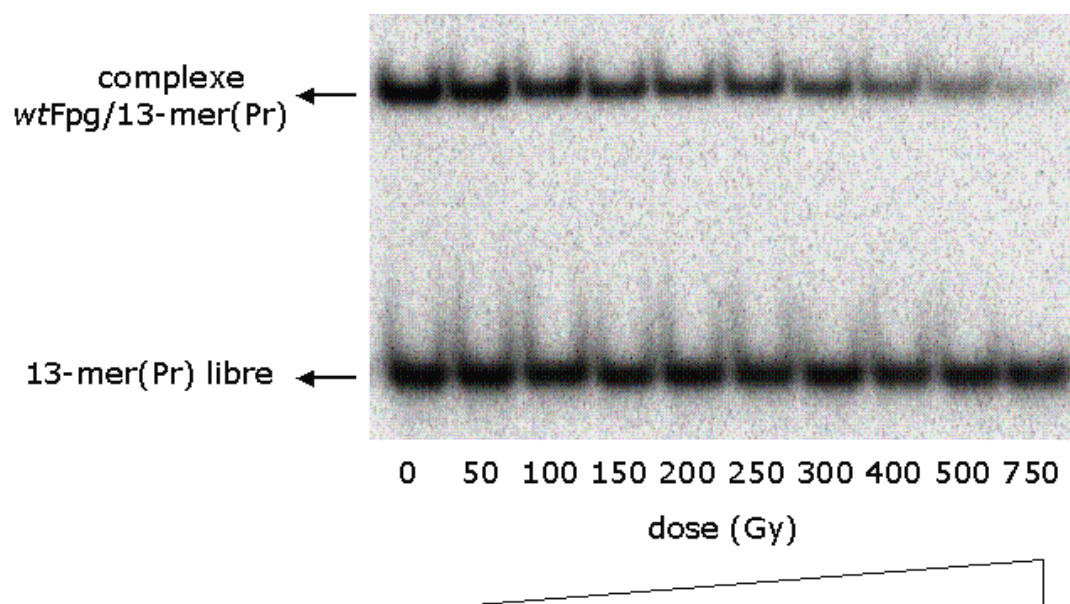


Figure 101. Fixation de la protéine Fpg irradiée sur un ADN de 13 paires de base portant un site 1,3-propanediol (conditions expérimentales : $[wtFpg]_{irradiation} = 3.2 \mu M$, $[wtFpg]_{complexation} = 1.6 \mu M$, $[ADN] = 0.1 nM$, complexation et migration à $4^\circ C$).

Il faut souligner que la perte de capacité de fixation à l'ADN endommagé de la protéine *wtFpg* irradiée est décalée vers de plus hautes doses par rapport à la protéine P1G-Fpg. Ceci s'explique par la différence de concentrations auxquelles les solutions de *wtFpg* et P1G-Fpg ont été irradiées, soit respectivement $3.2 \mu M$ et $0.4 \mu M$.

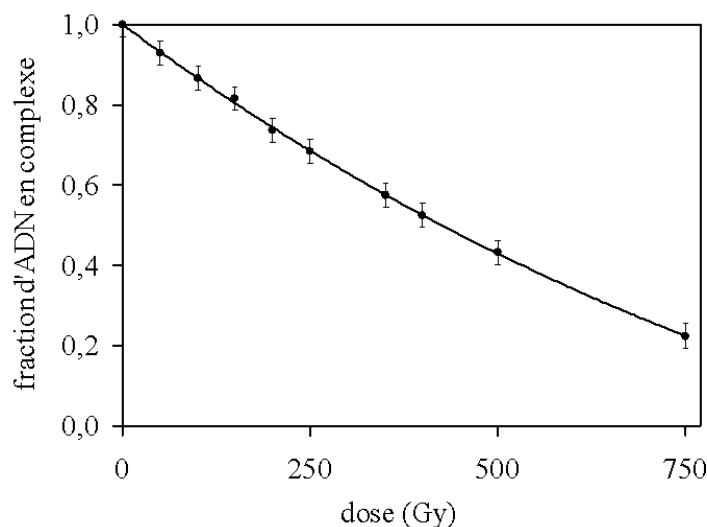


Figure 102. Fraction d'ADN complexé à la protéine Fpg après irradiation de la protéine libre, comme déterminé par analyse des gels retard (moyenne de 2 expériences).

b) Activité de *wtFpg* sur la 8-oxoG

Des solutions de *wtFpg* à 3.2 μM sont irradiées dans une gamme de dose de 0 à 750 Gy puis incubées avec 0.1 nM d'ADN (8-oxoG). Comme le montre la Figure 103, l'activité enzymatique de Fpg est modifiée par l'irradiation puisque la fraction de 13-mer clivé par l'enzyme diminue avec la dose.

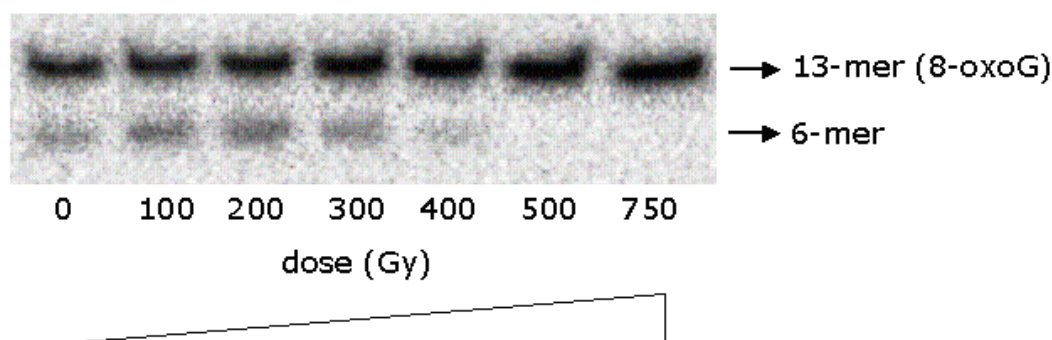


Figure 103. Evolution de l'activité de *wtFpg* irradiée sur un ADN de 13 paires de base portant une 8-oxoguanine. Gel dénaturant montrant le clivage du brin d'ADN en fonction de la dose (conditions expérimentales : $[\text{wtFpg}]_{\text{irradiation}} = 3.2 \mu\text{M}$, $[\text{wtFpg}]_{\text{clivage}} = 1.6 \mu\text{M}$, $[\text{ADN}] = 0.1 \text{ nM}$, complexation et migration à 4°C).

Pour de faibles doses, l'activité de *wtFpg* irradiée ne diminue pas : pour une dose de 200 Gy, la protéine a perdu seulement 3% de son activité. A de plus hautes doses, l'activité chute brutalement puisqu'elle n'est plus que de 56% à 300 Gy et est nulle à 750 Gy.

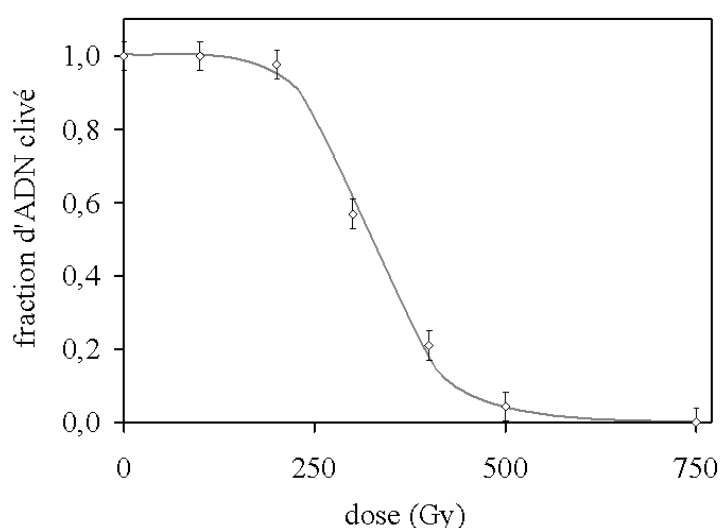


Figure 104. Fraction d'ADN clivé par *wtFpg* irradiée en fonction de la dose, comme déterminé par analyse des gels dénaturants (moyenne de 3 expériences).

La comparaison de la perte de fixation de *wtFpg* au site Pr avec la perte d'activité de la protéine vis-à-vis d'une lésion 8-oxoG est surprenante. En effet, pour de faibles doses, alors que la protéine perd sa capacité de fixation à l'ADN endommagé, son activité reste stable (Figure 105).

Pour expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

Sous irradiation, Fpg peut soit voir sa constante d'affinité K pour l'ADN diminuer, soit être totalement incapable de fixer son substrat (constante d'affinité nulle). Un échantillon de Fpg irradié peut donc être constitué soit de protéines qui fixent l'ADN avec une constante plus faible, soit d'un mélange de deux populations, des protéines fixant toujours l'ADN avec la même affinité que la protéine native et d'autres incapables de fixer l'ADN.

Dans les deux cas, le maintien de l'activité enzymatique observée pour de faibles doses nécessite que la protéine irradiée aie un turn-over plus grand (k_{cat}) que la protéine native. Des résultats comparables ont été obtenus par Schnoneich (communication personnelle, 2005) qui a montré que l'exposition d'une enzyme à un rayonnement peut augmenter son activité via des modifications de résidus cystéine.

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, il serait donc nécessaire de réaliser des cinétiques enzymatiques qui permettront de déterminer à la fois v_{max} , K_M et k_{cat} .

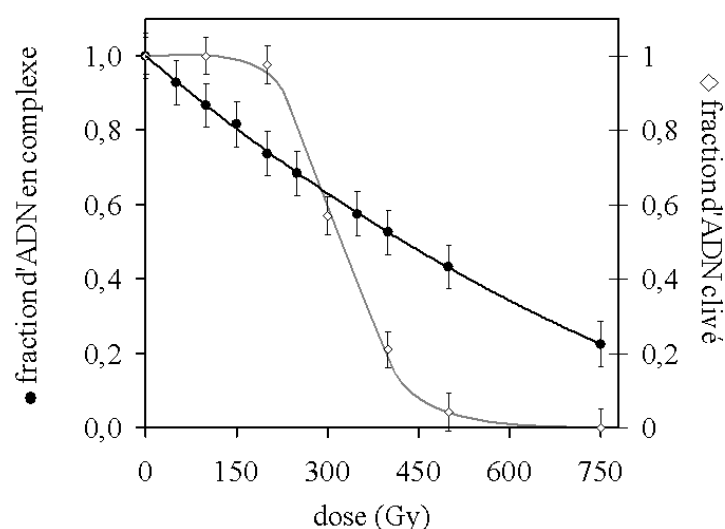


Figure 105. Comparaison des fractions d'ADN en complexe (cercles noirs) et d'ADN clivé (losanges blancs) par wtFpg en fonction de la dose d'irradiation de la protéine.

Conclusions et perspectives

La destruction radio-induite des complexes ADN-protéines peut avoir des conséquences graves dans le cas de systèmes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes ou dans la réparation de dommages induits par des stress oxydatifs. Ce travail a permis de répondre à de nombreuses questions concernant les effets des radiations ionisantes sur deux systèmes nucléo-protéiques.

Le premier système étudié est un système de régulation de l'expression génique chez *Escherichia coli*, celui de l'opéron lactose.

Comme cela avait déjà été montré précédemment, l'irradiation du complexe répresseur-opérateur détruit ce dernier. Alors que la capacité de fixation de l'ADN irradié au répresseur non irradié ne diminue que légèrement lorsque la dose augmente, la capacité du répresseur irradié à se fixer sur de l'ADN non irradié diminue rapidement. La dose nécessaire à la destruction du complexe étant supérieure à celle induisant la perte totale de la capacité de fixation du répresseur irradié libre à l'ADN, ceci montre que la protéine est protégée par l'ADN des rayons γ .

Les expériences en gel retard montrent également qu'un deuxième type de complexe est formé lorsque le répresseur est irradié libre ou en complexe. Or, comme ce deuxième type de complexe n'est pas observé lorsque l'ADN est irradié seul, il correspond donc à un complexe formé entre un fragment d'ADN et une molécule de répresseur endommagé. Deux hypothèses peuvent expliquer l'apparition d'un deuxième type de complexe au cours de l'irradiation. Soit l'irradiation provoque des dommages qui vont modifier les interactions ADN-protéine et donc la courbure du fragment d'ADN. Soit l'irradiation provoque des dommages au domaine de tétramérisation du répresseur, ce qui entraîne l'apparition d'une forme dimérique de la protéine. Afin d'identifier l'origine de ce deuxième complexe, des expériences de filtration sur gel et de pontage au glutaraldéhyde devraient permettre de détecter une possible forme dimérique du répresseur irradié. La permutation circulaire permettrait quant à elle de calculer la courbure d'un fragment d'ADN en complexe avec le répresseur [Wu & Crothers, 1984] et donc d'observer d'éventuelles modifications de cette courbure lorsque le répresseur est irradié.

Les radiations ionisantes perturbant les interactions répresseur-opérateur, le domaine de fixation du répresseur à l'ADN, appelé également *headpiece*, a ensuite été plus

particulièrement étudié afin d'identifier les dommages responsables de la perte de capacité de fixation de la protéine irradiée à sa séquence opératrice.

Un peptide de 60 acides aminés correspondant au domaine de fixation du répresseur à l'ADN a été exprimé chez *Escherichia coli* et purifié.

Comme pour le répresseur entier, l'irradiation induit des coupures de la chaîne peptidique puisqu'une diminution de la proportion de *headpiece* intacte est observée au cours de l'irradiation. Or, ces coupures de chaîne peuvent entraîner des changements dans la structure secondaire de la *headpiece*, tout comme certaines modifications des chaînes latérales des acides aminés. L'analyse par dichroïsme circulaire de la conformation de la *headpiece* a révélé une déstructuration du peptide au cours de l'irradiation. De plus, alors que la dénaturation thermique de la *headpiece* non irradiée est réversible, celle du peptide irradié ne l'est plus; un cycle de dénaturation-renaturation révèle des dommages supplémentaires. L'irradiation modifie également la stabilité thermique de la *headpiece* puisque son T_m diminue au cours de l'irradiation.

Les tyrosines étant particulièrement sensibles à l'attaque radicalaire, l'état des quatre résidus tyrosine présents sur la *headpiece* (Tyr7, Tyr12, Tyr17 et Tyr47) a été suivi au cours de l'irradiation. L'intensité de fluorescence diminue au cours de l'irradiation, preuve que les résidus tyrosine sont endommagés. De plus, l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la dose laisse penser qu'un ou plusieurs résidus sont endommagés avant les autres. L'étude de protéines mutantes pour les quatre résidus tyrosine de la *headpiece* permettrait de déterminer la cinétique d'oxydation des différentes tyrosines.

L'intensité de fluorescence dans la bande d'émission des dityrosines augmente avec la dose, ce qui suggère que l'irradiation entraîne la formation de ce composé ; ceci pourrait expliquer, au moins partiellement, la perte de la capacité de fixation du répresseur irradié à l'ADN. Les résidus Tyr7 et Tyr17 sont suffisamment proches pour participer à la formation de dityrosines intramoléculaires, comme montré par modélisation moléculaire [Gras *et al.*, 2005]. La formation de cette dityrosine intramoléculaire pourrait être confirmée en mutant soit le résidu Tyr7, soit Tyr17 et en étudiant l'évolution de la fluorescence dans la bande d'émission des dityrosines. En effet, en absence d'une des deux tyrosines, aucune dityrosine intramoléculaire ne devrait alors être formée.

La *headpiece* comprend également, en plus des tyrosines, d'autres acides aminés hautement oxydables par les radicaux hydroxyles, tels que les résidus méthionine, histidine et arginine. Les calculs réalisés par Marie Begusova (Institut de Physique Nucléaire, Prague) ont montré

que les acides aminés Tyr7, Tyr12, Tyr17, Arg22, His29, Arg35, Met42, Tyr47 et Arg51 ont les probabilités de réagir avec le radical hydroxyle les plus élevées. Des techniques de spectrométrie de masse (MALDI-TOF et ESI-IT) ont été utilisées pour tenter de déterminer si certains de ces résidus sont endommagés.

Dans un premier temps, l'analyse de la *headpiece* entière par MALDI-TOF a révélé que celle-ci est oxydée sous rayonnement γ et que le nombre d'oxydations est fonction de la dose.

L'analyse du peptide entier ne permettant cependant pas de déterminer quel(s) résidu(s) sont oxydés au cours de l'irradiation, les échantillons ont été digérés en fragments plus petits par des endoprotéinases. Les fragments ont ensuite été analysés par MALDI-TOF et par MS/MS ESI-IT. La comparaison des calculs de probabilité de réaction entre les différents résidus et le radical hydroxyle avec les résultats de MS tendent à prouver que les résidus Met1 (ou Tyr7), Tyr12, Tyr17, Met 42 et Arg51 sont probablement endommagés au cours de l'irradiation. Étonnamment, les expériences de MS tendent à prouver que ni His29, ni Arg35 ne semblent être des cibles majeures d'oxydation, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par calcul.

Certains fragments ne sont pas visibles en spectrométrie de masse, tel que celui de m/z de 1029.2 issu de la digestion de la *headpiece* par Arg-C. La séparation des produits de digestion par chromatographie, la concentration des différents fragments collectés et leur analyse individuelle en spectrométrie de masse permettrait de déterminer pourquoi ce fragment n'est pas observé en MALDI-TOF, une hypothèse étant qu'il s'ionise moins bien que les autres et que la compétition lors de l'ionisation lui est défavorable.

Il est nécessaire que les hypothèses émises sur base des calculs de probabilité et des premiers résultats de MS soient confirmées par des expériences supplémentaires. Premièrement, l'analyse MS/MS de peptides portant plus d'une oxydation pourrait fournir des renseignements supplémentaires sur les dommages radio-induits. D'autre part, des digestions à l'aide d'autres endoprotéinases permettraient de faire plus de recoupements. Par exemple, la digestion de la *headpiece* par Lys-C, qui coupe après les résidus lysine, permettrait de distinguer les oxydations de Met1 et Tyr7 en isolant ces deux résidus. D'autre part, des digestions multiples permettraient d'obtenir des fragments plus petits et qui se fragmenteraient mieux en MS/MS. Afin de déterminer si certains acides aminés sont oxydés en premier, il serait également utile de réaliser une étude de cinétique d'apparition des dommages en fonction de la dose, ce qui n'a pas encore été réalisé dans les études de MS/MS.

L'étude par radiolyse pulsée de la *headpiece* irradiée pourrait également fournir des informations sur l'apparition des radicaux Tyr et sur leur évolution, par exemple par transferts de dommages sur d'autres résidus.

Dans un deuxième temps, les effets des radiations ont été étudiées sur l'induction du système *lac* répresseur-*lac* opérateur afin de déterminer si les interactions inducteur-répresseur sont perturbées au même titre que les interactions répresseur-opérateur.

Lorsque l'inducteur se fixe au répresseur, il induit un changement de conformation de la protéine qui diminue son affinité pour l'ADN. C'est notamment cette régulation qui permet à *E.coli* d'utiliser le lactose présent dans son environnement comme source de carbone.

Lorsqu'un complexe non irradié répresseur-opérateur est incubé avec de l'IPTG, l'inducteur provoque une dissociation du complexe. Lorsque le répresseur irradié seul en solution est incubé avec sa séquence opératrice, en présence d'IPTG, il apparaît que le pourcentage de complexe répresseur-opérateur augmente pour de faibles doses puis diminue à de plus hautes doses. Ceci montre que, alors que le répresseur irradié est toujours capable de se lier à l'ADN, le complexe répresseur-opérateur n'est plus dissocié par l'IPTG.

Les expériences d'équilibre de dialyse ont montré que le dysfonctionnement de l'induction est dû à une perte d'affinité du répresseur pour l'IPTG et non à des perturbations de l'allostérie de la protéine suite à l'irradiation. D'autre part, le tracé du diagramme de Scatchard prouve que ce n'est pas la constante d'affinité du répresseur pour l'IPTG qui varie au cours de l'irradiation mais que le nombre de sites de fixation diminue.

Afin d'identifier les dommages responsables de la perte de fixation de l'inducteur, l'état des résidus Trp201 et Trp220, respectivement proche et au contact de l'inducteur, a été examiné par mesure de la fluorescence intrinsèque du répresseur. Ces expériences ont montré que les noyaux indole des résidus Trp201 et Trp220 sont détruits au cours de l'irradiation, avec des taux de destruction du même ordre de grandeur. La forte corrélation entre la destruction des résidus tryptophane et la perte de capacité de fixation de l'IPTG semble prouver l'implication des dommages aux tryptophanes dans la perte de fixation de l'inducteur. D'autre part, au vu de cette très bonne corrélation, il semble que la destruction radiolytique d'acides aminés autres que les tryptophanes ne joue pas de rôle majeur dans la perte de la capacité de fixation à l'inducteur du répresseur irradié.

L'IPTG étant un galactoside, sa capacité à réagir avec les radicaux hydroxyles a été testée : son pouvoir *scavenger*, déterminé graphiquement est égal à $(1.6 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Si

l'IPTG réagit avec les radicaux hydroxyles, il est également fort probable qu'il soit endommagé au cours de cette réaction. Des expériences d'équilibre de dialyse montrent en effet que la fraction d'IPTG toujours capable de se fixer au répresseur diminue exponentiellement au cours de l'irradiation. Le taux de dégradation de l'IPTG, déterminé graphiquement, est égal à $\lambda_0 = 0.0115 \text{ Gy}^{-1}$. Il faut souligner que, bien que l'IPTG irradié ne soit plus capable de se fixer au répresseur, il garde toutefois le même pouvoir scavenger que l'IPTG non irradié vis-à-vis des radicaux hydroxyles.

D'autre part, la perte de la capacité de fixation à l'inducteur du répresseur irradié en présence d'IPTG ne suit plus une simple courbe exponentielle, comme lorsque le répresseur est irradié seul. Ceci prouve que l'IPTG protège son site de fixation sur le répresseur tout comme l'ADN protège le répresseur lors de l'irradiation des complexes. A de faibles doses, les molécules d'IPTG intact occupent leur site de fixation sur les protomères et le protègent donc de la radiolyse : les sites de fixation de l'inducteur dans la population de protomères ne sont pratiquement pas endommagés. A de plus hautes doses, l'IPTG endommagé ne se fixe plus sur son site et celui-ci est alors détruit mais avec un taux inférieur ($\lambda = 0.00074 \text{ Gy}^{-1}$) à celui du répresseur irradié seul ($\lambda_1 = 0.00145 \text{ Gy}^{-1}$). L'IPTG endommagé possède en effet toujours la propriété de *scavenger* les radicaux hydroxyles en solution.

Compte tenu de toutes les données exposées ci-dessus, un modèle général de radiolyse du répresseur en présence d'IPTG a été construit pour expliquer les variations de concentration en sites IPTG intact au cours de l'irradiation. Ces variations peuvent être exprimées comme la somme de deux termes, soit la destruction des sites non occupés par l'inducteur avec un taux λ'_1 et la destruction des sites occupés par l'IPTG avec un taux λ'_2 . La mise en équation de ce système, la résolution numérique de l'équation différentielle ainsi obtenue et l'ajustement de certains paramètres (facteur de protection du site IPTG supérieur à 20 ; pouvoir scavenger de l'IPTG vis-à-vis des radicaux en présence de protéine $\alpha_{\text{rep}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) donne une courbe qui s'ajuste bien aux données expérimentales.

D'autre part, un modèle a également été construit pour expliquer le dysfonctionnement de l'induction du système répresseur- opérateur après irradiation. Ce modèle combine d'une part l'évolution de l'activité du répresseur irradié vis-à-vis de l'ADN et d'autre part la fraction de tétramères non-inductibles en fonction de la dose. Le produit de convolution de ces deux fonctions est une courbe qui correspond donc à la fraction de tétramères toujours capables de se fixer à l'ADN mais n'étant plus induits par l'IPTG. Il ressort également de ce modèle, que

la fixation d'une seule molécule d'IPTG par dimère de répresseur soit suffisante pour empêcher la fixation de ce dimère à l'opérateur.

Le deuxième système étudié dans ce travail est composé de la protéine de réparation Fpg (ou Formamidopyrimidine glycosylase) et d'un ADN porteur de lésion.

Dans un premier temps, le complexe formé par le mutant P1G-Fpg de *Lactococcus lactis* et le site 1,3-propanediol a été étudié afin de déterminer si l'exposition d'un tel système aux radiations ionisantes perturbe la reconnaissance des lésions par l'enzyme.

Si le complexe abortif P1G-Fpg/1,3-Pr est détruit sous irradiation, de plus hautes doses sont nécessaires pour détruire le complexe que pour détruire la capacité de fixation à l'ADN de la protéine irradiée seule. De plus, de très hautes doses sont nécessaires pour diminuer l'affinité de l'ADN irradié pour la protéine non-irradiée. Donc, tout comme pour le système de l'opéron lactose, ce sont les dommages à la protéine Fpg qui sont critiques dans la disparition du complexe ; d'autre part, la protéine Fpg en complexe est partiellement protégée des effets délétères de l'irradiation par l'ADN, ce qui a été confirmé par calcul.

L'ADN endommagé se fixe toujours à Fpg. Ceci peut être expliqué soit par la petite taille des régions de l'ADN impliquées dans la fixation soit par la formation de lésions supplémentaires au 1,3-Pr, qui augmenteraient le taux de fixation de Fpg au fragment d'ADN.

La fraction de protéine intacte diminue au cours de l'irradiation. La comparaison de ces résultats avec la perte de la capacité de fixation à l'ADN confirme que les cassures de la chaîne peptidique n'expliquent pas entièrement l'inactivation de Fpg. En plus des coupures de chaîne, la protéine porte également des dommages sur les chaînes latérales de ses acides aminés. L'analyse de la radiolyse de Fpg par le modèle RADACK montre que ce sont très probablement les dommages aux chaînes latérales qui sont responsables de l'inactivation de Fpg. D'autre part, certains acides aminés présentent des probabilités plus élevées que d'autres d'être endommagés lors de la radiolyse, dont certains sont impliqués dans la fixation à l'ADN. Des dommages causés à ces acides aminés peuvent empêcher la fixation de la protéine à son substrat, soit directement en modifiant les interactions ADN-protéine, soit via des changements de conformation de la protéine.

L'exposition aux rayonnements ionisants d'un système de réparation de l'ADN peut donc perturber la réparation en diminuant l'efficacité de reconnaissance des lésions par la protéine.

Des complexes ont ensuite été formés entre la protéine sauvage *wtFpg* de *Escherichia coli* et des fragments d'ADN porteurs de lésions, afin de savoir si les radiations affectent la réparation de l'ADN en perturbant à la fois la reconnaissance et la fixation par Fpg de son substrat et l'activité enzymatique de cette protéine.

L'activité de Fpg est effectivement perturbée sous rayonnement γ . Pour de faibles doses, l'activité de *wtFpg* irradiée ne diminue pas : pour une dose de 200 Gy, la protéine a perdu seulement 3% de son activité. A de plus hautes doses par contre, l'activité chute brutalement puisqu'elle n'est plus que de 56% à 300 Gy et nulle à 750 Gy.

La comparaison des pertes de fixation et d'activité de *wtFpg* est surprenante. En effet, pour de faibles doses, alors que la protéine perd sa capacité de fixation à l'ADN endommagé, son activité reste stable. Ces résultats peuvent être expliqués comme suit. Sous irradiation, Fpg peut soit voir sa constante d'affinité pour l'ADN diminuer, soit être totalement incapable de fixer son substrat. Dans le dernier cas, l'échantillon sera donc un mélange de deux populations, des protéines fixant toujours l'ADN avec la même affinité que la protéine native et d'autres incapables de fixer l'ADN. Dans les deux cas, le maintien de l'activité enzymatique observée pour de faibles doses nécessite que la protéine irradiée aie un turn-over plus grand (k_{cat}) que la protéine native. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait donc nécessaire de réaliser des cinétiques enzymatiques qui permettront de déterminer à la fois v_{max} , K_M et k_{cat} . D'autre part, la détermination des k_1 et k_{-1} par résonance plasmonique de surface (Biacore) devrait permettre de suivre l'évolution de l'affinité de Fpg pour son substrat au cours de l'irradiation.

Bibliographie

- Alberti S., Oehler S., von Wilcken-Bergmann B., Kramer H. and Muller-Hill B. (1991). Dimer-to-tetramer assembly of *Lac* repressor involves a leucine heptad repeat. *The New Biologist*. **3** (1), p.57-62.
- Armstrong D.A. (1990). Applications of pulse radiolysis to study of short-lived sulfur species. In *Sulfur-Centred Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, (ed. Chatgililoglu C. and Asmus K.D.), p.121-134. Plenum Press, New York.
- Asagoshi K., Terato H., Ohyama Y. and Ide H. (2002). Effects of a guanine-derived formamidopyrimidine lesion on DNA replication. translesion DNA synthesis, nucleotide insertion and extension kinetics. *The Journal of Biological Chemistry*. **277** (17), p.14589-14597.
- Asmus K.D. (1979). Stabilization of oxidized sulphur centers in organic sulfides. Radical cations and odd electron sulfur-sulfur bonds. *Accounts of Chemical Research*. **12**, p.436-442.
- Audette M., Blouquit Y. and Houée-Lévin C. (2000). Oxidative dimerization of protein : role of tyrosine accessibility. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **376**, p.217-220.
- Auffret van der Kemp P., Thomas D., Barbey R., de Oliveira R. and Boiteux S. (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **93**, p.5197-5202.
- Ayala A. and Cutler R.G. (1996). The utilization of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and proline residues in proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, **21** (1), p. 65-80.
- Aydogan B., Marshall D.T., Swarts S.G., Turner J.E., Boone A.J., Richards N.G. and Bolch W.E. (2002). Site-specific OH attack to the sugar moiety of DNA: a comparison of experimental data and computational simulation. *Radiation Research*. **157** (1), p.38-44.
- Balasubramanian B., Pogozelski W.K. and Tullius T.D. (1998). DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **95**, p.9738-9743.
- Barker S., Weinfeld M. and Murray D. (2005). DNA-protein crosslinks: their induction, repair and biological consequences. *Mutation Research*. **289**, p.111-135.
- Barry J.K. and Matthews K.S. (1999). Substitutions at histidine 74 and aspartate 278 alter ligand binding and allostery in lactose repressor protein. *Biochemistry*. **38**, p.3579-3590.
- Begusova M., Eon S., Sy D., Culard F., Charlier M. and Spothem-Maurizot M. (2001). Radiosensitivity of DNA in a specific protein-DNA complex: the *lac* repressor-*lac* operator complex. *International Journal of Radiation Biology*. **77** (6), p.645-654.
- Begusova M., Tartier L., Sy D., Spothem-Maurizot M., Michalik V. and Charlier M. (1999). Monte Carlo simulation of radiolytic attack to 5'-d[T4G4]4 sequence in a unimolecular quadruplex. *International Journal of Radiation Biology*. **75** (7), p.913-917.
- Bell C.E. and Lewis M. (2000). A closer view of the conformation of the *lac* repressor bound to operator. *Nature Structural Biology*. **7** (3), p.209-214.

- Bell C.E. and Lewis M. (2001). Crystallographic analysis of *lac* repressor bound to natural operator O1. *Journal of Molecular Biology*. **312**, p.921-926.
- Bensasson R., Land E.J. and Truscott T.G. (1993). Light and ionizing radiation: generation of excited states and radicals. In *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*. p.249-289. Oxford University Press, New York.
- Berlett B.S. and Stadtman E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (33), p.20313-20316.
- Bernhard W.A. and Close D.M. (2004). DNA Damage Dictates the Biological consequences of Ionizing Irradiation: The chemical Pathways in *Charged Particle and Photon, Interaction with Matter. Chemical, Physicochemical, and Biological Consequences with Applications*. p.431-469, Marcel Dekker Inc., New York.
- Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M. and Garewal H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation*. **511** (2), p.145-178
- Bessho T., Roy R., Yamamoto K., Kasai H., Nishimura S., Tano K. and Mitra S. (1993a). Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurin-DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **90**, p.8901-8904.
- Bessho T., Tano K., Kasai H., Ohtsuka E. and Nishimura S. (1993b). Evidence for two repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (26), p.19416-19421.
- Biemann K. (1990). Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods in Enzymology*. **193**, p.886-887.
- Bisby R.H., Ahmed S. and Cundall R.B. (1984). Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **119** (1), p.245-251.
- Blaisdell J.O. and Wallace S. (2001). Abortive base-excision repair of radiation-induced clustered DNA lesions in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **39**, p.8026-8031.
- Bobrowski K., Schöneich C., Holcman J. and Asmus K.D. (1991). OH radical induced decarboxylation of methionine-containing peptides. Influence of peptide sequence and net charge. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*. **2**, p.353-362.
- Boiteux S. (1993). Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *Journal of Photochemistry and PhotoBiology B: Biology*. **19**, p.87-96.
- Breen A.P. and Murphy J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*. **18**, p.1033-1077.
- Brenner D.J. and Ward J.F. (1992). Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *International Journal of Radiation Biology*. **61** (6), p.737-748.
- Brenowitz M., Pickar A. and Jamison E. (1991). Stability of a Lac repressor mediated "looped complex". *Biochemistry*. **30** (24), p.5986-5998.

- Bruner S.D., Norman D.P. and Verdone G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*. **403**, p.859-866.
- Buxton G.V. (2004). The radiation chemistry of liquid water: principles and applications in *Charged Particle and Photon, Interaction with Matter. Chemical, Physicochemical, and Biological Consequences with Applications*. p.331-363, Marcel Dekker Inc., New York
- Cadène M. and Chait B.T. (2000). A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. *Analytical Chemistry*. **72** (22), p.5655-5658.
- Cadet J., Berger M., Douki T. and Ravanat J.L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **131**, p.1-87.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D. and Ravanat J.-L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **531** (1), p. 5-23.
- Caldecott K.W. (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays*. **23** (5), p.447-455.
- Caldecott K.W. (2003). DNA single-strand break repair and *Spinocerebellar Ataxia*. *Cell*. **112**, p.7-10.
- Carell T., Burgdorf L.T., Kundu L.M. and Cichon M. (2001). The mechanism of action of DNA photolyases. *Current Opinion in Chemical Biology*. **5**, p.491-498.
- Castaing B., Fourrey J.L., Hervouet N., Thomas M., Boiteux S. and Zelwer C. (1999). AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucleic Acids Research*. **27** (2), p.608-615.
- Castaing B., Geiger A., Seliger H., Nehls P., Laval J., Zelwer C. and Boiteux S. (1993). Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. *Nucleic Acids Research*. **21** (12), p.2899-2905.
- Chakerian A.E. and Matthews K.S. (1991). Characterization of mutations in oligomerization domain of *Lac* repressor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **266** (33), p.22206-22214.
- Chakerian A.E., Tesmer V.M., Manly S.P., Brackett J.K., Lynch M.J., Hoh J.T. and Matthews K.S. (1991). Evidence for leucine zipper motif in lactose repressor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **266** (3), p.1371-1374.
- Chang W.I. and Matthews K.S. (1995). Role of Asp274 in *lac* repressor: diminished sugar binding and altered conformational effects in mutants. *Biochemistry*. **34**, p.9227-9234.
- Chang W.I., Barrera P. and Matthews K.S. (1994). Identification and characterization of aspartate residues that play key roles in the allosteric regulation of a transcription factor : aspartate 274 is essential for inducer binding in *lac* repressor. *Biochemistry*. **33**, p.3607-3616.
- Chang W.I., Olson J.S. and Matthews K.S. (1993). Lysine 84 Is at the Subunit Interface of *lac* Repressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (23), p.17613-17622.
- Charlier M., Culard F., Maurizot J-C. and Hélène C. (1977). Photochemical reactions of *lac* repressor. Effects on inducer binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **74**, p.690-698.

- Charlier M., Eon S., Seche E., Bouffard S., Culard F. and Spotheim-Maurizot M. (2002). Radiolysis of *lac* repressor by gamma-rays and heavy ions: a two-hit model for protein inactivation. *Biophysical Journal*. **82** (5), p.2373-2382.
- Chen J. and Matthews K.S. (1992a). Deletion of lactose repressor carboxyl-terminal domain affects tetramer formation. *The Journal of Biological Chemistry*. **267** (20), p.13843-13850.
- Chen J. and Matthews K.S. (1992b). T41 mutation in *lac* repressor is Tyr282 → Asp*. *Gene*. **111**, p.145-146.
- Chetsanga C.J. and Lindahl T. (1979). Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. **6**, p.3673-3684.
- Chung M.H., Kiyosawa H., Ohtsuka E., Nishimura S. and Kasai H. (1992). DNA strand cleavage at 8-hydroxyguanine residues by hot piperidine treatment *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **188** (1), p.1-7.
- Chuprina V.P., Rullmann J.A., Lamerichs R.M., van Boom J.H., Boelens R. and Kaptein R. (1993). Structure of the complex of *lac* repressor headpiece and an 11 base-pair half-operator determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and restrained molecular dynamics. *Journal of Molecular Biology*. **234** (2), p.446-462.
- Copley S.D., Frank E., Kirsch W.M. and Koch T.H. (1992). Detection and possible origins of aminomalonic acid in protein hydrolysates. *Analytical Biochemistry*. **201**, p.152-157.
- Cordoliani Y.S. (2002). Radioprotection. Chapitre III : Sources d'exposition naturelle et artificielle. *Feuillets de Radiologie*. **42** (4), p.341-345.
- Coste F., Ober M., Carell T., Boiteux S., Zelwer C. and Castaing B. (2004). Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine DNA glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry*. **279** (42), p.44074-44083.
- Cox M.M. (2001). Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annual Review of Genetics*. **35**, p.53-82.
- Culard F. and Maurizot J.-C. (1981). *Lac* repressor - *lac* operator interaction. Circular dichroism study. *Nucleic Acids Research*. **9** (19), p.5175-5184.
- Culard F. and Maurizot J.C. (1982). Binding of *lac* repressor induces different conformational changes on operator and non-operator DNAs. *FEBS Letters*. **146** (1), p.153-156.
- Culard F., Gervais A., de Vuyst G., Spotheim-Maurizot M. and Charlier M. (2003). Response of a DNA-binding protein to radiation-induced oxidative stress. *Journal of Molecular Biology*. **328**, p.1185-1195.
- Culard F., Schnarr M. and Maurizot J.C. (1982). Interaction between the *lac* operator and the *lac* repressor headpiece: fluorescence and circular dichroism studies. *The EMBO Journal*. **1**, p.1405-1409.
- David-Cordonnier M., Boiteux S. and O'Neill P. (2001). Efficiency of excision of 8-oxoguanine within DNA clustered damage by XRS5 nuclear extracts and purified human OGG1 protein. *Biochemistry*. **40**, p.11811-11818.

- David-Cordonnier M., Laval J. and O'Neill P. (2000). Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and *Escherichia coli* Nth and Fpg proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**, p.11865-11873.
- Davies K.J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General Aspects. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**, p.9895-9901.
- Davies M.J and Dean R.T. (1997). In *Radical-mediated protein oxidation from chemistry to medicine*, Oxford University Press, New York.
- Davies M.J., Fu S., Wang H. and Dean R.T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Research Biology and Medicine*. **27** (11&12), p.1151-1163.
- Davies M.J., Gilbert B.C. and Haywood R.M. (1993). Radiation induced damage to bovine serum albumin: role of the cystein residue. *Free Radical Research Communications*. **18**, p.353-2367.
- Dean R.T., Fu S., Stocker R. and Davies M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*. **324**, p.1-18.
- de Boer J. and Hoeijmakers H.J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. **21** (3), p.453-460.
- de Oliveira R., Auffret van der Kemp P., Thomas D., Geiger A., Nehls P. and Boiteux S. (1994). Formamidopyrimidine DNA glycosylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. **22** (18), p.3760-3764.
- Dizdaroglu M. and Simic M.G. (1980). Radiation induced conversion of phenylalanine to tyrosine. *Radiation Research*. **83**, p.437.
- Dizdaroglu M., Gajewski E., Reddy P. and Margolis S.A. (1989). Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry*. **28** (8), p.3625-3628.
- Eismann E.R. and Müller-Hill B. (1990). *Lac* repressor forms stable loops in vitro with supercoiled wild-type *lac* DNA containing all three natural *lac* operators. *Journal of Molecular Biology*. **213**, p.763-775.
- Elliott B. and Jasin M. (2002). Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cellular and Molecular Life Science*. **59** (2), p.373-85.
- Eon S., Culard F., Sy D., Charlier M. and Spothem-Maurizot M. (2001). Radiation disrupts protein-DNA complexes through damage to the protein. The *lac* repressor-operator system. *Radiation Research*. **156**, p.110-117.
- Eot-Houllier G., Eon-Marchais S., Gasparutto D. and Sage E. (2005). Processing of a complex multiply damaged DNA site by human cell extracts and purified repair proteins. *Nucleic Acids Research*. **33** (1), p.260-271.
- Falcon C.M. and Matthews K.S. (2001). Engineered disulfide linking the hinge regions within lactose repressor dimer increases operator affinity, decreases sequence selectivity, and alters allostery. *Biochemistry*. **40**, p.15650-15659.
- Falcon C.M., Swint-Kruse L. and Matthews K.S. (1997). Designed Disulfide between N-terminal Domains of Lactose Repressor Disrupts Allosteric Linkage. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (43) p. 26818-26821.

- Fedorova O.S., Nevinsky G.A., Koval V.V., Ishchenko A.A., Vasilenko N.L. and Douglas K.T. (2002). Stopped-flow kinetic studies of the interaction between *Escherichia coli* Fpg protein and DNA substrates. *Biochemistry*. **41**, p.1520-1528.
- Ferguson D.O. and Alt F.W. (2000). DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animals models. *Oncogene*. **20**, p.5572-5579.
- Ferradini C. and Pucheault J. (1983). In *Biologie de l'action des rayonnements ionisants*. Masson, Paris.
- Finley E.L., Dillon J., Crouch R.K. and Schey K.L. (1998). Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin. *Protein Science*. **7** (11), p.2391-2397.
- Fisher R., Lescoe M.K., Rao M.R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Garber J., Kane M. and Kolodner R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. **75**, p.1027-1038.
- Flynn T.C., Swint-Kruse L., Kong Y., Booth C., Matthews K.S. and Ma J. (2003). Allosteric transition pathways in the lactose repressor protein core domains: asymmetric motions in a homodimer. *Protein Science*. **12**, p.2523-2541.
- Frankenberg-Schwager M. (1990). Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation Environmental Biophysics*. **29**, p.273-292.
- Friedland W., Jacob P., Bernhardt P., Paretzke H.G. and Dingfelder M. (2003). Simulation of DNA damage after proton irradiation. *Radiation Research*. **159**, p.401-410.
- Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M. and Petropoulos I. (2000). Protein degradation by the proteasome and its implication in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **908**, p.143-154.
- Fromme J.C. and Verdine G.L. (2002). Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM. *Nature Structural Biology*. **9** (7), p.544-552
- Fu S. and Dean R.T. (1997). Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins. *Biochemical Journal*. **324**, p.41-48.
- Fu S., Hick L.A., Sheil M.M. and Dean R.T. (1995). Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acid, peptide, and protein molecules. *Free Radical Biology and Medicine*. **19** (3), p.281-292.
- Gajewski E. and Dizdaroglu M. (1990). Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry*. **29**, p.977-980.
- Garrison W.M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*. **87**, p.381-398.
- Gebicki S. and Gebicki J.M. (1993). Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochemical Journal*. **289**, p.743-749.
- Gieseg S.P., Simpson J.A., Charlton T.S., Duncan M.W. and Dean R.T. (1993). Protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry*. **32**, p.4780-4786.
- Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P. and Shoham G. (2002). Structure of formamidopyrimidine-DNA

- glycosylase covalently complexed to DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. **277** (22), p.19811-19816.
- Goodhead D.T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionising radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology*. **65**, p. 7-17.
- Goshe M.B., Chen Y.H. and Anderson V.E. (2000). Identification of the sites of hydroxyl radical reaction with peptides by hydrogen/deuterium exchange: prevalence of reactions with the side chains. *Biochemistry*. **39**, p.1761-1770.
- Gras J., Sy D., Eon S., Charlier M. and Spothem-Maurizot M. (2005). Consequences of intramolecular dityrosine formation on a DNA-protein complex: a molecular modeling study. *Radiation Physics and Chemistry*. **72** (2-3), p.271-278.
- Graves R.J., Felzenszwalb I., Laval J. and O'Connor T.R. (1992). Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. **267** (20), p.14429-14435.
- Gray H.B. and Winkler J.R. (1996). Electron transfer in proteins. *Annual Reviews of Biochemistry*. **65**, p.537-561.
- Grierson L., Hildenbrand K and Bothe E. (1992). Intramolecular transformation reaction of the glutathione thiyl radical into a non-sulphu-centred radical: a pulse radiolysis study. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. **62**, p.265-277.
- Harrison L., Hatahet Z. and Wallace S. (1999). In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiple damage DNA sites. *Journal of Molecular Biology*. **290**, p. 667-684.
- Harrison S.C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*. **353**, p.715-719.
- Hatahet Z., Kow Y.W., Purmal A.A., Cunningham R.P. and Wallace S. (1994). New substrates for old enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. **269** (29), p.18814-18820.
- Hawkins C.L. and Davies M.J. (1997). Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1360**, p.84-96.
- Hawkins C.L. and Davies M.J. (1998). EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions II*. p.2617-2622.
- Hawkins C.L. and Davies M.J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1504**, p.196-219.
- Headlam H.A. and Davies M.J. (2002). Beta-scission of side-chain alkoxyl radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones. *Free Radical Biology and Medicine*. **32** (11), p.1171-1184.
- Headlam H.A., Mortimer A., Easton C.J. and Davies M.J. (2000). Beta-scission of C3 (α -carbon) alkoxyl radicals on peptides and proteins: a novel pathway which results in the formation of α -carbon radicals and the loss of amino acid side chains. *Chemical Research in Toxicology*. **13** (11), p.1087-1095.

- Heinecke J.W., Li W., Daehnke H.L. and Goldstein J.A. (1993). Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (6), p.4069-4077.
- Hiller K.O., Masloch B., Göbl M. and Asmus K.D. (1981). Mechanism of the OH radical induced oxidation of methionine in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*. **103**, p.2734-2743.
- Holley W.R. and Chatterjee A. (1996). Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiation Research*. **145**, p.188-199.
- Hollis T., Ichikawa Y. and Ellenberg T. (2000). DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. *The EMBO Journal*. **19**, p.758-766.
- Hsieh M. and Brenowitz M. (1997). Comparison of the DNA association kinetics of the *lac* repressor tetramer, its dimeric mutant *lacI^{adi}*, and the native dimeric *gal* repressor. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (35), p.22092-22096.
- Huggins T.G., Wells-Knecht M.C., Detorie N.A., Baynes J.W. and Thorpe S.R. (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalysed oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (17), p.12341-12347.
- Ide H. and Kotera M. (2004). Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **27** (4), p.480-485.
- Isabelle V., Franchet-Beuzit J., Sabattier R., Laine B., Spothem-Maurizot M. and Charlier M. (1993). Radioprotection of DNA by a DNA-binding protein: MC1 chromosomal protein from the archaebacterium *Methanosarcina* sp. CHT155. *International Journal of Radiation Biology*. **63** (6), p.749-758.
- Jackson S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. **23** (5), p.687-696.
- Jacob F. and Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*. **3**, p.318-356.
- Jain R., Freund H.G., Budzinsky and Sharma M. (1997). Radiation-induced formation of 3,4-dihydroxyphenylalanine in tyrosine-containing peptides and proteins as a function of X-irradiation dose. *Bioconjugate Chemistry*. **8**, p.173-178.
- Jobe A. and Bourgeois S. (1972). *Lac* Repressor-operator interaction. VI. The natural inducer of the *lac* operon. *Journal of Molecular Biology*. **69** (3), p.397-408.
- Josimovic L., Jankovic I. and Jovanovic S.V. (1993). Radiation induced decomposition of tryptophan in the presence of oxygen. *Radiation Physics and Chemistry*. **41** (6), p.835-841.
- Jovin T.M., Geisler N. and Weber K. (1977). Amino-terminal fragments of *Escherichia coli lac* repressor bind to DNA. *Nature*. **269**, p.668-672.
- Kalodimos C.G., Bonvin A.M.J.J., Salinas R.K., Wechselberger R., Boelens R. and Kaptein R. (2002). Plasticity in protein-DNA recognition: *lac* repressor interacts with its natural

- operator 01 through alternative conformations of its DNA-binding domain. *The EMBO Journal*. **21** (12), p.2866-76.
- Kalodimos C.G., Folkers G.E., Boelens R and Kaptein R. (2001). Strong DNA binding by covalently linked dimeric *Lac* headpiece: evidence for the crucial role of the hinge helices. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **98** (11), p.6039-44.
- Karam L.R., Dizdaroglu M. and Simic M.G. (1984). OH radical induced products of tyrosine peptides. *International Journal of Radiation Biology*. **46** (6), p.715-24.
- Klungland A. and Lindahl T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair:reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO Journal*. **16**, p.3341-3348.
- Knapp-Pogozelski W. and Tullius T.D. (1998). Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chemical Reviews*. **98**, p.1089-1107.
- Krämer H., Niemöller M., Amouyal M., Revet B., von Wilcken-Bergmann B. and Müller-Hill B. (1987). *Lac* repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced *lac* operators. *The EMBO Journal*. **6** (5), p.1481-1491.
- Lau A.Y., Scharer O.D., Samson L., Verdine G.L. and Ellenberg T. (1998). Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell*. **95**, p.249-258.
- Lewis M., Chang G., Horton N.C., Kercher M.A., Pace H.C., Schumacher M.A., Brennan R.G. and Lu P. (1996). Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science*. **271**, p.1247-1254.
- Lloyd R.S. and Linn S. (1993). In Linn, Lloyd et Roberts ed., *Nucleases*, 2nd ed., Nucleases involved in DNA repair, p.263-316, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Magee J.L. and Chatterjee A. (1987). Theoretical aspects of radiation chemistry. In *Radiation Chemistry, Principles and Applications*. p.137-171, VCH Publishers, New York.
- Margison G.P. and Santibanez-Koref M.F. (2002). O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *BioEssays*. **24** (3), p.255-266.
- Margolis S.A., Coxon B., Gajewski E. and Dizdaroglu M. (1988). Structure of a hydroxyl radical induced cross-link of thymine and tyrosine. *Biochemistry*. **27** (17), p.6353-6359.
- Markiewicz P., Kleina L.G., Cruz C., Ehret S. and Miller J.H. (1994). Genetic studies of the *lac* repressor. XIV. Analysis of 4000 altered *Escherichia coli lac* repressors reveals essential and non-essential residues, as well as "spacers" which do not require a specific sequence. *Journal of Molecular Biology*. **240** (5), p.421-433.
- Maskos Z., Rush J.D. and Koppenol W.H. (1992a). The hydroxylation of tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **296** (2), p.514-520.
- Maskos Z., Rush J.D. and Koppenol W.H. (1992b). The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **296** (2), p.521-529.
- Michaels M.L., Cruz C., Grollman A.P. and Miller J.H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA.

- Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **89**, p.7022-7025.
- Michalik V. (1991). Particle track structure and its correlation with radiobiological endpoint. *Physical Medecine Biology*. **36**, p.1001-1012.
- Michalik V., Spothem-Maurizot M. and Charlier M. (1995). Calculation of hydroxyl radical attack on different forms of DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. **13** (3), p.565-575.
- Morin B., Bubb W.A., Davies M.J., Dean R.T. and Fu S. (1998). 3-hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chemical Research in Toxicology*. **11** (11), p.1265-1273.
- Moriya M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **90** (3), p.1122-1126.
- Moriya M., Bodepudi V., Johnson F., Takeshita M. and Grollman A.P. (1991). Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutation Research*. **254** (3), p.281-288.
- Moskovitz J., Weissbach H. and Brot N. (1996). Cloning and expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biochemistry*. **93** (5), p.2095-2099.
- Nash H.M., Bruner S.D., Schärer O.D., Kawate T., Addona T.A., Spooner E., Lane W.S. and Verdine G.L. (1996). Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Current Biology*. **6** (8), p.968-980.
- Nauser T. and Schöneich C. (2003). Thiyl radicals abstract hydrogen atoms from the α C-H bonds in model peptides: absolute rate constants and effect of amino acid structure. *Journal of American Chemical Society*. **125** (8), p.2042-2043.
- Norbury C.J. and Hickson I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **41**, p.367-401
- O'Connor T.R., Graves R.J., de Murcia G., Castaing B. and Laval J. (1993). Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (12), p.9063-9070.
- O'Connor T.R., Boiteux S. and Laval J. (1988). Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*. **16** (13), p.5879-5894.
- Oehler S., Eismann E.R., Krämer H. and Müller-Hill B. (1990). The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *The EMBO Journal*. **9** (4), p.973-979.
- Ogata R.T. and Gilbert W. (1979). DNA-binding site of *lac* repressor probed by dimethylsulfate methylation of *lac* operator. *Journal of Molecular Biology*. **132** (4), p.709-728.

- Oleinick N.L., Chiu S., Xue L., Ramakrishnan N. and Friedman L.R. (1990). Properties of DNA crosslinks (DPC) induced by ionising radiation. *Journal of Cell Biochemistry*, 14A (UCLA Symposium), 80
- Pace H.C., Kercher M.A., Markiewicz P., Miller J.H., Chang G. and Lewis M. (1997). *Lac* repressor genetic map in real space. *Trends in Biochemical Sciences*. **22** (9), p. 334-339.
- Parsons J.L. and Elder R.H. (2003). DNA N-glycosylase deficient mice: a tale of redundancy. *Mutation Research*. **531**, p.165-175.
- Perlow-Poehnelt R.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. and Broyde S. (2004). Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: distinguishing interactions within the active site. *Biochemistry*. **43**, p.16092-16105.
- Platt T., Files J.G. and Weber K. (1973). *Lac* repressor. Specific proteolytic destruction of the NH₂-terminal region and loss of the deoxyribonucleic acid-binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **248** (1), p.110-121.
- Prise K.M., Folkard M., Newmann H.C. and Michael B.D. (1994). Effect of radiation quality on lesion complexity in cellular DNA. *International Journal of Radiation Biology*. **66**, p. 537-542.
- Prutz W.A. (1990). Free radical transfer involving sulphur peptide functions. In *Sulfur-Centred Reactive Intermediates in Chemistry and Biology* (ed. Chatgililoglu C. and Asmus K.D.), p.389-399. Plenum Press, New York.
- Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S. and Boiteux S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **94**, p.8010-8015.
- Ramakrishnan N., Chiu S. and Oleinick N.L. (1987) Yield of DNA-protein crosslinks in γ -irradiated Chinese hamster cells. *Cancer Research*. **47**, p.2032-2035.
- Rauk A. and Armstrong D.A. (2000). Influence of β -sheet structure on the susceptibility of proteins to backbone oxidative damage: preference for α C-centered radical formation at glycine residues of antiparallel β -sheets. *Journal of the American Chemical Society*. **122** (17), p.4185-4192.
- Rauk A., Yu D., Taylor J., Shustov G.V., Block D.A. and Armstrong D.A. (1999). Effects of structure on α C-H bond enthalpies of amino acid residues: relevance to H transfers in enzyme mechanisms and in protein oxidation. *Biochemistry*. **38** (28), p.9089-9096.
- Rich T., Allen R.L. and Wyllie A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature*. **407**, p.777-783.
- Riggs A.D., Newby R.F. and Bourgeois S. (1970). *Lac* repressor-operator interaction. II. Effect of galactosides and other ligands. *Journal of Molecular Biology*. **51** (2), p.303-314.
- Roepstorff P. and Fohlman J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*. **11** (11), p.601.
- Roldan-Arjona T., Wei Y.F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.P., Augustus M. and Lindahl T. (1997). Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **94**, p.8016-8020.

- Roots R., Holley W., Chatterjee A., Irizarry M. and Kraft G. (1990). The formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiation: a comparison of data from in vitro and cellular systems. *International Journal of Radiation Biology*. **58**, p.55-69.
- Rydberg B. (1996). Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection. *Radiation Research*. **145**, p.200-209.
- Sadler J.R., Sasmor H. and Betz J.L. (1983). A perfectly symmetric *lac* operator binds the *lac* repressor very tightly. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **80** (22), p.6785-6789.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). In *Molecular cloning, a Laboratory Manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savoye C., Sabattier R., Charlier M. and Spothem-Maurizot M. (1996). Sequence-modulated radiosensitization of DNA by copper ions. *International Journal of Radiation Biology*. **70** (2), p.189-198.
- Savoye C., Swenberg C., Hugot S., Sy D., Sabattier R., Charlier M. and Spothem-Maurizot M. (1997). Thiol WR-1065 and disulphide WR-33278, two metabolites of the drug ethylol (WR-2721), protect DNA against fast neutron-induced strand breakage. *International Journal of Radiation Biology*. **71** (2), p.193-202.
- Schärer O.D. and Jiricny J. (2001). Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays*. **23** (3), p.270-281.
- Schnarr M. and Maurizot J.C. (1981). Unfolding of *lac* repressor and its proteolytic fragments by urea: *headpieces* stabilize the core within *lac* repressor. *Biochemistry*. **21**, p.6164-6169.
- Schnarr M. and Maurizot J.C. (1982a). Secondary structure of the *lac* repressor headpiece. *European Journal of Biochemistry*. **128**, p.515-520.
- Schnarr M. and Maurizot J.C. (1982b). Stability of the *lac* repressor *headpiece* against thermal denaturation and tryptic hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. **702**, p.155-162.
- Schnarr M., Durand M. and Maurizot J.C. (1983). Nonspecific interaction of the *lac* repressor headpiece with deoxyribonucleic acid: fluorescence and circular dichroism studies. *Biochemistry*. **22**, p.3563-3570.
- Sedgwick B. and Lindahl T. (2002). Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene*. **21**, p.8896-8894.
- Serre L., Pereira de Jésus K., Boiteux S., Zelwer C. and Castaing B. (2002). Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA. *The EMBO Journal*. **21** (12), p.2854-2865.
- Shacter E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*. **32** (3&4), p.307-326.
- Shibutani S., Takeshita M. and Grollman A.P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. **349** (6308), p.431-434.
- Siddiqi M.A. and Bothe E. (1987). Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiation Research*. **112** (3), p.449-463.

- Sidorkina O.M. and Laval J. (2000). Role of the N-terminal proline residue in the catalytic activities of the *Escherichia coli* Fpg protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **275** (14), p.9924-9929.
- Simpson J.A., Narita S., Giese S., Gebicki S., Gebicki J.M. and Dean R.T. (1992). Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochemical Journal*. **282**, p.621-624.
- Slijper M., Boelens R., Davies A.L., Konings R.N.H., van der Marel G.A., van Boom J.H. and Kaptein R. (1997). Backbone and side chain dynamics of *lac* repressor headpiece (1-56) and its complex with DNA. *Biochemistry*. **36**, p.249-254.
- Slijper M., Bonvin A.M.J.J., Boelens R. and Kaptein R. (1996). Refined structure of *lac* repressor headpiece (1-56) determined by relaxation matrix calculations from 2D and 3D NOE data: change of tertiary structure upon binding to the *lac* operator. *Journal of Molecular Biology*. **259** (4), p.761-773.
- Solar S. (1985). Reaction of hydroxyl radicals with phenylalanine in aqueous solution. *Radiation and Physical Chemistry*. **26**, p.103-108.
- Spotheim-Maurizot M., Charlier M. and Sabattier R. (1990). DNA radiolysis by fast neutrons. *International Journal of Radiation Biology*. **57** (2), p.301-13.
- Spotheim-Maurizot M., Franchet J., Sabattier R. and Charlier M. (1991). DNA radiolysis by fast neutrons. II. Oxygen, thiols and ionic strength effects. *International Journal of Radiation Biology*. **59** (6), p.1313-1324.
- Spotheim-Maurizot M., Garnier F., Sabattier R. and Charlier M. (1992). Metal ions protect DNA against strand breakage induced by fast neutrons. *International Journal of Radiation Biology*. **62** (6), p.659-666.
- Spotheim-Maurizot M., Ruiz S., Sabattier R. and Charlier M. (1995). Radioprotection of DNA by polyamines. *International Journal of Radiation Biology*. **68** (5), p.571-577.
- Spotts R.O., Chakerian A.E. and Matthews K.S. (1991). Arginine 197 of *lac* repressor contributes significant energy to inducer binding. *The Journal of Biological Chemistry*. **266** (34), p.22998-23002.
- Spronk C.A., Bonvin A.M.J.J., Radha P.K., Melacini G., Boelens R. and Kaptein R. (1999). The solution structure of *lac* repressor headpiece 62 complexed to a symmetrical *lac* operator. *Structure*. **7** (12), p.1483-1492.
- Spronk C.A., Slijper M., van Boom J.H., Kaptein R. and Boelens R. (1996). Formation of the hinge helix in the *lac* repressor is induced upon binding to the *lac* operator. *Nature Structural Biology*. **3** (11), p.916-919.
- Steen H. and Mann M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. **5**, p.699-711.
- Steenken S. and O'Neill P. (1977). Oxidative demethoxylation of methoxylated phenols and hydroxybenzoic acids by the OH radical. An *in situ* electron spin resonance, conductometric, pulse radiolysis, and product analysis study. *Journal of Physical Chemistry*. **81**, p.505-508.
- Sutherland B.M., Bennett P.V., Sutherland J.C. and Laval J. (2002). Clustered DNA damages induced by X rays in human cells. *Radiation Research*. **157**, p.611-616.

- Sy D., Hugot S., Savoye C., Ruiz S., Charlier M. and Spotheim-Maurizot M. (1999). Radioprotection of DNA by spermine: a molecular modelling approach. *International Journal of Radiation Biology*. **75** (8), p.953-961.
- Sy D., Savoye C., Begusova M., Michalik V., Charlier M. and Spotheim-Maurizot M. (1997). Sequence-dependent variations of DNA structure modulate radiation-induced strand breakage. *International Journal of Radiation Biology*. **72** (2), p.147-155.
- Tartier L., Michalik V., Spotheim-Maurizot M., Rahmouni A.R., Sabattier R. and Charlier M. (1994). Radiolytic signature of Z-DNA. *Nucleic Acids Research*. **22** (25), p.5565-5570.
- Tartier L., Spotheim-Maurizot M. and Charlier M. (1998). Radiosensitivity as support for the structure of a unimolecular DNA quadruplex. *International Journal of Radiation Biology*. **73** (1), p.45-51.
- Tchou J. and Grollman A.P. (1995). The catalytic mechanism of Fpg protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **270** (19), p.11671-11677.
- Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P. and Johnson F. (1994). Substrate specificity of Fpg Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **269** (21), p. 15318-15324.
- Tchou J., Michaels M.L., Miller J.H. and Grollman A.P. (1993). Function of the zinc finger in *Escherichia coli* Fpg protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (35), p. 26738-26744.
- Teoule R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. **51**, p.573-589.
- Thayer M.M., Ahern H., Xing D., Cunningham R.P. and Tainer J.A. (1995). Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO Journal*. **14**, p.4108-4120.
- Thompson L.H. and Schild D. (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutation Research*. **509**, p.49-78.
- Tubiana M., Dutreix J. and Wambersie A. (1986). Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. In *Radiobiologie* p.33-71, Hermann, Paris.
- Uchida K. and Kawakichi S. (1993). 2-oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Letters*. **332**, p.208-210.
- UNSCEAR (2000). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. Sources and effects of ionizing radiation. New York.
- Varga T. and Aplan P.D. (2005). Chromosomal aberrations induced by double strand DNA breaks. *DNA repair*. **4** (9), p. 1038-1046.
- Vogt W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*. **18** (1), p.93-105.
- Von Sonntag C. (1987). *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor & Francis, London.
- Von Sonntag C. (1990). Free-radical reactions involving thiols and disulphides. In *Sulfur-Centred Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, (ed. Chatgililoglu C. and Asmus K.D.), p.359-366. Plenum Press, New York.

- Von Sonntag C., Hagen U., Schon-Bopp A. and Schulte-frohlinde D. (1981). Radiation-induced strand breaks in DNA: chemical and enzymatic analysis of end groups and mechanistic aspects. *Advances in Radiation Biology*. **9**, p.109-142.
- Wallace S. (1997). Oxidative damage to DNA and its repair. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Ed. Scandalios J., p.49-90. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ward J.F. (1985). Biochemistry of DNA lesions. *Radiation Research Suppl.* **8**, p.103-11
- Ward J.F. (1988). DNA damage produced by ionising radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **35**, p.95-125.
- Wardman P. and von Sonntag C. (1995). Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. *Methods in Enzymology*. **251**, p.31-45.
- Weir Lipton M.S., Fuciarelli A.F., Springer D.L. and Edmonds C.G. (1996). Characterization of radiation-induced thymine-tyrosine crosslinks by electrospray ionisation mass spectrometry. *Radiation Research*. **145** (6), p.681-686.
- Wheeler P., Kirsch W.M. and Koch T.H. (1989). Free radical carboxylation of peptide- and protein-bound glycine to form peptide- and protein-bound aaminomalononic acid (Ama). *Journal of Organic Chemistry*. **54**, p.4360-4364.
- Wiederholt C.J. and Greenberg M.M. (2002). Fapy.dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine. *Journal of the American Chemical Society*. **124** (25), p.7278-7279.
- Wu H. and Crothers D.M. (1984). The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*. **308**, p.509-513.*
- Yim H.S., Kang S.O., Hah Y.C., Chock P.B. and Yim M.B. (1995). Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. *The Journal of Biological Chemistry*. **270** (47), p.28228-28233.
- Zaika E., Perlow R.A., Matz E., Broyde S., Gilboa R., Grollman A.P. and Zharkov D.O. (2004). Substrate discrimination by Formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry*. **279** (6), p.4849-4861.
- Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Douglas K.T. and Nevinsky G.A. (2003a). Recognition of damaged DNA by *Escherichia coli* Fpg protein: insights from structural and kinetic data. *Mutation Research*. **531**, p.141-156.
- Zharkov D.O., Rieger R.A., Iden C.R. and Grollman A.P. (1997). NH₂-terminal Proline Acts as a Nucleophile in the Glycosylase/AP-Lyase Reaction Catalyzed by *Escherichia coli* Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase (Fpg) Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (8), p.5335-5341.
- Zharkov D.O., Shoham G. and Grollman A.P. (2003b). Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases. *DNA Repair*. **2**, p.839-862.

Publications

Gillard N., Spothheim-Maurizot M. and Charlier M. (2005). Radiation abolishes inducer binding to lactose repressor. *Radiation Research*. **163**. p.433-446.

Gillard N., Begusova M., Castaing B. and Spothheim-Maurizot M. (2004). Radiation Affects Binding of Fpg Repair Protein to an Abasic Site Containing DNA. *Radiation Research*. **162** (5) p.566-571.

Begusova M., **Gillard N.**, Sy D., Castaing B., Charlier M. and Spothheim-Maurizot M. (2005). Radiolysis of DNA-protein complexes. *Radiation Physics and Chemistry*. **72**, p.25-270.

Communications

Gillard N., Goffinont S., Cadène M., Maurizot J.C. and Spothheim-Maurizot Mélanie. Effect of ionizing radiations on the lac repressor protein : study of the damage to the DNA binding domain. *24th Miller conference on Radiation Chemistry*. 10-15 septembre 2005, La Londe les Maures.

Gillard N., Culard F., Charlier M. and Spothheim-Maurizot M. Ionising radiations affect the functioning of a DNA-protein system, the lac repressor-lac operator complex. *Third International Summer School. DNA and Chromosomes*. 2-14 août 2004, Cargèse.

Gillard N., Culard F., Charlier M. and Spothheim-Maurizot M. Les radiations ionisantes affectent le fonctionnement d'un système DNA-protéine, le complexe lac répresseur- lac opérateur. *Colloque Annuel des Doctorants du CBM*. 7 mai 2004, Orléans.

Gillard N., Culard F., Charlier M. and Spothheim-Maurizot M. Radiation abolishes the induction of the *lac* repressor-*lac* operator complex. *Radiation Research Society 2004 Annual Meeting*. 24-27 avril 2004, St Louis, Missouri, USA.

Gillard N., Begusova M., Castaing B., Culard F. and Spothheim-Maurizot M. Radiolysis of DNA-binding proteins: experiment versus calculation. *52nd Annual Meeting of Radiation Research Society*. 16-19 octobre 2005, Denver, Colorado, USA. (présentation de Mélanie Spothheim-Maurizot)

Spothheim-Maurizot M., **Gillard N.**, Culard F., Sy D. and Charlier M. Radiation-induced dysfunction of a regulatory protein. *Gordon Research Conference on Radiation Chemistry*. 20-25 juin 2004, Colby College Waterville, ME, USA.

Gillard N., Spothheim-Maurizot M., Charlier M. Radiolyse du système de contrôle de l'opéron lactose d'*E. coli*. *JECCR*. 29 mai-3 juin 2004, Strasbourg. (présentation de Michel Charlier)