



Interaction entre yOgg1, une ADN glycosylase de la voie BER, et l'ADN polymérase répllicative Pol ϵ chez *Saccharomyces cerevisiae*

Kadija Essalhi

► To cite this version:

Kadija Essalhi. Interaction entre yOgg1, une ADN glycosylase de la voie BER, et l'ADN polymérase répllicative Pol ϵ chez *Saccharomyces cerevisiae*. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2077 . tel-01145247

HAL Id: tel-01145247

<https://theses.hal.science/tel-01145247>

Submitted on 23 Apr 2015

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.

**ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES
ET CHIMIE DU VIVANT**

LABORATOIRE CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE

THÈSE

présentée par :

Kadija ESSALHI

Soutenance prévue le : **12 Décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie/Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Interaction entre yOgg1, une ADN glycosylase
de la voie BER, et l'ADN polymérase
répllicative Pol ϵ chez *Saccharomyces
cerevisiae***

THÈSE dirigée par :

M. Bertrand CASTAING

Directeur de Recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Mme. Evelyne SAGE

Directeur de Recherche, CNRS Orsay

M. J. Pablo RADICELLA

Directeur de Recherche, CEA Fontenay-aux-Roses

JURY :

M. Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans

Mme. Evelyne SAGE

Directeur de Recherche, CNRS Orsay

M. J. Pablo RADICELLA

Directeur de Recherche, CEA Fontenay-aux-Roses

Mme. Marie-Josèphe GIRAUD-PANIS

Directeur de Recherche, CNRS Nice

M. Didier GASPARUTTO

Directeur de Recherche, CEA Grenoble

M. Bertrand CASTAING

Directeur de Recherche, CNRS Orléans

Remerciements

J'adresse tous mes remerciements à Madame Evelyne Sage et Monsieur J. Pablo Radicella pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier Madame Marie-Josèphe Giraud-Panis, Monsieur Alain Legrand et Monsieur Didier Gasparutto de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je remercie Monsieur Jean-Claude Beloeil et Madame Eva Jakab-Toth, directeurs successifs du Centre de Biophysique Moléculaire durant ma thèse, de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Monsieur Bertrand Castaing, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance, conseillée, encouragée et soutenue tout au long de ma thèse. Merci pour sa patience et sa disponibilité. Je le remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à l'Université d'Orléans et de participer à des congrès nationaux et internationaux. J'espère vraiment ne pas l'avoir déçu car il aura vraiment été un chef à part, merci pour tout.

J'adresse un grand merci à Monsieur Serge Boiteux, qui est à l'origine de ce projet, pour sa grande expertise, ces précieux conseils et ces encouragements, ainsi qu'à Monsieur Lionel Gellon qui a initié ce travail il y a plusieurs années. Je remercie vivement Madame Claudine Dherin-Boiteux, sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est, merci pour tout son travail engagé dans les doubles-hybride notamment, son aide et ses conseils indispensables ainsi que sa bonne humeur contagieuse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'implication et l'aide de tous les membres de l'équipe. Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Françoise Culard. Une page entière ne suffirait pas à lui exprimer toute ma gratitude, mais puisqu'il faut être bref, je dirais qu'elle est de ces personnes que l'on est chanceux de rencontrer dans la vie, des personnes que l'on estime beaucoup, qui vous apporte beaucoup également et que l'on ne peut pas oublier. Un énorme merci à elle pour toute son aide, dans tous les aspects de ma thèse (et en particulier la partie fonctionnelle *in vitro* !), pour ses conseils, ses encouragements et tous ces bons moments partagés. Un aussi grand merci à Madame Martine Guérin, qui fut d'abord mon professeur, ma collègue ensuite et qui est mon amie aujourd'hui. Merci pour toute son aide, ses conseils et toutes ces vives et longues discussions que je n'oublierai pas. Elle a su me remotiver dans les moments où cela n'allait

pas, c'est un peu beaucoup grâce à elle si je suis allée au bout... merci encore. Je remercie également mon amie de toujours, Julie, de m'avoir aidé dans ce projet, tant dans les manip que dans la folle ambiance qui régnait dans le labo grâce à elle, merci pour tous nos fous rires. Je remercie chaleureusement tous les autres membres de l'équipe, Stéphane, Franck, Arthur, Rémy et Mélanie pour leur présence, leur soutien, leur aide, leurs conseils. Ce fut à la fois un honneur et un véritable plaisir de travailler auprès de personnes aussi compétentes et grandes humainement.

Je remercie aussi tous les membres du CBM pour la diversité et le partage des compétences ainsi que la très bonne ambiance générale régnant au CBM. Un merci particulier à tous les doctorants également.

Je tiens aussi à remercier mes amis, Jamila, Vanessa, Hayat, Tahera, Julie, Makhoulf et ceux que j'oublie, pour leurs conseils, leur soutien, leur relecture, leur présence tout simplement. Merci de m'avoir supportée tout ce temps et de continuer à le faire.

Je remercie du fond du cœur tous les membres de ma grande et belle famille sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Et tout particulièrement mes parents, que j'aime très fort. Cette thèse est avant tout pour vous.

Un grand merci, pour finir, à Celui à qui je dois tout.

Table des matières

I. Introduction

I.A. Réparation par excision de base ou BER

I.A.1. Généralités

I.A.2. Mécanisme d'action et acteurs du BER

I.A.2.a. Initiation du BER : les ADN glycosylases

I.A.2.b. Métabolisation des sites AP et extrémités modifiées de l'ADN

I.A.2.c. Resynthèse et restauration de la continuité du brin d'ADN

I.A.3. BER et mitochondries

I.A.4. Régulation du BER

I.A.5. BER : au-delà de la réparation de l'ADN

I.A.5.a. BER et immunité

I.A.5.b. BER et 5-méthylcytosine dans l'ADN

I.A.6. Défauts du BER et pathologies

I.B. Une lésion oxydative majeure : la 8-oxoguanine

I.B.1. Oxygène, ERO et stress oxydant

I.B.2. Lésion 8-oxoG : caractérisation

I.B.2.a. 8-oxoG : généralités

I.B.2.b. 8-oxoG et prise en charge : le système GO

I.B.2.c. Réparation de la 8-oxoG et cancer

I.C. La protéine 8-oxoG-ADN glycosylase 1 (ou Ogg1)

I.C.1. De l'identification de yOgg1 chez *S. cerevisiae* à la découverte de son homologue humain

I.C.2. Ogg1 : Spécificités de substrats

I.C.3. Mécanisme d'action de Ogg1

I.C.3.a. Caractéristiques structurales de Ogg1

I.C.3.b. Mécanisme catalytique de Ogg1

I.C.4. Quelles fonctions biologiques pour Ogg1

I.C.5. Ogg1, polymorphismes et cancer

I.D. Situation et projet de recherche

I.D.1. Etat de l'art : partenaires d'interaction physique et/ou fonctionnelle de Ogg1 chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae*

I.D.1.a. Chez l'Homme

I.D.1.b. Chez la levure *S. cerevisiae*

I.D.2. Projet de recherche

I.D.2.a. Eléments initiateurs du projet

I.D.2.b. L'ADN polymérase ϵ : nouveau partenaire de Ogg1 chez *S. cerevisiae* ?

II. Résultats

II.A. Interaction physique entre yOgg1 et yPol2

II.A.1. Mise en évidence *in vitro* d'une interaction physique entre yOgg1 et yPol2A par la technique de « pull-down » Ni-NTA

II.A.2. Obtention de yPol2C, un fragment stable de Pol2, pour une étude quantitative de l'interaction

II.A.3. yPol2 n'interagit pas avec les autres ADN glycosylases

II.A.4. yPol2 interagit physiquement avec hOgg1 *in vitro*

II.A.5. Conclusion

II.B. Cartographie des domaines mis en jeu dans l'interaction yOgg1/yPol2

II.B.1. Cartographie de yPol2

II.B.1.a. Rupture de colinéarité entre « double-hybride » et « pull-down » : le cas de yPol2C

II.B.1.b. Cartographie du domaine N-terminal de yPol2

II.B.2. Cartographie de yOgg1

II.B.2.a. Premiers enseignements apportés par les troncations de yOgg1

II.B.2.b. L'interaction de yOgg1 avec yPol2 est fortement corrélée à son activité catalytique
ADN glycosylase

II.B.3. Conclusion

II.C. Approches fonctionnelles *in vitro* de l'interaction yOgg1/yPol2

II.C.1. Effet de yPol2 sur l'activité de yOgg1

II.C.1.a. yPol2 stimule l'activité ADN glycosylase/AP lyase de yOgg1

II.C.1.b. yPol2 stimule l'activité AP lyase de yOgg1 mais ne stimule pas son activité ADN glycosylase

II.C.2. Effet de yPol2 sur la stabilité des complexes [yOgg1/ADN]

II.C.2.a. Durée de vie des complexes [yOgg1/produit de réaction] en présence de yPol2

II.C.2.b. yPol2 déstabilise les complexes [yOgg1/ADN]

II.C.3. Conclusion

III. Discussion et perspectives

III.A. Caractéristiques de l'interaction yOgg1/yPol2

III.B. Rôle putatif de l'interaction yOgg1/yPol2

III.B.1. Collaboration de Polε et yOgg1 dans la voie de réparation BER chez *S. cerevisiae*

III.B.2. Action conjointe de Polε et yOgg1 aux télomères

III.B.3. Interaction yOgg1/Polε et réplication de l'ADN

III.C. Perspectives de recherche

III.C.1. Poursuite de l'étude biochimique

III.C.2. Approche génétique

III.C.3. Approche structurale

IV. Matériel et méthodes

IV.A. Partenaires d'interaction : constructions plasmidiques et protéines

IV.A.1. 1^{er} partenaire : yOgg1

IV.A.1.a. Plasmides utilisés : pET30A et pTrc99

IV.A.1.b. Mutagenèse dirigée

IV.A.1.c. Production des protéines Ogg1 recombinantes

IV.A.1.d. Purification des protéines Ogg1 recombinantes

IV.A.2. 2nd partenaire : yPol2

IV.A.2.a. Plasmide utilisé : pGEX-6P2

IV.A.2.b. Mutagenèse dirigée

IV.A.2.c. Production des protéines yPol2 recombinantes

IV.A.2.d. Purification des protéines yPol2 recombinantes

IV.B. Interaction physique *in vivo* : « double-hybride »

IV.B.1. Principe

IV.B.2. Plasmides utilisés

IV.B.3. Protocole expérimental

IV.B.4. Mutagenèse dirigée et troncations

IV.C. Interaction physique *in vitro*: « pull-down »

IV.C.1. Test d'interaction *in vitro*

IV.C.1.a. Protocole classique

IV.C.1.b. En présence de Benzonase

IV.C.2. Analyse des éluats

IV.C.2.a. Révélation par Western Blot

IV.C.2.b. Révélation au bleu de Coomassie

IV.C.3. Quantification du signal d'interaction

IV.C.3.a. Quantification du signal protéique sur gel SDS PAGE

IV.C.3.b. Estimation de la quantité de 6His-yOgg1 fixée par volume de résine Ni-NTA

IV.C.3.c. Estimation de la quantité de GST-yPol2C capturée

IV.C.4. Test de « pull-down » en présence de compétiteurs

IV.C.4.a. Compétiteurs protéiques

IV.C.4.b. Compétiteurs nucléiques (ADN)

IV.D. Etudes biochimiques

IV.D.1. Marquage des oligo-nucléotides

IV.D.2. Analyse de l'activité catalytique de Ogg1

IV.D.3. Analyse de l'activité 3'→5' exonucléase de yPol2C

IV.D.4. Analyse par gel retard

IV.D.4.a. Durée de vie des complexes (yOgg1/ADN)

IV.D.4.b. Titrage de l'ADN par yOgg1 en présence ou en absence de yPol2C

IV.D.4.c. Quantité de complexes yOgg1/ADN après ajout de quantités croissantes d'ADN
« froid » ou de yPol2C compétiteur

V. Annexes

VI. Références bibliographiques

Abréviations

°C : degré Celsius	Cdc13 : Cell division cycle 13
¹ O ₂ : oxygène singulet	cDNA : complementary DNA
3'-OH : 3' Hydroxyle	Cg : cytosine-glycol
³² P : phosphate 32	CHRA : Chromatin accessibility complex
3D : 3 dimensions	CPD : dimère cyclobutane de pyrimidines
5'-dRP : 5'-désoxyribose phosphate	CpG : CG sites
5'-P : 5' Phosphate	CSB : Cockayne syndrome B
5-hmC : 5-hydroxy-méthylcytosine	CSR : Commutation de classe
5-hmU : 5-hydroxy-méthyluracile	Cst9 : Cystatin 9
5-meC : 5-méthylcytosine	CTD : C-Terminal domain
6-4 PP : photoproduit 6-4	Ctrl+ : contrôle positif
6His : 6 Histidine	Cys : Cystéine
8-oxoG : 7,8-dihydro-8-oxoguanine	dGMP : désoxyguanosine monophosphate
A : adénine	dGTP : désoxyguanosine triphosphate
AAG ou ANPG : 3-méthyladenine ADN-glycosylase	DHC : 5,6-dihydro-cytosine
AD: Activation Domain	DHT : 5,6-dihydro-thymine
ADN: acide désoxyribonucléique	DHU : 5,6-dihydro-uracile
ADN _m : ADN mitochondrial	Dm : Drosophila melanogaster
AGOG: Archaeal GO-Glycosylase	DME : Demeter
AID: activation-induced cytidine deaminase	DNMT : ADN méthyltransférases
AlkA, C, D : 3-méthyladénine ADN glycosylase	DNMT3a/b : DNA (cytosine 5)-methyltransferase 3a/b
II A, C et D	dNTPs : désoxyribonucléotides tri-phosphate
AP : sites apuriques/apyrimidiques	Dpb2, 3 et 4 : DNA Polymerase B subunit 2, 3 et 4
APE1 : apuriques/apyrimidiques endonucléase 1	DRR : direct reverse repair
Apn1 et Apn2 : AP endonucléases 1 et 2	ds : double-strand
APOBEC: apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide	E. coli : <i>Escherichia coli</i>
Arg: Arginine	E300A : Acide glutamique 300 Alanine
ARM domain: armadillo domain	E327N : Acide glutamique 327 Asparagine
ARN _t : acides ribonucléiques de transfert	EA : éthano-adénine
ATP: adenosine tri-phosphate	EC : éthano-cytosine
BD: Binding Domain	Ej : religation directe
BER: base excision repair	Eq : equation
Bt: Bos taurus	ERO : espèces réactives de l'oxygène
C : cytosine	exp : exponentielle
C ₀ : temps 0 de cinétique	FAP : polyposé familiale
C1' : Carbone 1	FapyA : 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
C245A : Cystéine 245 Alanine	Fapy-G : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
CacOgg1 : Clostridium acetobutylicum Ogg1	

FapyG : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
 FEN1: FLAP endonucléase 1
 FLAP: 5-lipoxygenase activating protein
 Fpg: formamidopyrimidine ADN glycosylase
 G: guanine
 Gim5: Gene involved in microtubule biogenesis 1
 Gly: Glycine
 GO: *guanine oxydée*
 Gre3 : Genes de Respuesta a Estres (stress responsive genes)
 GST : Glutathion STransférase
 H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
 H2TH : Hélice-2 Tours-Hélice
 hd : hémi-duplexe
 HEC : 3,N⁴-α-hydroxy-éthano-cytosine
 HFD: high-fat diet
 HhH GPD: Helix-hairpin-Helix
 His: Histidine
 HIV- : human immunodeficiency virus 1
 HMGB1: High Mobility Group protein B1
 Hmh: 5-hydroxy-5-méthyle-hydantoïne
 hMLH1: human MutL Homolog 1
 hNEIL1, hNEIL2 et hNEIL3: human Nei endonuclease-like 1, 2 ou 3
 hOgg1: human *8-oxoguanine DNA glycosylase 1*
 HPC: hydroxy-propano-cytosine
 Hs: Homo sapiens
 HX: hypoxanthine
 Ig: immunoglobulines
 IT15: Huntington's disease gene 15
 Kap95: KaryoPherin 95
 kDa: kilodalton
 Lac Z: Lactose Z
 LOH: Loss Of Heterozygotity
 LP-BER: long-patch base excision repair
 LP-BER: long patch BER voie à brèches longues
 M : mitose
 Mag1 : 3-méthyladénine ADN glycosylase
 MAP: epistatic miniarray profile
 MBD4: methyl-CpG-binding domain 4
 Mg²⁺ : Magnesium

mM: millimolaire
 MMR : réparation des mésappariements mismatch repair
 MPG : 3-méthyl-ADN glycosylase
 MPT : modifications post-traductionnelles
 MTH1-2: MutT-homolog 1 -2
 MTS: mitochondrial matrix-targeting sequences
 Mug: mismatch-specific uracil-ADN glycosylase
 MutM: 8-oxoguanine-ADN glycosylase
 MutY : E.coli adénine-ADN glycosylase
 MYH: MutY-Homolog
 N134A: Asparagine 134 Alanine
 N135A: Asparagine 135 Alanine
 N136A: Asparagine 136 Alanine
 N7: Azote position 7
 NaBH₄ : borohydrure de sodium
 NAD(P)H : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 Nei: endonucléase VIII
 NER: nucleotide excision repair
 NHE: non homologous end joining
 Ni-NTA: Nickel-nitrilotriacetic acid
 NLS: nuclear localisation signal
 nM: nanoMolaire
 NOX: NAD(P)H oxydase membranaire
 NTD: N-Terminal Domain
 N-terminal: NH₂-terminal
 Ntg1 et Ntg2: Nth endonuclease-like 1 et 2
 Ntg1-2: Nth endonuclease-like 1-2
 O₂⁻ : anion superoxyde
 O₂ : dioxygène
 Ogg1: 8-oxoguanine ADN glycosylase 1
 OH: radical hydroxyl
 ORF: open reading frame
 P1 : proline N-terminale
 p53: protéine 53
 PARP-1 polymerase 1: poly-(ADP-ribose) polymerase 1
 PC: propano-cytosine
 PCNA: proliferating cell nuclear antigen
 PCR : Polymerase chain reaction
 Pfu : Pyrococcus furiosus
 pI : point Isoélectrique

PKC : protein kinase C
 pmol: picoMolaire
 PNK: polynucléotide kinase
 Pol I: ADN Polymerase I
 Pol β : ADN Polymerase β
 Pol λ : ADN Polymerase λ
 Pol ϵ : ADN Polymerase ϵ
 PTH: parathyroïde
 Rad9-Rad1: RADiation sensitive 9 - 1
 RER : respiratory exchange ratio
 RH : recombinaison homologue
 RI : radiations ionisantes
 Rim1 : Replication In Mitochondria 1
 ROS1: repressor of silencing 1
 RPA: protéine réplivative A
 S: Synthèse
 Sc: *Saccharomyces cerevisiae*
 SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate
 polyacrilamide gel electrophoresis
 Ser: Serine
 Sgf11: SAGA associated factor 11
 SHM: hypermutation somatique
 Sir 2: Silent information regulator 2
 SIRT6: Sirtuin 6
 SMUG1: single-strand-selective-
 monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
 SNP: single nucleotide polymorphism
 SP-BER: short patch BER voie à brèches
 courtes
 SPH : Chromatographie échangeuse de cations
 Sulfopropyl-High Performance.
 ss: simple-brin
 Ssl1: Suppressor of stem-loop 1
 T : thymine
 Taf12: TATA Box Binding Protein Associated
 Factor 12
 TBE: Tris Borate EDTA
 TC-NER: Transcription Coupled NER
 TDG: Thymine DNA Glycosylase
 TDP1: Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
 TET: Ten eleven translocation
 Tg : thymine-glycol
 THF: tétrahydrofurane
 TNR: trinucleotide repeat expansion
 TOP1: l'ADN topoisomérase I
 U (benzonase): Unité
 UBL: ubiquitine-like
 UDG: Uracyl DNA Glycosylase
 Ug : uracile-glycol
 Ume6: Unscheduled Meiotic gene Expression
 6
 Ung1: uracil-ADN glycosylase 1
 UV: ultraviolet
 V322G: Valine 322 Glycine
 Vpr: Viral protein R
 W98: Tryptophane 98
 WB: Western Blot
 wt: wild type
 Xl: *Xenopus laevis*
 XPC : *Xeroderma Pigmentosum*
 complementation group C
 XRCC1 : X-ray repair cross-complementing
 protein 1
 yDH : yeast Double Hybride

Index des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau 1 : Les principaux acteurs du BER chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et l'Homme (p.18).

Tableau 2 : Spécificités de substrat et redondance des ADN glycosylases (p.24).

Tableau 3 : La régulation des protéines du BER (p.31).

Tableau 4 : Pathologies liées à un BER nucléaire défectueux chez l'Homme (p.37).

Tableau 5 : Protéines impliquées dans l'élimination de la 8-oxoG chez l'Homme (p.47).

Tableau 6 : Partenaires d'interaction de Ogg1 (p.65).

Tableau 7 : Partenaires d'interactions physiques de l'ADN polymérase répllicative ϵ (p.71).

Tableau 8 : Récapitulatif des mutants ponctuels de γ Ogg1 testés en interaction avec γ Pol2 en γ DH (p.109).

Tableau 9 : Constantes de vitesse calculées à partir des cinétiques des activités ADN glycosylase/AP lyase, AP lyase et ADN glycosylase de γ Ogg1, en absence et en présence de γ Pol2C (en conditions de *multi-turnover*) (p.126).

Tableau 10 : Temps de demi-vie et vitesses de dissociation associées mesurées relatives à la figure 38 (p.132).

Figures

Figure 1 : Dommages de l'ADN, réparation et conséquences (p.15).

Figure 2 : Le système BER dans les cellules de mammifères (p.17).

Figure 3 : Mécanisme d'action des ADN glycosylases mono- et bi-fonctionnelles (p.20).

Figure 4 : Les trois principales superfamilles structurales d'ADN glycosylases : représentations de quelques structures, libres ou complexées à l'ADN (p.21).

Figure 5 : Métabolisation des sites AP et extrémités modifiées de l'ADN (p.26).

Figure 6 : Le BER chez *S. cerevisiae* (p.28).

Figure 7 : La lésion 8-oxoG (p.44).

Figure 8 : Le système GO procaryote (p.45).

Figure 9 : Le système GO chez *S. cerevisiae* (p.46).

Figure 10 : Organisation génomique du gène humain *OGG1* (p.53).

Figure 11 : Alignement des structures primaires des protéines Ogg1 chez différentes espèces (p.55).

Figure 12 : Structure cristallographique d'un complexe entre hOgg1 et un duplexe d'ADN contenant une 8-oxoG (p.57).

Figure 13 : Recherche par « double-hybride » chez *S. cerevisiae* de partenaires putatifs de γ Ogg1 (p.68).

Figure 14 : L'ADN polymérase répliquative ϵ chez *S. cerevisiae* (p.72).

Figure 15 : Matériel biologique utilisé dans les expériences de « pull-down » (p.81).

Figure 16 : Expérience de « pull-down » entre 6His-yOgg1 et GST-yPol2A (p.84).

Figure 17 : Considérations structurales pour l'obtention de yPol2C, un fragment de yPol2 stable incluant yPol2A (p.86).

Figure 18 : yPol2C, un domaine stable de yPol2 qui interagit avec yOgg1 (p.87).

Figure 19 : yPol2 interagit de façon singulière avec yOgg1 chez *S. cerevisiae* (p.89).

Figure 20 : Expérience de « pull-down » entre 6HIS-hOgg1 et GST-yPol2A (p.90).

Figure 21 : Fragments de yPol2 testés par « double-hybride » (p.93).

Figure 22 : Comparaison structurale entre la Pfu et la Rb69 fixées sur un hémi-duplexe d'ADN (p.96).

Figure 23 : Analyse structurale des troncations dans le domaine N-terminal de yPol2 (p.97).

Figure 24 : Cas particulier du mutant exonucléase yPol2-4 (p.100).

Figure 25 : Analyse par « double-hybride » de différentes formes tronquées de yOgg1 (p.103).

Figure 26 : Eléments structuraux de Ogg1 (p.106).

Figure 27 : Acides aminés de la poche du site actif de yOgg1 impliqués dans la reconnaissance de la 8-oxoG et de la cytosine qui lui est opposée et dans l'excision de la 8-oxoG (p.108).

Figure 28 : Analyse du lien entre activité 8-oxoG ADN glycosylase et interaction en yDH de différentes formes mutées de la protéine DC44-Wt-yOgg1 (p.113).

Figure 29 : Visualisation des mutations ponctuelles testées par « double-hybride » sur la structure de hOgg1 (p.114).

Figure 30 : Cas particulier du mutant catalytique yOgg1-K241Q (p.115).

Figure 31 : Expérience de « pull-down » entre 6His-yOgg1 et GST-yPol2C en présence de Benzonase (p.117).

Figure 32 : Représentation schématique de la mesure des activités de yOgg1 (p.121).

Figure 33 : Analyse au cours du temps de l'activité ADN glycosylase/AP lyase de yOgg1 en présence et en absence de yPol2C en conditions de multi-turnover (p.124).

Figure 34 : Analyse au cours du temps de l'activité AP lyase de yOgg1 en présence et en absence de yPol2C en conditions de multi-turnover (p.127).

Figure 35 : Analyse au cours du temps de l'activité ADN glycosylase de yOgg1 en présence et en absence de yPol2C en conditions de multi-turnover (p.128).

Figure 36 : Analyse au cours du temps de l'activité ADN glycosylase/AP lyase de yOgg1 en présence et en absence de yPol2C en conditions de single-turnover (p.130).

Figure 37 : Analogues de produits de réaction utilisés dans cette étude (p.132).

Figure 38 : Durée de vie du complexe [yOgg1/3'-THF-ADN] en présence de yPol2C déterminée par gel retard (p.133).

Figure 39 : Le fragment de yPol2, yPol2C est associé à une activité 3'→5' exonucléase (p.135).

Figure 40 : Titration d'un duplexe d'ADN contenant un THF par yOgg1 en présence ou en absence de yPol2C (p.137).

Figure 41 : Compétition entre yPol2C et l'ADN pour la fixation de yOgg1 (p.139).

Figure 42 : Proposition d'un modèle fonctionnel de l'interaction yOgg1/Polε dans la voie BER de *S. cerevisiae* (p.149).

Figure 43 : Proposition d'un modèle impliquant une interaction fonctionnelle entre yOgg1 et Polε, jouant un rôle dans la réplication de l'ADN au niveau d'une lésion 8-oxoG (p. 157).

I. Introduction

I.A. Réparation par excision de base ou BER

I.B. Une lésion oxydative majeure : la 8-oxoguanine

I.C. La protéine 8-oxoG-ADN glycosylase 1 (ou Ogg1)

I.D. Situation et projet de recherche

Avant-propos

Chaque jour, chaque cellule de l'organisme est soumise à de multiples attaques d'origine endogène et environnementale qui génèrent plusieurs milliers de lésions dans l'ADN nucléaire et mitochondrial (SAGE 1999; BOITEUX 2002). Les espèces réactives de l'oxygène ERO, (le radical hydroxyl $\cdot\text{OH}$, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, l'anion superoxyde O_2^- ...), les agents carcinogènes (tabac, aflatoxine, etc.), les radiations ultraviolettes (UV) de la lumière solaire, les radiations ionisantes (RI) d'origine naturelle (radioactivité terrestre) ou générées par l'activité humaine (médecine nucléaire, stockage de déchets, production d'énergie) sont autant de facteurs à l'origine de ces lésions (BOITEUX 2002; VAN LOON *et al.* 2010). Ces dernières, parmi lesquelles les cassures simple ou double brin de l'ADN, les pontages inter/intra-brin, les dimères de pyrimidine, les adduits ainsi que les modifications de base (oxydation, alkylation, etc.) contribuent, de par leur caractère potentiellement mutagène, à une instabilité du génome. Le paradoxe apparent entre la formation de ces milliers de lésions et la stabilité observée de l'information génétique au cours des générations est résolu par la présence de systèmes moléculaires de détection et élimination des altérations de l'ADN (réparation), qui diffèrent selon le type de lésions à réparer (**Figure 1**).

Dans leurs principes de base, les principaux systèmes de réparation de l'ADN ont été conservés de la bactérie jusqu'à l'Homme et comprennent la réversion directe du dommage (DRR pour « direct reversal repair»), la réparation des cassures double brin par religation directe (NHEJ pour « non homologous end joining ») ou par recombinaison homologue (RH) et la réparation par « excision et resynthèse ». Chez tous les organismes vivants, la réparation par excision-resynthèse est elle-même subdivisée en 3 systèmes : la réparation des mésappariements (MMR pour « mismatch repair »), la réparation par excision de nucléotides (NER pour « nucleotide excision repair ») et la réparation par excision de base (BER pour « base excision repair ») (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013).

Néanmoins, l'abondance de ces attaques génotoxiques, associée à un défaut des systèmes de réparation, conduit à une accumulation graduelle de mutations dans l'ADN et favorise ainsi le développement de nombreux processus pathologiques (**Figure 1**). Parmi les dommages de l'ADN les plus fréquents, ceux générés par les ERO ont été impliqués dans le cancer, le vieillissement, les maladies neurodégénératives et l'arthrite rhumatoïde (WISEMAN and HALLIWELL 1996; KIRKINEZOS and MORAES 2001; PETERSEN *et al.* 2005; WARIS and AHSAN 2006).

Les ERO sont considérées comme les agents toxiques endogènes les plus abondants chez les organismes aérobies dont les mammifères (BREEN and MURPHY 1995; BECKMAN and AMES 1997) et génèrent une multitude de lésions de l'ADN, de type bases oxydées, sites abasiques ou cassures simple- et double-brin, et de nature cytotoxique et /ou mutagène (FRIEDBERG *et al.* 2004; HAZRA *et al.* 2007; KRYSTON *et al.* 2011) (**Annexe 1**). Dans leur grande majorité, ces lésions dues aux ERO sont éliminées *via* le BER, mécanisme de réparation clef et véritable garant de l'information génétique.

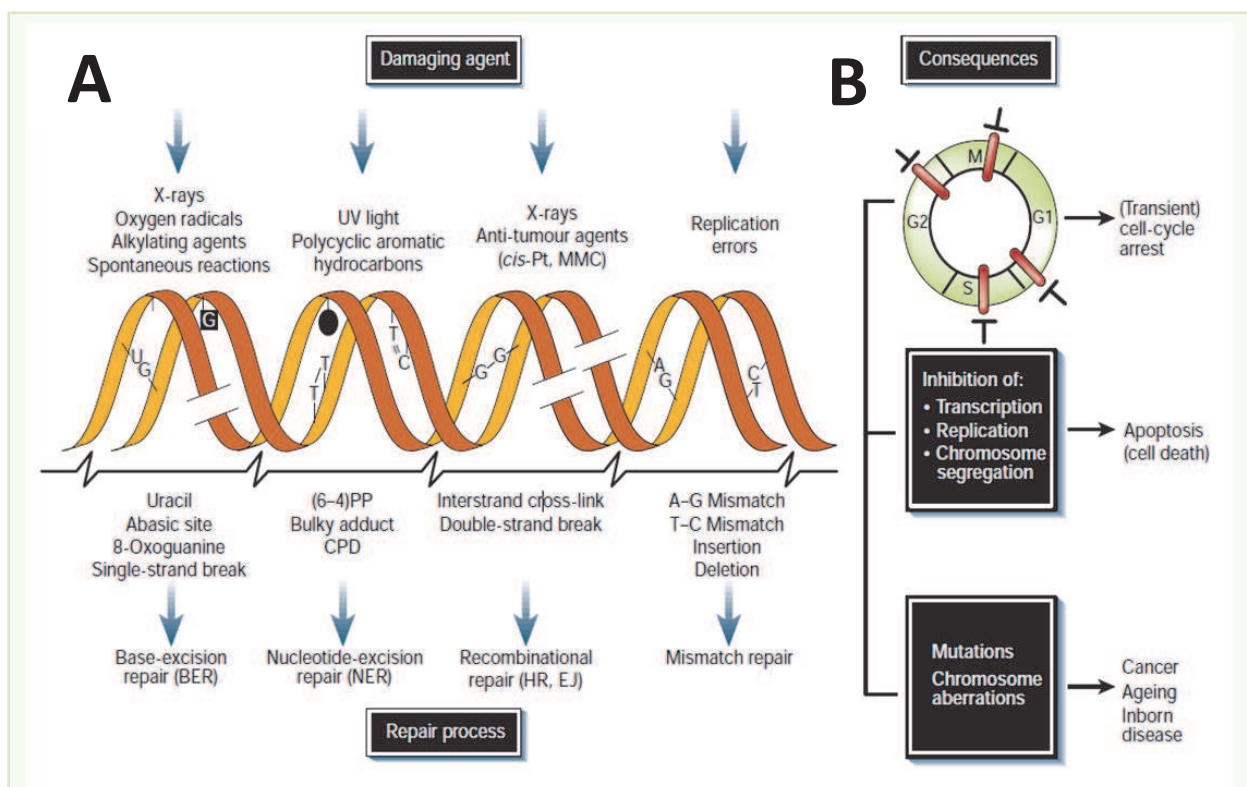


Figure 1 Dommages de l'ADN, réparation et conséquences (HOEIJMAKERS 2001)

A, Agents génotoxiques (haut) ; exemples de lésions de l'ADN induites par ces agents (milieu) ; et mécanismes principaux de réparation de l'ADN en charge de l'élimination de ces lésions (bas). **B**, Effets des dommages de l'ADN sur la progression du cycle cellulaire, conduisant à l'arrêt transitoire en phase G1, S, G2 et M (haut), et sur le métabolisme de l'ADN (milieu). Les conséquences à long-terme des lésions de l'ADN (bas) comptent les changements permanents de la séquence d'ADN (mutations ponctuelles sur des gènes seuls ou aberrations chromosomiques impliquant plusieurs gènes) et leurs effets biologiques. Abréviations : *cis*-Pt et MMC, cisplatine et mitomycine C, respectivement (agents pontants de l'ADN) ; (6-4)PP et CPD, photoproduit 6-4 et dimère cyclobutane de pyrimidines, respectivement (induits *via* les rayonnements UV) ; BER et NER, réparation par excision de base et de nucléotide, respectivement ; HR, recombinaison homologue ; EJ, religation directe.

Partie I.A.

Réparation par excision de base ou BER

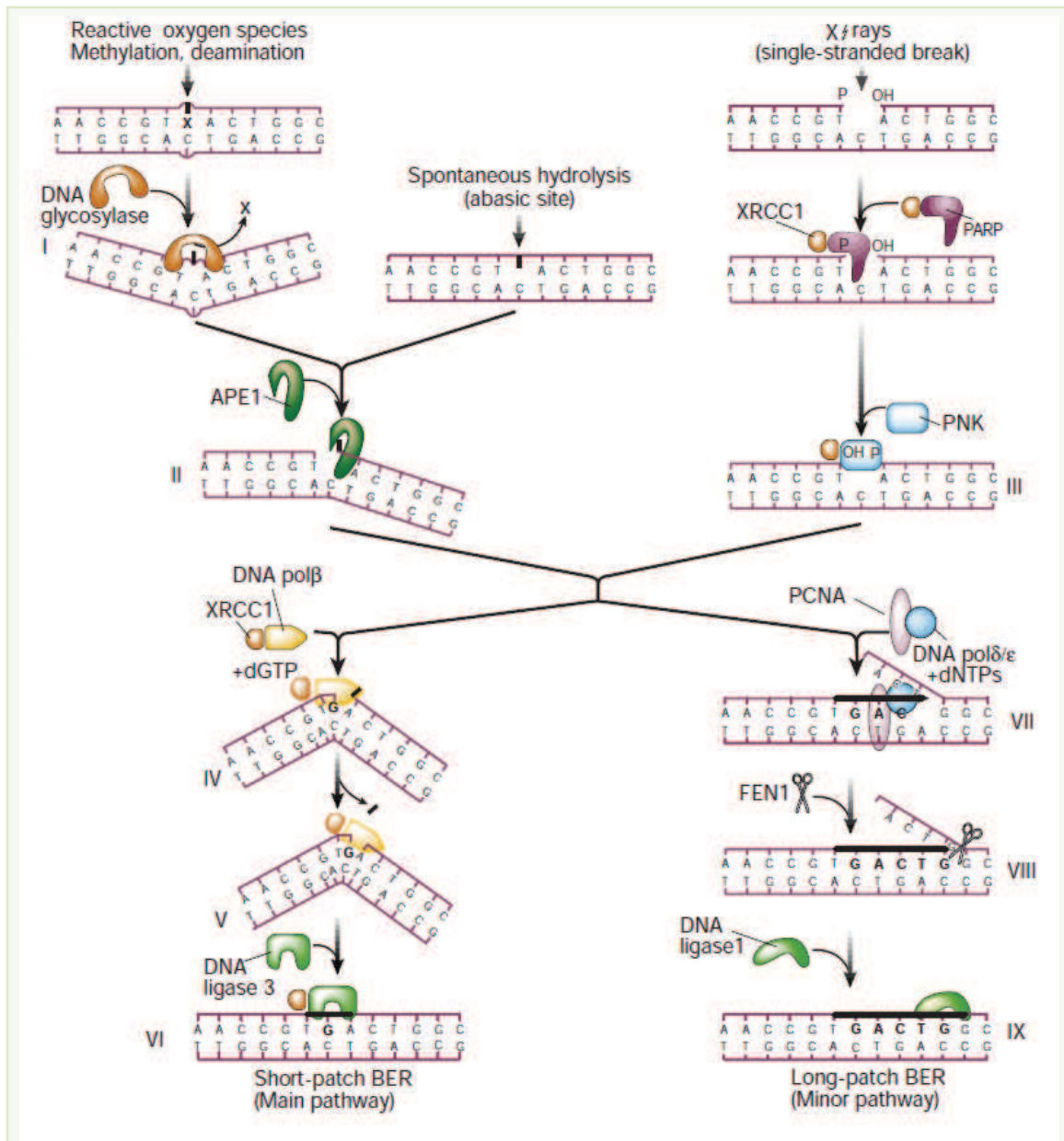


Figure 2 Le système BER dans les cellules de mammifères (HOEIJMAKERS 2001).

On peut distinguer une voie majoritaire SP-BER (pour « short-patch BER » ou voie brèches courtes, remplacement de 1 nucléotide) et une voie minoritaire LP-BER (pour « long-patch BER » ou voie brèches longues, remplacement de 2 à 10 nucléotides).

I.A. Réparation par excision de base ou BER

I.A.1. Généralités

La réparation par excision de base ou BER est une voie majeure de réparation, nécessaire au développement normal et dont les dysfonctionnements ont été associés à des pathologies dont les troubles neurologiques et les cancers. Voie principale de réparation des lésions endogènes et des lésions induites par les RI, le BER prend en charge des dommages de l'ADN très divers (**Annexe 1**) (FROMME and VERDINE 2004). Cela représente chez l'Homme près de 30000 lésions par cellule et par jour (FRIEDBERG *et al.* 2006): désamination hydrolytique (uracile, hypoxanthine, etc.), oxydation (8-oxoguanine), alkylation (7-méthylguanine, 3-méthyladénine), dégradation et perte de bases (formylamine, oxazolone, hydanthoïnes, site abasique ...) ainsi que cassures simple-brin de l'ADN (FROMME and VERDINE 2004).

Le BER est un système de réparation très conservé depuis la bactérie jusqu'à l'Homme (**Tableau 1**). Bien que mettant en jeu des protéines différentes (**Tableau 1**), on retrouve, chez toutes les espèces, une voie BER, plus ou moins complexe, avec un même cheminement enzymatique caractérisé par 5 étapes distinctes (**Figure 2**).

	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
DNA glycosylases			
Uracil-DNA glycosylase superfamily	Ung Mug	Ung1p	UNG TDG SMUG1
Nth superfamily	Nth MutY AlkA	Ntg1p, Ntg2p Ogg1p Mag1p	NTHL1 MUTYH OGG1 MBD4
Fpg superfamily	Tag Fpg, Nei		NEIL1, NEIL2, NEIL3
Others			MPG
AP endonucleases			
Xth family	Xth	Apn2p	APEX1, APEX2
Nfo family	Nfo	Apn1p	
PALF family			PALF
DNA polymerases*			
Family A	Pol I	Pol γ	Pol γ
Family B		Pol δ , Pol α (?), Pol ϵ (?)	Pol δ , Pol ϵ , Pol α (?), Pol ζ (?)
Family X			Pol β , Pol λ
DNA ligases			
NAD ⁺ -dependent	LigA		
ATP-dependent		Cdc9p	Lig I, Lig III α
Other proteins			
Flap endonuclease		Rad27p	FEN1
3'-phosphodiesterase		Rad1p-Rad10p, Mus81p-Mms4p	
XRCC1			XRCC1
PARP			PARP1
PCNA*		Pol30p	PCNA
9-1-1 complex*		Ddc1p-Rad17p-Mec3p	RAD9B-RAD1-HUS1
RFC*		RFC	RFC

Tableau 1 Les principaux acteurs du BER chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et l'Homme (ZHARKOV 2008).

Le BER est assuré par l'action successive de 4 catégories d'enzymes: ADN glycosylases, AP endonucléases, ADN polymérases et ADN ligases, aidées de protéines accessoires.

Le BER est initié par la reconnaissance spécifique et l'excision de la base endommagée par une ADN glycosylase *via* la coupure de la liaison *N*-glycosidique entre la base anormale et le squelette phosphate-sucre de l'ADN, générant ainsi un site abasique (AP) intermédiaire. Ce site AP résultant est ensuite reconnu par une AP endonucléase ou une AP lyase qui clive le lien phosphodiester en 5' (hydrolyse) ou en 3' (β -élimination) du site AP, respectivement, pour générer une cassure simple-brin présentant une extrémité non-canonique, qui peut dans certains cas s'avérer bloquante. Aussi cela est-il suivi d'une étape de « nettoyage des extrémités », indispensable à l'étape finale de resynthèse-ligation. Cette-dernière est assurée par une ADN polymérase (remplissage de la lacune ou gap) suivie par la restauration de la continuité du brin d'ADN par une ADN ligase, celles-ci aidées de facteurs accessoires (**Figure 2**) (KIM and WILSON 2012). C'est donc en tirant pleinement avantage de la structure bi-caténaire auto-complémentaire de la double-hélice de l'ADN que le BER opère une réparation fidèle.

I.A.2. Mécanisme d'action et acteurs du BER

I.A.2.a. Initiation du BER : les ADN glycosylases

Au vu de l'accumulation importante des dommages oxydatifs dans la cellule et du rôle essentiel joué par la voie BER dans leur réparation, les ADN glycosylases apparaissent donc comme des facteurs clefs dans le maintien de l'intégrité du génome.

Présentes chez tous les organismes vivants, ces enzymes, généralement de petite taille (20 à 45kDa), initient le processus de réparation en excisant la base lésée *via* la catalyse de la rupture de la liaison *N*-glycosidique entre la base et le sucre (2'-désoxyribose), générant un site abasique (HEGDE *et al.* 2008; DALHUS *et al.* 2009; ROBERTSON *et al.* 2009; FRIEDMAN and STIVERS 2010; KIM and WILSON 2012) (**Figure 3**). La localisation et la reconnaissance de la base endommagée se fait par l'ADN glycosylase elle-même qui, après fixation dans le petit sillon de l'ADN, va parcourir celui-ci et générer une courbure à l'endroit du dommage (FRIEDMAN and STIVERS 2010). Cette distorsion de l'ADN centrée sur le nucléoside endommagé induit son extrusion (par l'ouverture de la paire de base associée à la lésion) en dehors de la double hélice de l'ADN *via* le grand sillon de l'ADN et, sa stabilisation dans la poche du site actif de l'enzyme. Cette conformation permet en effet de rendre accessible le C1' de la lésion pour l'attaque nucléophile catalysée par l'ADN glycosylase (dans l'ADN, le C1' cible n'est pas

accessible sans « l'éversion » du nucléoside endommagé). De plus, des résidus de l'enzyme s'intercalent dans la double hélice en comblant l'espace créé par l'extrusion de la lésion, contribuant ainsi à maintenir en position extra-hélicale le nucléoside endommagé et à empêcher à la fois le retour de la lésion dans la double hélice de l'ADN et l'effondrement de la structure locale de l'ADN (KIM and WILSON 2012). Le mécanisme d'action des ADN glycosylases est permis par la flexibilité locale de l'ADN qui va après la courbure de l'ADN induite par l'enzyme faciliter l'extraction de la lésion hors de l'hélice de l'ADN et donc la formation d'un complexe catalytiquement actif. Il peut être noté que la nature des paires de bases environnant la base lésée peut moduler l'efficacité des ADN glycosylases (SEIBERT *et al.* 2002; KIM and WILSON 2012).

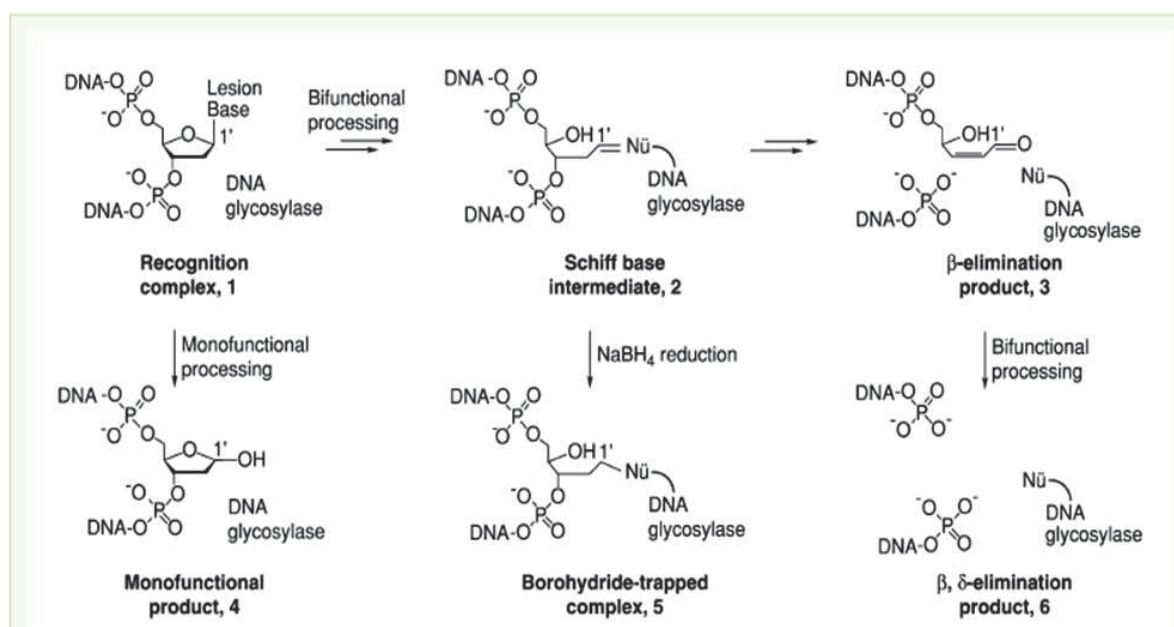


Figure 3 Mécanisme d'action des ADN glycosylases mono- et bi-fonctionnelles (FROMME and VERDINE 2004).

Formation d'un complexe de reconnaissance de la lésion (1) suivi dans le cas des ADN glycosylases monofonctionnelles de la formation d'un site abasique (4) et pour les ADN glycosylases bi-fonctionnelles de la formation d'un intermédiaire de type base de Schiff (2), générant ensuite un clivage en 3' (3) ou 3' et 5' (6) du brin d'ADN. L'intermédiaire (2) peut être stabilisé par l'action d'un agent réducteur tel que le borohydure de sodium (NaBH₄).

Ces enzymes se classifient en deux grandes catégories fonctionnelles en se basant sur leur mécanisme catalytique. Les ADN glycosylases dites monofonctionnelles clivent la liaison N-glycosidique en utilisant une molécule d'eau comme nucléophile, générant ainsi un site abasique, similaire à celui formé lors de la dépurination ou la dépyrimidination spontanée de l'ADN (Figure 3) (FROMME and VERDINE 2004; KIM and WILSON 2012). A la différence de celles-ci, les ADN glycosylases/AP lyases dites bi-fonctionnelles utilisent un groupement amino de

la protéine comme nucléophile pour l'attaque de la liaison N-glycosidique. Elles forment ainsi un intermédiaire covalent de type base de Schiff qui subit une β - ou une β,δ -élimination catalysée par l'enzyme, permettant au final le clivage de la liaison phosphodiester en 3' ou en 3' et 5' du site AP généré, respectivement (**Figure 3**) (FROMME and VERDINE 2004; KIM and WILSON 2012). Cette incision du site AP crée une rupture de la continuité de l'ADN aux extrémités non-canoniques qui empêchent l'action de l'ADN polymérase, aussi sont-elles prises en charge dans une étape ultérieure dite de « nettoyage des extrémités » (voir II.2.c) (ZHARKOV 2008). Une particularité des ADN glycosylases bi-fonctionnelles réside dans la formation d'un intermédiaire réactionnel covalent de type « imino » entre une amine réactive de l'enzyme et le C1' du site abasique. Cet intermédiaire peut être facilement mis en évidence en le stabilisant de façon irréversible par réduction au borohydrure de sodium (**Figure 3**) (FROMME and VERDINE 2004).

On distingue également les ADN glycosylases sur la base de motifs structuraux communs identifiés en particulier par la résolution de leurs structures tridimensionnelles. Il existe ainsi six superfamilles structurales d'ADN glycosylases (**Figure 4**) (HUFFMAN *et al.* 2005).

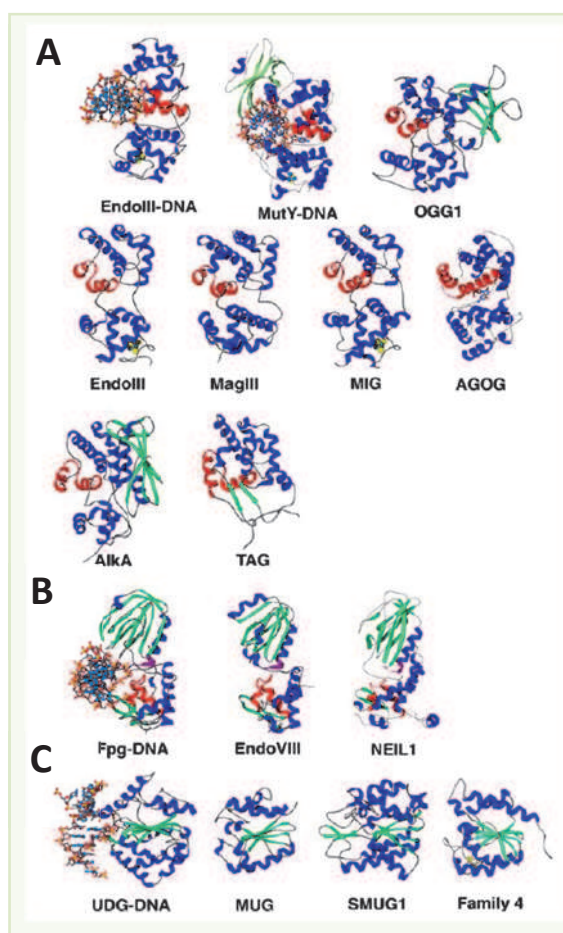


Figure 4 Les trois principales superfamilles structurales d'ADN glycosylases: représentations de quelques structures, libres ou complexées à l'ADN (HUFFMAN *et al.* 2005).

A Superfamille HhH-GPD: le motif HhH est en rouge, les hélices- α en bleu et les feuillets- β en turquoise. **B** Super famille H2TH: le motif H2TH est coloré en rouge et l'extrémité N-terminales en violet. **C** Superfamille de l'UDG.

La superfamille structurale HhH-GPD est considérée comme la plus importante et la plus variée d'un point de vue fonctionnel. Son nom fait référence au domaine particulier qui la caractérise : un motif de fixation non-spécifique à l'ADN (HhH, Helix-hairpin-Helix) suivi d'une boucle riche en glycines (G) et prolines (P) ainsi que d'un aspartate (D) important pour l'activité catalytique et situé à une vingtaine de résidus en C-terminal du motif HhH. Egalement appelée superfamille Nth, elle comprend les ADN glycosylases (mono ou bi-fonctionnelles) Nth (ou endonucléase III), MutY (ou *E.coli* adénine-ADN glycosylase) et AlkA (ou 3-méthyladénine ADN glycosylase II) chez *E.coli*, Ntg1 et 2 (pour « Nth endonuclease-like 1 et 2 »), Ogg1 (pour « 8-oxoguanine ADN glycosylase ») et Mag1 (pour « 3-méthyladénine ADN glycosylase ») chez *S.cerevisiae* et leurs homologues NTH1, MUTYH et OGG1 chez l'Homme. Celles-ci prennent en charge une grande variété de lésions (oxydation, alkylation, désamination) (JACOBS and SCHAR 2012).

Une deuxième superfamille structurale est définie par la présence de 2 domaines d'interaction avec l'ADN : en général un motif de type doigt à zinc et d'un motif Hélice-2 Tours-Hélice (H2TH), d'où le nom de superfamille H2TH (aussi dénommée par d'autres auteurs la superfamille structurale Fpg/Nei). Elle présente également une extrémité N-terminale conservée et impliquée dans l'activité catalytique (le nucléophile catalytique étant la proline N-terminale, P1). Parmi les ADN glycosylases de cette superfamille, on peut citer les protéines Fpg (pour « formamidopyrimidine ADN glycosylase » ou MutM) et Nei (ou endonucléase VIII) chez *E.coli*, et hNEIL1, hNEIL2 et hNEIL3 (pour « human Nei endonuclease-like 1, 2 ou 3 ») chez l'Homme. Elles sont en charge de la réparation d'une grande diversité de bases oxydées (ZHARKOV 2008; ROBERTSON *et al.* 2009; KIM and WILSON 2012). Les ADN glycosylases H2TH sont toutes bi-fonctionnelles (Glycosylase/lyase) et associées à une activité AP lyase particulière qui clive en 3' et en 5' le site abasique (β,δ -élimination) générant ainsi dans l'ADN une lacune de 1 nucléoside. Il est intéressant de noter que cette classe d'enzymes est complètement absente chez *S. cerevisiae* alors que l'on en retrouve au moins trois représentants chez l'Homme (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013).

La 3^{ème} superfamille structurale, dite de l'UDG, comprend quand à elle des enzymes toutes monofonctionnelles, ne partageant qu'une faible homologie de séquence mais qui possèdent toutes un repliement caractéristique α/β , constitué d'un feuillet- β vrillé à quatre brins parallèles entouré d'hélices- α . Elles correspondent chez *E.coli* aux protéines Ung (pour « uracil-ADN glycosylase ») et Mug (pour « mismatch-specific uracil-ADN glycosylase »), à

Ung1p chez *S.cerevisiae* et aux glycosylases UNG, TDG (pour « thymine ADN glycosylase »), SMUG1 (pour « single-strand-selective-monofunctional uracil-DNA glycosylase 1 »), MUG et MBD4 (pour « methyl-CpG-binding domain 4) chez l'Homme (ZHARKOV 2008; ROBERTSON *et al.* 2009; KIM and WILSON 2012). Elles permettent la reconnaissance dans l'ADN des uraciles et des thymines mal appariées. Elles catalysent en effet de façon efficace l'excision de l'uracile d'un ADN simple brin ou d'un ADN double brin en face d'une guanine, d'une adénine ou contenu dans d'une séquence CpG (cible pour la méthylation de l'ADN, voir plus loin). Pour exemple, la protéine humaine UNG a un *turnover* très important, excisant près de 1000 résidus uracile par minute (ZHARKOV 2008; ROBERTSON *et al.* 2009; KIM and WILSON 2012).

La protéine AAG (ou ANPG), seule membre d'une quatrième superfamille structurale, est une ADN glycosylase monofonctionnelle eucaryote réparant les bases alkylées de l'ADN et caractérisée par un feuillet- β antiparallèle entouré d'hélices- α (HOLLIS *et al.* 2000; SEDGWICK *et al.* 2007).

La cinquième superfamille structurale est constituée des protéines AlkC et AlkD issues de *Bacillus cereus*. Elles présentent un repliement de type superhélice α - α (ALSETH *et al.* 2006).

Pour finir, l'endonucléase V issue du bactériophage T4, une ADN glycosylase bi-fonctionnelle en charge de l'excision des dimères de pyrimidine, n'a pas d'homologue structural et définit donc à elle seule la sixième et dernière superfamille caractérisée par un domaine unique et compact, structuré en hélices- α (**Tableau 2** et **Figure 4**).

Cette grande diversité des ADN glycosylases n'explique pas à elle seule l'efficacité de la voie BER. Celle-ci réside également dans la présence, depuis la bactérie jusqu'à l'Homme, de systèmes redondants pour l'élimination des lésions: une même lésion peut ainsi être excisée par différentes ADN glycosylases, de même qu'une ADN glycosylase peut généralement éliminer une grande variété de lésions (**Tableau 2**) (KRZAWICZ *et al.* 2007; ZHARKOV 2008). On retrouve, même au sein d'une même famille ou superfamille structurale, des ADN glycosylases aux spécificités de substrats très différentes. Un grand nombre d'ADN glycosylases semble donc initier cette voie par excision de base *via* la reconnaissance de dommages très variés de l'ADN et ceci de manière efficace.

Superfamille structurale	Nom	Famille fonctionnelle (type d'élimination si bi-fonctionnelle)	Substrats connus
ADN glycosylases bactériennes			
UDG	Ung	Monofonctionnelle	5-OH-U; 5,6-OH-U; U dans ADN sb et db
	Mug	Monofonctionnelle	EC; HEC; PC; HPC; εG; 5-OH-C; 5-OH-U; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; U et T appariés à G; εC
HhH-GPD	Nth	Bi-fonctionnelle (β)	Ug; 5-OH-C; 5-OH-U; DHU; Tg; DHT; hmh; 5-OH-DHT; 6-OH-DHT; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; 6-OH-DHC; 6-OH-DHU; 5-OH-DHU; diOHC; diOHU; FapyA; εA à cycle ouvert
	MutY	Monofonctionnelle	A appariés à 8-oxo-G, G et C; 2-oxo-A appariée à G
	AlkA	Monofonctionnelle	εG; εA; EA; 3-Me-A; 3-Me-G; O2-Me-C; O2-Me-T; 7-Me-A; 7-Me-G; 8-Me-G; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; HX; X
	Tag	Monofonctionnelle	3-Me-A; 3-Me-G; 7-Me-G
Fpg/Nei	Fpg	Bi-fonctionnelle (β,δ)	8-oxo-G; FapyG; Me-FapyG; oxazalone; FapyA; 5-OH-C; 5-OH-U; Tg; DHT; hmh; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; Ug; εA2; εA3
	Nei	Bi-fonctionnelle (β,δ)	8-oxo-G; FapyA; Tg; 5-OH-DHT; 5-OH-DHU; hmh; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; Ug; 5-OH-U; 5-OH-C; DHT; DHU; 5-OH-DHU; diOH-U; diOH-C
AlkC/AlkD	AlkC	Monofonctionnelle	3-Me-A; 3-Me-G; 7-Me-G
	AlkD	Monofonctionnelle	3-Me-A; 3-Me-G; 7-Me-G
ADN glycosylases de levure <i>S. cerevisiae</i>			
UDG	Ung1p	Monofonctionnelle	U dans ADN sb et db
HhH-GPD	Ntg1p	Bi-fonctionnelle (β)	Me-FapyG ; DHU ; Thymine glycols ; sites AP ; FapyA ; FapyG ; 8-oxo-G/G
	Ntg2p	Bi-fonctionnelle (β)	Me-FapyG ; DHU ; Thymine glycols ; sites AP ; FapyA ; FapyG
	Ogg1p (ou yOgg1)	Bi-fonctionnelle	Me-FapyG ; 8-oxoG ; sites AP ; FapyG, 8-oxoA/C
	Mag1p	Monofonctionnelle	3-Me-A ; 7-Me-G ; HX ; εA
ADN glycosylases humaines			
UDG	UNG	Monofonctionnelle	U dans ADN sb et db; 5-OH-U.
	TDG	Monofonctionnelle	U et T appariés à G; εC
	SMUG1	Monofonctionnelle	U dans ADN sb et db; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; 5-OH-U; 5-Fluoro-U; εC; T
HhH-GPD	Ogg1	Bi-fonctionnelle (β)	Me-FapyG; FapyG; 8-oxo-G; 8-oxo-A
	MYH	Monofonctionnelle	A appariés à 8-oxo-G, G et C; 2-oxo-A appariée à G
	MBD4	Monofonctionnelle	U et T; 5-OH-Me-U; 5-Formyl-U; 5-Me-C; 5-Fluoro-U
	NTH1	Bi-fonctionnelle (β)	5-OH-C; Tg; 5-OH-U; DHU; FapyG; 5-Formyl-U; Cg; DHT; 5-OH-DHT
Fpg/Nei	NEIL1	Bi-fonctionnelle (β,δ)	8-oxo-G; Tg; 5-OH-C; 5-OH-U; DHU; FapyA; FapyG; Me-FapyG; DHT
	NEIL2	Bi-fonctionnelle (β,δ)	5-OH-U; DHU; 5-OH-C; DHT; Tg; 8-oxo-G
	NEIL3	Bi-fonctionnelle (β)	FapyG
AAG	AAG	Monofonctionnelle	3-Me-A; 7-Me-A; 3-Me-G; 7-Me-G; εG; εA; EA; HX; 8-oxo-G

Tableau 2 *Spécificités de substrat et redondance des ADN glycosylases* (KRWAWICZ et al. 2007; ZHARKOV 2008)
 Signification de l'abréviation de certaines lésions, peu explicites : 3,N⁴-éthéno-cytosine (εC); 1,N⁶-éthéno-adénine (εA); éthéno-guanines (εG); éthano-adénine (EA); éthano-cytosine (EC); hypoxanthine (HX); thymine-glycol (Tg); cytosine-glycol (Cg); uracile-glycol (Ug); 5,6-dihydro-thymine (DHT); 5,6-dihydro-uracile (DHU); 5,6-dihydro-cytosine (DHC); 3,N⁴-α-hydroxy-éthano-cytosine (HEC); propano-cytosine (PC); hydroxy-propano-cytosine (HPC); 5-hydroxy-5-méthyle-hydantoïne (hmh); dérivés d'oxydation de l'éthénoadénine à cycle fermé (εA2) ou ouvert (εA3) (voir **Annexe 1** pour la structure de ces substrats).

I.A.2.b. Métabolisation des sites AP et extrémités modifiées de l'ADN

L'action des ADN glycosylases mono- et bi-fonctionnelles génère des sites AP ou des extrémités 5' et/ou 3' modifiées dans l'ADN, intermédiaires très mutagènes s'ils venaient à ne pas être réparés. Après l'excision de la base lésée par une ADN glycosylase monofonctionnelle, une AP endonucléase clive le site AP en 5', générant une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-dRP (pour « 5'-désoxyribose phosphate »). Les ADN glycosylases bi-fonctionnelles génèrent quant à elles directement des extrémités 3' non-canoniques de type 3'-dRP ou 3'-P du fait de leur activité AP lyase (simple clivage en 3' du site AP par β -élimination ou double clivage en 3' puis 5' du site AP par β,δ -élimination) (**Figure 2**). Les extrémités non-canoniques des cassures simple-brin générées par les AP lyases ne constituent donc pas directement des substrats pour le système de resynthèse du BER. Il est à noter que de telles extrémités modifiées de l'ADN peuvent également résulter de modifications chimiques directes dues aux ERO, aux radiations ionisantes, aux drogues anti-tumorales ou encore de l'activité abortive de certaines enzymes telle que l'ADN topoisomérase I (TOP1) dans les cellules humaines (LE BIHAN 2009). Afin de restaurer des lacunes à extrémités 3'-OH et 5'-P normales (pouvant être comblées par les ADN polymérases impliquées dans le BER), les organismes procaryotes et eucaryotes font appel à un grand nombre de protéines différentes parmi lesquelles les AP endonucléases (BOITEUX and GUILLET 2004).

Les AP endonucléases prennent en charge ces extrémités modifiées de l'ADN en générant des extrémités 3'-OH *via* deux mécanismes différents: (i) le clivage hydrolytique de la liaison phosphodiester en 5' d'un site AP intact ce qui va donner des extrémités 5'-dRP et 3'-OH et (ii) l'élimination des extrémités 3'-dRP et 3'-P de part leur activité 3'-phosphodiesterase et 3'-phosphatase, respectivement (**Figure 5**) (FROMME and VERDINE 2004). En effet, les AP endonucléases de *E.coli*, Xth et Nfo, se chargent efficacement de l'excision des sites AP et de l'élimination des produits de β - et β,δ -élimination des ADN glycosylases bi-fonctionnelles (**Figure 5**) (ZHARKOV 2008; KIM and WILSON 2012). APE1, qui est l'AP endonucléase majeure chez les mammifères, est également très efficace, excisant plus de 95% des sites AP et catalysant, en plus de son activité AP endonucléase, l'excision d'extrémités 3' bloquantes (**Figure 5**) (ZHARKOV 2008; KIM and WILSON 2012). Elle présente néanmoins une activité 3'-phosphatase réduite (à l'image d'APE2, l'autre AP endonucléase

humaine) qui est résolue par le recrutement de la polynucléotide kinase (PNK), protéine aux activités 5'-kinase et 3'-phosphatase, qui va traiter les extrémités 3'-P. Chez *S.cerevisiae*, ce sont les AP endonucléases homologues Apn1 et Apn2 qui se chargent de métaboliser les sites AP et d'éliminer les extrémités 3'-dRP bloquantes (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013). Chez les eucaryotes, de nombreuses autres protéines sont impliquées dans ce processus de « nettoyage des extrémités ». Pour exemple, chez l'Homme, l'ADN polymérase β a, en plus de son activité polymérase, une activité dRP-lyase intrinsèque (**Figure 2**). Elle permet d'éliminer les extrémités 5'-dRP, générant un 5'-P reconnu par elle-même pour combler la lacune par son activité ADN polymérase non-processive de type « gap-filling » ou par la ligase pour restaurer la continuité du brin d'ADN clivé. Les ADN polymérases λ (Pol λ) et ι (Pol ι) ont également une activité 5'-dRPase, clivant les extrémités 5'-dRP qui résultent de l'action d'APE1 (ZHARKOV 2008; KIM and WILSON 2012). Aussi, la FLAP endonucléase 1 (FEN1) humaine enlève, par son activité endonucléase, les extrémités flottantes contenant un 5'-dRP dans la voie à brèches longues du BER (LP-BER), tout comme cela est observé chez *S.cerevisiae* avec la 5'-Flap endonucléase Rad27. Autre exemple, la protéine HMGB1 de mammifère posséderait elle aussi une (faible) activité 5'-dRP-lyase et stimulerait l'activité des AP endonucléases et de FEN1 (PRASAD *et al.* 2007).

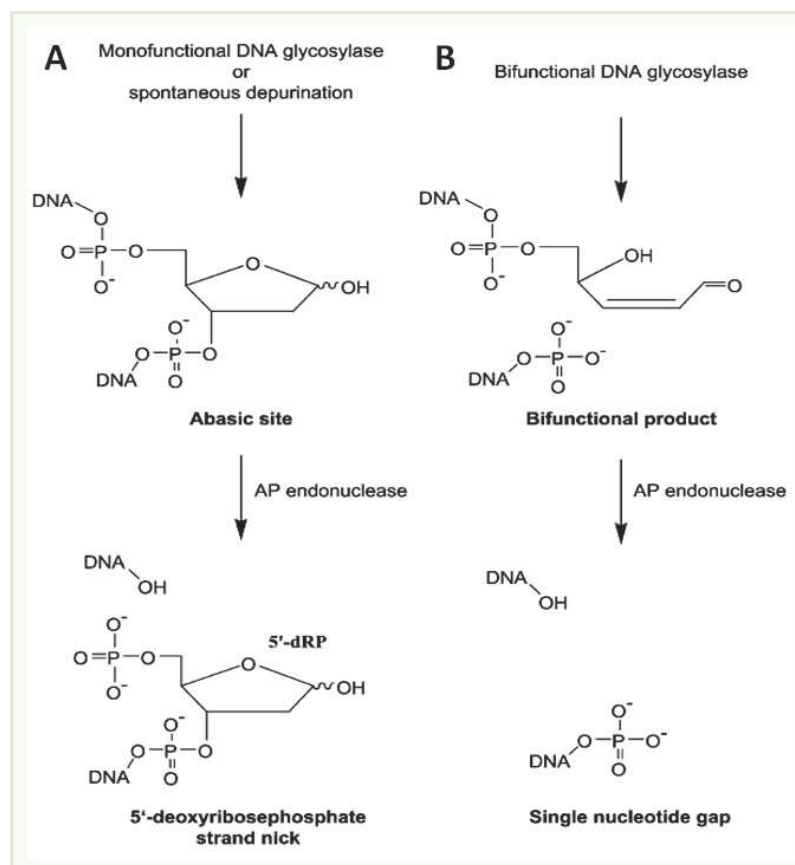


Figure 5 Métabolisation des sites AP et extrémités modifiées de l'ADN (FROMME and VERDINE 2004)

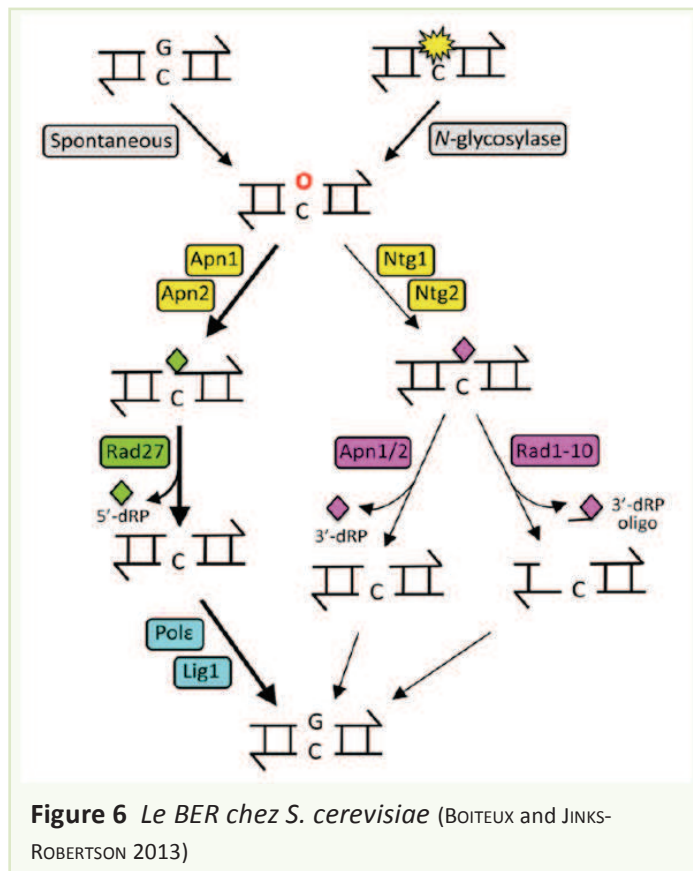
A En agissant sur un site AP intact, l'AP endonucléase génère des extrémités 5'-dRP et 3'-OH, par clivage hydrolytique de la liaison phosphodiester en 5'. **B** En parallèle, elle se charge de l'élimination des produits de β - et β,δ -élimination des ADN glycosylases bi-fonctionnelles, créant une lacune d'un nucléotide.

I.A.2.c. Resynthèse et restauration de la continuité du brin d'ADN

Une fois le nucléosi(ti)de endommagé correctement excisé, une ADN polymérase est en charge de combler la lacune ou « gap » résultante *via* le processus de resynthèse. Pour cela, elle utilise une extrémité 3'-OH et une matrice d'ADN non modifiée. Deux voies de resynthèse ont été décrites dans le cas du BER pour la correction du dommage (**Figure 2**). Dans la voie majoritaire, appelée « short patch BER » (SP-BER, voie à brèches courtes), le remplacement du nucléotide manquant est fait par la Pol I procaryote ou l'ADN polymérase β humaine (en association avec le facteur XRCC1 pour « X-ray repair cross-complementing protein 1 »). L'ADN ligase III α eucaryote ou la ligase I bactérienne prennent en charge la restauration de la continuité du brin d'ADN. Chez l'Homme, la Pol λ peut remplacer Pol β mais est beaucoup moins efficace. Une autre voie, annexe, appelée « long patch BER » (LP-BER, voie à brèches longues), implique la synthèse de plusieurs nucléotides (2 à 6 nucléotides après la lésion) par les ADN polymérases répliquatives δ et ϵ associées au facteur de processivité PCNA (pour « proliferating cell nuclear antigen »), qui déplacent le brin à l'extrémité 5' de la cassure. Le brin pendant est ensuite éliminé spécifiquement par FEN1 et l'ADN ligase restaure au final la continuité du brin d'ADN (**Figure 2**) (FROMME and VERDINE 2004; ZHARKOV 2008; KIM and WILSON 2012). Pol β , qui peut également synthétiser l'ADN par déplacement de brin, peut potentiellement agir dans les deux voies du BER (BEARD *et al.* 2006).

Le choix de la cellule de s'engager dans la voie à brèches courtes ou longues du BER dépend de la concentration en ATP, de la nature de la lésion, des interactions protéines/protéines, du stade du cycle cellulaire ou de l'état de différenciation de la cellule (FORTINI and DOGLIOTTI 2007). De manière générale, c'est la voie SP-BER qui prédomine. Celle-ci serait exclusivement utilisée dans l'excision de bases médiée par des ADN glycosylases/AP lyases. La voie LP-BER servirait donc en quelque sorte de voie de remplacement et serait essentielle à l'élimination des sites abasiques modifiés résistants à l'activité dRP lyase de la Pol β (SCHARER and JIRICNY 2001).

Il convient de préciser que pour le BER de la levure *S. cerevisiae*, qui requiert également les cinq étapes enzymatiques majeures décrites ci-dessus, on ne parle pas vraiment de voie SP-



ou LP-BER. Néanmoins, on distingue bien deux voies dans la prise en charge des sites AP générés spontanément ou *via* l'action des ADN glycosylases monofonctionnelles (Ung1 et Mag1) ou bi-fonctionnelles (Ntg1, Ntg2 et Ogg1) (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013). Dans une première voie majoritaire, ce sont les AP endonucléases Apn1 et Apn2 qui clivent la liaison phosphodiester en 5' du site AP générant une extrémité 5'-dRP qui sera prise en charge par la 5'Flap endonucléase Rad27. Dans

une voie parallèle, les ADN glycosylases (Ogg1, Ntg1 et Ntg2) clivent le site AP en 3', l'extrémité 3'-dRP résultante est éliminée *via* l'activité 3'-phosphodiesterase des protéines Apn1 et Apn2 ou *via* le complexe Rad1-Rad10 (**Figure 6**) (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013). Dans les deux cas, c'est Pol ε, l'ADN polymérase principale du BER chez la levure, qui se charge de l'étape de resynthèse avant la religation du brin par l'ADN ligase I. L'ADN polymérase δ pourrait également être impliquée (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013).

I.A.3. BER et mitochondries

La voie de réparation du BER est assurée de façon toute aussi importante dans la mitochondrie. On compte jusqu'à plusieurs milliers de mitochondries par cellule chez les mammifères, qui contiennent elles-mêmes de deux à cinq copies d'un ADN_m (pour « ADN mitochondrial ») super-enroulé. Celui-ci n'est pas protégé par des histones et est associé à la membrane interne des mitochondries. Il est donc situé à proximité de la chaîne respiratoire génératrice d'ERO et est particulièrement sensible aux dommages. Le taux de dommages

oxydatifs est ainsi plus élevé dans la mitochondrie que dans le noyau (MAYNARD *et al.* 2009). Alors que l'on suggérerait au départ une absence de mécanismes de réparation dans la mitochondrie, on y identifiera plus tard plusieurs protéines du BER, témoignant de la prise en charge de dommages de l'ADN_m par cette voie. De manière générale, celles-ci sont identiques ou sont des isoformes des protéines nucléaires (MAYNARD *et al.* 2009). La protéine humaine nucléaire NTH1 est ainsi retrouvée dans la mitochondrie du fait de son signal de localisation mitochondrial (TAKAO *et al.* 1998). L'épissage alternatif des gènes *MYH* et *UNG* génèrent respectivement des adénine- et des uraciles-ADN glycosylases nucléaires et mitochondriales (NILSEN *et al.* 1997; OHTSUBO *et al.* 2000). L'épissage alternatif du gène *OGG1* chez l'Homme produit quant à lui deux isoformes α et β , la protéine β -OGG1 étant exclusivement localisée aux mitochondries tandis que α -OGG1 est retrouvée dans les deux compartiments (HASHIGUCHI *et al.* 2004). L'AP endonucléase APE1 est également retrouvée dans la mitochondrie, sous une forme tronquée en N-terminale (CHATTOPADHYAY *et al.* 2006). Enfin, des études *in vitro* ont montré que la seule ADN polymérase présente dans la mitochondrie, Pol γ , aurait, en plus de son activité polymérase, une activité dRP-lyase (LONGLEY *et al.* 1998) l'impliquant comme l'enzyme principale dans l'étape de resynthèse de la voie BER mitochondriale.

Toutes ces protéines du BER, de quelque organisme que ce soit, agissant dans le noyau et/ou dans les autres organelles contenant de l'ADN, à différentes étapes du processus de réparation, sont au centre d'un système complexe de régulation essentiel à leur stabilité et à leur bon fonctionnement.

I.A.4. Régulation du BER

Le BER est un mécanisme régulé, et ceci *via* différents mécanismes : contrôle de la transcription, modifications post-traductionnelles, localisation protéique et interactions protéine/protéine (**Tableau 3**) (SWARTZLANDER *et al.* 2012; PARSONS and DIANOV 2013).

La régulation des protéines du BER peut se faire *via* le contrôle du taux de transcrits. Celui-ci peut être dépendant du cycle cellulaire. Pour exemple, il a été observé une augmentation de deux à trois fois du taux de transcrits pour MPG, UNG et APE1 durant la phase G1 et une diminution après la mitose (BOUZIANE *et al.* 2000; SWARTZLANDER *et al.* 2012). Le taux de transcrits de protéines du BER peut aussi varier en réponse à un stress oxydant :

on observe une augmentation de trois fois du nombre d'ARN messagers (ARN_m) de NTH1, OGG1 et APE1 après une exposition à des ERO (peroxyde d'hydrogène et autres) (**Tableau 3**) (SWARTZLANDER *et al.* 2012).

Les modifications post-traductionnelles des protéines du BER, de type phosphorylation, acétylation, nitrosylation et ubiquitination, contribuent également à leur régulation (**Tableau 3**). Pour exemple, l'acétylation de la protéine hNEIL2 réduit significativement ses deux activités glycosylase et AP lyase tandis que l'acétylation d'hOGG1 diminue son affinité pour les sites AP mais augmente son turnover et sa stimulation par APE1 (BHAKAT *et al.* 2006; SWARTZLANDER *et al.* 2012).

La localisation protéique est une autre voie cruciale de régulation du BER dans la mesure où les protéines du BER se doivent d'atteindre l'ADN à réparer afin d'y assurer leurs fonctions. Ainsi, la quasi-totalité de ces protéines possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) leur permettant de fixer spécifiquement les récepteurs NLS (ou Importine α) du cytoplasme et ainsi être importées au noyau *via* les pores nucléaires. De même, les protéines du BER agissant dans le génome mitochondrial possèdent des séquences d'adressage à la mitochondrie MTS (pour « mitochondrial matrix-targeting sequences ») de 10 à 80 acides aminés, situées en N-terminal et qui forment des hélices- α reconnues par les translocases membranaires mitochondriales. La localisation est un facteur de régulation d'autant plus significatif des protéines du BER qu'il dépend également d'interactions protéine/protéine et des modifications post-traductionnelles faisant suite à des stimuli particuliers. On parle de localisation dynamique : suite à l'identification du dommage, les acteurs appropriés du BER sont mobilisés à son endroit (SWARTZLANDER *et al.* 2012). Pour exemple, la protéine de levure Ntg1, colocalisée dans le noyau et les mitochondries à l'état basal, est majoritairement présente dans le noyau après un stress oxydant nucléaire alors qu'elle se concentre plus dans les mitochondries quand le stress oxydant est mitochondrial (GRIFFITHS *et al.* 2009; SWARTZLANDER *et al.* 2012).

Protéine	Organisme	Gène	MPT	Partenaire Interaction physique et/ou fonctionnel	Niveau Transcrits	Localisation
Uracil-ADN glycosylase	<i>S.cerevisiae</i>	UNG1	-	-	↑ en phase G1	Nuc et Mito
	Homme	UNG	Phos	RPA, XRCC1 et PCNA	↑ en phases G1 et S, forme mito ↑ en présence de ERO	Nuc (UNG2) et Mito (UNG1)
3-méthyl-ADN glycosylase	<i>S. cerevisiae</i>	SMUG1	-	-	-	Nuc
	Homme	MAG1	-	-	en réponse aux agents alkylants et UV	Nuc
Endonucléase III/ thymine glycol ADN glycosylase	Homme	MPG	Acetyl	Hhr23, XRCC1 et ERα	↑ en phase G1	Nuc
	<i>S. cerevisiae</i>	NTG1	Sumo	-	↑ en réponse à la ménadione	Nuc et Mito
Endonucléase VIII-like	<i>S. cerevisiae</i>	NTG2	Sumo	MLH1	-	Nuc
	Homme	NTHL1	-	XPG, XRCC1 et YB-1	↑ en phases G1 et S	Nuc et Mito
8-oxoguanine ADN glycosylase	Homme	NEIL1	-	FEN1 et XRCC1	↑ en phase S	Nuc et Mito
	Homme	NEIL2	Acetyl	p300 et XRCC1	pas dépendant du cycle cell.	Nuc
A-G-mismatch ADN glycosylase	Homme	NEIL3	-	RPA	-	Nuc
	<i>S.cerevisiae</i>	OGG1	-	-	-	Nuc et Mito
G-T-mismatch ADN glycosylase	Homme	hOGG1	Phos, acetyl et nitro	XRCC1, APE1, XPC, p300/CBP, Rad52, PARP1, PKC, Rad9-Rad1-HUS1	pas dépendant du cycle cell. ↑ en réponse aux ERO	Nuc et Mito
	Homme	MUTYH	Phos	APEX1, PCNA, RPA, Rad9-Rad1-HUS1 et MSH6	↑ en phase S	Nuc et Mito
AP endonucléase	Homme	MBD4	-	MLH1, SIN3A, HDAC1	-	Nuc
	Homme	TDG	Acetyl et Sumo	APEX1, CBP, p300, DNMT3A, DNMT3B, RXR, RAR, SCR1, p53, p73α, p63γ, ERα, Rad9 et XPC	pas dépendant du cycle cell.	Nuc
X-ray repair cross complementing group 1	<i>S. cerevisiae</i>	APN1	-	PIR1	-	Nuc et Mito
	<i>S. cerevisiae</i>	APN2	-	POL30	↑ en réponse aux agents alkylants	Nuc
Poly (ADP-ribose) polymérase	Homme	APE1	Acetyl, Phos, Ub et Nitro	Stimule activité glycosylase de UNG1, SMUG, NTHL1, OGG1 et TDG Associé à MUTYH, TDG, XRCC1, HSP70, p53, PCNA, LIG1, FEN1 et WRN	↑ en phase G1 et en réponse aux ERO	Nuc et Mito
	Homme	APE2	-	PCNA	-	Nuc et Mito
Flap endonucléase	Homme	XRCC1	Phos	OGG1, NTHL1, NEIL1/2, MPG, Polβ, LIG3, PARP1, PARP2, UNG2, PNK, CK2, TDP1, ATPX, PCNA et APE1	↑ en phase S	Nuc
	Homme	PARP1	Phos, Sumo, et Acetyl	LIG3, XRCC1, Polβ	-	Nuc
Proliférating cell nuclear antigen	<i>S.cerevisiae</i>	RAD27	-	Pol4 et DNL4/LIF1	↑ En phase G1 et en réponse aux agents alkylants	Nuc et Mito
	Homme	FEN1	Phos, Acetyl et Methyl	PCNA, WRN, CDK1, CDK2 NEIL1, LIG1, p300 et APE1	↑ dans cellules en mitose et ↓ dans cellules stationnaires	Nuc et Mito
	<i>S. cerevisiae</i>	POL30	Ub et Sumo	APN2	↑ en phases G1 et S	Nuc
	Homme	PCNA	Ub, Acetyl et Sumo	MUTYH, p21, Polβ, XRCC1, FEN1, LIG1, APE1	↑ en phase S	Nuc

Tableau 3 La régulation des protéines du BER (SWARTZLANDER et al. 2012).

La régulation des protéines du BER se fait à différents niveaux : modifications post-traductionnelles ou MPT (phosphorylation (phos), acétylation (acetyl), sumoylation (sumo), ubiquitination (ub) ou méthylation (méthyl)), interaction protéine-protéine, niveau de transcrits et localisation cellulaire (Nuc : nucléaire ou Mito : mitochondriale). Les flèches indiquent soit une stimulation ou une inhibition du taux de transcrits.

Les interactions protéine/protéine impliquant les protéines du BER sont une voie de régulation toute aussi importante. Elles sont nombreuses et permettent à la fois d'augmenter l'efficacité de ces protéines et de lier le BER à d'autres mécanismes de réparation tels que le NER ou le MMR (**Tableau 3**) (FAN and WILSON 2005). Plusieurs ADN glycosylases humaines voient ainsi leur activité d'excision de base augmenter en présence d'APE1 (FAN and WILSON 2005); c'est le cas de la protéine OGG1 (voir chapitre OGG1). Il peut même s'agir d'interactions physiques, comme c'est le cas de la protéine d'échafaudage XRCC1 qui interagit avec de nombreuses ADN glycosylases et stimule leur activité (**Tableau 3**).

I.A.5. BER : au-delà de la réparation de l'ADN

Au-delà de leur rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome *via* la réparation d'une grande variété de dommages de l'ADN, les acteurs du BER sont d'autant plus primordiaux à la cellule qu'ils sont impliqués dans d'autres processus cellulaires, plus inattendus. La capacité des ADN glycosylases à reconnaître et à exciser des bases endommagées leur confère aussi la possibilité de modifier l'ADN à des endroits spécifiques en dehors des mécanismes de réparation. C'est le cas en particulier des ADN glycosylases de la superfamille des UDG qui sont impliquées dans des processus très variés : immunité innée, diversification des gènes d'immunoglobuline, régulation de l'expression génique et modifications épigénétiques (NEUBERGER *et al.* 2003; ZHARKOV 2008; JACOBS and SCHAR 2012).

I.A.5.a. BER et immunité

Les UDG joueraient en effet un rôle crucial dans le système immunitaire : dans la diversité des anticorps de l'immunité adaptative ainsi que dans l'immunité innée suite à une infection virale. Dans ces processus, leur action est initiée par la désamination des cytosines de l'ADN par une famille de protéines spécifiques, appelée APOBEC (pour « apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide ») parmi lesquelles AID (pour « activation-induced cytidine deaminase ») (ZHARKOV 2008; JACOBS and SCHAR 2012).

En convertissant les cytosines des gènes d'immunoglobulines (Ig) en uracile, la protéine AID permet l'initiation dans les lymphocytes B des mécanismes d'hypermutation somatique (SHM) et de commutation de classe (CSR) à l'origine de la diversification des gènes Ig et donc

des anticorps (NEUBERGER *et al.* 2003). Cela se ferait en étroite collaboration avec l'ADN glycosylase UNG2. On observe en effet une diminution très nette des processus de CSR et de SHM dans des cellules déficientes en UNG de patients et de souris atteints d'hyperglobulinémie monoclonale (IMAI *et al.* 2003; SARIBASAK *et al.* 2006). L'introduction de ces uraciles par AID conduirait au recrutement d'UNG2 qui exciserait les bases uraciles de l'ADN générant des sites AP, initiateurs de la SHM (les sites abasiques étant considérés comme des lésions mutagènes). L'initiation du CSR se ferait quant à elle après la formation de coupures propres de l'ADN *via* l'action conjointe des protéines AID, UNG2 et APE1 (la présence d'UNG2 étant nécessaire indépendamment de son activité ADN glycosylase) (ZHARKOV 2008; JACOBS and SCHAR 2012). Aussi, la présence résiduelle de CSR et de SHM dans des souris déficientes en UNG2 suggère la possible contribution d'autres UDG dans ces processus. C'est le cas de la protéine SMUG1 qui, surexprimée dans ces cellules, restaure partiellement les phénotypes CSR et SHM. Cela est néanmoins à nuancer au vu de la diminution observée de l'expression de SMUG1 dans les lymphocytes B après leur activation (JACOBS and SCHAR 2012).

La protéine UNG est également mise en jeu dans l'immunité innée où elle agit sur le cycle de vie des virus après infection. Certains virus comme les poxvirus et les virus de l'herpès expriment des UNG virales propres, à la structure et aux propriétés biochimiques proches des UNG cellulaires, et qui feraient partie du complexe fonctionnel réplcatif de ces virus (ZHARKOV 2008). La délétion du gène UNG supprime en effet la réplication des poxvirus et ceci indépendamment de l'activité ADN glycosylase d'UNG (CHEN *et al.* 2002). Dans les virus de l'herpès, UNG n'est pas critique à leur viabilité dans des cellules en division mais est requise dans des cellules au repos où le taux d'UNG est faible (CHEN *et al.* 2002). De plus, dans ces 2 types de virus, les protéines UNG interagissent physiquement avec les facteurs de processivité des ADN polymérases, argument de plus en faveur de leur rôle dans la réplication de ces virus (ZHARKOV 2008). Au contraire, dans le cas du rétrovirus HIV-1 (pour « human immunodeficiency virus 1 »), qui ne possède pas d'UNG propre, UNG affecterait le cycle de vie du virus différemment. Les UNG présentes dans les cellules infectées ou intégrées par le virus dans des particules virales se chargeraient d'une part, de protéger le génome viral en éliminant les résidus uraciles incorporés (du fait entre autres de la faible fidélité reverse transcriptase de HIV-1) tout en limitant d'autre part, la propagation du virus en collaborant étroitement avec les cytosines désaminases cellulaires (APOBEC3G chez

l'Homme) (YANG *et al.* 2007; ZHARKOV 2008; JACOBS and SCHAR 2012). Dans les cellules humaines infectées par HIV-1, la défense antivirale médiée par APOBEC3G *via* l'introduction de résidus uracile dans le génome du virus est en effet couplée à l'action d'UNG2 et d'une autre protéine du BER, l'AP endonucléase APE1. UNG2, en excisant les uraciles du génome viral, génèrerait ainsi des sites AP conduisant au final au clivage et donc à la dégradation de l'ADN viral par APE1 (YANG *et al.* 2007). La forte baisse de l'activité antivirale de APOBEC3G observée suite à l'inhibition et/ou à la diminution des protéines UNG2 ou APE1 vient appuyer cette hypothèse (YANG *et al.* 2007). De plus, l'expression par HIV-1 d'une protéine particulière (Vpr) ciblant la dégradation des uraciles ADN glycosylases UNG2 et SMUG1 (*via* le système ubiquitine-protéasome) suggère d'autant plus le rôle critique de l'excision des bases uraciles dans la défense antivirale (YANG *et al.* 2007; JACOBS and SCHAR 2012).

I.A.5.b. BER et 5-méthylcytosine dans l'ADN

La méthylation de l'ADN est, avec la modification des histones, le mécanisme au centre du contrôle de l'expression spécifique des gènes et des modifications épigénétiques. Chez les mammifères, la méthylation de la cytosine en 5-méthylcytosine (5-meC) dans l'ADN se fait principalement au niveau des résidus cytosine des îlots CpG et est sous le contrôle strict d'un ensemble de protéines méthylantes et déméthylantes. La méthylation (*de novo* et son maintien) de ces séquences CpG est assurée par des ADN méthyltransférases (DNMT) tandis que leur déméthylation fait l'objet de processus passifs (inhibition ou diminution de l'expression des DNMT pendant la réplication de l'ADN) et actifs (conversion enzymatique de la 5-meC en une cytosine C) (JACOBS and SCHAR 2012). La déméthylation dite active de ces îlots CpG pourrait se faire soit par (i) l'élimination directe du groupement méthyle, (ii) le remplacement de la 5-meC par une cytosine *via* la réparation par excision, ou (iii) la désamination ou l'oxydation de la 5-meC suivi du remplacement de la base par le BER.

Un nombre croissant d'études suggère en effet l'implication des ADN glycosylases dans le processus de déméthylation active. Pour exemple, on retrouve chez les plantes, en plus des ADN glycosylases classiques du BER, des glycosylases uniques dont DME (pour « Demeter ») et ROS1 (pour « repressor of silencing 1 »), capables de réguler l'expression de plusieurs gènes de l'endosperme des plantes en jouant sur l'état de méthylation de l'ADN. Ces ADN glycosylases bi-fonctionnelles proches de la superfamille HhH-GPD permettent en effet l'activation de gènes cibles en excisant les bases 5-meC de l'ADN (MORALES-RUIZ *et al.* 2006).

Chez l'Homme, on a reporté une activité 5-meC ADN glycosylase chez les protéines MBD4 et TDG (ZHU *et al.* 2000; ZHU *et al.* 2001; JACOBS and SCHAR 2012). Les études récentes suggèrent en effet que MBD4 serait impliquée dans la déméthylation des séquences méthylées de l'ADN dans le contexte d'activation des gènes du développement alors que TDG aurait pour rôle de protéger les séquences promotrices non méthylées du génome de toute nouvelle méthylation aberrante (JACOBS and SCHAR 2012). Cette nouvelle fonction assumée par ces ADN glycosylases serait permise soit par (i) l'existence de cofacteurs qui intensifieraient l'efficacité catalytique de ces ADN glycosylases ou (ii) la conversion des bases 5-meC en un substrat plus favorable (JACOBS and SCHAR 2012).

Allant dans le sens de cette première hypothèse, il a en effet été montré que la protéine MBD4, après stimulation hormonale, contrôlait l'activation du gène *PTH* (pour « parathyroïde ») *via* la déméthylation des îlots CpG de son promoteur *CYP27B1* et que la phosphorylation de MBD4 par PKC potentialiserait cette activité 5-meC glycosylase (KIM *et al.* 2009). On peut donc imaginer que des modifications post-traductionnelles des ADN glycosylases permettraient de « réveiller » leur activité de déméthylation dans des conditions spécifiques.

Cette activité pourrait également être révélée par une meilleure reconnaissance par les ADN glycosylases des cytosines à déméthyliser *via* la désamination ou l'oxydation de celles-ci. La désamination des 5-meC par AID générerait ainsi un mésappariement de base de type G-T pris en charge par MBD4 ou TDG. Le promoteur du gène codant pour le récepteur à l'œstrogène (pS2/TFF1) fait l'objet d'une méthylation/déméthylation cyclique médiée par la protéine TDG (KANGASPESKA *et al.* 2008; METIVIER *et al.* 2008). Aussi, dans les embryons de zebrafish, le produit de désamination par AID des cytosines méthylées est pris en charge par MBD4 (JACOBS and SCHAR 2012). La déméthylation oxydative de l'ADN serait une autre voie possible. L'oxydation des résidus 5-meC en résidus 5-hmC (5-hydroxy-méthylcytosine) par des hydroxylases (protéines TET chez les mammifères) permettrait la déméthylation passive de l'ADN *via* une inhibition des DNMT (VALINLUCK and SOWERS 2007). On peut également imaginer que les résidus 5-hmC soient substrats des ADN glycosylases bien que cette voie enzymatique reste à clarifier, aucune ADN glycosylase n'ayant pour le moment montré une telle activité. Aussi est-il plus probable que les 5-hydroxy-méthylcytosines soient converties en un autre intermédiaire, substrat des ADN glycosylases. En effet, la désamination des résidus 5-hmC par une désaminase spécifique de type AID génère des résidus 5-hmU (5-

hydroxy-méthyluracile) opposés à une guanine, substrats pour les protéines SMUG1 et TDG (BOORSTEIN *et al.* 2001; HARDELAND *et al.* 2003; CORTELLINO *et al.* 2011). De même, les résidus 5-formylcytosine et 5-carboxylcytosine, obtenus après oxydation *de novo* des résidus 5-hmC par les protéines TET, sont excisés par TDG (HE *et al.* 2011; ITO *et al.* 2011). Ces dernières voies hypothétiques de déméthylation active nécessitent néanmoins le couplage efficace des activités de désamination et/ou oxydation et de la voie de réparation BER, en particulier dans les régions très méthylées de l'ADN.

I.A.6. Défauts du BER et pathologies

Les défauts de réparation de la voie BER ont été associés à un certain nombre de pathologies humaines dont le vieillissement prématuré, les cancers et les maladies neurodégénératives (**Tableau 4**) (WILSON and BOHR 2007).

Le BER, comme tout mécanisme de réparation de l'ADN, contribue à la longévité et la viabilité cellulaire *via* le maintien de l'intégrité du génome. Les souris déficientes pour les systèmes de réparation vieillissent anormalement vite (LOMBARD *et al.* 2005). Il a donc été suggéré que des défauts du BER ou une diminution de prise en charge des dommages oxydatifs de l'ADN par cette voie seraient corrélés à un vieillissement prématuré et au développement de maladies liées à l'âge (WILSON and BOHR 2007). Chez la levure, des études génétiques révèlent l'importance du BER contre l'accumulation de mutations et dans le bon déroulement chronologique du cycle cellulaire (MACLEAN *et al.* 2003). Aussi, les souris déficientes en protéine SIRT6 (déacétylase homologue de Sir2 qui module l'acétylation des histones et régule ainsi la longévité cellulaire), qui présentent un phénotype dégénératif de type vieillissement accéléré, altération de la prolifération des cellules et augmentation de l'instabilité génomique, ont également une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène et au MMS, agents dont les dommages à l'ADN sont normalement éliminés *via* le BER (MOSTOSLAVSKY *et al.* 2006). Des études de complémentation montrent en effet que les cellules de ces souris seraient incapables de traiter les extrémités 5'-dRP générées par le BER. Le rôle de SIRT6 n'est pas clairement défini mais on suggère qu'elle soit importante dans l'accès des protéines du BER à la chromatine (WILSON and BOHR 2007).

Gene	Disease connection
MYH	Reduced-function mutants linked to FAP Increased tumorigenesis in knockout mice when combined with an OGG1 deficiency
OGG1	Possible relationship of specific mutants/variants, or loss of OGG1, with cancer proneness/susceptibility
UNG	Recessive mutations linked to HIGM Deficiency in rat hippocampal neurons results in increased spontaneous apoptosis Knockout mouse embryonic fibroblasts and primary cortical neurons are more susceptible to exposure to a nitric oxide donor and oxygen and glucose-deprivation, respectively Plays an important role during brain ischemia and reperfusion in knockout mice
AAG	Null mouse neuronal cells display increased sensitivity to genotoxic agents
APE1	Putative target of lead-related carcinogenesis Haploinsufficient mice exhibit increased spontaneous mutagenesis, and elevated cancer incidence in the face of oxidative stress Reduced expression in rat hippocampal or sensory neurons results in decreased viability following hydrogen peroxide treatment
POL β	Human tumors found to express amino acid variants with reduced polymerase fidelity, or deletion or truncation mutants that may act as dominant-negative forms - reduced fidelity variants induce cellular transformation Haploinsufficient mice exhibit elevated mutation frequencies following DNA-damaging agent exposure
XRCC1	Possible relationship of amino acid variants with disease susceptibility Indirectly connected to autosomal recessive spinocerebellar ataxias via interactions with TDP1 and Aprataxin
LIG1	Missense mutations linked to a single, disease patient (46BR fibroblast strain)
Where relevant, mouse studies are noted. See text for additional details.	

Tableau 4 Pathologies liées à un BER nucléaire défectueux chez l'Homme (WILSON and BOHR 2007).

Les défauts du BER et l'instabilité génomique résultante ont également été corrélés à une plus grande prédisposition aux cancers. L'étude de cas cliniques de polyposse familiale (FAP) montre des mutations au niveau du gène MYH (homologue humain de MutY), associées à une haute fréquence de transversion GC vers TA (AL-TASSAN *et al.* 2002). L'analyse biochimique de ces formes mutées de MYH, qui montre une diminution de 6 à 90 fois de leur activité d'excision, relie BER défectueux et prédisposition à la formation de tumeurs chez l'Homme (AL-TASSAN *et al.* 2002). Plus particulièrement, étant donnée l'interaction de MYH avec les protéines APE1, PCNA et RPA et son association au niveau des foyers de réplication, c'est un défaut de la voie LP-BER post répllicative qui serait en cause (WILSON and BOHR 2007). Ce risque accru de développer un cancer est d'autant plus grand lorsque plusieurs ADN glycosylases du BER sont affectées : les souris déficientes en MYH et OGG1 présentent une plus grande cancérogenèse sporadique comparées aux souris MYH^{-/-} seul, en particulier dans le cas des lymphomes et des cancers des poumons et des ovaires (XIE *et al.* 2004) (WILSON and BOHR 2007). De même, on retrouve dans certaines tumeurs humaines différentes formes mutées de la polymérase Pol β parmi lesquelles plusieurs ont une fidélité très réduite (K289M et I260M) ou un site actif absent (WILSON and BOHR 2007). La

surexpression de certains mutants, comme la forme délétée Pol β 208-236 par exemple, réduit considérablement l'efficacité de la voie BER (BHATTACHARYYA and BANERJEE 1997). Bien qu'aucun lien direct n'ait été clairement établi entre ces mutants et le développement cancéreux, il est à noter que l'expression des formes mutées K289M et I260M dans des cellules de souris induit une transformation cellulaire (SWEASY *et al.* 2005; WILSON and BOHR 2007). Pour les autres acteurs du BER, le lien avec une prédisposition au cancer est plus indirect ou trop peu étayé. C'est le cas de la protéine OGG1 dont l'implication dans le développement tumoral est sujet à controverse bien que mutée dans de nombreux cancers (voir chapitre OGG1) (WILSON and BOHR 2007).

Enfin, des défauts dans le système BER induiraient aussi des pathologies neurodégénératives. Les cellules neuronales ne se divisant pas, l'accumulation de mutations dues à un BER défectueux favoriserait d'autant plus la mort cellulaire. La déficience des protéines UNG, AAG ou APE1 est en effet liée à une apoptose spontanée des neurones ou à une hypersensibilité aux agents génotoxiques (WILSON and BOHR 2007). Il a également été montré que l'apoptose des neurones suite à un stress oxydant est corrélée au fonctionnement anormal du BER mitochondrial (HARRISON *et al.* 2005). La protéine XRCC1 jouerait un rôle dans le développement des ataxies spinocérébrales autosomales récessives *via* la formation d'un complexe avec les protéines défectueuses impliquées (l'Aprataxine ou la protéine TDP1) (WILSON and BOHR 2007). De plus, il existe, dans la chorée de Huntington, un détournement pathologique du BER en faveur du mécanisme d'élongation de triplets de bases ou TNR (pour « trinucleotide repeat expansion »), mécanisme considéré comme déclencheur de nombreuses maladies neurodégénératives (LIU and WILSON 2012). En effet, chez un modèle murin qui exprime une version du gène humain *huntington* (ou gène *IT15*) doté d'un extra-segment répété (répétition de trinuécléotides CAG) assez long afin de déclencher la maladie chez l'Homme, et présentant une délétion du gène *OGG1*, les lésions oxydatives le long de l'ADN demeurent intouchées et le nombre de séquences répétitives sur le gène *huntington* augmente peu ou pas. Ainsi, de manière très intéressante, OGG1, tout en réparant l'ADN, entraîne également une multiplication perverse du nombre de séquences répétitives sur le gène *IT15* (KOVTON *et al.* 2007; KOVTUN and McMURRAY 2008). De même, dans la voie LP-BER, Pol β et FEN1 facilitent l'élongation de triplets de base CAG *in vitro*, et cela *via* une perte de coordination fonctionnelle entre ces deux protéines (LIU *et al.* 2009).

Enfin, on peut aussi ajouter qu'une grande majorité des acteurs du BER interagit avec des protéines impliquées dans des pathologies humaines et le vieillissement prématuré.

Parmi les lésions de l'ADN prises en charge par cette voie BER, il en est une particulièrement abondante et hautement mutagène dont l'élimination, qui fait intervenir de nombreuses protéines différentes, est primordiale au maintien de l'intégrité génomique. Il s'agit de la 8-oxoguanine.

Partie I.B.

Une lésion oxydative majeure : la 8-oxoguanine

I.B. Une lésion oxydative majeure : la 8-oxoguanine

I.B.1. Oxygène, ERO et stress oxydant

Pour une grande majorité des organismes vivants, l'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la production d'énergie (sous forme d'ATP) par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (GARDES-ALBERT *et al.* 2003; MIGDAL and SERRES 2011). L'oxygène y subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau. Toutefois, sa consommation par la cellule conduit également à la production de métabolites réduits tels que les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyles ($\cdot OH$) et l'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) (GARDES-ALBERT *et al.* 2003). Ces espèces toxiques (contrairement à l'oxygène moléculaire), sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO). Au-delà du métabolisme énergétique, les ERO peuvent être générées suite à l'exposition de l'organisme à des facteurs exogènes (radiations ionisantes conduisant à la radiolyse de l'eau, carcinogènes chimiques ou exposition chronique à des infections virales) (GROS *et al.* 2002; KRYSTON *et al.* 2011). La plupart des cellules peuvent également produire des radicaux superoxydes *via* une activité NAD(P)H oxydase membranaire (NOX) (MIGDAL and SERRES 2011) ou *via* d'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites (xanthine oxydase, enzymes du réticulum endoplasmique, enzymes de la voie de l'acide arachidonique, cytochromes oxydases du noyau, etc.) (MIGDAL and SERRES 2011). Aussi, l'activation d'oncogènes comme *c-myc* (VAFA *et al.* 2002) et *ras* (DENKO *et al.* 1994) peuvent, en altérant des voies spécifiques du métabolisme cellulaire, conduire à la production d'ERO. Les ERO ainsi générées sont potentiellement toxiques mais paradoxalement, ce sont aussi des molécules essentielles à la régulation et à la signalisation cellulaire. Elles jouent en effet le rôle de seconds messagers (oxydation réversible des molécules environnantes) dans l'apoptose, dans la prolifération des cellules musculaires lisses ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire (GARDES-ALBERT *et al.* 2003; MIGDAL and SERRES 2011). Cette double potentialité des ERO contraint les cellules à la mise en place de systèmes stricts de régulation de l'oxygène et de ses métabolites afin de maintenir une homéostasie redox. Une diminution des capacités antioxydantes (systèmes de défense) et/ou une surproduction d'ERO est à l'origine des phénomènes de stress oxydant (rupture de l'équilibre redox) largement impliqués dans de nombreuses pathologies

(KRYSTON *et al.* 2011). Ce dysfonctionnement se traduit notamment par une oxydation non spécifique et irréversible de tous les matériaux biologiques y compris l'ADN, l'une des cibles parmi d'autres des ERO.

I.B.2. Lésion 8-oxoG : caractérisation

L'ADN est en effet particulièrement sensible aux ERO (NEELEY and ESSIGMANN 2006). Les génomes nucléaire et mitochondrial sont tous deux endommagés mais il semblerait que l'ADN des mitochondries accumule un plus grand nombre de dommages suite à un stress oxydant (YAKES and VAN HOUTEN 1997). Dans une grande majorité des cas, l'attaque de l'ADN par les ERO induit des dommages chroniques et persistants incluant des modifications de bases, la formation de sites apuriques/apyrimidiques (AP), de cassure simple et double brin ainsi que des pontages de métabolites et protéines à l'ADN (KRYSTON *et al.* 2011). La nature, la caractérisation ainsi que la prise en charge de ces lésions ont été largement détaillées dans la littérature ces 25 dernières années (WALLACE 1988; MARNETT 2000; BJELLAND and SEEBERG 2003; DIZDAROGLU *et al.* 2008). Parmi les plus étudiées, la lésion 7,8-dihydro-8-oxoguanine (aussi appelée 8-oxoguanine ou 8-oxoG), qui correspond à l'oxydation d'une guanine (G), constitue un véritable marqueur cellulaire du stress oxydant (KLAUNIG and KAMENDULIS 2004).

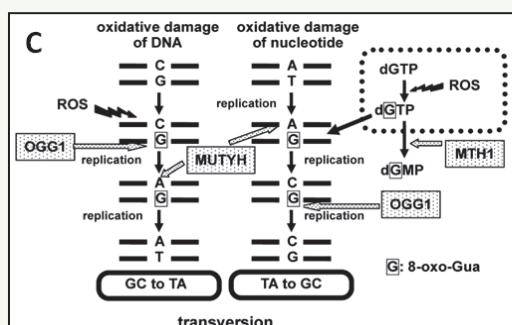
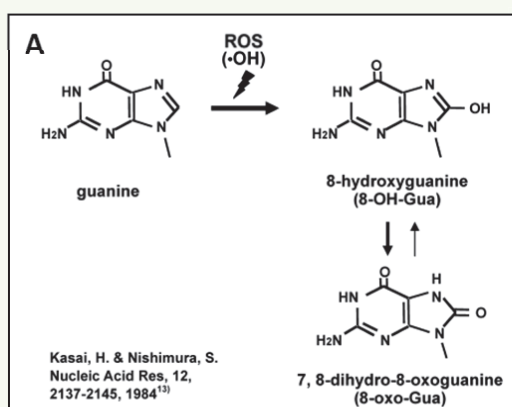
I.B.2.a. 8-oxoG : généralités

La 8-oxoG est l'une des principales bases modifiées générées dans l'ADN par des radicaux oxygénés et par des espèces réactive non-radicalaires de l'oxygène telle que l'oxygène singulet (DIZDAROGLU 1991). En effet, parmi les quatre bases nucléiques, la guanine a le potentiel redox le plus bas ce qui la rend particulièrement vulnérable à l'oxydation. On compte ainsi près de 15 produits d'oxydation de la guanine (BJELLAND and SEEBERG 2003) parmi lesquels le Fapy-G (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) et la 8-oxoG, cette dernière étant parmi les mieux caractérisés. Découverte et reportée en 1984 par Kasai et Nishimura (KASAI and NISHIMURA 1984), la 8-oxoG correspond à l'introduction d'un groupe oxo sur le carbone en position 8 (C8) et d'un hydrogène au niveau de l'azote en position 7 (N7) (**Figure 7A**). Elle peut être de nouveau oxydée pour former la guanidinohydantoine et la spiroiminodihydantoine (BJELLAND and SEEBERG 2003). Les résidus 8-oxoG dans l'ADN existent

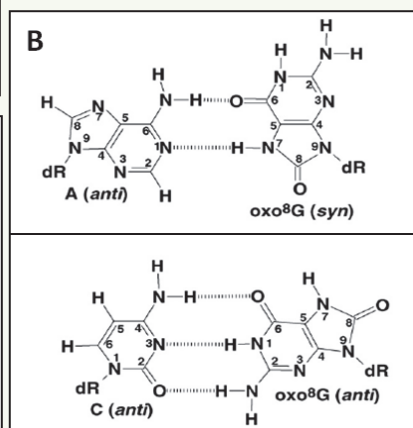
de façon prédominante sous leur forme *keto* au pH physiologique adoptant ainsi une conformation *anti* autour de la liaison *N*-glycosidique et formant une paire normale et en apparence non toxique de type Watson et Crick avec la cytosine. Néanmoins, dans sa conformation *syn*, la 8-oxoG est hautement mutagène de par sa forte habilité à mimer une autre base azotée, la thymine (T), et à ainsi former avec l'adénine une paire de base non-canonique et thermodynamiquement stable de type Hoogsteen (SHIBUTANI *et al.* 1991; KLUNGLAND and BJELLAND 2007) (**Figure 7B**). La présence de la 8-oxoG pendant la réplication de l'ADN conduit donc à une haute fréquence de transversions GC vers TA (KLUNGLAND and BJELLAND 2007) (**Figure 7C**), mutations particulièrement abondantes dans le génome de différents types de cancer. Pour exemple, elles représentent la 2^{ème} signature mutationnelle majoritaire dans les cellules de mélanome humain (PLEASANCE *et al.* 2010). La 8-oxoguanine, dont le taux moyen de formation est estimé à 10^3 lésions par cellule et par jour dans les tissus normaux, mais qui peut aller jusqu'à 10^5 dans les tissus cancéreux (LINDAHL and BARNES 2000; FRIEDBERG *et al.* 2006), serait donc un facteur clef dans le développement des cancers. La réparation de ce dommage particulier de l'ADN apparaît donc comme essentielle au maintien de la stabilité du génome et de son intégrité.

Figure 7 La lésion 8-oxoG (HIRANO 2008)

A Structure de la lésion 7,8-dihydro-8-oxoguanine (ou 8-hydroxyguanine). La 8-oxoG est formée par hydroxylation d'une guanine au niveau du carbone en position 8. **B** Propriétés d'appariement de base des résidus 8-oxoG dans l'ADN. **C** Mécanisme de formation de la mutation de type transversion GC vers TA chez



l'Homme. OGG1 est l'ADN glycosylase en charge de l'élimination des 8-oxoG générés ou incorporés dans l'ADN. MUTYH élimine les résidus adénine incorporés pendant la réplication en face de la lésion. MTH1 a un rôle 8-oxo-dGTPase en empêchant l'incorporation des résidus 8-oxoG dans l'ADN par l'élimination du pool 8-OH-dGTP.



I.B.2.b. 8-oxoG et prise en charge : le système GO

Alors que l'on montre pour la 1^{ère} fois en 1986 qu'une irradiation aux rayons X de souris génère *in vivo* des lésions 8-oxoG de l'ADN, on observe également une baisse rapide de la quantité de ces lésions dans l'ADN de foie de souris suite à l'arrêt de l'irradiation, suggérant un mécanisme de réparation de la 8-oxoG chez la souris (KASAI *et al.* 1986; NISHIMURA 2002). En 1992, Michaels et Miller définissent le système GO (pour « guanine oxydée ») comme l'ensemble des produits des trois gènes *fpg* (*mutM*), *mutY* et *mutT* (codant pour les protéines Fpg, MutY et MutT, respectivement) qui agissent spécifiquement pour contrecarrer l'effet mutateur de la 8-oxoG chez *E. coli* (**Figure 8**) (MICHAELS and MILLER 1992).

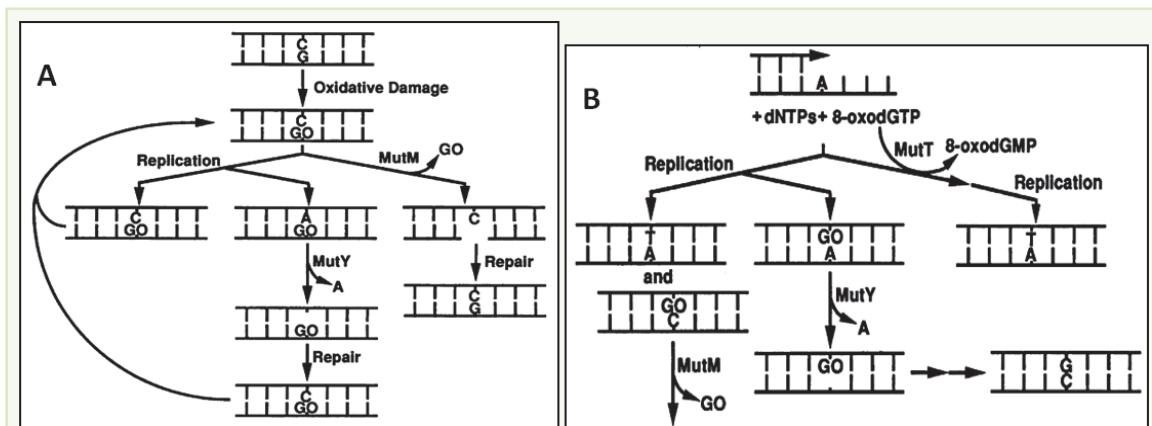


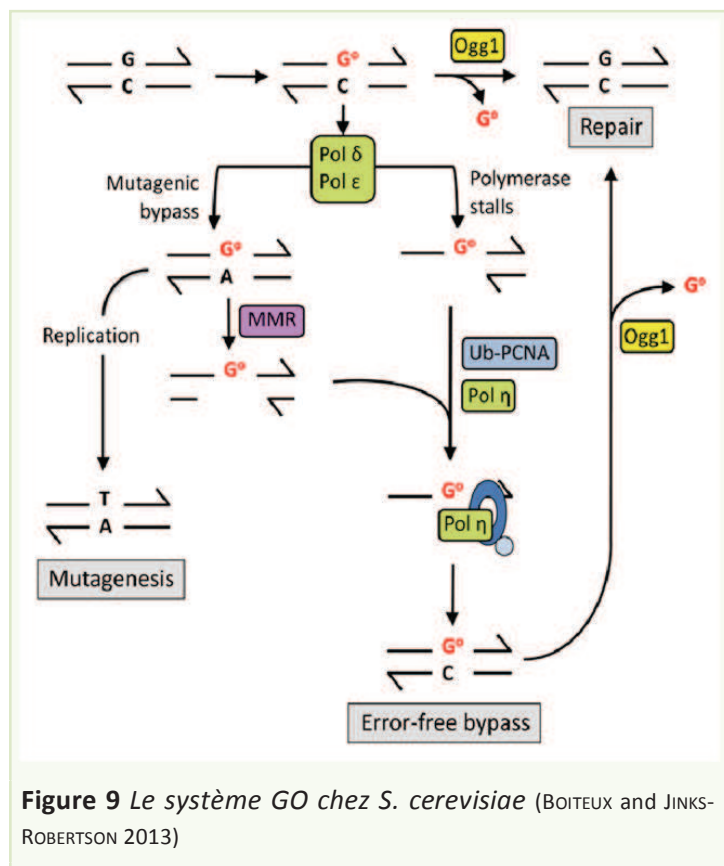
Figure 8 Le système GO procaryote (MICHAELS and MILLER 1992; KLUNGLAND and BJELLAND 2007)

Voir détails dans le texte.

La formamidopyrimidine-ADN glycosylase ou 8-oxoguanine-ADN glycosylase (Fpg ou MutM), acteur principal de ce système, est une enzyme bi-fonctionnelle (glycosylase/AP lyase) de la superfamille H2TH qui va reconnaître et exciser spécifiquement la lésion 8-oxoG en initiant le BER chez *E. coli* (BOITEUX *et al.* 1990). Son action, suivie de celle d'autres protéines en aval permettent de restaurer la paire de base normale G/C de départ. Si la lésion 8-oxoG n'est pas éliminée avant la réplication, une synthèse translésionnelle correcte des ADN polymérases répliquatives conduit à la formation d'une paire C/GO (pour « guanine oxydée ») anormale, substrat de MutM (**Figure 8A**). Son absence dans les souches *fpg*⁻ conduit à une augmentation des transversions GC vers TA (MICHAELS *et al.* 1991). En parallèle, le gène *mutY* code pour une adénine-ADN glycosylase qui va éliminer spécifiquement l'adénine anormalement incorporée face à la 8-oxoguanine du fait d'une synthèse translésionnelle le plus souvent imprécise (MICHAELS and MILLER 1992) (**Figure 8A**). Son

inactivation conduit également à des transversions GC vers TA. Enfin, le produit du gène *mutT*, une phosphatase, est quant à elle en charge du clivage des résidus 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGMP (MAKI and SEKIGUCHI 1992) évitant ainsi l'incorporation dans l'ADN de la 8-oxoG en face d'un A lors de la réplication (une voie majeure d'entrée de la 8-oxoG dans l'ADN après l'oxydation de dGTP directement dans l'ADN) (**Figure 8B**). Les souches *mutT* présentent une haute fréquence de transversions de type TA vers GC. Ainsi, le système GO protège l'organisme vis-à-vis de l'effet mutagène de la 8-oxoG et reflète l'importance biologique de cette lésion. Il n'est donc pas surprenant que ce mécanisme ait été conservé chez les eucaryotes.

En effet, l'homologue fonctionnel de Fpg, appelé Ogg1, a été isolé chez *S. cerevisiae* (*yOGG1*) (NASH *et al.* 1996; VAN DER KEMP *et al.* 1996). Elle excise les lésions 8-oxoG dans



l'ADN, générant des sites AP qui seront pris en charge dans la voie BER. De plus, l'absence d'Ogg1 ne générant qu'un phénotype mutateur modéré, il existerait chez la levure un système, comparable aux procaryotes, de défense contre les effets mutagènes de la 8-oxoG. On retrouve effectivement chez *S. cerevisiae* un système GO homologue non-canonique, impliquant non pas de protéine MutY (absente dans la levure) mais la voie de réparation des

mésappariements (MMR), qui joue ici un rôle analogue, ainsi que l'ADN polymérase translésionnelle η . Pendant la réplication, Pol ϵ et Pol δ vont incorporer préférentiellement l'adénine face à la 8-oxoguanine, qui sera éliminée *via* le MMR. Dans certaines circonstances, Pol ϵ et Pol δ sont bloquées au niveau du dommage, la Pol η est alors recrutée *via* l'ubiquitination du facteur de processivité PCNA et incorpore une cytosine opposée à la 8-oxoG, le substrat pris en charge par Ogg1 (**Figure 9**) (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013).

Il existe également un système GO chez l'Homme, qui implique un plus grand nombre de protéines. L'homologue fonctionnel humain de Fpg est appelé hOGG1 (ARAI *et al.* 1997; RADICELLA *et al.* 1997) et excise de la même façon la 8-oxoG appariée à une cytosine dans la voie BER. MYH (pour « MutY-Homolog »), homologue fonctionnel de MutY, élimine aussi l'adénine appariée à la 8-oxoguanine tandis que les protéines MTH1, MTH2 (pour « MutT-homolog ») et NUDIX5 (pour « NUDIX type 5 ») remplissent à elles trois le rôle de 8-oxodGTPase analogue à MutT (SAKUMI *et al.* 1993; SLUPSKA *et al.* 1996). Toutefois, l'élimination de la 8-oxoG ne se ferait pas *via* ces seules protéines, suggérant un système GO étendu chez l'Homme. En effet, les ADN glycosylases bi-fonctionnelles NEIL1 et NEIL2,

Protein	Function
OGG1	DNA glycosylase, AP lyase, removes 8-oxo-G paired opposite C and formamidopyrimidines
MUTYH	DNA glycosylase, removes A paired opposite 8-oxo-G
NEIL1	DNA glycosylase, AP lyase, removes 8-oxo-G paired opposite C
NEIL2	DNA glycosylase, AP lyase, removes 8-oxo-G when present in bubble structures
APE1	AP-endonuclease, 3'-phosphodiesterase
PNK	3'-phosphatase
DNA polymerase β	DNA polymerase, dRP lyase
DNA polymerase λ	DNA polymerase, dRP lyase
DNA polymerases δ and ϵ	DNA polymerase, 3' $\rightarrow$ 5' exonuclease
PCNA	Auxiliary protein of DNA polymerases
RF-C	Loads PCNA AAA ATPase
RP-A	Auxiliary protein of DNA polymerases
DNA ligase III/XRCC1	DNA ligase
FEN1	Flap endonuclease, 5' $\rightarrow$ 3' exonuclease
DNA ligase I	DNA ligase
hMTH1	8-oxo-dGTPase
hMSH2	Recognition of DNA mismatches
hMLH1	Repair of DNA mismatches
CSB	Repair of 8-oxo-G from the overall genome
CSA	Repair of 8-oxo-G from the overall genome
XPC	Repair of 8-oxo-G from the overall genome

Tableau 5 Protéines impliquées dans l'élimination de la 8-oxoG chez l'Homme (VAN LOON *et al.* 2010)

éliminent respectivement la 8-oxoG incluse dans des zones simple-brin de l'ADN en particulier dans des structures de type « bulle » (pouvant mimer une « bulle » de réplication) (HAZRA *et al.* 2002; Dou *et al.* 2003). NEIL1 stimule également OGG1 en augmentant son turnover (MOKKAPATI *et al.* 2004). Des protéines du MMR, comme hMLH1, seraient impliquées dans la prise en charge de cette lésion : les cellules déficientes pour le

MMR du fait de l'inactivation du gène hMLH1 présentent un taux quatre fois plus élevé de 8-oxoG que les cellules normales (COLUSSI *et al.* 2002). De même, les cellules humaines déficientes en protéine CSB (pour « Cockayne syndrome B »), une protéine du NER couplée à la transcription (ou TC-NER), sont très sensibles aux radiations ionisantes et accumulent des taux anormalement élevés de 8-oxoG (Tuo *et al.* 2001). Une protéine du NER, XPC (pour « Xeroderma Pigmentosum complementation group C ») jouerait ce même rôle de protection vis-à-vis de la 8-oxoG : l'absence du gène XPC est corrélée à une hypersensibilité des cellules au stress oxydatif (MELIS *et al.* 2008), à un taux de réparation de la 8-oxoG très diminué (D'ERRICO *et al.* 2006) et à une augmentation de transversions GC vers TA (WIJNHOFEN

et al. 2000). XPC stimulerait également l'activité d'OGG1 via le déplacement actif de celle-ci de son premier produit de réaction (site AP) (D'ERRICO *et al.* 2006). Au final, ce sont près de 20 protéines différentes (**Tableau 5**) (VAN LOON *et al.* 2010), impliquées dans des mécanismes divers de réparation de l'ADN, qui travaillent ensemble à l'élimination d'une même lésion, la 8-oxoG, dans le système GO humain.

I.B.2.c. Réparation de la 8-oxoG et cancer

Un argument en faveur de l'existence de voies redondantes de défense contre les effets mutagènes de la 8-oxoguanine réside dans les études liant la réparation de ces lésions au cancer. L'analyse des modifications de séquence de gènes suppresseurs de tumeurs (p53 par exemple) communément mutés dans de nombreux cancers révèle de façon générale un biais important de transversions GC vers TA (BOITEUX and RADICELLA 2000). Cette observation va dans le sens d'une incapacité des cellules cancéreuses à éliminer la lésion 8-oxoG et donc probablement dans celui d'une déficience en OGG1, celle-ci étant l'enzyme principale de prise en charge de ce dommage. Une perte fréquente d'hétérozygotie (LOH) des marqueurs de la région chromosomique du gène OGG1, en particulier dans les cancers du poumon et du rein (NAYLOR *et al.* 1987), semble confirmer cette hypothèse. Néanmoins, l'ensemble des données résultant de l'étude des mutations des allèles du gène OGG1 dans diverses tumeurs humaines indique que des mutations sur ce gène auraient un impact limité dans le développement des tumeurs (CHEVILLARD *et al.* 1998; KOHNO *et al.* 1998; SHINMURA *et al.* 1998; BLONS *et al.* 1999) (voir chapitre OGG1). Ces observations suggèrent des voies de protection redondantes, n'enlevant rien à la mutagénicité, bien établie, de la lésion 8-oxoG, à son implication dans le développement cancéreux ni au rôle essentiel joué par OGG1 dans la protection de l'ADN vis-à-vis des effets délétères de cette lésion. La cellule aura en effet su, au cours de l'évolution, entourer la protéine centrale du système GO, OGG1, d'un grand nombre de facteurs clefs avec pour but final de coordonner efficacement l'élimination de l'une des lésions les plus abondantes et les plus mutagènes chez tous les organismes aérobies.

Partie I.C.

La protéine 8-oxoG-ADN glycosylase 1 (ou Ogg1)

I.C. La protéine 8-oxoG-ADN glycosylase 1 (ou Ogg1)

I.C.1. De l'identification de *yOgg1* chez *S. cerevisiae* à la découverte de son homologue humain

Après la mise en évidence chez *E. coli* de la protéine Fpg dans la prise en charge des lésions FapyG (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine), FapyA (4,6-diamino-5-formamidopyrimidine) et 8-oxoG de l'ADN (BOITEUX *et al.* 1990), son homologue fonctionnel Ogg1 a été identifié chez *S. cerevisiae* (*yOgg1*) et son gène cloné par complémentation fonctionnelle d'une souche bactérienne *fpg⁻/mutY* à partir d'une banque d'ADN génomique de levure (DE OLIVEIRA *et al.* 1994; VAN DER KEMP *et al.* 1996). L'expression de *yOgg1* réduit significativement le taux de mutagenèse spontanée d'une souche *E. coli* déficiente en Fpg et MutY associée au phénotype mutateur de type transversions GC vers TA (VAN DER KEMP *et al.* 1996). Le gène *OGG1* code chez *S. cerevisiae* pour une protéine basique de 376 acides aminés et d'environ 43kDa capable d'exciser les résidus 8-oxoG et Me-FapyG à partir d'oligodésoxyribonucléotides et de catalyser le clivage en 3' d'un site AP *via* une réaction de β -élimination (NASH *et al.* 1996; VAN DER KEMP *et al.* 1996; GIRARD *et al.* 1997). Il s'agit donc d'une ADN glycosylase/AP lyase. De façon intéressante, bien que les protéines Ogg1 et Fpg aient des substrats communs dont la 8-oxoG, elles ne présentent aucune homologie structurale. Ogg1 est en effet une ADN glycosylase bi-fonctionnelle appartenant à la superfamille HhH-GPD (ou superfamille Nth) (NASH *et al.* 1996). *yOgg1* élimine efficacement les lésions 8-oxoG appariées à la cytosine et à la thymine ainsi que les résidus 8-oxoA appariés à la cytosine, mais n'excise pas ou très peu les 8-oxoG appariées à la guanine ou à l'adénine (NASH *et al.* 1996; VAN DER KEMP *et al.* 1996; GIRARD *et al.* 1997). Elle élimine également les lésions de type FapyG mais à la différence de Fpg, elle n'excise pas les FapyA dans l'ADN (KARAHALIL *et al.* 1998).

Un an seulement après l'identification du gène *OGG1* chez *S. cerevisiae*, son homologue humain a été identifié et cloné (ABURATANI *et al.* 1997; ARAI *et al.* 1997; BJORAS *et al.* 1997; LU *et al.* 1997; RADICELLA *et al.* 1997; ROSENQUIST *et al.* 1997) (**Figure 10**). Il est situé au niveau du chromosome 3p25, région très fréquemment perdue dans de nombreux cancers et comprend huit exons (**Figure 10A**). Cette identification a été permise par la structure primaire relativement bien conservée de la protéine Ogg1. Il existe en effet jusqu'à 60%

d'identité entre le gène de levure *OGG1* et son homologue humain, pour certaines régions particulières (BOITEUX and RADICELLA 2000). Et c'est ainsi qu'au-delà de la levure et de l'Homme, cette conservation de séquence a permis l'identification des homologues de Ogg1 chez la drosophile et plusieurs espèces de plantes (voir alignement de séquence de la structure primaire de différentes protéines Ogg1 en **Figure 11**).

On retrouve, chez toutes ces protéines Ogg1 identifiées, deux motifs de fixation à l'ADN,

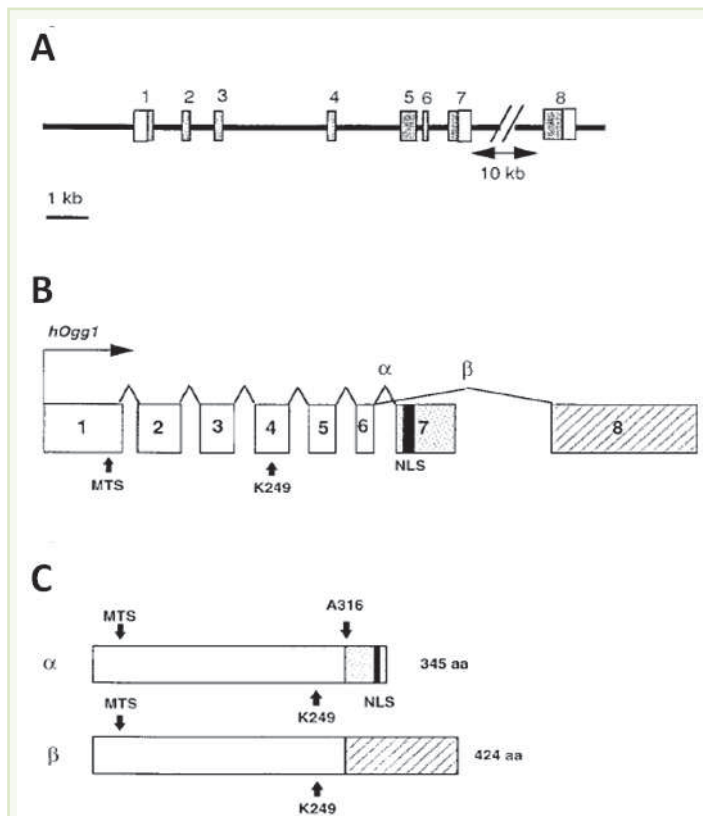


Figure 10 Organisation génomique du gène humain *OGG1* (BOITEUX and RADICELLA 2000)

A Structure génomique de la région transcrite du gène humain *OGG1* conduisant à la forme α de la protéine hOgg1. Les rectangles blancs dans les exons 1, 7 et 8 représentent les régions non traduites de l'ARN messager en 5' et 3', respectivement. **B** Variants du transcrit primaire du gène humain *OGG1* issu de son épissage alternatif. Les flèches indiquent le sens de transcription du gène *OGG1*, le motif MTS, signal de localisation mitochondrial et le motif NLS, signal de localisation nucléaire. **C** Les isoformes α - et β -hOgg1 sont constituées de 345 et 424 acides aminés, respectivement. La lysine catalytique en position 249 est indiquée. L'alanine en position 316 est le dernier résidu en commun des deux isoformes α et β .

le motif très conservé du site actif Hélice-épingle à cheveux-Hélice-K/PDV (HhH étant caractéristique de la superfamille Nth) ainsi que d'autres régions très conservées dont les fonctions ne sont pas encore connues (**Figure 11**). Néanmoins, la particularité du gène codant pour hOgg1 est que, contrairement aux autres espèces, il fait l'objet d'un épissage alternatif qui peut conduire à la production de 2 isoformes de la protéine (α -Ogg1 et β -Ogg1) partageant une extrémité N-terminale au niveau de laquelle on retrouve un motif MTS de localisation mitochondriale mais divergeant par leur extrémité C-terminale incluant ou pas un motif NLS (pour « nuclear localisation signal ») (HIRANO 2008) (**Figure 10B et 10C**). On retrouve donc ces deux isoformes distinctes dans les tissus humains : α -Ogg1 (ou Ogg1 type 1a)

et β -Ogg1 (ou Ogg1 type 2a) (NISHIOKA *et al.* 1999). L'isoforme α -Ogg1, qui correspond à la transcription des exons 1 à 7, compte 345 acides aminés (39kDa) et est localisée au noyau et

aux mitochondries tandis que β -Ogg1, qui résulte de la transcription des exons 1 à 6 et 8, est une protéine de 424 acides aminés (47kDa) située exclusivement dans les mitochondries (le signal NLS étant codé par l'exon 7 du gène, β -Ogg1 ne possède pas ce signal en C-terminale de sa séquence) (NISHIOKA *et al.* 1999). Elles possèdent en effet toutes deux un signal MTS dans leur région N-terminale très conservée mais leur extrémité C-terminale est totalement différente. La protéine α -Ogg1 est ainsi fonctionnelle dans le noyau mais également dans les mitochondries. Bien que la protéine β -Ogg1 y soit exclusivement localisée, c'est en effet l'isoforme α qui assure la réparation des lésions 8-oxoG dans la mitochondrie (HASHIGUCHI *et al.* 2004). Du fait de l'absence en C-terminal de l'hélice- α O, β -Ogg1 serait complètement dépourvue d'activité ADN glycosylase (HASHIGUCHI *et al.* 2004). Au contraire, α -OGG1, comme γ Ogg1, excise les résidus 8-oxoG, FapyG, me-FapyG et 8-oxoA/C et possède une activité AP lyase associée (type β -élimination). L'expression du gène *OGG1* sous le contrôle d'un promoteur riche en îlots CpG (absence de TATA ou CAAT box), est globalement ubiquitaire (expression plutôt constitutive bien que plus importante dans les tissus des reins, du cerveau et de l'intestin (BOITEUX and RADICELLA 2000)) et ne varierait pas en fonction du cycle cellulaire.

Témoignant de l'importance biologique de Ogg1 et comme mentionné précédemment, on la retrouve également chez d'autres espèces. Pour exemple, un homologue de hOGG1 (33% d'identité) et γ Ogg1 (37% d'identité) a été découvert chez *Drosophila melanogaster* (*dOgg1*) (DHERIN *et al.* 2000), une ADN glycosylase/AP lyase capables d'exciser dans des oligonucléotides de synthèse les résidus Me-FapyG, 8-oxoG/C ou /T et 8-oxoA/C mais très faiblement le 8-oxoG dans les paires 8-oxoG/G et 8-oxoG/A (DHERIN *et al.* 2000). Dans l'ADN, comme ses homologues γ Ogg1 et hOGG1, elle prend en charge efficacement les 8-oxoG et les FapyG mais pas les FapyA. De même, par homologie de séquence (40% d'identité avec γ Ogg1), le gène *AtOGG1* a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* (GARCIA-ORTIZ *et al.* 2001). Il code pour une ADN glycosylase/AP lyase (*AtOGG1*) de 40.3kDa qui reconnaît globalement les mêmes substrats que ces homologues eucaryotes, mais avec une cinétique d'excision différente (GARCIA-ORTIZ *et al.* 2001). Globalement, on peut classer l'ensemble des protéines Ogg identifiées à ce jour en trois sous-familles : « OGG1 », « OGG2 » et « AGOG », qui correspondent plus ou moins aux trois domaines eucaryote, procaryote et archées du monde vivant (FAUCHER *et al.* 2012). La grande majorité des protéines de la « sous-famille OGG1 » sont en effet eucaryotes, la « sous-famille OGG2 » comprend des protéines

procaryotes et d'Archée, tandis les protéines « AGOG » sont exclusivement présentes chez les archées. Au-delà de leur motif HhH, elles ne présentent que peu d'homologie de séquence entre elles. Pour exemple, les protéines Ogg de la sous-famille OGG2 ne possèdent pas le domaine N-Terminal des protéines Ogg1 avec qui l'identité de séquence n'est que de 15% en moyenne. On observe cette faible homologie de séquence au sein même des sous-familles : la protéine bactérienne CacOgg1 issue de *Clostridium acetobutylicum* ne présente que 28% d'homologie avec son homologue humain hOgg1. Toutes ces protéines Ogg présenteraient néanmoins un même mécanisme catalytique étant donné la grande similarité de leur site actif et la conservation des résidus catalytiques (FAUCHER *et al.* 2012).

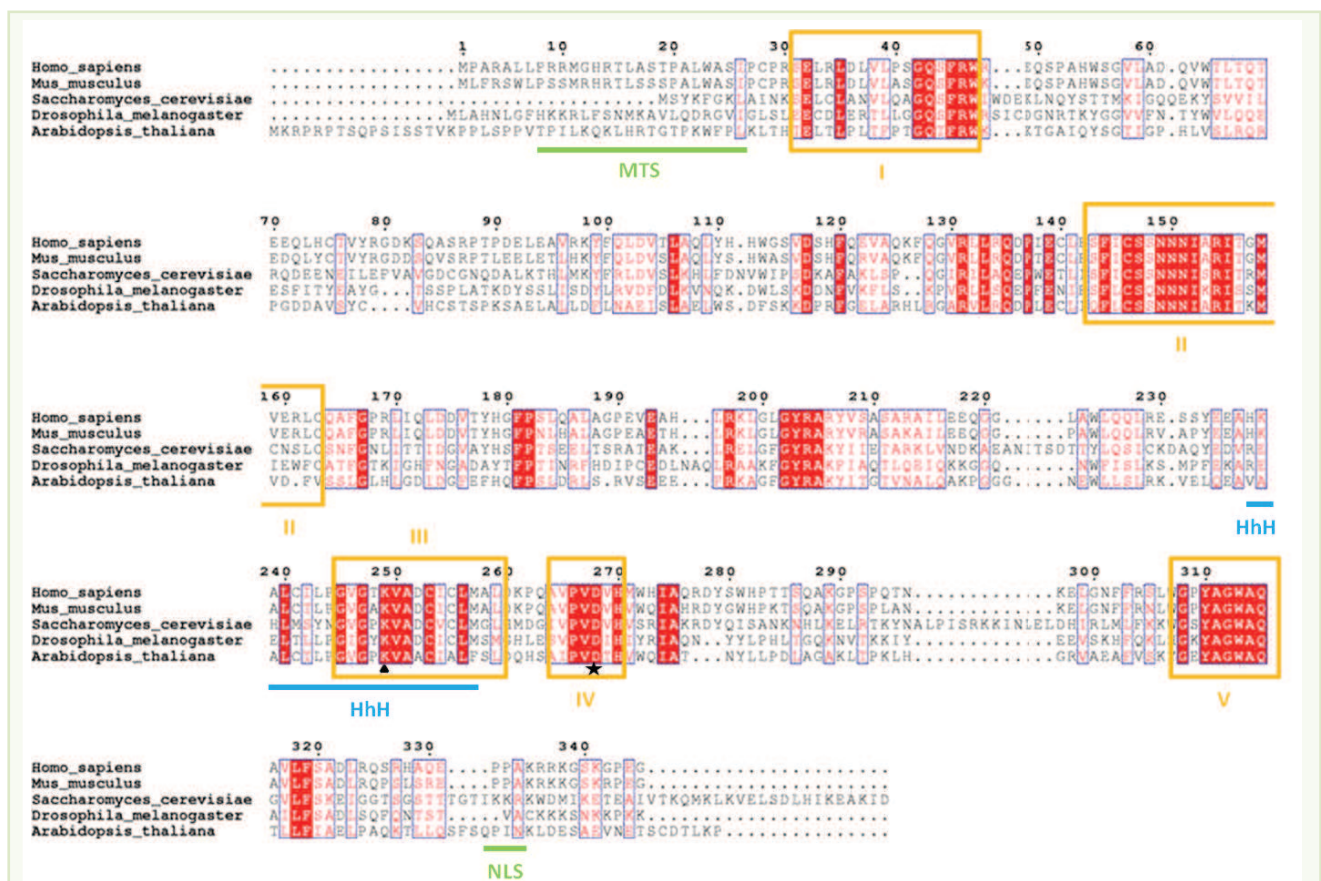


Figure 11 Alignement des structures primaires des protéines Ogg1 chez différentes espèces

Cet alignement de séquences multiples a été effectué avec le logiciel clustal 2.1 du site EMBL-EBI (paramètres par défaut) et la représentation a été réalisée avec ESPript 2.2 (paramètres par défaut). Les résidus strictement conservés sont en blanc sur fond rouge et, les résidus similaires sont en rouge sur fond blanc. Les séquences consensus correspondant aux motifs MTS (signal de localisation mitochondrial), NLS (signal de localisation nucléaire) et HhH (hélice-épingle à cheveux-hélice) sont indiqués en vert et bleu, respectivement. Les régions très conservées des protéines Ogg1 humaine et de levure *S. cerevisiae* sont encadrées. Les régions III et IV contiennent le site actif de l'enzyme tandis que les régions I, II et V ont une fonction inconnue. Les résidus importants d'un point de vue catalytique, Lys241 (yOgg1) ou Lys249 (hOgg1) et Asp260 (yOgg1) ou Asp268 (hOgg1) sont indiqués par un triangle noir et une étoile noire, respectivement.

I.C.2. Ogg1 : Spécificités de substrats

Comme mentionné précédemment, Ogg1, en tant qu'ADN glycosylase/AP lyase bifonctionnelle, reconnaît et catalyse l'excision de substrats spécifiques. L'identification de ceux-ci a été permise par l'utilisation d'ADN γ -irradié ainsi que de substrats particuliers de type oligo-désoxyribo-nucléotides. La 8-oxoguanine est ainsi excisée par Ogg1 chez la levure et chez l'Homme, avec une affinité pour cette base lésée directement liée à la nature de la base opposée au dommage (RADICELLA *et al.* 1997). Ainsi, l'efficacité d'excision de la 8-oxoG est accrue dans le cas d'une cytosine opposée à la lésion (situation canonique), significativement réduite pour une thymine et très faible voire quasi inexistante lorsque c'est une adénine ou une guanine qui fait face au dommage (produits de réplication de la paire 8-oxoG : C). Ogg1 élimine également les résidus FapyG mais pas les FapyA ou les 8-oxoA dans l'ADN (DHERIN *et al.* 1999). De la même manière que pour son activité ADN glycosylase, l'activité AP lyase d'Ogg1 est fortement dépendante de la base opposée au site abasique (DHERIN *et al.* 1999) : la présence de la cytosine opposée à la lésion est quasi-nécessaire (GIRARD *et al.* 1997).

I.C.3. Mécanisme d'action de Ogg1

I.C.3.a. Caractéristiques structurales de Ogg1

Il n'existe pas à ce jour de structure 3D de γ Ogg1, aussi les observations qui suivent sont-elles basées sur l'étude de la structure de hOGG1 uniquement, et peuvent être appliquées à la protéine de levure du fait de la forte homologie de séquences de ces deux protéines (**Figure 11**). Ogg1 fait partie de la superfamille structurale HhH-GPD présentant au niveau de son site actif le motif caractéristique suivant : un motif de fixation non séquence-spécifique à l'ADN (HhH) suivi du motif GPD (FROMME *et al.* 2004). La structure de hOGG1 a été définie en absence (BJORAS *et al.* 2002) et en présence de différents ADN (ADN substrats, intermédiaires base de Schiff, produits de réaction) avec des formes mutées de la protéine (BRUNER *et al.* 2000b; FROMME *et al.* 2003; NORMAN *et al.* 2003; CHUNG and VERDINE 2004; BANERJEE *et al.* 2005; RADOM *et al.* 2007; LEE *et al.* 2008; DALHUS *et al.* 2011). Dans la structure hOGG1/ADN (**Figure 12**), on observe une courbure de l'ADN endommagé centrée sur la

base lésée 8-oxoG et la présence d'un cation divalent qui empêche la répulsion électrostatique des groupes phosphate 5' et 3' de la base extrudée (DALHUS *et al.* 2009).

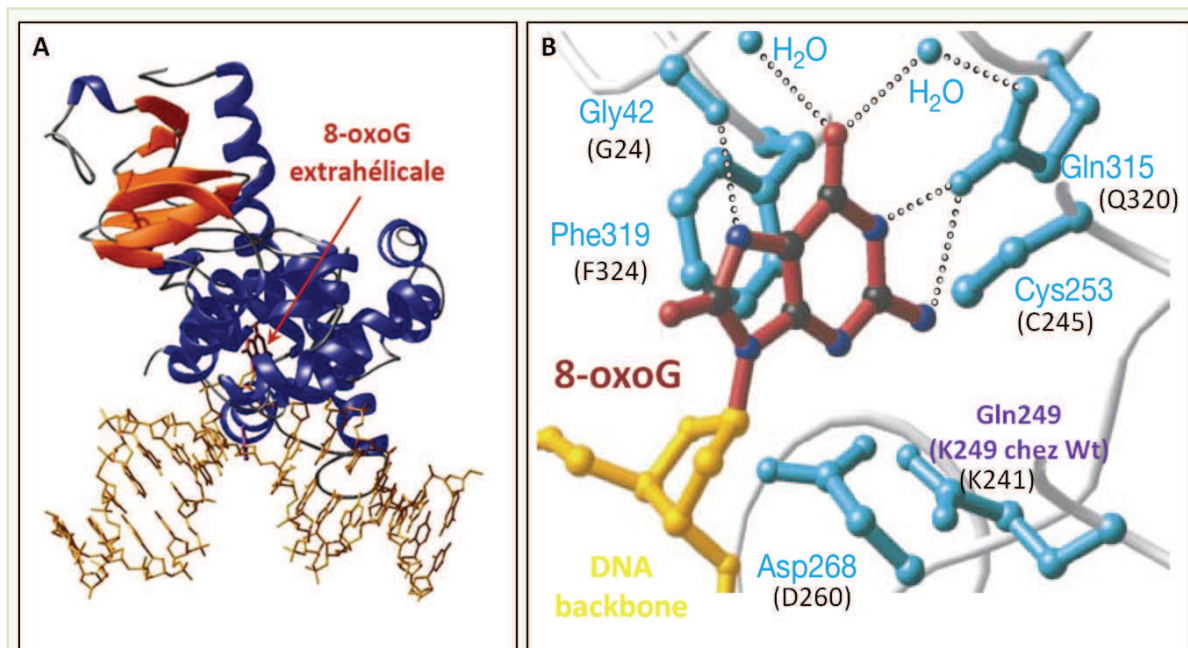


Figure 12 Structure cristallographique d'un complexe entre hOgg1 et un duplexe d'ADN contenant une 8-oxoG (BRUNER *et al.* 2000b)

A Vue générale de la structure : La protéine hOgg1 induit une forte courbure de l'ADN endommagé et stabilise le nucléoside lésé, ici une 8-oxoG, dans la poche du site actif. Il est à noter ici que la protéine utilisée est une forme de type mutant inactif dans laquelle la Lys249 a été substitué par une Gln. Grâce à la substitution K241Q, le complexe est stable et abortif. **B** Agrandissement au niveau de la poche du site actif : Parmi les contacts de la protéine avec le dommage, on peut noter que l'hydrogène en N7 de la 8-oxoG (l'un des déterminants de la base lésée qui la différencie d'une guanine normale) est reconnu par la Gly42 de hOgg1. Le nucléophile de la catalyse K249 (ici Gln249, en violet) est positionné idéalement pour faire son attaque en C1' du nucléoside endommagé. La position des résidus correspondants chez yOgg1 est indiquée en noir, entre parenthèses.

Le résidu asparagine Asn149 de la protéine hOGG1 (Asn134 chez la levure) comble le vide laissé par celle-ci. Les résidus arginine en position 154 (R139 chez la levure) et 204 (189) forment quant à eux des liaisons hydrogène fortes avec la cytosine opposée au dommage ce qui explique la reconnaissance spécifique par hOGG1 des paires 8-oxoG/C (DALHUS *et al.* 2009). La base lésée extrudée est stabilisée au sein d'une poche de reconnaissance spécifique entre les chaînes latérales des résidus Cys253 (245) et Phe319 (324) (DALHUS *et al.* 2009). Dans cette poche, un certain nombre de résidus sont impliqués dans la reconnaissance spécifique de la base lésée 8-oxoG. La glutamine strictement conservée en position 315 (320) établit ainsi une interaction *via* des liaisons hydrogène avec la 8-oxoG. Il a

aussi été suggéré que la spécificité de l'interaction d'hOgg1 avec la 8-oxoG se ferait *via* une liaison hydrogène entre l'azote en N7 de la 8-oxoG et la chaîne carbonée de la glycine en position 42 (24) (DALHUS *et al.* 2009) (cette liaison ne peut exister avec une guanine normale qui ne possède pas de donneur de proton en N7). La lysine conservée en position 249 (241) et située dans la 2^{ème} hélice du motif HhH, lui même impliqué dans l'interaction avec l'ADN, serait également nécessaire à la reconnaissance de la 8-oxoG. La « théorie du dipôle » proposée par Dalhus *et al.*, implique en fait les résidus Lys249 (241) et Cys253 (245) du site actif, qui formeraient un dipôle électrostatique dont l'interaction avec le dipôle N7-O8 de la 8-oxoG permettrait de distinguer de façon significative la 8-oxoG d'une guanine normale (DALHUS *et al.* 2009; DALHUS *et al.* 2011). Cette lysine catalytique en position 249 (241) serait nécessaire à l'activité AP lyase de l'enzyme mais ne serait pas mobilisée pour son activité ADN glycosylase. En effet, il a récemment été suggéré, du fait du comportement pseudo-monofonctionnel de Ogg1 lié au découplage entre ses deux activités (voir partie III.3.b), que l'enzyme utiliserait une molécule d'eau pour cliver le lien *N*-glycosidique de la 8-oxoG et non la lysine dite catalytique (DALHUS *et al.* 2011).

I.C.3.b. Mécanisme catalytique de Ogg1

L'étude de la structure cristallographique de hOgg1 a également permis de mettre en évidence un aspect particulier de son mécanisme d'action (observé pour la première fois dans une réaction catalysée par une enzyme) : la base endommagée excisée (guanine oxydée) reste fixée au niveau du site actif de l'enzyme et joue le rôle de cofacteur acide/base ralentissant la réaction suivante de clivage du site AP (FROMME *et al.* 2004; MORLAND *et al.* 2005). La présence de Mg^{2+} ralentit également son activité AP lyase. Ogg1 a ainsi une activité AP lyase faible et découplée de l'activité ADN glycosylase (MORLAND *et al.* 2005). En effet, des études montrent que Ogg1 exercerait ses deux activités ADN glycosylase et AP lyase à des vitesses différentes (ZHARKOV *et al.* 2000). En comparant les cinétiques d'excision de la base à celles du clivage du site AP, on observe que l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) de la réaction AP lyase est significativement plus faible que pour la réaction ADN glycosylase, ce qui suggère un mécanisme d'action de Ogg1 à deux phases d'un point de vue cinétique (ZHARKOV *et al.* 2000). Ce découplage entre les deux activités de Ogg1 observée *in vitro* suggère que l'enzyme pourrait se dissocier du site abasique avant de le cliver en 3' par

un mécanisme de β -élimination. Ainsi, on se retrouverait avec Ogg1 dans une situation similaire à la voie BER initiée par une ADN glycosylase monofonctionnelle avec une probabilité élevée de cliver en 5' du site AP par une AP endonucléase après l'excision de la base lésée par Ogg1. Dans ce scénario, l'AP lyase intrinsèque de Ogg1 serait peu sollicitée *in vivo* (VIDAL *et al.* 2001). Comme mentionné précédemment, il a même été proposé que Ogg1 utiliserait un mécanisme de clivage du lien *N*-glycosydique similaire à celui des ADN glycosylases monofonctionnelles (*i.e.*, *via* une molécule d'eau) (DALHUS *et al.* 2011). Aussi, étant donnée l'efficacité de cet enzyme *in vivo*, cette observation *in vitro* suggère qu'il pourrait exister des partenaires de Ogg1 capables de moduler son activité *in vivo*.

De ce point de vue, il est intéressant de noter que son homologue fonctionnel Fpg chez les procaryotes, ne manifeste pas ce découplage (BOITEUX *et al.* 1990). En réalité, les protéines procaryotes Fpg et les Ogg1 eucaryotes diffèrent à plusieurs niveaux dans leur mode de prise en charge de la lésion 8-oxoguanine (SHINMURA and YOKOTA 2001). Tout d'abord, tandis que Fpg catalyse le clivage des liens phosphodiester en 3' et en 5' du site AP *via* une réaction de β,δ -élimination, la protéine Ogg1 clive le site AP généré uniquement en 3' (β -élimination, il s'agit là d'une caractéristique partagée par les ADN glycosylases bifonctionnelles de la super famille structurale HhH) (SHINMURA and YOKOTA 2001). Une autre différence réside dans leurs spécificités de substrats : Fpg excise de façon efficace la 8-oxoG opposée à une cytosine, une thymine et une guanine, alors qu'Ogg1 est beaucoup plus « stringente » pour la base opposée à la 8-oxoG. Elle est efficace pour une pyrimidine (avec une préférence marquée pour un C) opposée à la 8-oxoG alors que la lésion opposée à une purine n'est pas substrat pour l'enzyme. De plus, comme mentionné précédemment, l'efficacité catalytique des deux activités glycosylase et lyase de Fpg sont semblables et concertées ce qui n'est pas le cas pour Ogg1 (ROSENQUIST *et al.* 1997; WILLIAMS and DAVID 1998). Ainsi, l'activité AP lyase d'Ogg1 est près de 80 fois inférieure à celle de Fpg. Les différences structurales bien établies entre ces deux protéines pourraient expliquer de telles disparités dans leur mécanisme d'action. Dans le cas de Fpg, il n'a jamais été observé de découplage entre les deux activités et l'amine catalytique (P1) semble nécessaire aux deux activités de l'enzyme.

I.C.4. Quelles fonctions biologiques pour Ogg1 ?

Comme mentionné précédemment, Ogg1 prend en charge des dommages de l'ADN (et notamment la 8-oxoG) *via* la voie de réparation du BER. Elle a un effet anti-mutateur, complétant le phénotype hyper-mutateur de type transversion GC vers TA des souches déficientes en Fpg et MutY chez *E. coli* et déficientes en Ogg1 chez *S. cerevisiae* (THOMAS *et al.* 1997; BOITEUX and RADICELLA 2000). Les souris *OGG1*^{-/-} accumulent au niveau cellulaire des lésions 8-oxoG mais elles sont viables et ne montrent pas de changements pathologiques évidents même après plusieurs mois (KLUNGLAND *et al.* 1999; FRIEDBERG and MEIRA 2006). La présence de voies redondantes d'élimination de la lésion 8-oxoG peut expliquer le phénotype finalement peu affecté de ces souris KO pour Ogg1 mais cela n'enlève rien au rôle crucial de Ogg1 dans la cellule.

Ogg1 serait impliquée dans le maintien de la taille des télomères *via* la réparation des guanines oxydées au niveau des séquences télomériques. Après la délétion de Ogg1 chez *S. cerevisiae*, on observe en effet une augmentation du taux de lésions 8-oxoG dans les télomères, région particulièrement riche en guanine (Lu and Liu 2010). Enfin, on constate dans cette même étude que ce sont les résidus guanines oxydées accumulés dans les télomères qui diminuent fortement la fixation du complexe protéique télomérique, affectant ainsi la régulation de la taille des télomères dont il a la charge (Lu and Liu 2010).

Une autre étude relie la protéine Ogg1 aux dysfonctionnements du métabolisme cellulaire et à l'obésité (SAMPATH *et al.* 2012). Ogg1 jouerait en effet un rôle nouveau dans la régulation du métabolisme énergétique de la cellule. On observe que les souris soumises à un régime très riche en calories (HFD pour « high-fat diet ») surexpriment Ogg1 en réponse au stress oxydant et aux lésions 8-oxoG générées (SAMPATH *et al.* 2012). Néanmoins, en absence de Ogg1, ces mêmes souris dites HFD présentent un processus métabolique fortement accéléré avec une augmentation de l'adiposité, l'accumulation de lipides au niveau hépatique et une tolérance détériorée au glucose (SAMPATH *et al.* 2012). S'ajoutent à cela une diminution de l'expression des gènes clefs de l'oxydation lipidique et une augmentation du quotient respiratoire (ou RER pour « respiratory exchange ratio »). Ce phénotype témoigne d'un changement du métabolisme énergétique chez les souris *OGG1*^{-/-} (SAMPATH *et al.* 2012). De plus, la forte diminution du taux de glycogène hépatique de ces

souris montre que c'est le métabolisme du glucose, au-delà de l'oxydation lipidique, qui serait principalement en cause (SAMPATH *et al.* 2012).

I.C.5. Ogg1, polymorphismes et cancer

L'étude des polymorphismes du gène *OGG1* a permis d'évaluer l'implication de Ogg1 dans le développement cancéreux. En effet, des variations de séquence dans les gènes de réparation de l'ADN peuvent conduire à une altération de la fonction des protéines et donc à une instabilité génomique et au processus tumoral (HUNG *et al.* 2005). Plusieurs polymorphismes du gène *OGG1* correspondant à une substitution d'acide aminé (ou SNP pour « single nucleotide polymorphism ») ont été enregistrés. Le polymorphisme Ser326Cys est le plus communément répandu, la fréquence allélique de la forme Cys326 étant différente suivant le groupe ethnique considéré. Il constituerait un facteur de risque dans le cancer. En effet, la forme Ogg1-Cys326 excise les lésions 8-oxoG et clive les sites AP à une vitesse 2 à 6 fois inférieure à la forme sauvage Ogg1-Ser326 et serait plus sensible à l'inactivation par des agents oxydants (HIRANO 2008; BRAVARD *et al.* 2009). Il a été montré dans des cellules humaines que des lésions 8-oxoG induites étaient plus efficacement éliminées *via* la surexpression de la forme Ser326 que celle de la forme Cys326, suggérant une incapacité de cette dernière à prévenir *in vivo* les cellules humaines de l'accumulation de dommages 8-oxoG et des événements mutateurs en résultant (YAMANE *et al.* 2004). La forme Ser326Cys serait associée à un risque accru dans les cancers de l'œsophage, des poumons et de la prostate (GOODE *et al.* 2002). Parmi ces polymorphismes, on retrouve également la forme Ogg1-Arg46Gln, identifiée pour la première fois dans des tumeurs humaines (AUDEBERT *et al.* 2000a; NOHMI *et al.* 2005). Elle serait moins active que la forme sauvage : l'efficacité catalytique de Ogg1-Gln46 est près de deux fois inférieure à celle de Ogg1-Arg46 (AUDEBERT *et al.* 2000b). Ogg1-Gln46 élimine moins efficacement les lésions oxydatives induites et à un effet anti-mutateur moindre dans une souche déficiente en Fpg et MutY chez *E. coli* (NOHMI *et al.* 2005). Un autre variant de la protéine Ogg1 est la forme Ogg1-Arg154His qui a été identifiée dans des cancers de l'estomac et des reins chez l'Homme (AUDEBERT *et al.* 2000a; NOHMI *et al.* 2005). Ogg1-His154 est moins efficace dans l'excision des lésions 8-oxoG et Fapy (le résidu Arg154 étant un acide aminé très conservé impliqué dans la reconnaissance directe de la cytosine opposée au dommage) (AUDEBERT *et*

al. 2000b). Cette forme constituerait un facteur de risque dans le développement du cancer colorectal (NOHMI *et al.* 2005).

Néanmoins, bien que ces polymorphismes de Ogg1 aient été identifiés pour la plupart dans des cellules cancéreuses, et bien que le regroupement dans des bases de données de l'ensemble des études épidémiologiques liées à ces polymorphismes et à leur implication dans le cancer (GOODE *et al.* 2002) ait permis d'associer certaines formes de Ogg1, notamment Ogg1-Ser326, à un risque accru de développer certains types de cancer ; cette association reste discutable étant donné le nombre d'études fonctionnelles et épidémiologiques n'allant pas dans ce sens (WILSON and BOHR 2007).

I.D. Situation et projet de recherche

L'exposition permanente de l'ADN aux espèces réactives de l'oxygène, résultant dans la formation abondante de lésions 8-oxoG, et la prise en charge efficace de ces dommages hautement mutagènes par l'ADN glycosylase Ogg1 *via* l'initiation de la voie de réparation BER font de cette protéine un acteur clef du maintien de l'intégrité du génome. Aussi mon travail s'est-il articulé autour du constat suivant : il est primordial de déterminer les facteurs susceptibles de moduler l'efficacité d'Ogg1 dans un contexte cellulaire. Connaître plus précisément l'interactome d'Ogg1 au sein du BER contribuerait ainsi à une meilleure compréhension de la coordination de cette voie de réparation ainsi que des différentes pathologies, dont le cancer, associées à une déficience fonctionnelle de l'enzyme ou de ces partenaires.

I.D.1. Etat de l'art : partenaires d'interaction physique et/ou fonctionnelle de Ogg1 chez l'Homme et la levure *S. cerevisiae*

Le BER est en effet le lieu de multiples interactions protéine/protéine nécessaires à la régulation et à la coordination des étapes enzymatiques mises en jeu dans cette voie. Des études suggèrent en particulier l'interaction de la protéine Ogg1 avec différentes protéines. Au début de notre projet de recherche (soit en 2009), un certain nombre de partenaires d'interaction physique et/ou fonctionnelle de Ogg1 étaient identifiés chez l'Homme et chez la levure *S. cerevisiae* (**Tableau 6**). Néanmoins, pour une grande majorité de ces interactants, on ne sait, encore aujourd'hui, que très peu de choses de leur interaction avec Ogg1. Nature exacte de l'interaction, effet sur le BER, conséquences biologiques et fonctionnelles de tels complexes, etc. sont autant de questions qu'il reste à éclaircir et qui constituent l'un des défis pour l'avenir pour mieux appréhender le rôle physiologique de ces interactions sur l'activité de Ogg1 *in vivo*.

I.D.1.a. Chez l'Homme

Chez l'Homme, parmi les interactants physiques et/ou fonctionnels identifiés, on compte des protéines du BER et du NER dont les effets sur hOgg1 sont à peu près compris. On constate en effet que certaines de ces protéines affectent l'activité d'excision d'hOgg1 *in*

vitro, c'est le cas de XRCC1, APE1, XPC, p300/CBP, Rad52, PKC ainsi que le complexe Rad9-Rad1-Hus1 (HILL *et al.* 2001; DANTZER *et al.* 2002; MARSIN *et al.* 2003; BHAKAT *et al.* 2006; D'ERRICO *et al.* 2006; DE SOUZA-PINTO *et al.* 2009; PARK *et al.* 2009).

L'interaction physique et fonctionnelle de hOGG1 avec la protéine d'échafaudage XRCC1 conduirait à la stimulation d'un facteur deux à trois de son activité ADN glycosylase. XRCC1 stimulerait la formation de l'intermédiaire base de Schiff (MARSIN *et al.* 2003). APE1 stimule aussi l'activité de hOgg1 *via* une interaction fonctionnelle, en augmentant le *turnover* de l'activité ADN glycosylase de l'enzyme (HILL *et al.* 2001; VIDAL *et al.* 2001). Le complexe XPC-HR23B de la voie NER serait quant à lui un cofacteur dans l'excision de la 8-oxoguanine *via* le BER en stimulant l'activité de hOGG1 par une augmentation de son chargement au niveau du dommage et de son *turnover* (D'ERRICO *et al.* 2006). Ogg1 interagit aussi avec la protéine p300/CBP, responsable de son acétylation au niveau des résidus lysine 338 et 341. Cette modification post-traductionnelle de la protéine conduit à stimuler l'activité d'hOgg1 en présence d'APE1 en réduisant son affinité pour le site AP généré (BHAKAT *et al.* 2006). Suite à un stress oxydant, la protéine humaine de recombinaison Rad52, une protéine impliquée dans la réparation des cassures double-brin et la réparation par recombinaison homologue, est colocalisée avec hOgg1 et augmente son activité d'excision (augmentation de son *turnover*) tandis qu'hOgg1 inhibe Rad52 (DE SOUZA-PINTO *et al.* 2009). Autre partenaire d'hOgg1, la protéine PKC (ou protein kinase C) ne montre aucun effet significatif sur son activité catalytique mais plutôt sur sa compartimentalisation cellulaire (DANTZER *et al.* 2002). La phosphorylation d'hOgg1 par PKC est la première évidence d'une modification post-traductionnelle d'hOGG1. Enfin, récemment, il a été montré que hOgg1 interagissait avec une autre protéine : la PARP-1 (pour « poly-(ADP-ribose) polymerase 1), interaction favorisée en condition de stress oxydant. Absente chez *S. cerevisiae*, cette protéine de détection des dommages de l'ADN est impliquée, chez l'Homme, dans la réparation de l'ADN et dans d'autres processus cellulaires. hOgg1 interagit physiquement, *via* sa région N-terminale, avec la PARP-1, stimulant l'activité de poly-(ADP-ribosyl)ation de cette dernière. En retour, PARP-1 inhibe l'activité de hOgg1 (NOREN HOOTEN *et al.* 2011). Globalement, on remarque que ces interactions font intervenir des protéines déjà impliquées dans les voies de réparation par excision et sont donc situées à proximité de la zone d'action d'Ogg1, ce qui facilite leur interaction *in vivo* et ainsi la prise en charge des intermédiaires de réparation,

Processus	Nom	Organisme	Références
Réparation	Pol30*	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Pol32*	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Sin3	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Ssl1	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	<u>Rad9-Rad1-Hus1</u> (complexe)	<i>Hs</i>	(PARK <i>et al.</i> 2009)
	<u>XRCC1</u>	<i>Hs</i>	(MARSIN <i>et al.</i> 2003)
	APE1	<i>Hs</i>	(HILL <i>et al.</i> 2001; VIDAL <i>et al.</i> 2001)
	XPC	<i>Hs</i>	(D'ERRICO <i>et al.</i> 2006)
	Rad52	<i>Hs</i>	(DE SOUZA-PINTO <i>et al.</i> 2009)
	<u>PARP-1</u>	<i>Hs</i>	(NOREN HOOTEN <i>et al.</i> 2011)
Réplication	Pol30*	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Pol32*	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Rim1 (mitochondries)	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
Autres			
Cycle cellulaire	Cdc13	<i>Sc</i>	(ADDINALL <i>et al.</i> 2008)
	<u>XRCC1</u>	<i>Hs</i>	(MARSIN <i>et al.</i> 2003)
	<u>Rad9-Rad1-Hus1</u> (complexe)	<i>Hs</i>	(PARK <i>et al.</i> 2009)
Biosynthèse des microtubules Adressage au noyau	Gim5	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	<u>Kap95</u>	<i>Sc</i>	(KROGAN <i>et al.</i> 2006)
	<u>Srp1</u>	<i>Sc</i>	(KROGAN <i>et al.</i> 2006)
Stabilité chromosomique	Cst9	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Sin3	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
Modulation chromatine/histones	Sgf11	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Taf12	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
Transcription	Ssl1	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Taf12	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	Ume6 (méiose)	<i>Sc</i>	(COLLINS <i>et al.</i> 2007)
	XRCC1	<i>Hs</i>	(MARSIN <i>et al.</i> 2003)
Réponse au stress (aldose réductase) Voie de transduction de signal	Gre3	<i>Sc</i>	(COSTANZO <i>et al.</i> 2010)
	PKC	<i>Hs</i>	(DANTZER <i>et al.</i> 2002)
	p300/CBP	<i>Hs</i>	(BHAKAT <i>et al.</i> 2006)

Tableau 6 Partenaires d'interactions de Ogg1

Les abréviations *Hs* et *Sc* correspondent aux espèces *Homo sapiens* et *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement. Les partenaires physiques apparaissent en gras et sont soulignés.

* Pol32 est la 3^{ème} sous-unité de l'ADN polymérase δ et Pol30 est l'homologue du facteur de processivité PCNA. Une grande majorité des interactants de Ogg1 chez *S. cerevisiae* a été identifiée par une étude à grande échelle des interactions génétiques (COLLINS *et al.* 2007).

produits des étapes en amont et substrats pour les étapes en aval. Finalement, ces réseaux d'interactions directes ou indirectes, *via* de possibles modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation) de l'enzyme et/ou d'intermédiaires réactionnels, peuvent stimuler d'une manière générale l'activité d'excision du dommage par hOgg1, en modulant directement son *turnover* et/ou en favorisant une localisation cellulaire optimale de l'enzyme. Le paradoxe observé entre, d'une part l'abondance de lésions de l'ADN de types 8-oxoguanine et leur réparation effective par Ogg1 et, d'autre part l'efficacité catalytique AP lyase très faible de l'enzyme *in vitro*, peut s'expliquer par un tel réseau complexe d'interactions dont d'autres acteurs restent probablement à identifier.

I.D.1.a. Chez la levure *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, la majorité des partenaires de yOgg1 qui ont été identifiés avant le début de notre projet sont fonctionnels. Ils résultent de l'identification de complexes protéiques fonctionnels par l'étude à grande échelle des interactions génétiques présentes chez *S. cerevisiae* (E-MAP pour « epistatic miniarray profile ») (COLLINS *et al.* 2007). Cette étude a révélé des partenaires d'interaction fonctionnelle de yOgg1 impliqués dans la réparation et/ou la réplication de l'ADN (la sous-unité Pol32 de l'ADN polymérase δ ; Pol30, l'homologue du facteur de processivité PCNA ; Sin3 ; Ssl1 et Rim1), dans la biosynthèse des microtubules (Gim5), dans la stabilité chromosomique (Cst9 et Sin3), dans la modulation de la chromatine (Sgf11 et Taf12) et enfin la transcription (Ssl1, Taf12 et Ume6). Plus tard, d'autres études ont permis d'identifier l'interaction fonctionnelle de yOgg1 avec la protéine du cycle cellulaire Cdc13 (ADDINALL *et al.* 2008) et l'aldose réductase de réponse au stress Gre3 (COSTANZO *et al.* 2010). Seuls deux partenaires d'interaction physique étaient clairement identifiés : les protéines d'adressage au noyau Kap95 et Srp1. Cela a été permis par une analyse globale de l'interactome dans *S. cerevisiae* basée sur la capture d'interactants par des méthodes d'affinité (similaires à du « pull-down ») combinées à différentes méthodes de spectrométrie (KROGAN *et al.* 2006) (**Tableau 6**).

Néanmoins, dès 2002, soit avant l'identification de ces partenaires, la recherche de partenaires de Ogg1 chez *S. cerevisiae* (yOgg1) susceptibles de moduler son activité *in vivo* était débutée par l'équipe de Serge Boiteux dans le cadre de la thèse de Lionel Gellon (GELLON 2002). A cette époque, aucune interaction physique entre Ogg1 (levure ou Homme)

et des partenaires putatifs n'avait encore été identifiée. Cette étude visait à mieux comprendre la coordination de l'étape initiatrice du BER avec les étapes en aval dans la levure *S. cerevisiae*.

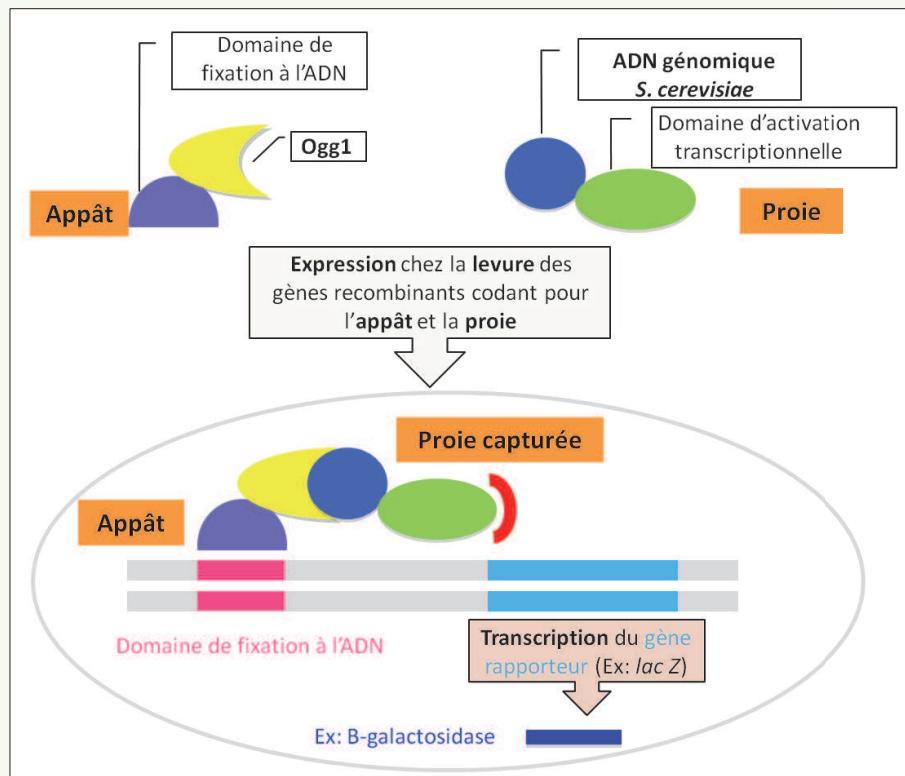
I.D.2. Projet de Recherche

I.D.2.a. Eléments initiateurs du projet

Lionel GELLON, sous la responsabilité de Serge BOITEUX, met en effet en place en 2002 un crible double-hybride dans la levure *S. cerevisiae* (yDH) pour identifier des partenaires de yOgg1 *in vivo*. Le protocole expérimental utilisé est similaire à celui décrit pour la recherche de partenaires de yNtg2 (GELLON *et al.* 2002). Cette technique est très couramment utilisée dans l'identification des partenaires d'une protéine considérée. Au-delà des interactions stables, elle permet également de détecter des interactions transitoires et instables et reste généralement indépendante de l'expression endogène d'une protéine. Elle a consisté, dans le cas présent, dans la co-expression chez *S. cerevisiae* de deux protéines fusion : (i) la protéine « appât » recombinante yOgg1, dont on veut identifier les partenaires et qui est couplée au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (BD pour « Binding Domain », vecteur recombinant pAS2Δ-yOgg1) et, (ii) d'une protéine recombinante dite « proie », issue d'une banque d'ADN génomique de levure et qui possède quant à elle le domaine d'activation de la machinerie transcriptionnelle de Gal4 (AD pour « Activation Domain », vecteur recombinant pACT2). Le domaine BD reconnaît une séquence spécifique de l'ADN, promotrice du gène rapporteur *lac Z* codant pour la β-galactosidase. La transcription de *Lac Z* n'aura lieu que si les deux protéines fusion interagissent. Ainsi, les colonies de levure recombinantes résultantes, qui se colorent en bleu en présence de X-gal (substrat chromogénique de la β-galactosidase), indiquent une interaction entre yOgg1 et le produit du DNA de levure cloné considéré. Au contraire, en absence d'interaction, il n'y pas de transcription de *lac Z* et donc de production de la β-galactosidase et les colonies résultantes restent blanches en présence de X-gal (**Figure 13A**). Ce crible yDH a permis l'identification de 3 partenaires putatifs de yOgg1: (i) la protéine Dsk2/Dph1 de la superfamille UBL (codée par le gène *DSK2* chez *S. cerevisiae* et *DPH1* chez *Schizosaccharomyces pombe*) impliquée avec Rad23 dans la duplication du corps polaire et dans la voie protéolytique ubiquitine-dépendante en interagissant avec le protéasome, (ii) la

protéine Srp1 ou Kap60, une Importine impliquée dans l'import des protéines (ayant un peptide signal de type NLS) dans le noyau et (iii) la sous-unité catalytique Pol2 de l'ADN polymérase répliquative Polε (**Figure 13B**). Un rationnel peut être trouvé pour justifier une interaction physique avec ces 3 partenaires putatifs.

A



B

Locus	gène	Séq. lue (pb)	ORF (pb)	Col. B Gal	Fonction
YNL262W	POL2	98-1399	6669	+++	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase ε ou Pol2, proposée pour être impliquée dans la synthèse du brin continu dans la réplication de l'ADN avec l'ADN polymérase δ impliquée dans la synthèse discontinue du brin retardé
YNL262W	POL2	98-1380	6669	+++	
YNL262W	POL2	188-1251	6669	+++	
YNL262W	POL2	188-1215	6669	+++	
YNL262W	POL2	188-1236	6669	+++	
YNL262W	POL2	188-1236	6669	+++	
YNL262W	POL2	188-1236	6669	+++	
YNL262W	POL2	103-1293	6669	+++	
YNL262W	POL2	239-1182	6669	++	
YMR276W	DSK2	38-646	1122	+	Duplication du corps polaire et participation à la dégradation des protéines via le protéasome
YNL189W	SPR1	233-749	1629	+	Importine impliquée dans l'import nucléaire, la structure du noyau, la ségrégation des chromosomes et le cycle cellulaire

Figure 13 Recherche par « double-hybride » chez *S. cerevisiae* de partenaires putatifs de *yOgg1* (GELLON 2002)

A Principe du crible double-hybride chez la levure *S. cerevisiae* **B** Résultats les plus significatifs du crible « double-hybride » utilisant *yOgg1* comme appât. Sur 12 clones positifs, 7 positifs forts (+++) correspondent à des régions chevauchantes du gène *POL2*. Le clone encadré (*POL2a*) a été ensuite sous-cloné dans le vecteur pGEX-6P2 pour la production dans *E. coli* (souche arctique) du fragment Pol2A fusionné en N-term à la GST (GST-yPol2A) pour les expériences d'interaction physique par « pull down » (voir figures 15 à 19).

L'interaction yOgg1/Dsk2 (1 seul clone positif en yDH qui code pour un fragment N-terminal de Dsk2, résidus 12-215, contenant un domaine UBL pour « ubiquitine-like » connu pour interagir avec des substrats protéiques poly-ubiquitylés (SEKIGUCHI *et al.* 2011)) pourrait réguler l'abondance relative de yOgg1 dans la levure. yOgg1 nouvellement synthétisée peut être transférée dans le noyau (ou dans la mitochondrie) pour participer à la réparation de l'ADN ou, alternativement, être ubiquitylée et finalement être dégradée par la voie du protéasome (avant son import dans le noyau ou après son export du même compartiment). Ce mécanisme de régulation (qui peut être généralisé à de nombreux composants cellulaires) aurait comme effet de moduler le « turnover » de la protéine (synthèse-dégradation) et ainsi, la réparation de l'ADN. En conséquence, une interaction entre yOgg1 ubiquitylée et Dsk2 pourrait avoir un sens biologique. Bien qu'on ne retrouve pas dans Ogg1 de site canonique d'ubiquitination, il a récemment été montré que la protéine humaine hOgg1 pouvait être ubiquitylée lors d'une hyperthermie et ensuite être dirigée vers la voie du protéasome pour être finalement dégradée (FANTINI *et al.* 2013). L'hyperthermie est associée à une déficience de réparation de hOgg1 dans le noyau de la cellule.

Une interaction transitoire entre yOgg1 et Srp1 (1 seul clone positif en yDH qui code pour un fragment interne de Srp1, résidus 78-249, et contient plusieurs répétitions du domaine ARM (YANO *et al.* 1992; CONTI *et al.* 1998)) peut apparaître elle-aussi cohérente puisque yOgg1 contient à son extrémité C-terminale une séquence d'adressage au noyau (motif NLS bipartite (VAN DER KEMP *et al.* 1996)) pouvant être reconnue par Srp1 (Kap60), une Importine soluble impliquée dans le transit des protéines vers le noyau *via* les pores nucléaires. Il est intéressant de noter que cette interaction physique entre yOgg1 et Srp1 a été récemment confirmée par une analyse globale de l'interactome dans *S. cerevisiae* (voir partie I.D.1.a) (KROGAN *et al.* 2006). Ce résultat valide le test double-hybride mis en place.

Les interactions observées par yDH entre yOgg1 et les protéines Dsk2 et Srp1 (GELLON 2002) participeraient par des voies différentes à réguler l'abondance relative de yOgg1 dans le noyau et, en conséquence, la réparation de la 8-oxoG. Il ne s'agit cependant pas de partenaires putatifs de yOgg1 jouant directement un rôle dans la voie BER dans le noyau.

L'interaction d'yOgg1 avec une région N-terminale de la sous-unité catalytique de Pol ϵ , Pol2, pourrait être plus directement impliquée dans la voie BER dans le noyau. Les limites inhérentes à la technique yDH n'excluent pas que cette interaction (et que celles observées

avec Dsk2 et Spr1) puisse être due à l'activation fortuite du gène rapporteur (faux-positif), mais cette hypothèse reste peu probable étant donné le nombre et la nature des clones positifs obtenus correspondant à Pol2 (**Figure 13B**). En effet, sur les 12 clones révélés positifs en γ DH, 7 clones, tous différents, issus de la banque d'expression de *S. cerevisiae*, correspondent à des régions chevauchantes du gène *POL2*. Ceci va dans le sens d'une interaction entre ces deux protéines *in vivo*.

Conceptuellement, une telle interaction entre γ Ogg1 et γ Pol ϵ est cohérente puisque les deux enzymes sont impliquées dans la voie de réparation BER chez *S. cerevisiae* (BOITEUX and JINKS-ROBERTSON 2013) (**Tableau 2**). En effet, dans la levure, on ne distingue pas clairement une voie « Short Patch » car l'ADN polymérase Pol β , impliquée dans l'étape de resynthèse des petits « gap » dans cette voie du BER des eucaryotes supérieurs, n'existe pas dans la levure. On retrouve cependant d'une façon générale chez les eucaryotes l'intervention de Pol ϵ dans la voie du « Long Patch » (voir Introduction). Aussi, du fait de notre étroite collaboration avec l'équipe de Serge Boiteux et de notre expertise, et au vu de l'intérêt scientifique que constitue une telle interaction, nous avons choisi d'articuler notre projet de recherche autour de la caractérisation de l'interaction de γ Ogg1 avec γ Pol2.

Notre hypothèse est qu'il existerait une interaction physique entre γ Ogg1 et Pol ϵ , qui se ferait *via* la sous-unité catalytique de cette dernière, et qui impacterait la réparation des lésions 8-oxoG par la voie BER chez *S. cerevisiae*.

I.D.2.b. L'ADN polymérase ϵ : nouveau partenaire de Ogg1 chez *S. cerevisiae*?

Pol ϵ est une ADN polymérase répliquative de la famille B, homologue de Pol III chez *E. coli* et très conservée chez tous les eucaryotes. Au-delà de son rôle dans la réplication de l'ADN, elle est impliquée dans d'autres processus cellulaires importants comme la réparation et la recombinaison de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine ou la transmission des modifications épigénétiques (PURSELL and KUNKEL 2008). De ce fait, Pol ϵ interagit avec différentes protéines de ces voies (**Tableau 7**) (PURSELL and KUNKEL 2008). C'est une holoenzyme constituée de quatre sous-unités : une sous-unité catalytique principale Pol2 (chez *S. cerevisiae*) qui porte entre autres l'activité ADN polymérase et l'activité 3'→5' exonucléase (POLE1 chez l'Homme) et trois petites sous-unités Dpb2, 3 et 4 (POLE2, 3 et 4 chez l'Homme) (**Figure 14**) (PURSELL and KUNKEL 2008). Pol2 contient 2222 acides aminés avec

une extrémité N-terminale très conservée au niveau de laquelle on retrouve les activités polymérase et exonucléase de l'enzyme. Sa partie C-terminale ne présente pas d'activité catalytique mais présente deux doigts de zinc et permet également son interaction physique aux petites sous-unités (**Figure 14**) (PURSELL and KUNKEL 2008). Ces-dernières sont essentielles à la stabilité de Pol2. Polε est une enzyme très fidèle qui catalyse la synthèse du brin continu de l'ADN pendant la réplication tout en exerçant une activité 3'-5' exonucléase (BEBENEK and KUNKEL 2004). Elle est avec Polδ la seule ADN polymérase eucaryote nucléaire à avoir une telle activité de correction d'erreur. Elle reconnaît et fixe l'ADN double brin *via* ses petites sous-unités mais fixe également l'ADN simple brin *via* l'extrémité N-terminale de Pol2 (TSUBOTA *et al.* 2006). La fixation de Polε à un ADN simple brin inhibe son activité catalytique en absence de la protéine réplivative A (RPA) (TSUBOTA *et al.* 2006). De façon intéressante, Polε est l'ADN polymérase en charge de la resynthèse du brin d'ADN dans le BER chez *S. cerevisiae* et a ce même rôle dans la voie à brèches longues PCNA dépendante chez l'Homme. Elle est également avec Polδ l'ADN polymérase de la voie de réparation NER eucaryote.

Processus	Nom	Organisme	Références
Réplication	Dpb11p	Sc	(MASUMOTO <i>et al.</i> 2000)
	TopBP1	Hs	(MAKINIEMI <i>et al.</i> 2001)
	PCNA	Hs	(LI 1998)
	Claspine	Xl	(LEE <i>et al.</i> 2005)
Réparation	PCNA	Hs	(LI 1998)
	LigI	Hs	(MOSER <i>et al.</i> 2007)
Autres			
Cohésion des chromatides sœurs	Trf4	Sc	(CARSON and CHRISTMAN 2001)
Remodelage de la chromatine	CHRAC* (complexe)	Sc/Hs/Dm	(IIDA and ARAKI 2004) (POOT <i>et al.</i> 2000) (CORONA <i>et al.</i> 2000)
Transcription/ Réparation?	RNAPII (complexe)	Hs	(MALDONADO <i>et al.</i> 1996)
Cycle cellulaire	Mdm2	Hs	(VLATKOVIC <i>et al.</i> 2000)
Recombinaison	LigIII	Bt	(JESSBERGER <i>et al.</i> 1993)

Tableau 7 Partenaires d'interactions physiques de l'ADN polymérase réplivative ε (PURSELL and KUNKEL 2008)

Les abréviations Bt, Dm, Hs, Sc et Xl correspondent aux espèces *Bos taurus*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Xenopus laevis*, respectivement.

* Dpb4 (et ses homologues) constitue une sous-unité de CHRAC. Il n'y a pas d'étude attestant d'une interaction physique directe entre CHRAC et Pol2.

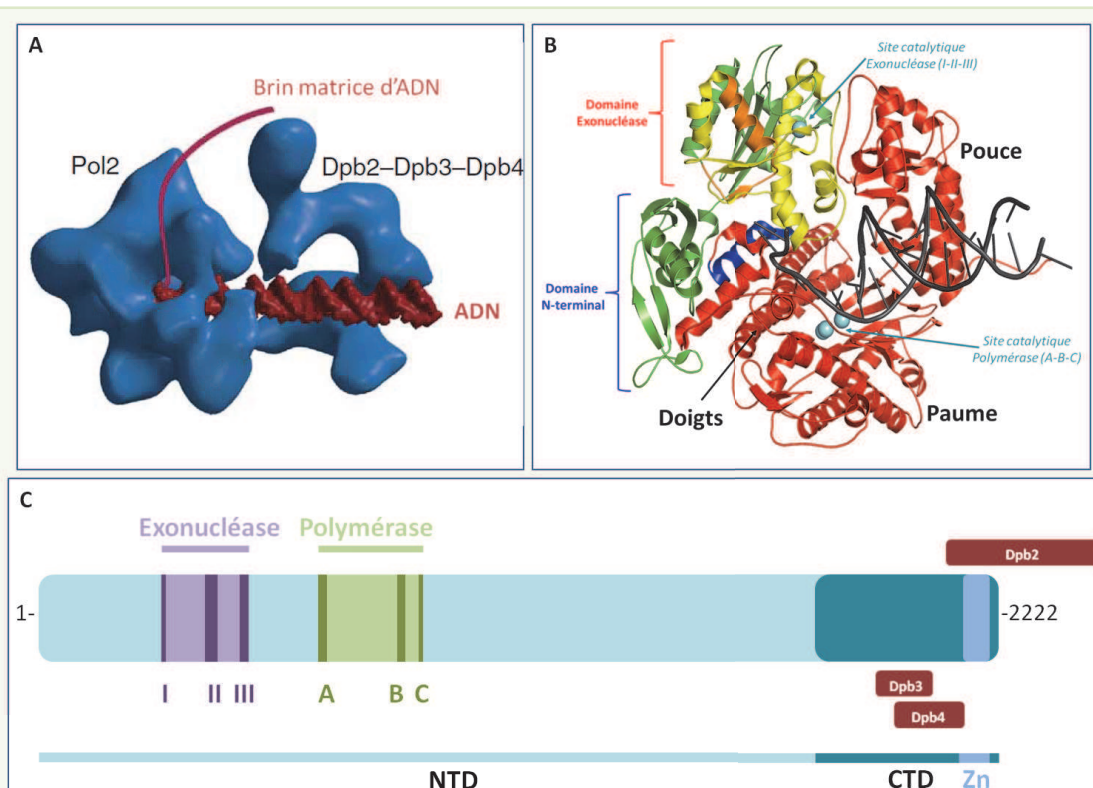


Figure 14 L'ADN polymérase répliquative ϵ chez *S. cerevisiae* (ASTURIAS *et al.* 2006)

A Représentation par cryo-microscopie électronique de la Pol ϵ chez *S. cerevisiae*. Les 4 sous-unités de Pol ϵ , en conformation fermée, sont ici représentées en interaction avec l'ADN, dans un modèle proposé par Asturias *et al.*, en 2006. **B** Il n'existe pas à ce jour de structure cristalline par rayons X de Pol ϵ . La structure de son homologue RB69 (du bactériophage du même nom), en « forme de main », est présentée en interaction avec l'ADN (en noir). On distingue le pouce, la paume et les doigts. Les domaines exonucléase et N-terminal sont indiqués ainsi que les sites catalytiques de ses activités polymérase et exonucléase. **C** Organisation structurale de la sous-unité catalytique Pol2 de Pole (adaptée de Pursell et Kunkel, 2008 et Johansson *et al.*, 2010). Elle comprend un total de 2222 résidus avec un domaine N-terminal (NTD, en bleu clair) et un domaine plus petit C-terminal (CTD, en bleu foncé). Dans le domaine NTD, on retrouve ses activités 3'-5' exonucléase (en violet, avec les motifs conservés I, II et III) et ADN polymérase (en vert, avec les motifs conservés A, B et C). Dans le domaine CTD, on retrouve deux doigts de zinc ainsi que les régions d'interaction aux petites sous-unités: Dpb2 (qui se lie au CTD de Pol2 par son extrémité N-terminale) et le complexe Dpb3/Dpb4.

II. Résultats

II.A. Interaction physique entre yOgg1 et yPol2

**II.B. Cartographie des domaines mis en jeu dans
l'interaction yOgg1/yPol2**

**II.C. Approches fonctionnelles in vitro de l'interaction
yOgg1/yPol2**

Approche expérimentale

Etant donnée l'implication de Pol ϵ dans la réparation de l'ADN et la mise en évidence par « double-hybride » d'une interaction avec yOgg1, l'objectif essentiel de mon travail de thèse, après confirmation d'une interaction physique entre ces deux protéines, est d'initier la caractérisation de cette interaction (spécificité, conservation, domaines structuraux mis en jeu, etc.) dans le but final de proposer un sens physiologique à cette interaction *via* une étude fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*.

Mon travail traitera dans un premier temps de la confirmation d'une interaction physique entre yOgg1 et yPol2 (sous-unité catalytique de Pol ϵ). L'optimisation de la production et de la purification des deux partenaires ont permis la mise en place d'un test d'interaction qualitatif et quantitatif de « pull-down » *in vitro*.

Dans une deuxième partie, nous présenterons nos tentatives de cartographier physiquement les domaines mis-en-jeu par chaque partenaire dans l'interaction, en couplant une approche combinée utilisant la méthode de « double-hybride » et de « pull-down » pour évaluer l'interaction des deux partenaires suite à leurs troncations et à l'introduction de mutations ponctuelles.

Dans une dernière partie, nous tenterons d'éclaircir le sens fonctionnel de cette interaction en examinant en quoi cette interaction peut moduler l'activité de yOgg1 et son interaction avec l'ADN *in vitro*.

Partie II.A.

Interaction physique entre yOgg1 et yPol2

II.A. Interaction physique entre yOgg1 et yPol2

II.A.1. Mise en évidence *in vitro* d'une interaction physique entre yOgg1 et yPol2A par la technique de « pull-down » Ni-NTA

Après la mise en évidence d'une interaction par yDH, il est nécessaire de valider que cette interaction s'établit bien physiquement entre les deux partenaires. En effet, il n'est pas exclu qu'une interaction entre deux partenaires s'établisse indirectement dans un complexe ternaire, *via* un troisième partenaire, sans qu'il y ait une interaction directe à proprement parlé entre les deux partenaires considérés.

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à montrer que l'interaction révélée par yDH entre yOgg1 et Pol2 correspondait à l'existence d'une interaction physique directe entre les deux partenaires.

Pour cela nous avons choisis de travailler avec le fragment peptidique minimal de Pol2 pour lequel le signal d'interaction obtenu par yDH était le plus fort (voir encadré, **Figure 13B**). En effet, nous avons jugé plus judicieux à ce moment-là de travailler avec le plus petit fragment de Pol2 et non la protéine entière de près de 255 kDa, afin d'éliminer toute contrainte stérique liée à la taille imposante de la protéine entière dans les tests d'interaction et les autres expériences à venir. Il correspond au fragment s'étendant des nucléotides 188 à 1215 (soit des résidus 63 à 405 de Pol2, **Figure 13B**) et a été directement obtenu par amplification PCR du gène *POL2* après extraction de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* (voir Matériel et Méthodes). Le fragment peptidique de Pol2 correspondant sera désigné yPol2A. L'expression de yPol2A a été permise par son sous-clonage dans le vecteur d'expression pGex-6P2 qui lui associe en position N-terminale une étiquette GST (Glutathion S-Transférase), générant une protéine recombinante que l'on appellera GST-yPol2A, globalement acide (pI = 5.03) et d'une taille de 66,186 kDa. Différents tests d'expression ont été nécessaires à la production optimale de ce peptide-fusion, qui s'est en réalité révélé être très insoluble. En effet, après une série de productions dans les souches classiques d'expression BL21(DE3) et Rosetta, à différentes températures et conditions d'induction, l'analyse des fractions solubles des extraits bactériens par « Western Blot » (WB, révélation avec des anticorps anti-GST après SDS-PAGE et transfert sur membrane) n'a révélé que de très petites quantités de protéine GST-yPol2A produite et soluble, insuffisantes pour

envisager des expériences systématiques d'interaction. C'est finalement l'utilisation d'une souche particulière de *E. coli* appelé Arctic-RILs (Stratagene, voir Matériel et Méthodes) qui a permis, par une production à très basse température (10-12°C), d'obtenir un rendement de production suffisant de GST-yPol2A (voir Matériel et Méthodes). Sur la base de ce protocole d'expression, nous avons pu isoler la protéine recombinante par chromatographie d'affinité du fait de la présence de l'étiquette GST, *via* l'utilisation d'une résine GST-Trap (voir Matériel & Méthodes). A ce stade de purification, l'homogénéité de GST-yPol2A appréciée par SDS-PAGE (révélation au bleu de Coomassie) reste médiocre (**Figure 15A**, piste 1). La source majeure d'hétérogénéité de cette préparation provient en fait d'une fragmentation de la protéine d'intérêt que l'on peut aisément apprécier par WB (**Figure 15A**, piste 4).

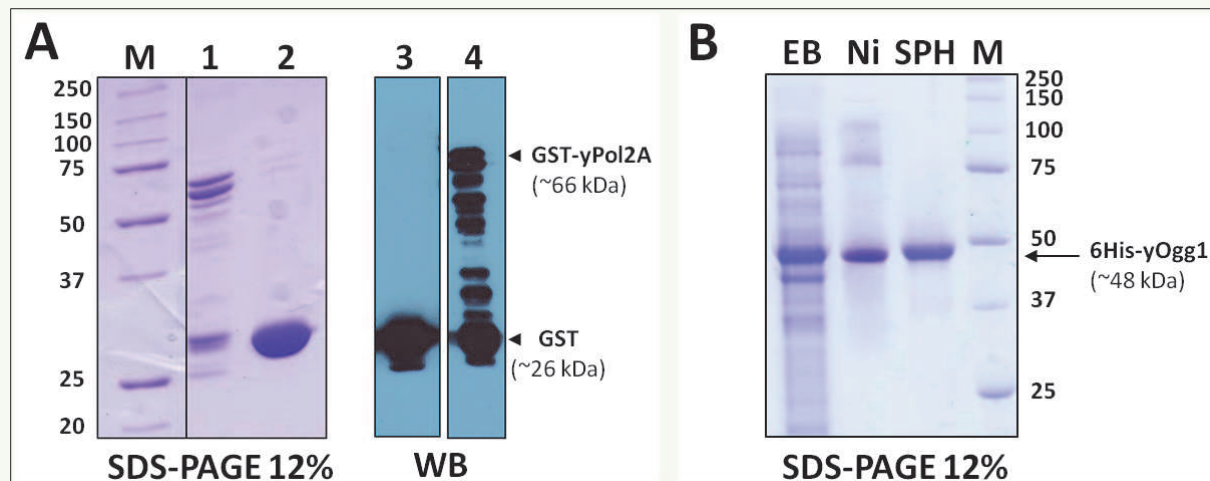


Figure 15 Matériel biologique utilisé dans les expériences de « pull-down »

A Préparation de la protéine-fusion GST-yPol2A. Après sous-clonage de l'ORF *YPOL2A* dans le plasmide pGEX-6P2 sous le contrôle d'un promoteur T7 pol, la protéine est produite dans une souche Arctic-RILs sous la forme d'une protéine-fusion GST-yPol2A. Après lyse des bactéries et chromatographie d'affinité sur GST-Trap, la fraction éluée de la GST-Trap (pistes 1 et 4) est analysée par SDS-PAGE et les protéines sont révélées soit au bleu de Coomassie soit par Western Blot (WB) et révélées par des anticorps anti-GST (voir Mat & Met). L'étiquette GST produite à partir du plasmide vide est extraite et purifiée de la même manière que GST-Pol2A. L'analyse de l'étiquette GST est présentée dans les pistes 2 et 3. La piste M correspond au dépôt de marqueurs de tailles (Biorad). La fraction GST-Trap de GST-yPol2A sera extemporanément utilisée dans les expériences de « pull-down ». **B** Préparation de la protéine-fusion 6His-yOgg1. Le sous-clonage de l'ORF *YOGG1* et la production de la protéine sous forme d'une protéine fusion 6His-yOgg1 sont décrits dans la section Mat & Met. Les différentes fractions de purification sont analysées par SDS-PAGE: pistes EB=extrait brut; Ni= Ni-NTA; SPH=Chromatographie échangeuse de cations Sulfopropyl-High Performance. Après l'étape SPH, la protéine est aliquotée et stockée à -80°C. Cette préparation de 6His-yOgg1 sera utilisée dans les expériences de « pull-down ».

Les analyses par SDS-PAGE et WB indiquent certes la présence d'une bande (doublée) majoritaire au voisinage de 66 kDa (masse attendue pour GST-yPol2A) mais également celles de plusieurs autres bandes, plus petites, qui seraient en partie le fruit d'une dégradation de GST-yPol2A entière car nombre d'entre elles sont révélées par WB et correspondent donc à des fragments N-terminal de la protéine-fusion encore associés à l'étiquette GST. Parmi ces fragments, l'étiquette GST de 26 kDa (**Figure 15A**, repérée grâce aux pistes 2 et 3 correspondant à la protéine GST produite à partir du plasmide vide) est pratiquement aussi abondante que la bande doublée de GST-yPol2A, indiquant une instabilité de l'étiquette GST dans la protéine-fusion. Cette instabilité de l'étiquette GST est un phénomène fréquent et qui a été mentionnée dans de nombreuses autres études ((TERPE 2003; RITTER *et al.* 2004; HASSAN *et al.* 2007; RAO *et al.* 2007; PURANIK *et al.* 2011)). Malheureusement, toutes les tentatives pour améliorer l'homogénéité de l'échantillon par l'ajout à la procédure de purification d'autres étapes de chromatographie (échangeurs d'anions et de cations et gel filtration) se sont soldées par des échecs. La protéine continue à se dégrader jusqu'à aboutir à une perte totale de la protéine d'intérêt. La faible solubilité de GST-yPol2A ainsi que son instabilité intrinsèque ne sont finalement pas surprenantes si l'on tient compte des données de la littérature qui indiquent que la sous-unité catalytique Pol2 de Polε ne peut être produite et purifiée dans de bonnes conditions qu'en présence de ses petites sous-unités et plus particulièrement de la sous-unité non-catalytique essentielle Dpb2. Il est proposé qu'en se fixant à la partie C-terminale de Pol2, Dpb2 permet de stabiliser la sous-unité catalytique (LI *et al.* 1997; KESTI *et al.* 2004). yPol2A pourrait également correspondre à un domaine structural tronquée de Pol2 dont l'intégrité et la stabilité dépendrait en partie des régions flanquantes en N- et C-terminal. yPol2A serait ainsi plus sensible à la protéolyse.

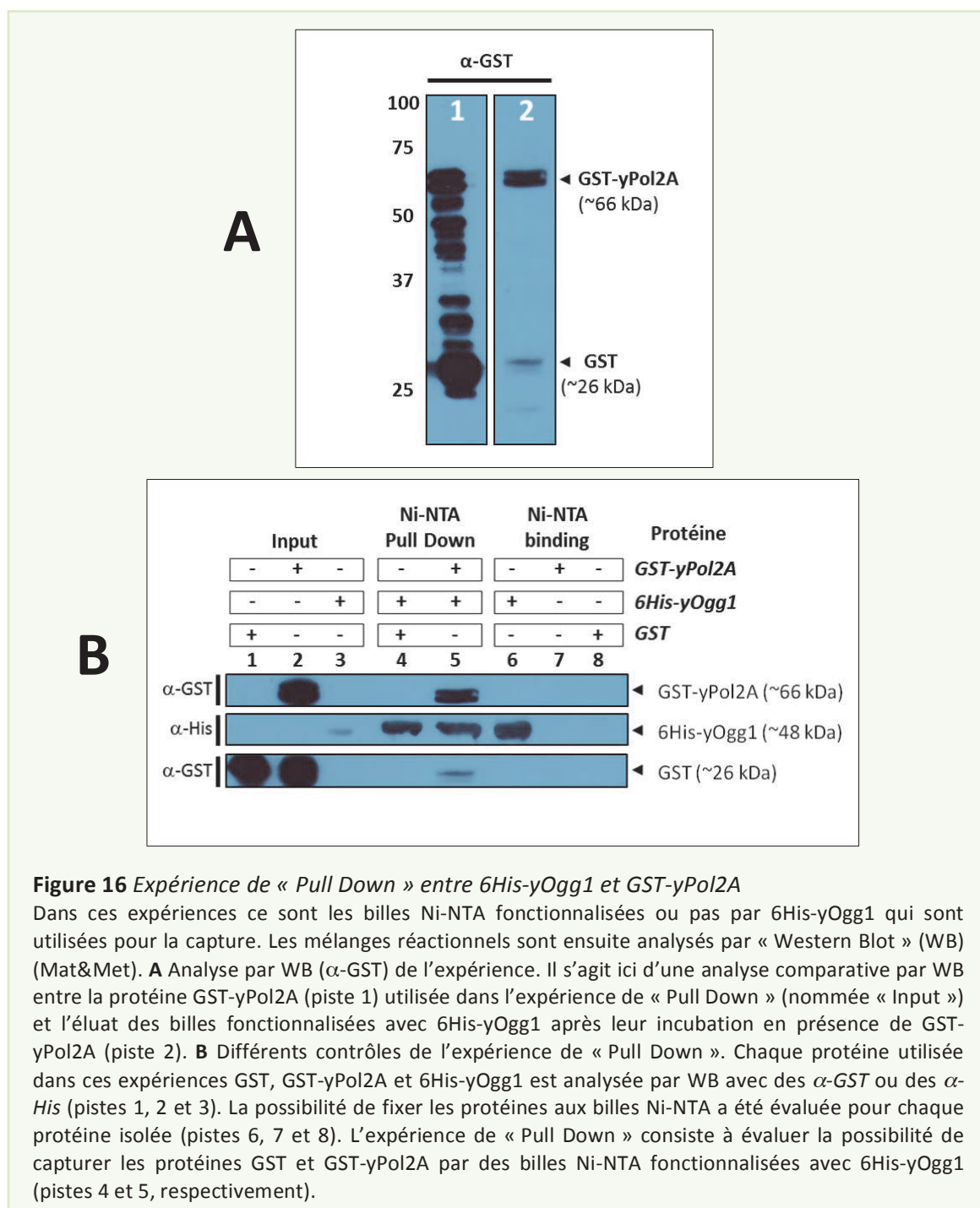
Malgré les difficultés que nous avons rencontrées pour préparer la protéine-fusion GST-yPol2A, nous avons décidé d'initier les premiers tests d'interaction physique entre les protéines yOgg1 et yPol2 en utilisant l'échantillon GST-yPol2A extemporanément élué de la résine GST-Trap. Dans le but de mettre en évidence une interaction physique *in vitro* entre 6His-yOgg1 et GST-yPol2A, nous avons choisi la technique du « pull-down », basée sur le principe de chromatographie d'affinité. Pour cela, nous avons sous-cloné le gène codant pour la protéine entière yOgg1 dans le vecteur d'expression pET-30a. Après transformation d'une souche BL21(DE3) de type *Rosetta*, le vecteur recombinant pET30a-YOGG1 permet la production de la protéine sous forme d'une protéine fusion 6His-yOgg1 de 46,7 kDa dans

laquelle l'étiquette 6His est insérée en N-terminal de γ Ogg1 (voir Matériel & Méthodes pour la construction du vecteur). Le protocole détaillé de la production et de la purification de 6His- γ Ogg1 est présenté dans la partie Matériel & Méthodes. Brièvement, après une lyse ménagée des bactéries (en présence de Lysozyme et par sonication), la purification est initiée par une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA suivie d'une chromatographie échangeuse de cation (type SPHP) (**Figure 15B**). Ce protocole de purification permet d'obtenir la protéine 6His- γ Ogg1 homogène à plus de 95%. Des billes magnétiques Ni-NTA (QUIAGEN) ont été fonctionnalisées avec cette préparation de la protéine 6His- γ Ogg1 (voir Matériels et Méthodes). Les billes ainsi fonctionnalisées ont été incubées 1h à 4°C en présence de GST- γ Pol2A préparée le jour-même. Après plusieurs lavages, les protéines fixées sur les billes puis éluées à l'imidazole ont été analysées par « Western Blot » (WB) avec des anticorps anti-His (α -His) ou anti-GST (α -GST) (**Figure 16**). Nous pouvons ainsi observer que la protéine GST- γ Pol2A interagit bien physiquement avec la protéine γ Ogg1 dans les conditions expérimentales utilisées (**Figure 16A**, piste 2). Il est intéressant de noter que parmi tous les fragments de dégradations de notre préparation GST- γ Pol2A (**Figure 16A**, piste 1), seules les deux plus grands fragments (doublet observé, **Figure 16A**, piste 2) sont capables d'interagir avec la 6His- γ Ogg1 immobilisée sur les billes Ni-NTA. Cela nous indique qu' γ Pol2A est probablement le domaine minimal de Pol2 capable d'interagir avec γ Ogg1. Nous verrons que cette première observation sera en partie confirmée par des expériences de double-hybride visant à cartographier les domaines d'interactions entre les deux protéines. Afin d'évaluer la sélectivité de cette interaction, nous avons vérifié qu'elle ne résultait ni d'une fixation non spécifique de GST- γ Pol2A à la résine Ni-NTA *via* son étiquette GST ou γ Pol2A, les composantes de la fusion (**Figure 16B**, pistes 7 et 8), ni de sa fixation *via* son étiquette GST à γ Ogg1 (**Figure 16B**, piste 4).

Quant à la bande de faible intensité correspondant à la GST et qui semble « être éluée » en même temps que le complexe GST- γ Pol2A/6His- γ Ogg1 (**Figures 16A**, piste 2 et **16B**, piste 5), il s'agirait en fait de l'étiquette GST perdue après élution par la protéine-fusion GST- γ Pol2A (perte spontanée de l'étiquette que nous pouvons apprécier sur la préparation de GST- γ Pol2A ; **Figure 16A**, piste 1) et juste avant l'analyse de l'éluat par WB.

Malgré l'instabilité intrinsèque de la protéine GST- γ Pol2A, nous avons pu initier une étude qualitative montrant que γ Ogg1 interagit de façon sélective avec γ Pol2A et ce indépendamment des étiquettes utilisées (GST et 6His). Néanmoins et du fait de cette

instabilité, il est impossible d'envisager une étude quantitative de cette interaction et du même coup d'évaluer l'impact de cette interaction sur l'activité de l'enzyme tout du moins *in vitro*.



II.A.2. Obtention de yPol2C, un fragment stable de Pol2, pour une étude quantitative de l'interaction

Suite à cette première étude, nous avons émis l'hypothèse que l'instabilité d'yPol2A pouvait en partie résulter du fait qu'il lui manque en N- et/ou C-terminal des régions susceptibles de le stabiliser. Nous avons donc décidé d'étendre la taille du fragment de Pol2 tout en se sachant limités par la taille imposante de la protéine Pol2 entière. Le « design » raisonné de cette nouvelle construction s'est d'abord basé sur une analyse bioinformatique avec le logiciel iTasser qui semblait indiquer que la séquence peptidique d'yPol2A était relativement proche de la région équivalente de l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) avant même celle de l'ADN polymérase du bactériophage RB69 (Rb69) (WANG *et al.* 1997; KIM *et al.* 2008). L'objectif de cette analyse était de trouver une ADN polymérase répliquative de la famille B dont la structure primaire était proche de celle de la région N-terminale de Pol2 incluant yPol2A et dont la structure tridimensionnelle était connue (**Figure 17**). Si l'on considère que la Pfu est un bon modèle pour Pol2 (Rb69 l'est aussi), nous pouvons observer que yPol2A contient deux sous-domaines, le domaine N-terminal (NTD) et une partie seulement du domaine exonucléase (EXO).

D'après la structure 3D de la Pfu, il apparaît clair que la région en C-terminale de yPol2A (**Figure 17**, région colorée en bleu) contient d'une part la partie manquante du domaine EXO et une région additionnelle (feuillet- β antiparallèle et une grande hélice- α) qui vient interagir à l'interface entre les domaines EXO et NTD et avec le domaine NTD. De ces observations, il apparaît raisonnable de penser que l'instabilité d'yPol2A (en rouge, **Figure 17**) provient de l'absence de cette extension en C-terminal (en bleu, **Figure 17**). Nous avons donc décidé d'étendre yPol2A en C-terminal (résidus 406 à 537 ; **Figure 17**, région bleu) et de n'exclure aucun résidu en N-terminal : le nouveau fragment, appelé yPol2C, s'étend ainsi des résidus 1 à 537. Après sous-clonage de la région d'intérêt dans le vecteur d'expression pGex-6P2, nous avons observé un bon niveau d'expression et de solubilité de la protéine fusion GST-yPol2C avec la souche Arctic-RILs à 12°C (**Figure 18A**, piste 1). Etant donné la stabilité de la protéine, nous avons pu introduire une étape de filtration (Superdex 75) après l'étape de chromatographie d'affinité (**Figure 18A**, pistes 2 et 3). GST-yPol2C est un polypeptide acide ($pI = 5,21$) de 88,56 kDa. Même si nous observons toujours de la dégradation résiduelle au

Pol2	1	MMFGKKNNNGSSSTARYSAGNKYNTLSNNYALS AQQLLNASKIDDIDSM	50
PfuPol	0	-----	0
Pol2	51	GFERYPVPQYNGRFD AKDIDQIPGRVGLTMMHATLVSQETLSGSGNGGG	100
PfuPol	0	-----	0
Pol2	101	NSNDGERVTTNQGISGVDFYFLDEEG-----GSFKSTVVYD---	136
PfuPol	1	-----mildvdyiteegkpvirlfkkengkfk--iehdrtf	34
Pol2	137	-PYFFIACNDESRVNDVEELVKKYLESCLSLQIIRKEDL-TMDNHLGL	184
PfuPol	35	rpyiyallrddskieevkkitge-----zhgkivrivdvekkflgk	78
Pol2	185	QKTLIKLSFVNSNQLFEARKLLRPILQDNANNVQRNIYNVAANGSEKVD	234
PfuPol	79	pitvwklylehpqdv-----ptlr-----ekvr	101
Pol2	235	AKHLIEDIREYDVPYHVRVSIDKDIRVGKWKVYVTOQGFIEDTRKIAFADP	284
PfuPol	102	ehpavvdifeydipfakrylidkgl-----ipmeg--eeelki----	137
Pol2	285	VVMAFDIET-----KPPLKFPDSAVDQIMMISYMIDGEGFLITNRE	326
PfuPol	138	--lafdietlyhegeefgkqp-----iimisyadeneavitwkn	175
Pol2	327	IISEDIEDFEYTPKPEYPGFFTIFNENDEVALQRFFEHIRDVPTVIST	376
PfuPol	176	i-----dlpy-----vesvstekemikrflriirekdpdiivt	208
Pol2	377	FNGDFFDWPFIHNRSKIHLDM-----FDEIG--FAPDAEGEYKS	414
PfuPol	209	yngdsfdfpylakraeklgikltigrdgsepkmqrigdmtavevgkri--	256
Pol2	415	SYCSHMDCFRWVKRDSYLPQGSQGLKAVTQSKLGYNPTE---LDPEIMTP	461
PfuPol	257	----hfdlyhvirttinlp--tytleavyeaifg-kpkekvyadeiakaw	299
Pol2	462	YAFEKPQHLSEYSVSDAVATYYLYMKYVHPFIFSLCTIILNPDETLRKG	511
PfuPol	300	esgenlervakysmedakatylgkefl-pmeiqslrlvgqplwdvsrss	348
Pol2	512	TGTLCEMLLMVQAYQHNLILPNKHTPIERFYDGHLLSEITYVGGHVESL	561
PfuPol	349	tglnvewflrkayerneavpnk---pseeyqrllres--ytggvfkep	393
Pol2	562	EAGVFRSDLKNEFKIDPSAIDELLQELPEALKFSVEVENKSSVDKVTNFE	611
PfuPol	394	ekglw-----en-----	400
Pol2	612	EIKNQITQKLELKENNIRNELPLIYHVDVASMYPNIMTTNRLQPD S IKA	661
PfuPol	401	-----ivlydykslypsiiithnvspdtlnl	426
Pol2	662	ERDCASCDF-----NRPGKTCARKLKAWARGEFFPSKMDEYNMIK	701
PfuPol	427	e-gcknydiapqvgghkfckdipg-----fipsllg-->	775

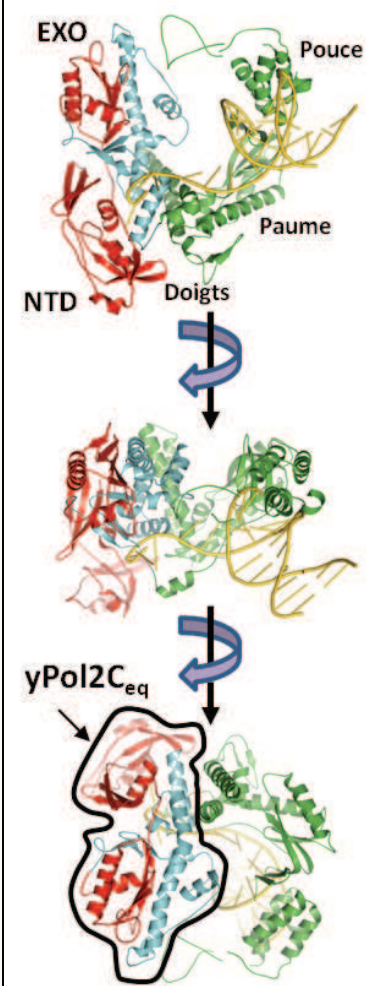


Figure 17 Considérations structurales pour l'obtention de yPol2C, un fragment de yPol2 stable incluant yPol2A

Panneau de gauche: Alignement des structures primaires en N-terminale des protéines Pol2 et de l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus* (PfuPol). La séquence de yPol2A (résidus 63-405) est indiquée par les lettres rouges, les extensions en N- (résidus 1-62) et C-terminal (résidus 406-537) pour obtenir Pol2C (résidus 1-537) sont indiquées par des lettres violettes soulignées. Dans PfuPol, le domaine équivalent à Pol2A, la région équivalente de l'extension en C-terminale de Pol2A et les régions s'étendant au-delà en C-terminal sont surlignés en rouge, bleu et vert, respectivement. Panneau de droite: Structure cristallographique d'un complexe PfuPol/ADN (ID code: 4AIL). Les différentes vues proposées de la structure du complexe sont reliées entre elles par rotation. Le code couleur des domaines de PfuPol reprend celui des surlignages indiqués dans l'alignement des structures primaires. yPol2A correspond au domaine bilobé rouge tandis que l'équivalent de yPol2C (yPol2C_{eq}) inclut en plus le domaine bleu. L'hémi-duplexe d'ADN est en jaune.

cours du temps ainsi qu'une propension à perdre l'étiquette GST, la stabilité globale de la protéine GST-yPol2C est bien plus grande que celle de GST-yPol2A. Testée par « pull-down », nous avons pu vérifier que l'allongement de notre fragment n'a pas affecté son interaction physique *in vitro* avec yOgg1. Aussi, ayant dès lors à notre disposition de plus grandes quantités de protéine GST-yPol2C, nous faisons le choix de révéler son interaction avec yOgg1 non plus par Western Blot, mais directement au bleu de Coomassie ce qui nous a permis de titrer GST-yPol2C par 6His-yOgg1 (**Figure 18B**). Des quantités croissantes de GST-yPol2C sont incubées en présence d'une quantité constante de 6His-yOgg1 immobilisée sur Ni-NTA. En ayant réalisé, au préalable, des gammes de 6His-yOgg1 et GST-yPol2C, nous avons pu extraire un rapport d'intensité de coloration (voir Matériel et Méthodes) qui nous a permis, à partir de la quantification du signal d'interaction en « pull-down », d'estimer la fraction relative de GST-yPol2C capturée. Cette dernière correspond au rapport entre la quantité de GST-yPol2C fixée à 6His-yOgg1 immobilisée sur les billes et celle de 6His-yOgg1 immobilisée dans chaque essai. En présence de près de 5 fois plus de GST-yPol2C que de 6His-yOgg1 dans l'essai, la quantité de GST-yPol2C capturée est d'environ 43% (**Figure 18B**)

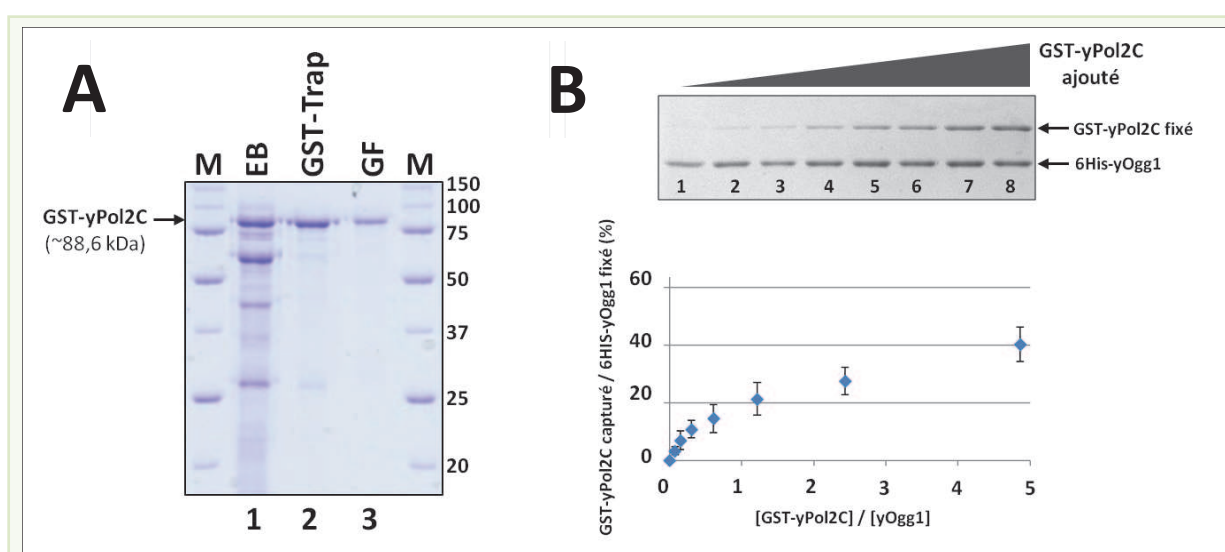


Figure 18 yPol2C, un domaine stable de yPol2 qui interagit avec yOgg1

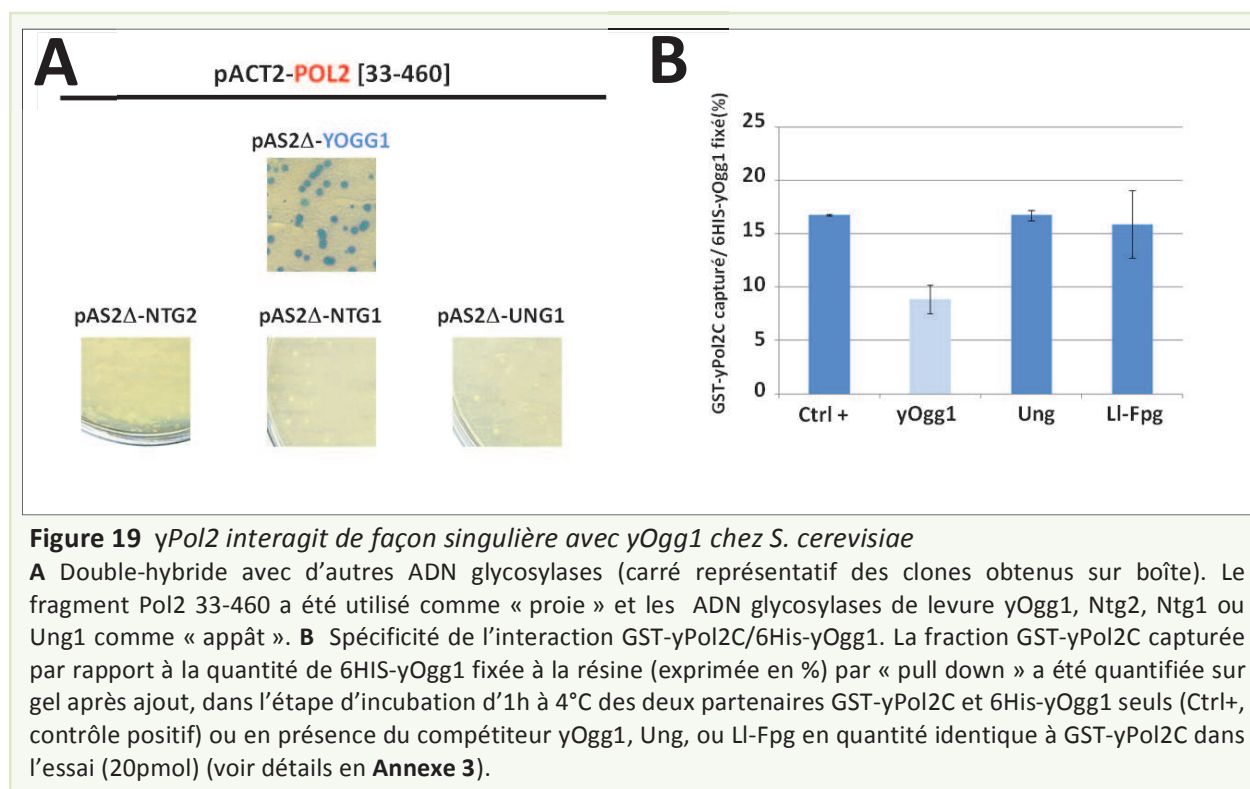
A Purification d'yPol2C. yPol2C a été purifié en 2 étapes de purification sous la forme d'une protéine-fusion GST-yPol2C. L'extract brut (fraction totale des protéines solubles) est fractionné successivement par une chromatographie d'affinité (GST-Trap) puis par gel filtration (Superdex 75, GF). L'homogénéité de chaque fraction de purification est analysée par SDS-PAGE. **B** Titrage par « Pull Down » de GST-yPol2C par 6His-yOgg1 immobilisée sur Ni-NTA. Des quantités croissantes de GST-yPol2C (pistes 1 à 8; 0, 4.5, 8.9, 17.9, 35.8, 71.5, 143 et 286 pmol respectivement) sont incubées en présence d'une quantité constante de 6His-yOgg1 (65.6 pmol) immobilisée sur Ni-NTA. Après lavage des billes Ni-NTA, les protéines sont ensuite éluées comme décrit dans la section Mat&Met. Chaque éluat est ensuite analysé par SDS-PAGE. La quantification des protéines est déterminée directement après coloration au bleu de Coomassie à partir de gammes étalons pour chaque protéine. On exprime en ordonnée le rapport (en %) entre la quantité de GST-yPol2C capturée (après fixation à 6His-yOgg1 immobilisée sur les billes Ni-NTA) et la quantité de 6His-yOgg1 fixée sur les billes dans chaque essai (voir contrôle de la spécificité de l'interaction en **Annexe 2**).

(ce qui signifie que la quantité de GST-yPol2C fixée représente 43% de la quantité de protéines 6His-yOgg1 disponible). Pour cet exemple précis, cela représente environ 28 pmol, soit 10% seulement de la quantité réelle de GST-yPol2C apportée dans l'essai (285 pmol). Sans pouvoir réellement conclure quant à l'affinité entre nos deux partenaires, cette expérience de titrage par « pull-down » constitue cependant un test quantitatif d'interaction entre les deux partenaires.

II.A.3. yPol2 n'interagit pas avec les autres ADN glycosylases

L'interaction yOgg1/yPol2 ayant été mise en évidence *in vivo* par double-hybride et confirmée *in vitro* par « pull-down », nous nous sommes tout naturellement posé la question de la spécificité de cette interaction. En particulier, yOgg1 est-elle la seule ADN glycosylase chez *S. cerevisiae* à interagir avec Pol2 ou est-ce une règle généralisable aux autres ADN glycosylases? Nous avons pu voir dans l'introduction que parmi les partenaires identifiés de Polε (autre les sous-unités) (**Tableau 7**), aucune ADN glycosylase n'a encore été trouvée ni chez *S. cerevisiae* ni chez l'Homme. Néanmoins, l'absence de mise en évidence d'une interaction quel que soit la méthode utilisée ne signifie pas qu'elle n'existe pas puisque par yDH, nous avons bien identifié yPol2 comme partenaire possible de yOgg1. De la même manière, en utilisant le même test de double-hybride (avec la même banque de levure « proie ») et comme protéine « appât » les endonucléases III-like de levure Ntg1 et Ntg2, Lionel GELLON en 2002 n'a pas identifié Pol2 comme partenaire de ces ADN glycosylases (GELLON 2002). Pour mieux documenter cette question, nous avons sous-cloné les gènes codant pour les ADN glycosylases de *S. cerevisiae* Ung1, Ntg1 et Ntg2 dans le même vecteur de double-hybride que celui utilisé pour yOgg1 (pGBT9 ou pAS2Δ, pour un taux d'expression faible ou élevé, respectivement), faisant d'elles des protéines « appât » dont nous avons testé leur interaction avec un fragment yPol2 [33-460] positif en double hybride (**Figure 19A**). Aucune de ces ADN glycosylases n'interagit *in vivo* avec ce fragment yPol2 (clones blancs). L'interaction chez *S. cerevisiae* de la protéine yOgg1 avec Pol2 serait donc singulière et non-généralisable aux autres ADN glycosylases. Afin de confirmer ce résultat, nous avons testé *in vitro* par « pull-down » une possible modulation de l'interaction GST-yPol2C/6His-yOgg1 en présence d'une autre ADN glycosylase comme compétiteur de l'interaction. Nous pouvons ainsi observer que pour un « pourcentage de binding » (quantité de GST-yPol2C

capturée par rapport à la quantité de 6HIS-yOgg1 fixée aux billes, exprimée en pourcentage) évalué à près de 16% en absence de tout compétiteur, celui-ci est diminué de moitié en présence de yOgg1 (8% environ) alors qu'il reste quasi inchangé en présence des protéines Ung1 et LI-Fpg (ADN glycosylase bactérienne de *Lactococcus lactis*) (**Figure 19B et Annexe 3**). Les expériences d'interaction *in vitro* confirment donc bien les expériences *in vivo* à savoir que Pol2 semble interagir de façon singulière avec yOgg1 et donc avec aucune autre ADN glycosylase.

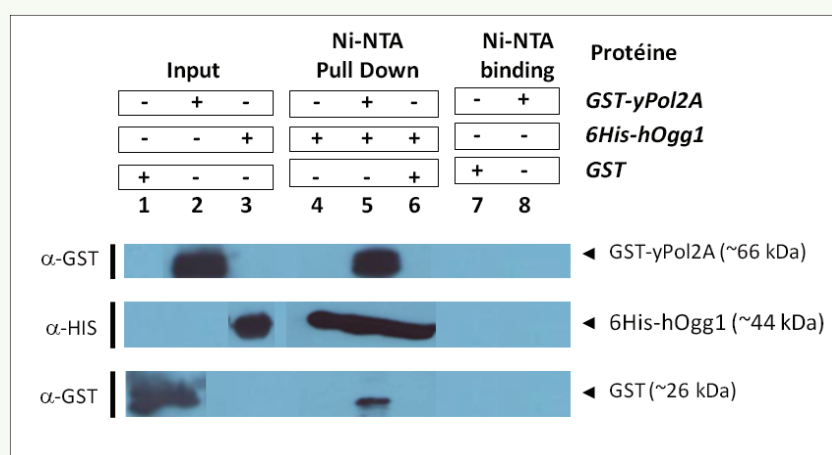


II.A.4. Pol2 interagit physiquement avec hOgg1 *in vitro*

Au vu de la singularité de cette interaction chez la levure, nous avons voulu savoir si elle lui était propre ou si au contraire elle était conservée chez d'autres espèces, et en l'occurrence chez l'Homme. Nous avons donc testé en « pull-down » l'interaction du fragment yPol2A avec l'homologue humain hOgg1 (**Figure 20A**). Après transformation d'une souche BL21(DE3) de type *Rosetta*, le vecteur recombinant pET30a-*hOGG1* nous a permis de produire la protéine fusion 6His-hOgg1 de 44,34 kDa dans laquelle l'étiquette 6His est insérée en N-terminal de hOgg1 (voir Matériel & Méthodes). Le protocole détaillé de la production et de la purification de 6His-hOgg1 est similaire à celui utilisé pour la protéine 6His-yOgg1 et est présenté dans la partie Matériel & Méthodes. La protéine 6His-hOgg1,

homogène à plus de 95%, est mise en présence des billes Ni-NTA qui sont ensuite incubées 1h à 4°C en présence de GST-yPol2A préparée le jour-même. Après les étapes de lavage et d'élution des protéines fixées sur les billes, une analyse par WB nous a permis d'observer que la protéine GST-yPol2A interagit bien physiquement et de façon spécifique avec la protéine hOgg1 dans les conditions expérimentales utilisées (**Figure 20A**). Comme pour yOgg1, nous observons un doublet correspondant aux deux plus grands fragments de GST-yPol2A allant encore une fois dans le sens d'un domaine minimal d'interaction que constituerait possiblement yPol2A. Nous avons également testé *in vitro* par « pull-down » la modulation de l'interaction GST-yPol2C/6His-yOgg1 en présence de hOgg1 (**Figure 20B et Annexe 3**). Cette dernière agit comme un compétiteur de l'interaction, réduisant le signal

A



B

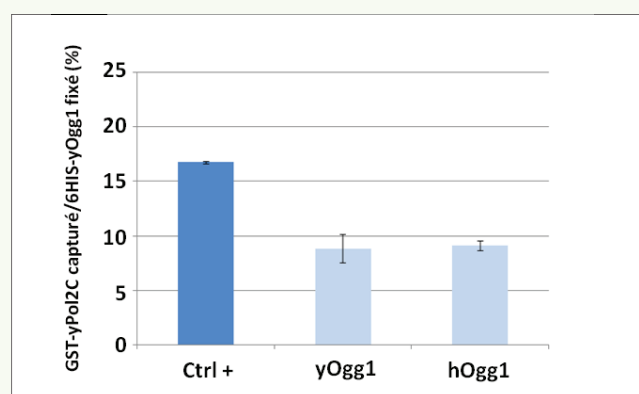


Figure 20 Expérience de « Pull Down » entre 6His-hOgg1 et GST-yPol2A

A Dans cette expérience ce sont les billes Ni-NTA fonctionnalisées ou pas par 6His-hOgg1 qui sont utilisées pour la capture. Les protéines GST, GST-yPol2A et 6His-hOgg1 sont analysées par WB avec des α -GST et des α -HIS (pistes 1, 2 et 3). La possibilité de fixer les protéines aux billes Ni-NTA a été évaluée pour chaque protéine isolée (pistes 4, 7 et 8). L'expérience de « Pull Down » consiste à évaluer la possibilité de capturer les protéines GST-yPol2A et GST par des billes Ni-NTA fonctionnalisées avec 6His-hOgg1 (pistes 5 et 6, respectivement). **B** Modulation de l'interaction GST-yPol2C/6His-yOgg1 *in vitro* en « pull-down » par l'ajout de hOgg1. La fraction GST-yPol2C capturée (exprimée en %) a été quantifiée sur gel après ajout lors de l'étape d'incubation d'1h à 4°C des deux partenaires GST-yPol2C et 6His-yOgg1, du compétiteur yOgg1 ou hOgg1 en quantité identique à GST-yPol2C dans l'essai (20pmol) ou en absence de compétiteur (Ctrl+, contrôle positif) (voir détails en **Annexe 3**).

d'interaction de près de 50% comme cela est observé lors de l'ajout d'yOgg1. Cela semble donc confirmer l'existence d'une interaction physique entre Pol2 et hOgg1, faisant de l'interaction Polε/Ogg1 une interaction conservée chez l'Homme et donc *a priori* importante pour la cellule.

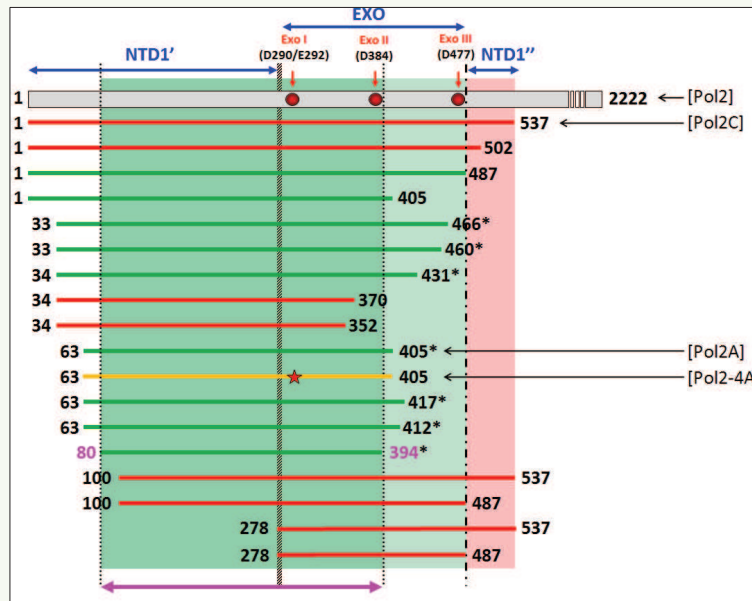
II.A.5. Conclusion

A partir des travaux initiés par Lionel GELLON révélant par double hybride une interaction *in vivo* chez *S. cerevisiae* entre les protéines yOgg1 et yPol2, nous avons pu, d'une part, démontrer que ces dernières interagissaient bien physiquement entre elles *in vitro*, et d'autre part, que Pol2 interagit de façon spécifique avec yOgg1 chez la levure et que l'interaction Pol2/Ogg1 serait *a priori* conservée chez l'Homme. Pour aboutir à ces conclusions, nous avons néanmoins dû faire face à l'instabilité du fragment yPol2 utilisé (yPol2A), qui bien qu'ayant été rallongé (yPol2C), reste un fragment avec lequel il est difficile de travailler, tant au niveau de sa production et de sa purification que dans son utilisation dans des expériences de biochimie basiques.

Partie II.B.

Cartographie des domaines mis en jeu dans l'interaction yOgg1/yPol2

A



B

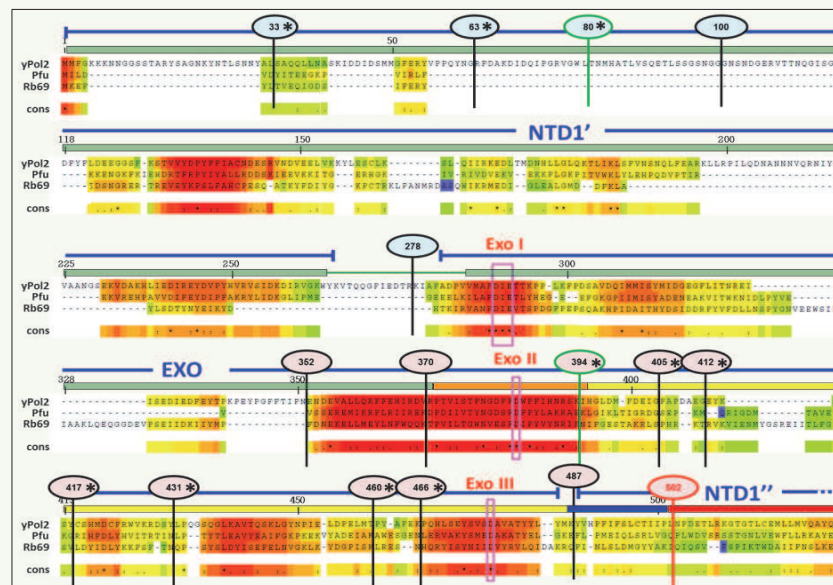


Figure 21 Fragments de yPol2 testés par « double-hybride »

A Représentation schématique des résultats de double-hybride (détaillés en **Annexe 4**). Les fragments situés en N-terminal de Pol2, positifs et négatifs pour l'interaction avec yOgg1, sont indiqués par des segments de droite en vert et en rouge, respectivement. Lorsque que l'interaction est altérée sans être supprimée (intensité de coloration bleu faible), le fragment est coloré en orange. L'étoile noire marquant certains fragments indique les clones sortis du « screen » de double-hybride. L'étoile rouge indique la double mutation dans le sous-site Exo I D290A/E292A connu pour abolir l'activité 3'→5' exonucléase. Les fonds vert et rouge en bruit de fond indiquent les zones positives et négatives (en C-terminal) en yDH, respectivement. Le fond vert clair indique la limite en C-terminal du signal positif d'interaction en yDH. Les bords de fragment indiqués en magenta repèrent le domaine minimal de yPol2 encore capable d'interagir avec yOgg1 (flèche magenta). La dichotomie de la région N-terminale de Pol2 en NTD1', EXO et NTD1'' est basée d'une part sur l'alignement des structures primaires de yPol2 avec ces homologues et sur les structures 3D connues de ces protéines (cf. Fig.22). **B** Alignements en N-terminal de la séquence de yPol2 avec celles de la Pfu et de Rb69 (voir zoom en **Annexe 5**). Les bulles indiquent les bords de fragments de Pol2 testés en yDH (sur fond bleu, les bornes N-terminales et sur fond rose, les bornes C-terminales). La bulle rouge en C-terminal indique la borne affectant complètement le yDH. Les deux bulles vertes indiquent les bornes du fragment le plus petit interagissant encore avec yPol2. Les rectangles au-dessus de la séquence de yPol2 reprennent le code couleur adopté pour des sous-domaines structuraux de yPol2 dans la Fig.23. Les sous-domaines structuraux de Rb69 sont indiqués par des segments de droite bleu. Le domaine exonucléase (EXO) contient les sous-sites Exo I (D290/E292), Exo II (D384) et Exo III (D477) impliqués dans la fixation du magnésium essentiel à l'activité exonucléase de yPol2, Pfu et Rb69.

II.B. Cartographie des domaines mis en jeu dans l'interaction yOgg1/yPol2

L'interaction *in vivo* (par « double-hybride ») et *in vitro* (par « pull-down ») entre yPol2 (en particulier pour les fragments yPol2A et yPol2C) et yOgg1 ayant été clairement établie, nous avons cherché à identifier les domaines (minimaux) et/ou les résidus d'acides aminés critiques de chaque partenaire nécessaires et suffisants pour une interaction yPol2/yOgg1. Dans ce but, nous avons suivi deux procédures, l'une consistant en des troncations et l'autre en une mutagenèse dirigée de chaque partenaire de l'interaction. Le rationnel pour ces procédures s'est basé d'une part, sur des alignements de séquences permettant de cibler par exemple des résidus (très) conservés et d'autre part, sur les modèles tridimensionnels homologues à notre disposition dans la « Protein Data Bank » (Rb69 (WANG *et al.* 1997), Pfu (KIM *et al.* 2008) et hOgg1 (BRUNER *et al.* 2000a)), les structures 3D de yPol2 et yOgg1 n'étant pas disponibles. Les différentes versions des deux partenaires résultants de ces procédures ont été testées *in vivo* par yDH pour leur capacité à interagir. L'objectif final de cette étude est donc de cartographier les déterminants structuraux et/ou fonctionnels de chaque partenaire nécessaires à leur interaction.

II.B.1. Cartographie de yPol2

Les résultats de cette étude systématique en yDH pour yPol2 sont rassemblés dans le panneau A de la **figure 21** (et voir **Annexe 4** pour le détail des résultats de yDH). Il reprend d'une part les 7 clones positifs chevauchants obtenus par crible « double-hybride » (dont yPol2A) que nous avons confirmé établissant ainsi des premières bornes en N- et C-terminal (à savoir le peptide 80-394 de yPol2) et d'autre part 8 constructions supplémentaires basées pour l'essentiel sur la connaissance du modèle structural de Rb69. Les étapes qui ont guidé cette étude sont présentées dans les paragraphes qui suivent.

II.B.1.a Rupture de colinéarité entre « double-hybride » et « pull-down » : le cas de yPol2C

Le premier résultat inattendu de cette étude réside dans le test d'interaction en yDH du fragment plus stable yPol2C. A la différence du fragment yPol2A [63-405], positif en

interaction avec yOgg1 dans les deux tests *in vivo* et *in vitro*, nous observons que le fragment yPol2C [1-537], qui est positif en « pull-down », donne un signal négatif de « double-hybride » (**Figure 21A**). Il y a donc pour yPol2C une perte de colinéarité entre « double-hybride » (négatif) et « pull-down » (positif). Ceci suggère immédiatement que les extensions en N- et/ou en C-terminal introduites par rapport à yPol2A pourraient être associées à une perte d'interaction de yPol2C avec yOgg1 *in vivo*. Deux hypothèses nous apparaissent comme pouvant expliquer l'interaction négative de yPol2C en yDH.

La première consiste à imaginer que le domaine d'interaction de yPol2 permettant l'interaction avec yOgg1 puisse être enfoui ou masqué de façon artificielle ou pas, dans le cas particulier de la structure de yPol2C du fait, en partie, de l'ajout des régions additionnelles en N- et/ou en C-terminal. Cette hypothèse implique donc que le domaine d'interaction de yOgg1 ne serait pas toujours accessible dans yPol2 et que pour des raisons qui nous échappent, yPol2C serait dans une conformation figée rendant impossible le démasquage de ce domaine. Néanmoins, l'interaction physique entre yPol2 et yOgg1 ayant été confirmée *in vitro* par « pull-down » pour le fragment yPol2C, cela nous conduit à rejeter cette hypothèse et à envisager une autre explication.

Nous pouvons en effet imaginer, dans une deuxième hypothèse, que l'extension en N- et/ou en C-terminal de yPol2A pour former yPol2C ait pu générer une contrainte stérique telle qu'elle ne permet plus de mettre en phase les domaines activateur de transcription, AD (en N-terminal de yPol2C) et de fixation à l'ADN, BD (en N-terminal de yOgg1) nécessaires à l'activation de la transcription du gène *lac Z* (gène rapporteur du test yDH). Le signal négatif en yDH obtenu pour yPol2C serait donc en réalité un « faux-négatif ». yPol2C serait bien capable d'interagir avec yOgg1 (comme l'indique le test de « pull-down ») mais cette interaction ne pourrait pas être révélée *in vivo* par yDH du fait de contraintes stériques qui empêcheraient une bonne orientation relative des domaines AD et BD.

Pour explorer cette dernière hypothèse nous avons effectué des troncations en N- et en C-terminal de yPol2C en nous basant essentiellement sur le modèle structural de l'ADN polymérase Rb69.

II.B.1.b. Cartographie du domaine N-terminal de γ Pol2

N'existant à ce jour aucune structure tridimensionnelle de γ Pol2, nous avons mentionné précédemment (voir Résultats) une analyse bioinformatique réalisée sur la séquence peptidique du fragment instable γ Pol2A, qui s'est trouvée être relativement proche de la

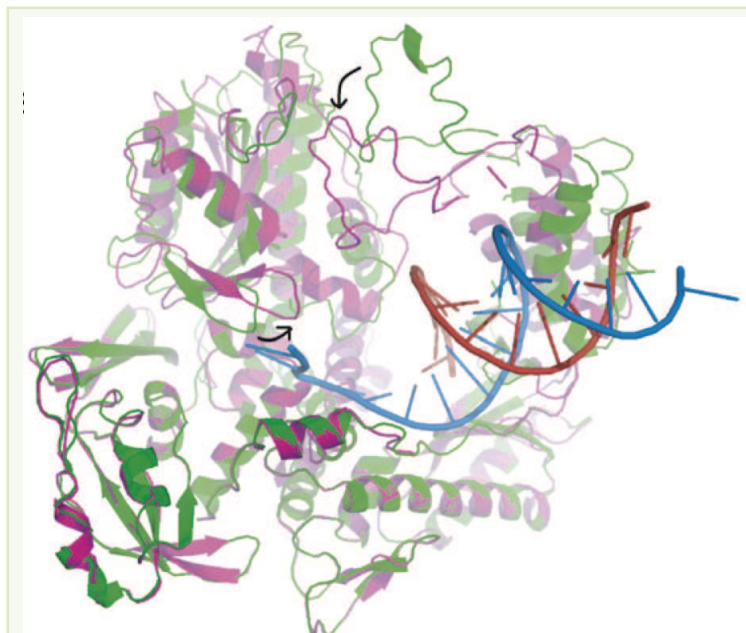


Figure 22 Comparaison structurale entre la Pfu et la Rb69 fixées sur un héli-duplexe d'ADN (KIM *et al.* 2008)

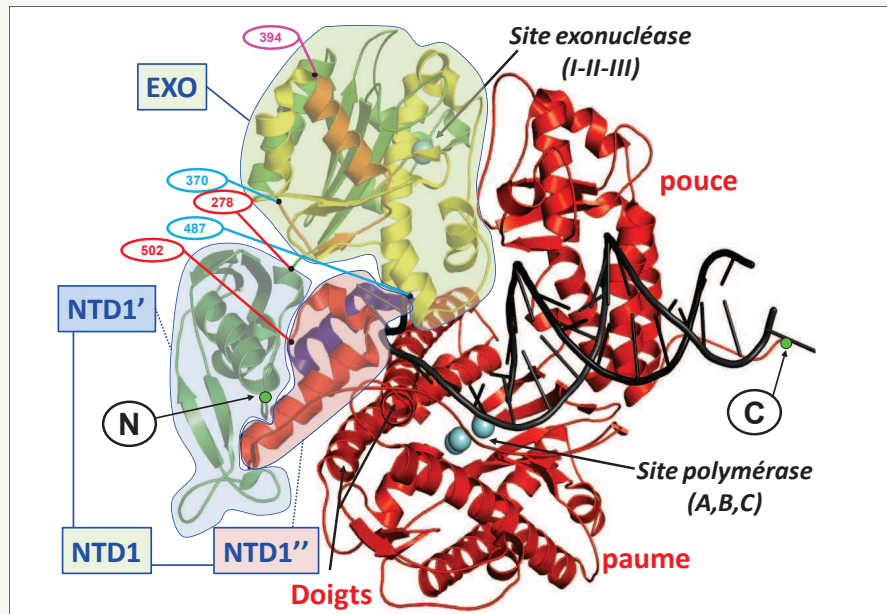
Il s'agit d'une superposition des structures de la forme dite « open » de Rb69 (vert) et de la forme dite « close » de la Pfu (violet). La conformation « close » a aussi été observée pour Rb69. Le passage de « open » à « close » est caractérisé en particulier par l'établissement d'une interaction entre le domaine « pouce » et le domaine exonucléase. Le brin matrice de l'héli-duplexe est en bleu tandis que le brin néosynthétisé est en rouge.

région équivalente de la Pfu (ADN polymérase répliquative de *Pyrococcus furiosus*), avant même celle de Rb69 (ADN polymérase répliquative gp43 du bactériophage RB69). En effectuant cette même analyse à partir de la structure primaire de la protéine γ Pol2 entière, c'est Rb69 qui s'est révélée être l'ADN polymérase répliquative de la famille B la plus proche. Aussi avons-nous décidé d'interpréter l'étude par mutagenèse dirigée et par tronctions de γ Pol2 sur la base de la structure tridimensionnelle de son

homologue Rb69 (**Figure 12**, Introduction). Les structures de Rb69 et de la Pfu étant parfaitement superposables (**Figure 22**), le choix de se référer désormais à Rb69 ne remet en cause ni la grande homologie de séquence entre la Pfu et γ Pol2, ni l'analyse qui en a découlé et qui nous a permis d'obtenir un fragment plus stable de γ Pol2, γ Pol2C (voir Résultats).

Le fragment γ Pol2C correspond, par homologie de séquence, à une partie de la région N-terminale de Rb69 au niveau de laquelle nous distinguons deux grands sous-domaines structuraux N-terminaux (**Figure 23**): (i) le 1^{er}, appelé NTD1, est constitué de deux zones NTD1' (résidus 1 à 278) et NTD1'' (résidus 487 à 502), non contigus dans la structure primaire et qui forment un domaine globulaire excluant (ii) EXO, le 2^{ème} sous-domaine N-

A



B

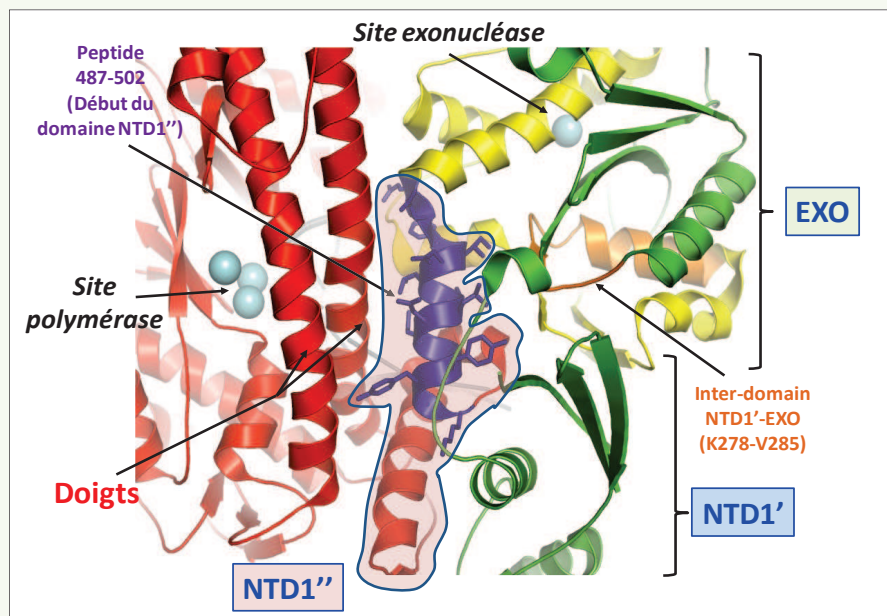


Figure 23 Analyse structurale des tronctions dans le domaine N-terminal de yPol2

A Vue d'ensemble sur la base du modèle structural de Rb69/ADN. La chaîne principale dans de Rb69 est représentée par un ruban avec des hélices pour les hélices alpha et des flèches pour les brins bêta. Le choix des couleurs des éléments de structure secondaire est celui proposé Fig.21B. Les bulles indiquent un certain nombre de site de tronction testés en yDH (Fig.21). yPol2A, utilisé dans la première partie des résultats, est constitué du sous-domaine NTD1' (en vert) et d'une partie du sous-domaine EXO (essentiellement les parties verte et orange). yPol2C est constitué des sous-domaines NTD1', EXO et NTD1''. Les éléments de structures secondaires en jaune et appartenant au sous-domaine EXO ne sont pas essentiels à l'interaction de yPol2 avec yOgg1. Les sphères en bleu clair localisées dans les sites catalytiques de l'enzyme sont attribuées à des atomes de magnésium, métal indispensable aux activités polymérase et exonucléase des ADN polymérases de la famille B. Les sous-domaines « doigts », « paume » et « pouce » sont en rouge. L'hémi-duplexe d'ADN est indiqué en noir **B** « Zoom » au niveau de l'extension C-terminal de yPol2C nommée NTD1''. L'extension NTD1'' (surligné sur fond rose) située en C-terminal de yPol2C (fragment stable de yPol2 utilisé dans les expériences de « pull-down ») est constituée pour l'essentiel de 3 hélices alpha prises en sandwich à l'interface des sous-domaines « doigts » et NTD1' dans la continuité de l'extrémité en C-terminal du sous-domaine EXO. L'hélice colorée en violet immédiatement dans la continuité du domaine EXO présente un caractère très hydrophobe. Ainsi, les sous-domaines NTD1' et NTD1'' constituent le domaine globulaire nommé NTD1 (voir Panneau A).

terminal, qui correspond au domaine exonucléase de Rb69 contenant les motifs Exo I, II et III (**Figure 21B**). C'est sur la base des homologies structurales avec Rb69 que nous avons procédé à des troncations en C- puis en N-terminal de yPol2C.

yPol2C (1-537) n'interagissant pas *in vivo* avec yOgg1 en yDH, nous nous sommes en effet posé la question de l'effet de l'allongement et/ou du raccourcissement du fragment yPol2C en C- et/ou N-terminal. Le but était d'étayer l'hypothèse selon laquelle la taille du fragment yPol2 testé en yDH serait critique à l'interaction, celle-ci pouvant constituer une limite à la technique du « double-hybride » du fait de l'encombrement stérique possiblement généré. Néanmoins, cette étude nous a également permis de questionner l'implication de la présence des différents sous-domaines NTD1', NTD1'' et EXO dans l'interaction.

Le domaine N-terminal NTD1'', situé en C-term de yPol2C, est responsable du « double-hybride » négatif

L'extension de yPol2C (à partir du fragment yPol2A) a consisté notamment dans l'ajout en C-terminal du sous-domaine NTD1'' dans son entier (**Figure 21**). Nous avons donc cherché à savoir si la présence de NTD1'' pouvait expliquer l'absence d'interaction de yPol2C en yDH. Pour cela, nous avons tronqué yPol2C en introduisant un codon stop en position 487 (voir Matériel et Méthodes), résidu qui constitue la limite physique entre les sous-domaines EXO et NTD1''. Cette troncation, qui élimine donc complètement NTD1'', rétablit l'interaction en yDH (**Figure 21A**). La troncation en C-term du fragment yPol2C en position 502, qui maintient quant à elle une partie du sous-domaine NTD1'', est, à l'image du fragment yPol2C 1-537, négative en yDH (**Figure 21A**). Il semblerait donc que le résidu 487 constitue la limite C-term supérieure d'interaction en yDH (au-delà de laquelle il n'est plus possible de révéler une interaction *in vivo* par yDH), limite qui exclut le domaine NTD1''. Cela rend-il néanmoins les sous-domaines NTD1' et exonucléase EXO essentiels à l'interaction en yDH ? En effet, qu'en-est-il de la limite inférieure ? Jusqu'où pouvons-nous tronquer le fragment yPol2C en C-terminal tout en maintenant l'interaction en yDH ?

Le domaine N-terminal exonucléase EXO est nécessaire à l'interaction, au moins jusqu'au résidu 394 (motifs Exo I et II)

Les résultats obtenus par Lionel GELLON lors du crible yDH de yOgg1 à partir d'une banque d'ADN génomique de levure apporte déjà une partie de la réponse. En effet, les

clones révélés positifs correspondent aux fragments yPol2 suivants (indiqués d'une étoile en **figure 21**) : 33-466, 33-460, 34-431, 63-405 (yPol2A), 63-417, 63-412 et 80-394. Déjà, ces 1^{ers} résultats indiquaient que la troncation en C-terminal du sous-domaine exonucléase EXO, jusqu'au résidu 394 tout du moins, n'affectait pas l'interaction en yDH. Nous avons pu vérifier cela en tronquant yPol2C en position 405 : le fragment 1-405 résultant interagit toujours avec yOgg1 en yDH. Aussi, nous avons voulu aller au-delà du résidu 394 afin de tester l'implication de EXO dans l'interaction. En tronquant le fragment 34-431 (clone révélé positif dans le crible yDH de yOgg1) aux résidus 370 puis 352, nous avons pu observer une perte totale de l'interaction en yDH. Le résidu 394 constituerait *a priori* la limite inférieure en C-terminal dans l'interaction en yDH (**Figure 21**).

En regardant de plus près la position de ces résidus dans EXO, sous-domaine au niveau duquel se trouve l'activité 3'-5' exonucléase de yPol2, nous constatons que les motifs Exo I, II et III ne sont pas égaux quant à leur implication dans l'interaction *in vivo* avec yOgg1. En effet, la suppression du motif Exo III (fragments 1-405 et 34-431) n'affecte pas l'interaction *in vivo*. Au contraire, au-delà (fragments 34-370 et 34-352), l'élimination du motif Exo II annule complètement l'interaction en yDH. L'absence d'interaction pour tous les fragments tronqués en C-terminal au-delà du résidu 394 et donc ne comprenant pas les motifs Exo I et II, semble indiquer que le sous-domaine exonucléase EXO de yPol2 est important pour son interaction avec yOgg1. Seul le motif Exo III ne semble pas indispensable. La nécessité d'une partie du domaine exonucléase de yPol2 (contenant au moins les motifs Exo I et Exo II) pourrait indiquer une éventuelle corrélation entre l'activité 3'→5' exonucléase de yPol2 et une interaction possible entre yPol2 et yOgg1.

Pour évaluer la possibilité d'une telle corrélation, nous avons muté yPol2 au niveau de ses différents motifs Exo I, II ou III. Nous avons d'abord choisis de muter yPol2A au site Exo I, en introduisant la double mutation D290A/E292A (yPol2-4A). Ce double mutant de Pol2 appelé Pol2-4 a été caractérisé chez *S. cerevisiae* et est associé à un phénotype mutateur directement relié à la perte de son activité 3'→5' exonucléase (qui résulte en une diminution de la fidélité de la réplication) (MORRISON *et al.* 1991). Ce mutant exonucléase yPol2-4A, testé en yDH, est très fortement affecté dans son interaction avec yOgg1, d'autant plus s'il est exprimé dans le vecteur d'expression élevé pASΔ (**Figures 21A** et **24A**). Ce résultat va donc dans le sens d'une possible connexion entre l'activité exonucléase de Pol2 et son interaction avec yOgg1 *in vivo*. Nous avons testé le mutant exonucléase yPol2-4A en « pull-down »

(Figure 24B), dans les mêmes conditions que le fragment de type sauvage yPol2A, et nous avons pu observer qu'il peut encore interagir avec yOgg1. Cependant yPol2-4A n'interagit pas avec yOgg1 en yDH (Figure 24A). Comme pour yPol2C, nous observons une rupture de colinéarité entre « double-hybride » et « pull-down ». Dans le cas de yPol2-4A, qui est dépourvu du domaine NTD1'' et dont la forme sauvage interagit bien avec yOgg1 en yDH et en « pull-down », il ne nous est pas possible d'avancer l'hypothèse de conditions non favorables à une détection de l'interaction en yDH.

L'hypothèse que nous pourrions faire à ce stade serait d'imaginer que, *in vivo*, l'interaction entre nos deux protéines impliquerait un 3^{ème} partenaire, en l'occurrence l'ADN, et que pour que yPol2 et yOgg1 puissent « être à proximité physique » et par la suite interagir, il faudrait que yPol2 ait une activité 3'-5' exonucléase intacte. Cela reste néanmoins à nuancer. En effet, nous avons, de façon similaire, muté le fragment yPol2 1-488 au niveau des sites Exo II (D384A) et Exo III (D477A). Dans les deux cas, et contrairement à ce qui se passe pour le mutant yPol2-4, yPol2 muté n'est pas affecté en yDH dans son

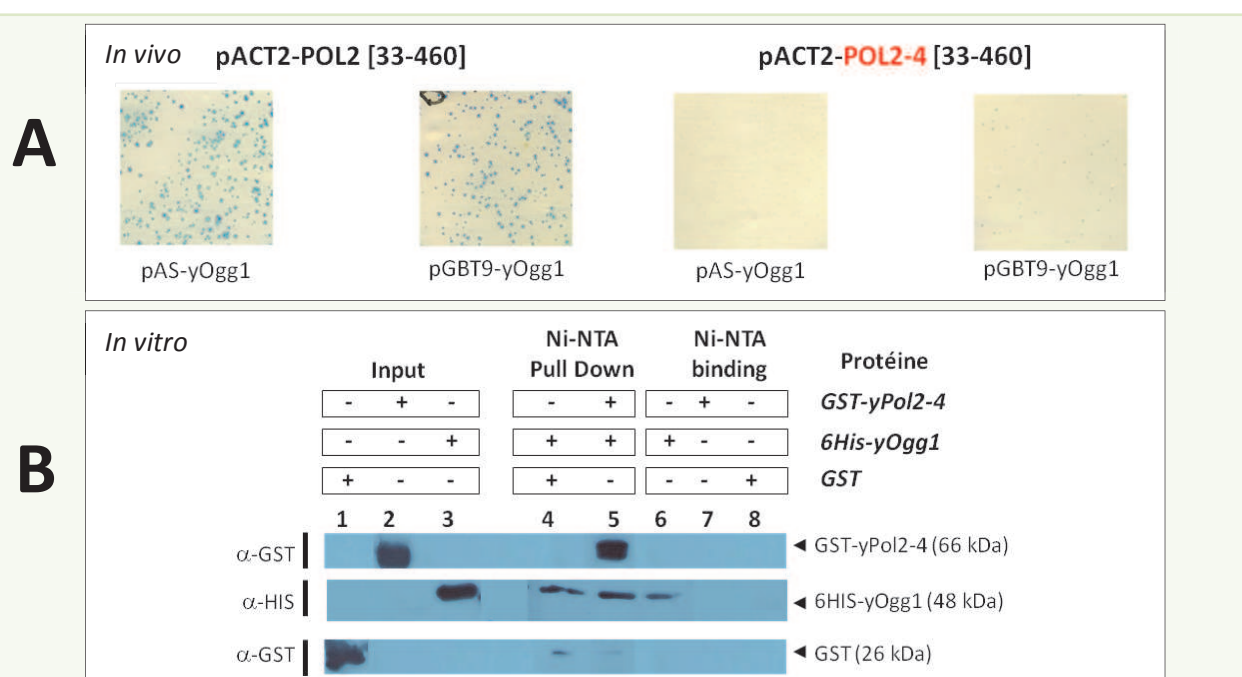


Figure 24 Cas particulier du mutant exonucléase yPol2-4

Le mutant exonucléase yPol2-4 (MORRISON *et al.* 1991) a été obtenu à partir du fragment 33-460 de la protéine Pol2 sauvage. **A** Test par « double-hybride » de l'interaction du mutant yPol2-4 avec yOgg1. yOgg1 est sous-cloné dans le vecteur pAS (expression élevée) ou pGBT9 (expression faible) et Pol2 et Pol2-4 sont sous-clonés dans le vecteur pACT2 (voir Mat&Mét). En comparaison au fragment sauvage, positif en yDH (colonies bleues), Pol2-4 n'interagit pas avec yOgg1 en yDH (clones blancs). Cela est vérifié pour les deux vecteurs d'expression faible (pGBT9) et élevé (pAS). **B** Expérience de « pull-down » entre 6-His-yOgg1 et GST-yPol2-4. Les différents contrôles de « pull down » sont présentés des pistes 1 à 8. Les protéines 6His-yOgg1, GST et GST-yPol2-4 utilisées sont analysées par WB avec des α-HIS et des α-GST (pistes 1 à 3). La possibilité de fixer les protéines aux billes Ni-NTA a été évaluée pour chaque protéine isolée (pistes 6, 7 et 8) (WB avec des α-HIS ou α-GST). L'expérience de « pull-down » consiste à évaluer la possibilité de capturer les protéines GST et GST-yPol2-4 par des billes Ni-NTA fonctionnalisées avec 6-His-yOgg1 (piste 4 et 5). Le mutant yPol2-4 interagit bien physiquement avec yOgg1 dans le test *in vitro* du « pull-down ».

interaction avec yOgg1 (**Figure 21A** et **Annexe 6**). De plus, à aucun moment, l'activité 3'→5' exonucléase de tous les fragments de yPol2 testés en « double-hybride » n'a été évaluée. Ainsi, il n'est pas exclu que le fragment yPol2 utilisé pour la mutagenèse des sites Exo soit affecté d'un point de vue de son activité exonucléase et qu'il n'y ait donc pas nécessairement de lien entre activité exonucléase et la possibilité pour les deux partenaires d'interagir (ce fragment yPol2 interagissant bien *in vivo* et *in vitro* avec yOgg1).

Le sous-domaine N-terminal NTD1' n'est pas indispensable à l'interaction dans son intégralité : seuls les résidus 80 à 278 sont nécessaires

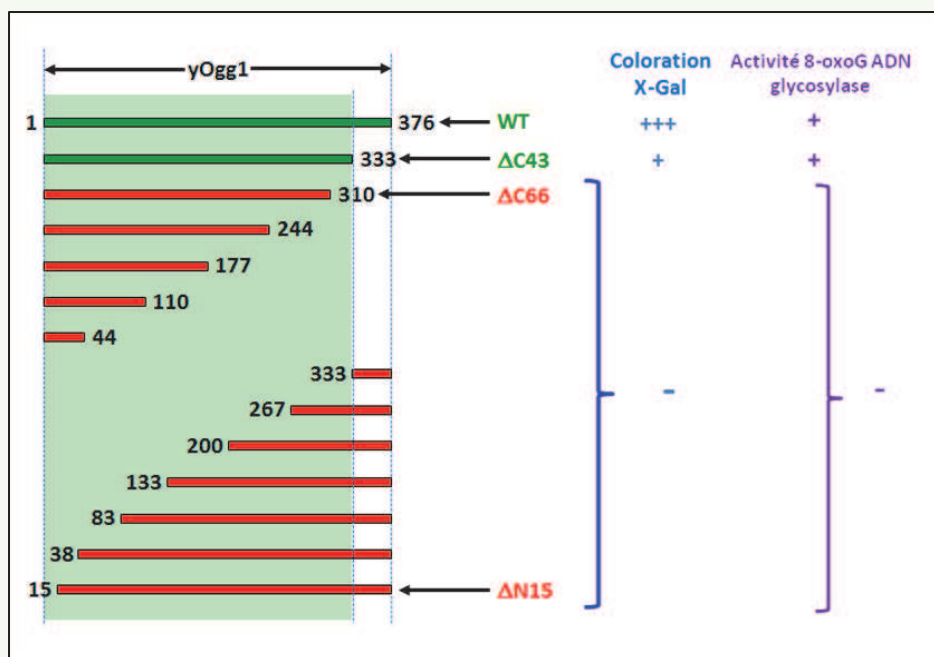
Dans la continuité de notre étude, nous avons effectué des troncations en N-terminal de yPol2C, cherchant cette-fois à évaluer l'importance du sous-domaine N-terminal NTD1 dans l'interaction en yDH. Il nous a fallu pour cela refaire de nouvelles constructions (à partir du fragment yPol2C et par amplification PCR du fragment d'intérêt, voir Matériel et Méthodes).

Les résultats du crible réalisé par Lionel GELLON nous donnent encore une fois une première information (GELLON 2002). Ainsi, les fragments de yPol2 tronqués en N-term en positions 33, 34, 63 et 80 et n'incluant pas en C-term la région 487-537 (incluse dans yPol2C et correspondant au sous-domaine NTD1'' non compatible avec le test yDH) interagissent toujours avec yOgg1 en yDH. Nous pouvons en conclure que la région de NTD1' correspondant aux résidus 1 à 80 ne contribue pas à l'interaction yPol2/yOgg1 et n'est pas nécessaire (**Figures 21** et **23**). Par contre, l'interaction est perdue suite à une troncation au niveau de la Val100 (fragment 100-487, **Figure 21**). Cette troncation entraînant l'élimination d'une partie du sous-domaine NTD1', cela suggère qu'au-delà du résidu 80, NTD1' est indispensable à l'interaction entre les deux protéines. Nous pouvons remarquer que la troncation en position 100 de yPol2C ne change rien à l'interaction yPol2/yOgg1, qui reste inopérante en yDH. Cela confirme bien que c'est l'extension en C-terminal de yPol2C (résidus 487-537, sous-domaine que nous avons nommé NTD1'') qui interfère négativement avec la possibilité de révéler un complexe stable yPol2/yOgg1 par yDH. Il semblerait donc que le résidu 80 soit la limite d'interaction en N-terminal, faisant de la région NTD1' [80-278] l'un des domaines de yPol2 essentiel pour l'interaction yPol2/yOgg1 (**Figure 21**).

En recoupant toutes ces informations, l'étude par mutagenèse dirigée et par troncations de yPol2 indique que le fragment 80-394 pourrait constituer le fragment minimal

d'interaction (suffisant pour interagir avec yOgg1 *in vivo* dans le test de yDH), faisant des sous-domaines NTD1' et exonucléase EXO (motifs Exo I et Exo II) des éléments de yPol2 essentiels à son interaction avec yOgg1 en yDH. Il a également été montré que le sous-domaine NTD1'', qui d'un point de vue structural vient recouvrir le domaine NTD1' chez l'homologue Rb69 de yPol2 (**Figure 23**), empêcherait de façon indirecte l'interaction en yDH (le résidu 487, à la limite des domaines EXO et NTD1'', constituant la limite supérieure d'interaction en C-term). Au-delà de l'hypothèse d'une contrainte stérique que pourrait générer yPol2C (du fait de la présence de NTD1'') et qui affecterait la détection de l'interaction yPol2/yOgg1 en yDH, cette étude par troncations de yPol2C laisse entrevoir d'autres explications possibles. Nous pouvons imaginer, entre autres, que dans le contexte particulier du « double-hybride » *in vivo*, la présence de NTD1'' dans le fragment yPol2C, dépourvu d'une grande partie de sa région N-terminale (y compris son domaine polymérase) et de toute sa partie C-terminale, induit une conformation structurale particulière de yPol2C qui (i) n'empêcherait pas l'interaction physique à proprement dite de yPol2C avec yOgg1 (celle-ci ayant été démontrée par « pull-down ») mais (ii) affecterait son activité exonucléase et d'une façon ou d'une autre, empêcherait l'interaction fonctionnelle des deux partenaires *in vivo*.

A



B

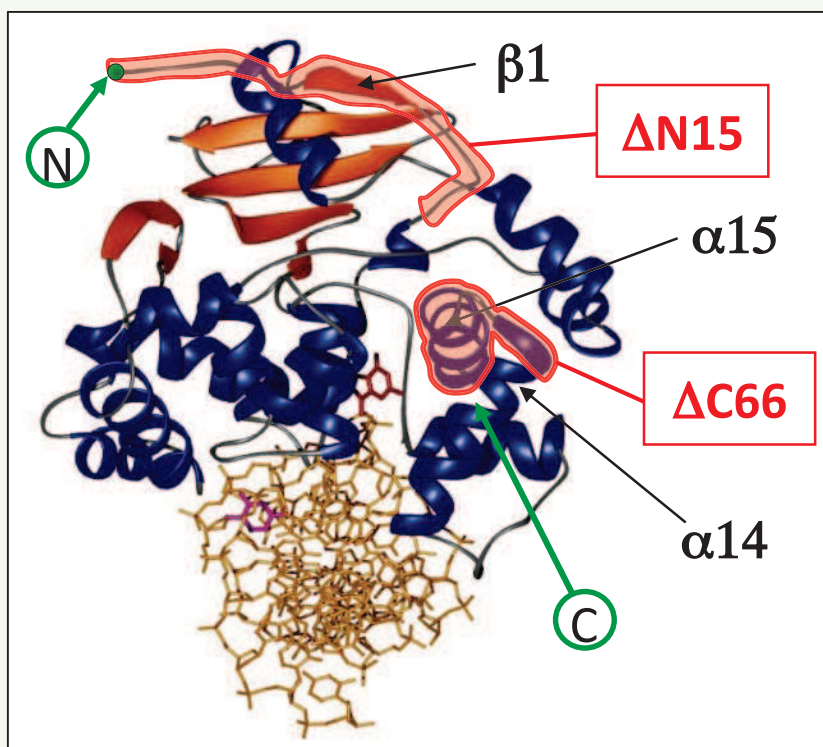


Figure 25 Analyse par « double-hybride » de différentes formes tronquées de *yOgg1*

A Double-hybride avec les troncations de *yOgg1*. Les troncations ont été réalisées dans le vecteur « appât » de *yDH* pAS (domaine de fixation à l'ADN, DB). Chaque troncation est ensuite testée par *yDH* en utilisant le clone de *yPol2* 1-488 dans le vecteur « proie » pACT (domaine activateur, DA) (voir Mat & Met). **B** Visualisation des troncations $\Delta N15$ et $\Delta C66$ sur la structure 3D du complexe *hOgg1*/ADN (BRUNER *et al.* 2000a). La chaîne principale de la protéine (mutant catalytique K249Q) est représentée par un ruban (les hélices alpha en bleu et les brins beta en orange) et l'ADN contenant une 8-oxoG extrahélicale (violet) apparaît en marron. La cytosine initialement opposée à la 8-oxoG est aussi colorée en violet. Les troncations $\Delta N15$ et $\Delta C66$ sont surlignées en rouge. « N » et « C » indiquent les extrémités N-terminale (résidu 12) et C-terminale (résidu 327) de *hOgg1*.

II.B.2. Cartographie de yOgg1

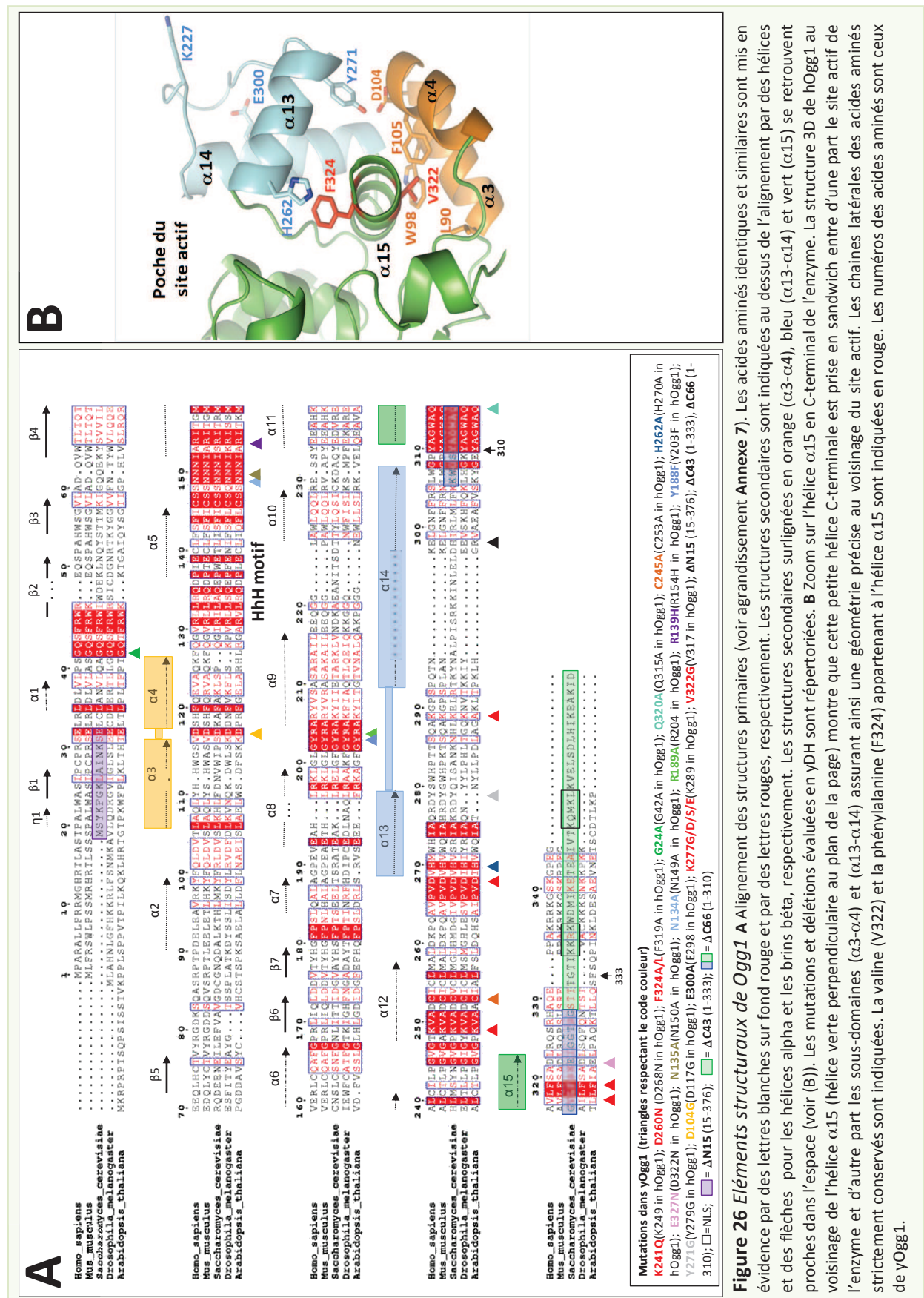
II.B.2.a. Premiers enseignements apportés par les troncations de yOgg1

Pour la protéine yOgg1, nous avons procédé au même type d'analyse que celle que nous avons suivie pour yPol2. Des troncations en N- et en C-terminal de yOgg1 évaluées par yDH ont été conduites en 2002 par Lionel GELLON (**Figure 25A**). Ces expériences indiquent que toute troncation qui abolit l'activité enzymatique de yOgg1 abolit également son interaction avec yPol2 en yDH (Boiteux *et al.*, données non publiées). En effet, seul le mutant catalytiquement actif $\Delta C43$ (délétion des 43 derniers résidus en C-terminal) interagit avec yPol2 en yDH. Ces expériences montrent aussi que les deux extrémités N- et C-terminales de yOgg1 sont nécessaires à l'interaction avec yPol2. En effet, la délétion des 15 premiers acides aminés en N-terminal de yOgg1 ($\Delta N15$) ou des 66 derniers résidus en C-terminal ($\Delta C66$) abolit complètement l'interaction en yDH. Malgré la connaissance de la structure 3D de hOgg1, il reste difficile d'interpréter $\Delta N15$ qui correspond à la perte d'une boucle et du brin $\beta 1$ (**Figure 25B**). Nous savons néanmoins, d'après la structure de hOgg1, que $\beta 1$ s'associe aux brins $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$ pour former un sous-domaine N-terminal de type feuillet à brins bêta antiparallèles (**Figure 25B**). Deux hypothèses peuvent être formulées : (i) les 15 premiers résidus de yOgg1 incluent tout ou partie du site d'interaction avec yPol2 ou (ii) la délétion de ces résidus déstabilise suffisamment yOgg1 pour modifier la géométrie globale de la protéine, pouvant entraîner la perte de l'activité catalytique ou même la dégradation de la protéine. Parmi les troncations testées par Lionel GELLON, seule la troncation $\Delta C43$ (délétion des 43 derniers résidus en C-terminal) est active catalytiquement et interagit encore avec yPol2. Cette délétion est en accord avec celle opérée par les cristallographes pour résoudre la structure de hOgg1 complexée à l'ADN (le mutant $\Delta C19$ ainsi généré est actif; (BRUNER *et al.* 2000b)). Par ailleurs, la structure cristallographique résolue avec hOgg1 entière en absence d'ADN indique clairement que cette région est non-structurée (tout du moins dynamique car non-visible dans la carte de densité électronique du modèle ; (BJORAS *et al.* 2002)). En fait, cette région C-terminale contient les séquences NLS d'adressage au noyau (**Figure 26A**). Toute troncation en C-terminal plus étendue que $\Delta C43$ abolit la capacité des protéines tronquées à interagir avec yPol2 et résulte dans une perte totale de l'activité catalytique (**Figure 25A**). Nous observons donc une relation stricte entre activité catalytique

et interaction avec yPol2 en yDH : toute délétion qui affecte l'activité catalytique de yOgg1 est négative en yDH. Cela n'est pas complètement étonnant car d'après le modèle 3D de hOgg1, ces troncations portent immédiatement atteinte à l'intégrité structurale de l'enzyme (et donc à son activité catalytique) dans un domaine compact formé des hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 13$, $\alpha 14$ et $\alpha 15$ (**Figure 26**). Il est intéressant de noter que la troncation $\Delta C66$ (perte totale de $\alpha 15$ et partielle de $\alpha 14$; **Figure 25B**) aboutit à la délétion d'éléments de structures secondaires participant à l'architecture de la poche du site actif de l'enzyme (**Figure 26B**). Une fois encore, une destruction locale de l'architecture de l'enzyme pourrait suggérer que ce domaine partiellement déstructuré de yOgg1 soit tout ou partie du domaine d'interaction avec yPol2.

Pour essayer de décrypter l'effet de la troncation $\Delta C66$, nous avons décidé d'introduire des mutations ponctuelles afin de porter atteinte de façon « plus douce » à la structure tertiaire du domaine C-terminal. Sur la base d'un alignement de séquence des structures primaires des Ogg1s (**Figure 26A**, voir agrandissement en **Annexe 7**), nous avons décidé de cibler par mutagenèse dirigée des acides aminés conservés appartenant à ce sous-domaine d'yOgg1 dans lequel l'hélice $\alpha 15$ en C-terminal est prise en sandwich par les hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ d'une part et $\alpha 13$ - $\alpha 14$ d'autre part (**Figure 26B**) : (i) V322G, cette valine contribue, par la formation d'un « cluster » hydrophobe *via* des interactions avec les résidus L90, W98 et F105, au bon empilement de l'hélice $\alpha 15$ sur la partie hydrophobe du motif hélice-tour-hélice $\alpha 3$ - $\alpha 4$, (ii) F324A(L), cette phénylalanine pointe côté opposé à V322 dans la poche du site actif de l'enzyme et n'intervient pas dans la structure locale du domaine C-terminal mais dans la catalyse (DALHUS *et al.* 2009), (iii) des résidus plutôt chargés exposés à la surface de ce domaine tels que D104G, K277X (avec X= G, Q, S ou E) et E300A et, (iv) un résidu hydrophobe, Y271G, plutôt enfoui dans la structure et assurant le bon empilement de l'hélice $\alpha 13$ au reste du domaine comme le fait V322 entre $\alpha 15$ et $\alpha 3$ - $\alpha 4$. Les résultats de yDH pour chaque mutant sont inclus dans le **tableau 8**. Cette première exploration par mutagenèse dirigée de yOgg1 indique clairement que toute mutation (à savoir V322G et Y271G) susceptible d'altérer l'intégrité de l'empilement de l'hélice $\alpha 15$ avec les autres hélices affecte significativement la capacité de yOgg1 à interagir avec yPol2. Ceci suggère donc que la topologie précise de ce domaine constitué d'hélices est essentielle à l'interaction yOgg1/yPol2. Par contre, la surface exposée au solvant du sous-domaine $\alpha 13$

$\alpha 14$ ne semble pas constituer une zone essentielle d'interaction entre yOgg1 et yPol2 car les mutations K227X et E300A n'ont aucun impact sur l'interaction.



Seule la mutation D104G semble légèrement affecter l'interaction car nous observons pour elle un effet dose selon le plasmide d'expression utilisé (pGBT9(-) ou pASΔ(+/-)). Il n'est donc pas exclu que D104 contribue à l'interaction mais faiblement. Le résultat le plus surprenant de cette première analyse est l'observation que la mutation F324A(L) impacte fortement l'interaction. *A priori*, nous ne nous attendions pas à observer un tel effet pour cette mutation car F324 est un résidu de la poche du site actif plutôt peu accessible et ne contribuant pas à l'architecture du domaine en hélice. D'après la structure de hOgg1/ADN, F324 serait un résidu participant à la reconnaissance de la 8-oxoG extra-hélicale dans la poche du site actif dont la chaîne latérale contacterait, par des interactions de type π - π électrons, le cycle purique de la lésion (**Figure 27A**). Il est intéressant de noter que le mutant F324A chez hOgg1 est très affecté dans la reconnaissance et dans l'excision de la 8-oxoG (activité 8-oxoG-ADN glycosylase déficiente et AP lyase de type sauvage ; (VAN DER KEMP *et al.* 2004)).

En conclusion de cette première exploration, nous pouvons dire qu'il est plutôt difficile, à la différence de γ Pol2, de définir concrètement un domaine minimal d'interaction, même si les résultats des troncations laissent supposer que deux régions de la protéine semblent importantes pour l'interaction : les 15 premiers résidus en N-terminal ainsi que les résidus 310 à 333 en C-terminal. Une des raisons à cela réside sans doute dans le fait qu'Ogg1 est une protéine compacte qui ne supporte pas d'être tronquée (une troncation pouvant s'accompagner d'une dénaturation partielle de l'enzyme). A ce stade, il est donc difficile d'isoler sur γ Ogg1 une zone discrète d'interaction avec γ Pol2, ce qui suggère aussi que le domaine d'interaction avec γ Pol2 n'est probablement pas continu dans la structure primaire de l'enzyme mais plutôt composite et présentant une architecture précise. Sur la base des premières mutations ponctuelles et des troncations, il semble cependant que la géométrie fine du domaine constitué des hélices α 3, α 4, α 13, α 14 et α 15 et qui participe à l'architecture de la poche du site actif (en particulier par α 15) soit indispensable à une interaction avec γ Pol2. Cette observation établit donc une connexion entre site actif et interaction avec γ Pol2. Cette corrélation est clairement renforcée par l'observation que le mutant F324A n'est plus capable d'interagir avec γ Pol2, connectant de façon plus précise la reconnaissance de la 8-oxoG par l'enzyme avec la possibilité d'interagir avec γ Pol2, tout du moins lorsque l'interaction est révélée par le test de γ DH.

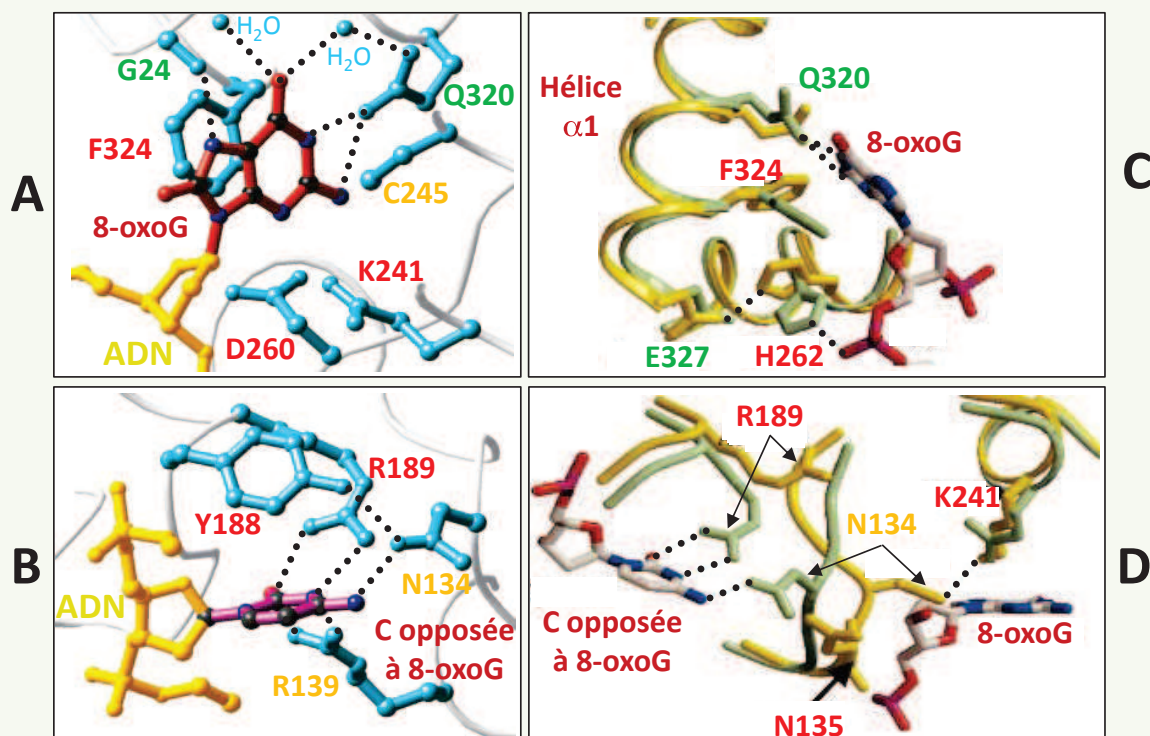


Figure 27 Acides aminés de la poche du site actif de *yOgg1* impliqués dans la reconnaissance de la 8-oxoG et de la cytosine qui lui est opposée et dans l'excision de la 8-oxoG

A et **B** Zooms au niveau du site actif de l'enzyme dans le complexe hOgg1/ADN. Les chaînes latérales des acides aminées sont indiquées en bleu, l'ADN en jaune, la 8-oxoG extra-hélicale en rouge-terre et la cytosine opposée à la 8-oxoG en violet. **C** et **D** Superposition des structures de hOgg1 libre (jaune) et hOgg1/ADN (vert). Le passage de la forme libre à la forme complexée avec l'ADN met en évidence les changements d'orientation de la chaîne latérale de certains résidus ce qui est associé à un remodelage du réseau d'interaction au niveau du site actif.

La nature et le numéro (ceux d'*yOgg1*) des résidus sont indiqués: en rouge, les résidus dont les mutations impactent fortement le « double-hybride », en orange, celles qui ont un effet modéré et en vert, celles qui n'ont aucun impacte. Voir le texte pour le rôle précis de chaque acide aminé quand celui-ci est connu.

Mutants yOgg1	Fonctions possibles	Double-hybride		Activité catalytique
		pASΔ	pGBT9	8-oxoG/C
Wt		+	+	+(a)
G24A	Reconnaissance du dommage (via N7)	+	+	+(a)
D104G	Intégrité structurale, interaction avec Y271	+/-	-	ND
N134A	Reconnaissance du C opposé au dommage	+/-	ND	+(a)
N135A	Reconnaissance de l'ADN aux alentours du dommage	-	-	+/- (a)
N136A		+	ND	+(a)
R139H	Reconnaissance du C opposé au dommage	+/-	ND	+/- (b)
Y188F	Reconnaissance du C opposé au dommage	ND	-	ND
R189A	Reconnaissance du C opposé au dommage	-	-	-(a)
K241Q	Lysine catalytique	-	-	-(c)
K241R		+/-	ND	+/- (c)
C245A	Interaction avec K241	+	+/-	+/- (a)
D260A	Acide aspartique catalytique	-	-	-(a)
H262A	Interaction avec le 5'-P du dommage et interaction avec E327 dans l'enzyme libre	ND	-	-(d)
Y271G	Intégrité structurale	+/-	+/-	ND
K277S/G/E/Q	Boucle α13-α14	ND	+	ND
Q320A	Interaction avec 8-oxoG	+	+	+(d)
F324A	Interaction avec 8-oxoG	+/-	ND	-(d)
F324L		ND	-	ND
V322G	Intégrité structurale	ND	-	ND
E300A	Résidu exposé	ND	+	ND
E327N	Interaction avec H262 dans l'enzyme libre	ND	+/-	ND

Tableau 8 Récapitulatif des mutants ponctuels d'yOgg1 testés en interaction avec yPol2 en yDH.

Les résultats compilés dans ce tableau sont issus de l'**Annexe 8**. Pour chaque mutant yOgg1, leurs rôles possibles sont indiqués ainsi que leur signal d'interaction avec yPol2 en « double-hybride » (+, pour un signal positif, - pour un signal négatif et +/- pour un signal positif mais faible). Les interactions en yDH sont, lorsque cela est possible, réalisées dans les 2 vecteurs de forte (pASΔ) et de faible (pGBT9) expression. L'activité catalytique 8-oxoG/C ADN glycosylase reportée dans la littérature est également indiquée pour les mutants caractérisés (a : ce travail, b : (AUDEBERT *et al.* 2000b), c : (GUIBOUT *et al.* 2000), d : (VAN DER KEMP *et al.* 2004). La notation ND signifie « non déterminé ».

II.B.2.b. L'interaction de yOgg1 avec yPol2 est fortement corrélée à son activité catalytique ADN glycosylase

Une connexion entre la poche du site actif préservée structuralement et la possibilité pour yOgg1 d'interagir avec yPol2 semble clairement émerger de l'approche par troncation et mutagenèse ciblée autour de l'hélice $\alpha 15$. Afin de mieux établir ce lien, nous avons décidé, dans une deuxième exploration, de cibler par mutagenèse dirigée l'ensemble des résidus conservés contribuant à l'architecture de la poche du site actif et pour un certain nombre, connus pour être nécessaires à la reconnaissance et/ou à l'excision de la 8-oxoG.

Le choix des résidus ciblés par la mutagenèse repose encore une fois sur la structure du complexe hOgg1/ADN (**Figure 27** et **Annexe 8**). Nous pouvons en établir la liste comme suit (**Tableau 8**) :

- (i) des résidus connus comme étant strictement catalytiques, c'est-à-dire indispensables à l'excision de la 8-oxoG ((DALHUS *et al.* 2009; DALHUS *et al.* 2011)) :
 - **K241** (249 chez l'Homme) : K241Q et K241R, lysine catalytique (impliquée dans la formation de la base de Schiff au cours de l'acte catalytique) située dans l'hélice $\alpha 12$ du motif HhH ($\alpha 11$ - $\alpha 12$, Figure 26A), domaine d'interaction avec l'ADN. Ce résidu est essentiel pour l'activité catalytique de Ogg1.
 - **D260** (268 chez l'Homme) : D260A, aspartate du motif GPD conservé dans la superfamille structurale de l'endonucléase III à laquelle appartient Ogg1. Il est indispensable à l'activité catalytique de Ogg1. Elle est en effet capable d'activer le nucléophile impliqué dans la catalyse (l'amine catalytique dans le cas d'yOgg1). La mutation D260N abolit l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase de l'enzyme (NORMAN *et al.* 2003). Ce résidu jouerait aussi un rôle structural stabilisateur en assurant le « capping » de l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 13$.
- (ii) des résidus impliqués dans la reconnaissance et/ou la catalyse du dommage ou dans l'architecture de la poche du site actif :
 - **G24** (42 chez l'Homme) : G24A, glycine impliquée dans la reconnaissance spécifique du proton en N7 de la lésion 8-oxoG *via* sa chaîne principale (BRUNER *et al.* 2000b). Son remplacement par une alanine n'affecte pas l'activité catalytique ADN glycosylase de Ogg1.

- **Q320** (315 chez l'Homme) : Q320A, glutamine strictement conservée impliquée d'après le modèle structural hOgg1/ADN dans la reconnaissance du N1 et du N2 de la face Watson-Crick de la 8-oxoG. Son remplacement par une alanine n'abolit pas l'activité ADN glycosylase de hOgg1 (VAN DER KEMP *et al.* 2004).
- **C245** (253 chez l'Homme) : C245A, cystéine strictement conservée dont le rôle n'est pas clairement établi. Une publication récente du groupe de M. Bjoras propose un mécanisme moléculaire original dit « Lys-Cys dipole » pour expliquer le rôle de C245 dans l'activité ADN glycosylase ((DALHUS *et al.* 2011), voir aussi Introduction). Néanmoins, la mutation C245A n'abolit pas l'activité ADN glycosylase de Ogg1.
- **H262** (270 chez l'Homme) : H262A, histidine qui interagit avec le phosphate en 5' du dommage. En contactant le phosphate, il refermerait la poche du site actif de l'enzyme en empêchant la 8-oxoG extrudée de revenir dans la double hélice d'ADN avant son excision (BJORAS *et al.* 2002; VAN DER KEMP *et al.* 2004). La mutation H262A n'abolit pas l'activité ADN glycosylase de hOgg1 (VAN DER KEMP *et al.* 2004).
- **E327** (322 chez l'Homme) : E327N, acide glutamique placé à l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 15$ et qui interagit avec H262 dans la structure de hOgg1 libre. Cette interaction est perdue dans le complexe avec l'ADN contenant une 8-oxoG (BJORAS *et al.* 2002) (Figure 27C). L'activité catalytique de ce mutant n'a pas été caractérisée.

(iii) des résidus impliqués dans la reconnaissance de l'ADN aux alentours du dommage et de la base opposée (une cytosine) (Figures 27 B et D)

- **N134, N135 et N136** (149, 150 et 151 chez l'Homme, respectivement) : N134A, N135A et N136A, asparagines constituant un motif NNN impliqué dans la reconnaissance de la cytosine opposée au dommage (N134) et l'ADN situé aux alentours (N135 et N136) (BRUNER *et al.* 2000b). Leur remplacement par une alanine affecte peu (N135A) ou pas (N134A et N136A) l'activité ADN glycosylase de Ogg1.
- **R189** (204 chez l'Homme) : R189A, arginine impliquée dans la reconnaissance de la cytosine opposée au dommage (BRUNER *et al.* 2000b). La mutation R189A abolit l'activité catalytique de Ogg1.
- **R139** (154 chez l'Homme) : R139H, arginine impliquée dans la reconnaissance de la cytosine opposée au dommage. Le mutant R139H est catalytiquement actif mais n'a plus de sélectivité pour la base opposée à la 8-oxoG contrairement à l'enzyme de

type sauvage qui présente une spécificité forte pour la paire 8-oxoG : C (AUDEBERT *et al.* 2000b; BRUNER *et al.* 2000b).

- **Y188** (203 chez l'Homme) : Y188F, tyrosine impliquée dans la reconnaissance de la cytosine opposée au dommage (BRUNER *et al.* 2000b). L'activité catalytique de ce mutant n'a pas été caractérisée.

La **figure 27** illustre par différents zooms le rôle de chacun de ces résidus situés dans la poche du site actif de hOgg1 ou dans son voisinage lorsque l'enzyme est engagée dans un complexe avec un fragment d'ADN contenant une 8-oxoG.

Tous ces mutants ont été sous-clonés dans les vecteurs d'expression élevée (pASΔ) et faible (pGBT9) et testés par yDH pour leur capacité à interagir avec yPol2 (voir Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le **tableau 8**. De façon inattendue mais en concordance avec les résultats de la première exploration, il semble que toute mutation affectant directement ou indirectement la catalyse affecte aussi la capacité de l'enzyme à interagir avec yPol2. C'est le cas de K241Q, D260N, H262A et R189A. Tout se passe comme si le test de « double-hybride » mesurait l'activité d'yOgg1. Ainsi, les mutations connues comme n'affectant pas l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase, telles que G24A, Q320A et C245A, n'altèrent pas l'interaction yOgg1/yPol2. Néanmoins, parmi tous les mutants que nous avons testés, plusieurs n'ont pas été caractérisés, tout du moins du point de vue de leur activité ADN glycosylase. Aussi, pour s'assurer que cette règle de colinéarité entre « interaction yOgg1/yPol2 » et « activité de yOgg1 » est bien toujours respectée, nous avons décidé de purifier un certain nombre de ces mutants non-caractérisés et d'évaluer leur activité 8-oxoG-ADN glycosylase *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé le vecteur pTrc99-wtΔC44-6HIS dont l'expression permet la surproduction d'une protéine active wtΔC44-yOgg1-6HIS (ou wtΔC44), déletée de ses 44 derniers résidus en C-terminal et présentant en C-terminal une étiquette 6His. Ce vecteur a servi de matrice pour générer de nouveaux vecteurs codant pour les versions mutantes de l'enzyme : (i) positives (G24A, C245A, N134A et N136A) ou (ii) négatives (R189A, N135A) en « double-hybride ». Afin d'éviter un biais lié à la troncation des 44 derniers résidus, nous avons choisi comme contrôle positif la construction codant pour la protéine dite wtΔC44 (active) et comme contrôle négatif celle codant pour le mutant yOgg1-D260N (attendue inactive) dans sa forme tronquée ΔC44. La

procédure de production et purification de chaque version mutante est décrite dans la section Matériel et Méthodes. L'activité 8-oxoG-ADN glycosylase de ces protéines a été évaluée en utilisant comme substrat un duplexe d'ADN de 24 paires de bases contenant la 8-oxoG opposée à une cytosine (8-oxoG : C). Après incubation de la protéine avec son substrat radiomarké, les mélanges réactionnels sont analysés par Urée-PAGE après les avoir incubés préalablement en présence de NaOH. Le produit de réaction est identifié dans le gel réalisé en conditions dénaturantes comme un fragment de 12 nucléotides témoignant de l'excision de la 8-oxoG. Ce même type d'expériences a été réalisé avec les versions mutantes précédemment citées, à une concentration égale d'enzyme (**Figure 28**). Ainsi, nous pouvons classer les protéines testées en 3 groupes par rapport à la protéine de type sauvage: (i) les mutants présentant une activité proche de la protéine wt ($> 1/3$ de l'activité du wt) tels que N134A, N136A et G24A, (ii) les mutants présentant une activité significativement affectée mais non-nulle tels que N135A et C245A et (iii) les mutants présentant une activité nulle, c'est le cas de D260A et R189A.

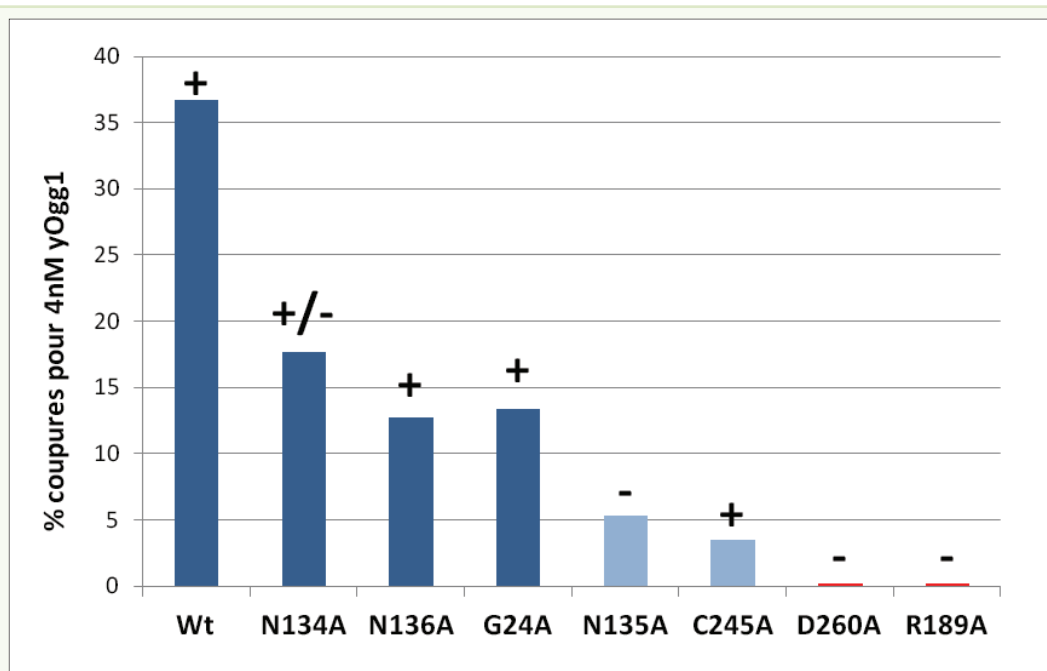
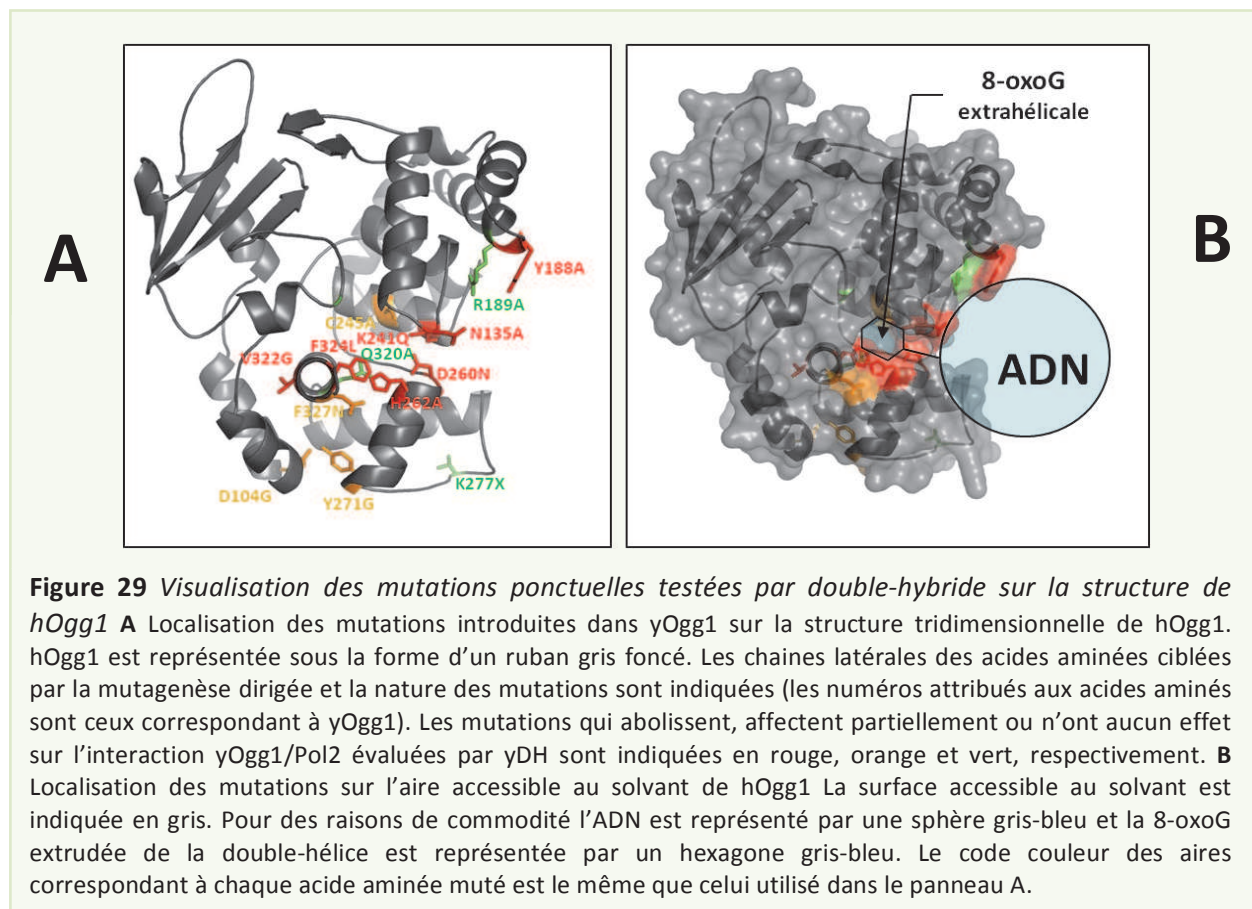


Figure 28 Analyse du lien entre activité 8-oxoG ADN glycosylase et interaction en yDH de différentes formes mutées de la protéine $\Delta C44$ -Wt-yOgg1.

Courbe représentative du pourcentage de coupure du duplexe [8oxo-G : C] en fonction de la nature du mutant $\Delta C44$ -WtyOgg1. Le pourcentage de coupure indiqué correspond à une concentration en enzyme de 4nM dans l'essai (d'après une quantification du gel par Image Quant). Un parallélisme est fait avec le résultat en interaction yDH pour chaque mutant. Le bleu foncé le bleu clair et le rouge correspondent à une activité ADN glycosylase proche de la protéine sauvage, affectée mais non-nulle ou nulle, respectivement. Les signes +, +/- ou - font référence à l'interaction en yDH. Des exemples de gel de séquence obtenu avec un mutant de chaque « groupe » (catalytiquement actif, moins actif ou non actif) sont donnés en **Annexe 9**.

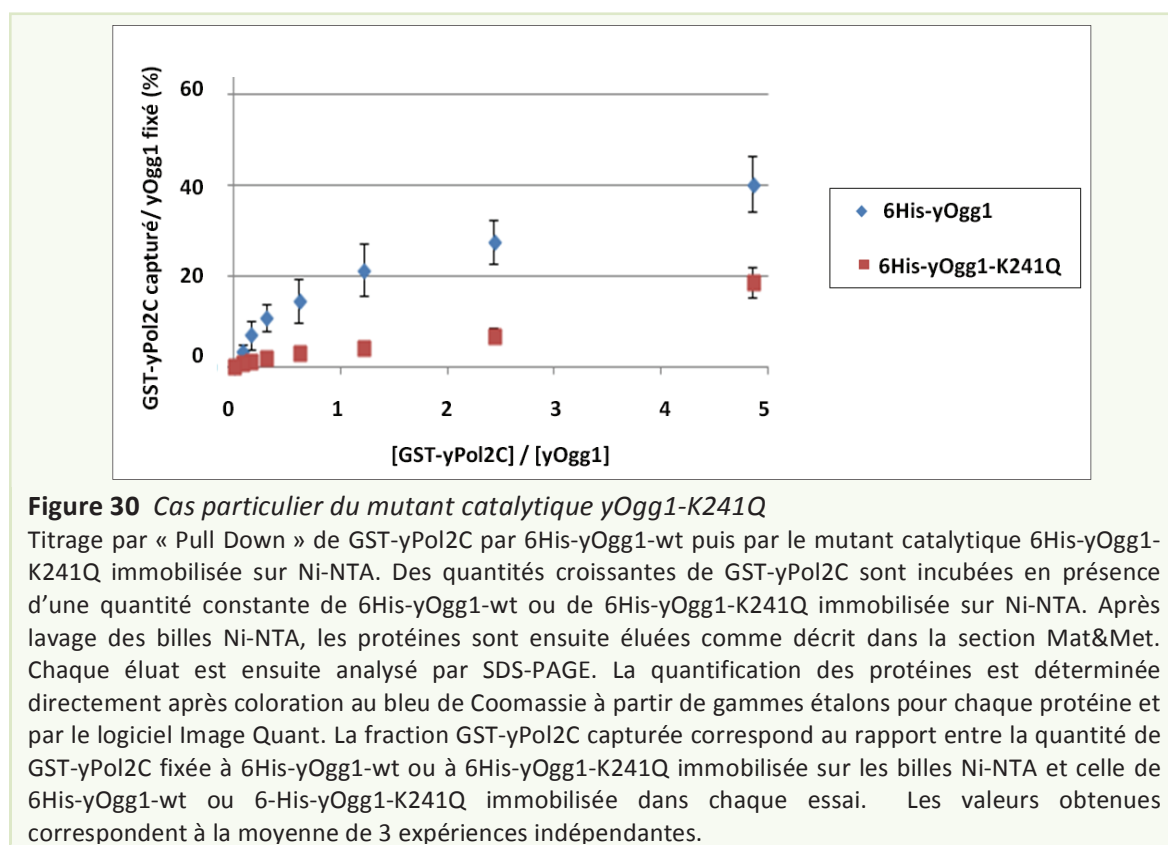
Nous observons globalement que les mutants présentant une activité ADN glycosylase associée correspondent à ceux qui sont positifs en yDH, confirmant ainsi la tendance observée à savoir une colinéarité entre l'interaction yOgg1/yPol2 et l'activité de yOgg1 (**Figure 28** et **Annexe 9**). Pour exemple, le mutant G24A, actif d'un point de vue catalytique, interagit toujours avec yPol2A en yDH, tandis que le mutant inactif D260A est négatif en double-hybride. Cependant, nous pouvons également noter que le lien entre activité et interaction en yDH n'est pas absolu. Le mutant N134A dont l'activité catalytique est proche de la protéine sauvage interagit moins bien avec yPol2 en yDH. Pour le groupe de protéines intermédiaires du point de vue de l'activité, la réponse en yDH présente deux cas de figures. Dans le cas du mutant C245A, présentant une activité catalytique de l'ordre de 15% de la protéine sauvage, cette activité est bien liée à un signal positif en yDH. A la différence de ce dernier, le mutant N135A, qui présente pourtant une activité catalytique quasi-similaire, n'interagit pas avec yPol2 en yDH. Les résidus N134 et N135, impliqués dans la reconnaissance de la cytosine opposée au dommage et de l'ADN situé aux alentours, respectivement, sont très exposés dans la structure de la protéine seule (**Figure 29A**). Aussi, sans remettre en question la règle que nous avons mise en évidence, les résidus N134 et



N135 pourraient être directement impliqués dans l'interaction physique de yOgg1 avec yPol2. Ces résidus étant masqués dans le complexe yOgg1/ADN lésé (**Figure 29B**), nous pouvons imaginer, si N135 et N134 s'avéraient être des résidus d'interaction, une possible compétition entre l'ADN et yPol2 pour la fixation à yOgg1 (voir Résultats II.C.).

Le but de l'exploration par mutagenèse dirigée était au départ d'identifier le domaine d'interaction de yOgg1 avec yPol2. Ayant observé que les mutations affectant le yDH se localisent pour la plupart au niveau de la poche du site actif de yOgg1, il n'est pas exclu que le site d'interaction de yPol2 se situe dans cette poche de yOgg1 ou tout du moins dans son voisinage comme l'illustre la **figure 29**. Cela permet d'expliquer que certaines mutations localisées dans la poche impactent l'interaction. Alternativement, nous pouvons imaginer que le clivage de l'ADN par yOgg1 favorise le recrutement de yPol2 pour former un complexe susceptible d'activer le « double-hybride ».

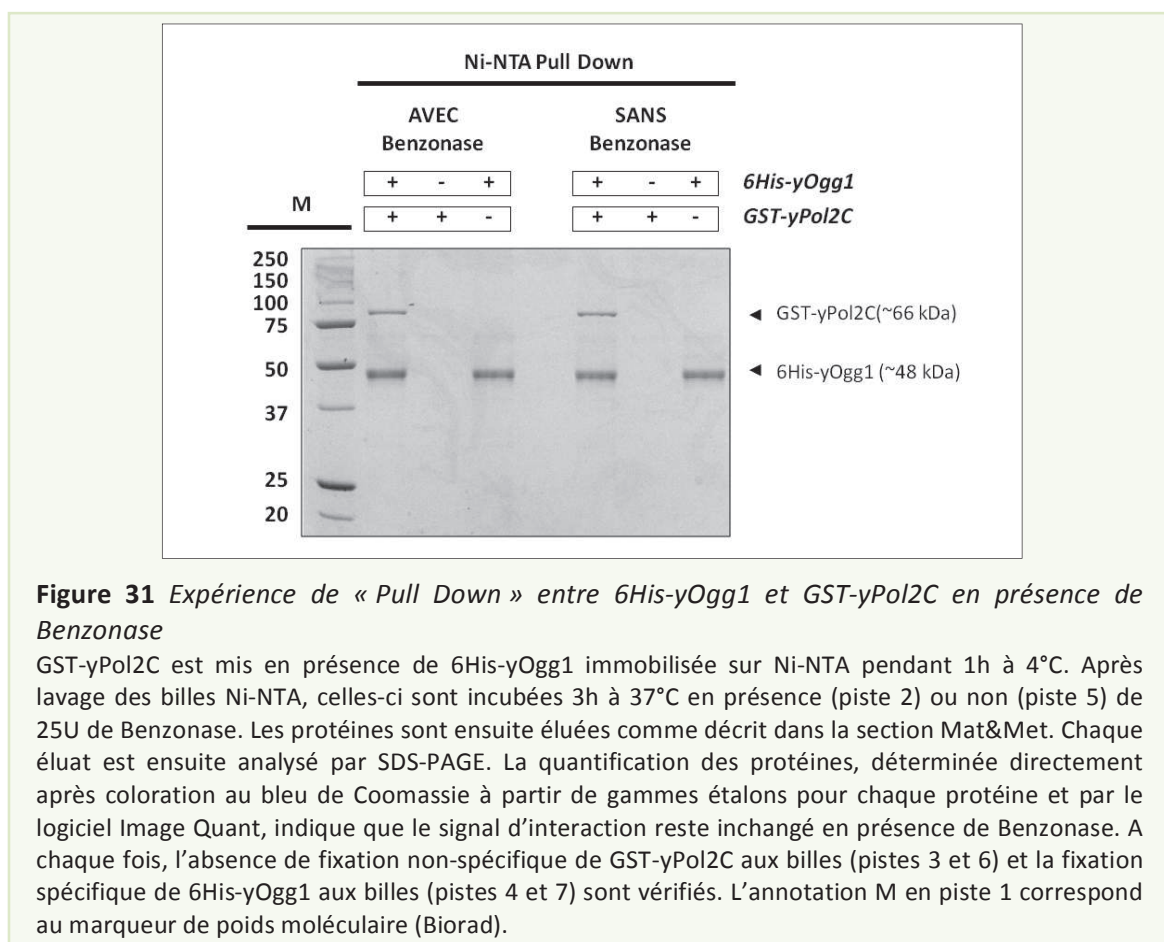
Nous avons cherché à confirmer le lien entre activité catalytique de yOgg1 et interaction avec yPol2 *in vitro*, par la méthode de « pull-down ». Nous avons sous-cloné le mutant catalytique K241Q dans le vecteur d'expression pET-30a qui permet de produire et purifier la protéine résultante 6His-K241Q-yOgg1 (ou plus simplement K241Q). L'interaction physique entre K241Q et le fragment yPol2C a été testée *in vitro* par « pull-down » en utilisant des



billes Ni-NTA fonctionnalisées soit avec wt-yOgg1 soit avec K241Q. Le mutant K241Q, inactif catalytiquement, interagit encore avec yPol2 bien que cette même interaction ne soit pas détectée en yDH. Néanmoins, l'analyse comparative des titrages de yPol2C par la protéine wt et K241Q indique clairement que la mutation affecte de façon significative l'affinité de l'enzyme pour yPol2 (**Figure 30**).

L'observation du couplage entre capacité catalytique de yOgg1 et interaction yOgg1/yPol2 dans la levure (yDH) demeure cependant étonnante et pourrait suggérer que le complexe yOgg1/yPol2 est fonctionnel seulement après l'acte catalytique de yOgg1. Cela pourrait sous-entendre que les deux protéines se retrouvent sur l'ADN au moment où yOgg1 excise par exemple une 8-oxoG. D'après les données précédentes, il semble cependant clair que cette rencontre, si elle a lieu sur l'ADN, n'est pas exclusivement dépendante de la reconnaissance de la 8-oxoG puisque le mutant K241Q reconnaît encore la 8-oxoG sans pour autant être capable de la métaboliser. En effet, c'est grâce à cette observation que les cristallographes ont pu résoudre la structure du complexe abortif stable entre K249Q-hOgg1 (équivalent à K241Q-yOgg1) et un duplexe d'ADN contenant une 8-oxoG, notre modèle structural de référence. Il découle finalement de cette analyse « double-hybride » que le complexe yOgg1/yPol2 n'a de sens qu'après l'excision de la 8-oxoG. En conséquence, il n'est donc pas impossible que *in vivo* l'ADN endommagé (ou plus exactement l'un des produits de réactions de yOgg1 à savoir un site abasique intact ou clivé en 3' par son activité AP lyase) soit un partenaire qui puisse déterminer la formation d'un complexe fonctionnel yOgg1/yPol2. Si nous excluons une contamination par un acide nucléique dans les préparations de protéines purifiées, nous devons cependant admettre que la possibilité de former ce complexe *in vitro* (expériences de « pull-down ») n'est pas exclusivement dépendante d'un acide nucléique. Bien que la présence d'acides nucléiques contaminants les échantillons d'yOgg1 purifiée ait pu être complètement écartée, une extraction par « phénol/chloroforme » des acides nucléiques s'est révélée légèrement positive dans les échantillons d'yPol2C purifiée. Ce constat n'exclue donc pas qu'un acide nucléique puisse contribuer à la formation du complexe yOgg1/yPol2 *in vitro*. Nous avons pu cependant rejeter cette hypothèse par l'utilisation dans le test de « pull down » de Benzonase, une endonucléase très efficace pour dégrader toute forme d'acides nucléiques tels que l'ADN et l'ARN. L'ajout de Benzonase a été réalisé avant interaction (prétraitement de yPol2C) ou pendant la formation du complexe, durant l'étape d'incubation à 4°C des deux partenaires

(voir Matériel et Méthodes). Dans les deux cas, l'interaction physique entre les protéines 6His-yOgg1 immobilisées sur résine Ni-NTA et GST-yPol2C reste inchangée (**Figure 31**). Finalement, l'interaction physique entre les deux partenaires ne nécessite donc pas d'être médiée par un acide nucléique même si les expériences de yDH le suggère fortement.



II.B.3. Conclusion

Les analyses par troncation et mutagenèse dirigée de yPol2 et yOgg1 couplées aux méthodes de « double-hybride » et « pull-down » nous ont permis de: (i) déterminer une forme tronquée minimale de yPol2 capable d'interagir avec yOgg1 contenant en particulier les domaines structuraux NTD1' et EXO, qui inclue le domaine 3'→5' exonucléase de yPol2 et (ii) proposer que la poche du site actif de yOgg1 et/ou son voisinage pourrait contenir le site d'interaction pour yPol2. Du fait cependant que de très courtes troncations en N- et C-terminale d'yOgg1 abolissent l'interaction avec yPol2, il reste difficile de cartographier précisément l'aire d'interaction de yPol2 sur yOgg1.

L'autre aspect intéressant qui ressort de cette analyse est l'observation d'une corrélation entre l'activité d' γ Ogg1 et sa capacité à interagir avec γ Pol2, tout du moins dans la levure. Il n'est pas impossible non plus qu'il existe de façon similaire une corrélation entre l'activité 3'→5' exonucléase de γ Pol2 et son interaction avec γ Ogg1 car l'équivalent du mutant γ Pol2-4 déficient en activité exonucléase (voir la partie traitant du mutant γ Pol2-4 dans le paragraphe 1) semble incapable d'interagir avec γ Ogg1. En définitif, il semble que le test de « double-hybride » que nous avons mis en place ne soit pas seulement un test d'interaction entre γ Ogg1 et γ Pol2 (comme l'est le test de « pull-down ») car il est conditionné au moins au fait qu' γ Ogg1 soit active. Ces dernières observations nous conduisent à tester quelques-unes de ces hypothèses fonctionnelles *in vitro* en analysant par exemple l'impact de l'interaction γ Ogg1/Pol2 sur l'activité de γ Ogg1. Cette exploration, ayant pour objectif de donner un premier sens à cette interaction, fait l'objet du chapitre suivant.

Partie II.C.
Approches fonctionnelles *in vitro* de l'interaction
yOgg1/yPol2

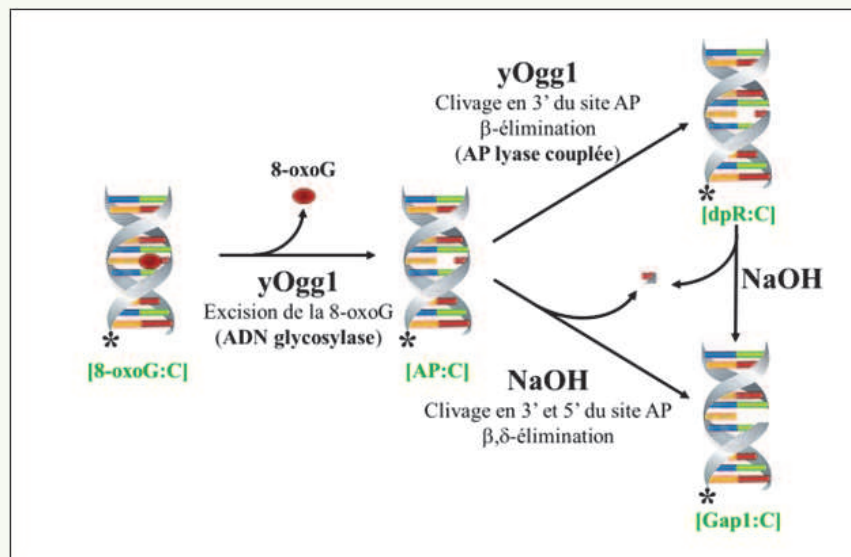
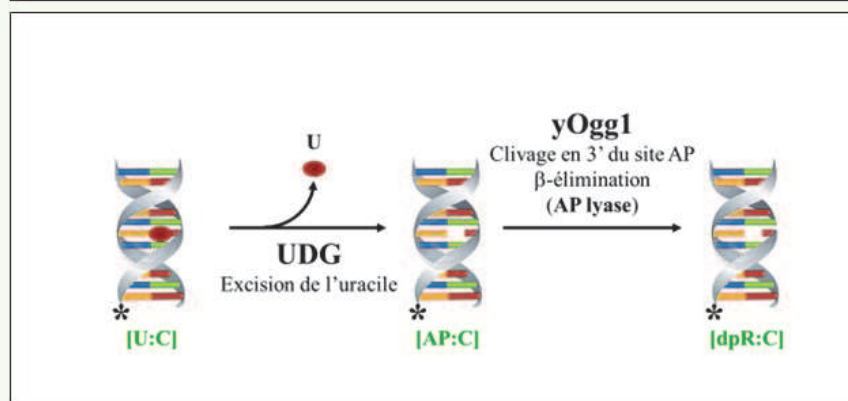
A**B**

Figure 32 Représentation schématique de la mesure des activités de yOgg1

Après radio-marquage en 5' par du ^{32}P (*) du brin d'ADN contenant la lésion (8-oxoG ou U), les duplexes d'ADN correspondant de 24 paires de bases [8-oxoG:C] et [U:C] sont obtenus par hybridation avec un 24-mer contenant un C opposé à la base lésée. Les duplexes sont ensuite incubés à 37°C en présence des enzymes. **A** Activité 8-oxoG-ADN Glycosylase et 8-oxoG ADN Glycosylase/AP lyase couplée. Après incubation du 24-mer[8-oxoG:C] en présence de yOgg1, les mélanges réactionnels sont dénaturés (formamide + chaleur) et analysés par Urée-PAGE soit directement (activité Glycosylase/Lyase) soit après un traitement à la soude (activité Glycosylase: le site AP est alcali-labile). **B** Activité AP lyase. Après incubation du 24-mer [U:C] en présence de l'Uracile-ADN glycosylase UDG (formation du substrat [AP:C]), yOgg1 est ajoutée au mélange réactionnel pour mesurer séparément l'activité AP lyase de l'enzyme. Les différents produits de réaction tels que [AP:C] (transformé en [Gap1:C] après clivage en 3' et 5' du site AP par la soude), [dpR:C] ou [Gap1:C] sont identifiés comme des produits de clivage radiomarqués du brin portant la lésion de 12 bases contenant ou pas le désoxyribose en 3', respectivement. Les conditions expérimentales de ces différents essais enzymatiques sont décrites en détails dans la section Matériels & Méthodes. Les données quantitatives sont extraites des autoradiographies des gels (voir plus loin).

II.C. Approches fonctionnelles *in vitro* de l'interaction yOgg1/yPol2

II.C.1. Effet de yPol2 sur l'activité de yOgg1

L'interaction yOgg1/yPol2 ayant été mise en évidence *in vivo* par yDH puis confirmée *in vitro* par « pull-down » et les domaines mis en jeu ayant été partiellement identifiés, nous nous sommes posé la question du rôle fonctionnel d'une telle interaction chez la levure. Au vu de l'expertise de notre équipe, nous avons, dans un premier temps, initié une étude *in vitro* de l'effet de l'interaction yOgg1/yPol2 sur l'activité de yOgg1.

En effet, yOgg1 intervenant dans la phase d'excision du dommage et yPol2 dans la phase de resynthèse du BER dans la levure, on pourrait s'attendre à ce qu'une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines puisse moduler l'efficacité du BER. Etant donné le très faible *turnover* de Ogg1 *in vitro* (voir Introduction), un couplage fonctionnel entre excision et resynthèse pourrait globalement stimuler l'enzyme comme cela a été observé par exemple pour la protéine humaine hOgg1 dont le *turnover* est stimulé par APE1 (l'AP endonucléase humaine majeure) (HILL *et al.* 2001; VIDAL *et al.* 2001). Dans ce dernier cas, APE1 stimule le *turnover* de l'activité ADN glycosylase de hOgg1 en déplaçant l'enzyme du site abasique néoformé. Ce mécanisme est rendu possible par un fort découplage entre les deux activités de l'enzyme et résulte dans l'observation d'une inhibition de l'activité AP lyase *in vitro*. hOgg1 se comporte comme une ADN glycosylase monofonctionnelle en présence de APE1.

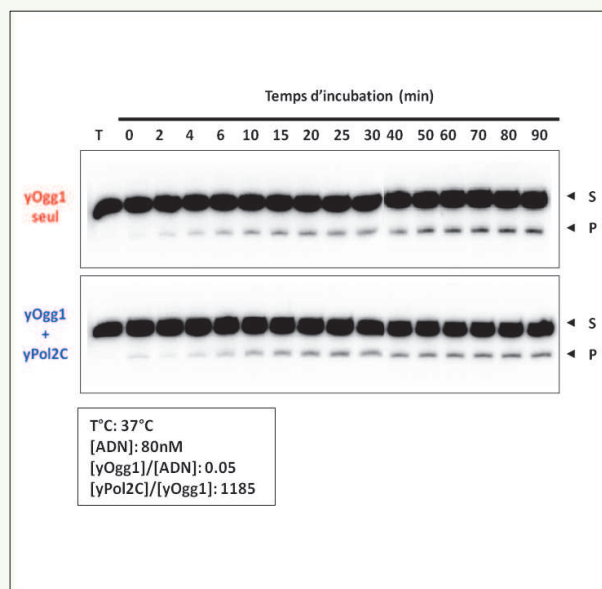
yOgg1 étant une ADN glycosylase bifonctionnelle (Glycosylase/Lyase), il existe plusieurs manières d'étudier son activité enzymatique. Chaque activité de l'enzyme peut être étudiée séparément, à savoir l'excision de la base lésée (activité 8-oxoG-ADN glycosylase) puis le clivage en 3' d'un site abasique (activité AP lyase) ou, en même temps, en analysant le couplage des deux activités (activité Glycosylase/lyase, c'est-à-dire l'excision de la 8-oxoG suivie du clivage du site AP résultant) (**Figure 32**). Par ailleurs et en fonction des conditions expérimentales, il est également possible d'évaluer les effets de yPol2 sur la catalyse à proprement parlé (*single-turnover*, concentration limitante en substrat) et sur le recyclage de l'enzyme après chaque acte catalytique (*multi-turnover*, concentration limitante en enzyme).

II.C.2.a. γ Pol2 stimule l'activité ADN glycosylase/AP lyase de γ Ogg1

L'activité ADN Glycosylase/AP lyase de γ Ogg1, a été évaluée au cours du temps en conditions de *multi-turnover*, en utilisant comme substrat un duplexe d'ADN de 24 paires de bases contenant la 8-oxoG opposée à une cytosine [8-oxoG : C] (**Figure 32**). Cela signifie que nous nous plaçons à une concentration saturante en ADN substrat par rapport à γ Ogg1, de sorte que nous considérons que chaque molécule d'enzyme doit pouvoir prendre en charge successivement plusieurs lésions substrats (d'où le terme de *multi-turnover* qui fait référence au recyclage de l'enzyme après chaque acte catalytique). Pour cela, γ Ogg1 est incubée avec son substrat radiomarqué avec ou sans γ Pol2. Les mélanges réactionnels sont ensuite analysés au cours du temps par Urée-PAGE (voir Matériel et Méthodes). Le produit de réaction est identifié dans le gel comme un fragment de 12 nucléotides témoignant de l'excision de la 8-oxoG (activité ADN glycosylase) et du clivage en 3' du site AP résultant (activité AP lyase couplée) (**Figure 33A**, gel du haut). Après quantification des autoradiographies des gels Urée-PAGE, l'apparition du produit de réaction (exprimée en pourcentage de clivage du duplexe d'ADN [8-oxoG :C]) en fonction du temps est représentée graphiquement (**Figure 33B**, courbe rouge). Nous pouvons immédiatement observer que seulement une faible quantité de substrats a été clivée et que le profil de cinétique présente une allure bi-phasique. Dans la situation d'une enzyme efficace, on doit s'attendre à des cinétiques de formation du produit qui suivent une loi exponentielle et à une métabolisation quantitative du substrat en produit. Ce n'est pas le cas ici car nous pouvons distinguer deux phases : (i) une première phase rapide de formation du produit (dans les 5 premières minutes que l'on appelle « burst » en anglais) de nature exponentielle et interrompue par (ii) une deuxième phase, plus lente, de nature linéaire en fonction du temps (phase stationnaire ou « steady-state » en anglais). Ce type de profil de cinétique est généralement attribué à un effet de rétro-inhibition (ici partielle) d'un des produits de réaction (dans notre cas, le site abasique [AP :C], produit de l'activité ADN glycosylase et/ou le site abasique clivé [dRp :C], produit final résultant de l'activité AP lyase, **Figure 32**). En d'autres termes, en début de cinétique (durant le « burst »), nous observons un acte catalytique unique par molécule d'enzyme puis la concentration de produit devient suffisante pour inhiber partiellement l'enzyme (partie linéaire ascendante de la cinétique). Cela revient à dire que *in vitro* γ Ogg1 présente un très faible *turnover*, tout du moins en ce qui concerne son activité

Glycosylase/Lyase (il n'y a pas ou peu de recyclage de l'enzyme après la catalyse). Tout se passe comme si nous avions deux étapes limitantes dans le mécanisme réactionnel. Ce type de comportement est également connu pour la protéine humaine hOgg1 (ZHARKOV *et al.* 2000; MORLAND *et al.* 2005).

A



B

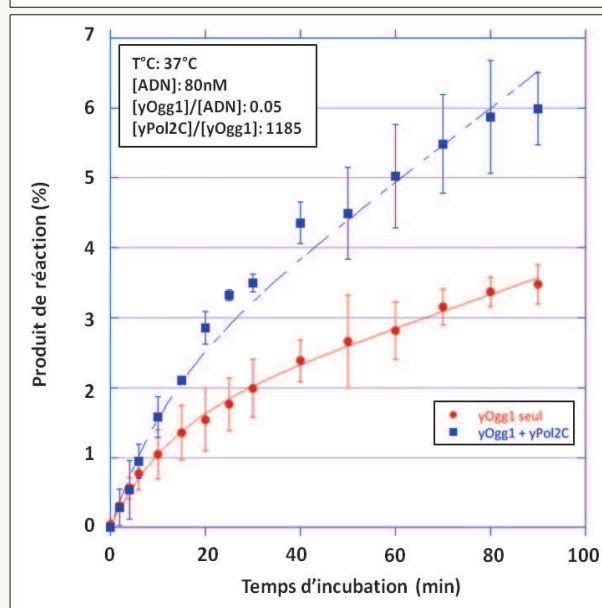
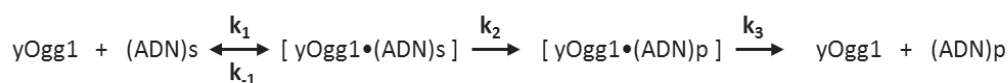


Figure 33 Analyse au cours du temps de l'activité ADN glycosylase/AP lyase de yOgg1 en présence et en absence de yPol2C en conditions de multi-turnover

A Autoradiographie des gels Urée-PAGE illustrant la métabolisation du duplexe [8oxo-G: C] par yOgg1 en absence ou en présence de yPol2C. Les notations S et P correspondent au substrat marqué (24 bases) et au produit généré (12 bases), respectivement (**Figure 32**). La concentration en enzyme dans l'essai est de 4nM et yPol2C est présent en excès avec un facteur 1185 par rapport à yOgg1. La notation T correspond à une incubation de 90 min du substrat à 37°C sans enzyme. Chaque piste correspond à un temps d'incubation donné du mélange réactionnel (de 0 à 90min). L'ADN est en excès par rapport à yOgg1 (conditions de *multi-turnover*). **B** Quantification des cinétiques extraites des autoradiographies des gels. Après autoradiographie, la quantification des données est obtenue avec le logiciel Image Quant. Chaque point de cinétique correspond à la moyenne obtenue pour au moins 3 expériences indépendantes. Le « fit » des données est obtenu en appliquant l'équation 1 (voir texte et **Tableau 9**).

Le mécanisme réactionnel le plus simple et le plus consistant avec ces données de cinétique est présenté dans le schéma ci-dessous :



Ce mécanisme décrit les 3 étapes de base nécessaires pour un cycle catalytique : la fixation du substrat (k_1 , k_{-1}), la réaction chimique de l'acte catalytique (k_2) et la libération du (des) produits de réaction (k_3). Ce mécanisme simple pourrait être aisément complexifié mais il suffit à traiter nos données expérimentales. D'après les données expérimentales de la formation du produit en fonction du temps, l'équation de courbe qui permet le mieux de relier les points expérimentaux (courbe rouge, **Figure 33B**) est la suivante :

$$[P]_t = A_0 [1 - \exp(-k_{obs} t) + k_{ss} t] \quad \text{Eq (1)}$$

avec A_0 = amplitude du « burst »,
 k_{obs} = constante de vitesse du « burst » ($\text{catalyse} \approx k_2$)
 k_{ss} = pente de la phase linéaire associée à l'étape de libération du produit
 $(k_{ss} \approx k_3[\gamma\text{Ogg1}]_0)$.

Remarque : il s'agit là d'une approximation car nous n'avons pas d'évidence absolue que k_{ss} mesure uniquement la dissociation du complexe enzyme-produit final, car pour cela 2 étapes catalytiques sont nécessaires (glycosylase et AP lyase).

Cette approximation nous a cependant permis d'extraire de notre courbe de cinétique des valeurs pour k_{obs} et k_3 (**Tableau 9**).

La même expérience a été conduite en présence d'un excès de γPol2C (**Figure 33A**, gel du bas et **figure 33B**, courbe bleue). L'allure de la cinétique en présence de γPol2C est comparable à la précédente, bi-phasique, mais avec une deuxième phase linéaire de formation du produit plus rapide que celle observée sans γPol2C . Si le modèle réactionnel proposé plus haut est valable, cela revient à dire que nous observons un effet stimulant de γPol2C sur l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase/AP lyase de γOgg1 . Ainsi, au bout de 80 min d'incubation, alors que l'action de γOgg1 seule conduit à un taux de coupure d'un peu plus de 3%, en présence de γPol2C , γOgg1 est près de deux fois plus efficace, avec un taux de coupure d'environ 6%. Plus précisément, c'est la constante de vitesse correspondant à la

deuxième partie de la courbe (k_3), et donc au recyclage de l'enzyme selon notre hypothèse, qui est plus que doublée ($\times 2,6$) (**Tableau 9**). La première partie de la courbe (k_2) reste inchangée. Il semblerait donc que yPol2C stimule l'activité globale de yOgg1 *via* une stimulation de son *turnover* et non de son activité catalytique à proprement dite en stimulant la dissociation de l'enzyme de son produit de réaction. Autrement dit, yPol2 stimulerait le couplage entre les deux activités glycosylase et lyase de yOgg1 dont les bases mécanistiques restent cependant à éclaircir.

Activité	Constante de vitesse	yOgg1 seul	yOgg1 + yPol2C	Rapport $k_{yOgg1+yPol2C}/k_{yOgg1}$
ADN glycosylase/ AP lyase	k_2^a	$0,0835 \pm 0,002$	$0,090 \pm 0,004$	1,1
	k_{ss}^b	$0,020 \pm 0,001$	$0,052 \pm 0,002$	
	k_3^c	$0,018 \pm 0,003$	$0,047 \pm 0,003$	2,6
AP lyase	k_2^a	$0,10 \pm 0,011$	$0,12 \pm 0,016$	1,2
	k_{ss}^b	$0,058 \pm 0,019$	$0,11 \pm 0,025$	
	k_3^c	$0,026 \pm 0,03$	$0,052 \pm 0,041$	2,0
ADN glycosylase	k_2^a	$0,40 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,05$	1,0
	k_{ss}^b	$0,175 \pm 0,002$	$0,177 \pm 0,003$	
	k_3^c	$0,144 \pm 0,012$	$0,159 \pm 0,013$	1,1

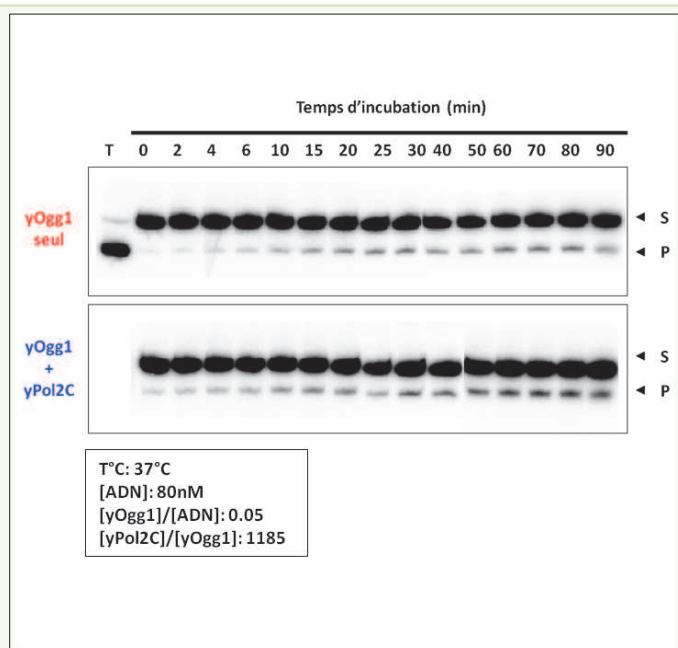
Tableau 9 Constantes de vitesse calculées à partir des cinétiques des activités ADN glycosylase/AP lyase, AP lyase et ADN glycosylase de yOgg1, en absence et en présence de yPol2C (en conditions de multi-turnover)

k_2^a : constante de vitesse (phase pré-stationnaire) en min^{-1} ; k_{ss}^b : pente de la partie linéaire de la phase stationnaire en nM min^{-1} ; k_3^c : constante de vitesse de dissociation du complexe [yOgg1/produit de réaction] ($= k_{ss}/[yOgg1]_0$) en min^{-1}

II.C.2.b. yPol2 stimule l'activité AP lyase de yOgg1 mais ne stimule pas son activité ADN glycosylase

Afin d'étayer l'hypothèse selon laquelle yPol2 stimulerait le *turnover* de yOgg1 en stimulant la cinétique de libération du produit final de réaction, nous avons étudié, toujours en conditions de *multi-turnover*, l'effet de yPol2C sur les deux activités de yOgg1 séparément : l'activité AP lyase (**Figure 34**) et l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase (**Figure 35**). Comme dans le cas de l'activité ADN glycosylase/AP lyase, nous observons pour l'activité AP

A



B

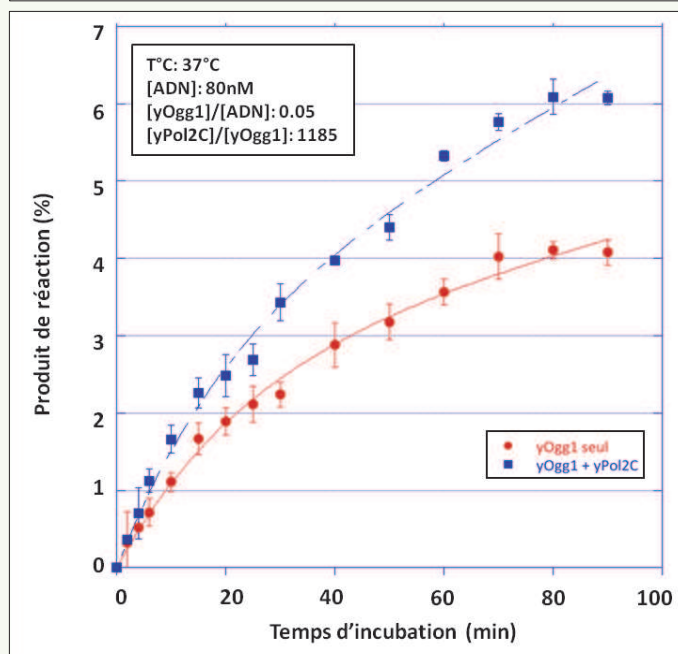


Figure 34 Analyse au cours du temps de l'activité AP lyase de yOgg1 en présence de yPol2C en conditions de multi-turnover

La concentration en enzyme dans l'essai est de 4nM et yPol2C est présent en excès avec un facteur 1185 par rapport à yOgg1. L'ADN est en excès par rapport à yOgg1 (x20; conditions de *multi-turnover*). L'ADN substrat est un duplexe de 24 paires de bases contenant un site abasique (**Figure 32**) **A** Autoradiographies des gels. Les notations S et P correspondent au substrat et au produit généré (tous deux radiomarqués), respectivement (**Figure 32**). La notation T correspond à l'ADN substrat seul traité avant dépôt avec 0,1M NaOH (voir Mat& Met). Ce contrôle témoigne de l'efficacité de l'UDG à exciser le U et à générer un site AP (**Figure 32**). Chaque piste correspond au contenu du mélange réactionnel au temps indiqué (de 0 à 90min). **B** Représentation graphique de la formation du produit au cours du temps. Après quantification des autoradiographies des gels, les valeurs expérimentales (moyennes issues de 3 expériences indépendantes) sont reliées entre elles en appliquant l'équation 1 d'où sont extraites les constantes de vitesse présentées dans le **Tableau 9**.

lyase (l'ADN substrat ici utilisé est un duplexe d'ADN contenant un site AP, 24-mer [AP : C], **Figure 32**) une allure bi-phasique de la cinétique de formation du produit 12-mer [dRp : C] (produit de β -élimination, **Figure 32**). Le « burst » semble apparemment moins marqué mais les données expérimentales ne peuvent être traitées qu'en considérant une première phase rapide de formation du produit, d'allure exponentielle correspondant à un seul cycle de catalyse, suivie d'une phase stationnaire (linéaire) plus lente, traduisant encore une fois une rétro-inhibition partielle par le produit de réaction (**Tableau 9**). Nous observons ici encore une accélération de la phase stationnaire en présence de γ Pol2C. Comme pour l'activité ADN glycosylase/AP lyase, il semble que l'étape de catalyse ne soit pas ou peu modifiée par la présence de γ Pol2 (k_2 inchangé) tandis que nous notons une augmentation d'un facteur 2 du k_3 . Cette augmentation correspond ici encore à un meilleur recyclage de l'enzyme après l'acte catalytique (clivage du site AP) selon le mécanisme simple présenté plus haut. Au contraire, lorsque nous analysons, dans les mêmes conditions, l'effet de γ Pol2C sur l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase seule (ajout de NaOH en fin de réaction, **Figure 32**), nous n'observons aucun effet de γ Pol2C, ni sur la catalyse ni sur le *turnover* de γ Ogg1 (**Figure 35** et **Tableau 9**).

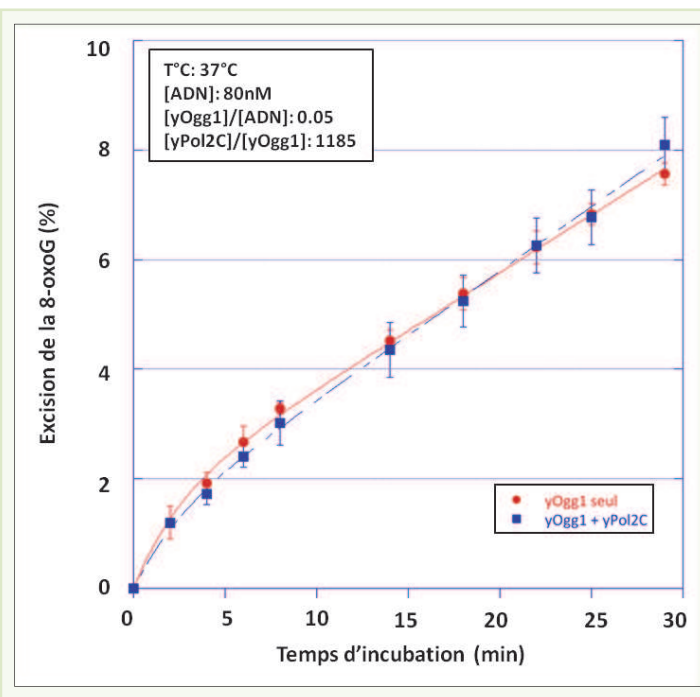


Figure 35 Analyse au cours du temps de l'activité ADN glycosylase de γ Ogg1 en présence de γ Pol2C en conditions de *multi-turnover*

La concentration de γ Ogg1 dans l'essai est de 4nM et celle de γ Pol2C lui est 1185x supérieure. L'ADN est en excès par rapport à γ Ogg1 (x20; conditions de *multi-turnover*). Les mélanges réactionnels sont analysés au cours du temps par Urée-PAGE après avoir été traités par 0,1M NaOH (**Figure 32**). Après autoradiographie et quantification des gels, la formation de produit au cours du temps est représentée graphiquement. Les valeurs expérimentales obtenues représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les courbes rouge et bleu (sans et avec γ Pol2C dans l'essai, respectivement) sont ajustées sur les points expérimentaux en utilisant l'équation 1.

Ces expériences complémentaires nous indiquent donc plus précisément que, dans des conditions de *multi-turnover*, γ Pol2 stimulerait en fait l'activité ADN glycosylase/AP lyase en stimulant uniquement l'activité AP lyase de γ Ogg1 *via* une augmentation de la libération du produit final de réaction, le 12-mer [dRp :C]. Finalement, cette possibilité d'accélérer la libération du produit de réaction en présence de γ Pol2 revient à stimuler le couplage entre les deux activités de l'enzyme (c'est ce que nous observons en étudiant l'activité Glycosylase/lyase en présence de γ Pol2C, **Figure 33**). Cependant, un meilleur couplage entre les deux activités pourrait également résulter d'une meilleure stabilisation fonctionnelle du site AP dans le site actif de l'enzyme après excision de la base lésée. Ce mode différent de stabilisation pourrait ainsi faciliter son clivage par l'enzyme. Néanmoins, dans le cadre du mécanisme réactionnel simple proposé, nous aurions pu nous attendre à une augmentation du k_2 en présence de γ Pol2 pour l'activité AP lyase de l'enzyme, ce qui n'est pas le cas. Il n'est cependant pas exclu que notre modèle réactionnel soit à affiner pour aller plus loin.

Afin de vérifier l'absence d'effet de γ Pol2C sur la catalyse, nous avons regardé l'effet de γ Pol2C sur l'activité 8-oxoG-ADN glycosylase/AP lyase de γ Ogg1 dans des conditions de *single-turnover*, c'est-à-dire en se plaçant cette fois à une concentration saturante en γ Ogg1 par rapport à l'ADN. Dans ces conditions, chaque molécule de substrat [8-oxoG : C] sera prise en charge par, au plus, une molécule d'enzyme (voir Matériel et Méthodes). Nous ne regardons pas dans ces expériences le recyclage de γ Ogg1, seule la cinétique de catalyse est mesurée (k_{obs}). L'excision de la 8-oxoG et le clivage du site AP résultant suivent une cinétique du premier-ordre et la réaction conduit en fin de cinétique à une métabolisation *quasi* quantitative du substrat en produit (**Figure 36**). Les données brutes de cinétique sont analysées en utilisant l'équation 2, où A_0 représente l'amplitude de la phase exponentielle et k_{obs} est la constante de vitesse observée pour le processus catalytique :

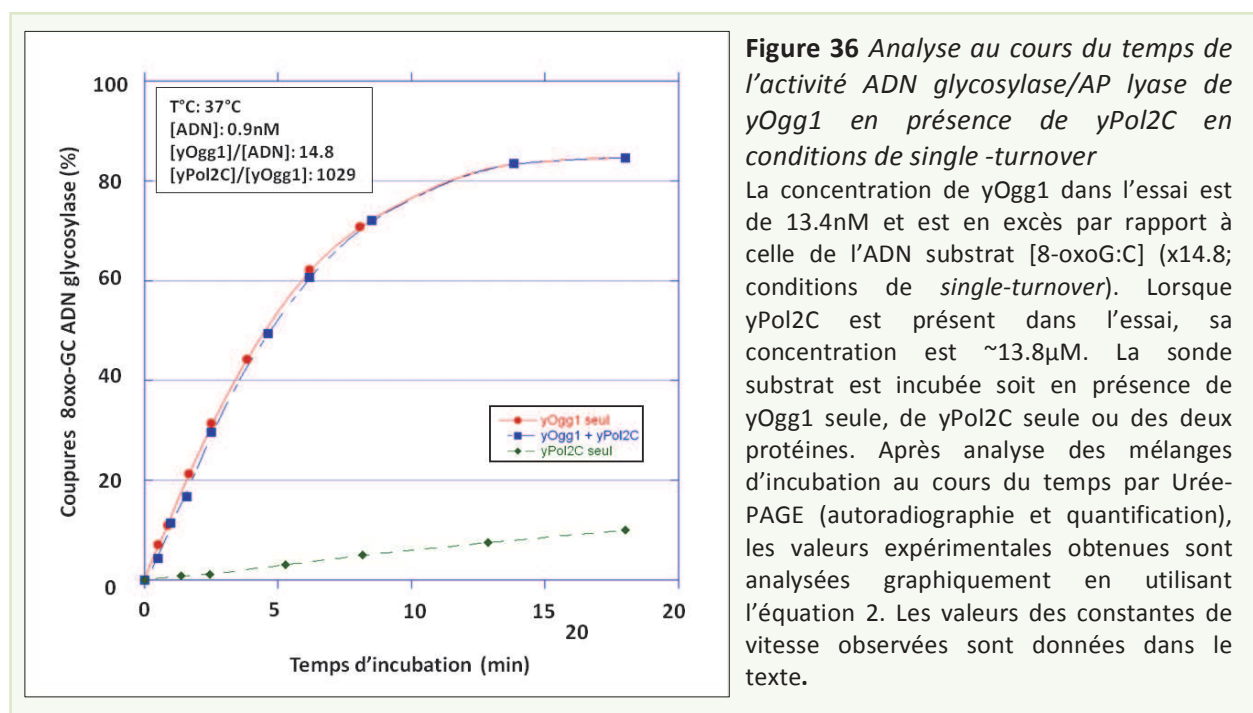
$$[P]_t = A_0 \{ 1 - \exp(-k_{obs} t) \} \quad Eq (2)$$

Si nous admettons que le complexe [enzyme-substrat] est un équilibre rapide ($k_{-1} \gg k_2$), la valeur de k_{obs} dans ces conditions ($[\gamma\text{Ogg1}]_0 \gg [8\text{-oxoG :C}]$) est donnée par l'équation 3 :

$$K_{obs} = [\gamma\text{Ogg1}]_0 / (K_d + [\gamma\text{Ogg1}]_0) \quad Eq (3)$$

Par ailleurs, puisque la concentration de yOgg1 utilisée dans ces expériences (13.4 nM) est très proche du K_d (GUIBOUT *et al.* 2000), l'équation 3 peut-être simplifiée en $k_{obs} \approx k_2$.

En accord avec ces simplifications, l'analyse des données en présence ou en absence de yPol2C donne une valeur du k_2 inchangée = $0,16 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ (**Figure 36**). Cela confirme l'absence d'effet de yPol2C sur la catalyse à proprement parlé, ce qui avait déjà été suggéré par les expériences de cinétique en conditions de *multi-turnover*.



II.C.2. Effet de yPol2 sur la stabilité des complexes [yOgg1/ADN]

D'après les expériences de cinétiques enzymatiques, il semblerait que l'interaction yOgg1/yPol2 favorise l'activité AP lyase de yOgg1 *via* une stimulation du recyclage de l'enzyme. A ce stade de l'étude, nous pouvons proposer que yPol2, en interagissant de façon spécifique avec yOgg1, agirait sur la vitesse de dissociation du complexe yOgg1/produit, en favorisant le déplacement de yOgg1 de son produit final de réaction [dRp :C] (**Figure 32**). Cette hypothèse permet de comprendre l'effet positif de yPol2C sur la réaction couplée Glycosylase/Lyase et sur celle de l'AP lyase. Dans les expériences qui suivent et pour étayer les conclusions des cinétiques enzymatiques, nous nous proposons d'étudier plus précisément l'effet de yPol2C sur la stabilité des complexes yOgg1/ADN.

II.C.2.a Durée de vie des complexes [yOgg1/produit de réaction] en présence de yPol2

Une manière d'évaluer l'hypothèse selon laquelle yPol2 stimulerait le *turnover* de yOgg1 en favorisant un déplacement de l'enzyme de son produit final de réaction, consiste à étudier la durée de vie des complexes [yOgg1/ADN-produits de réaction] en présence de yPol2C. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la méthode des gels retards, qui permet d'étudier qualitativement et quantitativement la formation de complexes stables entre une protéine et l'ADN. Une façon d'étudier des complexes stables entre une ADN glycosylase et l'ADN consiste à utiliser des duplexes d'ADN contenant des analogues stables de lésions. Ces analogues sont reconnus spécifiquement par l'enzyme sans pour autant être métabolisés. C'est le cas d'un analogue de site AP, le tétrahydrofurane (THF). Ainsi, le THF contenu dans un duplexe d'ADN (THF-ADN, **Figure 37**) se comporte comme un inhibiteur des ADN glycosylases avec lequel elles forment un complexe stable (CASTAING *et al.* 1999; GUIBOUT *et al.* 2000). Toujours en utilisant le THF, nous pouvons aussi concevoir un analogue de produit final (cassure simple-brin délimitée par des extrémités 5'-phosphate et 3'-dRp, **Figure 32**) contenant en lieu et place du 3'-dRp, un 3'-THF (3'-THF-ADN, **Figure 37**). La durée de vie des complexes entre yOgg1 et ces deux sondes radio-marquées (THF-ADN et 3'-THF-ADN) est accessible en analysant par gel retard la disparition au cours du temps du complexe préformé entre la sonde radiomarquée et yOgg1, en présence d'un excès de la même sonde « froide » (non radiomarquée). A l'équilibre, l'ADN froid en excès est ajouté aux mélanges réactionnels qui sont ensuite analysés au cours du temps par électrophorèse en gel retard. Le complexe [yOgg1/ADN] restant est identifié dans le gel, après autoradiographie, comme une bande retardée (C) par rapport à la sonde nucléique libre (L). La **figure 38A** montre un exemple de ce type d'expériences avec la sonde nucléique 3'-THF-ADN (analogue du produit final de réaction) en absence et en présence d'un excès de yPol2C (yPol2C/yOgg1=800). Comme attendu, en se plaçant dans des conditions limitantes de yOgg1 (30 à 60% de complexe à l'équilibre), l'ajout d'un excès de 3'-THF-ADN froid provoque une disparition du complexe (C) au profit de la réapparition de l'ADN libre (L), que l'on peut suivre au cours du temps. La quantification des gels retard nous permet de caractériser les cinétiques de dissociation (qui suivent une loi de décroissance exponentielle) en déterminant le temps de

demi-vie ($T_{1/2}$, temps nécessaire pour dissocier 50% du complexe γ Ogg1/ADN) des complexes et la vitesse de dissociation associée (k_{off}) (**Figure 38B** et **Tableau 10**).

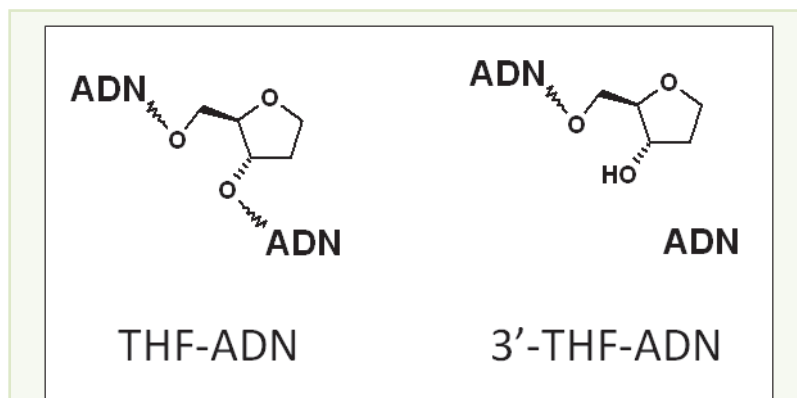


Figure 37 Analogues de produits de réaction utilisés dans cette étude

La sonde de type analogue stable de site AP (THF-ADN) est obtenue en hybridant un oligonucléotide de 24 bases radio-marquée contenant le site THF (en position 13 à partir de l'extrémité 5') avec l'oligonucléotide complémentaire contenant une cytosine opposée au THF. Le même oligonucléotide complémentaire est hybridé avec deux oligonucléotides dont un 12-mer radio-marqué contenant le site THF en 3' de manière à obtenir un duplexe d'ADN de 24 paires de bases contenant une cassure simple brin avec une extrémité 3'-THF et 5'-phosphate. Le duplexe d'ADN résultante (3'-THF-ADN) correspond à un analogue stable de l'activité AP lyase de γ Ogg1. Pour des raisons de commodité, seul le brin contenant l'analogue de produit est représenté.

	yOgg1 complexée avec			
	THF-ADN		3'-THF-ADN	
yPol2C	-	+	-	+
$T_{1/2}$ (min)	$9,7 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,0$	$10,2 \pm 1,0$	$11 \pm 1,0$
K_{off} (min^{-1})	$0,07 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,07$

Tableau 10 Temps de demi-vie et vitesse de dissociation associées mesurées relatives à la figure 38.

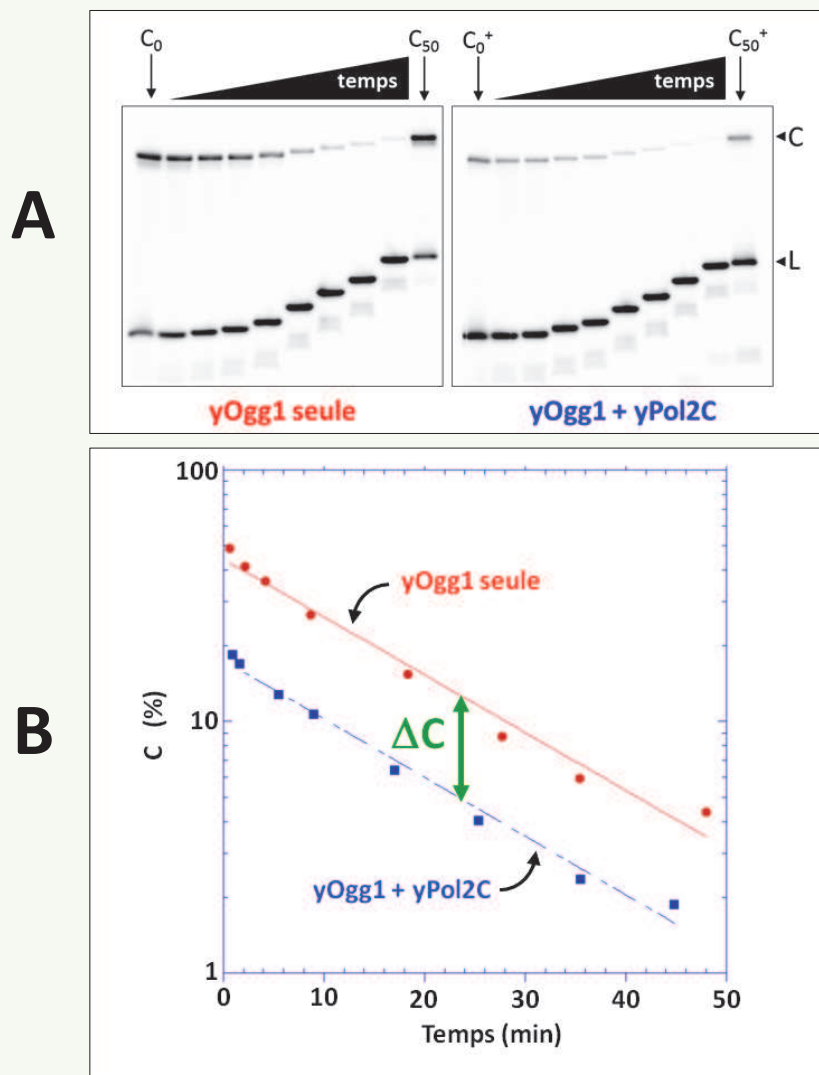


Figure 38 Durée de vie du complexe [yOgg1/3'-THF-ADN] en présence de yPol2C déterminée par gel retard

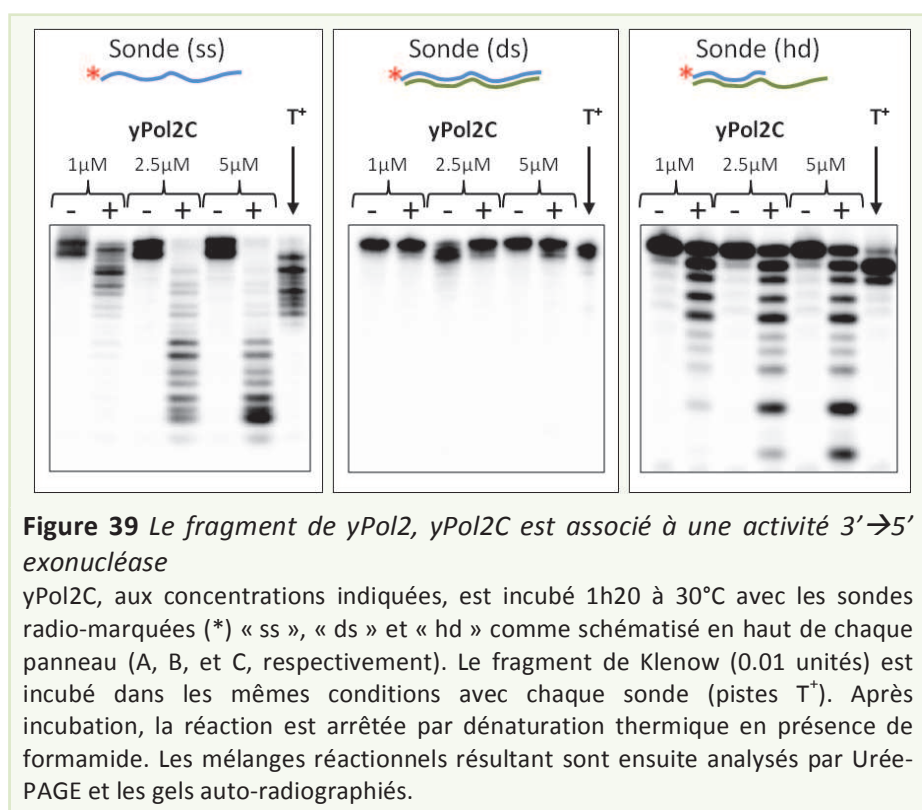
Le duplexe 3'-THF-ADN (Figure 37) radiomarqué est d'abord incubé en présence de yOgg1 (3h) en présence ou en absence de yPol2C (C_0 et C_0^+ , respectivement) et après 50 min (C_{50} et C_{50}^+) sans ajout d'ADN compétiteur. Comme souhaité, on ne note aucune différence entre ces contrôles entre le temps 0 et 50 min de la cinétique. L'incubation est poursuivie en présence d'un excès de 3'-THF-ADN froid (rapport molaire ADN chaud/ADN froid = 800). Des aliquotes du mélange réactionnel sont ensuite chargés sur le gel retard sous-tension à différents temps. Après autoradiographie (A) et quantification, le pourcentage de complexe (C) (en échelle logarithmique) est reporté graphiquement en fonction du temps d'incubation après ajout de l'ADN compétiteur (B). La pente des droites observée en échelle semi-log correspond au k_{off} et le T1/2 correspond au temps nécessaire pour n'observer plus que 50% du complexe. Les points reportés sur le graphe correspondent aux moyennes d'au moins trois expériences indépendantes. Les abréviations (L) et (C) sont pour la sonde libre et complexée avec yOgg1, respectivement. ΔC représente la différence de quantité de complexes observée pour une même concentration d'yOgg1 entre l'expérience avec et sans yPol2C (voir p.139).

De toute évidence, yPol2C semble n'avoir aucun effet sur $T_{1/2}$ pas plus que sur le k_{off} . Par ailleurs, nous ne notons pas non-plus de différences significatives entre les deux sondes. Ces expériences de durée de vie ne nous permettent donc pas de supporter l'hypothèse suggérant que yPol2 stimule le *turnover* de yOgg1 en la déplaçant préférentiellement de son produit final de réaction. Ce désaccord apparent entre cinétiques enzymatiques et cinétiques de dissociation des complexes [yOgg1/produit de réaction] trouve peut-être son explication dans les conditions expérimentales très différentes entre les deux approches : (i) pour les cinétiques enzymatiques le substrat est en large excès par rapport à yOgg1 ($R=20$), c'est exactement l'inverse en gel retard ($R=0.3$) et (ii) la température d'incubation dans les deux expériences est également différente à savoir 37°C pour les cinétiques enzymatiques et 4°C pour la mesure des durée de vie (les vitesses de dissociations sont trop rapides à 37°C pour être mesurées manuellement).

Une autre explication pouvant justifier que les deux types d'expériences ne sont pas directement comparables serait de suggérer que le fragment yPol2C possède encore une affinité pour les acides nucléiques, ce qui rendrait « non-applicable » les expériences de durée de vie. En effet, l'ajout de l'ADN_{froid} en excès pourrait neutraliser yPol2C dans des complexes avec l'ADN compétiteur et masquerait de ce fait son effet sur les durées de vie mesurées. Nous n'avons pas de preuve directe de la capacité d'interaction de yPol2C avec l'ADN. Dans les conditions de gel retard utilisées, nous n'avons jamais observé, en absence de yOgg1, de complexes stables entre yPol2C et les sondes nucléiques que nous avons utilisées (substrats ou produits de yOgg1). De plus, l'ajout de yPol2C dans les mélanges d'incubation n'entraîne pas non-plus de changement de migration des complexes yOgg1/ADN. Cependant, yPol2C ayant un pI acide et le pH du gel retard étant alcalin (TBE $pH8,3$), ces conditions sont à *a priori* défavorables à la stabilisation d'un complexe yPol2C/ADN, les 2 espèces étant chargées négativement à $pH\ 8,3$.

Pour évaluer la capacité de yPol2C à interagir avec les acides nucléiques, nous avons examiné si ce fragment de yPol2 contenant le site exonucléase dans son entier était encore associé à une activité 3'→5' exonucléase. Cette activité a été estimée sur trois types de sondes : (i) une sonde d'ADN simple-brin (ss), (ii) une de type hémi-duplexe avec une partie simple-brin 5'-sortante (hd) et une sonde double-brin (ds) (**Figure 39**). Comme attendu pour une ADN polymérase répliquative (tel que le fragment de Klenow, pistes T⁺, **Figure 39**), yPol2C possède une activité 3'→5' exonucléase (faible) sur les sondes « ss » et « hd ». Seule la sonde

« ds » est résistante à yPol2C et le fragment de Klenow. Cette expérience constitue donc une preuve indirecte que yPol2C peut interagir avec des acides nucléiques. Néanmoins, son interaction avec un duplexe d'ADN tel que un produit de réaction de yOgg1 reste encore à démontrer puisque ce type de sonde (AP-ADN et 3'-dRp-ADN) ne sont pas en théorie des substrats pour les ADN polymérases répliquatives. Le produit final de réaction de yOgg1 présente en effet une extrémité 3'-bloquante connue pour ne pas être substrat pour l'activité exonucléase des ADN polymérases. Ces dernières expériences ne sont pas conclusives pour supporter nos hypothèses mais il s'agit là d'une étude préliminaire qu'il serait intéressant d'approfondir. Il manque entre autres un contrôle négatif tel qu'un mutant *exo⁻* de yPol2C (par exemple, un équivalent de yPol2-4, chapitre II.B. des résultats) pour exclure toute contamination liée à la procédure imparfaite de purification de yPol2C.



II.C.2.b. yPol2 déstabilise les complexes [yOgg1/ADN]

A ce stade de l'étude, il est donc difficile de savoir si les expériences de durées de vie en présence de yPol2C nous donnent des données de cinétiques de dissociation clairement exploitables pour supporter les expériences de cinétiques enzymatiques. Par contre, la mise au point expérimentale de ces expériences a permis de mettre en évidence une anomalie sur

la stabilité des complexes [yOgg1/ADN] en présence de yPol2C. En effet, à la suite de la pré-incubation entre yOgg1, l'ADN sonde et yPol2C, nous avons toujours observé moins de complexe [yOgg1/ADN] en présence de yPol2C qu'en son absence, avant même de déclencher la cinétique de dissociation par l'ajout d'ADN_{froid} compétiteur (comparer C_0 et C_0^+ , **Figures 38A et 38B**, correspondant au temps 0 de cinétique en absence et en présence de yPol2C, respectivement). Cette différence est indiquée graphiquement par la notation ΔC sur la **Figure 38B**. ΔC est observée quelque soit la sonde ADN utilisée (THF-ADN ou 3'-THF-ADN) et son amplitude est très sensible aux variations des conditions expérimentales utilisées (en particulier le temps de pré-incubation). Cet effet de déstabilisation et/ou d'inhibition de la formation du complexe [yOgg1/ADN] est très visible dans une expérience de titrage de l'ADN en gel retard par yOgg1 en présence ou en absence de yPol2C (**Figure 40**). Dans les conditions expérimentales utilisées (voir Matériel et Méthodes), la sonde libre (ici THF-ADN, mais nous observons la même chose avec 3'-THF-ADN) est quantitativement titrée par une concentration de 42 nM de yOgg1. L'ajout de yPol2C dans le même essai se traduit à l'équilibre par une baisse significative de la quantité de complexe [yOgg1/ADN]. Tout se passe comme si la présence d'un excès de yPol2C diminuait le titre apparent de yOgg1 pour la sonde ADN-THF. En présence de yPol2C, seulement 40% de la sonde est titrée par une concentration de 42 nM de yOgg1. Plusieurs hypothèses peuvent-être formulées pour expliquer ces observations :

- (i) yPol2C déplace yOgg1 pour prendre sa place sur l'ADN (compétition entre yOgg1 et yPol2C pour la fixation à l'ADN),
- (ii) yPol2C déplace yOgg1 de la sonde en se fixant sur l'enzyme (compétition entre yPol2C et l'ADN pour la fixation à yOgg1) et,
- (iii) yPol2C se fixe à yOgg1 et l'empêche ensuite d'interagir avec l'ADN (compétition entre yPol2C et l'ADN pour la fixation à yOgg1).

Une quatrième hypothèse, moins probable et déjà proposée plus haut, consisterait en l'existence d'un complexe ternaire [yOgg1/Pol2C/ADN]. Il faudrait admettre dans ce cas que le complexe préformé [yOgg1/yPol2C] aurait moins d'affinité pour l'ADN que yOgg1 seule. En effet, le complexe observé en gel retard en absence ou en présence de yPol2C garde la même migration électrophorétique (pas de super-retard apparent en présence de yPol2C témoignant d'une présence éventuelle d'un complexe de plus haut poids moléculaire).

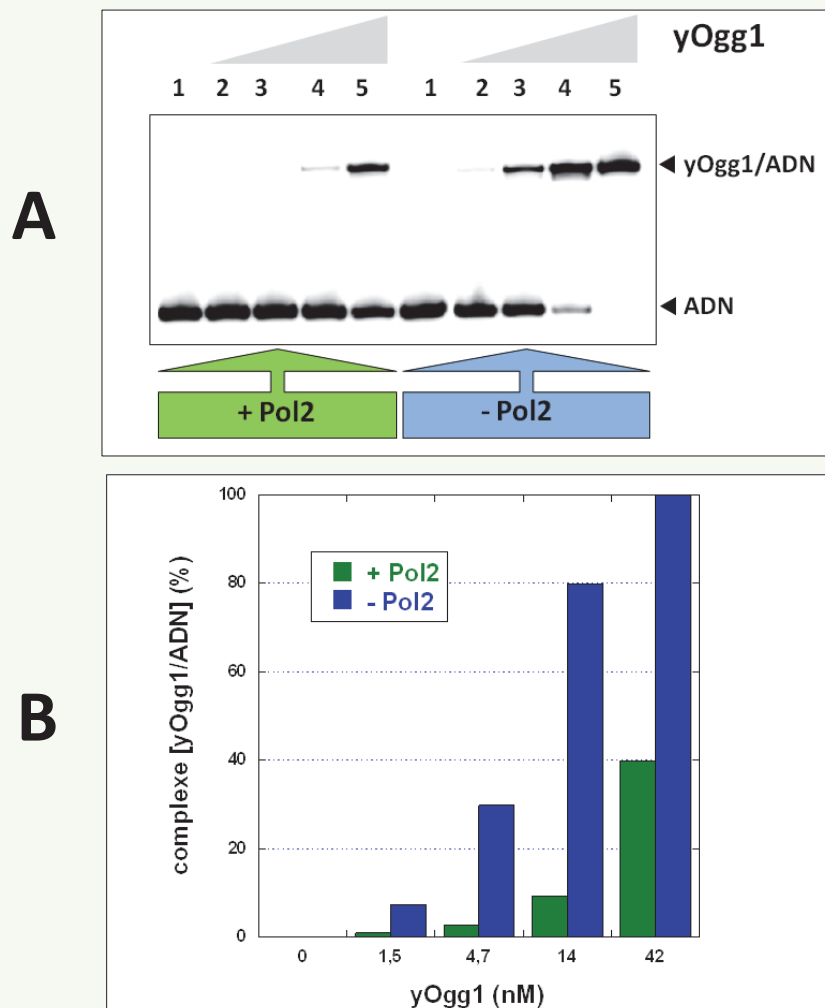


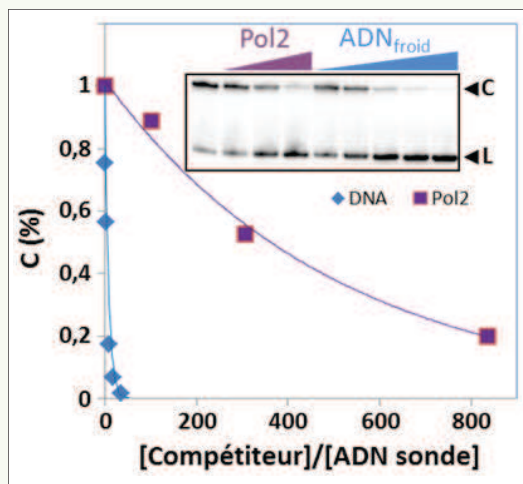
Figure 40 *Titration d'un duplexe d'ADN contenant un THF par yOgg1 en présence ou en absence de Pol2*

3,3 nM du duplexe d'ADN de 24 paires de bases contenant sur le brin radiomarqué un THF opposé à un C ([THF:C]) est incubé 3 heures à 4°C (équilibre) avec des concentrations croissantes de yOgg1 (0 à 42 nM, pistes 1 à 5) en présence ou en absence de 0,6 μ M de yPol2C comme indiqué. A l'équilibre, les échantillons sont analysés en gel retard (voir Matériel et Méthodes). **A** Autoradiographie du gel et **B** Quantification.

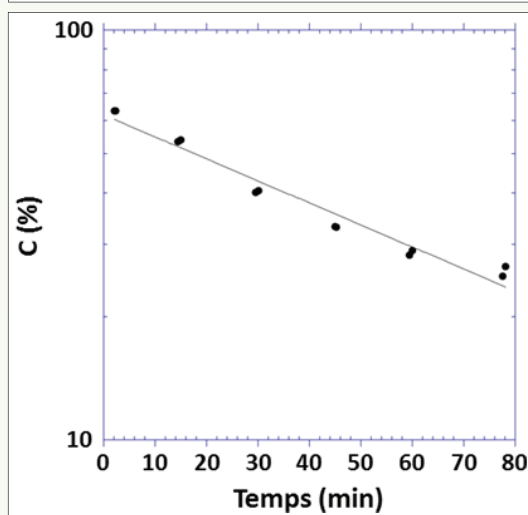
Faute d'éléments supplémentaires sur l'interaction de yPol2C à l'ADN (voir données préliminaires sur l'activité exonucléase associée à yPol2C), nous ne pouvons pas pour l'instant retenir l'hypothèse (i) car il semble que dans les conditions expérimentales choisies, yPol2C soit incapable de se fixer à un duplexe d'ADN (ou tout du moins nous n'avons pas été capable de l'observer) (**Figure 40A**, pistes contrôles 1 en présence de yPol2C sans yOgg1, pas de complexe visible sur le gel). Cette hypothèse est d'autant plus difficile à défendre que nous utilisons une forme tronquée de yPol2 ayant perdue ces domaines en C-terminal dans lequel se trouvent les doigts à zinc de yPol2 (domaines d'interaction avec l'ADN double-brin) et les régions en C-terminal sur lesquelles sont censées interagir les sous-unités non-catalytiques (Dpb2, Dpb3 et Dpb4) capables elles-aussi d'interagir avec l'ADN (voir Introduction). Cela n'exclut cependant pas qu'avec yPol2 entière, il puisse exister une interaction entre les trois partenaires *via* un complexe dans lequel yPol2 interagit d'une part avec yOgg1 (dissociée de l'ADN) et d'autre part avec l'ADN par son domaine C-terminal.

L'existence d'une compétition entre yPol2C et l'ADN pour la fixation à yOgg1 contenue dans les hypothèses (ii) et (iii) est clairement établie lorsque nous analysons par gel retard la quantité de complexe [yOgg1/THF-ADN] restant après l'ajout de quantités croissantes de THF-ADN_{froid} ou de yPol2C compétiteur (**Figure 41A**). Dans les deux cas, l'ajout du compétiteur est associée à une disparition du complexe [yOgg1/THF-ADN] proportionnelle à la concentration du compétiteur. Le plus probable est de proposer que yPol2C (comme l'ADN_{froid}) déplace le complexe préformé en se fixant à yOgg1. Le rapport entre la quantité de complexe en présence de yPol2C et celle en présence de l'ADN_{froid} compétiteur donne un ordre de grandeur du rapport d'affinité entre celle de yPol2C et celle de l'ADN pour yOgg1 (soit environ 95). Cela signifie que yOgg1 se fixe près de 100 fois plus fortement au THF-ADN qu'à yPol2C. Sachant que l'affinité de yOgg1 pour le THF-ADN est de $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (VAN DER KEMP *et al.* 2004), nous pouvons estimer que yPol2C se fixe à yOgg1 avec une affinité de l'ordre de $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (soit une constante de dissociation de l'ordre du μM). Cette affinité apparente de yPol2C pour yOgg1 n'est pas négligeable si on la compare à celle, par exemple, d'une aminoacyl-ARN_t synthétase pour son ARN_t spécifique qui est de l'ordre de 10^5 M^{-1} (LIPMAN *et al.* 2003). Toujours par gel retard, nous pouvons estimer un temps de demi-vie apparent ($T_{1/2}^{\text{app}} = 47 \text{ min}$) du complexe [yOgg1/ADN] en présence de yPol2C en étudiant par gel retard la dissociation du complexe en présence d'un excès de yPol2C de 900 fois (**Figure 41B**). Ce temps de demi-vie est 5 fois supérieur à celui déterminé en présence

A



B



C

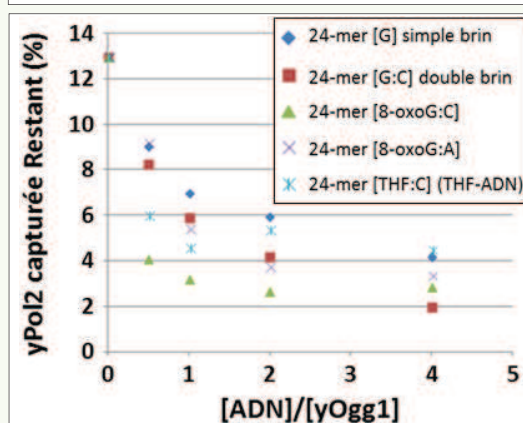


Figure 41 *Compétition entre γ Pol2C et l'ADN pour la fixation de γ Ogg1*

A Analyse comparative de la dissociation du complexe $[\gamma\text{Ogg1}/\text{THF-ADN}]$ en présence de $\text{THF-ADN}_{\text{froid}}$ ou de γPol2C . Après équilibration d'un mélange de γOgg1 et THF-ADN radiomarqué (30min, préformation du complexe), des quantités croissantes du même $\text{ADN}_{\text{froid}}$ ou de γPol2C sont ajoutées et le tout est incubé 3h à 4°C pour atteindre l'équilibre. Les mélanges d'incubation sont ensuite analysés par gel retard (voir insert). La quantité de complexe $[\gamma\text{Ogg1}/\text{THF-ADN}]$ est reportée en fonction du rapport molaire entre le compétiteur ($\text{ADN}_{\text{froid}}$ ou γPol2C) et le THF-ADN radiomarqué. **B** Cinétique de dissociation du complexe $[\gamma\text{Ogg1}/\text{THF-ADN}]$ induite par γPol2C . Après équilibration entre la sonde γOgg1 et THF-ADN (30min à 4°C), un excès de γPol2C ($\gamma\text{Pol2C}/\gamma\text{Ogg1}=900$) est ajouté au mélange réactionnel. La dissociation du complexe est suivie au cours du temps par gel retard. **C** Dissociation du complexe $[\gamma\text{Ogg1}/\gamma\text{Pol2C}]$ en présence d'un excès d'ADN. Des billes Ni-NTA fonctionnalisées par 6His- γOgg1 sont incubées en présence de γPol2C et de quantités croissantes d'ADNs compétiteurs de natures variées comme indiqué. A l'équilibre, les billes sont lavées puis leur contenu en γPol2 est analysé par SDS-PAGE (voir « pull down », chapitre résultats II.A.). Après quantification, la quantité de γPol2C capturée sur les billes par γOgg1 est exprimée en fonction du rapport molaire entre l'ADN compétiteur et γOgg1 immobilisée sur les billes Ni-NTA.

d'un excès d'ADN_{froid} (**Tableau 10**) ce qui témoigne encore une fois du fait que yOgg1 est bien plus affine de l'ADN que de yPol2. Ce différentiel marqué entre l'ADN et yPol2C est clairement mis en évidence lorsque nous regardons l'effet de l'ADN cette fois-ci sur le complexe [yOgg1/yPol2C] par la méthode de « pull-down » (**Figure 41C**). En effet, pour un excès de moins de 10 fois entre [6His-yOgg1/yPol2] immobilisée sur les billes Ni-NTA et l'ADN compétiteur, nous observons près de 100% de déplacement de yPol2C par l'ADN (il s'agit ici finalement d'un « négatif » de l'expérience présentée en **Figure 41A**). L'expérience de « pull-down » ne nous permet cependant pas d'apprécier des différences significatives liées à la nature des ADNs compétiteurs utilisés (ADN simple ou double brin sans site spécifique de reconnaissance pour yOgg1, ADNs substrats ou produits de réaction).

L'ensemble de ces études d'interaction et de stabilité des complexes yOgg1/ADN et yOgg1/yPol2 restent préliminaires mais ne nous permettent pas pour l'instant de complètement supporter les expériences de cinétiques enzymatiques. Elles devraient cependant nous permettre à l'avenir de mieux appréhender les déterminants spécifiques de l'interaction entre yOgg1 et yPol2.

II.C.3. Conclusion

Cette approche fonctionnelle *in vitro* semble indiquer que l'interaction yOgg1/yPol2 a pour effet de stimuler l'activité AP lyase de yOgg1 et le couplage entre l'activité ADN glycosylase et AP lyase de l'enzyme. Par contre, yPol2 n'aurait aucun effet sur l'activité ADN glycosylase de yOgg1. Bien que nous n'ayons observé aucun effet de yPol2C sur la vitesse de dissociation du complexe yOgg1/ADN (produits de réaction), yPol2 pourrait favoriser la dissociation de yOgg1 de son produit final de réaction, ce qui stimulerait son *turnover*. Ces observations laissent donc présager une implication de l'ADN dans une interaction fonctionnelle yOgg1/yPol2. Cette suggestion avait déjà émergée lors de l'étude de mutants ponctuels de yOgg1 par « double-hybride » reliant « activité catalytique » de yOgg1 et « interaction avec yPol2C ». Le produit final de réaction de yOgg1 est probablement la « pierre angulaire » sur laquelle repose le sens biologique de l'interaction entre ces deux protéines.

Par ailleurs, les expériences d'interactions yOgg1/ADN et yOgg1/yPol2C et l'effet de leurs interférences respectives suggèrent que l'ADN reconnu par yOgg1 (produits de réaction) et

yPol2C sont en compétition pour la fixation de yOgg1. Une interprétation simple de ces expériences est d'imaginer que les sites respectifs d'interaction de yPol2C et de l'ADN sur yOgg1 se recouvrent suffisamment pour que la fixation de l'un exclue celle de l'autre. Cette hypothèse est complètement en accord avec la cartographie du site de reconnaissance de yPol2C sur yOgg1 établie par « double-hybride » (voir plus haut, **Figure 29**, chapitre résultats II.B).

III. Discussion générale et Perspectives

La 8-oxoguanine-ADN glycosylase 1 (Ogg1) est l'enzyme capable d'éliminer dans l'ADN la 8-oxoguanine (8-oxoG), l'un des produits majeurs d'oxydation des purines. Depuis le clonage de son gène chez la levure et l'Homme il y a maintenant près de 20 ans (VAN DER KEMP *et al.* 1996; RADICELLA *et al.* 1997), l'intérêt de la communauté scientifique pour cette enzyme n'a cessé de croître, en témoignent les dizaines de publications sur le sujet chaque année. Une des voies de recherche privilégiée ces dix dernières années a consisté en la recherche active de partenaires de l'enzyme capables de moduler son activité *in vivo*. Cette recherche de partenaires est stimulée par au moins deux éléments. L'activité d'excision de la 8-oxoG par l'enzyme isolée est plus que médiocre *in vitro* (pas de *turnover*) alors que son activité anti-mutateur (témoignant de l'excision de la 8-oxoG) *in vivo* est très efficace (les souris KO pour le gène *OGG1* accumulent de la 8-oxoG dans leur ADN (OSTEROD *et al.* 2002). Aussi, les produits intermédiaires et finaux de réaction de l'enzyme (sites AP et cassures simple-brin) sont eux-mêmes très toxiques pour la cellule suggérant une synergie entre les acteurs du BER (par des interactions transitoires protéine/protéine, ADN-dépendantes ou non), en particulier entre l'étape d'excision du nucléotide endommagé et l'étape de resynthèse de l'ADN.

Même si de nombreux partenaires de la protéine humaine hOgg1 ont été identifiés (on peut citer XRCC1 et la PARP-1, autres acteurs du BER), aucun partenaire d'interaction physique avec yOgg1 n'a été identifié à ce jour. Le choix de la levure dans cette étude réside essentiellement dans l'approche fonctionnelle de ces interactions, plus aisée que chez les eucaryotes supérieurs. Cette étude a été initiée en 2002, lorsque Lionel Gellon a pu révéler par un test de « double-hybride » l'existence d'une interaction *in vivo* entre la sous-unité catalytique de Polε (yPol2) et la protéine yOgg1. L'implication de Polε dans la voie BER chez *S. cerevisiae* nous a stimulé à caractériser cette interaction et constitue l'objet de mon travail de thèse.

III.A. Caractéristiques de l'interaction yOgg1/Pol2

Dans un premier temps, nous avons pu confirmer l'observation de Lionel Gellon en montrant, *via* un test de « pull-down », que les protéines isolées yOgg1 et des fragments N-terminaux de yPol2 (yPol2A et yPol2C) interagissent bien physiquement entre elles *in vitro*. Une possible généralisation de cette interaction chez les eucaryotes supérieurs est suggérée

par le test de « pull-down » yPol2 (N-term)/hOgg1 et par le fait que hOgg1 peut compléter l'absence de yOgg1 dans la levure. Cela n'est néanmoins pas confirmé par le test de « double-hybride » inter-espèce entre hOgg1 et yPol2. Pour évaluer cette possibilité, il faudrait tester si une forme tronquée équivalente de POLE1 (homologue humain de yPol2) est capable d'interagir avec hOgg1 *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons également déterminé, par une analyse par troncation et mutagenèse dirigée de yPol2 couplée aux méthodes de « double-hybride » et « pull-down », que la forme tronquée minimale de yPol2 capable d'interagir avec yOgg1 contiendrait les domaines structuraux NTD1' et EXO (domaines structuraux identifiés dans la structure 3D de l'ADN polymérase RB69), incluant le domaine 3'→5' exonucléase de yPol2. Par le même type d'analyse réalisée cette fois sur yOgg1, nous proposons que la poche du site actif de yOgg1 et/ou son voisinage immédiat puisse contenir pour partie le site d'interaction pour yPol2. Il reste néanmoins difficile de cartographier avec précision l'aire d'interaction de yPol2 sur la structure de yOgg1 étant donné que de très courtes troncations en N- et C-terminal de yOgg1 suffisent à abolir son interaction avec yPol2. Au-delà de la détermination de la zone d'interaction qui apparaît pour l'instant floue, nous observons une corrélation entre l'activité catalytique de yOgg1 et sa capacité à interagir avec yPol2 dans la levure et cela indépendamment de la capacité de l'enzyme à reconnaître spécifiquement la 8-oxoG (la version mutante inactive K241Q est capable de reconnaître spécifiquement la lésion). *In vivo* (par « double-hybride »), tout se passe comme si cette interaction n'était opérante qu'à partir du moment où l'enzyme est capable de générer ses produits de réaction, à savoir un site abasique et/ou une cassure simple-brin. Cette observation semble cependant spécifique à la levure car elle n'est pas observée avec la protéine humaine hOgg1. De même, l'activité 3'→5' exonucléase de yPol2 et/ou une intégrité structurale du domaine EXO pourrait être liée à son interaction avec yOgg1, le variant yPol2-4 (N-term, type Pol2A) déficient en activité exonucléase n'interagissant pas avec yOgg1 *in vivo*.

Ces corrélations entre activité et interaction laissent présager une implication de l'ADN dans l'interaction yOgg1/yPol2 *in vivo*. Il faut cependant noter que ces observations dans la levure (test de « double-hybride ») ne sont pas toujours confirmées par les études équivalentes *in vitro* (test du « pull-down ». Ainsi par exemple, la version mutante K241Q-yOgg1 est encore capable d'interagir *in vitro* avec yPol2 (N-term) et la version mutante yPol2-4 (N-term) interagit aussi avec yOgg1 et ce indépendamment de l'ADN. L'inadéquation

entre les tests *in vitro* et *in vivo* suggère qu'ils ne mesurent pas exactement les mêmes choses : (i) une interaction fonctionnelle *in vivo* est fortement dépendante de l'activité de yOgg1 tandis (ii) une interaction *in vitro* existe quel que soit la capacité de l'enzyme à exciser la 8-oxoG. Ces observations indiquent également que nous n'avons pas complètement identifié le domaine d'interaction de yOgg1 avec Pol2.

Les études fonctionnelles *in vitro* semblent cependant supporter une implication possible de l'ADN sur l'interaction yOgg1/yPol2. Celles-ci révèlent en effet que yPol2 (N-term) stimulerait l'activité AP lyase de yOgg1 et le couplage entre l'activité ADN glycosylase et AP lyase de l'enzyme. Ce même fragment de yPol2 (Pol2C) n'aurait néanmoins aucun effet sur l'activité ADN glycosylase de yOgg1. Les expériences d'interactions yOgg1/ADN et yOgg1/yPol2C suggèrent aussi que l'ADN reconnu par yOgg1 (produits de réaction) et yPol2C sont en compétition pour la fixation de yOgg1. Les sites respectifs d'interaction de yPol2C (putatif) et de l'ADN (connu) sur yOgg1 pourrait se recouvrir suffisamment pour que leur fixation à yOgg1 s'exclut (et/ou se déstabilise) mutuellement, ce qui est en accord avec la cartographie du site de reconnaissance de yPol2 sur yOgg1 établie par « double-hybride ». Les expériences de « pull-down » en présence d'ADN suggèrent que l'interaction entre les deux protéines exclue la possibilité d'avoir, sur un même site au niveau de l'ADN, yOgg1 toujours fixée spécifiquement à l'ADN endommagé (substrat ou produit) et interagissant en même temps avec yPol2. Cela n'exclut cependant pas que les deux protéines interagissant soient fixées à l'ADN par l'intermédiaire de yPol2.

III.B. Rôle putatif de l'interaction yOgg1/yPol2

III.B.1. Collaboration de Polε et yOgg1 dans la voie de réparation BER chez *S. cerevisiae*

Les protéines yOgg1 et Polε agissant toutes deux dans la même voie de réparation BER chez *S. cerevisiae*, l'hypothèse la plus directe qui découle de ce travail est de proposer que la fonctionnalité première de l'interaction yOgg1/Pol2 s'exprime au niveau de cette voie particulière de réparation (**Figure 42A**). Plus précisément et d'après nos observations, Polε, *via* sa sous-unité catalytique yPol2, favoriserait la dissociation de yOgg1 de son produit final de réaction, stimulant ainsi son *turnover*. La stimulation par yPol2C de l'activité AP lyase de

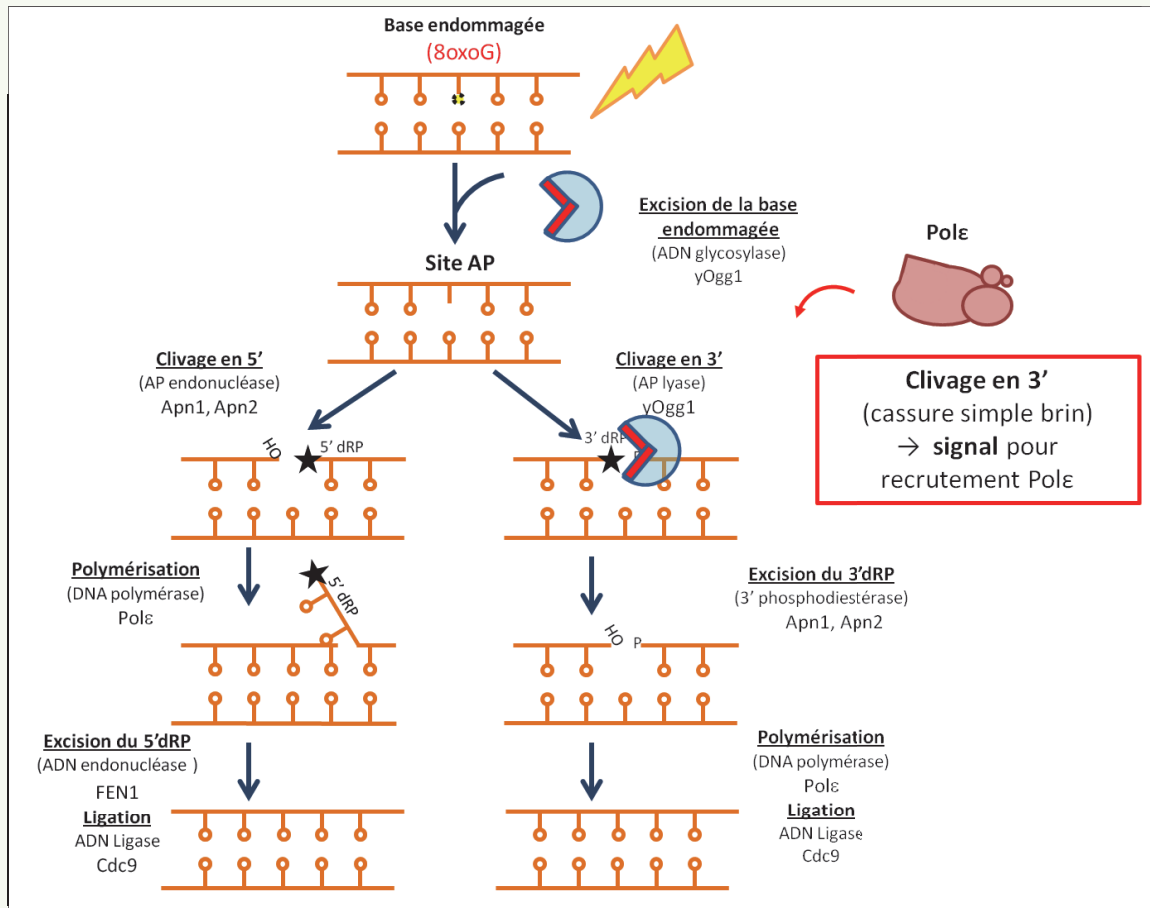
yOgg1 et du couplage de ces deux activités glycosylase et lyase sont cohérents avec une telle hypothèse.

Une stimulation du *turnover* de Ogg1 *via* son interaction physique et/ou fonctionnelle avec d'autres acteurs de la voie BER a déjà été observée chez l'Homme (voir Introduction, (HILL *et al.* 2001; VIDAL *et al.* 2001; MARSIN *et al.* 2003)). Dans le cas de la stimulation du recyclage de hOgg1 par l'AP endonucléase APE1, le modèle proposé exclut toute interaction physique. hOgg1 se dissocierait spontanément du site AP généré par son activité ADN glycosylase. L'association de APE1 au site AP généré diminuerait le temps de résidence de hOgg1 sur son produit intermédiaire de réaction (le site AP stimulant ainsi son *turnover* et donc son activité ADN glycosylase) et transformant l'enzyme en une ADN glycosylase monofonctionnelle, sans activité AP lyase associée). APE1 clive ensuite le site AP en 5', générant une extrémité 5'dRP prise en charge par l'ADN polymérase β (VIDAL *et al.* 2001). Dans le cas de yOgg1, ce type de stimulation par le(s) enzyme(s) homologue(s) Apn1 (Apn2) n'est pas exclu mais ne nécessiterait pas d'interaction physique entre les deux partenaires. L'effet de yPol2 (N-term) sur l'activité de yOgg1 est cependant très différent de celui de APE1 sur hOgg1. En effet, yPol2 ne stimule pas l'activité ADN glycosylase comme le fait APE1 mais l'activité AP lyase et le couplage Glycosylase/Lyase.

Il a été montré par ailleurs que la protéine d'échafaudage XRCC1 stimulerait l'activité d'excision de la 8-oxoG par hOgg1 *via* une interaction physique avec cette-dernière (effet similaire à APE1 avec une interaction physique). XRCC1 stabiliserait hOgg1 au niveau du site AP généré et permettrait d'induire sa dissociation au moment de la reconnaissance du site AP par APE1 (MARSIN *et al.* 2003). XRCC1 et APE1 agirait donc de concert pour stimuler le *turnover* de hOgg1 dans un modèle où cette dernière agirait comme une ADN glycosylase monofonctionnelle. De ce point de vue, l'effet de yPol2 (N-term) sur l'activité lyase de yOgg1 ne peut donc être assimilé à celui de XRCC1 sur l'activité ADN glycosylase hOgg1.

Chez l'Homme, alors que XRCC1 et APE1 interagissent avec hOgg1 pour stimuler son activité ADN glycosylase, il a récemment été montré que la protéine PARP-1 (pour « poly(ADP-ribose) polymerase 1 ») interagit physiquement avec hOgg1 pour à l'inverse inhiber son activité catalytique (NOREN HOOTEN *et al.* 2011). La protéine PARP-1 qui est un senseur des cassures simple brin et agit dans la voie LP-BER chez l'Homme, contrebalancerait ainsi l'effet stimulant de XRCC1 et APE1. Etant donné que les protéines XRCC1 et PARP-1 n'existent pas chez *S. cerevisiae*, on peut imaginer que c'est Pol ϵ qui

A



B

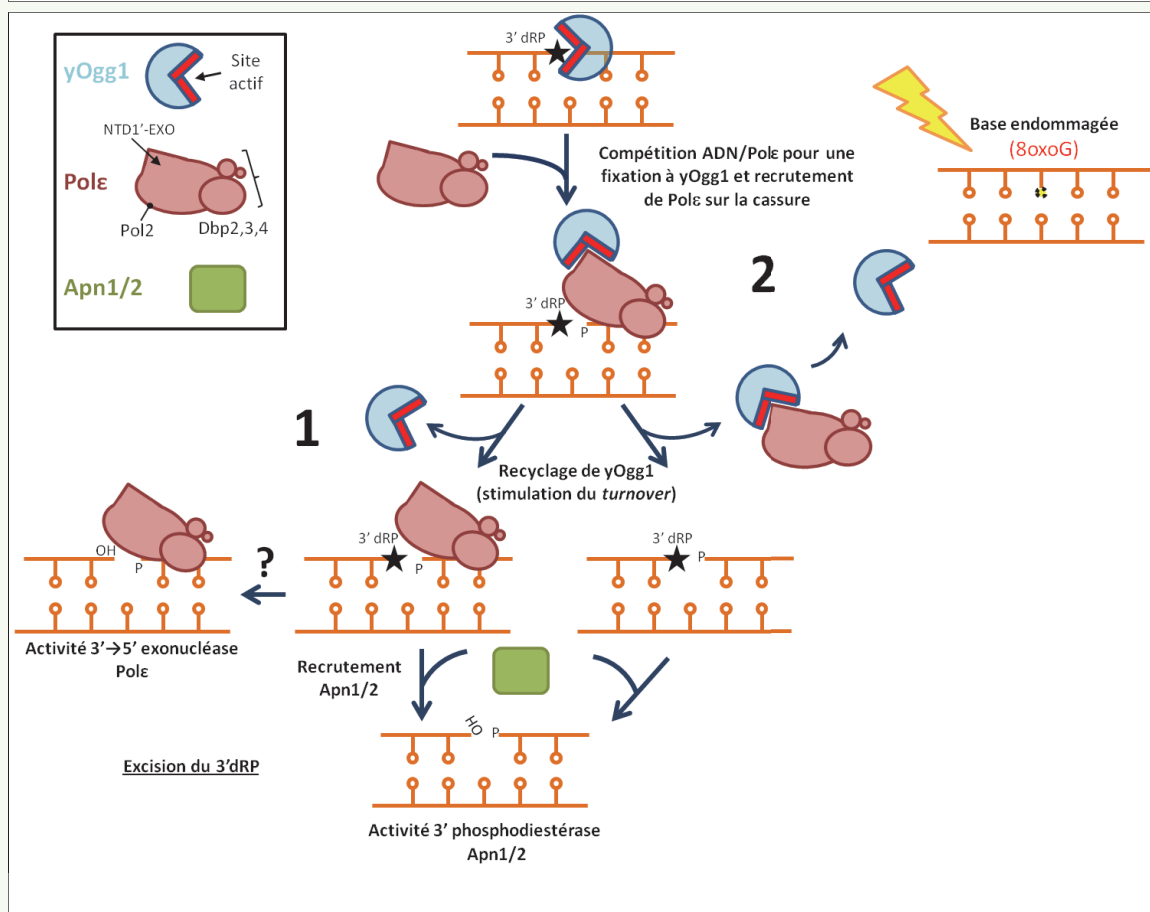


Figure 42 Proposition d'un modèle fonctionnel de l'interaction γ Ogg1/Polé dans la voie BER de *S. cerevisiae*
A Voie BER chez la levure *S. cerevisiae* **B** Voie supplémentaire proposée du BER de levure impliquant une interaction γ Ogg1/Polé et déclenchée par le clivage en 3' du site AP par γ Ogg1.

assureraient un rôle « similaire » sans être complètement équivalent à ces deux protéines dans la levure. L'effet de γ Pol2 revient à favoriser la formation d'une cassure simple-brin catalysée par γ Ogg1 en lieu et place d'une 8-oxoG. La toxicité de la cassure simple-brin serait contrecarrée par la fixation de Pol ϵ sur la cassure. Le clivage par γ Ogg1 en 3' du site AP (cassure simple) serait (à l'image de la PARP-1) un signal pour l'interaction de Pol ϵ à la cassure, qui servirait ensuite de « plateforme » (à l'image de XRCC1 et de PARP-1) pour le recrutement de protéines en aval comme Apn1 (Apn2).

Du fait de la compétition observée entre γ Pol2C et l'ADN pour une fixation à γ Ogg1 plusieurs scénarios sont possibles quant à la fixation de Pol ϵ sur le complexe. Néanmoins, au vu de l'existence d'une interaction physique forte entre γ Pol2 (N-term) et γ Ogg1 et du fait que γ Ogg1 soit apparemment bien plus affine de l'ADN que le fragment γ Pol2C (voir Résultats II.C), nous privilégions l'hypothèse selon laquelle un complexe ternaire transitoire Pol ϵ / γ Ogg1/ADN_{produit} serait formé suite au recrutement de Pol ϵ (**Figure 42B**). Ce serait le temps de résidence long de γ Ogg1 sur son produit final de réaction (cassure simple-brin) qui permettrait l'action de Pol ϵ . Deux situations sont alors envisageables : (i) la fixation de Pol ϵ pourrait induire un changement conformationnel de γ Ogg1 tel que cette dernière est libérée du complexe ternaire de sorte qu'elle puisse de nouveau agir au niveau d'une base lésée ou d'un site AP (augmentation du *turnover* de γ Ogg1, qui peut aussi être dû à une plus forte affinité de Pol ϵ pour l'ADN comparé à celui de γ Ogg1) (voie 1, **Figure 42B**) ou, (ii) la fixation de Pol ϵ à γ Ogg1 *in vivo* est telle qu'elle induit un détachement de l'ADN du complexe γ Ogg1/Pol ϵ (voie 2, **Figure 42B**). Dans le 1^{er} cas (i), le relargage de γ Ogg1 laisse Pol ϵ seule sur l'ADN, qui contient une extrémité 3'-dRP. La littérature n'ayant jamais fait état de l'existence d'un substrat de type 3'-dRP pour les ADN polymérases à activité 3'→5' exonucléase, il est peu probable que Pol ϵ digère cette extrémité pour générer un 3'-OH qu'elle utilisera par la suite dans son activité de polymérisation du brin lésé. Cependant, nous pouvons imaginer que la présence de Pol ϵ permet le recrutement des AP endonucléases dont le 3'-dRP est substrat (**Figure 42B**). Il serait intéressant d'utiliser ce substrat 3'dRP dans un test d'activité 3'→5' exonucléase de notre fragment γ Pol2C (ou au mieux avec la protéine γ Pol2 entière) afin de vérifier notre hypothèse. Dans le 2^{ème} cas (ii), l'extrémité 3'dRP est laissée libre par le relargage du complexe γ Ogg1/Pol ϵ , qui permet l'action en aval des AP endonucléases (Apn1/Apn2). Globalement, ce modèle confère à Pol ϵ un rôle de stimulation du *turnover* de γ Ogg1 et de plateforme de recrutement au niveau d'une cassure simple-brin.

Evidemment, nous n'avons pas d'explication claire pour expliquer que ce type d'interaction soit propre à la protéine Ogg1 et ne soit pas nécessaire par exemple à d'autres ADN glycosylases bi-fonctionnelles telles que Ntg1 et Ntg2 (nous n'avons pas observé de « double-hybride » positif entre ces protéines et γ Pol2). Dans ces derniers cas, il faut donc admettre que les AP endonucléases sont recrutées pour nettoyer l'extrémité 3'-bloquée sans l'aide de Pol ϵ afin d'engager la synthèse réparatrice avec Pol ϵ . Néanmoins, ce type d'interaction entre une ADN glycosylase et une ADN polymérase a déjà été mis en évidence chez certains virus tels que le cytomégalo virus humain (ou HCMV pour « human cytomegalovirus ») où l'uracil-ADN glycosylase ULL114 interagit physiquement avec la sous-unité catalytique UL54 de la HCMV ADN polymérase (STRANG and COEN 2010). De même, la sous-unité catalytique UL30 de l'ADN polymérase du virus de l'herpès HSV-1 (pour « herpes simplex virus 1 ») interagit avec son uracil-ADN glycosylase UL2 (BOGANI *et al.* 2010). Dans les deux cas, il est proposé que ces ADN glycosylases et polymérases agissent en concert dans la voie BER de ces virus respectifs. Aussi, bien que préliminaires, ces résultats laissent présager d'une implication possible de l'interaction γ Ogg1/ γ Pol2 dans la voie BER de *S. cerevisiae* mais également à d'autres niveaux de la cellule.

A supposer que cette interaction soit conservée chez l'Homme, nous pouvons également imaginer une action conjointe de hOgg1 et Pol ϵ au niveau du BER dans le contexte pathologique de la Chorée de Huntington. Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par une élongation de triplets CAG répétés particulièrement abondants dans le striatum. hOgg1 serait directement impliquée dans l'initiation de cette élongation de triplets (voir Introduction, (KOVTON *et al.* 2007)). Néanmoins, la seule présence et/ou activité de hOgg1 ne suffit pas à expliquer le détournement pathologique du BER en faveur de ce mécanisme d'élongation. En effet, des patients atteints de la Chorée de Huntington et portant l'allèle *OGG1*^{326C} (qui code pour une forme moins active de l'enzyme et/ou plus sensible à l'oxydation, (BRAVARD *et al.* 2009)) présentent un nombre plus importants de triplets CAG répétés que des patients homozygotes pour l'allèle sauvage *OGG1*^{326S} (COPPEDE *et al.* 2010). Aussi, il est proposé que le mécanisme par lequel hOgg1 initierait l'élongation des triplets répétés CAG se ferait bien *via* la réparation de lésions 8-oxoG présentes au niveau de ces séquences répétées mais, dépendrait de la composition du triplet de nucléotides répété, de la position de la base endommagée et, très relevant au vu de

l'interaction que nous avons mise en évidence, de la présence ou de l'absence d'autres enzymes du BER (DEREVYANKO *et al.* 2012). La stœchiométrie des différentes protéines du BER expliquerait d'ailleurs que ces répétitions de triplets CAG soient plus abondantes dans le striatum comparé au cervelet (GOULA *et al.* 2009). Dans ce contexte, nous pourrions imaginer que hOgg1 intervienne dans la voie « long-patch » du BER (LP-BER) et que le mécanisme par lequel l'enzyme initie l'expansion de triplets CAG consiste à un moment donné dans une interaction physique stable ou transitoire avec l'ADN polymérase ϵ . L'accumulation importante de Pol β dans le striatum a laissé suggérer un modèle dans lequel Pol β agirait dans la voie LP-BER en générant un déplacement de brin après l'excision par hOgg1 d'une lésion oxydative de type 8-oxoG dans une région de l'ADN très riche en triplets CAG. L'extrémité 5'-flap ainsi générée ne serait pas prise en charge (du fait du faible taux d'endonucléase FEN1 dans le striatum) ce qui conduirait à la formation d'une structure en boucle, stable, de type épingle à cheveux (« hairpin ») et donc à l'élongation du brin d'ADN réparé (GOULA *et al.* 2009; DEREVYANKO *et al.* 2012). Du fait de l'existence d'une interaction physique entre hOgg1 et Pol ϵ , nous pourrions de la même façon imaginer que le déplacement de brin à l'origine de l'expansion des triplets répétés soit initié par Pol ϵ . Un élément en faveur de cela serait un enrichissement de Pol ϵ dans le striatum comparé au cervelet par exemple. Evidemment, ce détournement pathologique du BER passant par Ogg1 et Pol ϵ conduisant à des insertions et/ou délétions ne trouve pas d'équivalent dans la levure même si des séquences répétées de ce type doivent également exister dans certains gènes de levure.

III.B.2. Action conjointe de Pol ϵ et γ Ogg1 aux télomères

Au niveau des régions chromosomiques riches en guanines et particulièrement sensibles à l'oxydation que sont les télomères, nous pouvons imaginer une action conjointe de Pol ϵ et γ Ogg1 non plus uniquement dans le cadre du BER mais dans le phénomène de sénescence répllicative par exemple. Le raccourcissement des télomères au niveau des cellules somatiques peut s'accompagner de l'arrêt de leur prolifération et de leur maintien dans un état métaboliquement viable appelé sénescence répllicative. La levure *S. cerevisiae* est un très bon modèle d'étude de cet état considéré comme une voie majeure de suppression de tumeurs (TEIXEIRA 2013). Il a récemment été montré que Pol ϵ jouerait un rôle

primordial dans le maintien de la sénescence réplivative, en agissant de façon synergique avec la nucléase Exo1 (DESHPANDE *et al.* 2011). Dans le modèle proposé, c'est l'alternance entre une « résection » et une « resynthèse » de l'ADN aux télomères qui permettrait le maintien de cet état de sénescence. Cette alternance se ferait en outre par l'action de la protéine de réplication Mrc1 (qui interagit physiquement avec Polε) qui aurait l'effet opposé en permettant à la cellule d'échapper à cet état. La phosphorylation de Mrc1 pendant la sénescence induirait sa dissociation partielle de la protéine Polε et ainsi l'inhibition de l'activité de polymérisation de l'ADN de cette dernière (LOU *et al.* 2008; DESHPANDE *et al.* 2011). Or la protéine γOgg1 s'avère également être primordial à la régulation de la taille des télomères chez la levure (LU and LIU 2010). Une délétion de γOgg1 induit en effet l'accumulation de guanines oxydées aux télomères ainsi que leur rallongement anormal du fait de l'interférence de ces guanines oxydées avec le complexe protéique en charge de la régulation de la taille des télomères (LU and LIU 2010). Nous pouvons donc imaginer que dans cette région télomérique de l'ADN fortement pourvue en séquences répétées riches en guanine, les protéines γOgg1 et Polε puissent être co-localisées et agir conjointement dans le maintien de la sénescence réplivative par exemple. Nous nous sommes posé la question de l'effet de γPol2 sur l'activité de γOgg1 (voir Résultats II.C.) mais il est tout aussi possible que la finalité de cette interaction consiste à l'inverse en un effet de γOgg1 sur l'activité de γPol2. Nous pouvons imaginer qu'à l'image de Mrc1, l'interaction physique de γOgg1 avec Polε puisse être régulée de sorte que l'association ou la dissociation de γOgg1 induise une inhibition ou une activation de l'activité ADN polymérase de Polε.

III.B.3. Interaction γOgg1/Polε et réplication de l'ADN

L'ADN polymérase réplivative Polε participe avec Polα et Polδ à la fourche de réplication pendant la réplication de l'ADN eucaryote (KUNKEL and BURGERS 2008). Lors de la réplication, Polα est en charge de la synthèse, sur le brin discontinu, de l'amorce requise à l'origine et au début de chaque fragment d'Okasaki (HUBSCHER *et al.* 2002), Polδ réplique le brin discontinu pendant que Polε assure celle du brin continu (PURSELL *et al.* 2007; NICK McELHINNY *et al.* 2008). Comme nous l'avons mentionné précédemment, Polε est une enzyme multi-domaine composée de différentes sous-unités codées par différents gènes : une sous-unité catalytique γPol2 et trois petites sous-unités accessoires : Dpb2, Dpb3 et

Dpb4. La fourche de réplication étant dynamique, sa régulation est en effet critique. La sous-unité catalytique γ Pol2 contient en plus de son domaine de polymérisation de l'ADN, un domaine d'activité 3'→5' exonucléase en charge de corriger les erreurs incorporées dans le brin nouvellement synthétisé (MORRISON *et al.* 1990). γ Pol2 est codée par un gène essentiel dont la délétion n'est pas viable pour la cellule. Un de ces mutants *γ Pol2-4* déficient dans son activité 3'→5' exonucléase est viable mais associé à une forte accumulation d'erreurs répliquatives (WILLIAMS *et al.* 2013).

Les erreurs répliquatives de Pol ϵ sont prises en charge par les différents composants du MMR qui protègent ainsi les cellules de leurs effets délétères (HARRINGTON and KOLODNER 2007). De même, le MMR prend en charge les erreurs répliquatives liées à une déficience de l'activité exonucléase de Pol δ (mutant Pol3-01), en charge de la réplication du brin discontinu. Les mutants *Pol2-4* et *Pol3-01* présentent des activités similaires *in vitro* et bien que générant un spectre de mutations différents, dans les deux cas celui-ci est constitué dans sa majorité de mésappariements de bases et de modifications du cadre de lecture, qui sont les substrats majoritairement pris en charge dans la voie MMR (WILLIAMS *et al.* 2013). Néanmoins, le taux de mutations présent dans une souche *Pol3-01* est 5 à 30 fois plus important que celui mesuré dans une souche *Pol2-4* (MORRISON and SUGINO 1994; GREENE and JINKS-ROBERTSON 2001; PAVLOV *et al.* 2004). Le fait que le MMR répare préférentiellement les erreurs du brin discontinu (PAVLOV *et al.* 2003; HOMBAUER *et al.* 2011) est en contradiction avec cette observation selon laquelle la perte d'activité exonucléase de Pol δ conduirait à un taux plus élevé de mutations que le mutant exonucléase de Pol ϵ . Il a été proposé que cette « contradiction » soit en réalité dû au fait que Pol ϵ « répliquerait moins de génome » que Pol δ (PAVLOV and SHCHERBAKOVA 2010). Pol δ serait capable de « sauver » la synthèse du brin continu au niveau de la fourche de réplication dans le cas de certaines lésions de l'ADN ou en réponse à des erreurs de réplication de Pol ϵ par exemple. Cependant, ayant mis en évidence une interaction physique entre Pol2 et γ Ogg1, une protéine de réparation du BER, une autre hypothèse serait d'imaginer, comme cela a déjà été suggéré ((SHCHERBAKOVA *et al.* 2003)), que Pol ϵ et Pol δ répliquent en quantité similaire le génome de levure mais avec une « précision différente » du fait de l'utilisation de facteurs accessoires (brin ou polymérase spécifiques) ou de facteurs de réparations particuliers qui diminuerait le taux de mutations générés par Pol ϵ (ou qui pourraient générer des mutations supplémentaires dans le cas de Pol δ). Dans ce contexte, nous pouvons imaginer une implication de γ Ogg1, *via* son

interaction directe avec la sous-unité catalytique de Pol ϵ , et plus généralement une implication de la voie BER dans une action de prévention ou de prise en charge des lésions 8-oxoG liées à l'action de Pol ϵ . Encore une fois, il serait intéressant de se poser la question de l'effet de yOgg1 sur yPol ϵ : fidélité, processivité, activités polymérase et/ou exonucléase, prises en charge de lésions, sont autant de domaines sur lesquelles yOgg1 pourrait agir. Pour exemple, la délétion des petites sous-unités non-essentiels Dpb3 et Dpb4, impliquées dans la processivité de Pol ϵ (ASTURIAS *et al.* 2006), induit une augmentation du taux de mutations et donc d'erreurs dans la synthèse, qui ne sont pas prises en charge par les protéines de la voie MMR, contrairement à ce qui se passe pour le mutant exonucléase *Pol2-4* (AKSENOVA *et al.* 2010) . Cela confirme l'existence de voies et/ou de facteurs supplémentaires encadrant l'action de Pol ϵ , notamment au niveau de la fourche de réplication.

Dans ce sens et au vu de l'existence d'une interaction yOgg1/yPol2, il serait possible d'imaginer que la réplication par Pol ϵ du brin continu de l'ADN soit couplée à la voie de réparation BER chez la levure *S. cerevisiae*. L'interaction de yPol2 avec yOgg1 permettrait de cibler cette dernière aux dommages de l'ADN au moment de la réplication. yOgg1 pourrait agir en amont ou en aval de la fourche de réplication. Dans le cas où l'ADN glycosylase interviendrait juste avant le passage de la fourche de réplication, elle permettrait le nettoyage de l'ADN des lésions 8-oxoG possiblement présentes et ainsi diminuer le risque de mutations (situation canonique). Au contraire, dans une action post-réplivative, yOgg1 serait en charge de la réparation des paires 8-oxoG : C néoformées par Pol ϵ .

L'interaction yOgg1/yPol2 permettrait de cibler l'ADN glycosylase aux dommages de l'ADN et de coupler la réparation des bases oxydées de l'ADN à la réplication du matériel génétique. Ainsi, les protéines de réparation telles que yOgg1 bénéficieraient de l'ouverture de la chromatine au moment du passage de la fourche de réplication, permettant au final une meilleure accessibilité aux lésions. Un modèle allant dans le même sens a été proposé pour la protéine humaine hNeil1 et pour la protéine UDG du virus de l'herpès (HSV-1). hNeil1 et UDG sont toutes les deux des ADN glycosylases (bi- et monofonctionnelles, respectivement) (BOGANI *et al.* 2010; HEGDE *et al.* 2013). Dans le cas de hNeil1 (une ADN glycosylase humaine impliquée dans l'élimination des pyrimidines oxydées telle que la 5-hydroxyuracile, 5-OHU), une enzyme particulièrement activée lors de la phase S, il a été démontré que l'enzyme peut être associée au réplisome. Dans cette situation, elle peut bloquer la progression de la fourche de réplication médiée par Pol δ au moment où le

complexe réplivative rencontre une 5-OHU dans le brin matrice. hNeil1 reconnaît la lésion mais l'enrobage du brin matrice par RPA (ssDNA-binding replication protein A, équivalent à la protéine ssb des bactéries) ne lui permet pas d'exciser le dommage et donc d'induire une cassure double-brin. La reconnaissance de la 5-OHU par hNeil1 provoquerait cependant un arrêt de la réplication et une régression de fourche pour permettre la réparation de la lésion dans une structure double-brin. Dans le cas de la réplication du génome du virus HSV-1, lorsque le complexe répliatif rencontre un uracile (U) dans le brin matrice, l'interaction entre l'UDG et la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase du virus provoquerait un arrêt de la réplication mais également un décrochage de l'ADN polymérase. Ce blocage de la réplication ne serait pas dépendant de l'activité enzymatique de l'UDG virale mais seulement de sa capacité à reconnaître le U dans le brin matrice. Ces deux exemples montrent une interaction entre le réplisome et une ADN glycosylase dont la finalité semble être de coupler réplication et réparation dans une stratégie de réparation pré-réplivative. Par analogie avec ces deux situations, nous pouvons proposer un modèle similaire pour une interaction fonctionnelle γ Pol2/ γ Ogg1 qui reste à documenter expérimentalement (**Figure 43**). Lorsque que le système répliatif ($\text{Pol}\epsilon/\text{Pol}\delta$ de *S. cerevisiae*) rencontre une 8-oxoG dans le brin matrice, 2 événements peuvent se produire : (i) soit le système passe à travers la lésion en mettant un A en face de la 8-oxoG (voie mutagène), (ii) soit le système marque une pause et un remplacement d'ADN polymérase ($\text{Pol}\epsilon/\text{Pol}\delta \rightarrow \text{Pol}\eta$) opéré pour passer de façon fidèle la 8-oxoG (voie fidèle) (**Figure 9**). Nous pouvons imaginer que γ Ogg1 complexée à γ Pol2 soit responsable d'un arrêt de la réplication au niveau d'une 8-oxoG rencontrée dans le brin matrice. A ce stade, deux scénarios peuvent être proposés: (i) à l'image de Neil1 chez l'homme, cette pause dans la réplication est suivie d'une régression de fourche et γ Ogg1 déjà associée à $\text{Pol}\epsilon$ est mobilisée par celle-ci pour éliminer la 8-oxoG opposé à un C dans une structure double-brin réhybridée permettant ensuite un redémarrage de la réplication après réparation (réparation pré-réplivative, voie 1 **Figure 43**) et (ii) γ Ogg1 (associée à $\text{Pol}\epsilon$) reconnaît la 8-oxoG (sans la métaboliser, l'enzyme n'étant pas active sur l'ADN simple-brin) dans le brin matrice et provoquerait un décrochage de $\text{Pol}\epsilon/(\text{Pol}\delta)$ facilitant ainsi le changement d'ADN polymérase ($\text{Pol}\eta$) pour passer à travers la 8-oxoG de façon fidèle (pas de réparation de la 8-oxoG, voie 2 **Figure 43**). Le scénario proposant une réparation pré-réplivative pourrait être évaluée au moins *in vitro* avec un hémiduplexe d'ADN contenant une 8-oxoG dans la région simple-brin et l'apoenzyme Pol2 entière (ou tout du moins, un

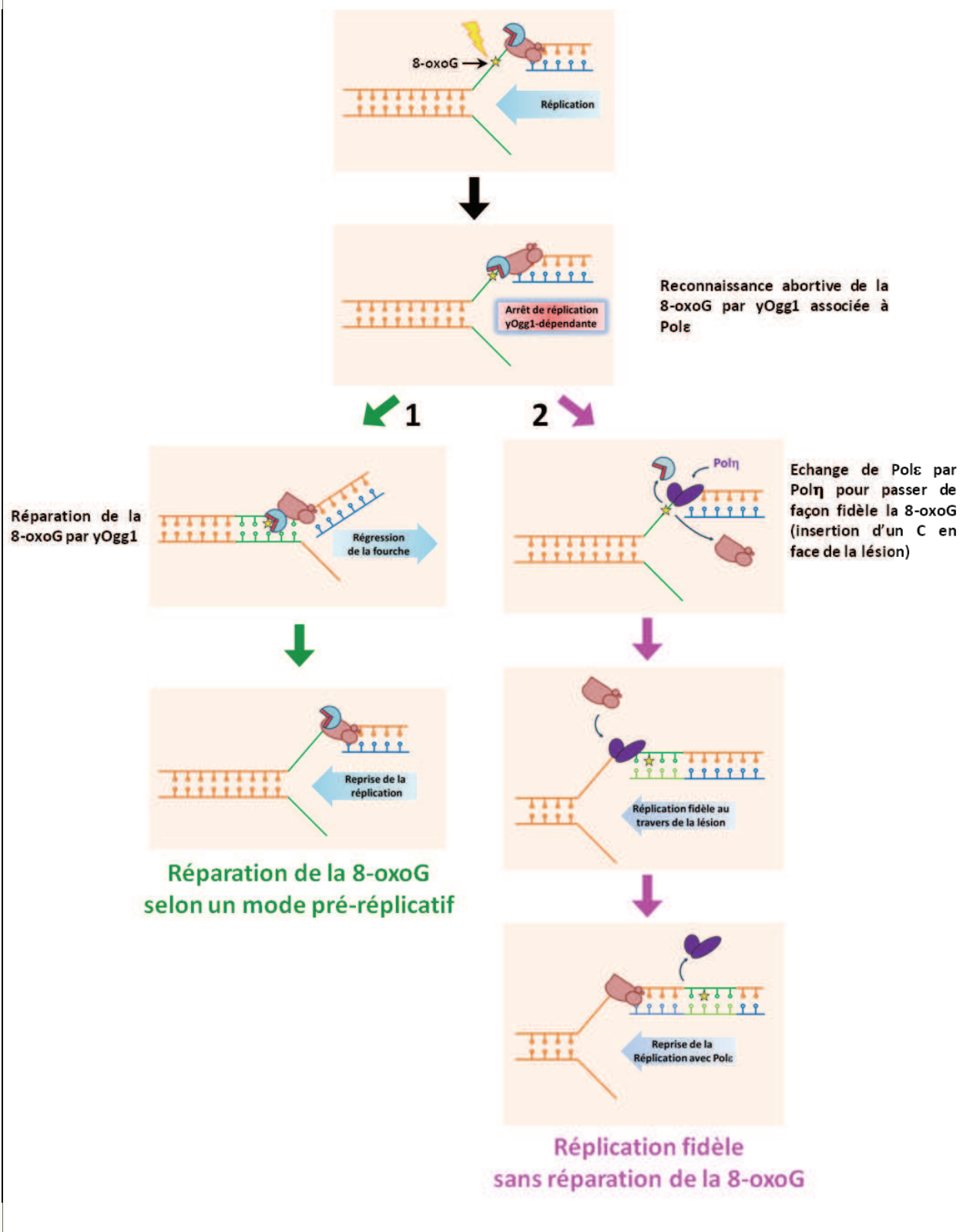


Figure 43 Proposition d'un modèle impliquant une interaction fonctionnelle entre yOgg1 et Polε, jouant un rôle dans la réplication de l'ADN au niveau d'une lésion 8-oxoG.

fragment de Pol2 portant les 2 activités de l'enzyme, 5'→3' polymérase et 3'→5' exonucléase) ou l'holoenzyme Polε (incluant les 3 sous-unités accessoires) en présence ou non d'autres facteurs du réplisome tels que RPA, PCNA, RF-C etc.

III.C. Perspectives de recherche

III.C.1. Poursuite de l'étude biochimique

L'existence d'un 3^{ème} partenaire dans l'interaction yOgg1/Pol2 pourrait ne pas être nucléique, comme nous le suggérons ici, mais bien protéique. Pour vérifier cela, il faudrait évaluer l'interaction physique entre les deux protéines produites dans la levure (yOgg1 sauvage ou de type mutants catalytiques et yPol2 sauvage ou yPol2-4) par des expériences de co-immunoprécipitation (Co-IP). Ces-dernières seraient réalisées avec le système « FLAG-immunoprecipitation kit » de Sygma-Aldrich. S'il existe un 3^{ème} partenaire protéique, il pourrait être identifié dans l'immuno-précipitat par une analyse par spectroscopie de masse (MaldiTof et fragmentation). Dans la même analyse, il serait possible d'évaluer l'état de modification post-traductionnel des protéines yOgg1 et yPol2, qui pourrait jouer un rôle dans l'interaction (la protéine yOgg1 produite en système bactérien pour les expériences de « pull-down » ne possède pas ces modifications) et du même coup démontrer que l'interaction peut également se faire avec la protéine Pol2 entière (cette possibilité ne pouvant être évaluée par le test de « double-hybride » tel que nous l'avons mis en place, voir Résultats II.B.1.a indiquant que yPol2C est négatif en « double-hybride »).

Les études fonctionnelles *in vitro* (effet sur l'activité de yOgg1 et sur l'interaction avec l'ADN) initiées dans ces travaux de thèse restent encore préliminaires et fragmentaires. Elles ont cependant le mérite d'avoir mis-en-place un certain nombre d'essais biochimiques qu'il nous faut maintenant exploiter le mieux possible.

III.C.2. Approche génétique

Dans l'avenir, il serait intéressant d'initier une étude génétique approfondie dans la levure *S. cerevisiae* afin d'approcher au mieux le sens physiologique de cette interaction. *POL2* étant un gène essentiel à la survie de la levure, nous avons comparé, dans des expériences préliminaires, la fréquence et la nature des mutations des souches de levure

ΔOgg1, *Pol2-4* et *ΔOgg1/Pol2-4*. Le variant *γPol2-4* (version de type *γPol2A*) s'étant avéré négatif en « double-hybride », il nous paraît intéressant d'étudier l'effet de cette mutation associée à une déficience en *γOgg1*. Cette approche génétique est en cours mais les premiers résultats sont trop préliminaires pour les exposer dans ce mémoire. Cette exploration sera également étendue à l'étude d'autres mutants viables tel que *Pol2-16*, un mutant ayant perdu une grande partie de son domaine N-terminal et dépourvu d'activité polymérase et exonucléase (OHYA *et al.* 2002).

III.C.3. Approche structurale

Etant donné le savoir-faire spécifique de notre équipe en biologie structurale par diffraction ou diffusion des rayons X (cristallographie et SAXS) il serait dommage de ne pas ajouter à ce projet une approche structurale. Ce type d'étude nécessite néanmoins de produire en quantités suffisantes les protéines d'intérêts. Cela nécessiterait une optimisation de la taille du fragment de *γPol2* permettant une bonne interaction avec *γOgg1* et suffisamment stable pour mener une étude structurale par cristallographie et en solution par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Nous pouvons également envisager des expériences d'ITC (pour « Isothermal titration calorimetry ») afin d'étudier le mode d'interaction entre les deux protéines et l'affinité de *γOgg1* pour *γPol2*.

IV. Matériel et méthodes

IV.A. Partenaires d'interaction : constructions plasmidiques et protéines

IV.A.1. 1^{er} partenaire : Ogg1

IV.A.1.a. Plasmides utilisés : pET30a et pTrc99

Caractéristiques

Le plasmide principal utilisé est le plasmide pET30a (Novagene). Il comprend un gène de résistance à la kanamycine (permettant la sélection de bactéries transformées) et le gène *LacI* codant pour le répresseur de l'opéron lactose. Il compte également une région de clonage avec : un promoteur T7 permettant la fixation de l'ARN polymérase, et l'opéron lactose sur lequel se fixe le répresseur bloquant ainsi l'ARN polymérase. Un cadre de lecture ouverte codant pour deux « étiquettes His » (en position C- et N-terminale des sites de clonage) et une étiquette S-tag (épitope permettant de purifier ou détecter une protéine recombinante) est aussi présente. Au niveau du site multiple de clonage a été clonée la phase ouverte du gène *yOGG1* de *S. cerevisiae* (sites EcoR I et Hind III) ou du gène *hOGG1* humain (sites EcoR I et Hind III), sous la dépendance du promoteur T7. Ces gènes codent respectivement pour les protéines de type sauvage 6His-yOgg1 et 6His-hOgg1, obtenues dans notre cas par l'expression des plasmides recombinants pET30a-yOgg1 et pET30a-hOgg1.

L'autre plasmide utilisé pour le clonage de *OGG1* est le plasmide pTrc99 (Pharmacia, fourni par Serge Boiteux). Il comprend un gène de résistance à l'ampicilline et le gène *LacI* codant pour le répresseur de l'opéron lactose. Au niveau du site multiple de clonage a été clonée la phase ouverte d'une partie du gène *yOGG1* (résidus 1 à 332) de *S. cerevisiae*, sous la dépendance du promoteur T7. Cet ORF code pour la protéine tronquée en C-terminale yOgg1-ΔC44 (élimination de 44 résidus en C-term par rapport à la protéine sauvage), obtenue dans notre cas par l'expression du plasmide recombinant pTrc99- yOgg1-ΔC44-6His (« étiquette His » en C-terminal).

Transformation des bactéries et extraction plasmidique

Les plasmides recombinants obtenus à partir des plasmides pET30a et pTrc99 (pET30a-yOgg1, pET30a-hOgg1, pTrc99- yOgg1-ΔC44-6His...) sont ensuite utilisés pour

transformer des bactéries ultra compétentes XL1-Blue (Stratagene). Toutes les étapes jusqu'à l'extraction du plasmide recombinant sont réalisées en milieu stérile. Nous ajoutons 100ng de plasmide recombinant (ou de mélange de digestion par DpnI dans le cas d'une mutagenèse dirigée, voir paragraphe suivant) à 50µL de solution de bactéries ultra compétentes. La transformation des cellules par choc thermique est alors réalisée dans les conditions suivantes : incubation de 30min à 4°C, de 45s à 42°C et de 2min à 4°C. Ensuite, 0.5mL de milieu complet SOC est ajouté et l'ensemble est incubé à 37°C sous agitation (225-250 rpm) pendant 1h. 300µL, 100µL et 50µL de la suspension bactérienne obtenue sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB/agar/kanamycine ou ampicilline (100µg/mL), suivi d'une incubation sur la nuit à 37°C. Une colonie isolée est alors reprise dans 60mL de milieu LB/kanamycine ou ampicilline (100µg/mL final). Arrivée à saturation ($DO_{600nm} > 2.1$), la culture est centrifugée (4500g, 30min à 4°C) et le surnageant est éliminé. L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit Nucleobond® AX (Macherey Nagel, dont le principe consiste à fixer l'ADN plasmidique sur une résine de silice (alors que les autres contaminants sont éliminés) et à l'éluer par la suite. L'intégrité des différents plasmides recombinants a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0.8% et leur concentration a été estimée au nanodrop (mesure DO_{260nm}). La nature des plasmides a été vérifiée par séquençage (Société MWG/operon, Allemagne).

IV.A.1.b. Mutagenèse dirigée

A partir de ces plasmides recombinants nous avons été amenés à réaliser un certain nombre de mutants ponctuels de γ Ogg1 et γ Pol2 (voir résultats partie II.B). Cette mutagenèse dirigée a été réalisée grâce au système commercial « Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit » (Stratagene). Son principe repose sur la réplication, avec une grande fidélité, de l'ADN double brin d'un vecteur contenant l'insert d'intérêt, à l'aide de l'ADN polymérase Pfu turbo (Stratagene) et de deux amorces portant la mutation à insérer. Les amorces correspondant aux différents mutants γ Ogg1 et γ Pol2 (Eurogentec) sont les mêmes pour toutes les constructions plasmidiques. Par l'étape d'extension de la PCR, nous obtenons une copie circulaire double brin mutée du vecteur contenant l'insert. Il faut ensuite digérer le vecteur ayant servi de matrice pour sélectionner le vecteur mutant, pour cela le produit de la mutagenèse est soumis à une digestion par l'enzyme DpnI (Fermentas) qui a pour caractéristique de digérer uniquement les brins méthylés et hémiméthylés (les

plasmides matrices sont issus d'une préparation bactérienne et donc sensibles à la digestion par DpnI, contrairement aux plasmides contenant la mutation qui ont été synthétisés *in vitro*). C'est ce même principe de mutagenèse par Quick Change qui nous a permis de construire un certain nombre de mutants yOgg1 à partir des plasmides pGBT9, pAS2Δ et pACT2 (utilisés en « double-hybride »).

IV.A.1.c. Production des protéines Ogg1 recombinantes

6His-yOgg1, 6His-hOgg1 et leurs mutants (issues du plasmide pET30a)

La souche d'expression bactérienne utilisée est Rosetta 2 (DE3). Elle dérive de la souche BL21 déficiente en protéases *lon* et *ompT* (protéases qui catalysent l'endoprotéolyse des protéines recombinantes ou altérées de la bactérie). Ce type de bactérie lysogène du phage λ, porte sur son chromosome une copie du gène codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7, sous le contrôle du promoteur lac-UV5 inductible par l'IPTG. Les plasmides recombinants pET30a-yOgg1, pET30a-yOgg1-K241Q et pET30a-hOgg1 codant respectivement pour les protéines yOgg1 WT, yOgg1-K241Q (mutant yOgg1 au niveau duquel le résidu lysine 241 est remplacé par une glutamine) et hOgg1 WT, ont été utilisés pour transformer les bactéries Rosetta 2. Ces plasmides sont introduits dans les bactéries par choc thermique, comme présenté auparavant (30min à 4°C puis 45s à 42°C, 2min à 4°C et 1h à 37°C). A la suite de l'incubation à 37°C, 200μL de la suspension bactérienne obtenue sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB agar additionné de kanamycine (kan) et de chloramphénicol (cam) (100μg/mL) et incubés sur la nuit à 37°C. Un clone isolé sur boîte LB/agar/kan/cam est prélevé dans le but d'ensemencer une pré-culture de 200mL de LB/kan/cam (100μg/mL) stérile. Après une nuit à 37°C sous agitation (225-250rpm), la culture saturée est utilisée pour ensemencer une culture de 600mL (placée dans un erlen de 5L pour une oxygénation optimale) de LB/kan/cam 100μg/mL, 0.5M sorbitol et 2.5 mM bétaine de sorte que la DO_{600nm} de départ soit de 0.1. La culture est placée à 37°C sous agitation et sa DO_{600nm} est mesurée au cours du temps. Lorsque la population bactérienne atteint une DO_{600nm} d'environ 1, la culture est placée à 18°C. Après homogénéisation de la température à 18°C, on induit la production de protéines avec 0.5mM IPTG. L'IPTG va induire la production de l'ARN polymérase du bactériophage T7, qui reconnaît très spécifiquement le promoteur T7 et peut alors débiter la transcription des gènes qui sont sous la

dépendance de ce-dernier. L'induction à 18°C se fait sur la nuit. Elle est arrêtée par centrifugation (30min à 5000rpm à 4°C). Les culots sont repris dans une solution de lavage (10mM Tris HCl pH8, 150mM NaCl). Après centrifugation (30min à 5000rpm à 4°C), les culots sont pesés et conservés à -20°C (soit environ 28g de bactéries à partir de 3 litres de culture).

yOgg1-ΔC44-6His et ses mutants (issues du plasmide pTrc99)

La souche d'expression bactérienne utilisée est la souche BH410 issue de *E. coli*, déficiente pour le gène *Fpg* et qui possède un gène de résistance à la kanamycine. Comme Rosetta 2, BH410 est inductible à l'IPTG. Le plasmide recombinant pTrc99-yOgg1 (et les mutants yOgg1 réalisés sur ce plasmide) qui code pour la protéine yOgg1-ΔC44-6His (et ses formes mutantes) a été utilisé pour transformer les bactéries BH410. Ces plasmides sont introduits dans les bactéries par choc thermique, comme présenté auparavant (30min à 4°C puis 45s à 42°C, 2min à 4°C et 1h à 37°C) et les clones obtenus permettent d'ensemencer 500mL de milieu de culture LB/kan/amp avec la souche recombinante (DO₆₀₀ de départ de 0.01). La culture est placée à 37°C sous agitation et sa DO_{600nm} est mesurée au cours du temps. Lorsque la population bactérienne atteint une DO_{600nm} d'environ 1, la culture est placée à 20°C. La production de protéines est induite à 1mM IPTG, à 20°C sur la nuit. Elle est arrêtée par centrifugation (30min à 5000rpm à 4°C). Les culots sont repris dans une solution de lavage (10mM Tris HCl pH8, 100mM NaCl). Après centrifugation (30min à 5000rpm à 4°C), les culots sont pesés et conservés à -20°C.

IV.A.1.d. Purification des protéines Ogg1 recombinantes

6His-yOgg1, 6His-hOgg1 et leurs mutants (issues du plasmide pET30a)

Toutes les étapes de purification des protéines yOgg1 WT, yOgg1-K241Q et hOgg1 WT ont été réalisées à 4°C et à la fin de chaque étape, la présence de la protéine est révélée par migration électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS PAGE).

(a) Lyse ménagée des bactéries

Le culot bactérien décongelé est repris dans du tampon de lyse (NaHPO₄ 50mM pH8, 300mM NaCl, BME 10mM) à raison de 10mL par gramme de bactérie, et la suspension obtenue est additionnée de lysozyme (1mg/mL), incubée 10 min dans la glace puis à 30°C

pendant 15min. Le lysat cellulaire est ensuite traité par sonication (4 cycles de 1.5min à 100% avec 1.5min d'arrêt entre chaque cycle) avant d'être centrifugé (35000rpm à 4°C pendant 2h). Le surnageant résultant, qui contient les protéines solubles, est filtré à 0.45µm. Les étapes de purification qui suivent ont nécessité l'utilisation de l'« Akta purifier » (GE Healthcare).

(b) Colonne HisTrap HP 5mL (chromatographie d'affinité)

La colonne HisTrap (5mL, GE Healthcare) contient des ions nickel accrochés à des billes de sépharose, ce qui permet une affinité pour les protéines recombinantes possédant un tag histidine, comme c'est le cas de yOgg1, yOgg1-K241Q et hOgg1 issues du plasmide pET30a. Après équilibration de la colonne dans le tampon de lyse (NaHPO₄ 50mM pH8, 300mM NaCl, BME 10mM), la fraction soluble filtrée est chargée avec un débit de 0.8mL/min. La colonne est ensuite lavée par le passage (environ 100mL) d'une solution NaHPO₄ 50mM pH8, 300mM NaCl, BME 10mM, 50mM Imidazole. Les protéines fixées sont éluées par le passage dans la colonne du tampon d'éluion NaHPO₄ 50mM pH8, 300mM NaCl, BME 10mM, 300mM Imidazole.

(c) Colonne HiLoad 16/10 SP HP

Après migration sur gel SDS PAGE, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées puis concentrées (jusqu'à un volume d'environ 5mL) à l'aide d'un concentrateur (Amicon Ultra 15®, Millipore). Lors de cette étape de concentration, on effectue un changement de tampon de notre protéine dans un tampon 10mM MES pH6, 500mM NaCl, 10mM BME et on filtre à 0.2µm la fraction protéique finale ainsi obtenue. Cette dernière est ensuite chargée sur une colonne HiLoad 16/10 SP HP (GE Healthcare, pour chromatographie Sulphopropyl Sepharose High Performance). C'est un échangeur de cations avec un grand pouvoir de séparation (lié à la petite taille de ces billes de résine). Cette étape permet de fixer les protéines chargées positivement grâce aux groupements sulphopropyls greffés à la résine. Après équilibration de la colonne dans le tampon SP de départ (10mM MES pH6, 10mM BME), la fraction protéique filtrée est chargée extemporanément avec un débit de 2mL/min. La colonne est ensuite lavée par le passage (environ 100mL) d'une solution 10mM MES pH6, 10mM BME, 100mM NaCl (qui correspond en fait à 10% du tampon

d'élution, réglage à faire sur l'Akta purifier). Les protéines fixées sont éluées par l'ajout du tampon d'élution 10mM MES pH6, 10mM BME, 1M NaCl.

(d) Dosage et stockage

Après migration sur gel SDS PAGE, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont concentrées. La protéine purifiée (6His-yOgg1, 6His-yOgg1-K241Q ou 6His-hOgg1) est conservée dans un tampon 5mM MES pH6, 500mM NaCl, 20% glycérol et 5mM BME. Elle est ensuite dosée au Nanodrop (DO₂₈₀) et par la technique de Bradford et stockée à -80°C. La masse de la protéine purifiée est systématiquement vérifiée par spectrométrie de masse.

yOgg1-ΔC44-6His et ses mutants (issues du plasmide pTrc99)

Le culot bactérien décongelé est repris dans du tampon de lyse (NaHPO₄ 50mM pH8, 250mM NaCl, 0.1mM PMSF) à raison de 10mL par gramme de bactérie, et la suspension obtenue est additionnée de lysozyme (1mg/mL), incubée 10 min dans la glace puis à 30°C pendant 15min. Après plusieurs cycles de congélation (à -80°C)/décongélation, le lysat cellulaire est traité par sonication (5 cycles de 1 min à 100% avec 1.5min d'arrêt entre chaque cycle) avant d'être centrifugé (35000rpm à 4°C pendant 2h). Le surnageant résultant, qui contient les protéines solubles, est filtré à 0.45μm et conservé à -80°C. La purification de la protéine d'intérêt à partir de cette fraction soluble est permise par l'utilisation de petites colonnes NiNTA (« NiNTA spin columns », QUIAGEN) dans lesquelles des billes de nickel vont permettre de purifier par chromatographie d'affinité les protéines taguées histidine. Cette étape est réalisée en suivant le protocole du fournisseur.

IV.A.2. 2nd partenaire : yPol2

IV.A.2.a. Plasmide utilisé : pGEX-6P2

Caractéristiques

Le plasmide utilisé est le plasmide pGEX-6P2 (GE Healthcare, fourni par H. Bénédicti). Il comprend un gène de résistance à l'ampicilline et le gène *LacI* codant pour le répresseur de l'opéron lactose. Au niveau du site multiple de clonage a été clonée la phase ouverte d'une partie du gène *POL2* (résidus 63 à 405 ou résidus 1 à 537) de *S. cerevisiae* (site EcoRI et

XhoI), sous la dépendance du promoteur T7. Ces ORF code pour les fragments yPol2A et yPol2C, respectivement et sont obtenus dans notre cas par l'expression des plasmides recombinant pGEX-6P2- yPol2A et pGEX-6P2- yPol2C (« étiquette GST » en N-terminal).

Transformation des bactéries et extraction plasmidique

Ces plasmides recombinants (ainsi que le plasmide vide pGEX-6P2) ont été utilisés pour transformer des bactéries ultra compétentes XL1-Blue (Stratagene) (voir IV.A.1.a).

IV.A.2.b. Mutagenèse dirigée

A partir du plasmide recombinant pGEX-6P2- yPol2A, nous avons été amenés à réaliser le mutant exonucléase yPol2A-4. Cette mutagenèse dirigée a été réalisée grâce au système commercial « Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit » (Stratagene) (voir IV.A.1.b).

IV.A.2.c. Production des protéines yPol2 recombinantes

Pour produire les protéines GST, GST-yPol2A et GST-yPol2C, à partir des plasmides vide, pGEX-6P2-yPol2A et pGEX-6P2-yPol2C respectivement, nous avons utilisé la souche d'expression bactérienne ArcticExpress (DE3) RIL (Stratagene). Cette souche dérive de la souche BL21 déficiente en protéases *lon* et *ompT* (protéases qui catalysent l'endoprotéolyse des protéines recombinantes ou altérées de la bactérie) et est cultivée à basse température (10 à 13°C), ce qui permet d'augmenter considérablement la solubilité des protéines produites. Elle est également désignée pour augmenter l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote dont les gènes correspondants contiennent des codons rarement utilisés chez *E.coli* (c'est le cas des fragments yPol2). Elle comporte le gène codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7, sous le contrôle du promoteur *lac* inducible par l'IPTG. Les plasmides pGEX-6P2, pGEX-6P2-yPol2A et pGEX-6P2-yPol2C sont introduits par choc thermique dans les bactéries Arctic RIL. Les clones sont cultivés dans 100mL de milieu de culture LB/ampicilline 100µg/mL/gentamycine 20µg/mL pendant une nuit à 37°C. Cette pré-culture est ensuite utilisée pour ensemercer une culture de 600mL de LB 0.5M sorbitol et 2.5 mM bétaine de sorte que la DO_{600nm} de départ soit de 0.1. La culture est placée à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la population bactérienne atteigne une DO_{600nm} d'environ 1. Puis, la culture est placée à 12°C et la production de protéines est induite à 0.5mM IPTG, à 12°C pendant la nuit. Les bactéries sont alors centrifugées (30min à 5000rpm

à 4°C) et les culots sont repris dans une solution de lavage (10mM Tris HCl pH8, 100mM NaCl). Après centrifugation (30min à 5000rpm à 4°C), les culots bactériens sont pesés et conservés à -20°C (soit environ 6g de bactéries à partir de 2 litres de culture).

IV.A.2.c. Purification des protéines γ Pol2 recombinantes

(a) Lyse ménagée des bactéries

Le culot bactérien décongelé est repris dans du tampon de lyse (PBS 1X pH7.4, 0.5mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM DTT, 0.05% triton) à raison de 10mL par gramme de bactérie, et la suspension obtenue est additionnée de lysozyme (1mg/mL) puis incubée successivement 10 min dans la glace et 15min à 30°C. Le lysat cellulaire est ensuite traité par sonication (6 cycles de 1min à 78% avec 1.5min d'arrêt entre chaque cycle) avant d'être centrifugé (35000rpm à 4°C pendant 2.5h). Le surnageant résultant, qui contient les protéines solubles, est filtré à 0.45 μ m. Les étapes de purification qui suivent ont nécessité l'utilisation de l'« Akta purifier » (GE Healthcare).

(b) Colonne GSTrap 5mL (chromatographie d'affinité)

La colonne GSTrap 4B (5mL, GE Healthcare) contient des molécules de glutathion accrochés à des billes de sépharose, ce qui permet une affinité pour les protéines recombinantes possédant un tag GST (pour « glutathione S-transferase »). Après équilibration de la colonne dans le tampon de lyse (PBS 1X pH7.4, 0.5mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM DTT, 0.05% triton), la fraction soluble filtrée est chargée avec un débit de 1mL/min. La colonne est ensuite lavée avec 100mL de tampon de lyse. Les protéines fixées sont éluées par le tampon d'élution 50mM TrisHCl pH8, 10mM glutathion réduit, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM DTT et 0.1% triton.

(c) Colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 (gel filtration)

Après migration sur gel SDS PAGE, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées puis concentrées (jusqu'à un volume d'environ 2mL) à l'aide d'un concentrateur (Amicon Ultra® 30kDa, Millipore). Lors de cette étape de concentration, on effectue un changement de tampon de la protéine dans le tampon de gel filtration 50mM NaHPO4 pH7.4, 500mM NaCl et on filtre à 0.2 μ m la fraction protéique finale ainsi obtenue. Cette dernière est ensuite déposée sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare).

Cette colonne permet de séparer les différentes protéines de l'échantillon selon le principe de gel filtration (selon leur taille et/ou leur forme) selon leur capacité à diffuser au travers du réseau de billes poreuses que constitue la résine. Seules les molécules de moins de 200kDa sont séparées sur cette résine. Après équilibration de la colonne dans le tampon de gel filtration, la fraction protéique filtrée est chargée extemporanément avec un débit de 0.5mL/min. La protéine d'intérêt est éluée selon le principe de gel filtration par l'ajout du tampon de gel filtration 50mM NaHPO₄ pH7.4, 500mM NaCl.

(d) Dosage et stockage

Après migration sur gel SDS PAGE, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont concentrées. La protéine purifiée (GST, GST-yPol2A ou GST-yPol2C) est conservée dans un tampon 20mM TrisHCl pH7.4, 150mM NaCl, 20% glycérol et 5mM BME. Elle est ensuite dosée au Nanodrop (DO₂₈₀) et par la technique de Bradford et stockée à -80°C.

IV.B. Interaction physique *in vivo* : « double-hybride »

IV.B.1. Principe

Le « double-hybride » repose sur la « reconstitution » d'un facteur de transcription *via* une interaction protéine/protéine et sur sa capacité à activer un gène rapporteur. Dans notre cas, la protéine d'intérêt (yOgg1) est fusionnée au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 pour servir d'appât à la protéine dite « proie » (fragment yPol2A ou yPol2C) fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription (voir **Figure 13A** Introduction).

IV.B.2. Plasmides utilisés

Pour cela, l'ORF du gène *yOGG1* a été cloné dans les vecteurs de « double-hybride » appropriés : pGBT9 (vecteur de faible expression) ou pAS2Δ (vecteur de forte expression). Une partie de l'ORF du gène *yPOL2* (correspondant aux fragments yPol2A et yPol2C) a été clonée dans le vecteur d'expression pACT2. Ces plasmides navettes bactéries/levures contiennent les séquences d'intérêt à cloner en amont du promoteur de levure ADH1. Ils contiennent les gènes d'auxotrophie *TRP1* (pAS2Δ, pGBT9) et *LEU2* (pACT2). Le clonage de

yOGG1 dans pGBT9 et pAS2Δ a été réalisé dans l'équipe de Serge Boiteux avant le début de notre projet. La bonne fonctionnalité de la protéine de fusion résultante a été vérifiée par un test d'activité (GELLON 2002). Nous avons réalisé le clonage de *yPOL2* (correspondant aux fragments yPol2A et yPol2C) dans le vecteur d'expression pACT2 (au niveau des sites SmaI et XhoI).

IV.B.3. Protocole expérimental

La souche de levure Y190 utilisée pour ce test « double-hybride » possède le gène rapporteur *LacZ* et est Trp-, Leu- et Ade-. Un test de coloration au X-Gal assure la sélection dans le test de « double-hybride ». Pour la transformation de cette souche avec les deux plasmides d'intérêt, la souche Y190 estensemencée dans 10mL de milieu YPDA et incubée sur la nuit à 30°C. Le lendemain, la culture est diluée à une DO finale de 0.4 et incubée à 30°C jusqu'à une DO de 1. Après centrifugation (5min à 4000rpm), le surnageant est éliminé et le culot repris dans 1mL d'eau stérile puis de nouveau centrifugé (1min à 13000rpm). Le culot repris dans 1mL d'une solution 10mM LiAc (Lithium acétate), 1mM Tris et 0.1mM EDTA est de nouveau centrifugé (1min à 13000rpm) et remis en suspension dans 100μL de cette même solution. 50μL de ces cellules sont alors mélangées à 20μL d'ADN de sperme de saumon (dénaturé 15min à 100°C et placé dans la glace), 1μg de chaque ADN plasmidique et 300μL d'une solution 50mM LiAc, 5mM Tris et 0.5mM EDTA. Ce mélange est incubé 30min à 30°C avec agitation. Après l'ajout de 20μL de DMSO, on réalise un choc thermique de 15min à 42°C puis le tube est placé 2min dans la glace. Après une centrifugation de 1min à 13000rpm, le culot est repris dans 1mL de milieu YPDA puis incubé 1h à 30°C avec agitation. Puis on centrifuge de nouveau (1min à 13000rpm) et le culot est resuspendu dans 100μL d'eau stérile. Les cellules ainsi transformées sont étalées sur milieu sélectif (milieu de culture sans leucine, sans tryptophane et en présence d'adénine 2X) et incubées 3 jours à 30°C.

Pour la coloration au X-Gal de nos boîtes de culture, on a recouvert chacune d'elle de 10mL d'une solution d'agarose/X-Gal qu'on a laissé se solidifier 5 à 10min avant de placer les boîtes à 30°C pendant 48h. Cette solution X-Gal a été préparée comme suit (pour une boîte de culture) : mélanger dans un premier temps 5mL d'agarose/H₂O 1% à 5mL de KHPO₄ 1M (l'agarose et le KHPO₄ ont été préalablement chauffés à 50°C), puis ajouter dans cet ordre, 600μL de DMF, 100μL de SDS 10% et 100μL de X-Gal 4% (diluée dans du DMF).

IV.B.4. Mutagenèse dirigée et troncations

A partir des plasmides recombinants pGBT9-yOgg1, pAS2Δ-yOgg1 et pACT2-yPol2C des versions mutantes des protéines yOgg1 et yPol2C ont été générées par mutagenèse dirigée au niveau de différents résidus (voir **tableau 8**). La mutagenèse dirigée a été réalisée grâce au système commercial « Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit » (Stratagene) sur la base du même protocole décrit dans la partie IV.A.1.b. De même, des troncations des protéines en C-term ont été réalisées *via* l'introduction de codons STOP. Pour les troncations en N-terminal, une amplification PCR du fragment d'intérêt réalisée à partir de la séquence de départ a été sous-clonée dans les plasmides pGBT9, pAS2Δ ou pACT2.

IV.C. Interaction physique *in vitro*: « pull-down »

IV.C.1. Test d'interaction *in vitro*

La technique du « pull-down » est basée sur le principe de chromatographie d'affinité. Elle consiste dans l'utilisation d'une protéine « appât » immobilisée sur une résine qui va constituer une matrice d'affinité spécifique permettant de capturer une protéine « proie ». Dans notre cas, 6His-yOgg1 (yOgg1 taguée histidine) est la protéine « appât » immobilisée à une résine NiNTA (« NiNTA magnetic agarose beads » QUIAGEN) et GST-yPol2 (fragment yPol2 tagué GST pour son identification) est la protéine « proie ». Après fixation, le décrochage de la résine des protéines taguées histidine est réalisé par l'ajout d'une forte concentration en Imidazole.

IV.C.1.a. Protocole classique

On considère que 50μL de résine fixe en moyenne 15μg de protéine taguée histidine (recommandations QUIAGEN). La 1^{ère} étape de ce test consiste donc à préparer la résine NiNTA en prélevant le volume de résine nécessaire (20μL de résine par essai) puis en éliminant le tampon de conservation de la résine à l'aide d'un séparateur magnétique (1min). La protéine 6His-yOgg1 diluée dans un tampon de fixation sans NaCl (20mM TrisHCl pH7.4, 0.1% triton, 5mM BME, 5% glycérol et 20mM Imidazole) est ajoutée à la résine de sorte à apporter 15μg de protéine pour 50μL de résine. L'incubation se poursuit 2h à 4°C sous agitation. Puis, la totalité du surnageant est délicatement éliminée et les billes

magnétiques sont lavées par 3 ajouts successifs de 500µL d'un tampon de lavage (20mM TrisHCl pH7.4, 300mM NaCl, 0.1% triton, 5mM BME, 5% glycérol, 0.005% Tween20 et 20mM Imidazole) (agitation de 2min entre chaque lavage). On ajoute ensuite un volume de tampon d'interaction (20mM TrisHCl pH7.4, 300mM NaCl, 0.1% triton, 5mM BME, 5% glycérol, 0.005% Tween20 et 20mM Imidazole, identique au tampon de lavage) correspondant au volume total de résine de départ. Après homogénéisation de la résine, 20µL de résine sont répartis par tube puis placés sur le séparateur magnétique pour élimination du surnageant. 50µL de la protéine GST-yPol2 est alors ajouté (ou 50µL de tampon d'interaction s'il s'agit du contrôle de fixation de 6His-yOgg1 à la résine). La quantité de GST-yPol2C utilisée pour l'essai pouvant varier, les dilutions sérielles de la protéine sont réalisées dans le tampon d'interaction. L'ensemble résine, 6His-yOgg1 et GST-yPol2C est bien homogénéisé par légers tapotements puis incubé 1h à 4°C sous agitation. Le surnageant est ensuite éliminé et les billes sont lavées par 3 ajouts successifs de 500µL de tampon de lavage. Le complexe 6His-yOgg1/GST-yPol2 est élué par l'ajout de 10µL de tampon d'élution (20mM TrisHCl pH7.4, 300mM NaCl, 0.1% triton, 5mM BME, 5% glycérol, 0.005% Tween20 et 250mM Imidazole) et 3.3µL de tampon de dénaturation SB4X (25mM Tris HCl pH6.8, 25% glycérol, 4% SDS, 4% BME et 0.2% Bleu de bromophénol). Les éluats sont analysés sur gel SDS PAGE 12% et les bandes correspondant à nos protéines sont révélées par western blot ou au bleu de Coomassie.

IV.C.1.b. En présence de Benzonase

Ce test a été réalisé en absence et en présence de Benzonase (nucléase, Novagen). L'ajout de Benzonase a été réalisé à deux étapes du « pull-down ». Dans un premier test, les deux protéines 6His-yOgg1 et GST-yPol2 ont été incubées séparément 3h à 37°C avec 25U de Benzonase avant leur mise en présence. Dans un autre test, GST-yPol2C a été mis en présence de 6His-yOgg1 immobilisée sur Ni-NTA et la Benzonase a été ajouté après le lavage des billes (incubation du complexe billes/6His-yOgg1/GST-yPol2 3h à 37°C en présence de 25U de Benzonase). Les protéines sont ensuite élués et révélées comme décrit ci-dessus.

IV.C.2. Analyse des éluats

IV.C.2.a. Révélation par Western Blot

Après migration des éluats sur gel SDS PAGE 12% (200V, 45min), les protéines yOgg1 et yPol2, taguées histidine et GST respectivement, peuvent être révélés par western blot. La membrane PVDF est incubée 10sec dans le méthanol puis 30min dans un tampon de transfert Tris/Glycine avant d'être posée sur le gel dans le système de transfert liquide utilisé. Après un transfert de 1h (100V, 400mA), la membrane est incubée 1h à température ambiante (RT) dans du TBST (2mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween) avec 5% de lait. Elle est ensuite incubée 1h à RT dans le 1^{er} anticorps murin anti-6His en N-term ou anti-GST (Promega, 1/1000^{ème}). Après 5 lavages successifs de 5min dans du TBST, la membrane est incubée 30min à RT dans le 2^{ème} anticorps anti-mouse IgG, HRP conjugate (Promega, 1/10000^{ème}). La membrane est de nouveau lavée 5 fois pendant 5min à chaque fois dans du TBST. Pour finir, elle est imbibée de 300µL de substrat West pico (Pierce) de chaque réactif pendant 5min. Elle est ensuite emballée dans un film plastique SARAN et déposée sur cassette pour être lue sur film photo en chambre noire.

IV.C.2.b. Révélation au bleu de Coomassie

Après migration des éluats sur gel SDS PAGE 12% (200V, 45min), les protéines 6His-yOgg1 et GST-yPol2 peuvent être révélées directement au bleu de Coomassie par l'ajout d'une solution Instant Blue (Expedeon). Dans ce cas, il nous a été possible de quantifier le signal d'interaction.

IV.C.3. Quantification du signal d'interaction

IV.C.3.a. Quantification du signal protéique sur gel SDS-PAGE

La 1^{ère} étape dans la quantification au bleu de Coomassie du signal d'interaction, consiste à quantifier plus généralement le signal donné par des quantités croissantes de valeurs connues de chaque protéine après migration sur gel SDS-PAGE. Après quantification du gel, la valeur du signal en Image Quant est exprimée en fonction du nombre de pmole de protéines par puits correspondant. La pente de la droite obtenue nous informe pour chaque protéine du signal en Image Quant par pmole de protéines (cette valeur finale correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes).

IV.C.3.b. Estimation de la quantité de 6His-yOgg1 fixée par volume de résine Ni-NTA

Dans un 2^{ème} temps, on a estimé la quantité de protéine appât fixée par volume de résine. Différents volumes de résine (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 et 22.5µL) ont été immobilisés avec 6His-yOgg1 (ou 6His-yOgg1-K241Q ou 6His-hOgg1) pendant 2h à 4°C (voir IV.C.1.a). La protéine appât est ensuite directement éluée par ajout de 10µL de tampon d'éluat et 3.3µL de SB4X et 5µL de cet éluat total est déposé sur gel SDS PAGE 12%. Après quantification, on exprime le signal en Image Quant en fonction du volume de résine et la pente de la droite obtenue nous informe pour chaque protéine appât du signal en Image Quant par µL de résine immobilisée (cette valeur finale correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes). En faisant, pour chaque protéine appât, le ratio du signal en Image Quant par µL de résine immobilisée sur le signal en Image Quant par pmole de protéines, on obtient un nombre de pmoles de protéines fixé par µL de résine. Les billes NiNTA fixent par exemple 3.28pmoles de protéines 6His-yOgg1 par µL de résine. Chaque essai étant de 20µL, cela signifie qu'à chaque fois la quantité moyenne de 6His-yOgg1 immobilisée sur la résine et présentée à GST-yPol2 est de 65.6pmoles. Le signal est de 2.45pmoles/µL de résine pour 6His-yOgg1-K241Q et de 2.96pmoles/µL de résine pour 6His-hOgg1.

IV.C.3.c. Estimation de la quantité de GST-yPol2C capturée

Pour estimer la quantité de GST-yPol2C capturée par des billes NiNTA immobilisée avec 6His-yOgg1, on effectue des dilutions sérielles de notre pool stock de protéines. On réalise un test d'interaction en « pull-down » avec chacune de ces dilutions (voir IV.C.1.a, 20µL de résine NiNTA/6His-yOgg1 par essai, mis en présence de 50µL de la dilution GST-yPol2C). A chaque fois, l'éluat est déposé sur gel SDS PAGE 12% (8µL par piste). En parallèle, on dépose sur ce même un gel un mélange équimolaire GST-yPol2C/6His-yOgg1 et on quantifie par Image Quant le signal correspondant à chaque bande (on sait ainsi pour chacune des deux protéines que tel signal correspond à telle quantité en protéines). On calcule le rapport « r » du signal GST-yPol2C témoin sur le signal 6His-yOgg1 témoin. Il s'agit d'un contrôle supplémentaire à la quantification du signal protéique sur gel SDS PAGE expliquée dans la partie IV.C.3.a. Pour chaque dilution et donc quantité de GST-yPol2C mis en présence de 65.6pmoles de 6His-yOgg1, on mesure le signal d'interaction après quantification du gel par

Image Quant. Le rapport de ce signal sur le signal de 6His-yOgg1 fixé est ensuite divisé par « r » et multiplié par 100 pour obtenir la quantité de GST-yPol2C capturé par rapport à 6His-yOgg1 fixé exprimée en pourcentage. Pour aller plus loin, on peut déterminer à quelle quantité de GST-yPol2C en pmoles cela correspond en multipliant ces valeurs par la quantité totale de 6His-yOgg1 fixé à la résine par essai soit 65.6 (pmoles).

IV.C.4. Test de « pull-down » en présence de compétiteurs

IV.C.4.a. Compétiteurs protéiques

Le test de « pull-down » décrit plus haut a été réalisé en présence de compétiteurs protéiques non tagués : yOgg1, hOgg1, Ung et *L*-Fpg. Pour un essai de 20µL de résine, 65.6pmoles de 6His-yOgg1 fixés aux billes Ni-NTA sont mis en présence de 28pmoles de GST-yPol2C (dans 50µL). L'ajout de quantités croissantes de compétiteurs se fait après saturation de la résine par 6His-yOgg1, en même temps que l'ajout de la protéine GST-yPol2C (avec et sans préincubation avec GST-yPol2C). La quantité de compétiteurs ajoutée est de 0, 0.5, 1, 2 ou 4 fois plus la quantité de GST-yPol2C. L'ensemble est incubé 1h à 4°C et les complexes élués sont analysés sur gel SDS PAGE 12% puis quantifié par Image Quant (voir explications ci-dessus).

IV.C.4.b. Compétiteurs nucléiques (ADN)

Le test de « pull-down » décrit plus haut a également été réalisé en présence d'ADNs compétiteurs de 24 paires de bases : 24-mer [G] simple brin, 24-mer [G :C] double brin, 24-mer [8-oxoG :C], 24-mer [8-oxoG :A] et 24-mer [THF :C]. Des quantités croissantes de ces ADN (rapport 0, 0.5, 1, 2 ou 4 par rapport à la quantité de 6His-yOgg1) ont été séchées au speed vac dans des tubes dans lesquelles ont été ensuite ajoutés les 50µL de GST-yPol2C (soit 28pmoles). Une fois l'ADN compétiteur remis en suspension, l'ensemble ADN compétiteur + GST-yPol2C a été rajouté à chaque essai de 20µL et incubé 1h à 4°C suivant le protocole décrit ci-dessus. Après lavage des billes, leur contenu en GST-yPol2C est analysé par SDS PAGE 12% puis quantifiés par Image Quant (voir explications ci-dessus).

IV.D. Etudes biochimiques

IV.D.1. Marquage des oligo-nucléotides

Les analyses biochimiques qui suivent ont nécessité l'utilisation d'ADN radiomarqué. Des oligonucléotides de 24 paires de bases (24mer) ont été utilisés (voir séquences en **Annexe 10**). Seul le brin contenant la lésion est marqué radioactivement (en 5'). Pour chaque type de duplexe d'ADN désiré, on réalise, dans un volume final de 10µL, le mélange suivant: 40pmoles de brin contenant la lésion (sous forme sèche), 6µL de [γ -³²P]-ATP à 2pmoles/µL et 10µCi/µL (Amersham Biosciences), 1µL de PolyNucléotide Kinase à 10U/µL (PNK, Fermentas) et 1µL de tampon PNK 10X. On incube ce mélange 45min à 37°C. Après élimination de [γ -³²P]-ATP libre par filtration, le brin lésé radiomarqué est récolté dans un tube contenant l'ADN complémentaire sec (24mer contenant un C opposé à la base lésée) en excès (80pmoles environ). Ce mélange est ensuite séché au concentrateur à vide. Pour permettre l'hybridation des ADN simples brins lésés radiomarqués aux brins complémentaires froids, le culot obtenu est repris dans 50µL de tampon d'hybridation (10mM Tris, 1mM EDTA et 150mM NaCl) et est incubé 2min à 83°C. Il est ensuite placé à 4°C jusqu'à une diminution progressive de la température afin d'obtenir une hybridation parfaite des duplexes. Ceux-ci sont conservés à -20°.

IV.D.2. Analyse de l'activité catalytique de Ogg1

Le principe de la mesure des activités de γ Ogg1 est présenté dans la partie II.C des résultats en figure 32. A chaque fois, la composition finale de l'essai (10µL final) est la suivante : 80nM de duplexe d'ADN radiomarqué, 2µL de tampon d'incubation 5X (100mM Hepes/NaOH pH 7.6, 25% glycérol, 1.5mg/mL BSA, 0.5mM PMSF, 2.5mM EDTA), 2µL de tampon de conservation de γ Pol2C (20mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 20% glycérol et 5mM BME) pour les essais en présence de γ Pol2C ou 2µL de tampon de dilution de γ Ogg1 (20mM Hepes/NaOH pH 7.6, 5% glycérol, 0.3mg/mL BSA, 0.1mM PMSF et 0.5mM EDTA) et pour finir 4µL de protéine γ Ogg1 (dans son tampon de dilution). Au final, la composition en NaCl dans l'essai est de 120mM. Si besoin, des dilutions sérielles de la protéine γ Ogg1 sont réalisées dans son tampon de dilution (on a travaillé dans une grande majorité des cas à 4nM γ Ogg1 dans l'essai). Des dilutions de γ Pol2C ont de la même façon été réalisées dans son tampon

de conservation (20mM TrisHCl pH7.4, 150mM NaCl, 20% glycérol et 5mM BME). Le mélange réactionnel a ensuite été incubé 15min à 37°C. L'arrêt de la réaction est différent suivant l'activité mesurée. Pour mettre en évidence l'activité glycosylase/lyase de γ Ogg1, le mélange réactionnel est arrêté juste après l'incubation à 37°C par l'ajout de 10 μ L de tampon de dénaturation formamide (70% formamide, 5mMEDTA, 0,05% bleu bromophénol) suivie d'une dénaturation thermique (1min à 95°C). Pour observer l'activité ADN glycosylase de γ Ogg1, le mélange est incubé 5min à 50°C en présence de 0.2M NaOH. Puis, la réaction est arrêtée par ajout de tampon de dénaturation formamide (10 μ L) et incubation de 1min à 95°C. Pour l'analyse de l'activité AP lyase, le duplex d'ADN radiomarké contenant un uracile U en face d'une cytosine (24mer-[U-C]) est traité à l'UDG (5U pour 2pmoles d'ADN, pendant 20min à 37°C) pour générer un site AP. Cet ADN radiomarké 24mer-[AP-C] est alors substrat pour l'activité AP lyase de γ Ogg1. En parallèle, l'ADN substrat traité à l'UDG et non soumis à γ Ogg1 est utilisé comme témoin d'efficacité de l'UDG à exciser le U et à générer un site AP.

Dans le cas particulier des cinétiques réalisées sur γ Ogg1 en présence et en absence de γ Pol2C, le temps d'incubation du mélange réactionnel à 37°C est variable. La composition de l'essai final présenté ci-dessus correspond à des conditions de *multi-turnover* (80nM d'ADN substrat pour 4nM de γ Ogg1). Pour les conditions de *single turnover*, la concentration en ADN dans l'essai est de 0.9nM (pour 13.4nM de γ Ogg1).

Dans tous les cas, 5 μ L du mélange réactionnel sont séparés sur gel Urée-Page (électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, 20% Acrylamide 19/1, TBE, 7M urée) pendant 30min à 300V (après un pré-run de 30min à 300V). Les gels sont exposés contre un écran photosensible, puis les différentes bandes sont révélées par un photo-Imageur (Typhoon, Amersham) et quantifiés par Image Quant.

IV.D.3. Analyse de l'activité 3'→5' exonucléase de γ Pol2C

La présence d'une activité 3'→5' exonucléase chez γ Pol2C est testée sur 3 sondes substrats différentes: un ADN simple brin, un héli-duplexe avec une partie simple brin 5' sortante et un ADN double brin (voir séquences en **Annexe 10**). La composition du mélange réactionnel est: 50mM TrisHCl pH 7.4, 100 μ g/mL BSA acétylée, 2mM DTT, 8mM MgCl₂, 50nM de duplexe ADN radiomarké et 0.1 à 5 μ M de γ Pol2C. La concentration en NaCl et en glycérol dans l'essai varie de 0.75 à 37.5mM et de 5 à 10%, respectivement en fonction de la

quantité croissante de γ Pol2C (tampon de conservation de γ Pol2C : tris20mM pH7.5; NaCl 150mM; glycérol 20%). Le fragment de Klenow (0.01 unités, Biolabs) est utilisé comme contrôle positif dans un tube témoin supplémenté en NaCl et glycérol afin de reproduire les conditions en présence de γ Pol2C. Un effet inhibiteur du NaCl et un effet stimulateur du glycérol ont été observés. Le mélange réactionnel est incubé 1h20 à 30°C puis la réaction est arrêtée par ajout d'un même volume de mélange dénaturant (70% formamide, 5mMEDTA, 0,05% bleu bromophénol) suivie d'une incubation de 3min à 70°C. 10 μ L du mélange réactionnel est soumis à une électrophorèse sur gel Urée-Page (15 et 20% acrylamide) pendant 2h de migration à 700V. Les gels sont exposés contre un écran photosensible, puis les différentes bandes sont révélées par un photo-Imageur (Typhoon, Amersham) et quantifiés par Image-Quant.

IV.D.4. Analyse par gel retard

La capacité de γ Ogg1 à former un complexe stable avec des oligo-nucléotides double-brins peut être mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions natives (gel retard, 10% Acrylamide 29/1, 0.5 TBE). Dans ce type de gel, une bande retardée par rapport à celle de l'ADN libre permet d'identifier un complexe formé avec la protéine. La composition de l'essai est différente suivant ce que l'on cherche à regarder. Dans tous les cas, après dépôt, migration à 110V pendant 1h à 4°C et fixation des complexes (solution de fixation 10% acide acétique, 10% éthanol V/V), le gel est séché et exposé contre un écran photosensible. Les différentes bandes sont ensuite révélées par un phospho-Imageur (Typhoon, Amersham) et quantifiées en utilisant Image Quant.

IV.D.4.a. Durée de vie des complexes (γ Ogg1/ADN)

Pour évaluer la durée de vie des complexes [γ Ogg1/ADN (sonde)], on analyse par gel retard la disparition au cours du temps du complexe γ Ogg1/sonde en ajoutant la même sonde « froide » (non radiomarquée). Pour cela, on a utilisé un duplexe d'ADN contenant des analogues stables de lésions reconnus spécifiquement par γ Ogg1 mais non métabolisable : un analogue de site AP (THF-ADN) et un ADN comprenant une coupure de chaîne en 3' du site AP (analogue de produit de réaction 3'-THF-ADN). Le marquage de ces oligo-nucléotides a été réalisé (voir IV.D.1). Dans le cas du 3'-THF-ADN, le brin d'ADN

radiomarqué (oligo de 11mer, voir **Annexe 10**) par la PNK est « chassé » par de l'ATP froid (1mM, pendant 10min).

L'expérience est réalisée à 4°C. Le mélange réactionnel comprend 2.5nM de sonde radiomarquée, 7.75nM de γ Ogg1 et 7 μ M de γ Pol2C, dans un tampon final de réaction 20mM Hepes pH7.4, 100mM NaCl, 1mg/mL BSA, 5mM MgCl₂ et 1mM DTT. Les deux protéines γ Ogg1 et γ Pol2C (ou γ Ogg1 et le tampon de conservation de γ Pol2C) sont mises en présence de la sonde radiomarquée pendant 3h pour atteindre l'équilibre d'interaction. Puis, on ajoute l'ADN « froid » au mélange réactionnel (soit un volume de 2.5 μ L à 50 μ M pour 60 μ L de complexe, un excès de 800 par rapport à l'ADN radiomarqué). L'évolution du complexe γ Ogg1/sonde ADN est analysée au cours du temps en chargeant sur le gel retard sous-tension des aliquotes du mélange réactionnel à différents temps (de 0 à 50min). Une fraction du mélange est gardée comme contrôle afin de s'assurer que la quantité de complexe en fin de réaction est identique (sans ajout de compétiteur, aux temps 0 et 50 min, C₀ et C₅₀ **Figure 38**).

IV.D.4.b. Titration de l'ADN par γ Ogg1 en présence ou en absence de γ Pol2C

Dans cette expérience de titration de l'ADN par γ Ogg1 en présence ou en absence de γ Pol2C, on incube pendant 3h à 4°C la sonde THF-ADN radiomarquée (3.3nM) en présence de concentrations croissantes en γ Ogg1 (0, 1.5, 4.7, 14 et 42nM) auxquelles on ajoute 0.6 μ M de γ Pol2C (ou de tampon de conservation de γ Pol2C). Au bout de ces 3h, l'équilibre est atteint et on peut analyser les échantillons en gel retard.

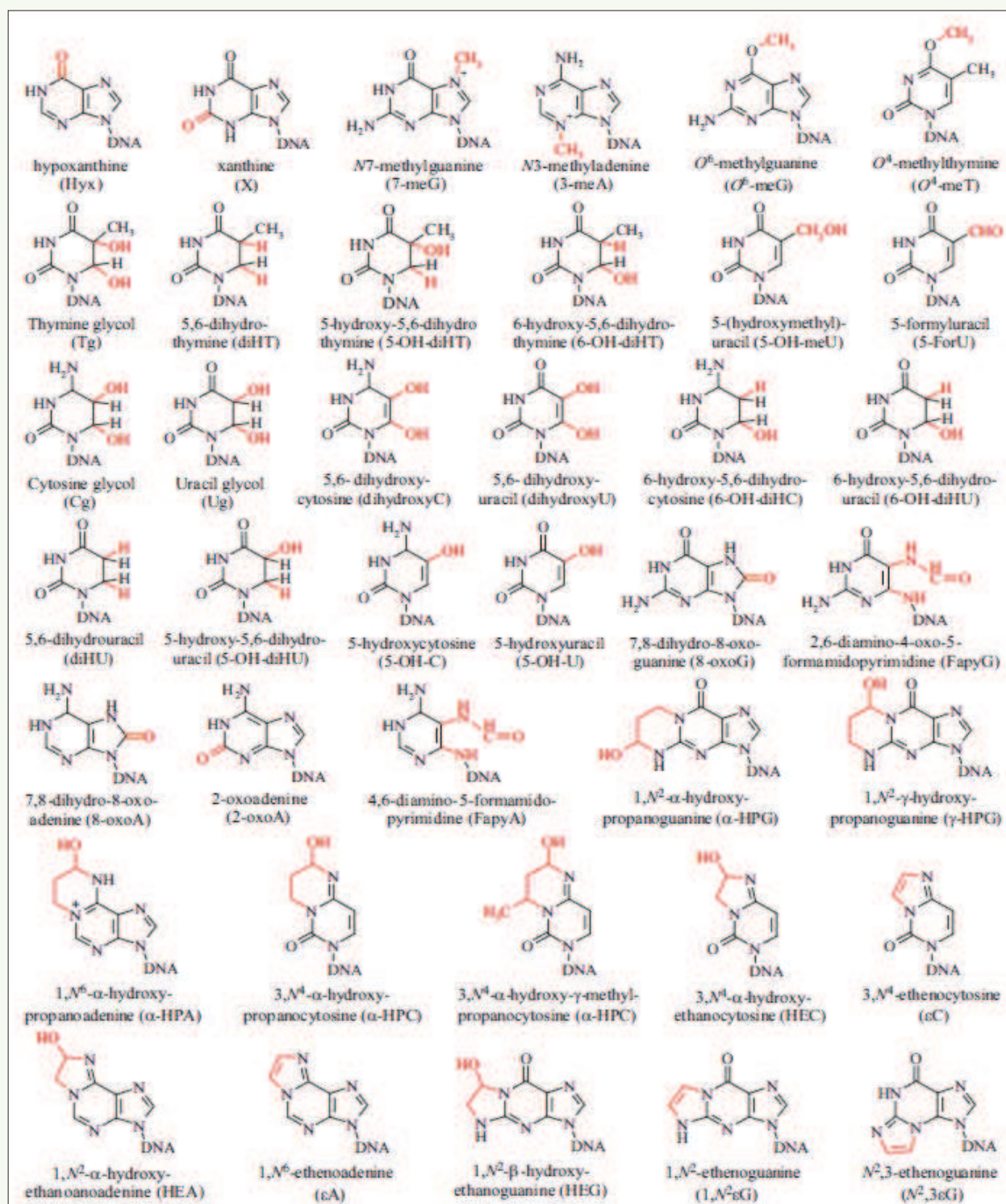
IV.D.4.c. Quantité de complexes γ Ogg1/ADN après ajout de quantités croissantes d'ADN « froid » ou de γ Pol2C compétiteur (**Figure 41A**)

Pour analyser l'évolution de la quantité de complexe γ Ogg1/THF-ADN après l'ajout de sonde THF-ADN non radiomarquée ou de γ Pol2C compétiteur, on a pré-incubé γ Ogg1 et la sonde radiomarquée THF-ADN pendant 30min à 4°C (préformation du complexe). On ajoute ensuite à l'essai des quantités croissantes de THF-ADN « froid » ou de γ Pol2C aux rapports indiqués en **Figure 41A** par rapport à γ Ogg1 et on incube ce mélange réactionnel pendant 3h à 4°C (équilibre). Les échantillons sont ensuite analysés par gel retard.

Dans le prolongement de l'étude de l'effet de γ Pol2C sur le complexe γ Ogg1/THF-ADN, une cinétique de dissociation du complexe par γ Pol2C a également été réalisée. Pour cela, on a incubé pendant 30min à 4°C γ Ogg1 et la sonde radiomarquée THF-ADN puis on a ajouté un large excès de γ Pol2C (en quantité 900 fois plus importante par rapport à γ Ogg1). On a suivi la dissociation du complexe au cours du temps (de 0 à 80min) en déposant sur gel retard des aliquots du mélange réactionnel au cours du temps.

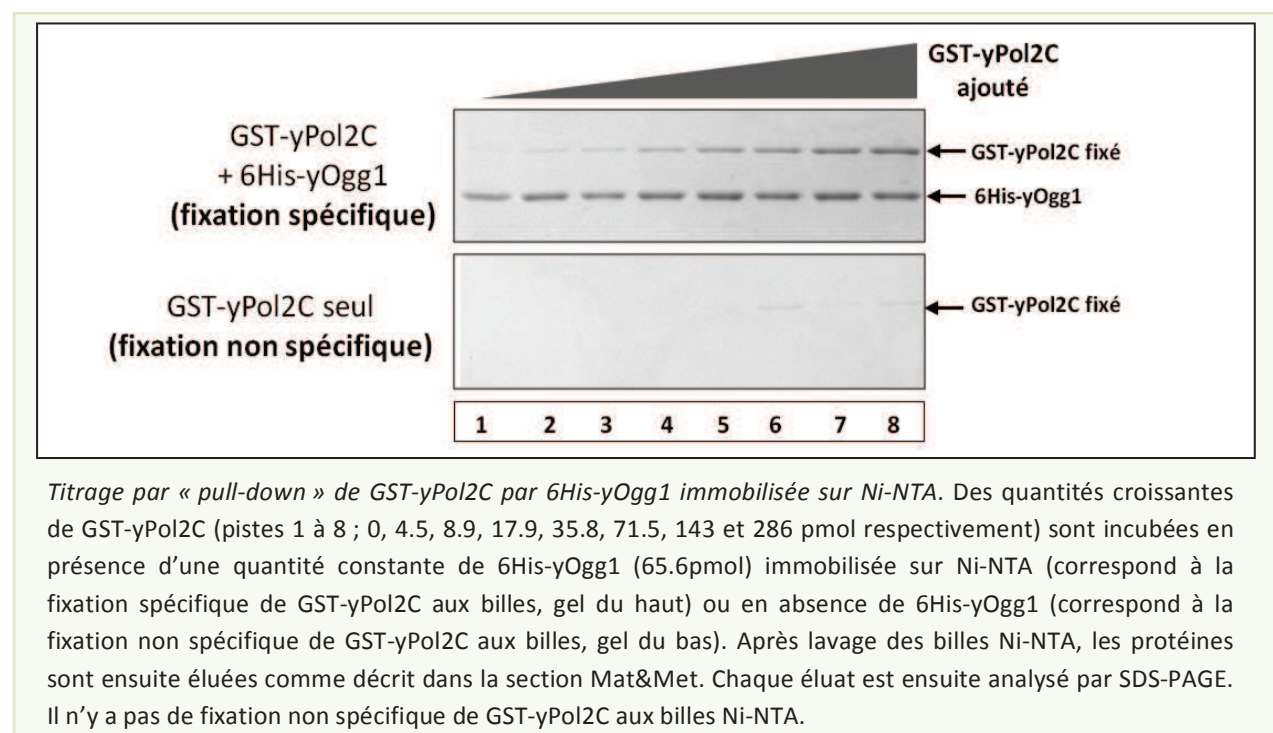
V. **Annexes**

Annexe 1 Principales modifications endogènes de bases (KRAWICZ *et al.* 2007).

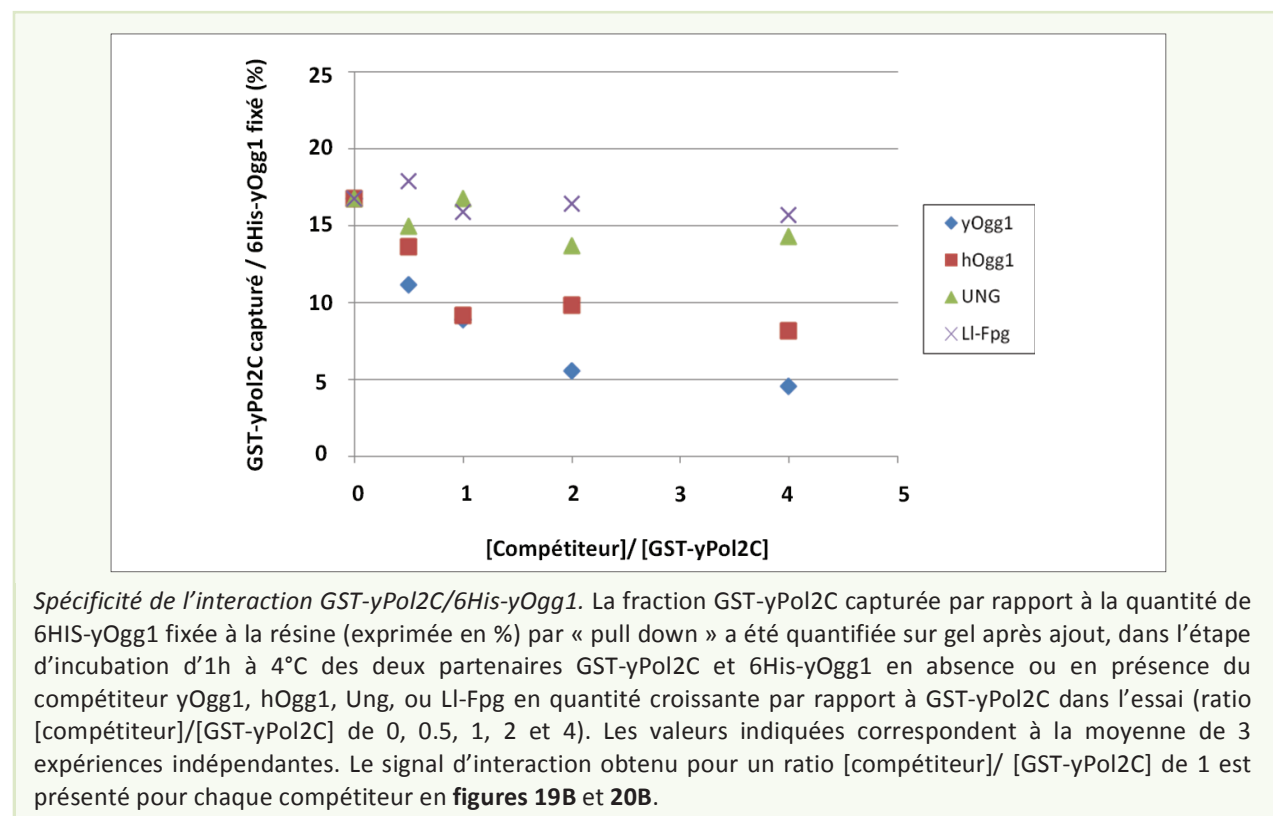


La position des modifications des bases est indiquée en rouge.

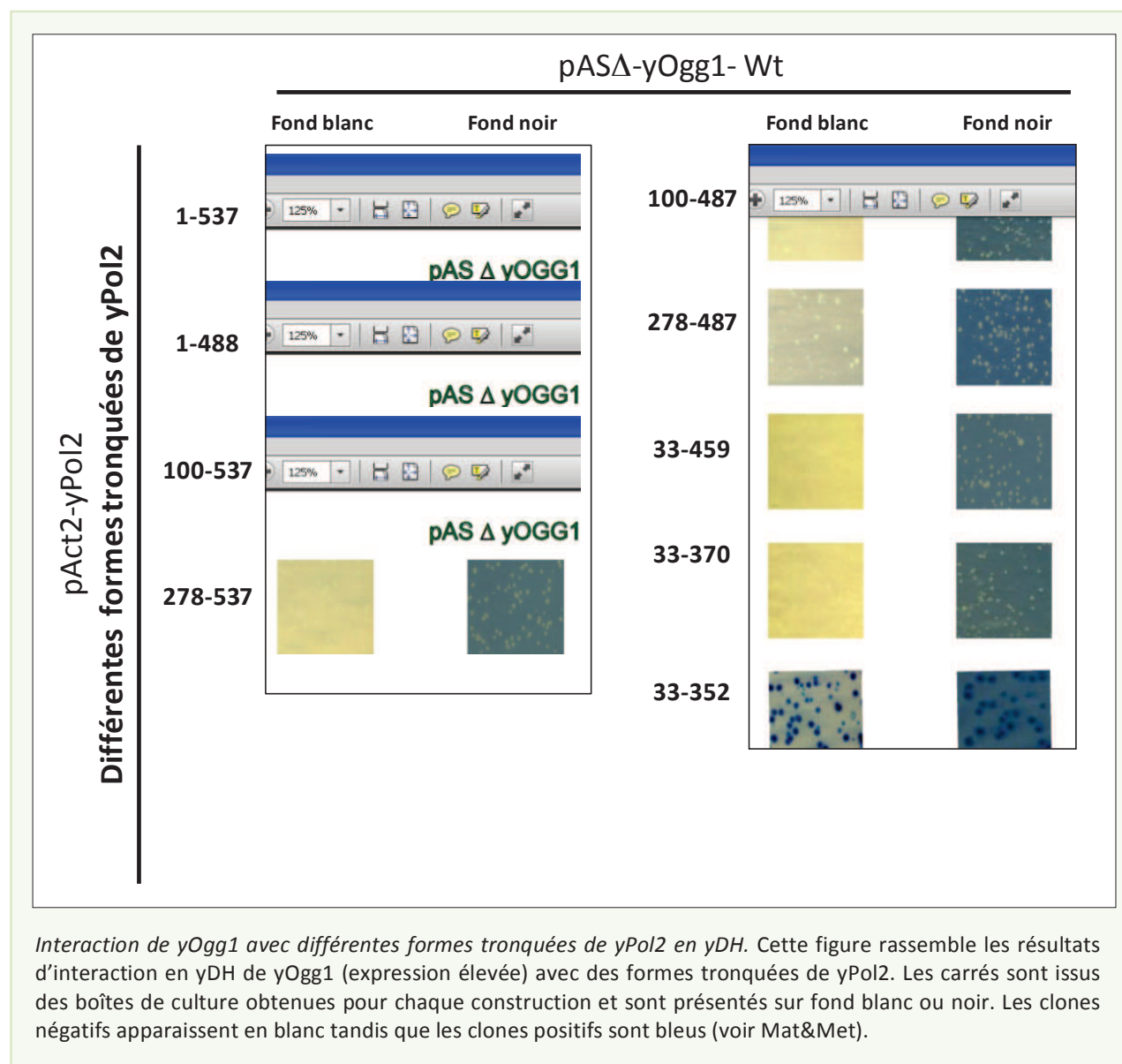
Annexe 2 Contrôle de la spécificité des expériences de titrage par « pull-down » de GST-yPol2C (voir **Figure 18B**).



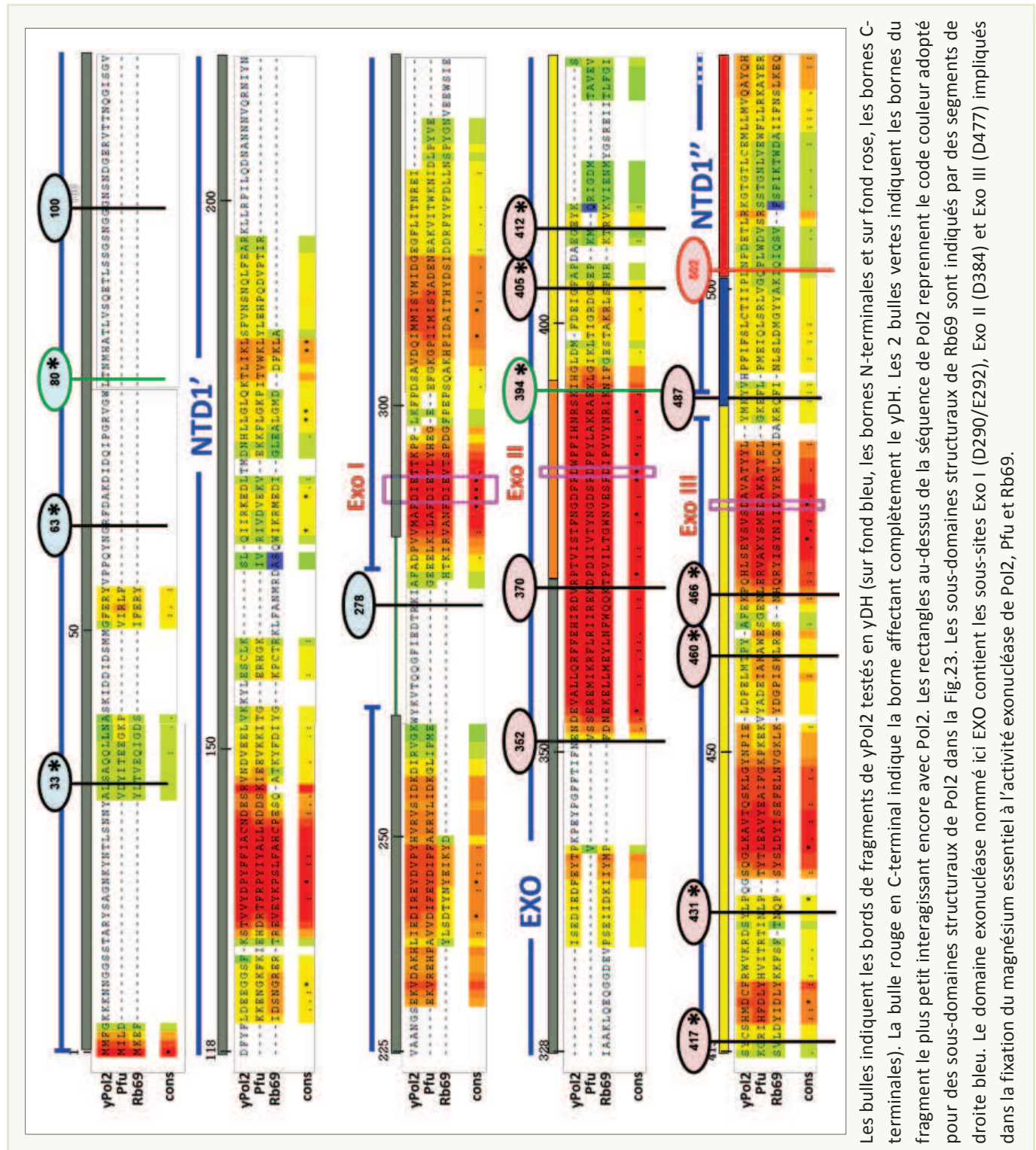
Annexe 3 Modulation de l'interaction GST-yPol2C/6His-yOgg1 *in vitro* en « pull-down » : spécificité de l'interaction (voir **Figures 19B** et **20B**).



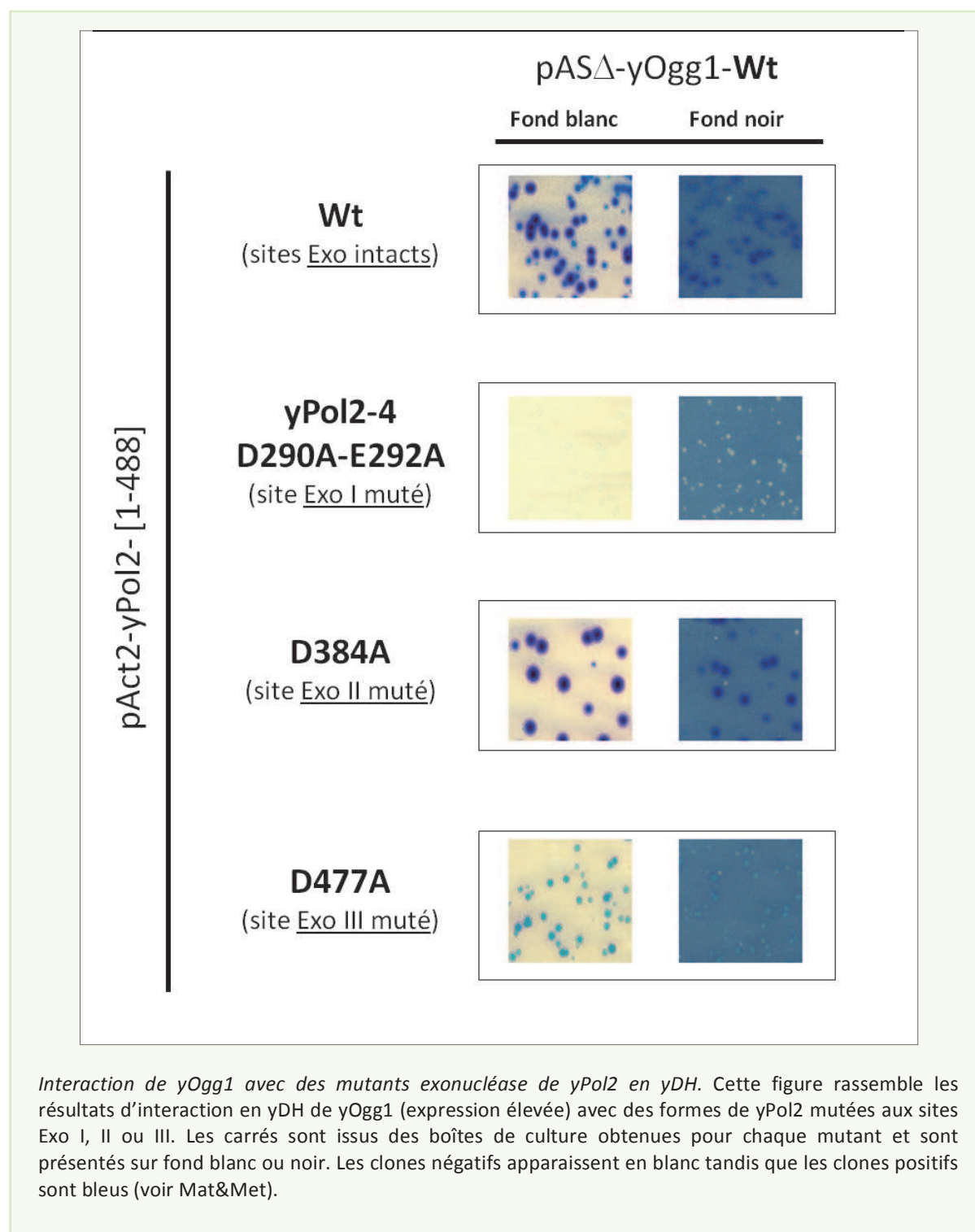
Annexe 4 Représentation en carrés des résultats d'interaction en « double-hybride » de yOgg1 avec différentes formes tronquées de yPol2 (voir **Figure 21**).



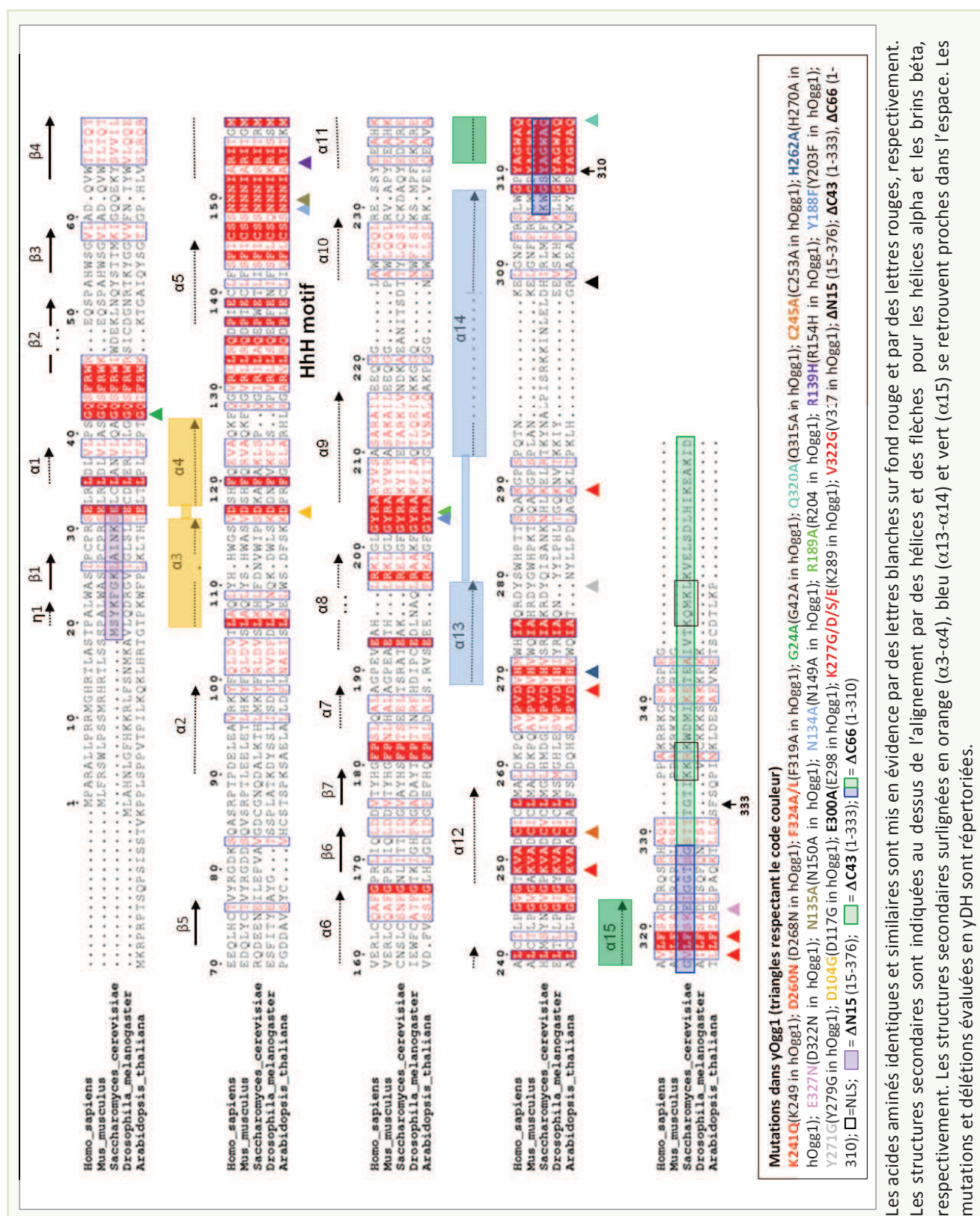
Annexe 5 Agrandissement des alignements en N-terminal de la séquence de yPol2 avec celles des ADN polymérases Pfu et Rb69 (voir **Figure 21B**).



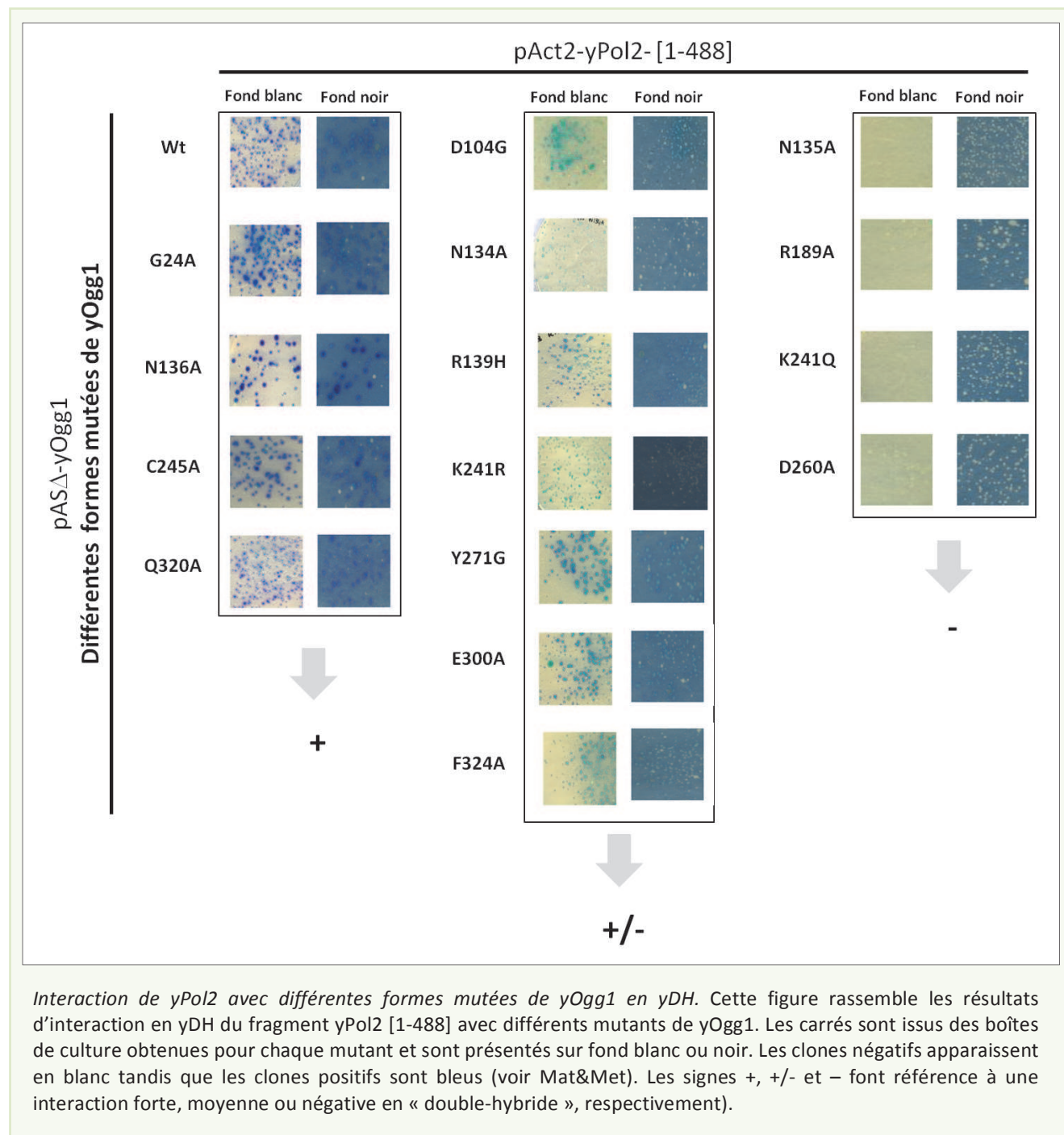
Annexe 6 Représentation en carrés des résultats d'interaction en « double-hybride » de yOgg1 avec différents mutants exonucléase de yPol2 (mutants ponctuels au niveau des sites Exo I, Exo II et Exo III) (voir **Figure 21**).



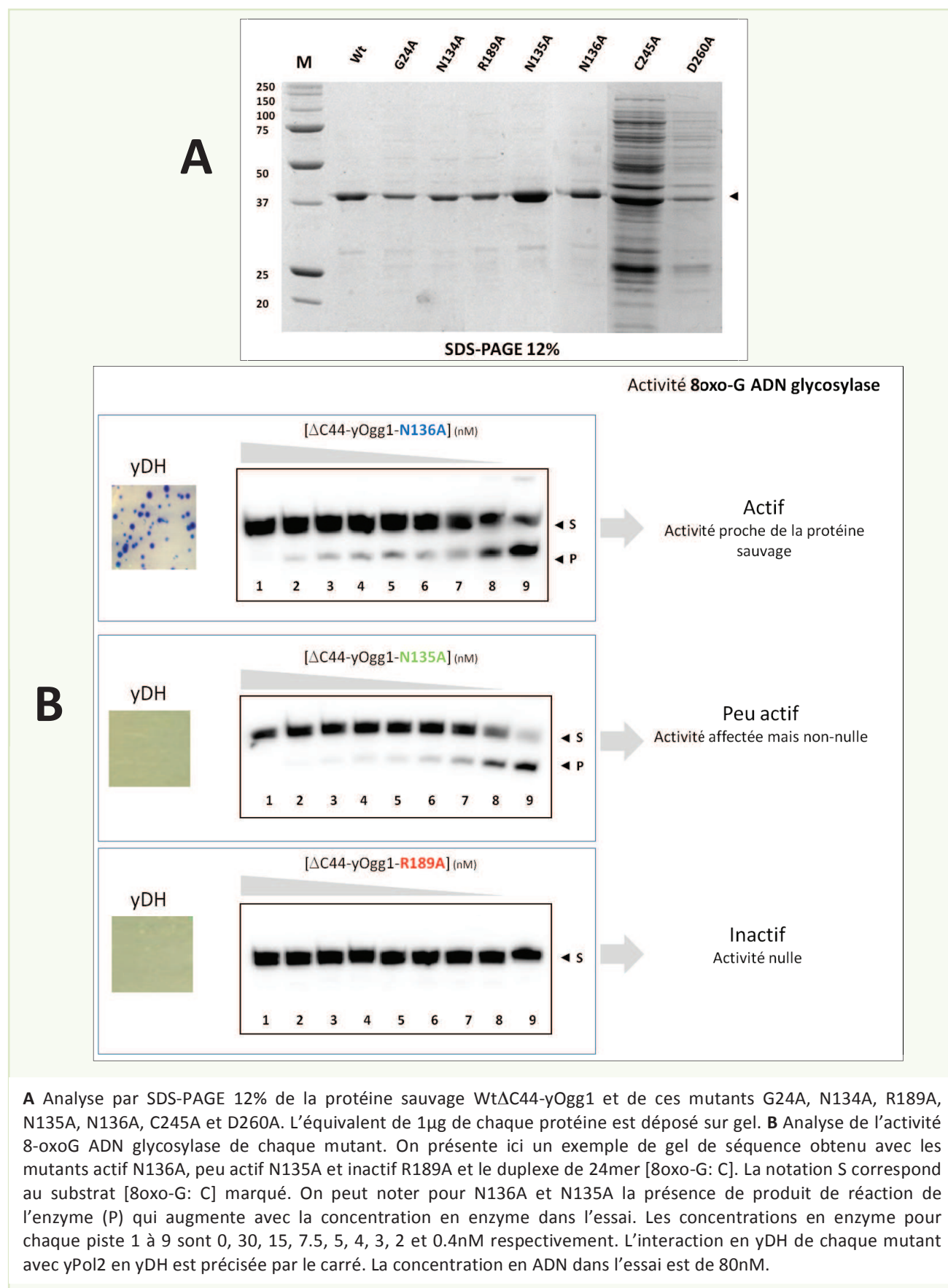
Annexe 7 Agrandissement de l'alignement des structures primaires de Ogg1 chez différentes espèces (voir Figure 26A).



Annexe 8 Représentation en carrés des résultats d'interaction en « double-hybride » de yPol2 [1-488] avec différents mutants de yOgg1 (voir **Tableau 8**).



Annexe 9 Identification de trois groupes de mutants γ Ogg1 d'un point de vue de leur activité 8oxo-G ADN glycosylase comparée à la protéine sauvage (voir **Figure 28**).



Annexe 10 Oligo-nucléotides utilisés pour nos études biochimiques (voir Résultats II.C).

Activité catalytique de γ Ogg1 : lésion 8-oxoG (X)

24mer, brin contenant la lésion

5' –CTG ATC GAT GAC **X**CC TGA CAT GAT- 3'

24mer, brin opposé à la lésion

5' ATC ATG TCA GGC GTC ATC GAT CAG 3'

Activité 3'→5' exonucléase de γ Pol2C

- ADN simple brin

24mer

5'-ATC ATG TCA GGC GTC ATC GAT CAG- 3'

- ADN double brin

24mer

5' ATC ATG TCA GGC GTC ATC GAT CAG- 3'

24mer, complémentaire

5'-CTG ATC GAT GAC GCC TGA CAT GAT-3'

- Hémi-duplexe d'ADN

24mer

5'-ATC ATG TCA GGC GTC ATC GAT CAG- 3'

12mer

5'-CTG ATC GAT GAC-3'

Expériences de gel retard

- Analogue de site AP : THF (F)

24mer, brin contenant la lésion

5' -CTG ATC GAT GAC **F**CC TGA CAT GAT- 3'

24mer, brin opposé à la lésion

5'-ATC ATG TCA GGC GTC ATC GAT CAG-3'

- Analogue de produit final de réaction avec extrémité 3'THF (F)

13mer, brin contenant la lésion

5'-CTG ATC GAT GAC **F**-3'

11mer, brin opposé à la lésion

5'-CCT GAC ATG AT-3'

Références Bibliographiques

- ABURATANI, H., Y. HIPPO, T. ISHIDA, R. TAKASHIMA, C. MATSUBA *et al.*, 1997 Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res* **57**: 2151-2156.
- ADDINALL, S. G., M. DOWNEY, M. YU, M. K. ZUBKO, J. DEWAR *et al.*, 2008 A genomewide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**: 2251-2266.
- AKSENOVA, A., K. VOLKOV, J. MACELUCH, Z. F. PURSELL, I. B. ROGOZIN *et al.*, 2010 Mismatch repair-independent increase in spontaneous mutagenesis in yeast lacking non-essential subunits of DNA polymerase epsilon. *PLoS Genet* **6**: e1001209.
- AL-TASSAN, N., N. H. CHMIEL, J. MAYNARD, N. FLEMING, A. L. LIVINGSTON *et al.*, 2002 Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* **30**: 227-232.
- ALSETH, I., T. ROGNES, T. LINDBACK, I. SOLBERG, K. ROBERTSEN *et al.*, 2006 A new protein superfamily includes two novel 3-methyladenine DNA glycosylases from *Bacillus cereus*, AlkC and AlkD. *Mol Microbiol* **59**: 1602-1609.
- ARAI, K., K. MORISHITA, K. SHINMURA, T. KOHNO, S. R. KIM *et al.*, 1997 Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* **14**: 2857-2861.
- ASTURIAS, F. J., I. K. CHEUNG, N. SABOURI, O. CHILKOVA, D. WEPLO *et al.*, 2006 Structure of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 35-43.
- AUDEBERT, M., S. CHEVILLARD, C. LEVALLOIS, G. GYAPAY, A. VIEILLEFOND *et al.*, 2000a Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res* **60**: 4740-4744.
- AUDEBERT, M., J. P. RADICELLA and M. DIZDAROGLU, 2000b Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res* **28**: 2672-2678.
- BANERJEE, A., W. YANG, M. KARPLUS and G. L. VERDINE, 2005 Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature* **434**: 612-618.
- BEARD, W. A., R. PRASAD and S. H. WILSON, 2006 Activities and mechanism of DNA polymerase beta. *Methods Enzymol* **408**: 91-107.
- BEBENEK, K., and T. A. KUNKEL, 2004 Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **69**: 137-165.
- BECKMAN, K. B., and B. N. AMES, 1997 Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* **272**: 19633-19636.
- BHAKAT, K. K., S. K. MOKKAPATI, I. BOLDOGH, T. K. HAZRA and S. MITRA, 2006 Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol* **26**: 1654-1665.
- BHATTACHARYYA, N., and S. BANERJEE, 1997 A variant of DNA polymerase beta acts as a dominant negative mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10324-10329.
- BJELLAND, S., and E. SEEBERG, 2003 Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* **531**: 37-80.
- BJORAS, M., L. LUNA, B. JOHNSEN, E. HOFF, T. HAUG *et al.*, 1997 Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J* **16**: 6314-6322.
- BJORAS, M., E. SEEBERG, L. LUNA, L. H. PEARL and T. E. BARRETT, 2002 Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase. *J Mol Biol* **317**: 171-177.
- BLONS, H., J. P. RADICELLA, O. LACCOURREYE, D. BRASNU, P. BEAUNE *et al.*, 1999 Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alterations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer. *Mol Carcinog* **26**: 254-260.
- BOGANI, F., I. CORREDEIRA, V. FERNANDEZ, U. SATTTLER, W. RUTVISUTTINUNT *et al.*, 2010 Association between the herpes simplex virus-1 DNA polymerase and uracil DNA glycosylase. *J Biol Chem* **285**: 27664-27672.

- BOITEUX, S., 2002 Réparation des lésions endogènes et induites par les radiations ionisantes dans l'ADN. *Médecine nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique* **26**.
- BOITEUX, S., and M. GUILLET, 2004 Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1-12.
- BOITEUX, S., and S. JINKS-ROBERTSON, 2013 DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 1025-1064.
- BOITEUX, S., T. R. O'CONNOR, F. LEDERER, A. GOUYETTE and J. LAVAL, 1990 Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* **265**: 3916-3922.
- BOITEUX, S., and J. P. RADICELLA, 2000 The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* **377**: 1-8.
- BOORSTEIN, R. J., A. CUMMINGS, JR., D. R. MARENSTEIN, M. K. CHAN, Y. MA *et al.*, 2001 Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* **276**: 41991-41997.
- BOUZIANE, M., F. MIAO, S. E. BATES, L. SOMSOUK, B. C. SANG *et al.*, 2000 Promoter structure and cell cycle dependent expression of the human methylpurine-DNA glycosylase gene. *Mutat Res* **461**: 15-29.
- BRAVARD, A., M. VACHER, E. MORITZ, L. VASLIN, J. HALL *et al.*, 2009 Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res* **69**: 3642-3649.
- BREEN, A. P., and J. A. MURPHY, 1995 Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* **18**: 1033-1077.
- BRUNER, S. D., D. P. NORMAN, J. C. FROMME and G. L. VERDINE, 2000a Structural and mechanistic studies on repair of 8-oxoguanine in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 103-111.
- BRUNER, S. D., D. P. NORMAN and G. L. VERDINE, 2000b Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* **403**: 859-866.
- CARSON, D. R., and M. F. CHRISTMAN, 2001 Evidence that replication fork components catalyze establishment of cohesion between sister chromatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8270-8275.
- CASTAING, B., J. L. FOURREY, N. HERVOUET, M. THOMAS, S. BOITEUX *et al.*, 1999 AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucleic Acids Res* **27**: 608-615.
- CHATTOPADHYAY, R., L. WIEDERHOLD, B. SZCZESNY, I. BOLDOGH, T. K. HAZRA *et al.*, 2006 Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **34**: 2067-2076.
- CHEN, R., H. WANG and L. M. MANSKY, 2002 Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *J Gen Virol* **83**: 2339-2345.
- CHEVILLARD, S., J. P. RADICELLA, C. LEVALLOIS, J. LEBEAU, M. F. POUPON *et al.*, 1998 Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* **16**: 3083-3086.
- CHUNG, S. J., and G. L. VERDINE, 2004 Structures of end products resulting from lesion processing by a DNA glycosylase/lyase. *Chem Biol* **11**: 1643-1649.
- COLLINS, S. R., K. M. MILLER, N. L. MAAS, A. ROGUEV, J. FILLINGHAM *et al.*, 2007 Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**: 806-810.
- COLUSSI, C., E. PARLANTI, P. DEGAN, G. AQUILINA, D. BARNES *et al.*, 2002 The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* **12**: 912-918.
- CONTI, E., M. UY, L. LEIGHTON, G. BLOBEL and J. KURIYAN, 1998 Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**: 193-204.

- COPPEDE, F., F. MIGHELI, R. CERAVOLO, E. BREGANT, A. ROCCHI *et al.*, 2010 The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and Huntington's disease. *Toxicology* **278**: 199-203.
- CORONA, D. F., A. EBERHARTER, A. BUDDE, R. DEURING, S. FERRARI *et al.*, 2000 Two histone fold proteins, CHRA-14 and CHRA-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRA). *EMBO J* **19**: 3049-3059.
- CORTELLINO, S., J. XU, M. SANNAI, R. MOORE, E. CARETTI *et al.*, 2011 Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**: 67-79.
- COSTANZO, M., A. BARYSHNIKOVA, J. BELLAY, Y. KIM, E. D. SPEAR *et al.*, 2010 The genetic landscape of a cell. *Science* **327**: 425-431.
- D'ERRICO, M., E. PARLANTI, M. TESON, B. M. DE JESUS, P. DEGAN *et al.*, 2006 New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J* **25**: 4305-4315.
- DALHUS, B., M. FORSBRING, I. H. HELLE, E. S. VIK, R. J. FORSTROM *et al.*, 2011 Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Structure* **19**: 117-127.
- DALHUS, B., J. K. LAERDAHL, P. H. BACKE and M. BJORAS, 2009 DNA base repair--recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 1044-1078.
- DANTZER, F., L. LUNA, M. BJORAS and E. SEEGER, 2002 Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res* **30**: 2349-2357.
- DE OLIVEIRA, R., P. A. VAN DER KEMP, D. THOMAS, A. GEIGER, P. NEHLS *et al.*, 1994 Formamidopyrimidine DNA glycosylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **22**: 3760-3764.
- DE SOUZA-PINTO, N. C., S. MAYNARD, K. HASHIGUCHI, J. HU, M. MUFTUOGLU *et al.*, 2009 The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **29**: 4441-4454.
- DENKO, N. C., A. J. GIACCIA, J. R. STRINGER and P. J. STAMBROOK, 1994 The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5124-5128.
- DEREVYANKO, A. G., A. V. ENDUTKIN, A. A. ISHCHENKO, M. K. SAPARBAEV and D. O. ZHARKOV, 2012 Initiation of 8-oxoguanine base excision repair within trinucleotide tandem repeats. *Biochemistry (Mosc)* **77**: 270-279.
- DESHPANDE, A. M., I. G. IVANOVA, V. RAYKOV, Y. XUE and L. MARINGELE, 2011 Polymerase epsilon is required to maintain replicative senescence. *Mol Cell Biol* **31**: 1637-1645.
- DHERIN, C., M. DIZDAROGLU, H. DOERFLINGER, S. BOITEUX and J. P. RADICELLA, 2000 Repair of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*: identification and characterization of dOgg1, a second DNA glycosylase activity for 8-hydroxyguanine and formamidopyrimidines. *Nucleic Acids Res* **28**: 4583-4592.
- DHERIN, C., J. P. RADICELLA, M. DIZDAROGLU and S. BOITEUX, 1999 Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* **27**: 4001-4007.
- DIZDAROGLU, M., 1991 Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* **10**: 225-242.
- DIZDAROGLU, M., G. KIRKALI and P. JARUGA, 2008 Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med* **45**: 1610-1621.
- DOU, H., S. MITRA and T. K. HAZRA, 2003 Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J Biol Chem* **278**: 49679-49684.
- FAN, J., and D. M. WILSON, 3RD, 2005 Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free Radic Biol Med* **38**: 1121-1138.
- FANTINI, D., E. MORITZ, F. AUVRE, R. AMOUROUX, A. CAMPALANS *et al.*, 2013 Rapid inactivation and proteasome-mediated degradation of OGG1 contribute to the synergistic effect of hyperthermia on genotoxic treatments. *DNA Repair (Amst)* **12**: 227-237.
- FAUCHER, F., S. DOUBLIE and Z. JIA, 2012 8-oxoguanine DNA glycosylases: one lesion, three subfamilies. *Int J Mol Sci* **13**: 6711-6729.

- FORTINI, P., and E. DOGLIOTTI, 2007 Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* **6**: 398-409.
- FRIEDBERG, E. C., L. D. MCDANIEL and R. A. SCHULTZ, 2004 The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 5-10.
- FRIEDBERG, E. C., and L. B. MEIRA, 2006 Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst)* **5**: 189-209.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER and S. WOEFERAN, 2006 DNA repair and mutagenesis. ASM Press.
- FRIEDMAN, J. I., and J. T. STIVERS, 2010 Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes. *Biochemistry* **49**: 4957-4967.
- FROMME, J. C., A. BANERJEE and G. L. VERDINE, 2004 DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 43-49.
- FROMME, J. C., S. D. BRUNER, W. YANG, M. KARPLUS and G. L. VERDINE, 2003 Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nat Struct Biol* **10**: 204-211.
- FROMME, J. C., and G. L. VERDINE, 2004 Base excision repair. *Adv Protein Chem* **69**: 1-41.
- GARCIA-ORTIZ, M. V., R. R. ARIZA and T. ROLDAN-ARJONA, 2001 An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **47**: 795-804.
- GARDES-ALBERT, M., D. BONNEFONT-ROUSSELOT, Z. ABEDINZADEH and D. JORE, 2003 Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? L'actualité chimique: 91-96.
- GELLON, L., 2002 Rôle biologique des ADN glycosylases Ogg1, Ntg1, Ntg2 et leurs inter-relations avec les différents systèmes de réparation de l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat Paris 7.
- GELLON, L., M. WERNER and S. BOITEUX, 2002 Ntg2p, a *Saccharomyces cerevisiae* DNA N-glycosylase/apurinic or apyrimidinic lyase involved in base excision repair of oxidative DNA damage, interacts with the DNA mismatch repair protein Mlh1p. Identification of a Mlh1p binding motif. *J Biol Chem* **277**: 29963-29972.
- GIRARD, P. M., N. GUIBOUT and S. BOITEUX, 1997 The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **25**: 3204-3211.
- GOODE, E. L., C. M. ULRICH and J. D. POTTER, 2002 Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: 1513-1530.
- GOULA, A. V., B. R. BERQUIST, D. M. WILSON, 3RD, V. C. WHEELER, Y. TROTTIER *et al.*, 2009 Stoichiometry of base excision repair proteins correlates with increased somatic CAG instability in striatum over cerebellum in Huntington's disease transgenic mice. *PLoS Genet* **5**: e1000749.
- GREENE, C. N., and S. JINKS-ROBERTSON, 2001 Spontaneous frameshift mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: accumulation during DNA replication and removal by proofreading and mismatch repair activities. *Genetics* **159**: 65-75.
- GRIFFITHS, L. M., D. SWARTZLANDER, K. L. MEADOWS, K. D. WILKINSON, A. H. CORBETT *et al.*, 2009 Dynamic compartmentalization of base excision repair proteins in response to nuclear and mitochondrial oxidative stress. *Mol Cell Biol* **29**: 794-807.
- GROS, L., M. K. SAPARBAEV and J. LAVAL, 2002 Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* **21**: 8905-8925.
- GUIBOUT, N., B. CASTAING, P. A. VAN DER KEMP and S. BOITEUX, 2000 Catalytic and DNA binding properties of the ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between the wild type and the K241R and K241Q active-site mutant proteins. *Biochemistry* **39**: 1716-1724.
- HARDELAND, U., M. BENTELE, J. JIRICNY and P. SCHAR, 2003 The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* **31**: 2261-2271.
- HARRINGTON, J. M., and R. D. KOLODNER, 2007 *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh3 acts in repair of base-base mispairs. *Mol Cell Biol* **27**: 6546-6554.

- HARRISON, J. F., S. B. HOLLENSWORTH, D. R. SPITZ, W. C. COPELAND, G. L. WILSON *et al.*, 2005 Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res* **33**: 4660-4671.
- HASHIGUCHI, K., J. A. STUART, N. C. DE SOUZA-PINTO and V. A. BOHR, 2004 The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res* **32**: 5596-5608.
- HASSAN, A. H., S. AWAD, Z. AL-NATOUR, S. OTHMAN, F. MUSTAFA *et al.*, 2007 Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem J* **402**: 125-133.
- HAZRA, T. K., A. DAS, S. DAS, S. CHOUDHURY, Y. W. KOW *et al.*, 2007 Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)* **6**: 470-480.
- HAZRA, T. K., T. IZUMI, I. BOLDOGH, B. IMHOFF, Y. W. KOW *et al.*, 2002 Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3523-3528.
- HE, Y. F., B. Z. LI, Z. LI, P. LIU, Y. WANG *et al.*, 2011 Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**: 1303-1307.
- HEGDE, M. L., T. K. HAZRA and S. MITRA, 2008 Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**: 27-47.
- HEGDE, M. L., P. M. HEGDE, L. J. BELLOT, S. M. MANDAL, T. K. HAZRA *et al.*, 2013 Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E3090-3099.
- HILL, J. W., T. K. HAZRA, T. IZUMI and S. MITRA, 2001 Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res* **29**: 430-438.
- HIRANO, T., 2008 Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J Radiat Res (Tokyo)* **49**: 329-340.
- HOEIJMAKERS, J. H., 2001 Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
- HOLLIS, T., A. LAU and T. ELLENBERGER, 2000 Structural studies of human alkyladenine glycosylase and *E. coli* 3-methyladenine glycosylase. *Mutat Res* **460**: 201-210.
- HOMBAUER, H., C. S. CAMPBELL, C. E. SMITH, A. DESAI and R. D. KOLODNER, 2011 Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates. *Cell* **147**: 1040-1053.
- HUBSCHER, U., G. MAGA and S. SPADARI, 2002 Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163.
- HUFFMAN, J. L., O. SUNDHEIM and J. A. TAINER, 2005 DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* **577**: 55-76.
- HUNG, R. J., J. HALL, P. BRENNAN and P. BOFFETTA, 2005 Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **162**: 925-942.
- IIDA, T., and H. ARAKI, 2004 Noncompetitive counteractions of DNA polymerase epsilon and ISW2/yCHRA1 for epigenetic inheritance of telomere position effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **24**: 217-227.
- IMAI, K., G. SLUPPHAUG, W. I. LEE, P. REVY, S. NONOYAMA *et al.*, 2003 Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* **4**: 1023-1028.
- ITO, S., L. SHEN, Q. DAI, S. C. WU, L. B. COLLINS *et al.*, 2011 Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**: 1300-1303.
- JACOBS, A. L., and P. SCHAR, 2012 DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* **121**: 1-20.
- JESSBERGER, R., V. PODUST, U. HUBSCHER and P. BERG, 1993 A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *J Biol Chem* **268**: 15070-15079.

- KANGASPEKA, S., B. STRIDE, R. METIVIER, M. POLYCARPOU-SCHWARZ, D. IBBERSON *et al.*, 2008 Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**: 112-115.
- KARAHALIL, B., P. M. GIRARD, S. BOITEUX and M. DIZDAROGLU, 1998 Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucleic Acids Res* **26**: 1228-1233.
- KASAI, H., P. F. CRAIN, Y. KUCHINO, S. NISHIMURA, A. OOTSUYAMA *et al.*, 1986 Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**: 1849-1851.
- KASAI, H., and S. NISHIMURA, 1984 Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* **12**: 2137-2145.
- KESTI, T., W. H. McDONALD, J. R. YATES, 3RD and C. WITTENBERG, 2004 Cell cycle-dependent phosphorylation of the DNA polymerase epsilon subunit, Dpb2, by the Cdc28 cyclin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**: 14245-14255.
- KIM, M. S., T. KONDO, I. TAKADA, M. Y. YOUN, Y. YAMAMOTO *et al.*, 2009 DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature* **461**: 1007-1012.
- KIM, S. W., D. U. KIM, J. K. KIM, L. W. KANG and H. S. CHO, 2008 Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int J Biol Macromol* **42**: 356-361.
- KIM, Y. J., and D. M. WILSON, 3RD, 2012 Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* **5**: 3-13.
- KIRKINEZOS, I. G., and C. T. MORAES, 2001 Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* **12**: 449-457.
- KLAUNIG, J. E., and L. M. KAMENDULIS, 2004 The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 239-267.
- KLUNGLAND, A., and S. BJELLAND, 2007 Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* **6**: 481-488.
- KLUNGLAND, A., I. ROSEWELL, S. HOLLENBACH, E. LARSEN, G. DALY *et al.*, 1999 Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13300-13305.
- KOHNO, T., K. SHINMURA, M. TOSAKA, M. TANI, S. R. KIM *et al.*, 1998 Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* **16**: 3219-3225.
- KOVTUN, I. V., Y. LIU, M. BJORAS, A. KLUNGLAND, S. H. WILSON *et al.*, 2007 OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* **447**: 447-452.
- KOVTUN, I. V., and C. T. MCMURRAY, 2008 Features of trinucleotide repeat instability in vivo. *Cell Res* **18**: 198-213.
- KROGAN, N. J., G. CAGNEY, H. YU, G. ZHONG, X. GUO *et al.*, 2006 Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643.
- KRWAWICZ, J., K. D. ARCZEWSKA, E. SPEINA, A. MACIEJEWSKA and E. GRZESIUK, 2007 Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol* **54**: 413-434.
- KRYSTON, T. B., A. B. GEORGIEV, P. PISSIS and A. G. GEORGAKILAS, 2011 Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* **711**: 193-201.
- KUNKEL, T. A., and P. M. BURGERS, 2008 Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol* **18**: 521-527.
- LE BIHAN, Y.-V., 2009 Etude structurale et fonctionnelle de la reconnaissance et de la métabolisation de lésions puriques et pyrimidiques dans l'ADN par la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase. Thèse de doctorat Université d'Orléans.
- LEE, J., D. A. GOLD, A. SHEVCHENKO, A. SHEVCHENKO and W. G. DUNPHY, 2005 Roles of replication fork-interacting and Chk1-activating domains from Claspin in a DNA replication checkpoint response. *Mol Biol Cell* **16**: 5269-5282.

- LEE, S., C. T. RADOM and G. L. VERDINE, 2008 Trapping and structural elucidation of a very advanced intermediate in the lesion-extrusion pathway of hOGG1. *J Am Chem Soc* **130**: 7784-7785.
- LI, Y., 1998 Thèse de doctorat Université de Californie, Berkeley.
- LI, Y., H. ASAHARA, V. S. PATEL, S. ZHOU and S. LINN, 1997 Purification, cDNA cloning, and gene mapping of the small subunit of human DNA polymerase epsilon. *J Biol Chem* **272**: 32337-32344.
- LINDAHL, T., and D. E. BARNES, 2000 Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 127-133.
- LIPMAN, R. S., J. CHEN, C. EVILIA, O. VITSEVA and Y. M. HOU, 2003 Association of an aminoacyl-tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* **42**: 7487-7496.
- LIU, Y., R. PRASAD, W. A. BEARD, E. W. HOU, J. K. HORTON *et al.*, 2009 Coordination between polymerase beta and FEN1 can modulate CAG repeat expansion. *J Biol Chem* **284**: 28352-28366.
- LIU, Y., and S. H. WILSON, 2012 DNA base excision repair: a mechanism of trinucleotide repeat expansion. *Trends Biochem Sci* **37**: 162-172.
- LOMBARD, D. B., K. F. CHUA, R. MOSTOSLAVSKY, S. FRANCO, M. GOSTISSA *et al.*, 2005 DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**: 497-512.
- LONGLEY, M. J., R. PRASAD, D. K. SRIVASTAVA, S. H. WILSON and W. C. COPELAND, 1998 Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12244-12248.
- LOU, H., M. KOMATA, Y. KATOU, Z. GUAN, C. C. REIS *et al.*, 2008 Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint. *Mol Cell* **32**: 106-117.
- LU, J., and Y. LIU, 2010 Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. *EMBO J* **29**: 398-409.
- LU, R., H. M. NASH and G. L. VERDINE, 1997 A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr Biol* **7**: 397-407.
- MACLEAN, M. J., R. AAMODT, N. HARRIS, I. ALSETH, E. SEEBERG *et al.*, 2003 Base excision repair activities required for yeast to attain a full chronological life span. *Aging Cell* **2**: 93-104.
- MAKI, H., and M. SEKIGUCHI, 1992 MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**: 273-275.
- MAKINIEMI, M., T. HILLUKKALA, J. TUUSA, K. REINI, M. VAARA *et al.*, 2001 BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem* **276**: 30399-30406.
- MALDONADO, E., R. SHIEKHATTAR, M. SHELTON, H. CHO, R. DRAPKIN *et al.*, 1996 A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**: 86-89.
- MARNETT, L. J., 2000 Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**: 361-370.
- MARSIN, S., A. E. VIDAL, M. SOSSOU, J. MENISSIER-DE MURCIA, F. LE PAGE *et al.*, 2003 Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* **278**: 44068-44074.
- MASUMOTO, H., A. SUGINO and H. ARAKI, 2000 Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 2809-2817.
- MAYNARD, S., S. H. SCHURMAN, C. HARBOE, N. C. DE SOUZA-PINTO and V. A. BOHR, 2009 Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **30**: 2-10.
- MELIS, J. P., S. W. WIJNHOFEN, R. B. BEEMS, M. ROODBERGEN, J. VAN DEN BERG *et al.*, 2008 Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res* **68**: 1347-1353.
- METIVIER, R., R. GALLAIS, C. TIFFOCHE, C. LE PERON, R. Z. JURKOWSKA *et al.*, 2008 Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**: 45-50.
- MICHAELS, M. L., and J. H. MILLER, 1992 The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* **174**: 6321-6325.

- MICHAELS, M. L., L. PHAM, C. CRUZ and J. H. MILLER, 1991 MutM, a protein that prevents G.C----T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* **19**: 3629-3632.
- MIGDAL, C., and M. SERRES, 2011 Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Mèdecine/sciences* **27**: 405-412.
- MOKKAPATI, S. K., L. WIEDERHOLD, T. K. HAZRA and S. MITRA, 2004 Stimulation of DNA glycosylase activity of OGG1 by NEIL1: functional collaboration between two human DNA glycosylases. *Biochemistry* **43**: 11596-11604.
- MORALES-RUIZ, T., A. P. ORTEGA-GALISTEO, M. I. PONFERRADA-MARIN, M. I. MARTINEZ-MACIAS, R. R. ARIZA *et al.*, 2006 DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6853-6858.
- MORLAND, I., L. LUNA, E. GUSTAD, E. SEEBERG and M. BJORAS, 2005 Product inhibition and magnesium modulate the dual reaction mode of hOgg1. *DNA Repair (Amst)* **4**: 381-387.
- MORRISON, A., H. ARAKI, A. B. CLARK, R. K. HAMATAKE and A. SUGINO, 1990 A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* **62**: 1143-1151.
- MORRISON, A., J. B. BELL, T. A. KUNKEL and A. SUGINO, 1991 Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'----5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9473-9477.
- MORRISON, A., and A. SUGINO, 1994 The 3'-->5' exonucleases of both DNA polymerases delta and epsilon participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 289-296.
- MOSER, J., H. KOOL, I. GIAKZIDIS, K. CALDECOTT, L. H. MULLENDERS *et al.*, 2007 Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* **27**: 311-323.
- MOSTOSLAVSKY, R., K. F. CHUA, D. B. LOMBARD, W. W. PANG, M. R. FISCHER *et al.*, 2006 Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**: 315-329.
- NASH, H. M., S. D. BRUNER, O. D. SCHARER, T. KAWATE, T. A. ADDONA *et al.*, 1996 Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* **6**: 968-980.
- NAYLOR, S. L., B. E. JOHNSON, J. D. MINNA and A. Y. SAKAGUCHI, 1987 Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* **329**: 451-454.
- NEELEY, W. L., and J. M. ESSIGMANN, 2006 Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* **19**: 491-505.
- NEUBERGER, M. S., R. S. HARRIS, J. DI NOIA and S. K. PETERSEN-MAHRT, 2003 Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* **28**: 305-312.
- NICK MCELHINNY, S. A., D. A. GORDENIN, C. M. STITH, P. M. BURGERS and T. A. KUNKEL, 2008 Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**: 137-144.
- NILSEN, H., M. OTTERLEI, T. HAUG, K. SOLUM, T. A. NAGELHUS *et al.*, 1997 Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res* **25**: 750-755.
- NISHIMURA, S., 2002 Involvement of mammalian OGG1(MMH) in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA. *Free Radic Biol Med* **32**: 813-821.
- NISHIOKA, K., T. OHTSUBO, H. ODA, T. FUJIWARA, D. KANG *et al.*, 1999 Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* **10**: 1637-1652.
- NOHMI, T., S. R. KIM and M. YAMADA, 2005 Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat Res* **591**: 60-73.
- NOREN HOOTEN, N., K. KOMPANIEZ, J. BARNES, A. LOHANI and M. K. EVANS, 2011 Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem* **286**: 44679-44690.
- NORMAN, D. P., S. J. CHUNG and G. L. VERDINE, 2003 Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase. *Biochemistry* **42**: 1564-1572.

- OHTSUBO, T., K. NISHIOKA, Y. IMAISO, S. IWAI, H. SHIMOKAWA *et al.*, 2000 Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* **28**: 1355-1364.
- OHYA, T., Y. KAWASAKI, S. HIRAGA, S. KANBARA, K. NAKAJO *et al.*, 2002 The DNA polymerase domain of pol(epsilon) is required for rapid, efficient, and highly accurate chromosomal DNA replication, telomere length maintenance, and normal cell senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 28099-28108.
- OSTEROD, M., E. LARSEN, F. LE PAGE, J. G. HENGSTLER, G. T. VAN DER HORST *et al.*, 2002 A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene* **21**: 8232-8239.
- PARK, M. J., J. H. PARK, S. H. HAHM, S. I. KO, Y. R. LEE *et al.*, 2009 Repair activities of human 8-oxoguanine DNA glycosylase are stimulated by the interaction with human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 complex. *DNA Repair (Amst)* **8**: 1190-1200.
- PARSONS, J. L., and G. L. DIANOV, 2013 Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)* **12**: 326-333.
- PAVLOV, Y. I., S. MAKI, H. MAKI and T. A. KUNKEL, 2004 Evidence for interplay among yeast replicative DNA polymerases alpha, delta and epsilon from studies of exonuclease and polymerase active site mutations. *BMC Biol* **2**: 11.
- PAVLOV, Y. I., I. M. MIAN and T. A. KUNKEL, 2003 Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast. *Curr Biol* **13**: 744-748.
- PAVLOV, Y. I., and P. V. SHCHERBAKOVA, 2010 DNA polymerases at the eukaryotic fork-20 years later. *Mutat Res* **685**: 45-53.
- PETERSEN, O., A. SPAT and A. VERKHRAATSKY, 2005 Introduction: reactive oxygen species in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 2197-2199.
- PLEASANCE, E. D., R. K. CHEETHAM, P. J. STEPHENS, D. J. MCBRIDE, S. J. HUMPHRAY *et al.*, 2010 A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**: 191-196.
- POOT, R. A., G. DELLAIRE, B. B. HULSMANN, M. A. GRIMALDI, D. F. CORONA *et al.*, 2000 HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J* **19**: 3377-3387.
- PRASAD, R., Y. LIU, L. J. DETERDING, V. P. POLTORATSKY, P. S. KEDAR *et al.*, 2007 HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol Cell* **27**: 829-841.
- PURANIK, S., K. KUMAR, P. S. SRIVASTAVA and M. PRASAD, 2011 Electrophoretic mobility shift assay reveals a novel recognition sequence for *Setaria italica* NAC protein. *Plant Signal Behav* **6**: 1588-1590.
- PURSELL, Z. F., I. ISOZ, E. B. LUNDSTROM, E. JOHANSSON and T. A. KUNKEL, 2007 Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* **317**: 127-130.
- PURSELL, Z. F., and T. A. KUNKEL, 2008 DNA polymerase epsilon: a polymerase of unusual size (and complexity). *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **82**: 101-145.
- RADICELLA, J. P., C. DHERIN, C. DESMAZE, M. S. FOX and S. BOITEUX, 1997 Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8010-8015.
- RADOM, C. T., A. BANERJEE and G. L. VERDINE, 2007 Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations. *J Biol Chem* **282**: 9182-9194.
- RAO, A., G. RAM, A. K. SAINI, R. VOHRA, K. KUMAR *et al.*, 2007 Synthesis and selection of de novo proteins that bind and impede cellular functions of an essential mycobacterial protein. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1320-1331.
- RITTER, L. M., K. BOESZE-BATTAGLIA, B. M. TAM, O. L. MORITZ, N. KHATTREE *et al.*, 2004 Uncoupling of photoreceptor peripherin/rds fusogenic activity from biosynthesis, subunit assembly, and targeting: a potential mechanism for pathogenic effects. *J Biol Chem* **279**: 39958-39967.
- ROBERTSON, A. B., A. KLUNGLAND, T. ROGNES and I. LEIROS, 2009 DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* **66**: 981-993.

- ROSENQUIST, T. A., D. O. ZHARKOV and A. P. GROLLMAN, 1997 Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7429-7434.
- SAGE, E., 1999 Les effets des rayonnements sur la cellule vivante. Colloque des 3R: Réplication, recombinaison, réparation de l'ADN.
- SAKUMI, K., M. FURUICHI, T. TSUZUKI, T. KAKUMA, S. KAWABATA *et al.*, 1993 Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem* **268**: 23524-23530.
- SAMPATH, H., V. VARTANIAN, M. R. ROLLINS, K. SAKUMI, Y. NAKABEPPU *et al.*, 2012 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One* **7**: e51697.
- SARIBASAK, H., N. N. SARIBASAK, F. M. IPEK, J. W. ELLWART, H. ARAKAWA *et al.*, 2006 Uracil DNA glycosylase disruption blocks Ig gene conversion and induces transition mutations. *J Immunol* **176**: 365-371.
- SCHARER, O. D., and J. JIRICNY, 2001 Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* **23**: 270-281.
- SEDGWICK, B., P. A. BATES, J. PAIK, S. C. JACOBS and T. LINDAHL, 2007 Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* **6**: 429-442.
- SEIBERT, E., J. B. ROSS and R. OSMAN, 2002 Role of DNA flexibility in sequence-dependent activity of uracil DNA glycosylase. *Biochemistry* **41**: 10976-10984.
- SEKIGUCHI, T., T. SASAKI, M. FUNAKOSHI, T. ISHII, Y. H. SAITOH *et al.*, 2011 Ubiquitin chains in the Dsk2 UBL domain mediate Dsk2 stability and protein degradation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **411**: 555-561.
- SHCHERBAKOVA, P. V., Y. I. PAVLOV, O. CHILKOVA, I. B. ROGOZIN, E. JOHANSSON *et al.*, 2003 Unique error signature of the four-subunit yeast DNA polymerase epsilon. *J Biol Chem* **278**: 43770-43780.
- SHIBUTANI, S., M. TAKESHITA and A. P. GROLLMAN, 1991 Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434.
- SHINMURA, K., T. KOHNO, H. KASAI, K. KODA, H. SUGIMURA *et al.*, 1998 Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* **89**: 825-828.
- SHINMURA, K., and J. YOKOTA, 2001 The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* **3**: 597-609.
- SLUPSKA, M. M., C. BAIKALOV, W. M. LUTHER, J. H. CHIANG, Y. F. WEI *et al.*, 1996 Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **178**: 3885-3892.
- STRANG, B. L., and D. M. COEN, 2010 Interaction of the human cytomegalovirus uracil DNA glycosylase UL114 with the viral DNA polymerase catalytic subunit UL54. *J Gen Virol* **91**: 2029-2033.
- SWARTZLANDER, D. B., N. C. BAUER, A. H. CORBETT and P. W. DOETSCH, 2012 Regulation of base excision repair in eukaryotes by dynamic localization strategies. *Prog Mol Biol Transl Sci* **110**: 93-121.
- SWEASY, J. B., T. LANG, D. STARCEVIC, K. W. SUN, C. C. LAI *et al.*, 2005 Expression of DNA polymerase {beta} cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14350-14355.
- TAKAO, M., H. ABURATANI, K. KOBAYASHI and A. YASUI, 1998 Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **26**: 2917-2922.
- TEIXEIRA, M. T., 2013 Saccharomyces cerevisiae as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening. *Front Oncol* **3**: 101.
- TERPE, K., 2003 Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 523-533.
- THOMAS, D., A. D. SCOT, R. BARBEY, M. PADULA and S. BOITEUX, 1997 Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in Saccharomyces cerevisiae: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet* **254**: 171-178.

- TSUBOTA, T., R. TAJIMA, K. ODE, H. KUBOTA, N. FUKUHARA *et al.*, 2006 Double-stranded DNA binding, an unusual property of DNA polymerase epsilon, promotes epigenetic silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 32898-32908.
- TUO, J., M. MUFTUOGLU, C. CHEN, P. JARUGA, R. R. SELZER *et al.*, 2001 The Cockayne Syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8-hydroxyguanine in DNA. *J Biol Chem* **276**: 45772-45779.
- VAFA, O., M. WADE, S. KERN, M. BEECHE, T. K. PANDITA *et al.*, 2002 c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**: 1031-1044.
- VALINLUCK, V., and L. C. SOWERS, 2007 Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* **67**: 946-950.
- VAN DER KEMP, P. A., J. B. CHARBONNIER, M. AUDEBERT and S. BOITEUX, 2004 Catalytic and DNA-binding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP lyase: biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket. *Nucleic Acids Res* **32**: 570-578.
- VAN DER KEMP, P. A., D. THOMAS, R. BARBEY, R. DE OLIVEIRA and S. BOITEUX, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5197-5202.
- VAN LOON, B., E. MARKKANEN and U. HUBSCHER, 2010 Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* **9**: 604-616.
- VIDAL, A. E., I. D. HICKSON, S. BOITEUX and J. P. RADICELLA, 2001 Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* **29**: 1285-1292.
- VLATKOVIC, N., S. GUERRERA, Y. LI, S. LINN, D. S. HAINES *et al.*, 2000 MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res* **28**: 3581-3586.
- WALLACE, S. S., 1988 AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen* **12**: 431-477.
- WANG, J., A. K. SATTAR, C. C. WANG, J. D. KARAM, W. H. KONIGSBERG *et al.*, 1997 Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* **89**: 1087-1099.
- WARIS, G., and H. AHSAN, 2006 Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* **5**: 14.
- WIJNHOFEN, S. W., H. J. KOOL, L. H. MULLENDERS, A. A. VAN ZEELAND, E. C. FRIEDBERG *et al.*, 2000 Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene* **19**: 5034-5037.
- WILLIAMS, L. N., A. J. HERR and B. D. PRESTON, 2013 Emergence of DNA polymerase epsilon antimutators that escape error-induced extinction in yeast. *Genetics* **193**: 751-770.
- WILLIAMS, S. D., and S. S. DAVID, 1998 Evidence that MutY is a monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA. *Nucleic Acids Res* **26**: 5123-5133.
- WILSON, D. M., 3RD, and V. A. BOHR, 2007 The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* **6**: 544-559.
- WISEMAN, H., and B. HALLIWELL, 1996 Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* **313 (Pt 1)**: 17-29.
- XIE, Y., H. YANG, C. CUNANAN, K. OKAMOTO, D. SHIBATA *et al.*, 2004 Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* **64**: 3096-3102.
- YAKES, F. M., and B. VAN HOUTEN, 1997 Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 514-519.

- YAMANE, A., T. KOHNO, K. ITO, N. SUNAGA, K. AOKI *et al.*, 2004 Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis* **25**: 1689-1694.
- YANG, B., K. CHEN, C. ZHANG, S. HUANG and H. ZHANG, 2007 Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* **282**: 11667-11675.
- YANO, R., M. OAKES, M. YAMAGISHI, J. A. DODD and M. NOMURA, 1992 Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 5640-5651.
- ZHARKOV, D. O., 2008 Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1544-1565.
- ZHARKOV, D. O., T. A. ROSENQUIST, S. E. GERCHMAN and A. P. GROLLMAN, 2000 Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **275**: 28607-28617.
- ZHU, B., D. BENJAMIN, Y. ZHENG, H. ANGLIKER, S. THIRY *et al.*, 2001 Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5031-5036.
- ZHU, B., Y. ZHENG, H. ANGLIKER, S. SCHWARZ, S. THIRY *et al.*, 2000 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* **28**: 4157-4165.

Kadija ESSALHI

Interaction entre yOgg1, une ADN glycosylase de la voie BER et l'ADN polymérase répliquative Pol ϵ , chez *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé :

Les dommages oxydatifs de l'ADN sont impliqués dans les processus pathologiques que sont le cancer, les maladies neurodégénératives ou le vieillissement. Ces dommages résultent en partie de l'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui proviennent du métabolisme cellulaire ou d'agents exogènes (physiques ou chimiques), et qui conduisent à différents types de lésions parmi lesquelles l'oxydation des bases de l'ADN (8-oxoguanine, 8-oxoG) ou la formation de sites abasiques AP (apurique/apyrimidique). Ces lésions, qui si elles ne sont pas éliminées conduisent à des processus de mutagenèse ou de mort cellulaire, sont prises en charge spécifiquement par le système de réparation de l'ADN par excision de base ou BER. Le BER est initié par l'action d'une ADN glycosylase, telles que la 8-oxoG-ADN glycosylase (Ogg1) chargée d'éliminer la 8-oxoG, une lésion très abondante. Une étude par « double-hybride » initiatrice de ce projet a révélé l'existence d'une interaction *in vivo* chez *S. cerevisiae* entre la protéine yOgg1 et la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase répliquative Pol ϵ (yPol2), également impliquée dans la voie BER chez la levure. Nos travaux démontrent que yOgg1 et yPol2 interagissent bien physiquement entre elles et de façon spécifique. Une étude par troncations et mutagenèse dirigée nous a permis d'identifier le domaine 3'→5' exonucléase de yPol2 comme faisant partie de la forme tronquée minimale de yPol2 capable d'interagir avec yOgg1. La poche du site actif de yOgg1 et/ou son voisinage immédiat pourrait contenir pour partie le site d'interaction pour yPol2. Nous observons d'ailleurs une corrélation nette entre l'activité de yOgg1 et sa capacité à interagir avec yPol2 dans la levure. De même, l'activité 3'→5' exonucléase de yPol2 pourrait être liée à son interaction avec yOgg1. D'un point de vue fonctionnel, yPol2 stimulerait l'activité AP lyase de yOgg1 et le couplage entre l'activité ADN glycosylase et AP lyase de l'enzyme, permettant ainsi une meilleure coordination de l'étape d'excision du nucléoside endommagé et l'étape de resynthèse de l'ADN dans la voie BER.

Mots clés: Réparation de l'ADN ; Réparation par excision de base ; 8-oxoG-ADN glycosylase ; ADN polymérase répliquative ϵ ; Interaction physique, Double-hybride

yOgg1, a *Saccharomyces cerevisiae* bifunctional DNA glycosylase involved in base excision repair of oxidative DNA damage, interacts with the replicative DNA polymerase, Pol ϵ .

Abstract :

Oxidative DNA damages are involved in pathological processes such as cancer, neurodegenerative diseases and aging. Part of these damages results from the action of reactive oxygen species (ROS), which are produced by cellular metabolism or (physical or chemical) exogenous agents. They lead to different types of DNA lesions including DNA base oxidation (8-oxoguanine, 8-oxoG) and abasic site formation (AP, apuric/apyrimidic). If not removed, these lesions lead to mutagenesis or cell death. Most of base lesions are dealt specifically by the base excision repair (BER) pathway. BER is initiated by a DNA glycosylase, such as 8-oxoG-DNA glycosylase (Ogg1) which is responsible for the removal of 8-oxoG. In previous unpublished work, a yeast two-hybrid study revealed the existence in *S. cerevisiae* of an interaction between yOgg1 and the catalytic subunit of the replicative DNA polymerase Pol ϵ (yPol2), also involved in the BER pathway in eukaryotes. Our work shows that yOgg1 and yPol2 physically and specifically interact with each other. Truncation and site-directed mutagenesis studies allowed us to identify the 3' → 5' exonuclease activity domain of yPol2 as part of the minimal form of yPol2 still able to interact with yOgg1. The active site of yOgg1 and/or its immediate vicinity may contain part of its interaction domain with yPol2. Besides, we observe a clear correlation between yOgg1 catalytic activity and its ability to interact with yPol2 *in vivo*. Similarly, the 3'→5' exonuclease activity of yPol2 could be useful to its interaction with yOgg1. From a functional point of view, yPol2 stimulates *in vitro* the AP lyase activity of yOgg1 and the coupling of both DNA glycosylase and AP lyase enzyme activity. The interaction yOgg1/yPol2 could allow a better coordination of damaged nucleoside excision and DNA re-synthesis steps in BER.

Keywords: DNA repair; Base excision repair; 8-oxoG-DNA glycosylase; Replicative DNA polymerase Pol ϵ ; Physical interaction; Yeast-two-hybrid system



Centre de Biophysique Moléculaire
Equipe « Interactions nucléoprotéiques : Approches structurales et
Fonctionnelles de la Réparation de l'ADN »
Rue Charles Sadron
45071 Orléans cedex 2



