



HAL
open science

Réparation de l'ADN par une protéine “ Radical-SAM ” : Etude de la Spore Photoproduit Lyase

Alexia Chandor-Proust

► **To cite this version:**

Alexia Chandor-Proust. Réparation de l'ADN par une protéine “ Radical-SAM ” : Etude de la Spore Photoproduit Lyase. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00376741

HAL Id: tel-00376741

<https://theses.hal.science/tel-00376741>

Submitted on 20 Apr 2009

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.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie / Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Alexia CHANDOR-PROUST

Le 28 novembre 2008

Réparation de l'ADN par une protéine « Radical-SAM »

Etude de la Spore Photoproduct Lyase

Composition du jury

Président : Pr. Alain FAVIER
Rapporteurs: Dr. Pascale CLIVIO
Dr. Bertrand CASTAING
Examineur : Pr. Olivier PLOUX
Directeur : Dr. Mohamed ATTA
Co-directeur : Pr. Marc FONTECAVE

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
CEA – Grenoble
iRTSV/LCBM – CNRS – Université Joseph Fourier

RESUME

Chez les spores de bactéries, le photoproduit le plus abondant formé dans l'ADN irradié par les UV est un dimère de thymine appelé Photoproduit des spores (SP, 5-(α -thyminyl)-5,6-dihydrothymine). Au début de la germination, ce photoproduit est spécifiquement réparé par une enzyme, la Spore Photoproduit Lyase (SPL), régénérant les deux résidus thymine originaux. Cette enzyme est une protéine Fe-S qui appartient à la famille des « Radical-SAM ». Les protéines de cette famille d'enzymes possèdent un centre [4Fe-4S], coordonné par 3 cystéines conservées organisées selon le motif CxxxCxxC, et utilisent la S-Adénosylméthionine comme cofacteur. Elles fonctionnent toutes selon un mécanisme radicalaire, initié par la formation du radical 5'-désoxyadénosyle issu de la coupure homolytique de la S-Adénosylméthionine par le centre [4Fe-4S] réduit. Dans ce travail, nous avons effectué une caractérisation biochimique et spectroscopique des SPL de *Clostridium acetobutylicum* et *Bacillus subtilis*. Par ailleurs, nous avons synthétisé un substrat minimum sous la forme d'un dinucléoside monophosphate appelé SPTpT, pour lequel une caractérisation structurale par RMN a été réalisée. Le SPTpT est reconnu et efficacement réparé par l'enzyme, ce qui nous a permis d'obtenir de nouvelles informations sur le mécanisme enzymatique de réparation. Enfin, la séquence primaire des SPL contient une 4^e cystéine conservée, essentielle à la réparation, mais qui n'est pas impliquée dans la coordination du centre [Fe-S]. Nous nous sommes intéressés au rôle de cette cystéine dans le mécanisme de réparation grâce à l'étude biochimique et enzymatique du mutant SPLC141A.

MOTS CLES : spore, ADN, lésion de l'ADN, photoproduit, réparation de l'ADN, SPL, Radical-SAM, centre fer-soufre

TITLE : Study of Spore Photoproduit Lyase, a “Radical-SAM” enzyme involved in DNA repair

ABSTRACT

The major photoproduct of UV-irradiated DNA from bacterial spores is 5-(α -thyminyl)-5,6-dihydrothymine, a unique thymine dimer called Spore Photoproduct (SP). At the beginning of germination, this photoproduct is specifically repaired by the Spore Photoproduct Lyase (SPL), regenerating the two thymine monomers. SPL belongs to a family of iron-sulfur enzymes named « Radical-SAM ». In this family, proteins have a [4Fe-4S] cluster, chelated by three cysteines highly conserved constituting the “Radical-SAM” motif CxxxCxxC, and use S-Adenosylmethionine as a cofactor. They all use a radical based mechanism, initiated by 5'-deoxyadenosyl radical formation, derived from the homolytic cleavage of S-Adenosylmethionine by the reduced [4Fe-4S] cluster. Here, we have characterized, by biochemical and spectroscopic methods, the recombinant SPL from *Clostridium acetobutylicum* or *Bacillus subtilis*. Furthermore, we have synthesized a novel substrate called SPTpT under the form of a dinucleoside monophosphate. The structural characterization of this compound, using NMR spectroscopy, has been carried out. Moreover, this substrate is recognized and efficiently repaired by this enzyme, providing a convenient way to investigate the repair mechanism. Finally, the sequence of all SPL contains a fourth well-conserved cysteine. Site-directed mutagenesis shows that this residue is strongly involved in the repair mechanism but not in the cluster formation. The role of this cysteine 141 in the catalytic mechanism has been studied.

KEYWORDS: spore, DNA, DNA lesion, photoproduct, DNA repair, SPL, Radical-SAM, iron-sulfur cluster

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Fontecave de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques devenu le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, de m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en biochimie en octobre 2005. Je te remercie pour ta disponibilité, les réunions de travail très motivantes et les discussions scientifiques très enrichissantes que nous avons eues.

Je remercie également mon directeur de thèse Mohamed Atta ; pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse et pour ton encadrement au quotidien.

Mes remerciements vont également à Sandrine Ollagnier-de-Choudens, si impliquée dans ce sujet passionnant même si ça n'était pas « officiel ». Merci de t'être impliquée dans ma formation pratique en biochimie, merci pour tes conseils et ton suivi régulier, jusqu'à la rédaction de ce manuscrit et pour ta disponibilité lors de la préparation de ma soutenance.

Je désire ensuite exprimer mes plus chaleureux remerciements à Thierry Douki et Didier Gasparutto, pour m'avoir initiée à la chimie et la photochimie particulière de l'ADN. Merci pour votre accueil dans votre laboratoire, pour votre gentillesse qui m'ont permis de me sentir à l'aise dans ce laboratoire que j'ai fréquenté par intermittence, et surtout pour m'avoir appris tant de choses.

Je tiens également à remercier les différentes personnes qui ont collaboré à mon travail :

Tout d'abord Serge Gambarelli, merci pour ta pédagogie en ce qui concerne les explications des principes de la RPE et de la spectroscopie Hyscore ;

Je remercie le laboratoire de Résonances Magnétiques du CEA, en particulier Michel Bardet, Jean-Marie Mouesca, Claire Mantel et Pierre-Alain Bayle pour leur implication dans le projet et leurs immenses compétences qui nous ont permis de répondre à une question cruciale sur le sujet ;

Yvain Nicolet, je te remercie d'avoir accepté d'essayer de cristalliser la SPL, et je m'excuse auprès de toi de ne pas avoir pu te donner de protéine suffisamment pure. J'espère que cela aboutira un jour.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du jury, Alain Favier, Pascale Clivio, Bertrand Castaing et Olivier Ploux, pour avoir accepté de juger mon travail.

Vient le tour de remercier tous les membres du LCBM, sans qui mes trois années passées au laboratoire n'auraient pas été si sympatiques !

Merci à tous, chimistes ou biochimistes, pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir (Etienne, Vincent N, Vincent A, Stéphane, Olivier, Caroline Marchi, Cathy, Fabien) et pour les moments de détente au café. Nico, je te remercie pour les premières manip de RMN que nous avons faites ensemble et aussi pour les discussions prolongées devant la porte du labo de RMN.

Des « Special Thanks » pour « Les Filles », qui plus que des collègues sont devenues de véritables amies, Maïté avec qui j'ai partagé beaucoup plus qu'un bureau ; Emilie ta gentillesse n'a pas d'égal ; Carole, merci pour ce que tu m'as appris en purification de protéines et bien plus (pas seulement professionnellement), ta bonne humeur et ta tchatche ; la mystérieuse Carine et tes expressions spontanées devenues célèbres ; Guni pour m'avoir permis de pratiquer un tout petit peu l'allemand pendant 2 ans ; Chantal pour être à la fois une maman et une mamie de substitution ; Adeline pas seulement pour ma mosaïque, mais aussi pour partager mes goûts télévisuels !! Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les bons moments passés ensemble au labo et à l'extérieur, pour mon enterrement de vie de jeune fille, pour les surprises lors de mon mariage, pour mes cadeaux de thèse, pour m'avoir soutenue dans les moments de doute, etc... vous êtes géniales.

Je n'oublierai pas Sigolène (je compte sur toi pour perpétuer le fameux Chimie Pariiiiiis) ; Florence, Pascal et son humour que j'apprécie beaucoup, Eric pour ses potins, Stéphane Mouret pour m'avoir formée à l'utilisation du spectro de masse et pour ses nombreux conseils, Silke, Cécile, Simon, Pierre-André et tous ceux qui ne sont plus au LCBM, Caro Ranquet, Yohan, Aziz pour les bons moments passés au labo.

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille, Edouard, Valentin et mes parents pour votre amour, votre confiance et votre soutien permanent ; ma grand-mère Nicole, Jean et Odile pour tout ce que vous avez fait pour moi ; Jacques et Martine Proust, qui avez accepté qu'un docteur de plus entre dans votre famille et enfin et surtout Alexandre qui a accepté de me suivre à Grenoble et est devenu mon mari pendant cette thèse. Je te remercie pour ton amour incommensurable, pour toujours croire en moi et pour m'avoir soutenue même dans certains moments de doute, merci pour tout ce que tu fais pour moi et pour ce que tu m'apportes au quotidien.

Table des matières

<i>Abréviations et notations</i>	15
<i>Introduction</i>	21
I. Les spores de bactéries	24
I.1. Structure et caractéristiques des spores	25
I.2. Sporulation	28
I.3. Germination	29
II. Agressions UV et réparation de l'ADN	30
II.1. Rappels sur l'ADN (structure, rôle et nomenclature)	30
II.2. Les lésions de l'ADN	37
II.3. Réparation des lésions photoinduites	44
II.4. Le Photoproduit des spores	48
III. La Spore Photoproduit Lyase	63
III.1. Mise en évidence d'un processus de réparation spécifique	63
III.2. La Spore Photoproduit Lyase	64
IV. Les protéines de la famille « Radical-SAM »	67
IV.1. Les protéines à centre [Fe-S]	67
IV.2. La famille des « Radical-SAM »	68
IV.3. La Spore Photoproduit Lyase : Mécanisme proposé	74
V. Objectifs de la thèse	77
<i>Matériels et Méthodes</i>	79
I. Matériels biologiques	81
I.1. Souches bactériennes	81
I.2. Vecteur de surexpression	82
I.3. Milieux de culture	82
II. Méthodes de biologie moléculaire	83
II.1. Introduction d'ADN dans E. coli	83
II.2. Amplification par PCR - Mutagenèse dirigée	84
III. Méthodes biochimiques	86
III.1. Obtention des protéines	86
III.2. Reconstitution du centre [Fe-S] de la SPL	88
III.3. Analyses biochimiques	89

III.4.	Libération du Photoproduit des spores de l'ADN par voie enzymatique	93
III.5.	Tests enzymatiques	95
IV.	Méthodes Chimiques	98
IV.1.	Produits chimiques	98
IV.2.	Synthèses	98
V.	Techniques physico-chimiques – Méthodes analytiques	105
V.1.	Spectrophotométrie UV-visible	105
V.2.	Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	107
V.3.	Spectroscopie Hyscore	109
V.4.	Spectroscopie Mössbauer	111
V.5.	Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	114
V.6.	Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse	118
V.7.	Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	119
V.8.	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	121
	Résultats	123
	<i>Partie I Expression, Purification et Caractérisation de La Spore Photoproduit Lyase</i>	125
	Chapitre 1 : Résultats	129
I.	Obtention des protéines (sauvages et mutées) de Bacillus subtilis et Clostridium acetobutylicum	129
I.1.	Expression et purification des protéines recombinantes en aérobiose	129
I.2.	Quantification du Fer et du Soufre	132
I.3.	Purification de la SPL recombinante de C. acetobutylicum en anaérobiose	132
I.4.	Reconstitution des protéines purifiées en aérobiose	133
I.5.	Caractérisation biochimique de la SPL de B. subtilis reconstituée	134
II.	Caractérisation spectroscopique du centre [Fe-S]	134
II.1.	Caractérisation du centre [Fe-S] après reconstitution	134
II.2.	Caractérisation par RPE du centre après oxydation	138
II.3.	Caractérisation du centre [Fe-S] à l'état réduit ([4Fe-4S] ¹⁺)	139
	Chapitre 2 : Discussion	143
	<i>Partie II Synthèse du Photoproduit des spores</i>	147
	Chapitre 1 : Résultats	150

I. Synthèse du SPTpT	150
I.1. Préparation du dinucléoside monophosphate TpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine)	150
I.2. Préparation du Photoproduit des spores SPTpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine)	152
I.3. Détermination de la configuration absolue du C5 du SPTpT par RMN	155
II. Obtention du 11mer contenant le Photoproduit des spores, simple et double brin	166
II.1. Synthèse de l'oligonucléotide 11mer GCGAATTCACG et de son complémentaire	167
II.2. Irradiation UV-C – Incorporation du SP dans l'oligonucléotide	168
II.3. Séquençage de l'oligonucléotide 11merSP	169
II.4. Hybridation du 11merSP avec le 11mer _{comp}	171
Chapitre 2 : Discussion	172
<i>Partie III Quel mécanisme pour la SPL ?</i>	177
Chapitre 1 : Résultats	180
I. Activité et spécificité de la SPL sauvage de Bacillus subtilis	180
II. Activités de la SPL sauvage de Bacillus subtilis avec le SPTpT	181
II.1. Cinétique de l'activité de réparation du Photoproduit des spores	181
II.2. Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la SPL sauvage de B. subtilis pour le substrat SPTpT	182
II.3. Mesure de l'activité de réductolyse de la S-Adénosylméthionine	183
III. Activités de la SPLBsC141A de Bacillus subtilis en présence du SPTpT	185
III.1. Activité de réparation du SPTpT par la SPLBsC141A de B. subtilis	185
III.2. Activité de réductolyse de la SAM de la SPLBsC141A	187
III.3. Identification des produits issus de l'incubation de la SPLBsC141A avec le substrat SPTpT par spectrométrie de masse MS2	188
III.4. Modélisation chimique de la formation des produits A et B	193
IV. Détermination du rôle de la cystéine 141 dans la réaction enzymatique	197
IV.1. Transfert de deutérium par la S-Adénosylméthionine marquée en position 5'	198
IV.2. Marquage de la SPL par du deutérium	199
V. Test d'activité de la SPL de B. subtilis avec le substrat oligonucléotidique	204
Chapitre 2 : Discussion	206
I. Activité de réparation de la SPL sauvage	206
I.1. Le substrat SPTpT	206
I.2. Le substrat oligonucléotidique	207

II. Activité de réductolyse de la SAM	208
III. Informations mécanistiques obtenues grâce à l'étude de la SPL mutée	210
<i>Conclusion générale</i>	215
<i>Table des illustrations</i>	221
Table des figures	223
Table des schémas	229
Table des tableaux	233
<i>Références bibliographiques</i>	235
<i>Annexes</i>	253

1. Chandor, A., Berteau, O., Douki, T., Gasparutto, D., Sanakis, Y., Ollagnier-de-Choudens, S., Atta, M., and Fontecave, M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 26922-26931
2. Chandor, A., Douki, T., Gasparutto, D., Gambarelli, S., Sanakis, Y., Nicolet, Y., Ollagnier-De-Choudens, S., Atta, M., and Fontecave, M. (2007) *C. R. Chim.* **10**, 756-765
3. Chandor-Proust, A., Berteau, O., Douki, T., Gasparutto, D., Ollagnier-de-Choudens, S., Fontecave, M., and Atta, M. (2008) *J Biol Chem* **283**, 36361-36368
4. Mantel, C., Chandor, A., Gasparutto, D., Douki, T., Atta, M., Fontecave, M., Bayle, P. A., Mouesca, J. M., and Bardet, M. (2008) *J Am Chem Soc* **130**, 16978-16984

Abréviations et notations

(6-4)PP	Adduit pyrimidine(6-4)pyrimidone
Å	Angström
A	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ado•	radical 5'-désoxyadénosyle
AdoH	5'-désoxyadénosine hydrogénée
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
BET	Bromure d'Ethidium
CaCl₂	Chlorure de Calcium
CPD	Dimère cyclobutabipyrimidique
Cys (C)	Cystéine
DMPD	DiMéthyl Phénylène Diamine
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
E	Energie
EDTA	Acide Ethylène Diamine TétraAcétique
ESI	Ionisation par Electrospray
ε	Coefficient d'absorption (ou extinction) molaire
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Gauss
GHz	Gigahertz
h	Constante de Planck
HCl	Acide Chlorhydrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
Hz	Hertz
I	Spin nucléaire
IPTG	IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
mL	Millilitre

mM	Millimolaire
mV	Millivolt
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
ng	Nanogramme
NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
Ni-NTA	Nickel- Acide Nitilotriacétique
nm	Nanomètre
v	Fréquence
OD	Optical Density
pb	Paire de Bases
PCA	Acide Perchlorique
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
pmol	picomole
ppm	Parties par millions
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
Rpm	Tours par minute
Rt	Temps de rétention
S•	Radical thiyle
SAM (AdoMet)	S-Adénosylméthionine
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate polyAcrylamide Gel Electrophoresis
SP	Photoproduit des spores
SPL	Spore Photoproduit Lyase
SPTpT	Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate
T1	Temps de relaxation spin – réseau
T2	Temps de relaxation spin – spin
TEMED	N, N, N', N'-TétraMéthylEthylène Diamine
Thy	Thymine
Thd	Thymidine

TOF	Time Of Flight (Temps de vol)
TpT	Thymidily-(3'-5')-thymidine
UV	Ultra Violet
ω	Vitesse angulaire

Introduction

Les spores de bactéries sont des organites au métabolisme ralenti voire quasi-inexistant ayant des propriétés très particulières. Ainsi sont-elles extrêmement résistantes à toutes sortes d'agressions extérieures (températures élevées, irradiations UV et gamma, vide, agents chimiques). Cette résistance confère aux spores une longévité extraordinaire, qui peut aller jusqu'à plusieurs milliers d'années (Nicholson *et al.*, 2002).

Les agressions extérieures peuvent fortement endommager l'acide désoxyribonucléique ou ADN, contenu dans toutes les cellules et support de l'information génétique, qu'il est donc primordial pour un organisme vivant de protéger. Les spores de bactéries ont ainsi acquis des mécanismes leur permettant à la fois de protéger leur matériel génétique, en vue de leur survie, et également de réparer les dommages que l'ADN aurait pu subir pendant cet état cryptobiotique.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans le contexte de l'étude d'une de ces lésions subies par l'ADN après irradiation provoquée par le rayonnement solaire et plus particulièrement le rayonnement ultra-violet ainsi que sa réparation enzymatique. Ce travail a été effectué dans deux laboratoires, le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, spécialisé dans l'étude des métalloenzymes, et le laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, dont les thématiques concernent la synthèse et l'analyse de lésions de l'ADN. C'est cette complémentarité qui a permis de mener à bien le projet. Après un rappel sur les spores de bactéries et sur les lésions de l'ADN en général, nous présenterons la lésion UV-induite spécifique des spores. Nous verrons que cette lésion est réparée spécifiquement par une métalloprotéine (la Spore Photoproduct Lyase ou SPL) appartenant à la superfamille des « Radical-SAM » qui sera présentée à la fin de cette introduction.

I. Les spores de bactéries

C'est à la fin du XIX^{ème} siècle, en 1876, que Cohn et Koch découvrent de façon indépendante les spores de bactéries, bien qu'en 1838 ait été déjà rapportée la présence de corps réfractiles dans certaines cellules bactériennes. Alors que Cohn se concentrait sur une recherche plus fondamentale concernant la compréhension de la résistance à la chaleur de certaines bactéries, l'intérêt de Koch était plus appliqué, recherchant comment combattre les maladies de l'époque et particulièrement la maladie du charbon¹. C'est Koch, qui, 12 ans plus tard, décrit en premier le cycle complet sporulation – germination – multiplication – resporulation (Schéma 1).

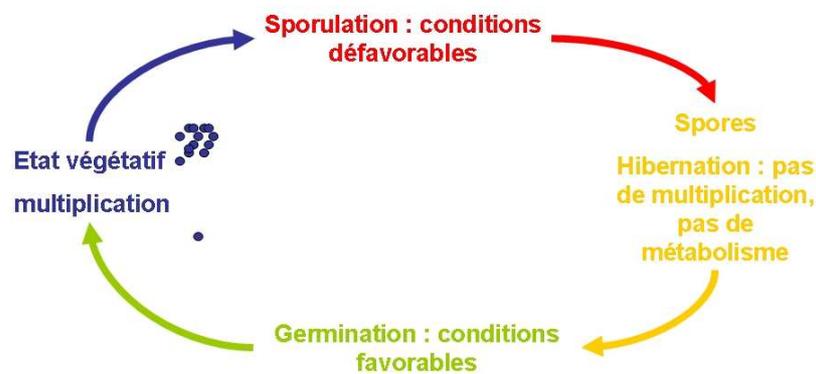


Schéma 1 : Cycle de vie des bactéries sporulantes.

Les recherches sur les spores de bactéries ont continué, et se sont surtout accrues après les années 1950, notamment grâce aux progrès de la génétique et de la biologie moléculaire.

La résistance des spores constitue un problème majeur de santé publique, car le pouvoir pathogène de certaines bactéries se manifeste lors de la germination de spores dans un milieu favorable (sang, tissus, etc....). A titre d'exemple, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* sont responsables de certaines toxi-infections alimentaires, *Clostridium tetani* du tétanos, *Clostridium difficile* de certaines maladies nosocomiales, sans oublier *Bacillus anthracis*. Les spores de cette bactérie sont, lorsqu'elles rentrent en germination, responsables de la maladie du charbon qui est principalement une maladie du bétail. Objet initial des travaux de Koch sur les spores, Pasteur développa un vaccin contre elle en 1881. Cependant, les spores de *Bacillus anthracis* sont une arme de bioterrorisme potentielle depuis la fin de la seconde guerre mondiale. En effet, l'inhalation des spores provoque une pneumopathie mortelle.

¹ Maladie infectieuse provoquée par *Bacillus anthracis*.

I.1. Structure et caractéristiques des spores

Les spores bactériennes, ou endospores, sont des organites produits chez certaines espèces de bactéries, qui constituent un état de dormance (encore appelé état cryptobiotique) induit par des conditions défavorables à la survie du microorganisme (stress nutritif, dessiccation, chaleur, ...). Il existe 6 genres de bactéries, toutes à Gram⁺, pouvant sporuler : *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* et *Thermoactinomyces*. Ces bactéries sont ainsi reliées de façon phénotypique mais non phylogénétique.

Lors d'observations au microscope, les spores ne sont visibles que si elles sont colorées au vert de malachite³ (Figure 1).

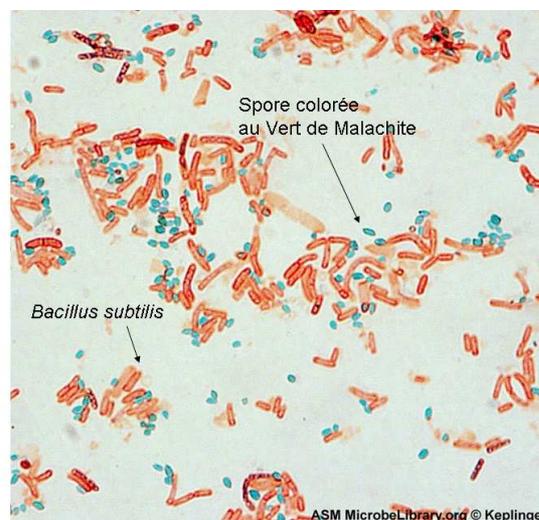


Figure 1 : Observation au microscope de spores de *Bacillus subtilis* après coloration au vert de malachite.

L'arrivée de la microscopie électronique dans les années 1960 a permis de décrire la structure complexe des spores (Figure 2), ainsi que d'en identifier les composants spécifiques.

La spore est constituée du protoplaste (*core* en anglais), pauvre en ARN, en enzymes et en eau mais contenant une quantité d'ADN proche de la cellule végétative, et beaucoup d'acide dipicolinique, un composé spécifique des spores constituant environ 20% du poids sec de celles-ci (Gould, 2006). Le noyau contient également de petites protéines solubles en milieu acide (Small Acid-Soluble Proteins ou SASPs). Ces protéines se complexent fortement

² Les bactéries à Gram positif sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de Gram. Elles apparaissent alors mauves au microscope. Les bactéries à Gram positif ont une structure qui s'organise en trois grandes parties : la couche de peptidoglycane, l'espace périplasmique et la membrane plasmique.

³ La coloration s'effectue à chaud, de façon à ce que le colorant entre dans les spores. Après lavage à l'eau et contre-coloration à la safranine à froid, les bactéries sont colorées en rouge, et les spores en vert, le vert de malachite y étant piégé.

à l'ADN en le compactant, et sont responsables de la résistance des spores aux agents chimiques détériorant l'ADN et aux irradiations UV (Setlow, 1988). La membrane cytoplasmique, analogue à celle de la cellule végétative, est entourée de la paroi sporale et du cortex, une épaisse paroi de peptidoglycane. La formation correcte du cortex est nécessaire à l'état de déshydratation du protoplaste, conférant à la spore la résistance à des températures élevées. Appliquée contre le cortex on trouve la ou les tuniques (appelées alors intine ou tunique interne et exine ou tunique externe) formées de protéines riches en ponts disulfures puis, éventuellement, l'exosporium (Figure 2) (Prescott *et al.*, 2007).

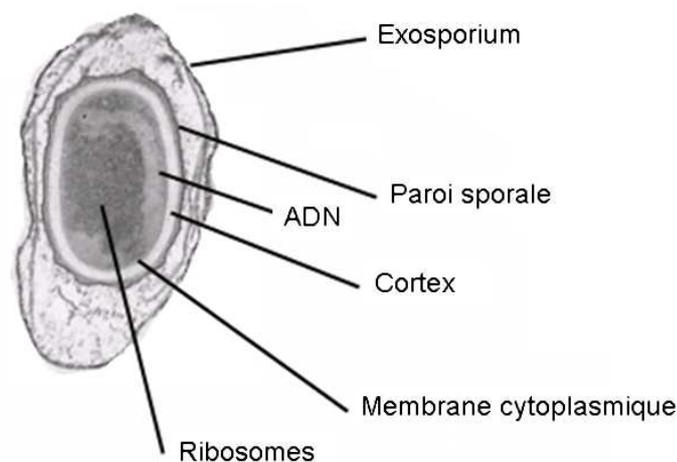


Figure 2 : Structure des spores, d'après une image au microscope électronique

Une bactérie ne peut donner lieu qu'à une seule spore, qui peut être de forme et de position dans la bactérie différentes selon les espèces, déformante ou non-déformante de la bactérie initiale, et de taille entre 0,2 et 2 μm . Il existe en effet trois groupes (Figure 3) :

- Les bactéries à spore ronde ou ovale, centrale ou sub-terminale non déformante ;
- Les bactéries à spore ovale centrale ou sub-terminale déformante ;
- Les bactéries à spore ronde terminale déformante.

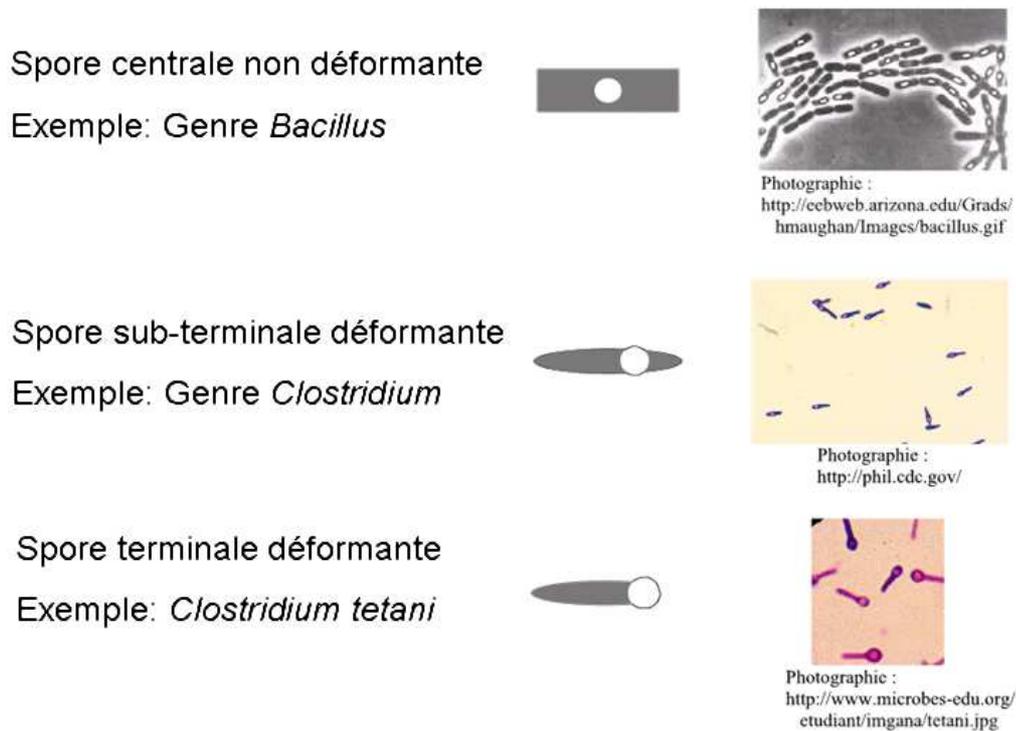


Figure 3 : Les différents types de spores, classées selon leur forme et leur position dans la bactérie initiale

La spore diffère de la cellule végétative par sa forme, sa structure, son contenu enzymatique ainsi que sa grande résistance aux agressions d'agents exogènes (physiques, chimiques, radiatifs,...), ce qui lui permet d'avoir une longévité extraordinaire dans des conditions défavorables. La spore est en effet le type de microorganisme le plus durable trouvé dans la nature. On peut attribuer ces propriétés entre autres à son état de déshydratation, à la présence d'acide dipicolinique dans le cortex et de ponts disulfures au niveau des tuniques. Le Tableau 1 permet de comparer quelques propriétés des cellules végétatives et des spores.

Propriétés	Cellule végétative	Spore
Apparence au microscope	Non réfringente	Réfringente
Acide dipicolinique DPA	Absence	Présence
Présence d'eau dans le cytoplasme	Elevée	Faible
Activité enzymatique Synthèse moléculaire	Elevée	Faible
Résistance aux agents exogènes	Faible	Elevée
Sensibilité à la coloration	Sensible	Résistante

Tableau 1 : Comparaison de quelques propriétés des spores et des cellules végétatives.

I.2. Sporulation

La sporulation est la différenciation qui conduit de la forme végétative d'une bactérie à la forme spore. C'est un des procédés de différenciation bactérienne les plus complexes. Elle se déroule en 7 étapes, décrites par Ryter en 1966 grâce à des études de microscopie électronique (Ryter *et al.*, 1966) (Figure 4).



Figure 4 : Les différentes étapes de la sporulation. Image de droite : microscopie de fluorescence à différentes étapes de la sporulation de *B. subtilis* – d'après D. Rudner HMS –Harvard.

La sporulation commence par une division du cytoplasme en deux parties non égales, parallèlement à une duplication du matériel génétique (Stade I). Contrairement à une division cellulaire normale, les deux protoplastes ne se séparent pas par la membrane cellulaire. En revanche la spore est progressivement invaginée par le cytoplasme de la cellule mère et une première membrane se forme (septum – stade II). Par un mécanisme d'endocytose, ce septum de sporulation enveloppe ensuite le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore (*forespore*) caractéristique du stade III. Lors du stade IV, la paroi sporale se forme entre les deux membranes délimitant la préspore puis apparaît rapidement le cortex. Les tuniques sont élaborées au cours du stade V, et, après maturation (phase VI), la cellule mère se lyse et libère la spore mature (phase VII).

I.3. Germination

La germination correspond au retour à la forme végétative. C'est la transformation inverse de la sporulation. Il est intéressant de noter que cette évolution a lieu sans aucune nouvelle synthèse macromoléculaire, tout le matériel requis étant déjà présent dans la spore. Les différentes étapes de ce processus ont été mises en évidence par l'identification des exsudats des différentes étapes de germination dans les années 1950 (Moir, 2006).

Après « activation » de la spore, et si les conditions du milieu sont favorables, la bactérie germe. L'activation est un stade souvent indispensable correspondant à une ouverture des enveloppes sporales par des agents physiques ou chimiques. En l'absence de cette activation et même si elles sont placées dans un environnement favorable, les spores sont incapables de germer. L'activation peut être provoquée par des agents mécaniques (choc, abrasion), des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (lysozyme, acides...)(Euzéby, 2006). Ce temps de latence (Microlag time – Figure 5) peut aller de quelques minutes à une vingtaine de minutes. Puis la germination proprement dite est déclenchée (Figure 5), en présence de conditions favorables d'hydratation, par l'activation de récepteurs spécifiques de molécules germinantes (alanine, adénosine, magnésium, ...). Ces récepteurs sont localisés sur la tunique interne. Après avoir pénétré les couches externes endommagées par l'activation et le cortex, le germinant interagit avec le récepteur ce qui provoque la germination. Avant que le cortex ne soit hydrolysé, la spore perd ses propriétés de résistance à la chaleur, des mouvements d'ions sont observés, le DPA est libéré dans le milieu et le protoplaste se réhydrate partiellement (phase I, quelques secondes). Durant la phase II (temps variable selon les espèces et les conditions environnantes : de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes), les enveloppes médianes ainsi que le cortex sont dégradés, et les composants du peptidoglycane sont libérés dans le milieu. Puis la cellule se réhydrate totalement.

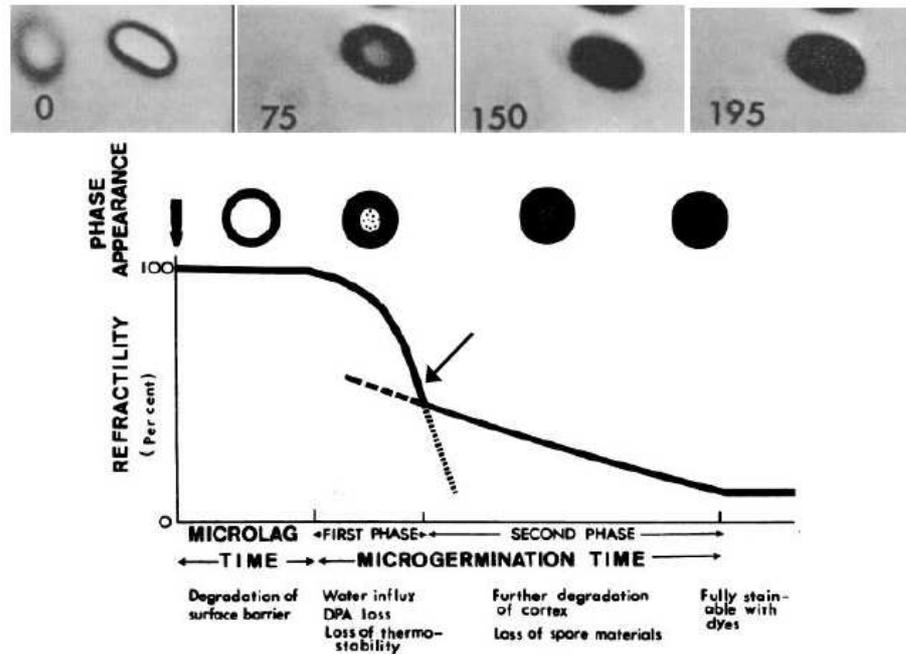


Figure 5 : Les différentes étapes de la germination (Hashimoto *et al.*, 1969). Temps de latence : de 1 à 20 minutes, phase I de la germination : quelques secondes, phase II : de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes.

II. Agressions UV et réparation de l'ADN

II.1. Rappels sur l'ADN (structure, rôle et nomenclature)

II.1.1. L'ADN : support de l'information génétique

Les connaissances actuelles de la biologie proviennent de plusieurs disciplines : la génétique, la cytologie, la chimie, la physique moléculaire, la biochimie et la biologie moléculaire. La génétique moléculaire est née lorsque Avery, McLeod et McCarty ont montré en 1943 que l'acide désoxyribonucléique (ADN) était le support moléculaire de l'information génétique (Avery *et al.*, 1944). Cette découverte fut toutefois accueillie avec beaucoup de scepticisme, car à cette époque la majorité des scientifiques pensaient que l'information génétique était de nature protéique. L'acceptation définitive de la théorie de Avery ne viendra qu'avec l'élucidation de la structure de l'ADN en 1953 par James Watson et Francis Crick (Watson *et al.*, 1953), en partie grâce aux clichés de diffraction des rayons X de l'ADN des cristallographes Rosalind Franklin et Maurice Wilkins. Cette découverte valut aux trois hommes le prix Nobel de médecine en 1962.

L'existence d'un code génétique permettant de traduire l'information contenue dans l'ADN en une séquence d'acides aminés a été décrite par Nirenberg et Khorana en 1961

(Khorana, 1961, Nirenberg *et al.*, 1961). Avec l'avènement du génie génétique dans les années 1970, les gènes des organismes les plus complexes deviennent directement accessibles à l'analyse.

II.1.2. Structure de l'ADN :

La macromolécule d'ADN est un polymère formé de deux brins oligonucléotidiques antiparallèles enroulés hélicoïdalement l'un autour de l'autre, en double hélice. Un brin d'ADN est constitué d'une succession de quatre motifs élémentaires : les nucléotides (Schéma 2). Ceux-ci portent chacun une des quatre bases azotées différentes : adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et thymine (T). Chaque base est fixée sur un 2-désoxyribose par une liaison *N*-glycosidique pour former un nucléoside. Lorsqu'un nucléoside est lié à un ou plusieurs phosphates, il s'agit d'un nucléotide. A et G sont appelées bases puriques, alors que C et T prennent le nom de bases pyrimidiques.

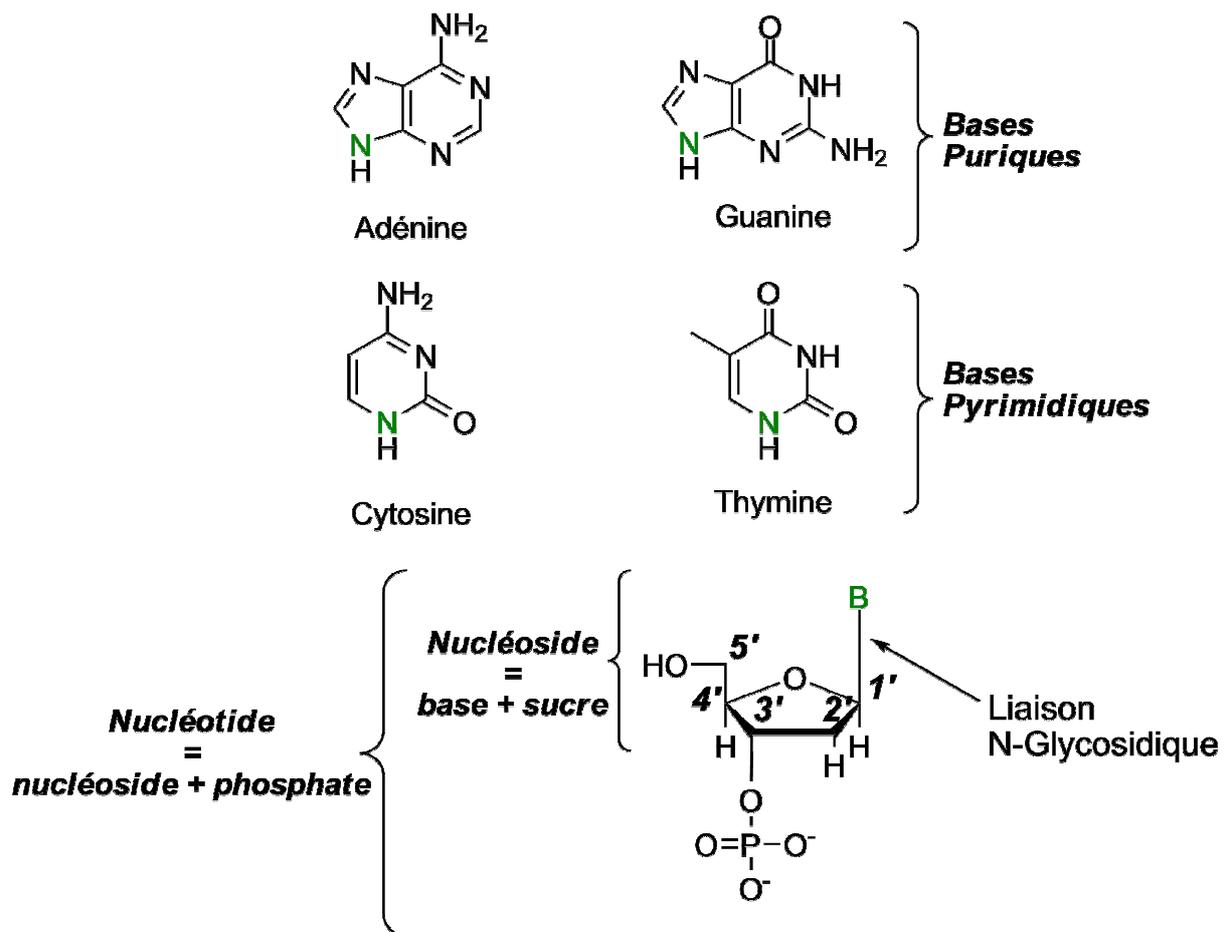


Schéma 2 : Structure des quatre bases de l'ADN et des nucléotides. Adénine (A), Thymine (T), Cytosine (C) et Guanine (G). Numérotation des carbones du 2'-désoxyribose de 1' à 5'. B représente une des quatre bases de l'ADN. Les N en vert indiquent les azotes impliqués dans la liaison *N*-glycosidique avec le désoxyribose.

L'enchaînement des nucléosides est assuré par des ponts phosphodiester (Schéma 3). Ceux-ci unissent le carbone C-3' d'une unité osidique au carbone C-5' de la suivante. L'ordre dans lequel sont disposées les bases constitue la séquence des gènes, et donc le message génétique.

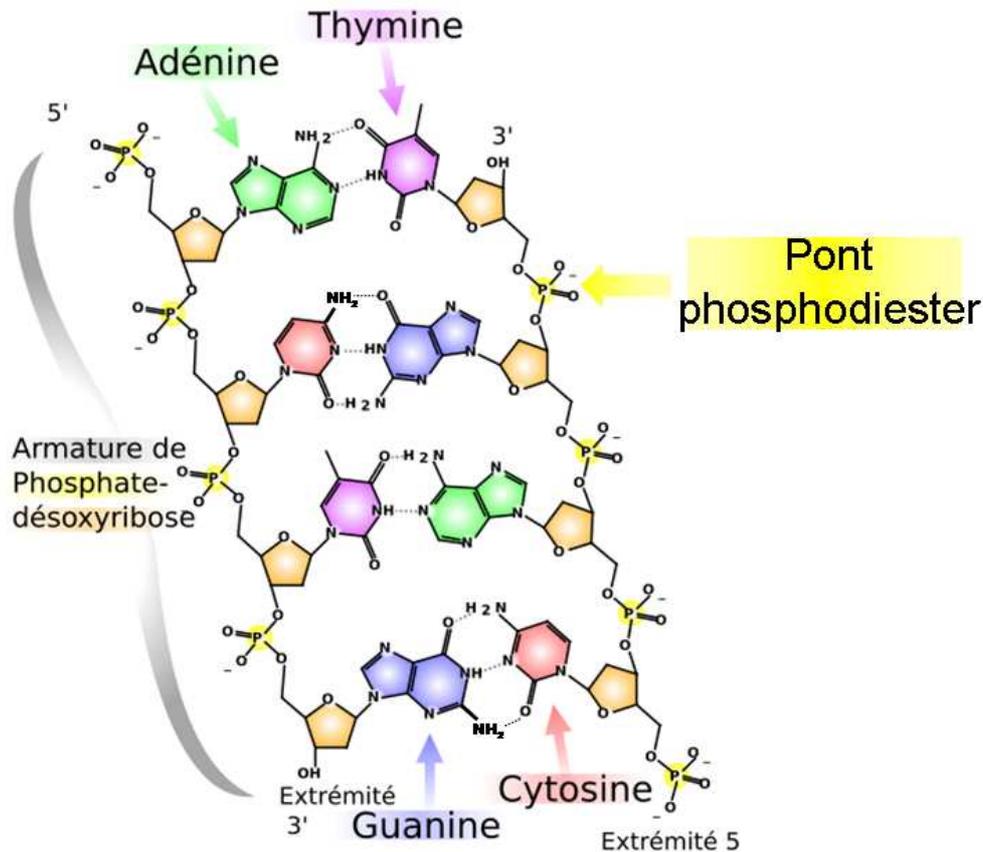


Schéma 3 : Structure des nucléotides dans l'ADN et complémentarité des bases selon Watson et Crick : A – T, C – G

Des liaisons hydrogènes entre bases complémentaires (appelées appariements de Watson et Crick) permettent d'assurer la stabilité de la molécule d'ADN : la thymine s'apparie avec l'adénine et la cytosine avec la guanine (Schéma 3). Cette complémentarité permet la duplication et la transcription en ARN de la molécule, chaque brin servant de matrice pour la synthèse du brin opposé (il faut rappeler que lors de la transcription, la thymine T dans l'ADN devient un uracile U dans l'ARN).

L'ADN étant extrêmement long par rapport à l'espace cellulaire qui lui est accordé, un compactage de celui-ci est nécessaire. Le génome bactérien se concentre dans une zone appelée nucléoïde. L'ADN dans cette structure forme des supers hélices et il est verrouillé par des protéines spécifiques.

II.1.3. Conformation des nucléosides et de la double hélice

Un nucléotide présente plusieurs degrés de liberté dont un au niveau de la liaison glycosidique et les autres au niveau du 2-désoxyribose. Il est donc possible de définir deux paramètres majeurs pour un nucléotide : l'orientation de la base par rapport au sucre et la conformation du 2-désoxyribose. Ces paramètres sont à l'origine du polymorphisme de l'ADN pouvant adopter majoritairement trois conformations A, B et Z décrites plus loin.

❖ Orientation de la base par rapport au sucre

Quand le carbonyle C2 des bases pyrimidiques ou le carbone C4 des bases puriques se situe au dessus du cycle du désoxyribose, la base est dite en orientation *syn*. Dans le cas contraire, elle est dite en orientation *anti* (Figure 6). Dans l'ADN, l'orientation la plus courante est *anti*.

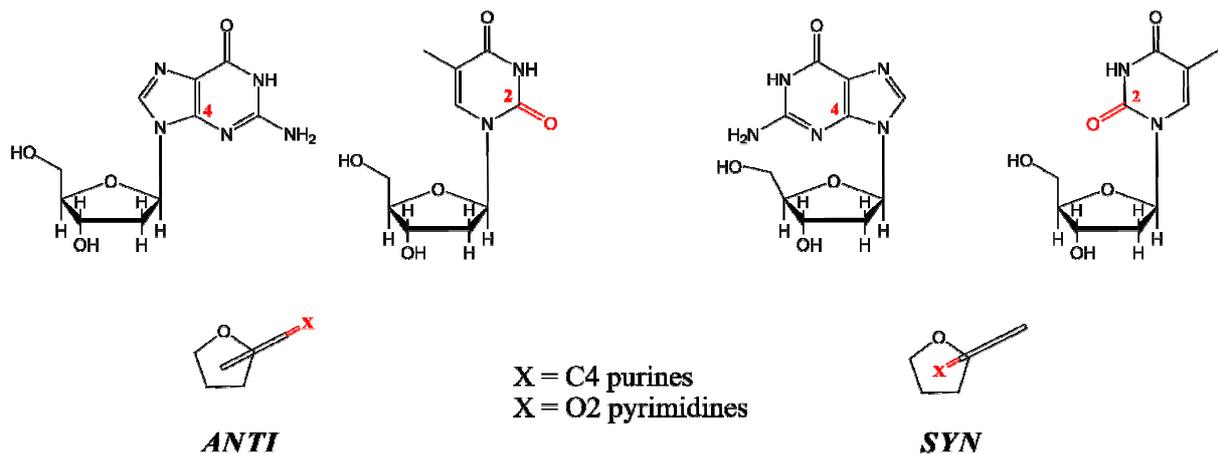


Figure 6 : Orientation de la base *syn* ou *anti* par rapport au sucre

❖ Conformation du 2 – désoxyribose

Le cycle furanose ne peut être plan du fait de la présence de carbones sp^3 . La distorsion résultante est nommée plissage ou « puckering » du sucre (Schéma 4). Le cycle peut prendre la forme d'enveloppe (E) ou de demi-chaise (twistée T). Pour la forme E, quatre atomes sont dans le même plan et le cinquième au dessus ou en dessous du plan. Pour la forme T, deux atomes adjacents sont de part et d'autre du plan formé par les trois autres atomes.

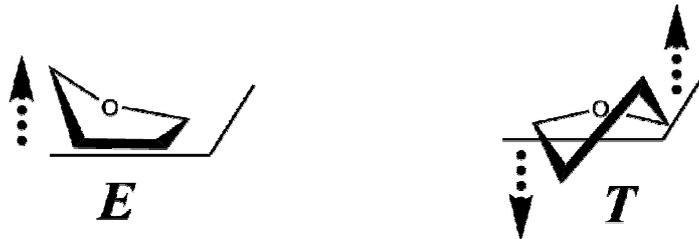


Schéma 4 : Forme enveloppe (E), 1 atome est en dehors du plan formé par les 4 autres. **Forme (T)**, deux atomes adjacents sont de part et d'autre du plan formé par les 3 autres.

Dans le cas de la conformation twistée du 2-désoxyribose, l'atome hors du plan est appelé endo s'il se trouve du même côté que le C5', et exo s'il est de l'autre côté. Les désoxyriboses de l'ADN présentent essentiellement la conformation C2'-endo-C3'-exo, alors que les riboses de l'ARN ont la conformation C2'-exo-C3'-endo (Schéma 5).

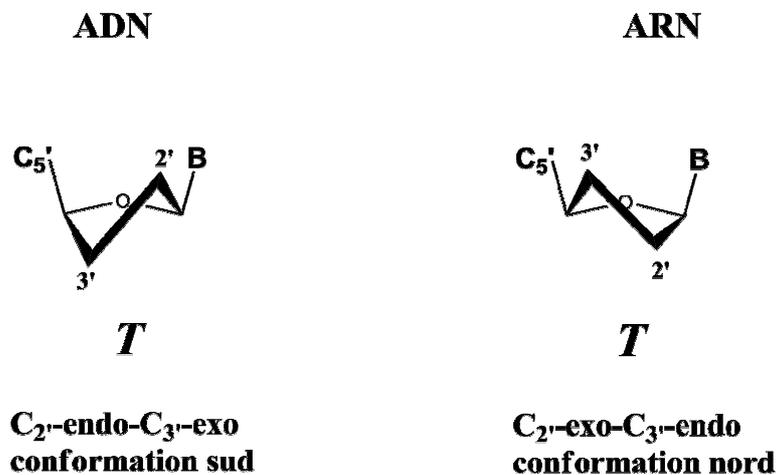


Schéma 5 : Notation endo/exo du « puckering » du sucre.

❖ Conformation de la double hélice

Les changements de conformation des nucléotides induits par les conditions environnantes ainsi que par la séquence du brin d'ADN expliquent que la double-hélice d'ADN peut adopter plusieurs conformations stables. L'ADN peut adopter jusqu'à 5 formes (Voet *et al.*, 2002) dont trois majoritaires. Les deux formes qui nous intéressent ici particulièrement sont les formes A et B, toutes deux hélices « droites » (l'enroulement se fait en tournant vers la droite). La forme B est la forme la plus naturelle. On peut observer la formation d'un petit et d'un grand sillon dû au fait que les liaisons N-glycosidiques ne sont pas diamétralement opposées au sein d'une paire de base ce qui crée d'un côté un espace plus grand (grand sillon) et de l'autre un espace plus petit (petit sillon). La forme A, plus compacte, se rencontre lorsque l'ADN est déshydraté, et n'a été observée *in vivo* que dans l'ADN des spores de bactéries. Les formes C et D sont des sous-classes de la forme B,

également hélices droites. En revanche, la forme Z (ou ZigZag) est de type gauche et est observée sur les portions d'ADN riches en cytosine et en guanine (Figure 7), mais la fonction biologique de cette forme est inconnue (Voet *et al.*, 2002).

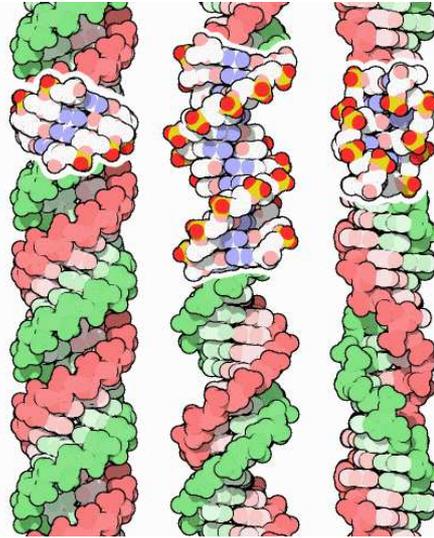


Figure 7 : De gauche à droite, conformation A, B et Z de l'ADN.

Le Tableau 2 présente les différentes caractéristiques de ces 3 grandes formes :

Paramètre	A		B		Z
Type d'hélice	Droite		Droite		Gauche
Grand sillon	Étroit et profond		Large et profond		Aplati
Petit sillon	Large et superficiel		Étroit et profond		Étroit et profond
Degré d'inclinaison des bases par rapport au plan perpendiculaire à l'axe	20°		6°		7°
Liaison osidique	<i>Anti</i>		<i>Anti</i>		<i>Syn</i> pour les purines <i>Anti</i> pour les pyrimidines
Puckering	C2'-exo C3'-endo	Nord	C2'-endo C3'-exo	Sud	C3'-endo pour les purines C2'-endo pour les pyrimidines
Pas de l'hélice et nombre de paires par pas	28 Å 11 pb		34 Å 10 pb		45 Å 12 pb
Hauteur de l'hélice par paire de base	2,6 Å		3,4 Å		3,7 Å
Diamètre de l'hélice	26 Å		20 Å		18 Å

Tableau 2 : Données sur la structure de l'ADN idéal respectivement A, B et Z. (Voet *et al.*, 2002).

II.1.4. Rôle biologique :

(1) La synthèse protéique

Grâce à un code de 4 lettres (A, T, G et C), les gènes sont le point de départ de la synthèse des protéines par la cellule. De plus, certaines régions, non codantes, sont utilisées pour la régulation de l'expression des gènes, par l'intermédiaire de la fixation de protéines régulatrices de type activateur ou répresseur. Pour la synthèse des protéines, l'ADN est ainsi transcrit en ARN (le sucre est alors un ribonucléotide et non plus un désoxyribonucléotide et la thymine est remplacée par l'uracile), puis traduit en protéine au niveau des ribosomes. Chaque triplet de nucléotides, appelé codon, code pour un acide aminé.

(2) La transmission de l'information génétique

En plus de sa fonction de support de l'information génétique, l'ADN assure aussi le transfert de cette information à travers les générations cellulaires. En effet, avant chaque division cellulaire, la totalité de l'ADN se réplique afin que les cellules filles aient le même contenu en ADN que la cellule mère.

Le principe de la réplication est simple mais ce processus fait intervenir de nombreuses protéines que ce soit pour la synthèse du nouveau brin ou la correction des erreurs.

La réplication est dite semi-conservative car au cours du processus, chaque brin d'ADN de la double hélice est utilisé comme support à sa recopie par des ADN polymérases. Ainsi chacun des nouveaux doubles brins contient-il un brin provenant de l'ADN parental et un brin nouvellement synthétisé.

L'élongation s'effectue dans le sens 5' vers 3'. Le groupement phosphate relie le carbone C3' du sucre du premier nucléotide au C5' du nucléotide suivant, laissant libre l'extrémité C3' de ce dernier, pour l'accrochage d'un nouveau nucléotide. Cette élongation est accompagnée d'une étape de vérification. Celle-ci permet à la polymérase de repérer un nucléotide incorporé de façon erronée ; ce dernier est alors excisé et remplacé par le nucléotide correct. La réplication est un mécanisme d'une très grande fidélité (moins d'une erreur pour 10^9 bases).

II.2. Les lésions de l'ADN

II.2.1. Généralités

Au cours de la vie cellulaire, l'ADN est constamment endommagé par des agents endogènes ou exogènes (Lindahl, 1993). L'action de ces agents sur l'ADN conduit à des modifications chimiques très variées de celui-ci (Schéma 6).

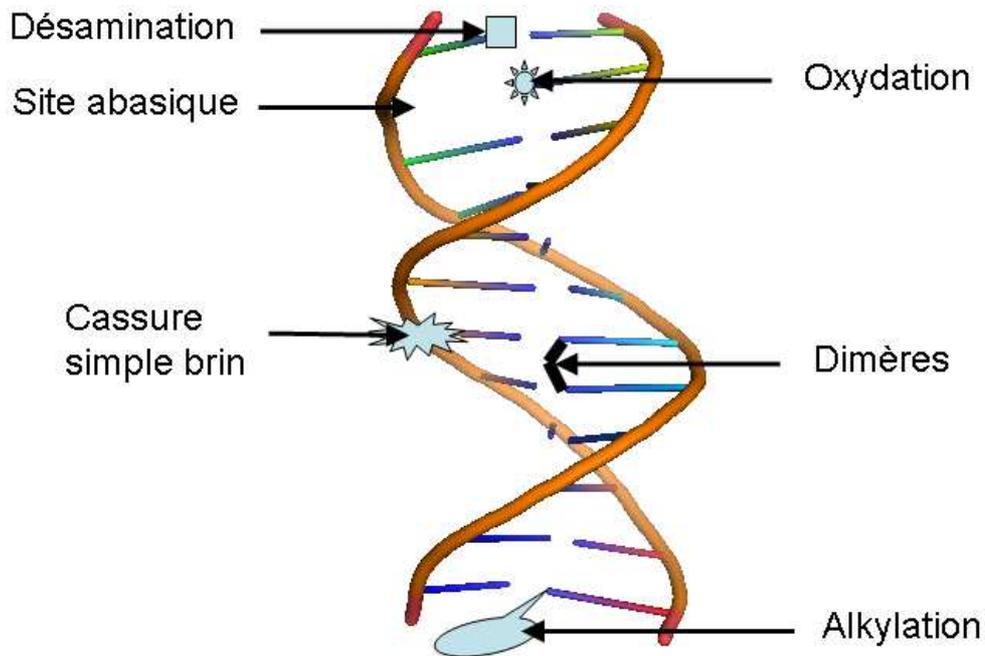


Schéma 6 : Exemples de lésions subies par l'ADN.

Parmi ces agresseurs, on peut citer les agents physiques comme les radiations ionisantes (rayons X et γ) et la lumière ultraviolette (dont nous détaillerons les effets plus loin). L'ADN peut également être modifié par des agents chimiques, comme des agents alkylants entraînant l'addition de chaînes carbonées sur les bases (cis-platine, gaz moutarde). Des réactions hydrolytiques spontanées à pH et température physiologiques ou sous l'action de produits divers peuvent également endommager l'ADN. Les groupements NH_2 des bases A, C et G sont ainsi convertis en groupe cétonique ; la cytosine désaminée se transforme en uracile, l'adénine en hypoxanthine, la guanine en xanthine pouvant aboutir à des mutations suite à la réplication comme le montre le Schéma 7.

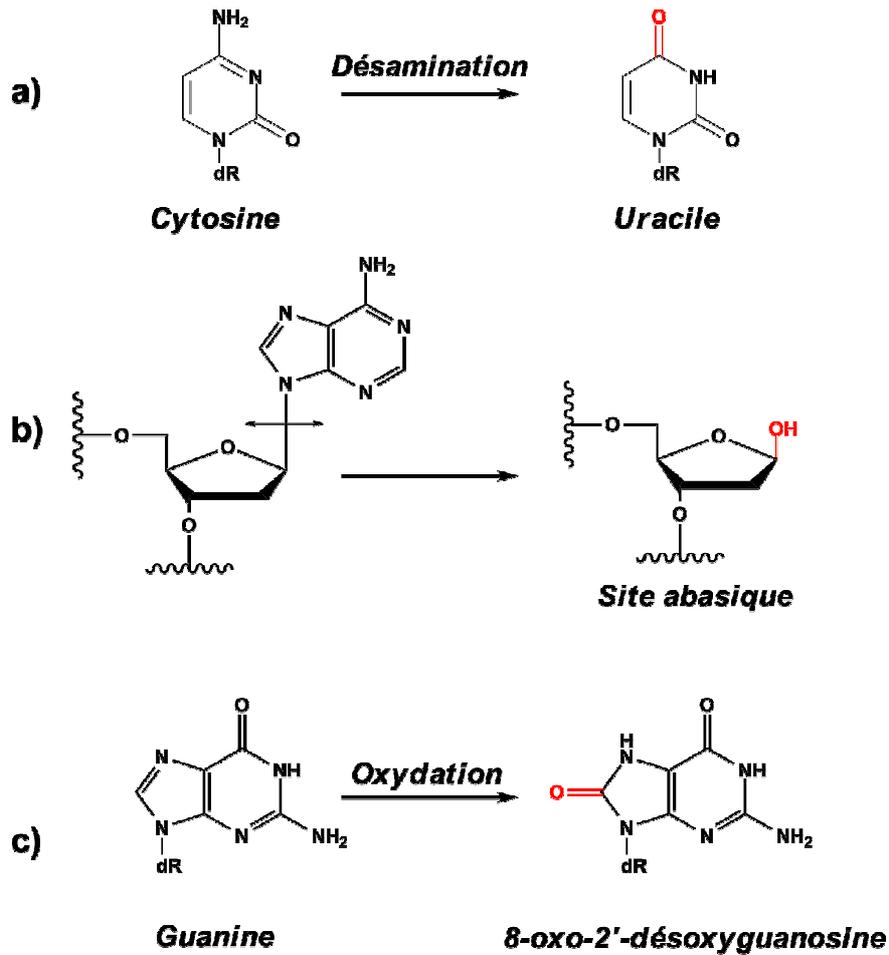


Schéma 7 : Exemples de lésions fréquemment rencontrées dans l'ADN. a) Désamination. b) Rupture de la liaison *N*-Glycosidique conduisant à la formation de site abasique. c) Oxydation de la guanine par HO• conduisant à la formation de 8-oxo-2'-désoxyguanosine. dR signifie désoxyribose.

La liaison *N*-glycosidique est également hydrolysable, plus facilement pour les bases puriques et conduit alors à la formation de sites abasiques (Schéma 7). Le métabolisme cellulaire est aussi une source d'espèces réactives de l'oxygène (Winterbourn, 2008), en particulier le radical HO•, qui est capable d'endommager l'ADN en l'oxydant (par exemple, oxydation de la guanine en 8-oxoGuanine - Schéma 7). L'arrachement d'un atome d'hydrogène au niveau du fragment osidique sous l'effet des radiations ionisantes se traduit par la coupure d'un ou des deux brins d'ADN appelée cassure simple ou double brin. Une autre conséquence de l'action d'agents photosensibilisateurs (psoralènes) ou physiques (UV, radiations ionisantes) est la formation de ponts covalents entre brins d'ADN ou entre l'ADN et des protéines qui l'entourent.

Enfin, des lésions peuvent être provoquées par le rayonnement ultraviolet (UV). En effet, le rayonnement UV fait partie des rayonnements électromagnétiques émis par le soleil qui parviennent à la surface de la Terre avec la lumière visible, les infrarouges (IR) et les

ondes de radiofréquence. Le rayonnement UV peut être décomposé en trois catégories qui sont les UV-A (315-400 nm), les UV-B (280-315 nm) et les UV-C (200-280 nm), ces derniers étant filtrés par la couche d'ozone. Si les rayonnements UV-A et UV-B peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé (synthèse de la vitamine D, traitement du rachitisme, du psoriasis ...), ils sont également à l'origine d'effets génotoxiques, les photons UV-A pénétrant plus profondément dans l'épiderme. Les effets de la lumière UV sur l'ADN font intervenir deux séries de mécanismes : une voie directe dans laquelle l'énergie des rayonnements UV-B est directement absorbée par l'ADN ; et une voie indirecte, qui concerne les UV-A et la lumière visible. Cette voie indirecte fait intervenir des photosensibilisateurs endogènes ou exogènes (Cadet *et al.*, 1992).

II.2.2. Effets indirects des UV-A

L'ADN n'absorbe aucune longueur d'onde du domaine des UV-A et du visible. Toutefois, par photoexcitation de molécules endogènes (flavines, acides aminés, quinones) ou exogènes (médicaments, colorants ...), ces rayonnements sont capables de détériorer l'ADN. Ces molécules sont appelées agents de photosensibilisation et, lorsqu'elles sont dans des états excités triplets, peuvent agir sur l'ADN principalement par deux mécanismes nommés types I et II représentés sur le Schéma 8 (Aubin, 2001).

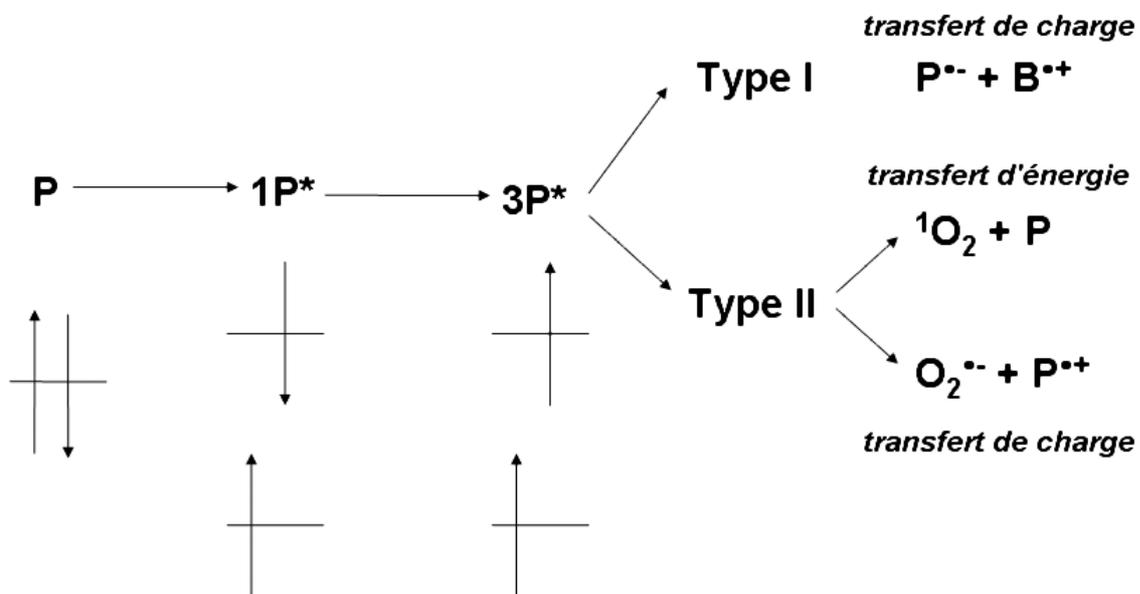


Schéma 8 : Effet indirect des UV-A sur l'ADN via un photosensibilisateur P. B signifie la base nucléique

❖ Mécanisme de type I:

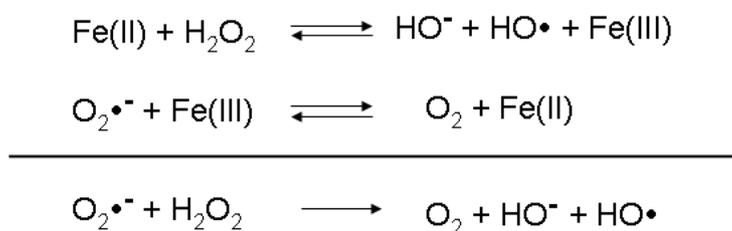
Le photosensibilisateur et la base échangent un électron ou un atome d'hydrogène, convertissant par oxydation la base en cation radical qui peut ensuite réagir avec l'eau ou se

déprotoner. La guanine est la base nucléique la plus sensible à ce mécanisme car elle possède le potentiel d'oxydation le plus bas dans l'ADN.

❖ Mécanisme de type II:

Dans ce cas, une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire dite oxygène singulet $^1\text{O}_2$, est produite à partir d'un transfert d'énergie entre O_2 et le photosensibilisateur excité.

Il peut également y avoir transfert de charge entre le photosensibilisateur et l'oxygène moléculaire qui conduit à la formation du radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Ce dernier peut réagir indirectement sur l'ADN après formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis génération du radical hydroxyle HO^\bullet via la réaction de Fenton (Réaction 1) en présence de fer.



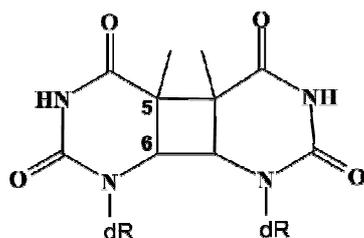
Réaction 1 : Production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

L'oxygène singulet réagit très spécifiquement avec la 2'-désoxyguanosine pour former la 8-oxo-2'-désoxyguanosine (Schéma 7). A l'inverse, le radical HO^\bullet peut oxyder les quatre bases nucléiques ainsi que le 2'-désoxyribose et entraîner des cassures de chaînes.

II.2.3. Effets directs des UV-B et C

L'effet direct du rayonnement UV est prédominant pour les photons de longueur d'onde de 260 nm (UV-C), ce qui correspond au maximum d'absorption de l'ADN. Toutefois, cet effet persiste pour les photons moins énergétiques comme les UV-B.

Ce sont les bases pyrimidiques adjacentes de l'ADN qui sont les plus sensibles. Les photoréactions impliquant ces bases conduisent à des produits de dimérisation comme les cyclobutabipirimidines (notés CPD par la suite) (cycloaddition 2+2 des doubles liaisons C5-C6 de deux pyrimidines adjacentes) pour lesquels plusieurs diastéréoisomères peuvent être obtenus selon la position des deux noyaux pyrimidiques par rapport au cyclobutane (isomérisie *cis* ou *trans*) et selon l'orientation relative des deux liaisons C5-C6 (isomérisie *syn* ou *anti*) (Schéma 9).



Dimère cyclobutabipyrimidique TT

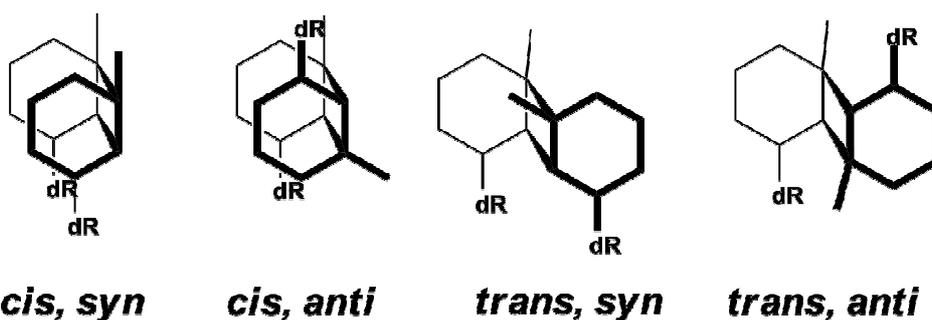


Schéma 9 : Structure chimique du dimère cyclobutabipyrimidique TT, et les différents diastéréoisomères. dR signifie désoxyribose.

Pour des raisons stériques, seuls les dérivés *syn* sont formés dans l'ADN ou les oligonucléotides, et l'isomère *cis* est nettement majoritaire.

Un deuxième type de photoproduits issus de l'irradiation de l'ADN par les UV-B sont les adduits pyrimidine(6-4)pyrimidone (notés (6-4)PP par la suite). La réaction consiste également en une cycloaddition 2+2 entre la double liaison C5-C6 de la pyrimidine en 5' et le groupement carbonyle situé en position 4 de la thymine en 3' (ou imine si la base en 3' est une cytosine) (Schéma 10).

Une troisième classe de photoproduits provient de la photo-conversion des noyaux pyrimidone des adduits (6-4)PP en isomère de valence Dewar par exposition aux UV-B ou A (Schéma 10).

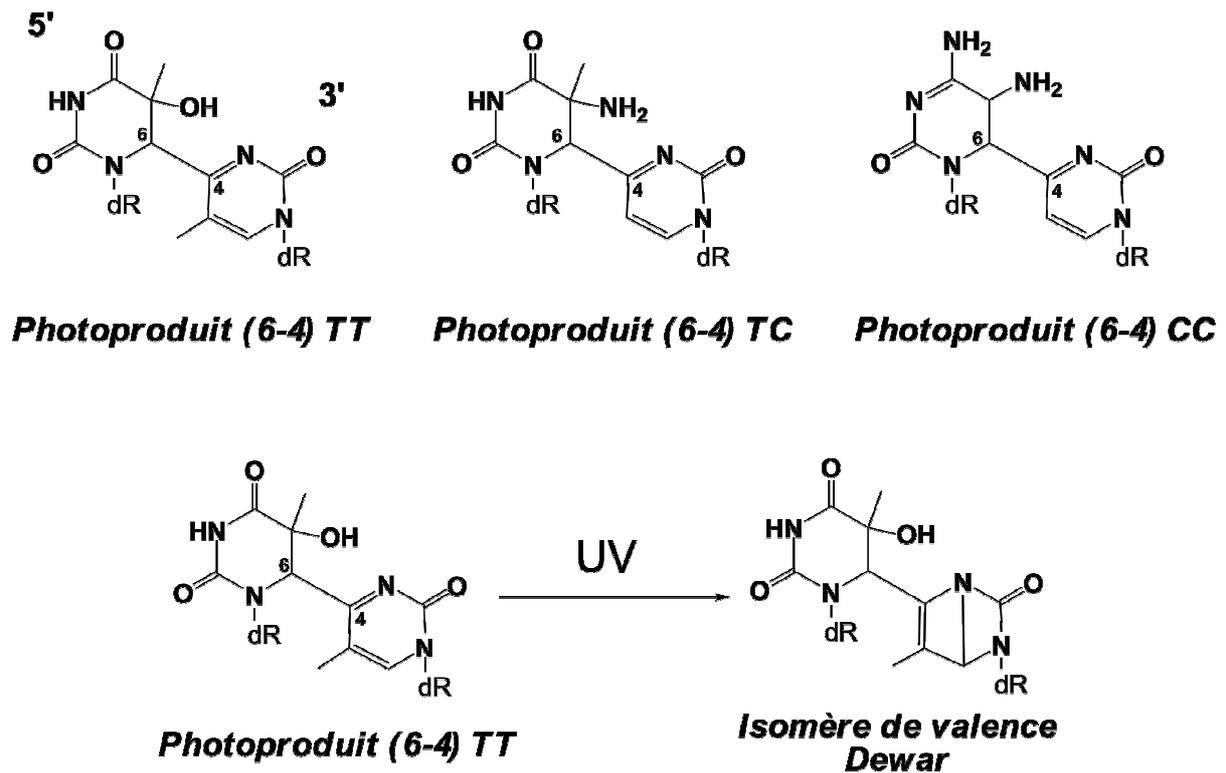


Schéma 10 : Structures chimiques des photoproduits (6-4) et formation de l'isomère de valence Dewar.

Enfin, comme discuté et détaillé plus loin, le Photoproduit des spores est obtenu par dimérisation de deux thymines adjacentes uniquement après irradiation des spores de bactéries ou dans l'ADN isolé dans des conditions très spécifiques (Donnellan Jr. *et al.*, 1965, Varghese, 1970).

II.2.4. Conséquences biologiques des lésions de l'ADN

Ces nombreuses agressions conduisent à la formation de plusieurs milliers de lésions par jours et par cellule dans le cas d'agressions endogènes (Lindahl, 1993, Lodish *et al.*, 2004). Ceci semble contradictoire avec l'apparente stabilité de l'information génétique contenue dans l'ADN et observée au fil des générations. Comme le dit E. Friedberg « la vie est un équilibre délicat entre la stabilité et l'instabilité génomique ainsi qu'entre les mutations et la réparation » (Friedberg, 2003). En effet, d'une part l'évolution selon la sélection darwinienne est fondée sur la diversité génétique. D'autre part, la vie et son évolution n'est possible qu'en présence de processus cellulaires performants assurant le maintien du message génétique et capable de contrecarrer les effets néfastes des dommages spontanés et environnementaux.

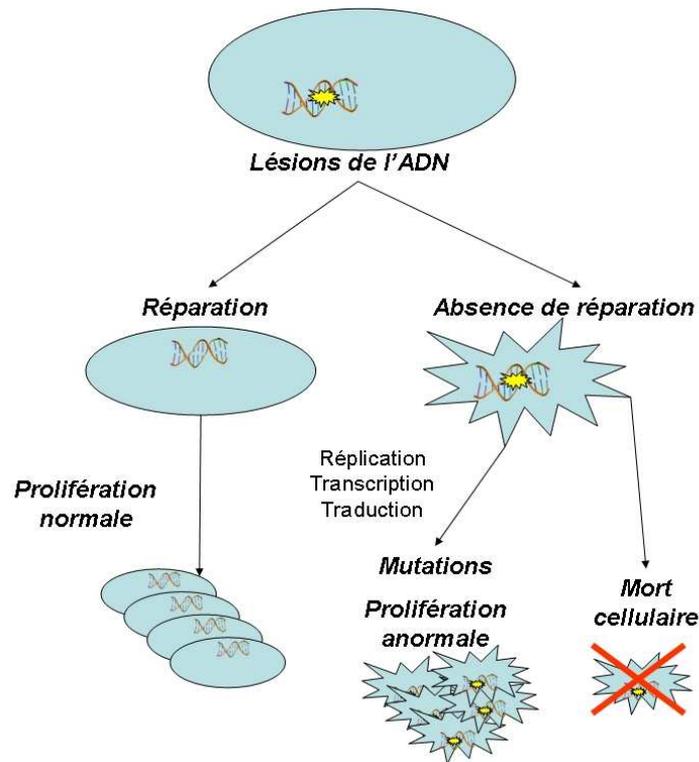


Schéma 11 : Conséquences biologiques des lésions sur l'ADN.

La présence d'un dommage dans l'ADN induit en général soit l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la réparation, soit des blocages temporaires du cycle cellulaire, ou encore la programmation de la mort de la cellule (Schéma 11).

Cette dernière conséquence est paradoxalement une façon de protéger l'individu et les générations futures de mutations conduisant à la cancérisation et au vieillissement. Cette propriété est utilisée notamment en cancérologie par l'emploi d'agents alkylants ou oxydants qui induisent un grand nombre de dommages sur l'ADN des cellules tumorales ce qui déclenche le processus d'apoptose⁴ (cis-platine, radiothérapie).

Parallèlement, la cellule dispose d'une panoplie de systèmes de réparation de son ADN. Le principe de ces systèmes a été conservé des procaryotes aux eucaryotes supérieurs. Leur complexité a cependant fortement augmenté au cours de l'évolution, tant du point de vue du nombre d'enzymes impliquées que de la taille des complexes multi-enzymatiques et du nombre de protéines régulatrices.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour contourner l'effet délétère d'une lésion : les dommages peuvent être réparés par réversion directe, par recombinaison et par excision-resynthèse (Friedberg, 2003). Il existe de plus des polymérases spécialisées dans la synthèse

⁴ Mort cellulaire programmée contrôlée par un certain nombre de gènes.

translésionnelle qui permettent à la cellule de répliquer l'ADN endommagé au risque d'induire des mutations (Shcherbakova *et al.*, 2006).

Nous nous intéressons ici à deux mécanismes de réparation prenant en charge les lésions dimériques induites par les UVB. La Réparation par Excision de Nucléotides (REN) et la réparation par réversion directe des dommages (Direct Reversal Repair DRR).

II.3. Réparation des lésions photoinduites

II.3.1. La réparation par excision de nucléotides (REN)

Ce processus est un des plus importants mécanismes de réparation de l'ADN, retrouvé à la fois chez les procaryotes et chez les eucaryotes (Petit *et al.*, 1999). Sa fonction principale est de réparer les lésions encombrantes de l'ADN qui créent des blocages de la réplication et de la transcription (comme les bases alkylées ou oxydées de l'ADN ainsi que les photoproduits) à cause de la distorsion de la double hélice qu'ils engendrent. Ce système a été bien étudié chez *E. coli* où il a été observé en premier au début des années 1960 (Setlow *et al.*, 1964), mais le mécanisme d'action est transposable à tous les procaryotes.

Dans les bactéries, la REN implique l'excision d'un oligonucléotide de 12-13 bases. Le processus de la REN peut être divisé en 3 grandes étapes. Le dommage sur l'ADN est d'abord repéré, puis le brin endommagé est excisé de part et d'autre de la lésion. La portion d'ADN manquante est enfin resynthétisée et grâce à une ligation, l'intégrité du double brin est restaurée (Van Houten, 1990).

Chez *E. coli*, la REN fait intervenir 5 protéines d'un système appelé système UvrABC. Trois gènes ont d'abord été identifiés : *uvrA*, *uvrB* et *uvrC* puis plus tard deux autres *uvrD* et *pdA* (Figure 8).

Les trois protéines UvrA, UvrB et UvrC sont produites de façon constitutive à un niveau très faible mais elles sont inductibles par des agents génotoxiques (multiplication par 10 du nombre de protéines UvrA par cellule). Toutes ces protéines sont recrutées conjointement ou successivement lors des trois étapes de la réparation.

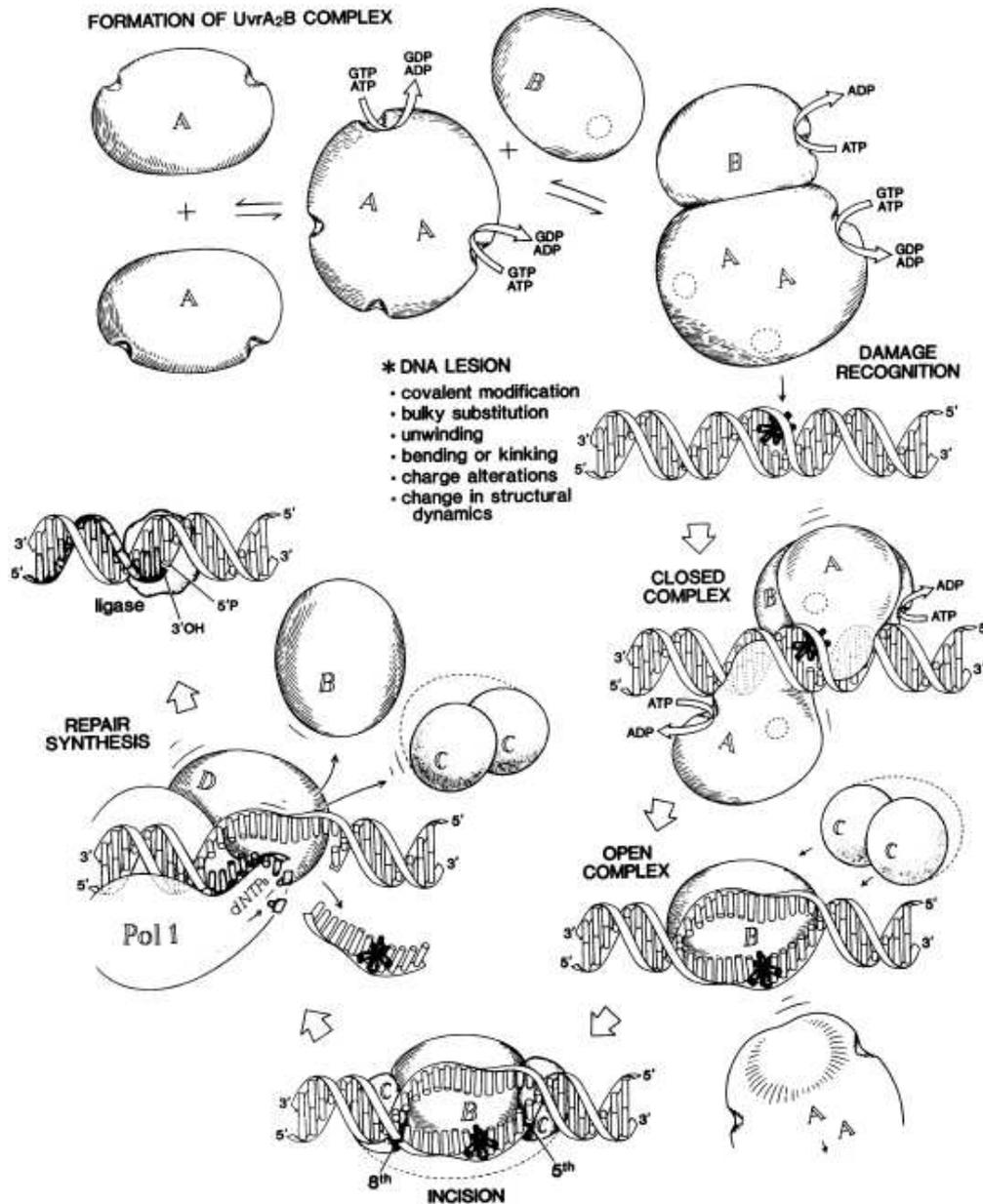


Figure 8 : La réparation de l'ADN par excision de nucléotides chez *E. coli* (Van Houten, 1990).

(1) 1^{re} étape : Reconnaissance du dommage

Les dommages reconnus par le système sont de nature très variée (cis-platine, adduits avec la mitomycine, photoproduits). Cependant, le mécanisme doit être suffisamment spécifique des dommages de façon à ne pas exciser l'ADN inutilement. Pour cela, il semble que le système reconnaisse les dommages induisant une distorsion de la double hélice (un dimère de pyrimidine déroule l'hélice de 19° et crée une courbure de 27° au niveau du grand sillon). C'est cette déformation qui est reconnue par le dimère d'UvrA du complexe A₂B₁ (2 protéines UvrA et une UvrB) se déplaçant le long du double brin d'ADN. La protéine UvrB, une hélicase, déroule alors localement l'hélice et s'enroule sur le brin endommagé. Cette

deuxième reconnaissance induit un changement de conformation qui entraîne la dissociation de (UvrA)₂. UvrC, en présence d'ATP, vient se lier au complexe UvrB/ADN (appelé complexe de pré-incision).

(2) 2^e étape : Excision du dommage

Une première incision est réalisée côté 3' par la protéine UvrB au niveau du 4^e ou 5^e nucléotide du côté 3' de la lésion. La seconde incision est faite au niveau du 8^e nucléotide après la lésion côté 5' par UvrC. Le dimère d'UvrC se dissocie spontanément tandis que le complexe UvrB/oligonucléotide est stable et reste en place. Enfin, UvrD permet le déplacement du brin excisé, mais UvrB reste complexé à l'ADN.

(3) 3^e étape : Resynthèse et ligation

L'extrémité 3'-OH du brin d'ADN ayant subi l'incision 5' est alors libérée par le départ d'UvrC. Ceci permet à PolI, polymérase spécifique de la réparation, de synthétiser un brin en remplacement de celui excisé, grâce au brin complémentaire utilisé comme matrice. Lorsque PolI arrive au niveau de l'autre extrémité incisée, UvrB est libérée. Une ligase relie enfin le brin nouvellement synthétisé à l'extrémité 5'.

(4) La REN chez *B. subtilis*

Les gènes codant pour UvrA, UvrB, UvrC ont chez *B. subtilis* de fortes similarités de séquence avec ceux de *E. coli*. L'expression des protéines de la REN est induite en réponse à l'apparition de dommages de l'ADN à l'état végétatif et pendant la phase de développement au moment de la germination. En revanche, pendant la sporulation, les protéines sont exprimées de façon constitutive à un faible niveau (Nicholson *et al.*, 2000).

Ceci explique pourquoi la REN est déjà fonctionnelle pendant la germination même lorsque la synthèse protéique est bloquée, les protéines étant probablement enfermées dans le protoplaste de la spore pendant la sporulation (Munakata *et al.*, 1974).

II.3.2. Mécanisme de réparation par réversion directe : exemple des photolyases

(1) Principe

Ce mode de réparation consiste à transformer une lésion en la base normale dont elle est issue en faisant intervenir une seule enzyme spécifique de la lésion. Cette voie concerne les alkyltransférases (Mishina *et al.*, 2006), la Spore Photoproduct Lyase (pour laquelle un

paragraphe est dédié plus loin) ou les photolyases de dimères cyclobutane ou photoproduits (6-4) (Sancar, 2003).

En effet, ces dernières réparent spécifiquement les dommages de l'ADN générés par exposition aux rayonnements UVB et C (200 – 300 nm). Ce mécanisme également appelé photoréactivation semble être le premier processus de réparation de l'ADN à avoir évolué dans la nature. C'est en tout cas le premier à avoir été découvert (Friedberg, 2003) dans la fin des années 40 indépendamment par deux laboratoires américains. Ces enzymes catalysent la monomérisation des dimères bipyrimidiques après activation par exposition à un rayonnement UV proche ou visible (300 – 500 nm). Les photolyases utilisent deux cofacteurs qui sont la flavine réduite ($FADH_2$) – notée $F1^-$ dans le Schéma 12 ; et une molécule de folate (méthylènetétrahydrofolate ; 5,10-MTHF) ou une déazaflavine (8-hydroxydeazariboflavine ; 8-HDF) notés F2 dans le Schéma 12. L'absorption d'un photon par le folate permet son interaction avec le cofacteur redox de la protéine, $FADH_2$, qui aboutit à la réduction du dimère et à la rupture des liaisons du cycle cyclobutane. Fait remarquable, ce processus de réparation fait intervenir un mécanisme produisant des radicaux libres alors que nous avons vu plus haut que ceux ci peuvent être fortement délétères pour l'ADN. Il est donc nécessaire que ce processus soit finement contrôlé.

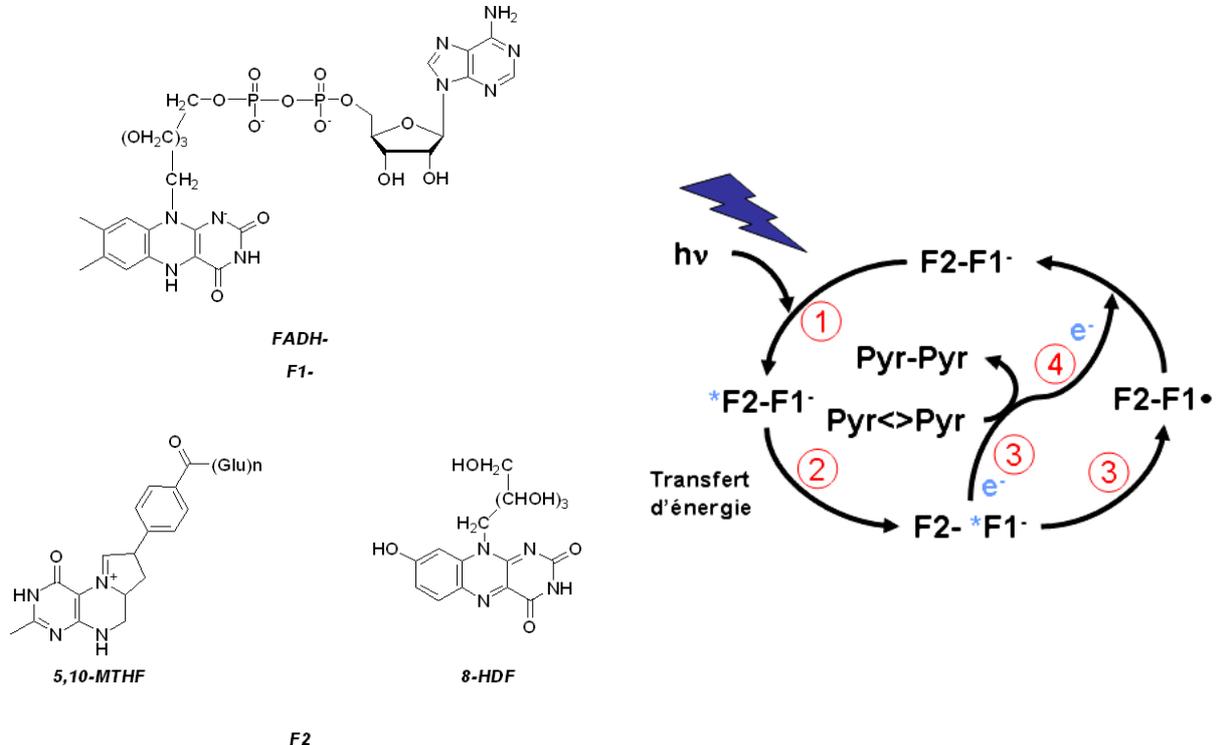


Schéma 12 : Représentation des cofacteurs des photolyases et mécanisme réactionnel. F2 absorbe un photon et transfère son énergie à $F1^-$, étapes (1) et (2). La flavine réduite excitée transfère un électron au dimère $Pyr<>Pyr$. La monomérisation s'effectue par voie concertée (3), avec rétro-donation d'un électron à $FADH^-$ ($F1^\bullet$), afin de le régénérer dans sa forme catalytiquement active (4).

(2) Le « *base-flipping* »

Il a été montré dans le cas de méthyltransférases et de N-glycosylases et plus récemment pour les photolyases (Mees *et al.*, 2004, Roberts, 1995, Sancar, 2003) que le processus de réparation implique une étape initiale dite de « *base-flipping* », non photo-induite, pendant laquelle la lésion (en jaune sur la Figure 9) est positionnée par l'enzyme de façon extrahélicoïdale afin de se fixer dans le site actif de celle-ci (Figure 9). Il est proposé que des acides aminés de la protéine viennent remplacer les bases manquantes pour stabiliser le double brin (par liaisons hydrogènes et liaisons de Van der Waals).

Actuellement, des incertitudes subsistent concernant la reconnaissance du dommage : la protéine retourne-t-elle toutes les bases unes à unes dans son site jusqu'à ce qu'elle rencontre celle dont les interactions sont spécifiques de la lésion, ou ne retourne-t-elle que la base qu'elle doit réparer ?

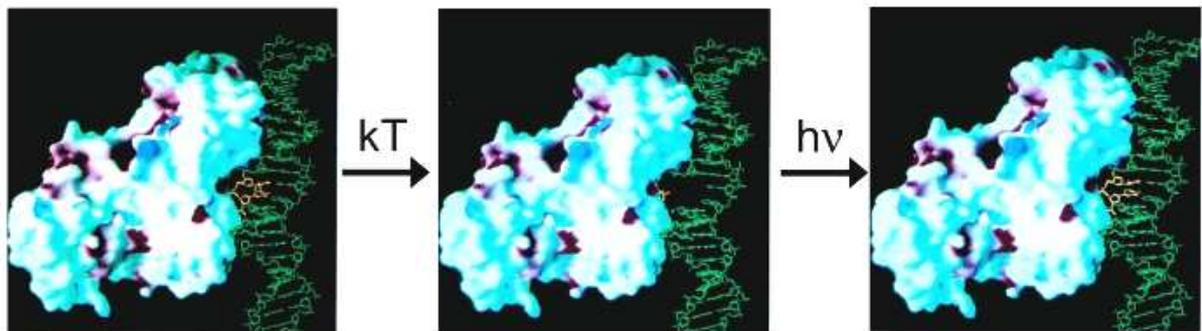


Figure 9 : Etapes de réparation d'ADN par une photolyase. La première étape, dite « *base-flipping* » est activée thermiquement (Sancar, 2003). La lésion, en jaune est positionnée dans le site actif de la protéine, puis la lésion est réparée par la photolyase.

II.4. Le Photoproduit des spores

L'exceptionnelle résistance des spores bactériennes au rayonnement ultraviolet (Nicholson *et al.*, 2000, Setlow, 2001) suscite beaucoup d'intérêt et de ce fait a conduit à l'étude des photoproduits formés dans leur ADN. Ces études ont montré que l'irradiation UV des cellules végétatives conduit à l'apparition de dimères CPD (majoritairement les *cis-syn* entre une thymine et une cytosine, et entre deux thymines) et d'adduits (6-4) entre deux thymines et entre une thymine et une cytosine adjacente (Douki *et al.*, 2001). Or la présence de ces dimères est la plus importante cause de létalité pour la cellule végétative exposée aux rayonnements UV (Setlow, 1966). Cependant, dans le cas de spores exposées aux UV-C, la formation de ces photoproduits est absente, allant de pair avec la résistance de ces organismes. Cette dernière ne s'explique cependant pas par l'absence de dommages à l'ADN. En effet, Donnellan et Setlow ont découvert, en 1965, la formation d'un autre photoproduit

qui n'est observé que dans les spores de bactéries, d'où son nom le Photoproduit des Spores (SP) (Donnellan Jr. *et al.*, 1965). Sa structure précise a été déterminée par les travaux de Varghese en 1970, grâce à des analyses RMN ^1H , de spectrométrie de masse et par spectrophotométrie UV. Il proposa alors comme structure le motif 5-(α -thyminy)-5,6-dihydrothymine (Varghese, 1970) (Figure 10).

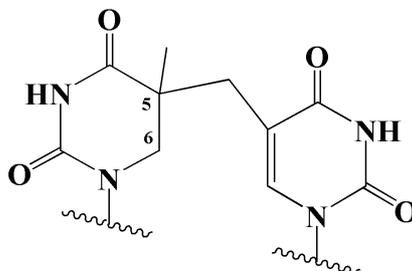


Figure 10 : Motif 5-(α -thyminy)-5,6-dihydrothymine : le Photoproduit des spores.

II.4.1. Conditions de formation de cette lésion

Depuis la découverte de ce photoproduit particulier, les équipes travaillant sur ce sujet ont cherché à en expliquer le mécanisme de formation, en déterminant plus particulièrement les facteurs qui influencent la sélectivité de formation de cet adduit par rapport aux dimères CPD et (6-4)PP.

En effet, plusieurs paramètres peuvent favoriser la formation du Photoproduit des spores au détriment des dimères CPD et (6-4)PP. Ceux-ci sont détaillés ci-dessous.

(1) Conditions d'irradiation des spores

❖ Milieu d'irradiation

- *En solution :*

La première observation du Photoproduit des spores a été faite suite à l'irradiation à 265°nm de spores de *Bacillus megaterium* en solution dans l'eau (Donnellan Jr. *et al.*, 1965). Les autres photoproduits n'ont pas été identifiés, cependant aucune trace de formation du dimère CPD n'est détectée. De même, pour des spores de *Bacillus subtilis* irradiées à 254 nm, la quantité de Photoproduit des Spores formé est de l'ordre de dix fois plus importante que celle de dimères CPD (Smith *et al.*, 1966).

- *A l'état sec :*

Les mêmes observations peuvent être faites si des spores sont irradiées à l'état sec (Lindberg *et al.*, 1991), et, de façon très intéressante, si des cellules végétatives et non plus des spores sont irradiées à l'état gelé (Varghese, 1970).

- *Sous vide* :

Lorsque des spores sont irradiées sous vide, le Photoproduit des spores se forme mais en plus faible quantité qu'à pression atmosphérique, ces conditions modifiant la structure de l'ADN, sans doute peu favorable à la formation du SP. Sur la totalité des dimères de thymine formés, 70 % sont le SP, 23 % le dimère CPD *cys-sin*, et 7% le *trans-syn* (Lindberg *et al.*, 1991).

❖ Longueur d'onde

La longueur d'onde d'irradiation a un effet sur la sensibilité des spores. Son influence a été étudiée par C. Lindberg et G. Horneck sur la gamme 200-300 nm (UV-C et UV-B) et par R. Tyrrell pour des longueurs d'onde comprises entre 250 et 370 nm (UV-C, UV-B et UV-A) (Lindberg *et al.*, 1991, Tyrrell, 1978). Les spores sont plus sensibles pour les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption de l'ADN (254 - 260 nm), car la résistance des spores augmente quand l'absorption diminue. Cependant, pour les longueurs d'onde inférieures à 230 nm, une augmentation de la résistance des spores aux UV est observée tandis que l'absorbance de l'ADN augmente. Cette divergence peut s'expliquer par l'absorption des radiations inférieures à 230 nm par les couches externes de la spore qui entourent le cytoplasme contenant l'ADN. Ainsi cette filtration protège partiellement l'ADN.

La longueur d'onde d'irradiation a également un effet sur la formation du SP. L'irradiation de spores à 254, 313 et 365 nm montre que le SP se forme à toutes ces longueurs d'onde. Cependant, on en observe de moins en moins quand la longueur d'onde augmente. Ainsi pour une même dose d'irradiation ($J.m^{-2}$), l'irradiation à 313 nm produit mille fois moins de SP qu'à 254 nm (maximum d'absorption de l'ADN), et le rapport est de 1 million quand l'irradiation est réalisée à 365 nm (Tyrrell, 1978). Enfin, le SP reste le photoproduit majoritaire observé lorsque les spores de bactéries sont irradiées par le rayonnement solaire, ensemble de longueurs d'onde et non plus irradiation monochromatique (Slieman *et al.*, 2000a, Tyrrell, 1978).

(2) *Autres facteurs influençant la formation du SP*

Les travaux concernant l'étude des conditions de formation et particulièrement le rôle de divers facteurs ont été effectués majoritairement, non plus sur les spores entières, mais sur des brins d'ADN isolés, des oligonucléotides et des solutions de thymidine.

❖ Hydratation

Alors que la cellule végétative contient 75 à 80 % de son poids humide en eau, la spore n'en contient que 25 à 55 %. Cette faible quantité d'eau est à l'origine de la résistance des spores à la chaleur, et également serait un facteur influençant la formation du SP au détriment des autres dimères de pyrimidines. En effet, R. Rahn *et coll.* et M. Patrick *et coll.* ont montré que la formation du SP était favorisée par irradiation d'ADN peu hydraté (Patrick *et al.*, 1976, Rahn *et al.*, 1969).

❖ Conformation de la double hélice

Des études par dichroïsme circulaire ont montré que l'ADN en solution dans un mélange eau/éthanol pouvait adopter différentes conformations selon la quantité d'éthanol. Ainsi, au delà de 80%, l'ADN est de conformation A (Ivanov *et al.*, 1974). Par la suite, M. Patrick et D. Gray ont montré que la formation de SP était favorisée au détriment de CPD lors d'une exposition aux UV d'ADN isolé en solution dans un mélange eau/éthanol (20 : 80), (Patrick *et al.*, 1976). Cette préparation correspond à de l'ADN faiblement hydraté, comme l'ADN des spores.

❖ Small Acid Soluble Proteins : SASP

Un deuxième facteur important influençant la photochimie de l'ADN dans les spores est un groupe de petites protéines appelées SASP (Small Acid-Soluble Proteins). Ces protéines sont spécifiques des spores de bactéries et représentent jusqu'à 20% de la quantité totale de protéines dans les spores (Setlow, 1988). Elles sont synthétisées à la fin de la sporulation et leur fonction principale est de fournir lors de leur dégradation au tout début de la germination, les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique qui redémarre alors. Il existe deux types de SASP : le type α/β et le type γ . Les SASP α et β ont un poids moléculaire de 5 000 à 7 000 Da pour 61 à 72 acides aminés et comportent une quantité significative d'acides aminés hydrophobes (21 à 29 %). Les SASP γ ont un poids moléculaire de 8000 à 11000 Da pour 81 à 96 acides aminés et sont pauvres en acides aminés hydrophobes (9 – 11 %). Les SASP α/β sont localisées dans le protoplaste de la spore où elles se complexent à l'ADN. Les SASP γ sont localisées partout où l'on trouve de l'ADN, sans pour autant se complexer à lui.

Les SASP sont les produits des gènes *ssp*, chaque gène codant pour une seule protéine (*sspA* pour SASP α , *sspB* pour SASP β , etc...). Leur expression est régulée au niveau

transcriptionnel bien qu'il existe également une rétro-régulation. En effet, lors d'une délétion du gène codant pour SASP γ , il n'y a pas de SASP γ mais un taux normal de α et β . En revanche si *spsA* est mutée, un taux deux fois plus élevé de SASP β est observé (Setlow, 1988).

Des études sur des souches mutées des gènes codant pour SASP γ ont montré que les spores avaient une résistance aux rayons UV et γ identiques aux souches sauvages (Hackett *et al.*, 1988). En revanche, les spores dont les SASP α et β sont absentes ont une sensibilité accrue aux UV (elles sont plus sensibles que les cellules végétatives et beaucoup plus sensibles que les spores sauvages). La résistance aux UV retrouve un niveau normal lorsque les cellules sont complétées avec les gènes *spsA* ou *spsB*. Enfin, ces souches déficientes en SASP α et β sont aussi résistantes au rayonnement γ que les sauvages mais plus sensibles à la chaleur (Hackett *et al.*, 1988). Afin de comprendre ces observations, des analyses sur le type de photoproduit formé ont alors été effectuées. Dans les souches mutées pour SASP α et SASP β , la quantité de SP formé est divisée par deux par rapport aux souches sauvages (Douki *et al.*, 2005a), la formation de dimères CPD et de (6-4)PP est observée à la place avec des quantités de l'ordre de la moitié de celles trouvées dans les cellules végétatives (Douki *et al.*, 2005a).

Les séquences en acides aminés des SASP ne contiennent pas de tryptophane, et un certain nombre ne contient pas non plus de tyrosine, excluant ainsi un rôle de photosensibilisateur pour les SASP. En revanche, la forte similarité de séquence entre les SASP α et β entre elles et entre différentes espèces suggère plutôt un rôle structural. En effet, lorsque l'ADN est complexé par les SASP et irradié par les UV, la quantité de SP formé augmente avec la quantité de SASP complexant l'ADN. Lorsque la saturation est atteinte (au dessus de 1 protéine pour 5 paires de bases) seul le SP se forme (Nicholson *et al.*, 1991). Puis ces auteurs ont également montré que la complexation de SASP à des plasmides induisait de nombreux surenroulements de ceux-ci. Ils observent que la superhélicité est maximale à saturation de l'ADN par les SASP, avec une densité proche de celle des spores (Nicholson *et al.*, 1990).

Enfin, S.C. Mohr *et coll.* ont montré par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge que la complexation de l'ADN isolé par les SASP à saturation (rapport massique 3:1 soit une SASP pour 5 paires de bases) induisait un changement de conformation de l'ADN de la forme B à la forme A (Mohr *et al.*, 1991), favorisant ainsi largement la formation du SP par rapport aux CPD et (6-4)PP (Douki *et al.*, 2005a).

Cependant, la quantité de SP formé lors de la complexation de l'ADN avec les SASP est de l'ordre de dix fois inférieure à celle trouvée dans les spores entières sauvages, ce qui suggère qu'un autre facteur augmente encore le rendement de formation du SP dans celles-ci.

❖ Acide dipicolinique (DPA)

L'acide dipicolinique (acide pyridine-2,6-dicarboxylique) est également un constituant spécifique des spores, présent sous forme de dipicolinate de calcium (Figure 11). Cette petite molécule représente environ 20% du poids sec de la spore. Elle est synthétisée à la fin de la sporulation juste après la synthèse des SASP par la DPA synthase, encodée par deux cistrons (*dpaA* et *dpaB*) de l'opéron *spoVF*, et est localisée dans le cortex et dans le protoplaste (Daniel *et al.*, 1993, Setlow *et al.*, 2006, Tovar-Rojo *et al.*, 2002).

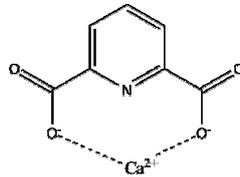


Figure 11 : Pyridine-2,6-dicarboxylate de Calcium – DPA.

Le DPA jouerait un rôle important dans la déshydratation du protoplaste de la spore, allant de pair avec la résistance à la chaleur (en effet, des souches mutées de l'opéron *dpaAB* sont plus sensibles à la chaleur humide (Paidhungat *et al.*, 2000)). Il a été montré également que le DPA serait impliqué dans la maintenance de l'état de dormance, en effet, des souches DPA^- sont instables, et tendent à germer spontanément (Paidhungat *et al.*, 2000).

Enfin, il a été montré par différentes équipes, que la sensibilité des spores aux UV était différente selon qu'elles contiennent ou non du DPA (Douki *et al.*, 2005b, Setlow *et al.*, 2006, Setlow, 2006, Slieman *et al.*, 2001).

En effet, les spores de souches sauvages de *Bacillus subtilis* sont moins sensibles, en termes de survie après la germination, que celles mutées (ne synthétisant pas le DPA), après exposition aux rayonnements UV provenant soit de lampes monochromatiques, soit directement du rayonnement solaire, soit du rayonnement solaire filtré ne laissant passer que les UV-A. De plus, l'ajout de Ca-DPA dans des films d'ADN complexé aux α/β SASP augmente de façon très significative la production de SP par rapport aux autres dimères et ce quelle que soit la source de rayonnement (Setlow *et al.*, 1993). Enfin, plusieurs études rapportent que le DPA peut interagir directement avec l'ADN *in vitro* (Lindsay *et al.*, 1985, Lindsay *et al.*, 1986).

T. Douki *et coll.* ont d'ailleurs montré que dans les spores déficientes en DPA, le SP se formait beaucoup moins que dans les cellules sauvages. Plusieurs explications peuvent être données quant au rôle du DPA sur la photochimie de l'ADN (Douki *et al.*, 2005b):

- une altération de la structure de l'ADN à cause de la liaison du DPA à la double hélice. Cependant, la nature de cette modification n'est pas claire à l'heure actuelle ;
- une autre hypothèse concerne l'observation que les spores déficientes en DPA voient leur contenu en eau augmenter modifiant ainsi la photochimie. Or l'eau de spores varie de 36% à 44% sans DPA et des études ont montré qu'une variation de 34 à 39% d'eau dans les spores ne modifiait pas la sensibilité de celles-ci vis-à-vis des UV. Il serait donc peu probable que l'augmentation à 44% modifie considérablement la résistance des spores aux UV ;
- Enfin, une autre hypothèse proposée par T. Douki *et coll.* est celle d'une photosensibilisation de l'ADN par le DPA impliquant un état excité triplet du DPA. Les preuves d'un tel mécanisme sont d'une part que la quantité de photoproduits, incluant également les CPD et dans une moindre mesure les (6-4)PP, augmente avec l'addition de Ca-DPA, et surtout que l'analyse des quantités de photoproduits issus de l'irradiation de films secs d'ADN en présence de DPA indique que le rapport CPD/(6-4)PP augmente significativement avec l'addition de DPA. Or il a été montré qu'un état triplet était à l'origine de la formation de CPD mais pas de (6-4)PP. Ceci suggère un transfert d'énergie de l'état triplet du Ca-DPA excité à l'ADN des spores. De plus, il a été montré que la photosensibilisation UV-A de films secs de thymidine par des psoralènes ou la benzophénone implique un état triplet dans la formation du SP et que cet état triplet favorise en outre la formation de dimères de thymines plutôt que de cytosine (Charlier *et al.*, 1972, Douki *et al.*, 2003c, Lamola, 1970).

En conclusion, la formation du Photoproduit des Spores dépend de nombreux paramètres. La **déshydratation** de l'ADN contenu dans le protoplaste empêche l'ADN d'adopter une conformation B et limite ainsi la formation de dimère CPD létal pour la cellule. La présence des **SASP** induit une **conformation A** compacte qui permet une formation exclusive du SP, photosensibilisée par le **DPA** présent dans le protoplaste.

II.4.2. Structure et formation du Photoproduit des spores

- *Nature du photoproduit : intra-brin ou inter-brin ?*

Pendant longtemps, toutes les études concernant le Photoproduit des spores ont été faites par hydrolyse acide de l'ADN afin d'en extraire et d'étudier le Photoproduit des spores. Cette technique permet de dissocier les bases nucléiques du sucre sur lequel il est fixé, facilitant ainsi l'analyse. Cette démarche ne permet cependant pas de déterminer si les lésions dimériques se produisent de façon intra-brin ou entre les deux brins complémentaires de l'ADN, puisque alors seules les deux bases dimérisées sans les désoxyriboses sont observées. Habituellement, ce type de lésions est considéré comme survenant entre deux bases « adjacentes » donc situées sur le même brin d'ADN ; mais déjà en 1969, R. Rahn et H. Hosszu s'interrogeaient sur la nature intra- ou inter-brin du photoproduit de type spore (Rahn *et al.*, 1969).

En 2003, T. Douki *et coll.* présentent une méthode d'analyse qualitative et quantitative plus complète que celles utilisées précédemment en proposant de digérer les brins d'ADN irradiés par des exonucléases (phosphodiesterases) qui vont donc hydrolyser les liaisons phosphodiester entre les nucléotides. Les nucléosides issus de l'hydrolyse sont ensuite analysés par HPLC⁵ couplée à la spectrométrie de masse (Douki *et al.*, 2003b). Or, dans le cas des lésions dimériques intra-brin, les exonucléases sont incapables d'hydrolyser le pont phosphodiester compris entre deux nucléosides renfermant la lésion bipyrimidique. C'est alors le dinucléoside monophosphate qui est libéré à l'issue de l'hydrolyse. Dans le cas des lésions inter-brin, le photoproduit n'empêche pas l'hydrolyse des ponts phosphodiester de part et d'autre des nucléotides engagés dans la lésion. Ici, c'est donc le dinucléoside sans le pont phosphodiester qui est libéré à la suite de la digestion enzymatique. La différence entre les deux cas, intra- et inter-brin, peut ainsi être distinguée en HPLC-MS, comme le montre le Schéma 13.

⁵ High Performance Liquid Chromatography. Technique de chromatographie liquide à haute performance. Voir dans le chapitre Matériels et Méthodes V.6, page 118.

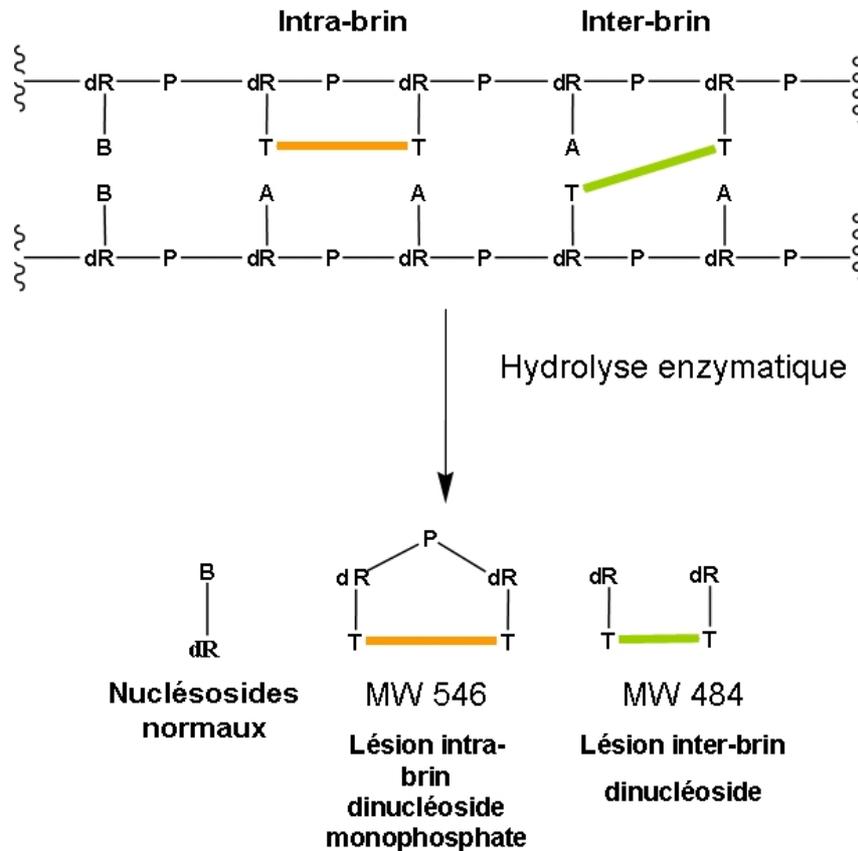


Schéma 13 : Principe de la méthode utilisée par Douki *et coll.* pour l'analyse des lésions bipyrimidiques (Douki *et al.*, 2003b).

Après avoir appliqué cette méthodologie à l'irradiation à 254 nm de **brins d'ADN lyophilisés**, T. Douki *et coll.* ont montré que la totalité de la lésion SP produite dans l'ADN se répartissait de façon presque équitable entre les lésions intra- et les lésions inter-brin, la proportion d'inter-brin étant sensiblement plus importante (54% d'inter contre 46% d'intra). En revanche, dans le cas de l'irradiation à 254 nm d'ADN **dans une solution eau/éthanol 20/80**, favorable à la formation du Photoproduit des spores car induisant une déshydratation et une conformation A de l'ADN, le profil est très différent puisque les SP intra-brin représentent 91% des SP totalement formés dans l'ADN contre 9% de SP inter-brin (Douki *et al.*, 2003b).

Enfin, l'irradiation de **spores de *B. subtilis*** conduit à la formation de 99% de SP intra-brin et à peine 1% de SP inter-brin (Douki *et al.*, 2005a). Il semblerait donc que le Photoproduit des spores soit plutôt une lésion intra-brin dans la cellule, même si la forme inter-brin peut être obtenue en grande quantité *in vitro*.

- Sélectivité de la réaction de formation du Photoproduit des spores

La stéréosélectivité de la réaction de formation du Photoproduit des Spores est un paramètre important à considérer puisque le C5 de la base saturée est un carbone asymétrique. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte, d'une part l'orientation des bases par rapport au sucre (*syn* ou *anti*) avant irradiation, et d'autre part la provenance du pont méthylène entre les deux bases : soit celui-ci provient du méthyle de la base en 5' qui réagit sur le C5 de la base en 3' (flèches bleues conduisant aux composés de gauche sur le Schéma 14 : « 3'R » et « 3'S ») soit l'inverse (flèches orange conduisant aux composés de droite « 5'R » et « 5'S »). A cause de ces différents cas, la formation de quatre diastéréoisomères peut être envisagée (Schéma 14).

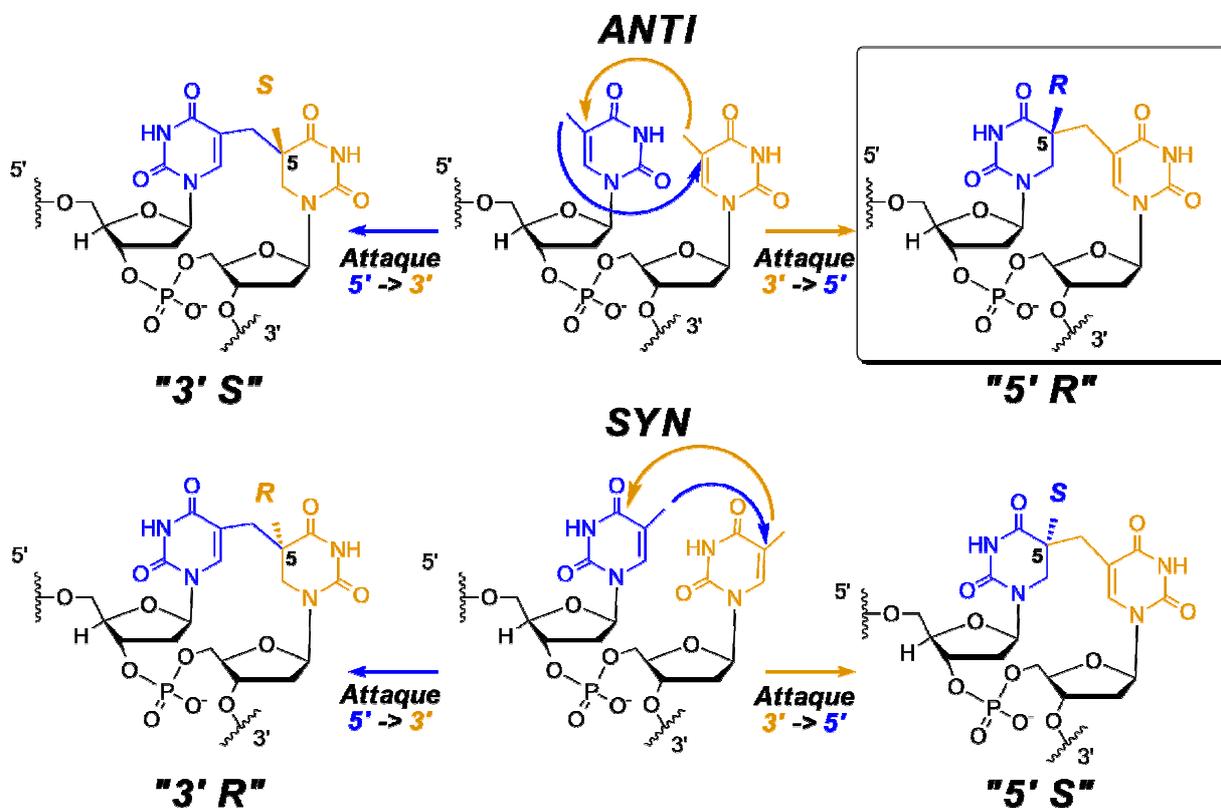


Schéma 14 : Les quatre diastéréoisomères du Photoproduit des spores obtenus selon l'orientation des bases *syn* ou *anti* et l'origine du méthyle engagé dans le pont méthylène. La notation « 3' S » signifie que le carbone asymétrique est sur la base en 3' et de configuration absolue S.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a permis de déterminer quel isomère du Photoproduit des spores est obtenu par irradiation des spores. En effet, l'hydrolyse acide ne permet pas de déterminer sur quelle base est le carbone asymétrique (5' ou 3'), car celle-ci provoque une rupture de la liaison *N*-glycosidique. Les deux produits possibles sont alors identiques. De même, la configuration absolue du carbone 5 asymétrique n'a encore jamais été déterminée.

Cependant, la formation préférentielle d'un dimère peut être supposée par :

- des données de la littérature concernant à la fois la conformation de l'ADN (conformation A) et des bases elles-mêmes (en *anti* dans l'ADN), favorisant la formation des composés « 3'S » et « 5'R » ;
- des études sur d'autres dimères (effet de séquence sur les dimères Guanine – Thymine) (Bellon *et al.*, 2002), indiquant que la base en 3' attaque la base en 5' ;
- des contraintes stériques et de distance (Figure 12).

Il serait donc plus vraisemblable que le pont méthylène se forme entre le méthyle de la base en 3' et le C5 de la base en 5', car cette distance est plus courte que la distance inverse (entre le méthyle de la base 5' et le C5 de la base 3') (Figure 12, réalisée à partir du fichier pdb 1G4Q, structure d'un ADN de conformation A). C'est cet effet de séquence qui a également été observé par S. Bellon *et coll.* sur les dimères formés artificiellement entre une guanine et une thymine. Le dimère d(GΔT) est formé préférentiellement au d(TΔG), car c'est la thymine en 3' qui engage son méthyle (Bellon *et al.*, 2002).

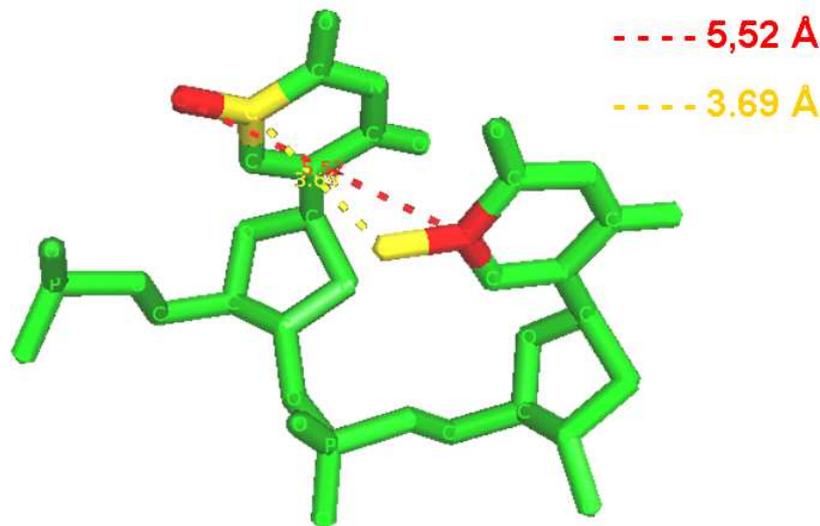


Figure 12 : Distances entre deux thymines adjacentes d'un ADN de conformation A. Les bases ont l'orientation *anti*. Distance « jaune » : 3,69 Å entre le méthyle de la base en 3' vers le C5 de la base en 5'. Distance « rouge » : 5,52 Å entre le méthyle de la base en 5' vers le C5 de la base en 3'. D'après le fichier pdb 1G4Q.

Pour toutes ces raisons, il semblerait que l'isomère naturel du Photoproduit des spores soit donc le « 5' R », encadré sur le Schéma 14.

- Mécanisme de formation du Photoproduit des spores

Deux hypothèses concernant le mécanisme de formation du Photoproduit des spores ont été proposées. Une voie radicalaire et un mécanisme concerté (Schéma 15).

Selon A.J. Varghese, qui étudia la structure du SP en 1970, le SP pourrait provenir de la recombinaison de deux radicaux issus de la thymine (Schéma 15 (1)) (Varghese, 1970).

La formation du radical 5,6-dihydrothyminyle centré en C5 (b) a été justifiée par des études de résonance paramagnétique électronique lorsque l'ADN est irradié sous UV à -196°C à la faveur de l'addition d'un radical hydrogène sur le C6 de la base (Pershan *et al.*, 1965). La formation de l'autre radical (a) peut être démontrée par l'observation de produits d'oxydation issus de l'irradiation à 254 nm de solution aqueuse de thymine : 5-hydroxyméthyluracile, 5-formyluracile et 5-carboxyuracile (Alcantara *et al.*, 1965, Wang *et al.*, 1965).

En l'absence d'eau, condition favorisant la formation du SP, les deux radicaux pourraient être obtenus de façon concomitante par arrachement d'un hydrogène du méthyle d'une thymine par une thymine voisine, celui ci se fixant en C6 (Schéma 15 (1)).

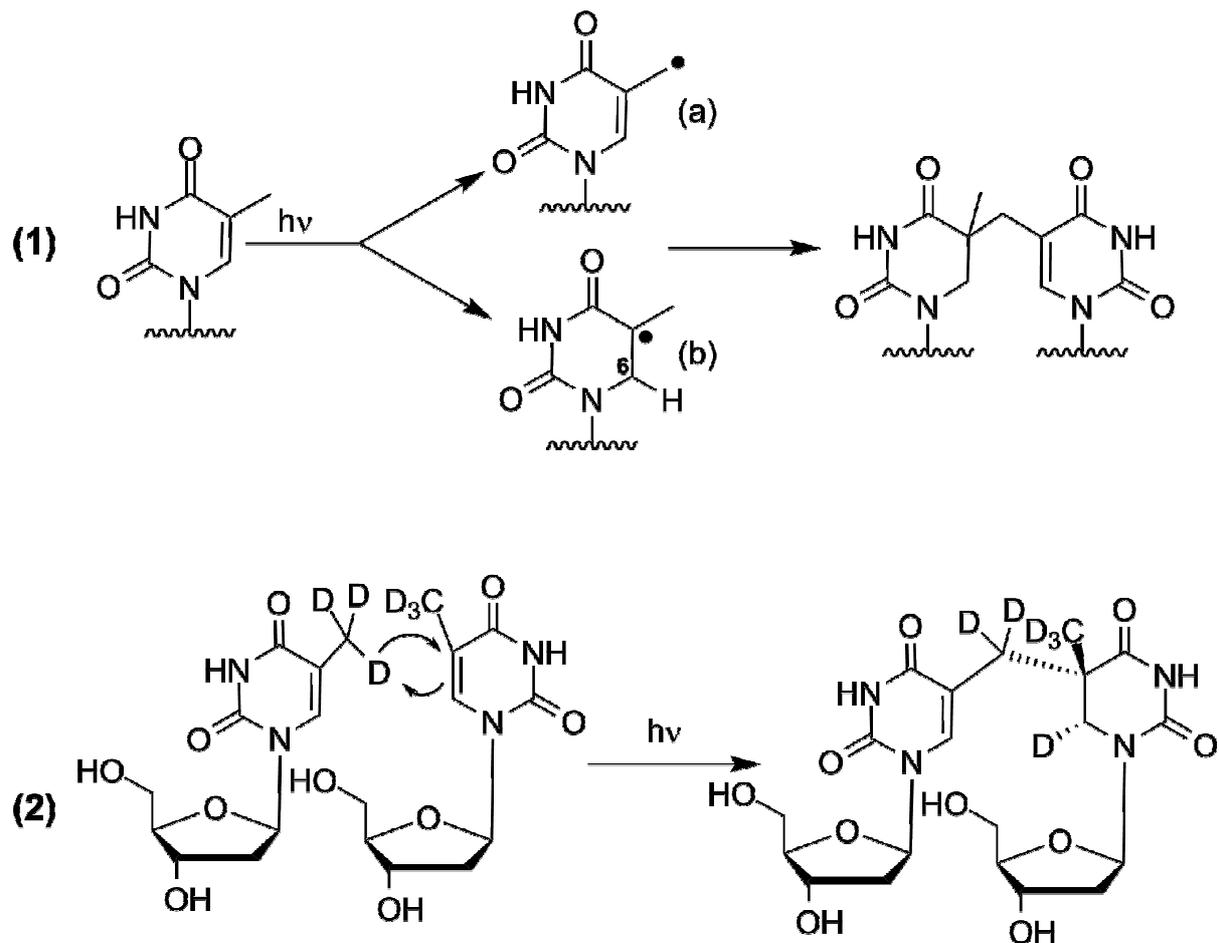


Schéma 15 : Les deux hypothèses concernant le mécanisme de formation du SP : (1) voie radicalaire proposée par Varghese, (2) voie concertée proposée par Cadet.

Puis, J. Cadet *et coll.* envisagent un mécanisme concerté, sur la base d'une expérience d'irradiation UV de thymine deutérée montrant un transfert d'atome d'hydrogène entre le méthyle d'une thymine et la position 6 de l'autre (Cadet *et al.*, 1992). Celle-ci conduit à un Photoproduit des spores sous la forme d'une dithymidine deutérée stéréospécifiquement sur le C6 de la base saturée, étayant l'hypothèse du mécanisme concerté et non radicalaire (Schéma 15 (2)). De plus, les expériences de photosensibilisation de la thymidine par la benzophénone à l'état sec suggèrent fortement l'existence du mécanisme concerté dans le cas d'irradiation de films secs de thymidine. En effet, l'énergie de l'état triplet de la benzophénone est très proche de celle de la thymidine, et de plus, le transfert d'énergie de la benzophénone excitée à la thymidine a déjà été prouvée comme étant un processus efficace, notamment lors de la préparation des dimères CPD, excluant ainsi le mécanisme radicalaire (Douki *et al.*, 2000).

- *Les différentes préparations du Photoproduit des spores en vue de son analyse*

Irradiation de spores et extraction de l'ADN

C'est W.L. Nicholson qui décrit cette méthode afin de préparer de l'ADN marqué au Tritium contenant le Photoproduit des spores (Sun *et al.*, 1994).

Les cellules végétatives des bactéries *Bacillus subtilis* sont cultivées en milieu LB et supplémentées avec de la *méthyl*-[³H] thymidine, puis mises à sporuler pendant deux jours dans un milieu pauvre. Après lavage avec un tampon, les spores subissent un choc thermique à 80°C pendant 10 min. Une suspension de ces spores dans un tampon phosphate est alors soumise à irradiation sous agitation à 254 nm. Une fois irradiées, les spores sont collectées par centrifugation, lyophilisées puis sont cassées à l'aide de billes de verre. La poudre est remise en solution dans un tampon d'extraction et l'ADN est purifié par extraction au phénol et précipitation à l'éthanol.

Irradiation d'ADN et d'oligonucléotides

L'équipe de J.B. Broderick a utilisé de l'ADN plasmidique (pUC18) marqué au tritium et irradié en présence des SASP dans un rapport massique 5:1. Pour l'analyse de la quantité de SP formé, une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique est effectuée (Cheek *et al.*, 2002) suivie d'une séparation des différents produits formés et d'une quantification par comptage de radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

W.L. Nicholson a également synthétisé un oligonucléotide de 35 paires de bases contenant une seule paire de thymines adjacentes. Après avoir hybridé le brin et son complémentaire, le duplex est amplifié par PCR en utilisant de la *5-méthyl*-[³H]-

thymidinetriphosphate. L'ADN est alors déshydraté (10% d'humidité relative) avant d'être irradié à 254 nm. L'identification du SP et sa quantification est effectuée de la même façon par hydrolyse acide, chromatographie liquide puis comptage par scintillation liquide (Slieman *et al.*, 2000b)

Enfin, l'équipe de T. Carell a récemment synthétisé le SP inclus dans un oligonucléotide simple brin de 6 bases de séquence 5'-GGTTGG-3' (Pieck *et al.*, 2006), par irradiation en présence de DPA sous forme de film sec, l'analyse s'effectuant cette fois par digestion enzymatique suivi d'une analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

Comme nous l'avons vu plus haut, encore peu d'études sont disponibles sur la stéréochimie du SP, sur la perturbation structurale de l'ADN qu'il pourrait induire, sur la stéréosélectivité de sa réparation, etc....De nombreuses équipes ont ainsi projeté de préparer le SP sous la forme des deux thymines reliées par le pont méthylène, soit par irradiation de thymidine, soit par synthèse chimique, de façon à mieux étudier cette lésion notamment en terme de structure et de mécanisme de réparation, mais aussi de façon à pouvoir l'introduire dans des oligonucléotides à un endroit connu et précis dans une séquence spécifique.

Irradiation de thymidine

Le meilleur rendement en SP a été obtenu par irradiation de films secs formés par évaporation à l'air d'une solution éthanolique de thymidine (Douki *et al.*, 2003b). Les rendements en SP par rapport au CPD et 6-4 étant moins bons lors d'une irradiation d'un film lyophilisé ou d'une solution gelée en présence de DPA (Douki *et al.*, 2003b, Douki *et al.*, 2005b). Cependant, cette approche fournit un Photoproduit des spores sans pont phosphodiester donc d'intérêt biologique limité.

Synthèses chimiques

Plusieurs synthèses chimiques du SP ont été décrites, celles-ci pouvant a priori sembler plus efficaces (pas d'autres photoproduits, échelle préparative) que la voie photochimique.

Dans la littérature, seulement cinq synthèses chimiques du Photoproduit des spores sont décrites. Trois d'entre elles consistent en la synthèse du motif sans les sucres (Bergstrom *et al.*, 1977, Bergstrom *et al.*, 1979, Nicewonger *et al.*, 1997), une quatrième propose la synthèse totale (Figure 13) du dinucléoside monophosphate (Kim *et al.*, 1995).

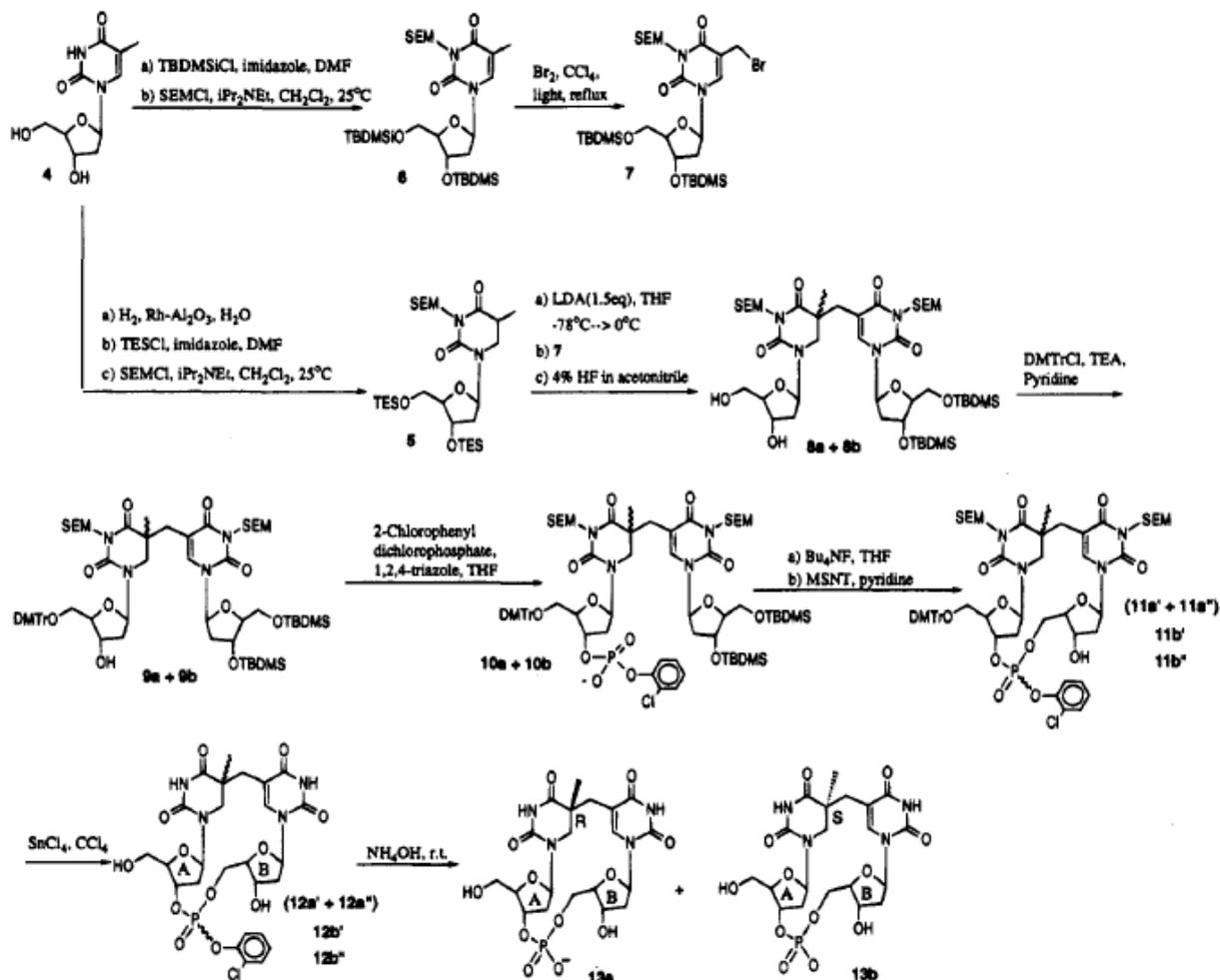


Figure 13 : Voie de synthèse selon Kim *et coll.* (Kim *et al.*, 1995).

Grâce à cette synthèse, l'équipe de T.P. Begley apporte les premières données RMN permettant de caractériser complètement les deux dinucléosides monophosphates, et par conséquent de déterminer la configuration absolue du carbone asymétrique porté par la base en 5' (Kim *et al.*, 1995).

La synthèse la plus récente est une adaptation cette dernière méthode sans le pont phosphodiester (Friedel *et al.*, 2006a), qui a permis d'isoler et de caractériser les deux énantiomères 5*R* et 5*S*. Cependant, les rendements obtenus via ces synthèses sont assez faibles, et jusqu'en 2005, aucun de ces produits de synthèse, excepté ceux de M.G. Friedel *et coll.* n'ont été testés en réparation *in vitro*. En vue d'une étude structurale du Photoproduit des spores, Carell *et coll.* ont tout récemment incorporé ces synthons 5*R* et 5*S* dans des oligonucléotides de 13 et 14 bases, par une synthèse automatisée sur support solide (Bürckstümmer *et al.*, 2008).

III. La Spore Photoproduct Lyase

III.1. Mise en évidence d'un processus de réparation spécifique

Comme nous l'avons vu précédemment, les spores de bactéries sont particulièrement résistantes aux rayonnements UV, notamment grâce à des caractéristiques intrinsèques favorisant la formation d'une lésion prépondérante qu'est le Photoproduct des spores. En revanche, la spore n'ayant aucune activité métabolique, le SP s'accumule au cours des irradiations et peut alors être très délétère pour la bactérie. Or la spore ne possède qu'une seule copie de son génome, ce qui exclut la recombinaison homologue comme mécanisme de réparation de ces lésions. Des systèmes de réparation efficaces ont donc dû être développés par la spore, constituant ainsi un deuxième facteur de résistance des spores aux UV, en plus de la photochimie particulière observée pour leur ADN.

De façon très intéressante, K. Smith *et coll.* (Smith *et al.*, 1966) et J.J. Donnellan *et coll.* (Donnellan *et al.*, 1968) ont observé que le SP était stable sous réirradiation à 254 nm, et qu'une irradiation à 405 nm ne réparait pas le SP, contrairement au CPD réparé directement par une photolyase dans cette dernière condition.

De plus, le SP n'est pas ou peu retrouvé dans la fraction issue de la solubilisation acide des spores, suggérant que le SP n'est pas excisé de l'ADN mais plutôt réparé directement. Ceci conduit à penser que la REN n'interviendrait ainsi pas du tout chez *B. megaterium* dans la réparation du SP, et prendrait en charge la lésion dans une faible proportion pour *B. subtilis* et *B. cereus* (Donnellan *et al.*, 1968, Munakata *et al.*, 1974).

Un deuxième mécanisme de réparation de SP a été mis en évidence par l'utilisation de souches mutées pour un des gènes impliqués dans la REN, souches pour lesquelles la disparition du SP est comparable aux souches sauvages. En revanche, la mutation du gène de réparation spécifique du SP appelé à l'origine *ssp* provoque une augmentation de la sensibilité des spores (due à une diminution du taux de SP plus lente), encore augmentée lorsque les deux gènes sont mutés (aucune réparation du SP). Ce mécanisme spécifique est donc plus efficace et plus rapide que la REN car opérationnel dès le début de la germination. Ceci peut s'expliquer par le fait que le mécanisme de la REN implique une resynthèse oligonucléotidique, nécessitant une réserve d'acides nucléiques et une disponibilité énergétique suffisantes, ce qui n'est pas le cas de l'autre mécanisme. De plus, le système de réparation spécifique, qui s'est avéré être une réversion, est déjà présent dans la spore, ce qui

permet de prendre en charge la lésion dès le début de la germination même si la synthèse protéique n'est pas encore opérationnelle.

III.2. La Spore Photoproduct Lyase

L'existence d'un mécanisme de réversion directe non photoactivé du Photoproduit des spores a donc été postulée par J.J. Donnellan et R. Strafford puis par N. Munakata et C.S. Rupert mais les premiers résultats expérimentaux n'ont été publiés qu'en 1977 par T.C. Wang et C.S. Rupert (Donnellan *et al.*, 1968, Munakata *et al.*, 1974, Wang *et al.*, 1977). L'enzyme, baptisée Spore Photoproduct Lyase⁶, est donc la première lyase non photoactivable identifiée (et la seule à ce jour) catalysant la réversion directe de ce dimère bipyrimidique. Des données plus précises sur cette enzyme ont été obtenues grâce aux développements de la biologie moléculaire dans les années 1990. Ainsi, le gène qui code pour la SPL chez *B. subtilis* a-t-il été cloné et séquencé en 1993 par l'équipe de W.L. Nicholson (Fajardocavazos *et al.*, 1993). Il s'agit d'un opéron bicistronique *splAB*. Cet opéron est exprimé lors de la phase III de la sporulation, la régulation de son expression ne se faisant pas suite à l'apparition de dommages mais de façon concomitante à la sporulation par l'ARN polymérase σ^G (régulon $E\sigma^G$, contenant également les gènes codant pour la synthèse des SASP et leur dégradation, ainsi que pour la DPA synthase) (Pedrazareyes *et al.*, 1994). Le cistron *splB* code pour la protéine Spore Photoproduct Lyase, synthétisée dans la préspore, alors que le cistron *splA* code pour une petite protéine de 72 acides aminés, qui n'est pas nécessaire à l'activité de la SPL mais qui aurait un rôle de régulateur négatif, modulant la quantité de Spore Photoproduct Lyase produite.

Le clonage a permis de commencer de nombreuses études *in vitro* sur le mécanisme de réparation de la Spore Photoproduct Lyase.

Tout d'abord, l'analyse des séquences primaires des Spore Photoproduct Lyases de différents organismes a montré d'une part des similarités avec des membres de la famille des ADN photolyases (Brennan *et al.*, 1989, Fajardocavazos *et al.*, 1993, Todo *et al.*, 1996), et d'autre part l'existence de quatre cystéines conservées pour les deux organismes clonés (*B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*) dont trois sont arrangées selon un motif (CxxxCxxC) également rencontré dans une autre famille, celle des protéines de la famille des « Radical-SAM ». Plus précisément, un alignement des acides aminés 80 à 115 a montré de fortes

⁶ Pour des raisons de simplicité, c'est le nom anglophone Spore Photoproduct Lyase (SPL) qui est utilisé dans le manuscrit.

homologies avec des protéines Fer-Soufre comme les sous-unités activatrices de la Ribonucléotide Réductase Anaérobie (RNR) et de la Pyruvate-Formiate Lyase (PFL). L'existence d'un centre fer-soufre était également fortement suggérée par la sensibilité accrue des spores aux UV lors d'une carence en fer (Nicholson *et al.*, 1997). Par la suite, la purification de la SPL recombinante produite dans *E. coli* ou dans des spores de *B. subtilis* a permis de confirmer que celle-ci contenait bien un centre fer-soufre, à la faveur de sa couleur rouge-marron et de la présence de quantités équimolaires de fer et de soufre (Rebeil *et al.*, 1998). Par analogie avec la sous-unité activatrice de la RNR, les auteurs ont montré que l'enzyme n'était active *in vitro* en anaérobiose qu'après réduction (par du dithionite ou lorsque les extraits sont mis en présence de NADPH) et en présence d'un cofacteur : la S-Adénosylméthionine (SAM) (Rebeil *et al.*, 1998), ce qui est une caractéristique des « Radical-SAM ». Cette famille de protéines à centre Fer-Soufre et à cofacteur SAM fait l'objet du paragraphe IV. L'appartenance de la SPL à cette superfamille suggère un mécanisme radicalaire pour la réparation du Photoproduit des spores.

Outre les trois cystéines conservées du motif CxxxCxxC supposées coordonner le centre Fe-S, les séquences des SPL de toutes les bactéries sporulantes possèdent une quatrième cystéine conservée (Figure 14). Cette cystéine est en aval du motif CxxxCxxC pour les espèces du genre *Bacillus* (position 141 d'après la numérotation de *B. subtilis*), et en amont (position 77) pour les SPL du genre *Clostridium*.

	77	91	95	98	141												
<i>B. subtilis</i>	SSKPSAEYAI	PFATG	MGHCHY	YLQ	TTMGS	KPYIRTYVNV	EELDQADKYM	KERAPEF	TRFEAS	TSD							
<i>B. cereus</i>	TSKPSAEYAI	PFATG	MGHCHY	YLQ	TTMGS	KPYIRTYVNV	EELGAA	KYMEE	RAPEL	TRFEAS	TSD						
<i>B. halodurans</i>	TSKPSAEYAI	PLATG	MGHCHY	YLQ	TTLGS	KPYIRTYVNV	LEEIFAA	ADQYI	HEREPEI	TRFEAA	TSD						
<i>B. thurigiensis</i>	TSKPSAEYAI	PLATG	MGHCHY	YLQ	TTLGS	KPYVVRVY	NLDEIFE	KAKQY	MDERAPEI	TRFEAA	TSD						
<i>B. anthracis</i>	TSKPSAEYAI	PLATG	MGHCHY	YLQ	TTLGS	KPYVVRVY	NLDEIFE	KAKQY	MDERAPEI	TRFEAA	TSD						
<i>C. perfringens</i>	S	KPSAHW	QLPLLSG	IVGN	QYCYL	NTNLG	DKPYVKI	NVNVEDI	LNQAQ	KYIDER	KPNIT	TIFE	GSATSD				
<i>C. tetani</i>	S	KPSAHY	QLPLISG	IGQ	EYCYL	NTNLG	DRPYIK	VNANID	ILCQ	AEKYI	NERLP	PETT	TIFE	GSATSD			
<i>C. acetobutylicum</i>	T	KPSANY	QLPIV	SGA	AM	EYCYL	NTHG	GKKPYV	KINVN	LDL	LSKAGE	YIEK	RKPD	ITV	FE	GAA	ISD

Figure 14 : Alignement des séquences d'acides aminés de SPL de différents organismes. La position du motif CxxxCxxC est surlignée en vert. La position de la quatrième cystéine est indiquée en rose. Celle-ci est située en position 141 (numérotation de *B. subtilis*) pour les espèces du genre *Bacillus*, et en position 77 pour les espèces du genre *Clostridium*.

Dans le cas de la SPL de *B. subtilis*, W.L. Nicholson a construit des plasmides contenant le gène *splB* muté pour chacune des 4 cystéines de la séquence (chaque cystéine est remplacée par une alanine : C91A, C95A, C98A et C141A). Il a réintroduit les plasmides mutés dans des souches de *B. subtilis* délétées au niveau du gène *splB*, ainsi qu'un plasmide ne contenant pas *splB* (vecteur), puis les a fait sporuler, les a irradiées par les UV-C (254 nm), les a fait

germiner et enfin mesure la résistance des bactéries⁷ (Figure 15). Il n'est pas surprenant de voir que les mutations des cystéines 91, 95 et 98 en alanines conduisent à l'inactivation de la SPL et donc à la létalité des spores, de la même manière que si la SPL est absente (vecteur). En effet, ces cystéines sont proposées comme étant ligands du centre [4Fe-4S] essentiel à l'activité. En revanche, la mutation de la cystéine 141 en alanine conduit également à la létalité des spores, dans les mêmes proportions que pour les autres mutations. Cette cystéine est donc essentielle à la survie des spores lors d'une irradiation UV (254 nm) (Figure 15) (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005).

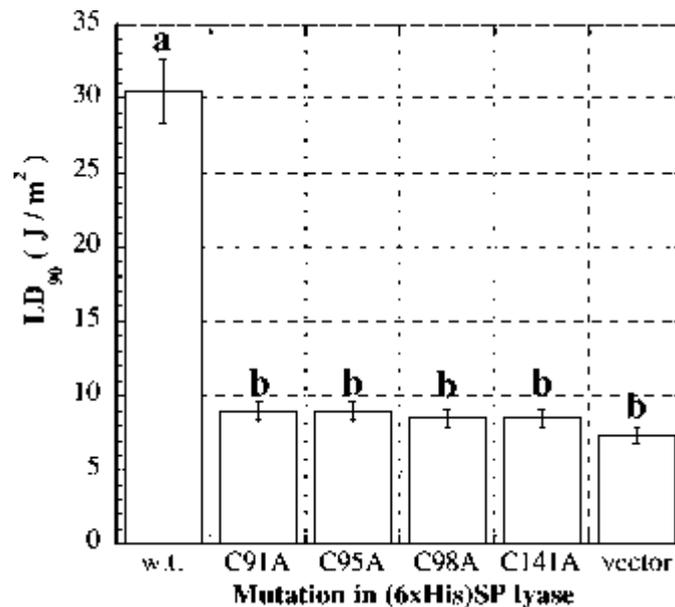


Figure 15 : Résistance aux UV de spores de *B. subtilis* portant différentes mutations sur le gène *splB*. LD₉₀ est la dose UV létale pour 90% de la population (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005)

Les auteurs démontrent également que cette cystéine n'interviendrait pas dans la chélation du centre fer-soufre, car une analyse en spectrophotométrie UV-Visible de la protéine purifiée sauvage et de la protéine mutée au niveau de cette quatrième cystéine ne montre pas de différence sur le contenu en fer et en soufre. Bien qu'essentielle à la survie des spores irradiées par les UV, le rôle précis de cette cystéine n'a pas été déterminé dans cette étude.

⁷ Cette résistance se mesure par la dose d'UV létale pour 90% de la population (en J.m⁻²). Plus cette valeur est élevée, plus les spores sont résistantes.

IV. Les protéines de la famille « Radical-SAM »

IV.1. Les protéines à centre [Fe-S]

Les protéines à centre Fer-Soufre ([Fe-S]) sont de très anciennes espèces biologiques apparues dans le métabolisme primitif, donc très tôt dans l'évolution (Holliday *et al.*, 2007). Cependant, la première protéine à centre fer-soufre identifiée, une ferrédoxine de *Clostridium pasteurianum*, n'a été découverte que dans les années 1960 (Mortenson *et al.*, 1962). En effet, la découverte tardive des protéines contenant ce groupe prosthétique, pourtant coloré, est principalement due à l'instabilité de ces centres à l'oxygène. Aujourd'hui, de nombreuses protéines [Fe-S] ont été identifiées, et il est clairement admis qu'elles sont présentes dans les trois domaines du vivant (Johnson *et al.*, 2005).

Les centres [Fe-S], présents dans les sites actifs des protéines, résultent de l'assemblage d'atomes de fer dans différents états d'oxydation (fer ferreux Fe^{2+} ou fer ferrique Fe^{3+}) et d'ions sulfures dits soufres inorganiques, en stœchiométrie variable. Ces agrégats forment une structure plus communément appelée « cluster » ou « centre » [Fe-S]. Ils sont en général reliés à la protéine par des groupements thiols de cystéine. Toutefois, des ligands de nature différente peuvent intervenir. En effet, il existe de plus en plus d'exemples dans lesquels les ligands du cluster sont des atomes d'azote appartenant à des histidines ou des arginines (Berkovitch *et al.*, 2004, Gurbiel *et al.*, 1991) ou bien des atomes d'oxygène fournis par des résidus aspartate, sérine, glutamine ou tyrosine (Brereton *et al.*, 1999, Calzolari *et al.*, 1995, Dobritzsch *et al.*, 2001). Enfin, la coordination des atomes de fer par des ligands exogènes a pu être observée. Ces ligands peuvent être le substrat de l'enzyme (comme le citrate dans le cas de l'aconitase), un cofacteur (la S-Adénosylméthionine pour les enzymes de la famille des « Radical-SAM ») ou encore des molécules d'eau (Lauble *et al.*, 1992, Layer *et al.*, 2003).

Les centres [Fe-S] existent majoritairement dans les protéines sous les formes $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+/1+}$, $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ et son produit d'oxydation $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+/0}$ (Schéma 16).

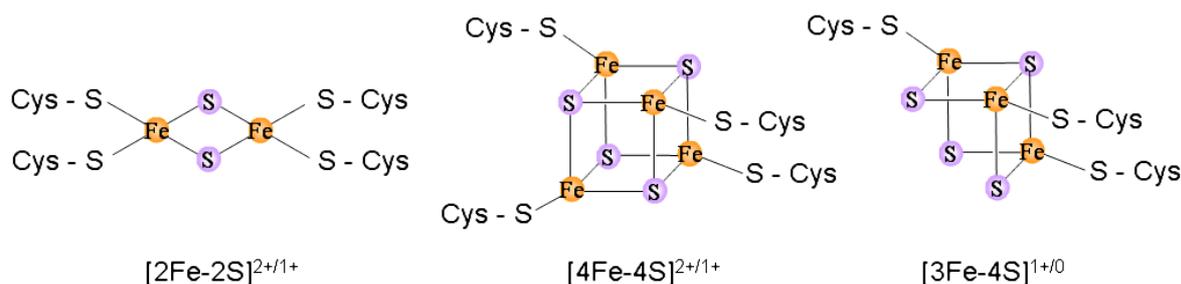


Schéma 16 : Les centres [Fe-S] majoritairement rencontrés dans les protéines. Cys : cystéine.

IV.2. La famille des « Radical-SAM »

Dans le cas des enzymes de la famille des « Radical-SAM », le centre [4Fe-4S] est coordonné par trois cystéines et la S-Adénosylméthionine a été identifiée comme quatrième ligand du centre (Frey *et al.*, 2003). Ces enzymes, regroupées récemment grâce à une étude bioinformatique dans une superfamille appelée « Radical-SAM », sont présentes dans tous les domaines du vivant et ont acquis un mécanisme conservé permettant de réaliser des réactions chimiquement difficiles (Sofia *et al.*, 2001) (Figure 16). En effet, cette superfamille catalyse des réactions variées (méthylations, isomérisations, cyclisations, oxydations, insertions de soufre) impliquées dans diverses voies de biosynthèse (ADN, cofacteurs, vitamines, antibiotiques, herbicides) et de biodégradation. On dénombre aujourd'hui plus de 40 réactions catalysées par des « Radical-SAM » (Frey *et al.*, 2008).

IV.2.1. Découverte de cette famille

La première enzyme appartenant à cette famille à avoir été caractérisée est la Lysine 2,3-aminomutase (LAM) de *Clostridium subterminale* (Chirpich *et al.*, 1970, Zappia *et al.*, 1970). Cette enzyme, sensible à l'oxygène, contenait des traces de fer après purification sous rampe d'Argon, et il a été montré qu'un ajout de fer stimulait l'activité, de même que la conversion de la lysine en β -lysine, dépendait absolument de la présence de dithionite et de S-Adénosylméthionine (SAM) (Moss *et al.*, 1987). De plus, grâce à une étude de Résonance Paramagnétique Electronique, R.M. Petrovitch *et coll* (1991, 1992) ont démontré la présence d'un centre [4Fe-4S] (Petrovich *et al.*, 1991, Petrovich *et al.*, 1992). Cependant, il a fallu attendre presque une vingtaine d'années avant de connaître précisément le rôle de la SAM. En effet, prenant en considération que la même réaction était catalysée par la β -lysine mutase, ayant pour cofacteur l'adénosylcobalamine, il a été proposé que la SAM était clivée par une réduction à un électron, pour générer un radical 5'-désoxyadénosyle, similaire à celui issu de l'Adénosylcobalamine (Baraniak *et al.*, 1989, Moss *et al.*, 1987). Ce radical va ensuite arracher un atome d'hydrogène au substrat, créant le radical substrat correspondant, qui se réarrange ensuite pour conduire au produit de réaction.

Quatre autres membres de cette nouvelle famille de protéines dépendantes de la SAM ont été ensuite étudiés (Frey *et al.*, 2008) : l'activase de la Pyruvate-Formiate Lyase (PFL), l'activase de la Ribonucléotide Réductase Anaérobie (RNR), la Biotine Synthase (BioB), et la Lipoate Synthase (LipA), par ordre chronologique. Elles possèdent toutes un centre [4Fe-4S] chélaté par les trois cystéines appartenant au motif conservé CxxxCxxC (Figure 16).

Par la suite, H.J. Sofia *et coll.*, ont recherché par analyse bioinformatique, les protéines contenant ce motif conservé et ont ainsi recensé plus de 600 membres (Sofia *et al.*, 2001). On dénombre actuellement près de 3000 protéines contenant ce motif pour environ 800 génomes séquencés, mais seulement une vingtaine de protéines ont été réellement caractérisées et étudiées biochimiquement (Frey *et al.*, 2008).

LAM (<i>C. subterminale</i>)	T	D	M	C	S	M	Y	C	R	H	C	T	R	R	Biosynthèse de la lysine
PFL-AE (<i>E. coli</i>)	F	Q	G	C	L	M	R	C	L	Y	C	H	N	R	Activation de la PFL
RNR-AE (<i>E. coli</i>)	V	S	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	Activation de la RNR
BioB (<i>E. coli</i>)	T	G	A	C	P	E	D	C	K	Y	C	P	Q	S	Biosynthèse de la biotine
SPL (<i>B. subtilis</i>)	A	T	G	C	M	G	H	C	H	Y	C	Y	L	Q	Réparation de l'ADN
HemN (<i>E. coli</i>)	I	P	F	C	H	K	L	C	Y	F	C	G	C	N	Biosynthèse du coproporphyrinogène
MoaA (<i>E. coli</i>)	T	D	V	C	N	F	R	C	T	Y	C	L	P	D	Biosynthèse des molybdoptérines
HydE (<i>C. reinhardtii</i>)	S	N	I	C	Q	N	D	C	S	Y	C	G	I	R	Maturation des Fe-hydrogénases

Figure 16 : Alignement d'une partie des séquences de différentes protéines possédant le motif CxxxCxxC conservé. LAM : Lysine 2,3-aminomutase ; PFL-AE : sous-unité activatrice de la Pyruvate-Formiate Lyase ; RNR-AE : sous-unité activatrice de la Ribonucléotide réductase anaérobie ; BioB : Biotine synthase ; SPL : Spore Photoproduct Lyase ; HemN : Coproporphyrinogène III oxydase ; MoaA : Biosynthèse des molybdoptérines ; HydE : Maturase des hydrogénases à fer.

IV.2.2.Mécanisme

Malgré la diversité des réactions catalysées, il a été montré que la première étape est commune et correspond à la formation d'un radical, faisant intervenir le centre [Fe-S] et la S-Adénosylméthionine (Schéma 17).

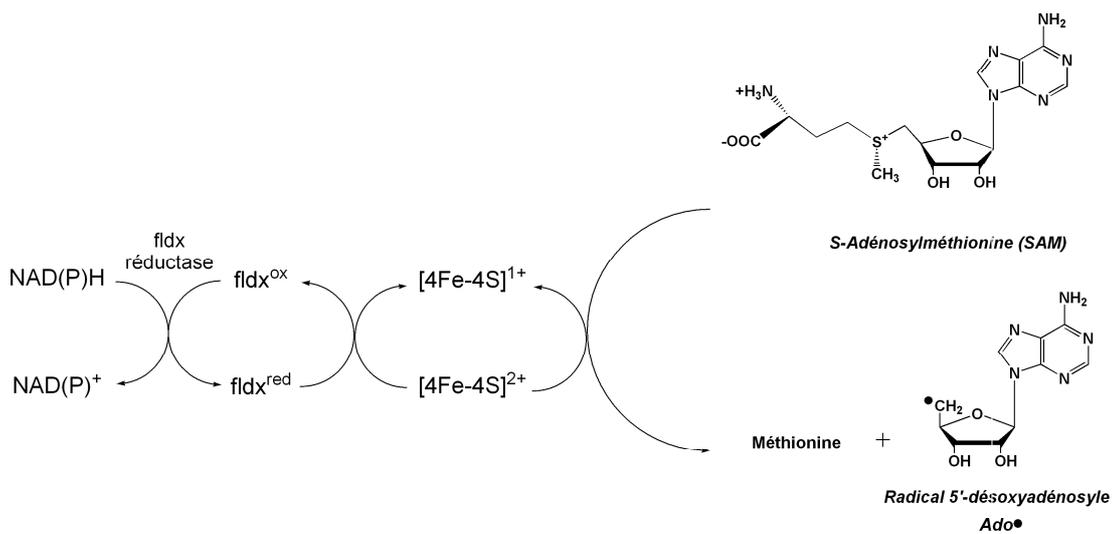


Schéma 17 : Mécanisme commun à toutes les protéines « Radical-SAM » : Réductolyse de la S-Adénosylméthionine avec formation du radical 5'-désoxyadénosyle (Ado•).

Dans un premier temps, le centre [4Fe-4S] est réduit de l'état d'oxydation +2 à l'état +1 qui est l'état rédox actif pour la réductolyse de la SAM (Fontecave *et al.*, 2001). Le potentiel d'oxydoréduction du couple $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ a été déterminé à $E^0 = -550$ mV (par rapport à l'électrode normale à hydrogène (vs ENH)) pour l'activase de la RNR anaérobie (Mulliez *et al.*, 2001), à $E^0 = -440$ mV vs ENH pour BioB (Ugulava *et al.*, 2001) et à $E^0 = -495$ mV vs ENH pour MiaB (Pierrel *et al.*, 2003). Si le système (NADPH : flavodoxine : flavodoxine réductase) a été proposé comme étant le réducteur physiologique des « Radical-SAM » (Birch *et al.*, 1995, Blaschkowski *et al.*, 1982, Ifuku *et al.*, 1994, Layer *et al.*, 2002, Mulliez *et al.*, 2001), la réduction à un électron du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ est généralement réalisée *in vitro* par des réducteurs chimiques puissants, tels que le dithionite ($E^0 \approx -550$ mV, pH 8) ou la 5-déazaflavine (5-DAF) photoréduite ($E^0 \approx -650$ mV, pH 8). Le transfert mono-électronique du centre réduit à la SAM provoque la rupture homolytique de la liaison C₅-S du sulfonium, ce qui génère de la méthionine, et le radical 5'-désoxyadénosyle, hautement réactif. C'est précisément ce radical qui initie les réactions catalysées par les protéines de la famille des « Radical-SAM ». Ce radical 5'-désoxyadénosyle (Ado[•]) transitoire n'a jamais été observé directement du fait de sa grande réactivité. Cependant P.A. Frey *et coll.* ont observé et caractérisé un radical allylique stabilisé, représenté sur le Schéma 18, lors de la réaction de la LAM en présence de lysine et de 3',4'-anhydroadénosylméthionine, un analogue de la SAM (Magnusson *et al.*, 2001).

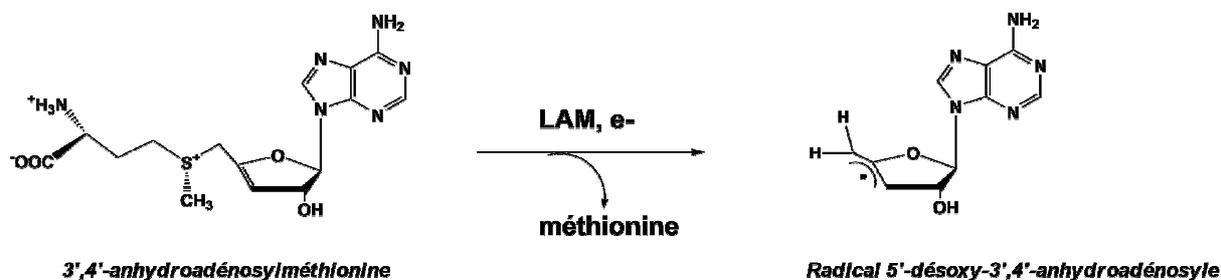


Schéma 18 : Observation du radical Ado[•] stabilisé par P.A. Frey *et al.*

Une autre indication en faveur de l'existence du radical Ado[•] a été apportée par l'équipe de J. Knappe. La PFL possède dans sa forme active un radical glycinyle, produit par une autre protéine appelée activase, membre de la famille « Radical SAM ». Un octapeptide contenant une déshydroalanine à la place de la glycine en question a été synthétisé ; l'analyse du produit de la réaction d'activation par spectrométrie de masse et RMN 2D a montré la formation d'une liaison covalente entre le C5' de la partie adénosyle et le carbone β du résidu déshydroalanine, comme indiqué sur le Schéma 19 (Wagner *et al.*, 1999).

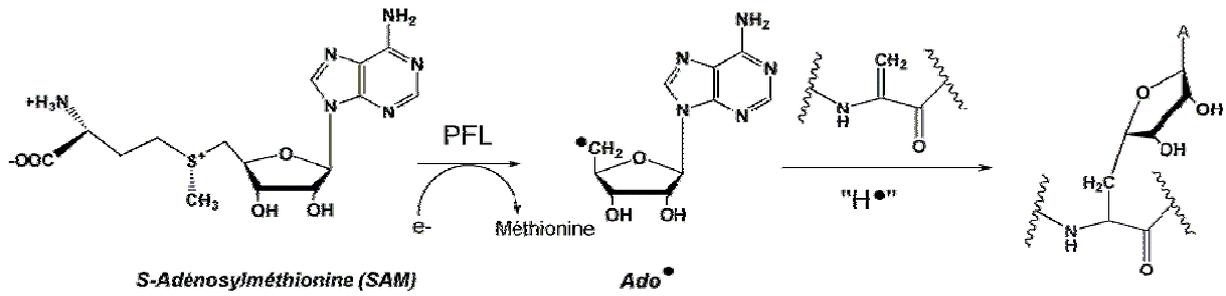


Schéma 19 : Piégeage du radical 5'-désoxyadénosine par l'octapeptide, où seule la déshydroalanine est représentée.

Actuellement, il existe deux hypothèses de mécanisme de formation du radical 5'-désoxyadénosyle (Fontecave *et al.*, 2004). La SAM est dans tous les cas coordonnée à un atome de fer du centre [Fe-S] par le groupement aminocarboxylate de la partie méthionine (Krebs *et al.*, 2002, Walsby *et al.*, 2002a). Dans un premier cas, le centre [Fe-S] transfère un électron à la SAM ce qui conduit directement à la formation d'Ado• après coupure homolytique de la liaison C-S (Schéma 20 (a)). Dans un deuxième cas, le radical est généré en deux étapes à partir du complexe cluster-SAM. Un des soufres du cluster substituerait la méthionine sur le carbone 5' de la SAM. La décomposition de cet intermédiaire produit alors le radical 5'-désoxyadénosyle (Schéma 20 (b)).

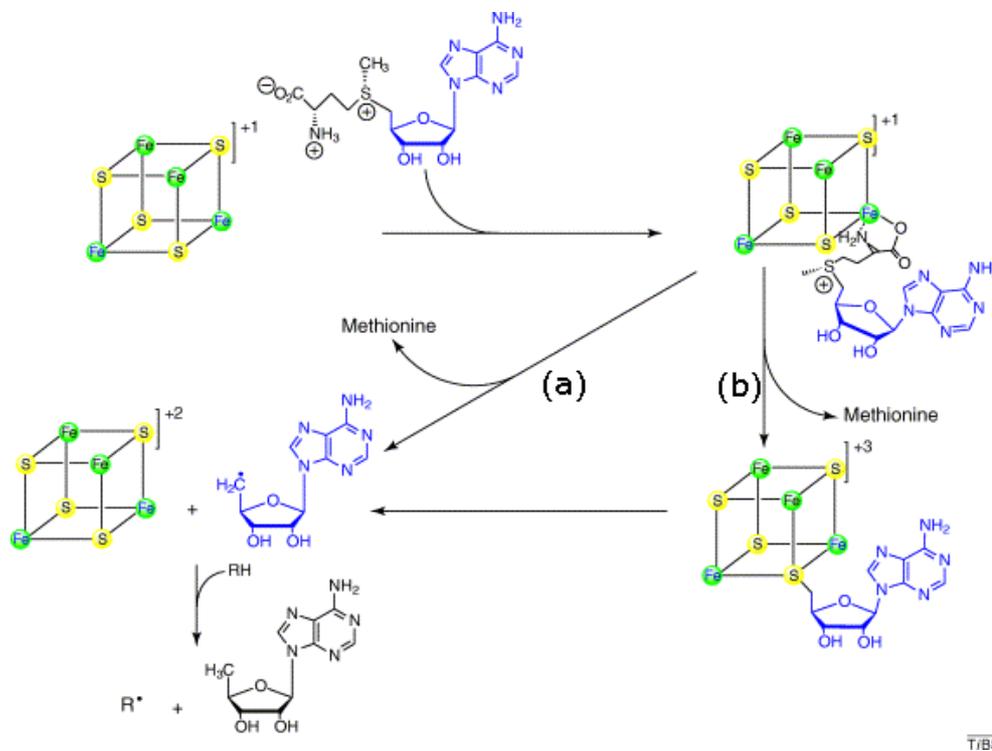


Schéma 20 : Les deux mécanismes hypothétiques de formation du radical 5'-désoxyadénosyle. (Fontecave *et al.*, 2004)

Les étapes suivant la génération du radical Ado^\bullet sont spécifiques à chaque enzyme de la superfamille. Néanmoins, elles peuvent se regrouper en deux sous-familles, selon le type de substrat (petite molécule organique ou protéine) auquel Ado^\bullet arrache un atome d'H. Celui-ci peut en effet arracher soit un atome d'hydrogène spécifique du substrat (représenté par S-H sur le Schéma 21) qui subit par la suite un réarrangement radicalaire menant au produit (comme dans le cas de la Lysine 2,3-aminomutase LAM) ; soit l'hydrogène d'un résidu glycine générant un radical sur la protéine (comme l'activase de la Ribonucléotide Réductase anérobie (RNR) ou l'activase de la Pyruvate-Formiate Lyase (PFL)) représenté par Gly-H sur le Schéma 21. Cependant, il est à noter que le devenir de la 5'-désoxyadénosine (AdoH) formée peut varier selon le système. Ainsi, dans le cas de la Lysine 2,3-aminomutase (LAM), le radical Ado^\bullet est régénéré au site actif de l'enzyme à chaque cycle catalytique alors que pour toutes les autres « radical-SAM » étudiées jusqu'à présent *in vitro*, le radical Ado^\bullet est irréversiblement transformé en 5'-désoxyadénosine (AdoH) après l'arrachement de l'atome d'hydrogène (Frey *et al.*, 2001).

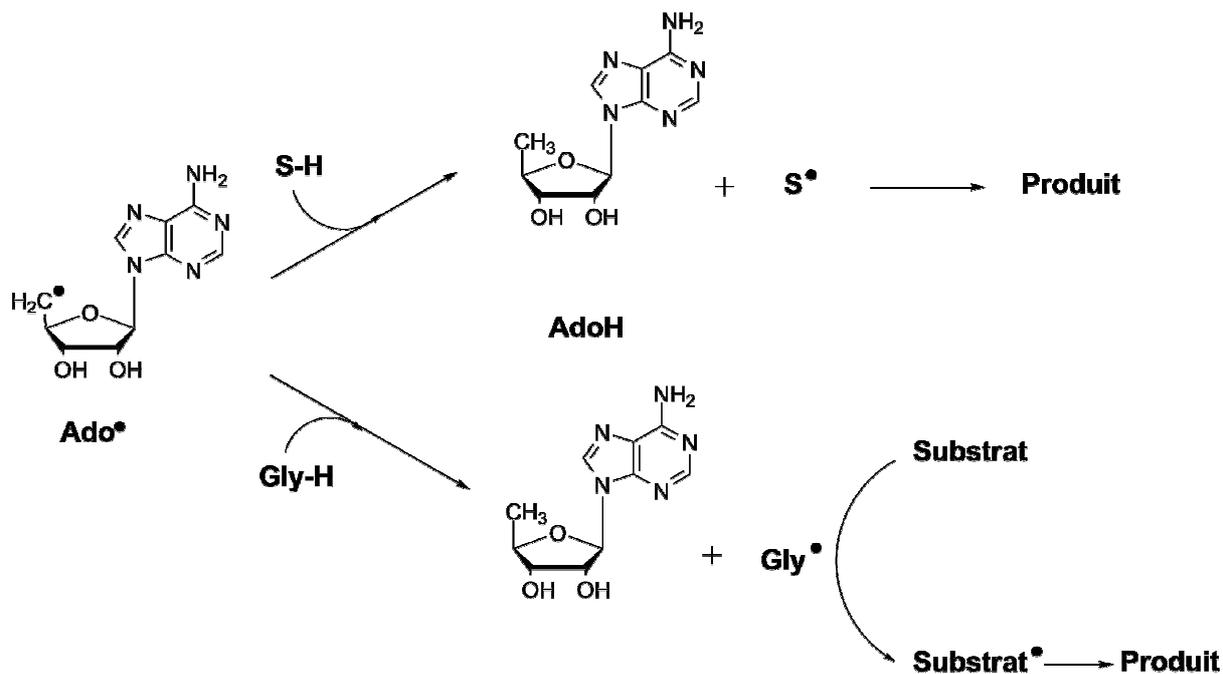


Schéma 21 : Mécanisme des deux sous-familles de « Radical-SAM ». S-H représente le substrat. Gly-H représente le résidu Glycine de l'enzyme.

IV.2.3. Structure des « Radical-SAM »

A l'heure actuelle, de nombreuses études spectroscopiques témoignent d'une liaison covalente entre le centre $[\text{Fe-S}]$ et la SAM, vraisemblablement au niveau du 4° Fe différencié. Les structures cristallographiques de 5 protéines « Radical-SAM » en présence de leur centre $[\text{Fe-S}]$ et de la SAM ont successivement été déterminées entre 2003 et 2008, révélant

l'organisation spatiale du centre [4Fe-4S] et de la SAM (Berkovitch *et al.*, 2004, Hanzelmann *et al.*, 2004, Layer *et al.*, 2003, Lepore *et al.*, 2005, Nicolet *et al.*, 2008). Dans toutes ces structures, 3 atomes de fer du centre [Fe-S] sont liés par les trois cystéines du motif CxxxCxxC (en rouge sur la Figure 17). La coordination bidentate du quatrième atome de fer par l'atome d'azote du groupe amino et par un atome d'oxygène du carboxylate de la SAM, représentée en bleu sur la Figure 17, est invariablement observée.

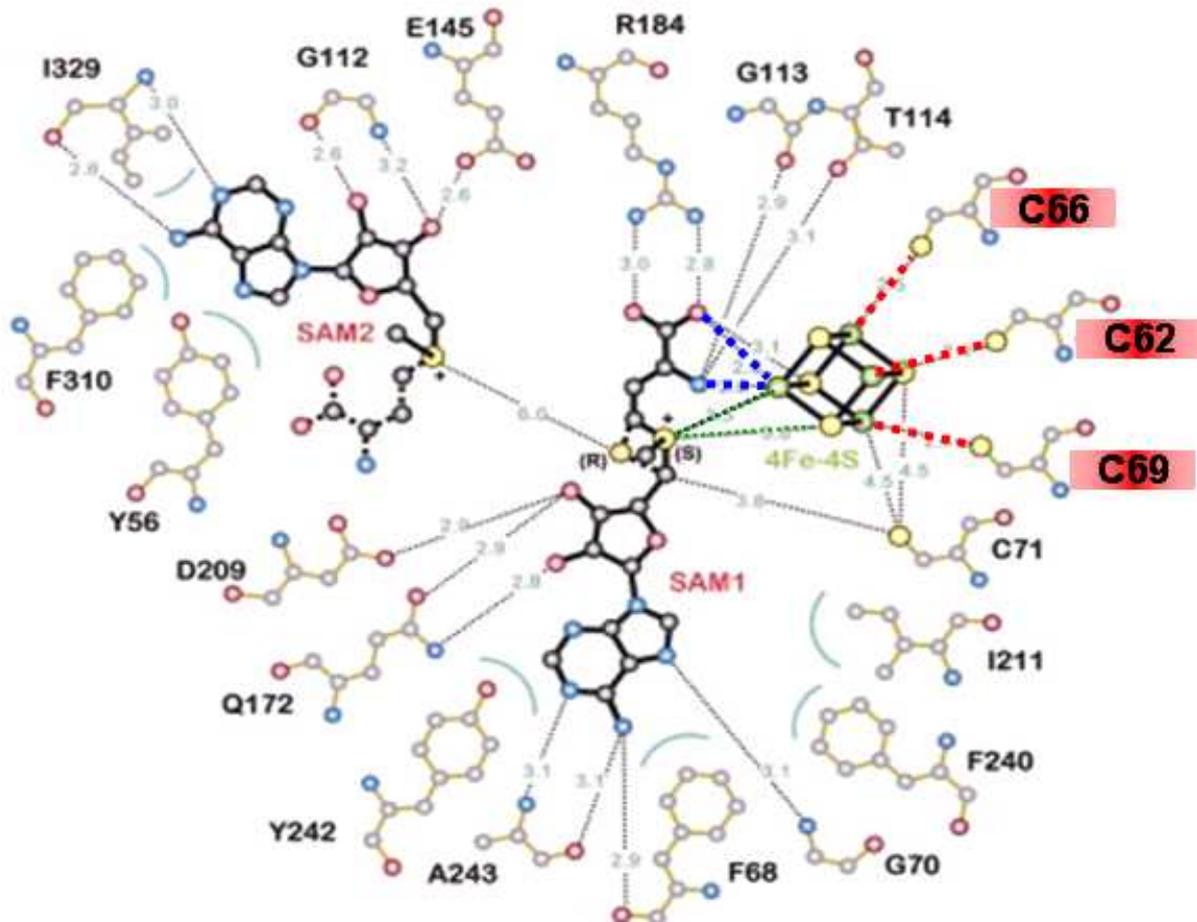


Figure 17 : Schéma issu de la structure tridimensionnelle de HemN d'après (Layer *et al.*, 2003). Les atomes de fer sont indiqués en vert. Trois d'entre eux sont chélatés par les trois cystéines du motif CxxxCxxC C62, C66 et C69 (pointillés rouges). Le quatrième ligand du 4^e fer est le groupement aminocarboxylate de la SAM (pointillés bleus). Les atomes de soufre sont indiqués en jaune.

Les structures des 6 protéines « Radical-SAM » actuellement résolues (HemN, BioB, MoaA, LAM et plus récemment HydE et Tyw1⁸) partagent toutes le même repliement de type tonneau β ou tonneau TIM (pour Triose Phosphate Isomerase), une structure de type $(\alpha/\beta)_8$ commune à de nombreuses protéines dans laquelle un anneau interne à 8 brins β parallèles est

⁸ La structure de cette protéine a été résolue sans SAM et sans le centre [4Fe-4S]. Un modèle a été construit de façon à positionner la SAM, les deux centres [Fe-S] et le substrat de la protéine (Goto-Ito *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2007).

entouré d'une couronne de 8 hélices α (Murzin *et al.*, 1995) (Figure 18). Le centre [4Fe-4S], ainsi que la SAM, sont localisés au cœur du tonneau. Seule la Biotine Synthase possède un repliement complet de type $(\alpha/\beta)_8$, alors que les autres structures disponibles ont un tonneau incomplet contenant entre 4 et 6 paires α/β . Un travail de bioinformatique a prédit que la majorité des « Radical-SAM » devrait avoir un repliement $(\alpha/\beta)_6$ (Layer *et al.*, 2005, Nicolet *et al.*, 2004) tandis que les membres les plus primitifs de la superfamille auraient une structure en demi-tonneau, $(\alpha/\beta)_4$, comme la Ribonucléotide Réductase Anaérobie.

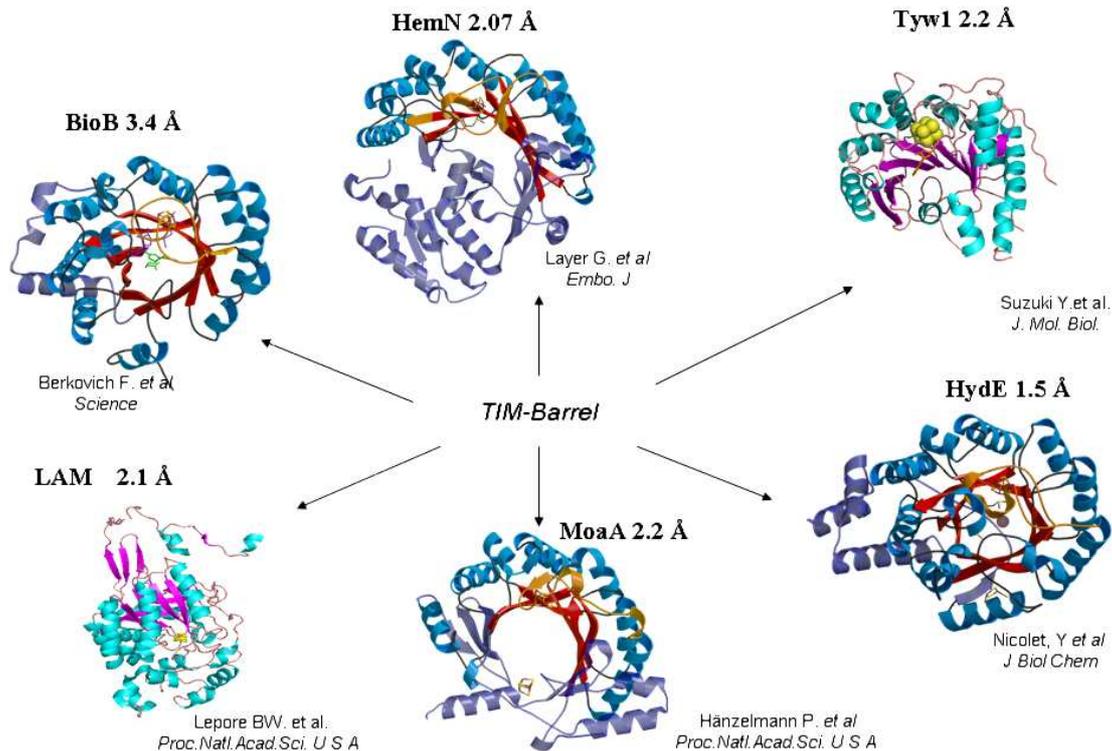


Figure 18 : Structures des 6 protéines de la famille des « Radical-SAM » disponibles actuellement présentant toutes le repliement de type tonneau TIM. HemN : coproporphyrinogène III oxydase (code pdb 1olt), BioB : Biotine synthase (1r30), LAM : Lysine 2,3-aminomutase (2a5h), MoaA : protéine impliquée dans la biosynthèse d'un cofacteur à molybdène (1tv8), HydE : Maturase des hydrogénase à Fe (3ciw), Tyw1 : protéine impliquée dans la modification de la wyosine (2z2u).

IV.3. La Spore Photoproduct Lyase : Mécanisme proposé

T.P. Begley fut le premier à proposer un mécanisme concernant la réparation du SP par la Spore Photoproduct Lyase (Mehl *et al.*, 1999). A la suite de la découverte par W.L. Nicholson *et coll.* de la nécessité du cofacteur SAM pour l'activité *in vitro*, il propose que le radical 5'-désoxyadénosyle, issu de la réductolyse de la SAM soit à l'origine du clivage du Photoproduct des spores, et donc que cette réparation procède via un mécanisme radicalaire. Pour vérifier son hypothèse, un modèle de Photoproduct des Spores (Schéma 22), possédant un groupement thiophényle précurseur de radical est synthétisé. Le radical centré en C6

général chimiquement se réarrange et conduit à la diméthylthymine. Ce résultat montre qu'à partir d'un radical en C6 on arrive au produit final et donc qu'un mécanisme radicalaire est très probablement initié au niveau du carbone C6 d'une des bases du SP.

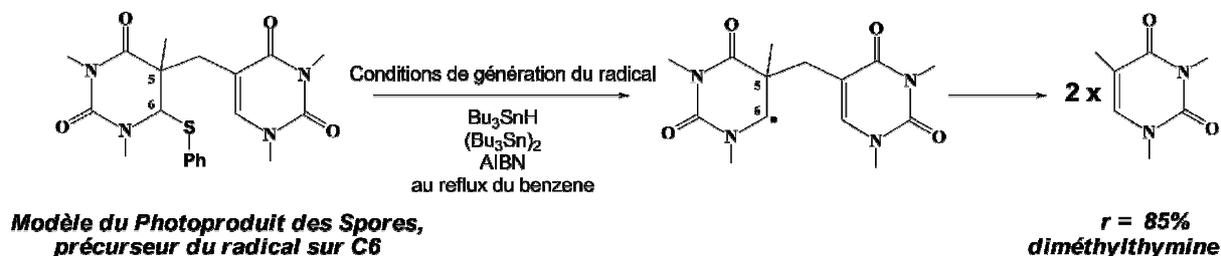


Schéma 22 : Fragmentation du modèle du Photoproduit des spores faisant intervenir un probable intermédiaire radicalaire dans la réaction de réparation du SP par la SPL, en position 6 (Mehl *et al.*, 1999).

Cette hypothèse sera ensuite étayée par l'équipe de J.B. Broderick en 2002 (Cheek *et al.*, 2002). Grâce au marquage au tritium des hydrogènes du C6 de la thymidine incorporée dans l'ADN ensuite irradié, les auteurs ont pu observer un transfert de marquage de la lésion **1** sur la SAM (Schéma 23).

Une deuxième information apportée par ces résultats montre également qu'Ado[•] ne forme pas un radical protéique sur la SPL qui serait par la suite l'initiateur de la réaction. De ce point de vue, la SPL fait partie du sous-groupe des « Radical-SAM » pour lequel Ado[•] génère un radical intermédiaire sur le substrat.

Une troisième information apportée par ces expériences de marquage concerne le rôle catalytique de la SAM. En effet, le fait de retrouver du marquage sur la SAM impliquerait qu'AdoH se retransforme en Ado[•] et se recombine avec la méthionine pour reformer la SAM qui dans ce cas serait donc utilisée de façon catalytique par rapport au SP. En faveur de cette hypothèse, les auteurs n'observent jamais la production d'AdoH. A la lumière de ces résultats, le mécanisme proposé par cette équipe est présenté Schéma 23.

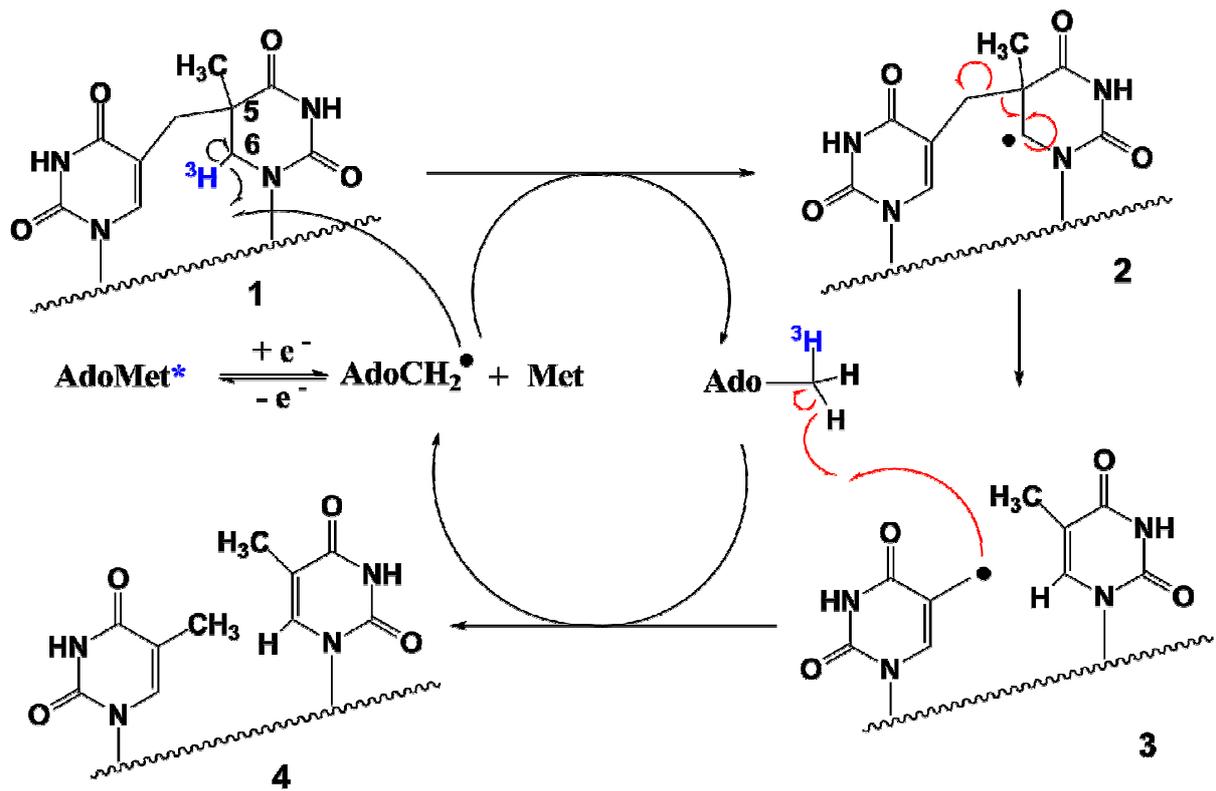


Schéma 23 : Mécanisme de réparation par la SPL proposé par J.B. Broderick (Cheek *et al.*, 2002). * signifie que du marquage est retrouvé sur la SAM (AdoMet)

Les dernières expériences de ce groupe confirmant encore l'hypothèse de l'utilisation de la SAM de façon catalytique mettent en jeu l'emploi de SAM marquée au tritium en position 5' (Schéma 24). Dans ces conditions, les auteurs observent l'incorporation de tritium sur de la thymine après réparation par la SPL (Buis *et al.*, 2006). Cependant, de très faibles quantités de radioactivité sont retrouvées sur les thymines par rapport à la quantité mise en jeu.

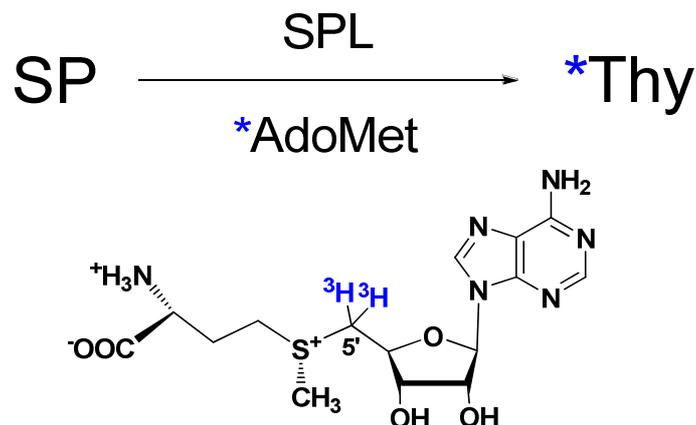


Schéma 24 : Schématisation de l'expérience de transfert de marquage de la SAM vers la thymine réparée (Buis *et al.*, 2006). * signifie que du tritium est présent dans la molécule.

Ce mécanisme (représenté Schéma 23) est à ce jour le seul à avoir été proposé. Si les deux premières étapes de celui-ci (conduisant à l'intermédiaire **3**) ont été validées par les expériences précédentes (Cheek *et al.*, 2002, Mehl *et al.*, 1999), la dernière étape, dans laquelle AdoH fournit le dernier atome d'hydrogène à l'intermédiaire **3**, est en revanche controversée. D'une part, W.L. Nicholson a observé la production d'AdoH (entre 1,8 et 2,4 équivalents par SPL, même lorsque l'ADN n'est pas présent) qui ne serait donc pas réutilisée pour la dernière étape. D'autre part, une étude par la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) montre que les positions relatives de la lésion en cours de réparation et d'AdoH seraient incompatibles pour un transfert d'atome d'hydrogène d'AdoH vers le radical thymine **3** (Guo *et al.*, 2003). A ce jour, il existe donc un désaccord entre d'une part l'équipe de J.B. Broderick, qui pense que la SAM est régénérée à chaque cycle catalytique et les équipes de J.D. Guo et W.L. Nicholson, qui suggèrent qu'elle soit utilisée comme co-substrat.

V. Objectifs de la thèse

A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées sur la SPL combinant à la fois :

- i) la caractérisation structurale complète de l'enzyme ;
- ii) l'étude de son activité et de son mécanisme réactionnel sur des substrats bien définis.

Le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, laboratoire au sein duquel le projet a débuté, possédait déjà une grande expertise dans l'étude des protéines de la famille des « Radical-SAM ». La nécessité d'avoir un substrat de l'enzyme en grande quantité a rapidement été capitale pour l'avancement du projet. Ainsi la possibilité d'une collaboration avec le laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, qui possède également toute l'expertise concernant la synthèse et l'analyse de lésions de l'ADN (de plus, cette équipe avait déjà travaillé sur la chimie du Photoproduit des spores), s'est-elle révélée très importante. La synergie entre ces deux laboratoires nous a permis de définir trois axes majeurs pour ce travail de thèse. Ils correspondent aux trois grandes parties de ce manuscrit.

Caractérisation biochimique et spectroscopique de la Spore Photoproduit Lyase (Partie I)

Comme mentionné précédemment, c'est grâce à la bioinformatique et se fondant sur des analogies avec d'autres protéines de la famille des « Radical-SAM » qu'il a été postulé que le centre métallique de la Spore Photoproduit Lyase était un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$, coordonné par le motif CxxxCxxC et le groupe aminocarboxylate de la partie méthionine de la SAM. Cependant, celui-ci n'avait jamais été caractérisé complètement de façon spectroscopique. Un des objectifs de ma thèse a donc été de purifier les Spore Photoproduit Lyases de différents organismes, afin d'étudier par différentes techniques spectroscopiques, la nature de leur centre métallique et leur coordination au cofacteur SAM. La même étude pour la SPL de *B. subtilis* mutée au niveau de la quatrième cystéine a également été entreprise.

Etudes sur le Photoproduit des spores (Partie II)

Un des enjeux du travail était de posséder un substrat, d'une part reconnu par l'enzyme, et d'autre part, dont on puisse suivre facilement la disparition et le devenir, permettant une étude enzymatique et mécanistique poussée. Ce substrat devait également être disponible en assez grande quantité de façon à entreprendre son étude structurale afin de déterminer la stéréochimie du Photoproduit des spores. La collaboration étroite avec T. Douki et D. Gasparutto, m'a permis d'effectuer la synthèse et la caractérisation du Photoproduit des spores sous la forme d'un dimère de thymines liées par un pont phosphodiester (nommé le SPTpT) ainsi que l'incorporation de cette lésion dans des oligonucléotides de séquence connue.

Activité enzymatique et mécanisme catalytique de réparation de la Spore Photoproduit Lyase (Partie III)

Le dernier objectif majeur de cette étude était d'avoir plus d'informations sur le mécanisme réactionnel de la Spore Photoproduit Lyase, et notamment d'identifier i) les différents intermédiaires réactionnels et ii) le rôle de la SAM, en tant que cofacteur catalytique ou co-substrat. Pour cette étude, la SPL sauvage de *B. subtilis* ainsi que la protéine mutée au niveau de la 4^e cystéine (mutant C141A) ont été utilisées.

Matériels et Méthodes

I. Matériels biologiques

I.1. Souches bactériennes

I.1.1. *Escherichia coli* DH5 α

Ces bactéries ont le génotype suivant : *F- ϕ 80lacZ Δ M15 recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17(rk-, mk+) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169*. Cette bactérie est utilisée pour la préparation de plasmides. Elle est déficiente en endonucléase I spécifique de l'ADN (endA), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

I.1.2. *Escherichia coli* Tuner (DE3)

Ces bactéries ont le génotype suivant : *F-ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm lacY1* (DE3). Ce système est utilisé pour la surproduction de protéines dont les gènes sont sous la dépendance de promoteurs de phage T7. L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour la T7 RNA polymérase. Il est sous contrôle du promoteur lac, inductible par l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG). La mutation de la lac perméase lacY1 permet de contrôler le niveau d'expression. Ces cellules ont été utilisées pour l'expression des Spore Photoproduct Lyases.

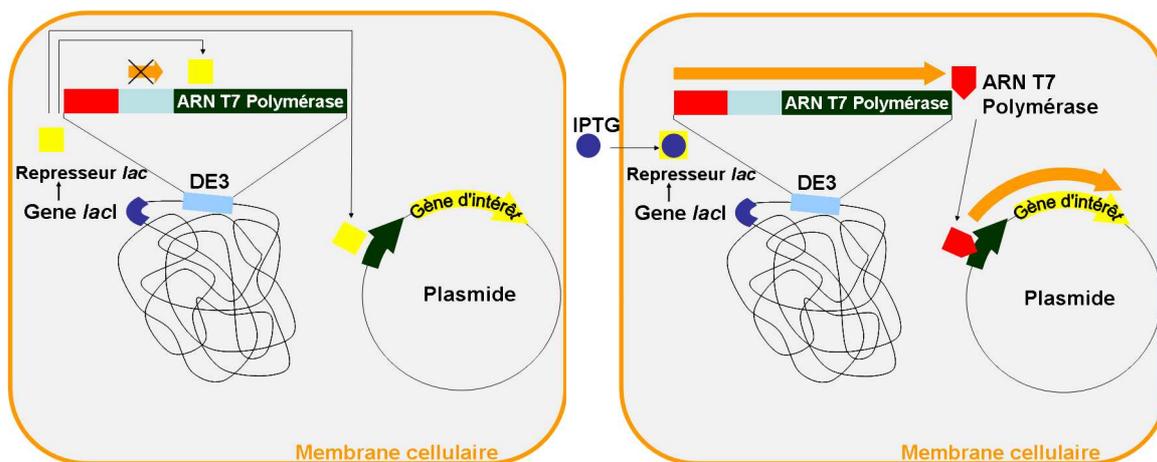


Schéma 25 : Principe de l'expression sous contrôle des promoteurs T7. A gauche, pas d'induction : le gène *lacI* exprime le répresseur lac, réprimant l'expression de l'ARN T7 polymérase. A droite, l'IPTG empêche le répresseur lac de se fixer sur le promoteur de l'ARN T7 polymérase, il y a traduction.

I.2. Vecteur de surexpression

I.2.1. Le vecteur pT7-7

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Il possède également le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline. Le gène *splB* de *Bacillus subtilis* sauvage a été cloné dans ce vecteur aux sites de restriction [*NdeI-HindIII*]. Le plasmide obtenu est noté pT7-SPLBs. Il code pour la protéine SPLBs comportant une étiquette polyhistidine en N-terminal. L'insertion de la séquence polyhistidine a été réalisée à l'aide de deux oligonucléotides complémentaires qui, lorsqu'ils sont hybridés, forment une cassette contenant en 3' et en 5' des extrémités compatibles avec un site *NdeI* digéré. Cette cassette a été utilisée pour effectuer la ligation dans le vecteur pT7 préalablement digéré par *NdeI*. Le plasmide pT7-SPLBs a également servi de matrice pour l'obtention par PCR de la protéine mutée de la SPL, contenant donc également une étiquette polyhistidine en N-terminal.

I.2.2. Le vecteur pET-28a

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Il possède également le gène *kan* qui confère la résistance à la kanamycine. Le gène *splB* de *Clostridium acetobutylicum* a été cloné dans ce vecteur pET-28a aux sites de restriction [*BamHI-NdeI*]. Le plasmide obtenu a été noté pET-SPLCa. Il code pour la protéine SPLCa comportant une étiquette polyhistidine en N-terminal.

I.3. Milieux de culture

La composition des milieux de culture a été décrite précédemment (Sambrook *et al.*, 2001). Le milieu généralement utilisé pour les cultures bactériennes est le milieu riche LB (liquide et solide Luria Bertani). Le milieu LB contient 10 g/L de peptone tryptique de caséine, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl. Ce milieu a été obtenu chez AthenaES.

Le milieu minimum M9 contient 6 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄ et 1 g/L de NH₄Cl. Il est enrichi par 2 mM de MgSO₄, 0,4 % de glucose, 0,2 mg/L de thiamine, 10 µM de CaCl₂, 2 mL/L de milieu LB et 20 à 40 µM de citrate de Fer ou de FeCl₃.

II. Méthodes de biologie moléculaire

II.1. Introduction d'ADN dans *E. coli*

II.1.1. Préparation des cellules compétentes

Toutes les étapes se déroulent stérilement.

100 mL de LB sontensemencés à 1% avec une préculture de bactéries Tuner (DE3) ou DH5 α réalisée sur la nuit. Les cellules sont alors cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ($A^{600\text{ nm}} = 0,4$) ; puis la croissance est arrêtée en laissant reposer les cultures dans la glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 5 000 rpm, les culots sont repris dans 10 mL de CaCl₂ 0,1 M et maintenus à 4°C pendant 30 minutes. Le traitement des cellules par les ions divalents Ca²⁺ altère les membranes en créant des microperforations dans la bicouche lipidique, ce qui facilitera la transformation par un ADN exogène. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries sont reprises dans 700 μ L de CaCl₂ 0,1 M, 10% glycérol puis aliquotées et congelées dans l'azote liquide. Les cellules compétentes sont alors conservées à -80°C.

II.1.2. Transformation des cellules compétentes

Dans un tube eppendorf stérile, 100 μ L de cellules compétentes sont incubés à 4°C avec 100 à 500 ng de vecteur de surexpression pendant 30 minutes. Un choc thermique, réalisé à 42°C pendant 2 minutes, permet la transformation des bactéries. En effet, ce traitement accentue la déstabilisation de la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Celles-ci sont ensuite remises 2 minutes à 4°C, puis reprises dans 500 μ L de milieu LB, et laissées 1 heure sous agitation à 37°C. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar, additionné des antibiotiques appropriés (ici ampicilline 100 μ g/mL ou kanamycine 50 μ g/mL). Les boîtes sont placées une nuit à 37°C. Les colonies formées sont celles contenant le vecteur de surexpression.

II.1.3. Préparation d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 mL de culture de cellules DH5 α transformées avec le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN génomique est alors éliminé par centrifugation, et le surnageant

déposé sur une colonne comportant une membrane constituée de gel de silice, permettant une adsorption sélective de l'ADN plasmidique, en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon d'éluion du kit : Tris 10 mM, pH 8,5). L'ADN plasmidique purifié est stocké à -20°C .

II.2. Amplification par PCR - Mutagenèse dirigée

L'amplification en chaîne par l'ADN polymérase (PCR) permet de synthétiser des fragments d'ADN ou des plasmides entiers. Elle s'effectue en utilisant 2 oligonucléotides qui vont servir d'amorces, une matrice d'ADN et une ADN polymérase thermorésistante. La réaction consiste en une répétition de 3 étapes qui forment un cycle de température : une étape de dénaturation (séparation des 2 brins de l'ADN matrice), une étape d'hybridation (appariement des amorces à leur séquence complémentaire sur la matrice d'ADN) et une étape d'élongation (synthèse de l'ADN complémentaire par la polymérase).

II.2.1. Amplification du plasmide pT7-SPLBsC141A

L'insertion d'une mutation dans le gène *spIB* au niveau d'un résidu cystéine a été réalisée par mutagenèse dirigée suivant les recommandations proposées par Stratagene (Quick Change Site-Directed Mutagenesis). Selon cette technique, le plasmide pT7-SPLBs a servi de matrice pour l'amplification par PCR, à partir de 2 oligonucléotides contenant la mutation désirée, chacun étant complémentaire d'un des 2 brins d'ADN du plasmide. La polymérase utilisée est la Pfu ultra (Stratagene), capable de synthétiser des brins d'ADN de grande taille (jusqu'à 9 kb). Le produit de la réaction est ensuite digéré par l'endonucléase *DpnI* qui coupe spécifiquement les ADN méthylés et qui donc va seulement digérer le plasmide parental ne comportant pas la mutation.

Par cette technique, seule la cystéine 141 de la SPL de *B. subtilis* a été mutée en alanine. La séquence des amorces utilisées pour construire le mutant ainsi que les conditions de réaction sont listées respectivement dans le Tableau 3 et le Tableau 4.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
BsC141A 1	GAA GCA TCA <u>GCT</u> ACG TCA GAC
BsC141A 2	GTC TGA CGT <u>AGC</u> TGA TGC TTC

Tableau 3 : amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée sur le gène *spIB*. Les bases mutées sont indiquées en gras / couleur bleue. Les codons soulignés codent alors pour une alanine.

Typiquement, le mélange réactionnel est tout d'abord porté à 94°C pendant 30 secondes afin de dénaturer l'ADN parental (Etape 1). 16 cycles de température permettent ensuite l'amplification de l'ADN muté (Etape 2). L'amplification se termine par une étape d'élongation de 10 minutes à 68°C (Etape 3). La PCR a été effectuée sur un appareil Robocycler gradient 40 (Stratagene).

<i>Etape 1</i>	94 °C, 30 sec
<i>Etape 2</i>	94 °C, 30 sec
	45 °C, 1 min
<i>Etape 3</i>	68 °C, 12 min
	68°C, 10 min

Tableau 4 : Conditions d'amplification par PCR. Etape 1 : Dénaturation de l'ADN parental. Etape 2 : Amplification de l'ADN muté. Ce cycle est répété 16 fois de suite. Etape 3 : Elongation de l'ADN muté.

II.2.2. Analyse des produits PCR : gel d'agarose et séquençage

L'ADN plasmidique obtenu après l'amplification par PCR ou après clonage est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, digéré ou non par des enzymes de restriction adaptées. Un volume de tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol, 2,25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN. Le mélange est déposé sur gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille allant de 250 à 10 000 pb (Fermentas). Après migration sous une tension de 135 V dans du tampon TAE (Tris 20 mM, acétate 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,3) pendant 30 minutes environ, le gel est plongé dans une solution de Bromure d'éthidium (BET) afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous lumière UV ($\lambda=260$ nm). La comparaison avec les marqueurs de taille permet de déterminer la taille (approximative) du fragment d'ADN étudié.

Le mélange réactionnel obtenu après PCR et vérifié par gel d'agarose est ensuite utilisé pour transformer des cellules compétentes DH5 α . L'ADN plasmidique contenant a priori la mutation désirée est alors extrait et purifié puis séquencé par la société Genome Express (Meylan, France) afin de vérifier la présence de la mutation ainsi que l'intégrité de la séquence du gène muté.

III. Méthodes biochimiques

III.1. Obtention des protéines

III.1.1. Purification en aérobiose

III.1.1.a. Surexpression des SPL de Bacillus subtilis, Clostridium acetobutylicum

La souche *E. coli* Tuner(DE3) est transformée par l'un des plasmides pT7-SPLBs, pT7-SPLBsC141A, pET-SPLCa, suivant la protéine à surexprimer. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar, contenant 100 µg/mL d'ampicilline pour les plasmides pT7 et 50 µg/mL de kanamycine pour les plasmides pET. Une colonie isolée sur boîte de Pétri est alors mise en culture dans 100 mL de milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat (concentration finale = 100 µg/mL d'ampicilline ou 50 µg/mL de kanamycine). Après une incubation d'une nuit à 37°C, sous agitation (180 rpm), cette préculture sert à inoculer 10 L de milieu LB/antibiotique à 1 %. La culture se poursuit à 37°C. Lorsque la densité optique à 600 nm des cultures atteint 0,8, celles-ci sont placées à 4°C. L'expression des protéines est induite par ajout d'une solution d'IPTG (concentration finale = 0,5 mM) et les cultures sont remises à incuber pour la nuit à 15°C, ceci afin de minimiser la formation de corps d'inclusion. Les culots bactériens sont ensuite récupérés par centrifugation à 4 000 rpm, à froid, lavés avec du tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,5 et conservés à -80°C.

III.1.1.b. Préparation des extraits protéiques

Les culots bactériens obtenus à partir des cultures sont décongelés et remis en suspension dans le tampon d'extraction froid (Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, pH 7,5, tween 0.5%, triton X100 0.5%, cocktail d'inhibiteur de protéases Complete-EDTA free (Roche) – 1 tablette pour 50 mL de tampon), puis traités aux ultrasons (15 cycles de 15 secondes) toujours en s'assurant d'avoir une température proche de 4°C. Les extraits totaux sont alors ultracentrifugés à 45 000 rpm, pendant 1h30 à 4°C, et le surnageant contenant les extraits protéiques solubles est gardé à 4°C pour être immédiatement chargé sur la colonne de purification.

III.1.1.c. Chromatographie d'affinité

Toutes les étapes suivantes de purification des protéines sont réalisées à 4°C.

Les extraits protéiques obtenus sont chargés sur une colonne Nickel - Acide Nitrilo Triacétique (Ni-NTA) (Qiagen) d'un volume de 10 mL, maintenue à 4°C et équilibrée avec le tampon A (Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, pH 7,5).

Cette étape chromatographique permet une purification aisée des protéines possédant une étiquette polyhistidine. Après un lavage de la colonne avec le tampon A, la colonne est lavée abondamment avec le tampon B (Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, imidazole 30 mM, pH 7,5), puis la protéine est éluée par un gradient linéaire d'imidazole (30 mM à 500 mM). L'utilisation d'une solution contenant de l'imidazole à faible concentration permet lors du lavage de déplacer l'équilibre de complexation et de décrocher les protéines fixées de façon non spécifique, puis la forte concentration d'imidazole permet d'éluer spécifiquement la protéine contenant l'étiquette polyhistidine. Les fractions récupérées sont ensuite analysées sur gel d'électrophorèse.

III.1.1.d. Filtration sur gel

Dans le cas de la SPL, il est nécessaire d'enlever l'imidazole de la solution protéique afin d'éviter la précipitation de la protéine. Pour cela, une étape de filtration sur gel est effectuée juste après l'éluion de la colonne d'affinité avec les fractions colorées issues de cette éluion.

La colonne HiPrep™ Desalting de GE Healthcare a été utilisée. Elle contient une résine Sephadex G25. Typiquement, 15 mL de solution protéique sont chargées sur la colonne équilibrée avec le tampon A. Puis l'éluion se fait avec ce tampon. Environ 25 mL de solution protéique ne contenant plus d'imidazole sont récupérées.

Les fractions obtenues sont concentrées par centrifugation sur des cellules Amicon ultra (Millipore), de taille de coupure 30 000 Da. Après cette étape, les protéines sont pures à 90 % environ.

III.1.1.e. Chromatographie d'exclusion de taille – Détermination de l'état oligomérique de la protéine

L'état d'oligomérisation de la SPL de *B. subtilis* reconstituée a été déterminé sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex-75 analytique (GE Healthcare) équilibrée en anaérobiose avec le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, DTT 5 mM, pH 7,5, à 0,3 mL/min. Cette colonne sépare les constituants d'un mélange selon leur poids moléculaire. Le fractionnement de la Superdex-75 se situe entre 3 000 Da et 70 000 Da. Une calibration de la colonne a été effectuée avec des protéines de masse moléculaire connue.

50 μL de SPL sauvage et mutée reconstituées de *B. subtilis* respectivement à 14,6 mg/mL et 15,5 mg/mL ont été injectés.

III.1.2. Purification en anaérobiose

La surexpression est effectuée dans les mêmes conditions que la surexpression en vue de la purification en aérobiose. En revanche, les étapes de préparation des extraits et la purification sur colonne d'affinité ont lieu en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (<4 ppm O_2), à 17°C . Lorsque la protéine doit être produite en vue de la réalisation d'un spectre Mössbauer, les bactéries sont cultivées en milieu M9 enrichi contenant $34 \mu\text{M}$ de $^{57}\text{FeCl}_3$ (préparé par dissolution à chaud – de l'ordre de 100°C – de ^{57}Fe par un mélange équimolaire d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique).

Les culots bactériens obtenus à partir des cultures sont décongelés en conditions d'anaérobiose stricte et remis en suspension dans le tampon d'extraction froid (même composition que pour la purification en aérobiose), puis traités au lysozyme (1 mg/mL) sous agitation pendant 45 min. Les cellules subissent ensuite 3 cycles de congélations dans l'azote liquide suivis de décongélations dans la boîte à gants. Les extraits totaux sont alors ultracentrifugés à 45 000 rpm, pendant 1h30 à 4°C , et le surnageant contenant les extraits protéiques solubles est immédiatement chargé sur la colonne de purification installée sur un système FPLC Biorad en boîte à gants. Les tampons et la méthode utilisés sont strictement identiques à ceux cités ci-dessus concernant la purification hors boîte à gants. Après collection des fractions contenant la SPL sauvage de *Clostridium acetobutylicum* et après l'étape de gel filtration, la solution protéique est concentrée par ultrafiltration sur une membrane Amicon 30K (Millipore), la solution protéique, après dosages, est aliquotée et congelée à -80°C .

III.2. Reconstitution du centre [Fe-S] de la SPL

Les expériences sont réalisées en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (<4 ppm O_2), à 17°C . Deux méthodes ont été utilisées afin d'obtenir les protéines contenant leur centre [Fe-S].

❖ Méthode 1 : Reconstitution « chimique »

La solution protéique (1 mL entre 5 et 10 mg/mL) est d'abord incubée avec du dithiothréitol (DTT – 5 mM) pendant 5 minutes à température ambiante. Ce traitement permet la réduction d'éventuels ponts disulfures entre deux cystéines. Pendant ce temps, une solution aqueuse de sulfure de sodium (Na_2S) 50 mM ainsi qu'une solution aqueuse de Fer(II) 50 mM

(sel de Mohr $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$) sont préparées. La reconstitution s'effectue ensuite en ajoutant à la solution protéique 5 excès molaire de S^{2-} en une fois, puis, progressivement, 5 excès molaires de Fe(II). La solution brunit instantanément, et la réaction est laissée se poursuivre pendant la nuit à 4°C.

Le lendemain, après centrifugation 1 min à 10 000 rpm pour éliminer un éventuel dépôt, l'excès de Fe(II) et de soufre est enlevé en réalisant une colonne de filtration sur gel NAP-25 préalablement équilibrée avec du tampon Tris 200 mM, KCl 50 mM, pH 8. Un spectre UV-visible est alors enregistré entre 250 nm et 800 nm. La protéine colorée (marron foncé) est concentrée sur microcon 30K (Amicon), puis aliquotée avant d'être congelée à -80°C.

Dans le cas où l'échantillon doit être analysé par spectroscopie Mössbauer, la solution de fer utilisée est une solution de sel de Mohr [$^{57}\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$], ou une solution de chlorure de fer [$^{57}\text{FeCl}_3$] préalablement réduite avec un excès de DTT. Après reconstitution et passage sur NAP-25 (GE Healthcare), la solution est concentrée jusqu'à un volume final de 400 μL , et à une concentration minimale de 250 μM .

❖ Méthode 2 : Reconstitution « enzymatique »

Cette deuxième méthode consiste à utiliser des quantités catalytiques de cystéine désulfurase et un excès de L-cystéine comme donneur de soufre. Le fer est apporté chimiquement comme indiqué précédemment.

Dans un volume total de 1 mL, la solution de SPL (137 μM) est mise à incuber avec 5 mM de DTT pendant 5 minutes. Sont ensuite ajoutés 10 μM d'IscS ou de CsdA (deux des cystéines désulfurases de *E. coli*), 3 mM de L-cystéine, puis en plusieurs fois, 5 équivalents de Fe(II) sous la forme d'une solution de sel de Mohr à 50 mM. La réaction est suivie par UV-visible, jusqu'à ce que l'absorption à 420 nm n'augmente plus. La solution est alors passée sur NAP-25 puis concentrée comme pour la méthode 1.

Quelles que soient les conditions de réaction utilisées (méthodes 1 ou 2), les quantités de protéines, de fer et de soufre sont déterminées par les méthodes décrites ci-après.

III.3. Analyses biochimiques

III.3.1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide de la solution commerciale "Biorad Protein Assay" (Biorad). Cette technique est fondée sur le

changement de coloration à 595 nm du bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant aux protéines. La concentration d'un échantillon est donc déterminée par simple lecture de l'absorbance à 595 nm dont la valeur est comparée avec celles obtenues à partir d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (BSA) de concentration connue et constituant la droite d'étalonnage.

III.3.2. Dosage du fer dans les protéines

Le dosage du fer est effectué selon une méthode colorimétrique dérivée de la méthode de Fish (Fish, 1988) fondée sur la formation d'un complexe tris[bathophénanthroline]-Fe(II) en milieu réducteur tamponné (ascorbate de sodium + acétate d'ammonium, pH 8).

Une gamme d'étalonnage est tout d'abord réalisée afin de pouvoir déterminer ensuite la quantité de fer présente dans un échantillon protéique.

❖ Gamme étalon

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de Fe(II) commerciale à 18 mM dans 1% HCl (Aldrich), dont la concentration est ajustée à 500 μM par dilution dans l'eau. Ainsi, 1 μL de cette solution contient 0,5 nmol de fer. Des éppendorfs contenant différentes quantités de fer sont préparés comme décrit dans le Tableau 5, en ajustant le volume à 65 μL avec de l'eau.

nmoles de Fe^{2+}	solution de Fe^{2+} à 500 μM (μL)	eau (μL)
0	0	65
2	4	61
4	8	57
6	12	53
8	16	49
10	20	45

Tableau 5 : gamme étalon pour le dosage du fer dans les protéines.

Chaque étalon est alors traité de la façon suivante :

- 45 μL de PCA sont ajoutés et la solution est mélangée énergiquement.
- Les tubes sont laissés 15 minutes à température ambiante. A 90 μL de chacun des échantillons sont ajoutés :
- 72 μL de disulfate de bathophénanthroline à 1,7 mg/ml. Il s'agit d'un chélateur de fer.

- 36 μl d'ascorbate de sodium à 38 mg/ml. Ce produit est un réducteur qui permet de réduire le fer ferrique présent en solution sous forme de Fe(II).

- 27 μl d'acétate d'ammonium saturé (dilué 3 fois), qui joue le rôle de tampon pour favoriser la formation du complexe rose. La solution est agitée vigoureusement. Une couleur rose apparaît immédiatement, mais la réaction est laissée se poursuivre pendant 30 minutes à température ambiante.

La mesure de la différence d'absorbance entre 535 nm et 680 nm est effectuée pour chaque échantillon. La courbe d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 535-680 nm en fonction du nombre de nanomoles de fer.

❖ Echantillons protéiques

Des échantillons de concentration connue en protéine se situant dans la gamme étalon sont préparés dans un volume final de 65 μl . 45 μl de PCA sont ajoutés, ce qui provoque la dénaturation des protéines. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 5 minutes, afin d'éliminer les protéines précipitées. 90 μl du surnageant sont récupérés puis traités de la même façon que les étalons. La lecture de l'absorbance à 535-680 nm permet de déterminer la quantité de fer présente dans la protéine.

III.3.3. Dosage du soufre dans les protéines

Le soufre a été dosé selon la méthode colorimétrique décrite par Beinert (Beinert, 1983).

❖ Gamme étalon

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de sulfure de sodium (Na_2S) dont la concentration est ajustée à 200 μM . Des échantillons contenant des quantités déterminées de sulfure (0-10 nmoles) sont préparés comme décrit dans le Tableau 6, en ajustant le volume à 100 μL avec de l'eau.

nmoles de S^{2-}	solution de Na_2S à 200 μM (μL)	eau (μL)
0	0	100
1	5	95
2	10	90
5	25	75
10	50	50

Tableau 6 : gamme étalon pour le dosage de soufre dans les protéines.

Chaque tube est alors traité de la façon suivante :

- 300 μL d'acétate de zinc [$\text{Zn}(\text{OAc})_2$, H_2O] à 1% (solution à 100 mg/mL diluée au $1/10^6$) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 15 μL de soude (NaOH) 3 M. La solution est mélangée vigoureusement. Cette procédure permet d'éviter la perte de soufre sous forme de H_2S qui se produit lors de l'acidification du milieu par ajout de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. Le mélange est laissé à température ambiante entre 5 et 10 minutes.

- Ensuite, 75 μL de DiMéthyl Phénylène Diamine (DMPD) 0,01% (solution à 1 mg/mL dans HCl 5M) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 16 μL d'une solution de chlorure de fer (FeCl_3) à 23 mM (37,5 mg dans 10 mL HCl 1,2 M). De même que précédemment la solution est mélangée énergiquement. Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 30 minutes. Une coloration bleue apparaît, correspondant à la formation du bleu de méthylène, obtenu par réaction des ions sulfures S^{2-} avec le DMPD en milieu oxydant.

- Chaque tube est alors centrifugé (10 000 rpm, 5 minutes) et l'absorbance à 670 nm mesurée. La gamme d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 670 nm en fonction du nombre de nanomoles de soufre.

❖ Echantillons protéiques

De la même façon, 100 μL d'une solution protéique de concentration connue sont traités comme les échantillons étalons. Dans ce cas, l'incubation de l'échantillon avec le DMPD et le chlorure de fer est réalisée à froid (4°C) pendant 3 heures. Le reste du dosage est identique. La mesure de l'absorbance à 670 nm permet de déterminer la quantité de soufre initialement présente dans la protéine.

III.3.4. Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse est une méthode d'analyse fondée sur la migration différentielle de particules chargées dans un champ électrique. L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes : 5 à 20 μg de protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C dans du tampon de dénaturation (Tris- HCl 1M, pH 6,8, SDS 10 %, glycérol 15 %, BBP 2 %, β -mercaptoéthanol 2 %). La charge propre de chaque protéine devient ainsi négligeable. Les protéines migrent donc selon leur poids moléculaire et non leur charge.

Les échantillons protéiques dénaturés sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. La concentration en polyacrylamide dépend de la masse des protéines d'intérêt : plus elles sont petites, plus le gel devra être concentré. Le gel de

polyacrylamide est constitué d'un gel de séparation surmonté d'un gel de concentration. Ce dernier permet une migration homogène des protéines qui vont se tasser au sommet du gel de séparation, afin de garantir la pénétration simultanée de toutes les protéines de l'échantillon dans ce gel. Les protéines vont ensuite migrer lors du passage d'un courant électrique de 200 V et 35 mA pendant environ 60 minutes. Le gel joue un rôle de tamis moléculaire, séparant les protéines selon leur masse. La masse apparente des protéines est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines de poids moléculaire connu. Les bandes correspondant aux protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %, glycérol 10 %) puis décoloration dans une solution méthanol 30 %, acide acétique 10 %, glycérol 5 %.

III.4. Libération du Photoproduit des spores de l'ADN par voie enzymatique

III.4.1. Digestion enzymatique complète pour analyse HPLC-MS/MS

Tout au long de ce travail, les échantillons d'oligonucléotides, solubilisés dans l'eau, sont digérés de façon enzymatique selon un protocole commun. Pour cela, 0,025 unité de phosphodiesterase II, 2,5 unités de DNase II, 0,5 unité de nucléase P1 et 2,5 µL de tampon (acide succinique 200 mM, CaCl₂ 100 mM, pH 6) sont ajoutés à la solution d'oligonucléotide ou d'ADN. Après une incubation de 2 h à 37°C, 0,015 unité de phosphodiesterase I, 2 unités de phosphatase alcaline et 6 µl de tampon (Tris 500 mM, acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) 1mM, pH 8) sont ajoutés au mélange. Après 2 h d'incubation supplémentaires à 37°C, 3,5 µL d'HCl (0,1 N) sont ajoutés pour neutraliser la solution.

III.4.2. Digestion ménagée d'oligonucléotides par les exonucléases

Pour 200 pmol d'oligonucléotides, sont ajoutés 20 µl de tampon citrate d'ammonium 100 mM à pH 7, et 0,01 unité de phosphodiesterase I ou de phosphodiesterase II. A différents temps d'incubation à 37 °C (compris entre 2 min et 240 min) sont prélevés 1 µL du milieu réactionnel, puis 9 µL d'H₂O sont ajoutés. 1 µL de ce mélange est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Fonctions des enzymes utilisées (voir Schéma 26) :

- DNase II : Endonucléase libérant des oligonucléotides 3'-phosphate.
- Phosphodiesterase II (Ph II) : C'est une 3'-exonucléase, c'est à dire que cette enzyme digère l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' et libère des nucléotides 3'-phosphate (cette enzyme est inactive sur les extrémités phosphorylées côtés 5').
- Nucléase P1 : C'est une endonucléase et une exonucléase libérant des nucléotides/oligonucléotides 5'-phosphate ; c'est également une 3'-phosphatase.
- Phosphodiesterase I (Ph I) : 5'-exonucléase, c'est à dire que cette enzyme digère l'ADN de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' et libère des nucléotides 5'-phosphate (cette enzyme est inactive sur les extrémités phosphorylées côtés 3').
- Phosphatase alcaline : 3'- et 5'-phosphatase.

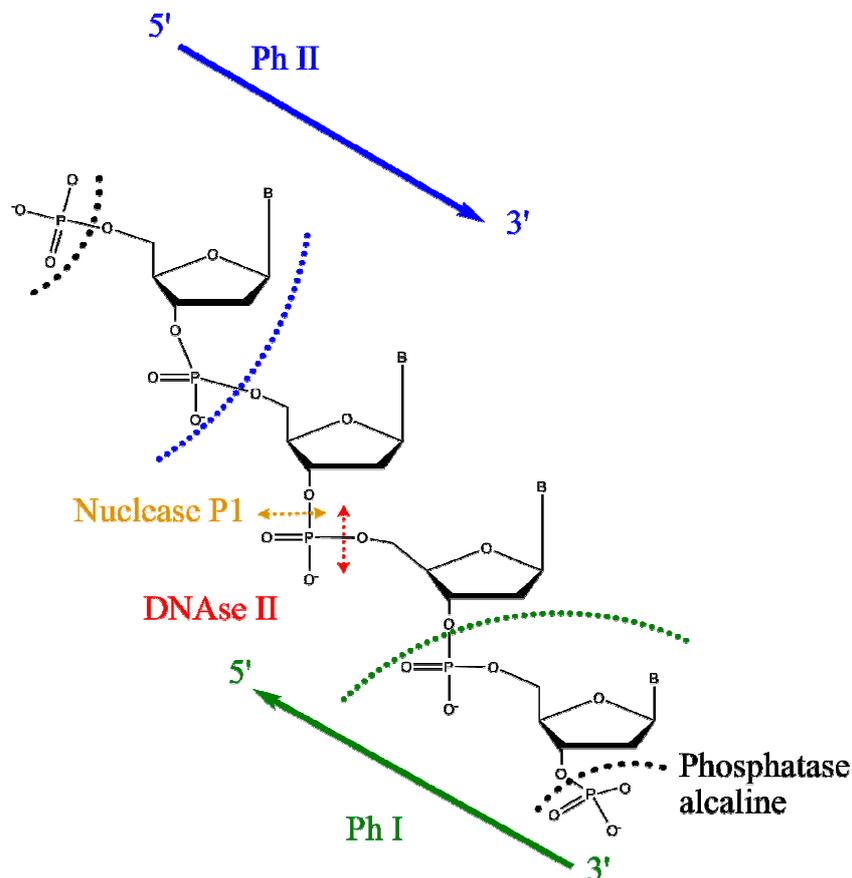


Schéma 26 : Schématisation des fonctions des enzymes utilisées dans cette étude.

III.5. Tests enzymatiques

III.5.1. Conditions du test enzymatique

Tous les tests d'activité (réductolyse de la SAM ou réparation du SPTpT) sont effectués en conditions d'anaérobiose avec des solutions désoxygénées ou préparées dans la boîte à gants avec de l'eau ou du tampon désoxygéné.

Les concentrations utilisées dans les tests enzymatiques classiques sont résumées dans le Tableau 7.

	Substrat	SPL	DTT	dithionite	SAM	Tampon 10x	H ₂ O
Concentrations	10 µM	1 µM	2,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1x	qsp 10 ou 20 µL

Tableau 7 : Concentrations finales dans les tubes eppendorfs de chaque réactif.

Typiquement, dans un tube eppendorf, l'enzyme (1 µM) est mise en présence d'eau et du tampon de réaction 10x de sorte que la composition finale soit Tris-HCl 100 mM, KCl 200 mM, pH 8. Le DTT est ajouté, suivi du dithionite puis de la SAM. La réaction est déclenchée par l'ajout du substrat contenant le SP (ADN génomique de thymus de veau irradié⁹, SPTpT, oligonucléotide simple brin, oligonucléotide double brin).

A différents temps d'incubation à 37°C, une fraction aliquote est prélevée dans un tube eppendorf (10 µL pour le test de réparation, 20 µL pour le test d'activité de réductolyse de la SAM), sortie de la boîte à gants et immédiatement congelée dans l'azote liquide. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par HPLC et/ou HPLC-MS/MS.

Lorsque le substrat utilisé est l'ADN de thymus de veau, le volume final est de 50 µL et contient 0,5 µg/µL d'ADN (25 µg), 10 µM de SPL, 1 mM de SAM, 2 mM de DTT et 2 mM de dithionite dans le tampon Tris HCl 100 mM, KCl 200 mM, pH 8.

Dans le cas de la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme, la concentration en substrat varie de 0,1 µM à 30 µM.

III.5.2. Mesure de l'activité de réductolyse de la S-Adénosylméthionine

La 5'-désoxyadénosine (AdoH), un des produits de la réductolyse de la SAM (l'autre étant la méthionine), peut être détectée dans le milieu réactionnel du test d'activité *in vitro* de la SPL grâce à une analyse HPLC. Les fractions aliquotes (20 µL) conservées à -20 °C sont

⁹ Le SP contenu dans l'ADN génomique de thymus de veau (Sigma) a été préparé par exposition aux UV-C de films secs d'ADN pendant 1 heure, puis solubilisation dans l'eau. La concentration en ADN a été déterminée par UV-visible en prenant un coefficient d'absorption molaire à 260 nm de 6 200 M⁻¹.cm⁻¹.

décongelées, et 3 μL d'une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés, ceci afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 12 min à 10 000 rpm (9 600 x g). 20 μL sont prélevés et placés dans les flacons en verre pour injecteur HPLC. Le volume est ajusté à 60 μL avec de l'eau distillée. 50 μL de chaque fiole sont injectés sur une colonne HPLC Zorbax SB-C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm (Agilent) équilibrée avec une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 0,1 % (solvant A). L'appareil utilisé est une HPLC Agilent 1100 équipée d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes. La chromatographie est réalisée à un débit de 1 mL/min par un gradient linéaire de 0 à 30 % de solvant B (acétonitrile/eau 1:1 TFA 0,1 %) en 20 minutes. AdoH est élué vers 14 minutes. Une gamme étalon, réalisée à partir de solutions d'AdoH de concentrations connues ayant subi le même traitement que les échantillons, permet alors d'établir une corrélation entre l'aire du pic HPLC (détecté à 260 nm) d'AdoH et sa concentration. Cette gamme est refaite et réinjectée à chaque série d'analyses, le temps de rétention et l'intensité du pic pouvant varier légèrement.

III.5.3. Mesure de l'activité de réparation du SPTpT en TpT

Cette activité a été mesurée par analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Les échantillons décongelés sont centrifugés 5 min à 10 000 rpm. 5 μL sont prélevés, placés dans les fioles HPLC et dilués à 50 μL avec du tampon d'analyse acétate de triéthylammonium (TEAA) 2 mM, pH 6,3. Dans le cas de l'ADN de thymus de veau, le mélange réactionnel est d'abord hydrolysé enzymatiquement afin de libérer les lésions sous la forme de dinucléosides monophosphates. Les échantillons (20 μL sur les 50 μL) sont injectés sur la colonne Uptisphere ODB 3 μm , 150 x 2 mm C18 (Interchim) connectée à une HPLC Agilent 1100. Les différents produits du mélange réactionnel sont séparés grâce à un gradient d'acétonitrile (de 0% à 2% en 8 min, puis de 2 à 10% en 12 min) dans le TEAA 2 mM à un débit de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ suivi d'un débit isocratique à 10% pendant 6 min. A la sortie de la colonne, l'éluât est mélangé à du méthanol (à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$), et ce mélange est directement introduit dans la source electrospray du spectromètre de masse triple quadripole API 3000. Celui ci est utilisé en mode MRM. La quantification de SPTpT et TpT se fait par injection de solutions standards de concentrations connues.

III.5.4. Identification des adduits inconnus A et B

Les produits A et B, générés lors de la réaction avec la SPL mutée SPLBsC141A, sont séparés du milieu réactionnel par HPLC sur une colonne Modulocart Uptisphere C18, 5 μ , 250 x 4,6 (Interchim) par un gradient de 0 à 10 % d'acétonitrile en 20 minutes dans du TEAA 5 mM suivi d'un isocratique à 10 % d'acétonitrile, puis identifiés par analyse HPLC-MS/MS. Des spectres MS2 de ces produits A et B sont réalisés par ionisation par electrospray en modes positif et négatif. Dans le cas du mode positif, le tampon d'HPLC utilisé est le formiate d'ammonium 2 mM.

III.5.5. Echange H/D sur la SPL

III.5.5.a. Préparation des tampons deutéré

– Tampon commun Tris-HCl 100 mM, KCl 50 mM, pH 8 :

Pour 10 mL : 36 mg de KCl sont dissous dans 500 μ L de Tris-HCl 2 M pH 8 puis 9,5 mL de D₂O 100 % sont ajoutés.

– Tampon SPL 10x (Tris-HCl 1 M, KCl 2M, pH 8) :

Pour 2 mL : 30 mg de KCl sont dissous dans 1 mL de Tris-HCl 2 M pH 8 puis 1 mL de D₂O 100 % est ajouté.

III.5.5.b. Echange H/D de la SPL

L'échange est effectué sur une colonne de filtration sur gel MicroBioSpin 6 (gel de polyacrylamide Bio-Gel P-6 – Biorad). Les colonnes sont équilibrées en faisant passer quatre fois successivement du tampon commun deutéré (selon les instructions données par le fabricant, l'échange de tampon est alors estimé à 99,9 %) avant de charger la protéine et de l'éluer, toujours avec le tampon commun deutéré. La protéine échangée est alors diluée dans le tampon commun deutéré à la concentration nécessaire pour le test d'activité.

Le test d'activité est réalisé à 37°C comme indiqué dans le Tableau 7 et au paragraphe III.5.1 en remplaçant H₂O par D₂O.

Pour l'analyse, 5 μ L des échantillons sont dilués à 50 μ L avec du TEAA 2mM, puis lyophilisés et dissous dans 50 μ L de TEAA 2 mM deux fois de suite. L'analyse se fait par HPLC-MS en mode SIM (Selected Ion Monitoring) et il est donc nécessaire d'injecter deux fois 20 μ L : une première injection permet de suivre SPTpT et TpT (même rapport m/z) et une deuxième le produit A.

III.5.6. Test enzymatique avec la [5'-(²H₂)]SAM

La SAM deutérée en position 5' a été synthétisée et fournie par le Pr. Perry Frey (Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA). Cette molécule a été utilisée dans un test enzymatique classique dans des tampons non deutérés.

L'analyse des échantillons se fait après dilution des 5 µL dans le TEAA 2 mM (volume final 50 µL) par injection HPLC-MS/MS sur l'API3000 en mode MRM négatif.

IV. Méthodes Chimiques

IV.1. Produits chimiques

La nucléase P1 (*Penicillium citrium*) et la phosphodiesterase II sont des produits Sigma (St Quentin-Fallavier, France). La phosphatase alcaline est commercialisée par Roche (Neuilly sur Seine, France), et la phosphodiesterase I (*Crotalus adamantus Venom*) par Amersham (Piscataway, NJ). Les produits liés à la synthèse oligonucléotidique selon la méthode au phosphoramidite (solvants, supports solides de type CPG – controlled pore glass, réactifs, ...) et les synthons phosphoramidites sont d'origine commerciale (GlenResearch, Etats-Unis et Proligo, Allemagne). Les solvants utilisés pour l'HPLC sont de pureté analytique. L'eau désionisée est préparée par un système de purification Millipore Milli-Q (Molsheim, France).

IV.2. Synthèses

IV.2.1. Principe de la synthèse d'oligonucléotides par la méthode aux phosphoramidites

Un fragment d'ADN est constitué de nucléosides liés entre eux par une liaison phosphodiester établie entre la fonction alcool primaire (5'-OH) du premier nucléoside et la fonction alcool secondaire (3'-OH) du second. La synthèse biologique de l'ADN s'effectue de l'extrémité 5'-OH vers l'extrémité 3'-OH. Cependant, du fait de la plus grande réactivité de la fonction alcool primaire, la synthèse chimique d'ADN s'effectue habituellement dans le sens inverse, c'est-à-dire que l'on forme une liaison phosphodiester entre le phosphate en position 3' du premier nucléoside et la fonction alcool primaire 5'-OH du second. Afin d'obtenir des condensations spécifiques, il faut mettre en œuvre des groupements protecteurs sur :

- les fonctions amines des bases (benzoyle, isobutyryle) ;
- les fonctions hydroxyles du 2'-désoxyribose (diméthoxytrityle, lévulinyle) ;

- la fonction acide du phosphate (Cyanoéthyle, méthyle).

Ces groupements doivent pouvoir être déprotégés de manière sélective, quantitative et séquentielle, tout en respectant l'intégrité des autres composés nucléotidiques. Le procédé chimique actuellement le plus utilisé a été développé par Marvin Caruthers et est connu sous le nom de méthode aux phosphoramidites (Caruthers *et al.*, 1980).

La synthèse d'oligonucléotides s'effectue par addition successive de plusieurs nucléotides selon un processus cyclique.

Les premiers procédés, laborieux et coûteux, ont été remplacés au début des années 1980 par des méthodes de synthèse en phase solide, beaucoup plus rapides, et qui permettaient l'automatisation de la synthèse d'oligonucléotides. La synthèse d'oligonucléotides normaux par la méthode aux phosphoramidites s'effectue en routine sur support solide. Dans cette technique, l'atome de phosphore des synthons n'est pas à l'état d'oxydation +V mais à l'état +III, ce qui augmente sa réactivité. Cette méthode est simple de manipulation et rapide. De plus, le cycle de synthèse est répété pour chaque nucléotide incorporé ; ceci permet l'automatisation de la méthode. On peut ainsi préparer des quantités d'oligonucléotides de l'échelle de la micromole, voire de la millimole. L'inconvénient majeur est son coût en réactifs, puisque ces derniers doivent être utilisés en large excès du fait de la réactivité plus faible en phase hétérogène qu'en phase homogène.

Le premier nucléoside est fixé par sa fonction 3'-OH sur un support solide. Différents types de supports ont été proposés : le polystyrène (Ito *et al.*, 1982), le polyacrylamide (Miyoshi *et al.*, 1980), un composite de polydiméthylacrylamide (Gait *et al.*, 1980), la cellulose (Crea *et al.*, 1980), la silice (Caruthers *et al.*, 1980, Chow *et al.*, 1981, Matteucci *et al.*, 1981), ou encore des polymères colloïdaux (Devivar *et al.*, 1999). Les billes de verre fonctionnalisées sont le support le plus couramment utilisé. En effet, ces dernières présentent l'avantage d'être inertes vis-à-vis des solvants utilisés. Il s'agit de billes de verre de tailles de pores bien déterminées (CPG, 500 à 2000 Å) et fonctionnalisées par de longues chaînes alkyle aminées, greffées sur le support par l'intermédiaire d'un bras de jonction, généralement une chaîne de type succinyle (Caruthers *et al.*, 1987). D'autres bras de jonction, de type polyéthylène glycol, par exemple, ont été utilisés (Gunzenhauser *et al.*, 1999). Il a également été récemment proposé des supports solides (billes de verre CPG) dits « universels », permettant d'incorporer n'importe quelle base à l'extrémité 3' (Azhayev, 1999, Guzaev *et al.*, 2003, Kumar *et al.*, 2003, Pon *et al.*, 2001).

Le cycle de condensation utilisé pour la synthèse d'oligonucléotides par la voie au phosphoramidite sur phase solide est présenté dans le Schéma 27.

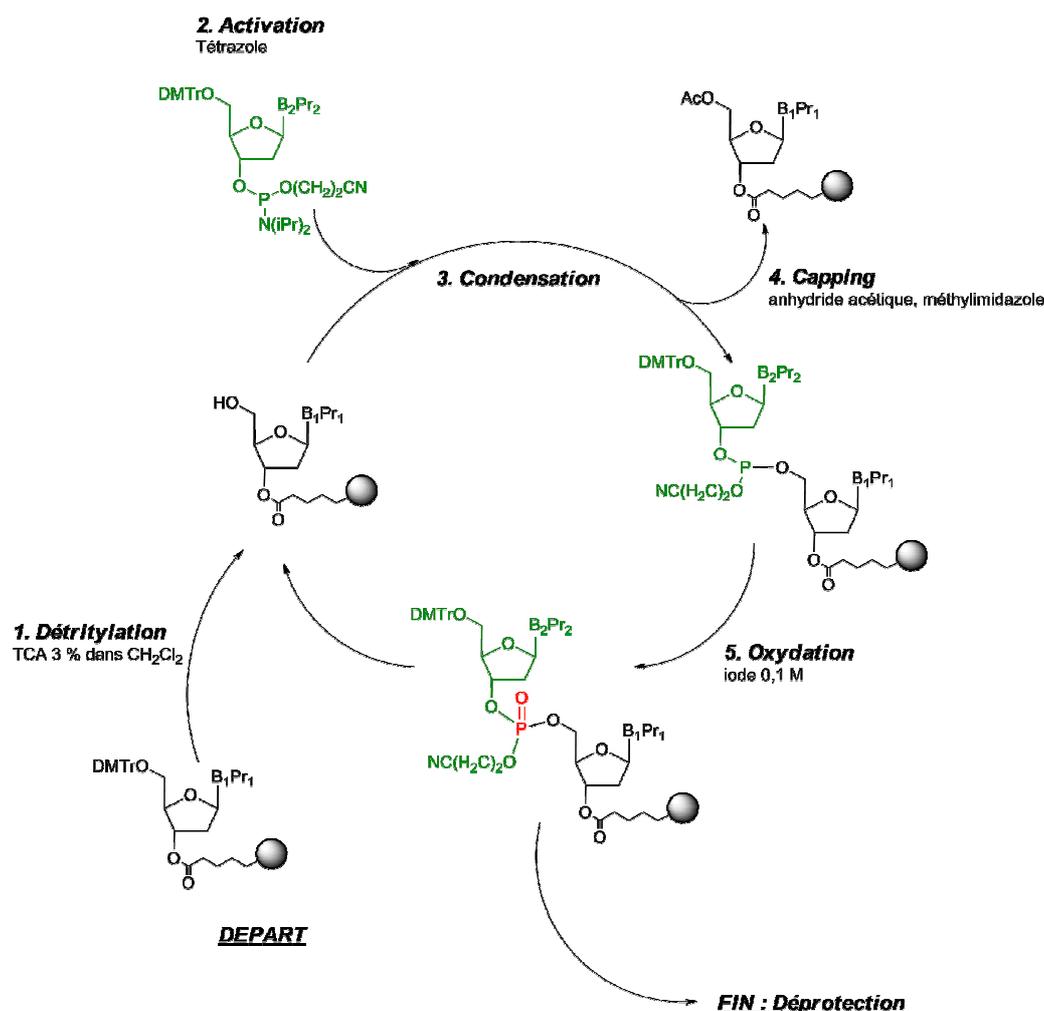


Schéma 27 : Cycle de synthèse d'oligonucléotides sur support solide faisant appel à la méthode au phosphoramidite.

La fonction 5'-OH du premier nucléoside (fixé sur le support solide) est tout d'abord déprotégée par un traitement acide, qui implique généralement l'utilisation de l'acide trichloracétique (TCA) à 3 % dans le dichlorométhane (étape 1). Cette fonction peut alors réagir avec le phosphoramidite du nucléoside suivant, préalablement activé par le tétrazole (étape 2, en vert). C'est l'étape de condensation (étape 3). Suit ensuite l'étape dite de « capping » (étape 4). Elle consiste à bloquer la fonction 5'-OH des premiers nucléosides n'ayant pas réagi avec le second, afin que celles-ci ne soient pas le site de réactions parasites, facilitant ainsi la purification des oligonucléotides à la fin de la synthèse. On acétyle les fonctions alcool par de l'anhydride acétique en présence de méthylimidazole. Au cours de la dernière étape du cycle, l'oxydation du phosphore trivalent en phosphore pentavalent est obtenue par une solution d'iode 0,1 M (étape 5). Un nouveau cycle de condensation peut alors commencer et ce, autant de fois qu'il y a de nucléotides à incorporer. Selon le type de purification adopté, on conservera ou non le groupement diméthoxytrityle terminal. En effet,

son caractère hydrophobe peut faciliter la purification de l'oligonucléotide. En fin de synthèse, un traitement basique permet la déprotection des bases et du phosphore internucléotidique, ainsi que la rupture du bras de jonction avec le support. Il s'agit généralement d'un traitement ammoniacal à chaud.

IV.2.2. Synthèse du Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate SPTpT

IV.2.2.a. Synthèse et purification du dinucléoside monophosphate thymidylyl-(3'-5')-thymidine (TpT)

La synthèse est effectuée selon la méthode au phosphoramidite présentée ci-dessus, pour un seul couplage, en phase liquide.

Sous atmosphère inerte et sous agitation sont introduits 1 g de 5'-O-diméthoxytrityl-3'-(2-méthoxy)-N,N-diisopropylthymidine (1,42 mmol, 1 éq), 579 mg de 3'-O-lévilinylthymidine (1,7 mmol, 1,2 éq) et 16 mL de tétrazole en solution à 0,5 mol.L⁻¹ dans l'acétonitrile (8 mmol). 10 mL d'acétonitrile anhydre sont ajoutés, et la solution est agitée à température ambiante durant 15 min. Après évaporation partielle de l'acétonitrile, 20 mL de diiode en solution dans un mélange THF/Pyridine/H₂O (80 :18 :2) sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant 1h15 et la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) avec comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol 95 :5. La révélation se fait par UV puis par vaporisation d'un mélange acide sulfurique/cystéine puis chauffage. Lorsque la réaction est complète, 10 mL d'une solution de thiosulfate de sodium 1M sont ajoutés, ainsi que du dichlorométhane. Cette phase est alors lavée deux fois avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase organique extraite est séchée avec du sulfate de sodium anhydre, puis le solvant est évaporé.

Le brut de couplage obtenu est dissous dans 100 mL d'acide acétique 80% en solution aqueuse. La solution est mise sous agitation à température ambiante pendant 2h, puis l'acide acétique est évaporé. La réaction de détritylation est également suivie par CCM.

Le brut détritylé est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane/méthanol 95 : 5, puis par HPLC (Agilent 1100) avec une colonne Nucleodur C18 5 μ 250 x 4,6 mm (Macherey-Nagel) et un gradient de 5 % à 25 % d'acétonitrile dans de l'acétate de triéthylammonium (TEAA) 10 mM.

La déprotection des alcools encore protégés par les groupements lévulinyle et méthyle est effectuée sur la nuit dans l'ammoniaque à 50°C et le TpT est de nouveau purifié par HPLC, avec la même méthode.

IV.2.2.b. Synthèse et purification du Photoproduit des spores SPTpT sous la forme d'un dinucléoside monophosphate

– *Irradiation UV du TpT :*

Le SPTpT a été préparé par irradiation du TpT en présence d'acide dipicolinique (DPA) sous la forme de film sec. Pour cela, une solution de dipicolinate de sodium à une concentration de 10 mM a été préparée par dissolution du sel dans l'eau puis neutralisation de l'acide avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 M.

Typiquement, le TpT en solution dans l'eau est dilué par la solution de DPA, de façon à avoir des concentrations finales respectives de 1 et 10 mM pour TpT et DPA dans un volume final de 350 mL. Cette solution est répartie dans 6 boîtes de pétri en verre de diamètre 15 cm. Les échantillons sont congelés et lyophilisés. Les films secs ainsi obtenus sont exposés aux UV-C (254 nm) pendant une heure, puis chaque film resolubilisé dans 30 mL d'eau, et à nouveau lyophilisé. Après 6 cycles, les films sont solubilisés dans un volume total de 10 mL d'eau, puis le SPTpT purifié par HPLC.

– *Purification par HPLC :*

La purification s'effectue par HPLC en trois fois. La première étape s'effectue sur une colonne Inertsil ODS2 5 μ 250 x 10 mm (Interchim) à un débit de 3 mL/min par un gradient de 0 à 20 % en 30 min d'acétonitrile dans du TEAA 10 mM (ajusté à pH 6,5), suivi d'un plateau à 20 % pendant 5 minutes. La détection s'effectue par un détecteur UV-visible à 260 nm. Les différentes fractions sont analysées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Celles contenant le SPTpT sont rassemblées, l'acétonitrile évaporé, et le résidu obtenu est purifié une seconde fois avec la même méthode chromatographique. De même, une troisième purification est effectuée, avec une colonne Inertsil ODS2 5 μ 250 x 4 mm, permettant d'obtenir le SPTpT à une pureté supérieure à 95 %.

– Analyse :

La pureté du SPTpT a été déterminée par HPLC-MS/MS. La caractérisation complète par RMN du SPTpT (^1H - ^{13}C - ^{31}P à 1 et 2 dimensions) a été effectuée dans D_2O et dans le DMSO deutéré.

IV.2.3. Synthèse d'un oligonucléotide de 11 bases contenant le Photoproduit des spores

IV.2.3.a. Synthèse de l'oligonucléotide GCGAATTCACG et du brin complémentaire CGTGAATTCGC

– Synthèse des oligonucléotides non modifiés sur support solide

Les différents synthons phosphoramidites ont été mis en solution dans l'acétonitrile anhydre à une concentration de 0,1 M.

Le cycle de condensation utilisé est celui préconisé par le fabricant de l'appareil (Applied Biosystems) pour des synthèses à l'échelle de la μmole . Les rendements de couplage ont été évalués par la mesure conductimétrique du cation DMTr^+ libéré. L'oligonucléotide GCGAATTCACG est appelé 11mer et son complémentaire 11mer_{compl}. Les synthèses sont effectuées sur le robot synthétiseur par Didier Gasparutto (CEA/Grenoble LAN).

– Déprotection et purification des oligonucléotides

Les supports solides portant les chaînes oligonucléotidiques sont transférés dans des tubes eppendorf à bouchon vissé ; on ajoute 1 mL d'ammoniaque (32%). Au bout de 16 h à 50°C , chaque brut de déprotection est transféré dans un nouveau tube eppendorf puis partiellement évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speed-vac. Chaque brut de synthèse est quantifié par spectrométrie UV et analysé par HPLC analytique. Ensuite, les oligonucléotides sont purifiés par HPLC semi-préparative sur colonne C18 Hypersil 250 x 10 mm, taille de particule $5\ \mu$ (Interscience) avec un gradient d'acétonitrile dans le TEAA 10 mM. Les fractions collectées contenant les oligonucléotides sont quantifiées par spectrométrie UV. L'homogénéité et la pureté de ces fractions sont contrôlées par HPLC analytique, et par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

IV.2.3.b. Synthèse, purification et caractérisation d'un oligonucléotide 11mer contenant le SP

– *Synthèse du 11merSP*

L'oligonucléotide 11mer (0,1 mM final dans un volume de 1,5 à 2 mL selon les quantités d'oligonucléotide à irradier) est mis en présence d'une solution de DPA 1 mM (10 équivalents). La solution est transférée dans une petite boîte de pétri de 4 cm de diamètre, congelée et lyophilisée. Le film sec obtenu est exposé 1 heure au rayonnement UV-C (254 nm), resolubilisé dans 1,5 mL d'eau, et ce, pour plusieurs cycles lyophilisation, irradiation, resolubilisation. Après chaque irradiation, 5 µL de solution sont prélevés et analysés par HPLC analytique et HPLC-MS/MS après une étape de digestion enzymatique afin d'identifier les produits de réaction et d'en suivre l'évolution.

Lorsque la quantité de produits formés n'évolue plus, le film sec est solubilisé dans 1 mL d'eau et le DPA est éliminé par filtration sur gel d'exclusion de taille sur une colonne NAP-10 (GE Healthcare) avant purification.

– *Purification*

Les bruts d'irradiation dessalés sont purifiés sur une colonne Hypersil C18 250 x 10 mm 5 µ (Interscience) à un débit de 2,5 mL/min par un gradient d'acétonitrile dans le TEAA 10 mM de 4 à 12 % en 55 minutes. Les fractions contenant le 11merSP sont rassemblées (une analyse HPLC-MS/MS est réalisée pour connaître la pureté de la solution), l'acétonitrile est évaporé au speed-vac puis la solution contenant le 11merSP est lyophilisée.

IV.2.3.c. Hybridation avec le brin complémentaire

Le brin 11merSP est hybridé avec le brin complémentaire purifié (comme décrit au paragraphe IV.2.3.a). Dans un volume final de 50 µL sont mélangés 2,5 nmol de 11merSP, et deux équivalents, soit 5 nmol, de 11mer complémentaire dans du tampon Tris 10 mM, KCl 100 mM, pH 7,5. Le mélange est porté à 70°C puis est laissé refroidir à température ambiante lentement. Dans ces conditions, on considère que la totalité des brins s'hybrident. La solution d'oligonucléotide double brin est utilisée directement pour le test enzymatique présenté dans la partie III.

IV.2.4. Préparation de l'adduit TpTSO₂H par photolyse du dinucléoside monophosphate modifié par un groupe thiophényle

Les composés 5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridylyl-(3'-5')-thymidine (TSΦpT) et thymidylyl-(3'-5')-5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridine (TpTSΦ) étaient disponibles au laboratoire suite à leur synthèse par S. Bellon (Romieu *et al.*, 2000). Ce sont des précurseurs du radical centré sur le méthyle de la thymine par photolyse de la liaison C-S.

A 1 mL d'une solution aqueuse désoxygénée de précurseur à une concentration de 1 OD²⁶⁰/mL (1 unité d'absorbance mesurée à 260 nm, soit environ 40 μM) sont ajoutés ou non 2 mM de dithionite. Les solutions sont transférées dans des cuves en quartz bouchées avec un septum en caoutchouc, sorties de la boîte à gants et irradiées 5 et 10 minutes à 254 nm par un irradiateur Rayonet composé de neuf lampes UV-C. Les solutions sont ensuite injectées en HPLC pour s'assurer de la dégradation du précurseur (colonne Nucleodur 100 Å C18 (Macherey-Nagel), gradient de 0 à 30 % d'acétonitrile dans du TEAA 10 mM en 28 minutes) puis analysées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse, afin d'identifier les produits de la réaction (colonne Uptisphere ODB 3 μm, 150 x 2 mm C18 (Interchim) connectée à l'HPLC Agilent 1100).

V. Techniques physico-chimiques – Méthodes analytiques

V.1. Spectrophotométrie UV-visible

❖ Principe :

Les atomes et les molécules existent dans un nombre défini de niveaux d'énergie et un changement de niveau d'énergie d'un état électronique fondamental S₀ à un état électronique excité S₁ (passage d'un électron d'une orbitale à une autre) nécessite l'absorption ou l'émission d'un quantum d'énergie ou photon. L'énergie (E) d'un photon émis ou absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donné par la relation $E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon.

Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (λ_{\max}) et par son intensité, donnée par le coefficient d'absorption molaire ϵ_{λ} (M⁻¹ cm⁻¹). Ces deux grandeurs sont reliées à la concentration de la solution par la loi de Beer-Lambert : $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times l \times c$, où l est la longueur du trajet optique (cm) et c la concentration (M).

❖ Applications aux métalloprotéines :

Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques (certains acides aminés, flavines, ...) et celles qui contiennent un métal de transition. Ainsi, le pic d'absorption à 280 nm observé pour les solutions protéiques correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique (tryptophane, tyrosine et phénylalanine).

Pour les complexes de métaux de transition dans les protéines, il existe plusieurs types de bande d'absorption :

- les bandes de transition entre orbitales d : pour les complexes de métaux de transition, il est possible d'observer des bandes de transition de faible intensité d-d ;
- les bandes de transfert de charge : elles sont en général assez intenses et représentent le passage d'un électron d'un atome à un autre au cours de l'excitation. On distingue essentiellement deux catégories de bandes de transfert de charge : (i) les bandes de transfert de charge ligand→métal (un électron σ ou π du ligand est transféré au métal), de faible énergie (λ élevée) et (ii) les bandes de transfert de charge métal→ligand (transfert d'un électron métallique à une orbitale localisée sur le ligand : oxydation du métal et réduction du ligand), de forte énergie (faible λ).

Dans le cas des protéines [Fe-S], le transfert de charge du soufre vers le fer(III) provoque une absorption entre 300 et 600 nm. Cette valeur varie en fonction du type de centre fer-soufre et même si ces bandes d'absorption sont relativement larges, la position de leur maximum ainsi que la forme générale du spectre fournissent des renseignements sur la nature du centre [Fe-S].

En règle générale, la spectroscopie d'absorption UV-visible permet, en biologie, de caractériser un cofacteur protéique (identification et quantification) et de suivre une réaction enzymatique impliquant ce cofacteur.

❖ Mise en œuvre :

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm ou 1 mm de trajet optique. Les spectres en aérobiose ont été réalisés avec un spectrophotomètre Hewlett Packard 8453 à barrette de diodes ou un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). Les spectres en anaérobiose stricte (boîte à gants) ont été réalisés avec un spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur de la boîte à gants.

V.2. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

❖ Principe :

La spectroscopie RPE permet d'étudier les espèces dites paramagnétiques qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés. Dans les systèmes biologiques, ces espèces sont principalement des radicaux libres et des ions de certains métaux de transition (par exemple le fer, le cuivre, le nickel). L'entité paramagnétique est placée dans un champ magnétique B_0 variable. Sous l'action de ce champ et selon l'effet Zeeman, les niveaux d'énergie d'un spin S se séparent en $(2S+1)$ états, chacun affecté d'un nombre quantique m_s de valeur $-S, -S+1, \dots, S-1, S$. Ainsi, pour le cas d'un ion magnétique ne présentant qu'un seul électron célibataire (donc pour lequel $S = 1/2$), la présence du champ magnétique extérieur donne lieu à $(2S + 1) = 2$ états, correspondant à $m_s = -1/2$ et $m_s = +1/2$ (Schéma 28).

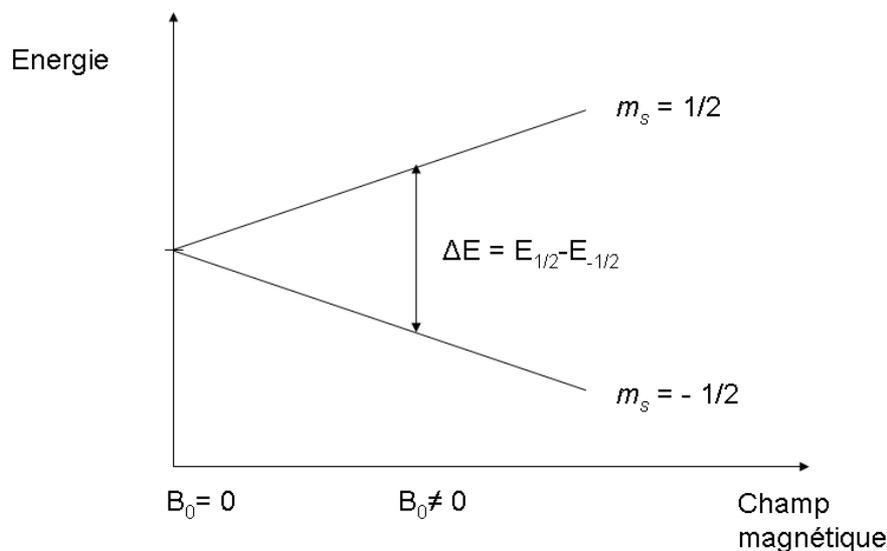


Schéma 28 : Principe de la RPE selon l'effet Zeeman – séparation des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique externe.

L'énergie magnétique associée à chacun de ces états est donnée par $m_s g \beta B_0$, où g est le facteur de Landé (lorsqu'il s'agit d'un électron libre – $g_e = 2,0023$ – mais qui est désigné, dans le cas général, par *le facteur g*), et β le magnéton de Bohr. Puis, sous l'action d'un second champ magnétique oscillant (champ hyperfréquence ou micro-onde) perpendiculaire au premier et d'amplitude beaucoup plus faible, ayant une fréquence ν , un photon d'énergie $h\nu$ peut être absorbé si la séparation énergétique entre les 2 niveaux concernés, c'est-à-dire $g\beta B_0$,

se trouve égale à $h\nu$. C'est à cette valeur particulière de B_0 que le phénomène de résonance se produit. Ainsi, la condition de résonance est donnée dans l'Equation 1 :

$$h\nu = \Delta E = E_f - E_i = g\beta B_0$$

Equation 1 : Conditions de résonance paramagnétique électronique.

L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire possède un facteur g dont la valeur diffère de celle de g_e en fonction du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire (g est l'équivalent RPE du déplacement chimique δ en RMN). Les spectres sont effectués à basse température, de façon à éviter le problème de relaxation. Les échantillons étant congelés, on parle de systèmes solides désordonnés et on obtient un « spectre de poudre ». Dans ce cas, le facteur g est anisotrope, ce qui signifie qu'il est assimilable à une grandeur tensorielle définie par trois composantes g_x , g_y et g_z . Ces trois composantes correspondent aux points d'inflexions et à l'extremum du spectre d'absorption enregistré au cours du balayage des valeurs du champ magnétique.

En fait, le spectre obtenu expérimentalement par le spectromètre est la dérivée du signal d'absorption. Ce spectre permet de plus la détermination des valeurs de g de façon plus précise.

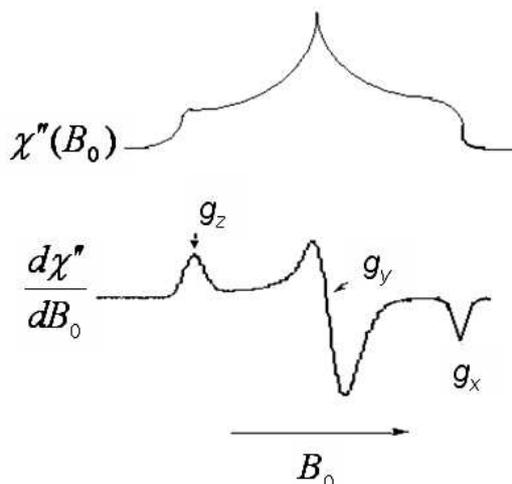


Figure 19 : Signal d'absorption χ'' et sa dérivée $d\chi''/dB_0$ obtenus en faisant varier le champ B_0 . La dérivée du signal d'absorption permet de déterminer les grandeurs tensorielles g_x , g_y et g_z qui sont caractéristiques du centre paramagnétique étudié.

❖ Applications aux métalloprotéines :

Appliquée à l'étude des centres [Fe-S] paramagnétiques (les centres diamagnétiques ne sont pas observables), la RPE nous informe sur le type de centre, son état redox et le nombre

de centres [Fe-S] au sein de la protéine puisque le signal peut être doublement intégré et la valeur de l'intégration comparée à celle d'une solution standard de Cu-EDTA de concentration connue, dont la préparation est décrite ci-dessous.

❖ Mise en œuvre :

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons de 200 μL de protéine à une concentration d'environ 150 μM , préparés et congelés dans la boîte à gants. Les spectres RPE ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP 300E à température variable équipé d'un cryostat (Oxford Instruments) qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide. Les quantifications du signal des centres [Fe-S] ont été réalisées par comparaison avec les valeurs obtenues pour une solution standard de Cu-EDTA à 1 mM.

Préparation du tube standard Cu-EDTA :

Une solution de Cu^{2+} à 10 mM est d'abord préparée par dissolution de sulfate de Cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$), dans du tampon Tris 0,1 M pH 8. Cette solution est ensuite diluée au dix fois, dans le même tampon, et 10 équivalents d'EDTA sont ajoutés. La solution finale, congelée dans un tube RPE contient donc 1 mM de Cu(II) complexé par l'EDTA dans du tampon Tris 0,1 M pH 8.

V.3. Spectroscopie Hyscore

❖ Principe et application au système [Fe-S]-SAM

La spectroscopie HYSORE (pour HYperfine Sublevel CORRElation spectroscopy) est une technique de RPE pulsée à deux dimensions, déjà utilisée pour étudier d'autres protéines de la famille des « Radical-SAM » comme l'activase de la RNR (Gambarelli *et al.*, 2005). Il est donc nécessaire d'avoir un signal RPE pour effectuer une spectroscopie Hyscore.

En effet, l'Hyscore est une méthode de choix pour détecter les couplages hyperfins de certains noyaux avec les moments gyromagnétiques faibles dans les systèmes non orientés. En effet, les interactions hyperfines sont le résultat de couplage entre le spin électronique et le spin nucléaire s'il est non nul. Les différentes transitions hyperfines autorisées ($\Delta m_s = \pm 1, \Delta m_l = 0$) sont représentées en rouge sur le Schéma 29.

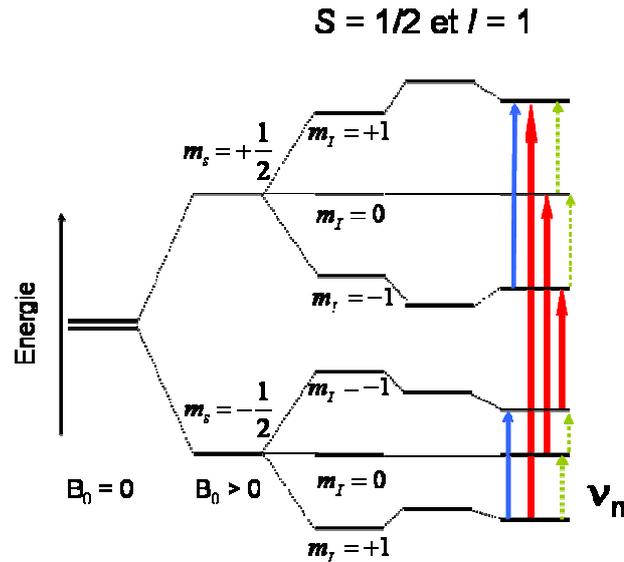


Schéma 29 : Niveaux d'énergie correspondant au couplage hyperfin entre un spin électronique $S = 1/2$ et un spin nucléaire $I = 1$.

Dans ce cas, l'Hamiltonien de structure hyperfine s'écrit comme indiqué dans l'Équation 2.

$$H = g\beta_e \vec{B}_0 \cdot \vec{S} + a\vec{I} \cdot \vec{S}$$

Équation 2 : Ecriture de l'Hamiltonien lorsque des couplages hyperfins sont possibles. a représente la constante de couplage hyperfin I le spin nucléaire et S le spin électronique.

La principale caractéristique de la technique Hyscore est de pouvoir voir d'autres transitions normalement interdites (représentées en vert sur le Schéma 29 et d'énergies ν_n) et discriminer différents types de noyaux : les couplages forts ($|a|/2 > \nu_n$) et faibles ($|a|/2 < \nu_n$), et les noyaux « distants », caractérisés par des constantes hyperfines très faibles.

Le spectre Hyscore est composé de deux quadrants. Sur la diagonale du quadrant nommé (+,+), on trouve ces noyaux « distants », tandis qu'hors des diagonales des quadrants (-,+ et +,+), on trouve respectivement les couplages forts et faibles. De plus, dans le cas d'un couplage fort avec un noyau de spin nucléaire $I=1$ comme l'azote ^{14}N , il est possible d'observer un massif caractéristique dans le quadrant (-,+), avec des paramètres de corrélations appelés « double quanta-double quanta » (dqdq) qui correspondent à un saut de deux niveaux d'énergies (en bleu sur le Schéma 29). Un exemple de spectre Hyscore est représenté Schéma 30.

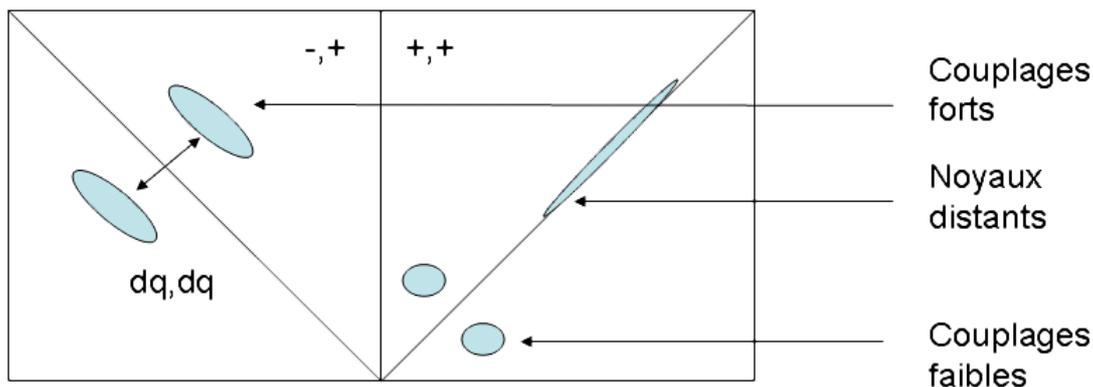


Schéma 30 : Exemple de spectre Hyscore.

Il est possible d'avoir une estimation de la constante de couplage hyperfin a et de la constante de couplage quadripolaire K , à partir de la position en fréquence des pics de corrélation en utilisant l'Équation 3 (η étant le paramètre d'asymétrie).

$$V_{dqdq\pm} = 2[(\nu_N \pm a_N / 2)^2 + K^2(3 + \eta^2)]^{1/2}$$

Équation 3 : Equation permettant le calcul de a_N . K est la constante de couplage quadripolaire, et η est le paramètre d'asymétrie.

Par conséquent, un atome d'azote coordonné à un centre [Fe-S] est facilement détectable à la faveur d'un couplage fort de son spin nucléaire ($I = 1$) avec l'électron non apparié.

Après calcul de la constante de couplage hyperfin a_N et comparaison avec la littérature, il est possible de déterminer la nature du noyau ayant le couplage avec le centre métallique.

❖ Mise en œuvre

Les expériences d'Hyscore ont été effectuées en collaboration avec le Service de Chimie Inorganique et Biologique du CEA Grenoble par Serge Gambarelli sur un spectromètre en bande X pulse elxsys E-580 de Bruker, avec un résonateur diélectrique Bruker ER4118X et un cryostat à flux continu d'Hélium (Oxford Instrument CF935) contrôlé par un contrôleur de température ITC 503 de chez Oxford Instruments. Les expériences ont été faites à 10 K à $g = 1,93$.

V.4. Spectroscopie Mössbauer

❖ Principe

Cette technique d'analyse a été effectuée en collaboration par Yiannis Sanakis (NCSR Demokritos, Institute of Materials Science, Ag. Paraskevi, Attiki, Grèce).

La spectroscopie Mössbauer ou spectroscopie d'absorption γ est l'étude de l'absorption nucléaire résonante de rayons γ par certains noyaux. Ce phénomène se produit lorsqu'un

photon γ , émis par un noyau émetteur lors de la désexcitation de ce noyau (qui passe donc d'un niveau excité E_e à l'état fondamental E_f) est absorbé par un noyau identique se trouvant dans l'état fondamental. Le noyau absorbant est alors excité au niveau d'énergie E_e (Schéma 31).

Dans notre cas, la source de rayonnement γ est obtenue par désintégration radioactive de l'isotope $^{57}\text{Co}^*$. Celui-ci se convertit lentement par capture électronique en un état excité noté $^{57}\text{Fe}^*$. Dans un délai de l'ordre de la microseconde, le $^{57}\text{Fe}^*$ revient à l'état fondamental par l'émission d'une radiation électromagnétique de haute fréquence dans la région des énergies γ .

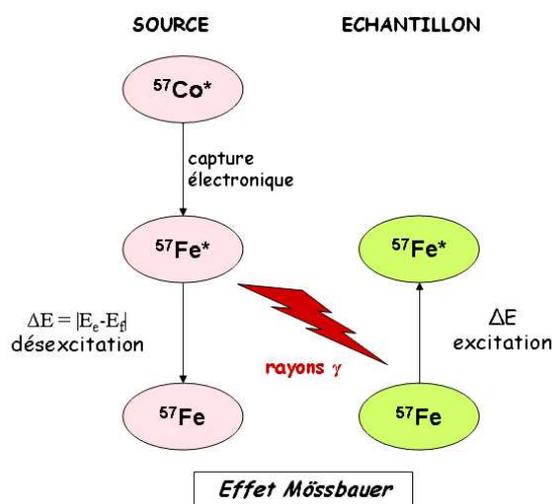


Schéma 31 : Principe de l'effet Mössbauer

Si les noyaux de l'échantillon se trouvent dans un environnement différent de celui de la source, la modification de l'environnement électronique des noyaux produit un effet suffisant sur les niveaux d'énergie nucléaires pour que l'absorption n'ait plus lieu. Pour rétablir la résonance, la fréquence des rayons γ doit être modifiée. Cette variation est obtenue en déplaçant la source à une vitesse relative v par rapport à l'absorbant. Ceci conduit à un balayage approprié du spectre de fréquences γ susceptibles d'être captées par l'échantillon absorbant. C'est le principe de l'effet Doppler. En spectroscopie Mössbauer, les énergies sont donc exprimées en unités de vitesse et les vitesses requises sont généralement de l'ordre du mm/s. Ainsi, les spectres Mössbauer indiquent la transmission relative des rayons γ ayant traversé l'échantillon en fonction de la vitesse relative de la source par rapport à l'absorbant.

En spectroscopie Mössbauer, l'absorption des rayons γ est caractérisée par essentiellement deux paramètres (δ , ΔE_q). Ceux-ci correspondent à différentes interactions

hyperfines qui sont dues aux perturbations créées par l'environnement du noyau absorbéur (Schéma 32).

- *L'interaction monopolaire électrique : paramètre de déplacement isomérique δ*

Le noyau absorbéur se trouvant dans un environnement différent de celui de la source, le pic d'absorption est décalé par rapport à la raie d'émission d'une quantité δ (exprimé en mm/s) appelée déplacement isomérique. δ provient de l'existence d'interactions entre la distribution de charge nucléaire supposée sphérique et la densité de charge électronique contenue dans le volume nucléaire. δ reflète donc la structure électronique et fournit par conséquent des informations sur l'état d'oxydation, le degré de covalence et la nature des ligands de l'atome absorbant (ici le ^{57}Fe).

- *L'interaction quadripolaire électrique : paramètre d'éclatement quadripolaire ΔE_q*

Cette interaction est due à l'asymétrie de la distribution de charges qui entoure le noyau, créant un gradient de champ électrique. Le noyau dans un état de spin $I > 1/2$ possède un moment quadripolaire électrique Q . L'interaction de ce dernier avec le gradient de champ électrique (appelée interaction quadripolaire électrique) provoque une levée de dégénérescence de l'état excité, conduisant à deux niveaux séparés de ΔE_q , défini comme l'éclatement quadripolaire exprimé en mm/s. Ce paramètre reflète la symétrie de la distribution électronique autour du noyau considéré.

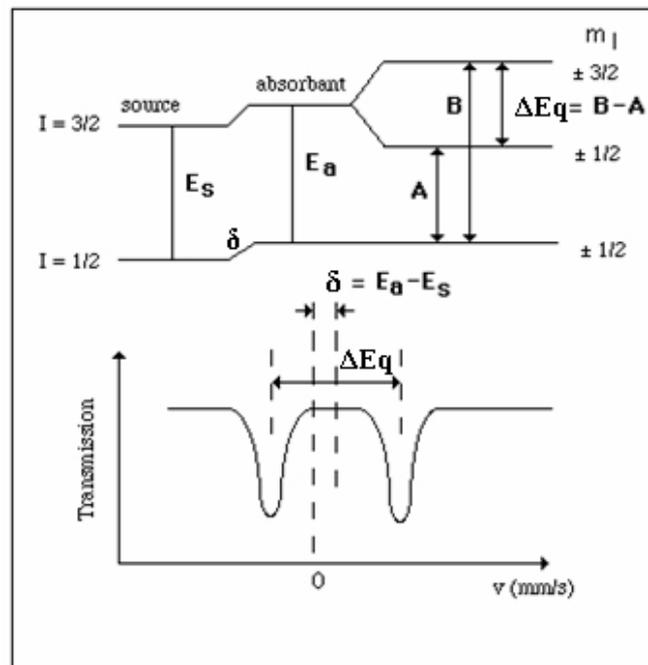


Schéma 32 : Déplacement isomérique δ et éclatement quadripolaire ΔE_q des composés du ^{57}Fe ; schématisation des spectres Mössbauer résultants

❖ Mise en œuvre

L'échantillon protéique est préparé en boîte à gants, après reconstitution avec du ^{57}Fe comme indiqué au paragraphe III.2. La solution protéique doit être assez concentrée (250 μM minimum en protéine) dans un volume de 400 μL . Elle est alors congelée en boîte à gants, dans une cellule adaptée. L'analyse est effectuée par Yiannis Sanakis (NCSR Demokritos, Institute of Materials Science, Ag. Paraskevi, Attiki, Grèce)

V.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

V.5.1. Principe

La technique de Résonance Magnétique Nucléaire est un outil précieux permettant de déterminer, entre autres, la structure de molécules. Elle exploite les propriétés magnétiques des noyaux et est fondée sur l'absorption d'une onde électromagnétique dans la gamme des radiofréquences (de 10 MHz à 1 GHz).

Tous les atomes, sauf ceux dont le nombre de masse et le numéro atomique sont simultanément pairs (comme le $^{12}_6\text{C}$ ou le $^{16}_8\text{O}$) possèdent un nombre quantique de spin nucléaire non nul I , entier ou demi-entier, plus simplement appelé le spin nucléaire. L'existence d'un spin nucléaire non nul est un prérequis pour toute expérience RMN. Le noyau étant regardé comme une sphère en rotation autour d'un axe, le vecteur **moment angulaire de spin nucléaire** associé à ce mouvement est noté \mathbf{L}^{10} . Le noyau est également une particule chargée, un vecteur **moment magnétique nucléaire** $\boldsymbol{\mu}$ est donc associé au moment angulaire de spin avec $\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{L}$. Le rapport gyromagnétique γ est un nombre scalaire caractéristique du noyau considéré.

Lorsqu'un noyau de spin $I = 1/2$ est placé dans un champ magnétique B_0 , le vecteur \mathbf{L} ne peut adopter que 2 valeurs du nombre quantique magnétique de spin m_I : $-1/2$ et $+1/2$, c'est-à-dire deux niveaux d'énergie (avec $E_{m_I} = -\gamma \hbar B_0 m_I$).

L'application d'un champ radiofréquence \mathbf{B}_1 (perpendiculaire à B_0) transportant des quantas d'énergie $h\nu$, permet d'induire ces transitions entre les états d'énergie quantifiés. La règle de sélection étant $\Delta m_I = \pm 1$, la condition de résonance s'exprime alors de cette façon :

$$h\nu = \Delta E = h \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Équation 4 : Condition de résonance pour la spectroscopie RMN

¹⁰ La notation en gras indique qu'il s'agit d'un vecteur et non d'un nombre scalaire.

Le champ radiofréquence ($2B_1 \cos(\omega t)$) possède une composante qui tourne dans le même sens que μ et peut donc, à la résonance lorsque $\omega = \omega_0$, exercer un couple sur les moments magnétiques μ ce qui entraîne leur basculement dans le plan XY caractérisé par la composante M_{XY} (Schéma 33). A l'équilibre, la résultante des moments magnétiques μ est appelée l'aimantation, notée M^0 et est alignée le long de B_0 (selon l'axe Z).

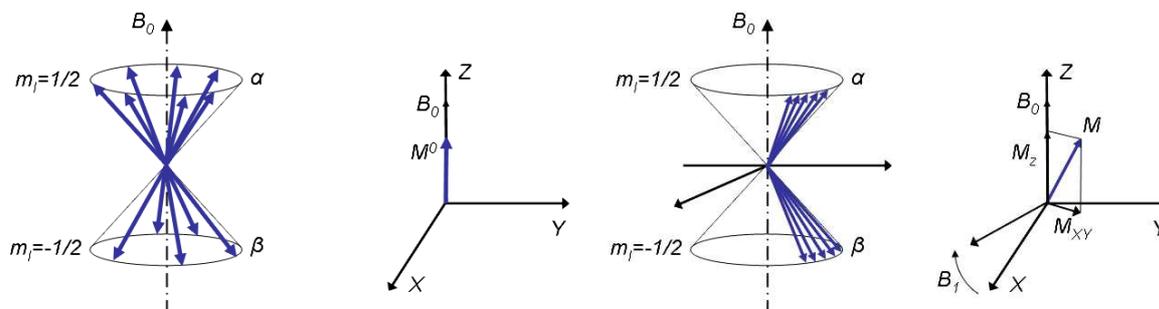


Schéma 33 : Ensemble de N spins nucléaires identiques ($1/2$). M^0 représente la résultante des moments magnétiques μ . **Influence du champ B_1 .** M s'écarte de Z et possède deux composantes : M_Z et M_{XY}

Le retour à l'équilibre (répartition des différents moments magnétiques selon la loi de Boltzmann) s'effectue grâce aux processus de relaxation. Il existe deux phénomènes :

- Retour de la composante M_Z à M^0 (relaxation longitudinale T1 ou spin-réseau) ;
- Retour de la composante M_{XY} à 0 (relaxation transversale T2 ou spin-spin).

Le champ B_0 est fixe, et le champ radiofréquence variable agit pendant un temps très court t_p (RMN impulsionnelle à 1 dimension). Lors de la relaxation, c'est l'aimantation transversale qui est détectée en fonction du temps et qui donne le signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay). Le signal RMN est alors obtenu par transformée de Fourier.

V.5.2. Grandeurs caractéristiques de la RMN

Les noyaux sont entourés d'un nuage électronique et, dans la majorité des cas, liés à d'autres atomes. Les interactions déterminantes de la RMN sont :

- interaction entre noyau et environnement électronique. Le paramètre associé est la constante d'écran σ (sans dimension) ;
- couplage spin-spin, relayé par les électrons de liaison. Le paramètre associé est la constante de couplage scalaire J (Hz) ;
- interaction directe entre noyaux proches dans l'espace. Le paramètre associé est la constante de couplage dipolaire D (Hz). Cette interaction est responsable de l'effet nucléaire Overhauser noté « NOE » ;

- interaction entre un noyau et un gradient de champ électrique (uniquement dans le cas des noyaux de spin supérieur à 1/2). Le paramètre associé est la constante de couplage quadripolaire notée QCC (MHz).

Le déplacement chimique

L'effet d'écran (σ) du nuage électronique diminue l'effet du champ B_0 ressenti par le noyau. La fréquence de résonance devient :

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma)$$

Équation 5 : Modification de la condition de résonance par l'effet d'écran σ du nuage électronique.

Ainsi, pour chaque type de noyau étudié, il y aura autant de fréquences ν donc de signaux que d'environnements différents. En référence au terme d'écran, on dit que le noyau est blindé quand σ augmente et donc lorsque ν diminue, et qu'il est déblindé dans le cas inverse. Pour un atome inclus dans une molécule, la présence des autres noyaux perturbe la rotation du nuage électronique et donc le déplacement chimique.

Les fréquences sont mesurées par rapport à un produit de référence :

$$\nu = \nu_i - \nu_{ref} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (\sigma_{ref} - \sigma)$$

Équation 6 : Expression des fréquences par rapport à un produit de référence.

Pratiquement, on utilise un paramètre sans dimension appelé déplacement chimique δ , qui permet de s'affranchir du spectromètre et donc du champ magnétique B_0 utilisé.

$$\delta = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \approx (\sigma_{ref} - \sigma)$$

Équation 7 : Expression du déplacement chimique δ .

Pour éviter de reporter systématiquement un facteur 10^{-6} , δ est exprimé en ppm.

V.5.3. RMN à deux dimensions

L'un des problèmes rencontrés en RMN 1D résulte de la superposition éventuelle de signaux, d'où une perte d'information. La RMN 2D permet de répartir les signaux sur une surface. Il existe en fait trois dimensions. Les deux dimensions selon lesquelles sont mesurées des fréquences définissent le plan de la carte 2D. La troisième selon laquelle apparaissent les volumes correspondant à l'intensité des signaux. La carte 2D est obtenue en sélectionnant

dans cette troisième dimension un niveau de coupe tel que la section de chaque pic d'intérêt soit observée.

Pour une expérience de RMN 2D on doit enregistrer une série de spectres en utilisant une séquence Préparation – Évolution (t_1) – Mélange (T_m) – Détection (t_2). La préparation, qui comporte un délai de relaxation D_1 et des impulsions plus ou moins complexe(s), réalise un transfert d'aimantation dans le plan XY. Cette aimantation évolue pendant le temps t_1 (régulièrement incrémenté d'un spectre à l'autre) mais n'est pas détectée. La période de mélange, qui peut comporter une ou plusieurs impulsions ainsi que des délais, permet un transfert de cohérence ou d'aimantation d'un noyau à un autre. Finalement, la détection de l'aimantation transversale est faite pendant le temps t_2 . Une double transformation de Fourier donne accès aux deux dimensions fréquences.

Différents spectres 2D peuvent être obtenus :

❖ *En système homonucléaire :*

On observe des signaux hors de la diagonale s'il existe une interaction entre deux noyaux via le couplage scalaire (COSY pour homonuclear CORrelation SpectroscopY) ou le couplage dipolaire (NOESY Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY ou ROESY Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY).

❖ *En système hétéronucléaire :*

Les déplacements chimiques du ^{13}C sont placés en ordonnée et ceux du ^1H en abscisse.

En HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) : on observe un signal s'il existe un couplage scalaire entre un atome d'H et un atome de C en ^1J . En HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), on observe une tache s'il existe un couplage scalaire « longue distance » en ^nJ entre H et C.

Les séquences TOCSY (TOtal CORrelation SpectroscopY) permettent d'observer une corrélation d'un noyau à tous les protons de la chaîne successivement couplés deux à deux.

V.5.4. Mise en œuvre

L'analyse structurale du SPTpT a été effectuée en collaboration par l'équipe de Michel Bardet au Laboratoire de Résonances Magnétiques du CEA/Grenoble.

Les spectres 1D et 2D ont été enregistré sur un spectromètre Bruker Avance 500 à une température variable (entre 278 et 298 K) avec une sonde indirecte de 5 mm. Les déplacements chimiques ^1H and ^{13}C ont été mesurés par référence au D_2O ou au DMSO.

Le spectre 1D du ^{13}C dans D_2O a été enregistré sur un spectromètre Varian Unity 400 MHz. Les expériences de RMN à deux dimensions ^1H - ^1H COSY, TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{31}P HMBC, NOESY, weft-ROESY ont été effectuées via des séquences d'impulsions standards Bruker. Les temps de mélange pour les expériences NOESY et ROESY sont compris entre 50 ms et 1 s. Le SPTpT (150 μg) a été premièrement lyophilisé et solubilisé dans D_2O 99,9%, – et ce deux fois de suite, de façon à échanger les protons échangeables de la molécule (NH et OH) – puis dans le diméthyl sulfoxyde deutéré ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) dans une deuxième série d'expériences.

V.6. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse

La Chromatographie Liquide Haute Performance est une technique de séparation analytique ou préparative de molécules présentes en mélange dans un échantillon. L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Ceci a pour conséquence l'emploi d'une pompe à haute pression afin de pousser la phase mobile dans la colonne avec un débit d'écoulement élevé. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants du mélange par rapport à une chromatographie liquide classique, et la fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation. La combinaison des ces attributs : rapidité et résolution élevées, conduit à l'appellation « haute performance ». La phase stationnaire contient dans notre cas de la silice greffée par des chaînes alkyles de 18 atomes de carbone (C18). Les composants du mélange y sont plus ou moins retenus en fonction de leur polarité. Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H_2O – ACN et MeOH sont ajoutés parce qu'ils sont moins polaires que l'eau et augmentent l'hydrophobicité de la phase mobile). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier, ce qui est caractéristique de la chromatographie en phase inverse.

Les échantillons sont déposés en tête de colonne sans que le débit ne soit diminué ou que la pression dans la colonne (plus de 100 bars) ne chute. On utilise pour cela une vanne d'injection qui possède 2 positions (Schéma 34). La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue, soit de façon automatique par un robot soit manuellement.

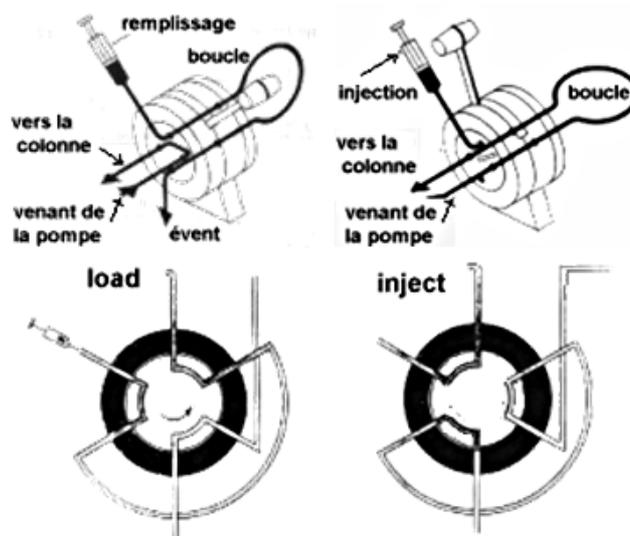


Schéma 34 : Système de vanne d'injection. Position load, à gauche, remplissage de la boucle de volume fixe. Position inject, à droite, le solvant venant de la pompe pousse l'échantillon dans la colonne

Un détecteur UV à barrette de diodes est utilisé en sortie de colonne de façon à enregistrer un chromatogramme HPLC représentant l'absorption UV-visible à une longueur d'onde choisie (260 nm en général pour les acides nucléiques) en fonction du temps de rétention.

Un intégrateur peut être utilisé en série pour calculer l'aire sous les pics. Couplée à l'injection d'échantillons de concentration connue, l'HPLC peut alors être quantitative.

V.7. Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Le détecteur UV peut être remplacé par un spectromètre de masse. Après séparation, la phase mobile contenant les composés à analyser est directement introduite dans le spectromètre de masse.

La HPLC-MS/MS apparaît être la technique de choix pour détecter les lésions de l'ADN de façon spécifique. De plus, la sensibilité de cette technique, de l'ordre de quelques lésions/ 10^8 nucléosides normaux dans quelques microgrammes d'ADN, est intéressante (Koc *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2006).

Il existe différents types de spectromètres de masse qui sont essentiellement caractérisés par leur source d'ionisation et leur analyseur. Dans le cas de ce travail, il s'agit d'un spectromètre de masse composé d'une source d'ionisation de type électrospray, et d'un

analyseur triple quadripolaire (Schéma 35). La source d'ionisation permet la transformation des composés séparés lors de l'HPLC en ions positifs ou négatifs selon le mode choisi. De plus, ce type de source permet d'éliminer le solvant avant l'entrée de l'analyseur du spectromètre de masse, ce qui est indispensable car ce dernier travaille sous vide. Pour cela, un spray est formé en sortie d'un capillaire par ajout d'azote, et l'échantillon est nébulisé sous forme de petites gouttelettes. Dans la chambre d'ionisation, grâce au champ électrique élevé (quelques kV) et à l'application d'azote chaud, les gouttelettes sont soumises au phénomène de désorption de champ ; le solvant s'évapore, le champ électrique augmente et les ions migrent en surface des gouttes jusqu'à ce qu'ils soient libérés par éclatement des gouttes. Les ions peuvent ensuite pénétrer dans le premier quadripôle de la partie « analyseur » du spectromètre. Un quadripôle est constitué de quatre cylindres entre lesquels un champ électrique oscillant et un champ électrique fixe se superposent. Selon les conditions de champs électriques appliqués, seuls certains ions, caractérisés par leur rapport masse/charge (m/z), peuvent traverser le quadripôle, selon une trajectoire sinusoïdale, les autres étant défocalisés et perdus dans le quadripôle. Les ions filtrés peuvent entrer dans le quadripôle suivant. En balayant sur une gamme de champs électriques dans le quadripôle, il est possible de tracer le spectre de masse de l'échantillon. Dans le cas d'un analyseur triple quadripolaire comme celui utilisé dans cette étude (Schéma 35), le premier quadripôle permet aussi de sélectionner spécifiquement un ion parent qui est ensuite fragmenté par collision avec un gaz inerte dans le second quadripôle, appelé cellule de collision. Le dernier quadripôle permet d'analyser les ions fils issus de la fragmentation.

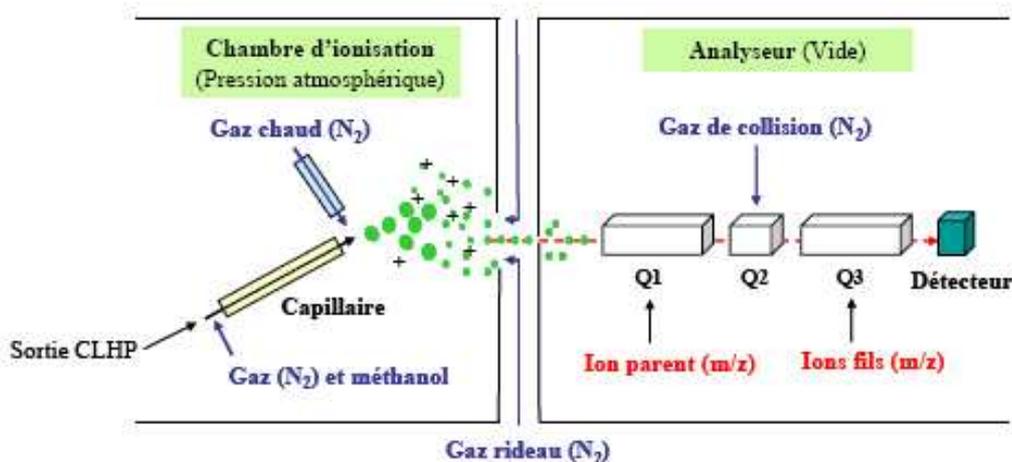


Schéma 35 : Représentation schématique d'une source électrospray (en mode positif) associée à un analyseur triple quadripôles.

Enfin, un détecteur d'ions et un système de conversion permettent de transformer les signaux de détection d'ions en des chromatogrammes ou des spectres de masse.

Notons que différents modes de fonctionnement de l'analyseur triple quadripôles peuvent être choisis, selon le type de filtration des ions appliqué à chaque quadripôle. Dans notre cas, le mode le plus couramment utilisé est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permettant de quantifier très spécifiquement les molécules selon des couples de rapport m/z , également appelés transitions, constitués du rapport m/z de l'ion parent et de l'un de ses ions fils. A des fins de caractérisation, des analyses MS1 (spectre de masse simple des composés) et MS2 (spectre de fragmentation) ont également été réalisées.

La quantification de chaque photoproduit est effectuée après calibration de la réponse en spectrométrie de masse lors de l'injection d'un échantillon contenant tous les photoproduits de thymine et cytosine en concentration connue.

V.8. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

V.8.1. Principe

Dans le cas de l'analyse par MALDI-TOF, l'oligonucléotide est cristallisé dans une matrice et il est désorbé par laser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation –Time Of Flight). Le détecteur est un analyseur temps de vol. Il s'agit d'un tube, libre de champs, qui achemine les ions jusqu'au détecteur. A l'entrée du tube, une même énergie cinétique ($E_c = 1/2 mv^2$) est donnée à tous les ions produits. Ainsi, le temps mis par un ion pour parcourir le tube de vol dépend de son rapport m/z . Si deux ions portent la même charge, l'ion le plus léger arrive au détecteur avant l'ion le plus lourd. L'analyse nécessite 5 à 10 fois moins de produit qu'une analyse par spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray. L'analyse MALDI-TOF permet généralement de détecter l'ion pseudo-moléculaire, ainsi que les ions « multichargés », mais en quantité beaucoup moindre que par ionisation electrospray. L'analyse par MALDI-TOF est donc la technique de choix pour l'analyse des grosses molécules (protéines, oligonucléotides), bien qu'elle apporte moins d'informations structurales que la spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray.

V.8.2. Mise en œuvre

Les analyses MALDI-TOF ont été effectuées par Christine Saint-Pierre (CEA Grenoble/INAC/SCIB/LAN), afin de vérifier la masse moléculaire des oligonucléotides 11mer synthétisés. Les spectres MALDI ont été enregistrés sur un spectromètre BIFLEX de Bruker. Le laser est un laser azote avec une longueur d'onde de 337 nm. La matrice utilisée

est l'acide 3-hydroxypicolinique (35-40 mg/mL dans du citrate d'ammonium à 10 mM). Les échantillons sont dessalés sur de la résine échangeuse de cation DOWEX -50W X 8-200 (Sigma). Ils sont ensuite déposés sur la cible du spectromètre en mélangeant 1 µl de solution de matrice et 1 µl de solution d'échantillon (co-cristallisation). Une analyse MALDI-TOF a également été utilisée de façon à vérifier la position du SP dans la séquence de l'oligonucléotide. Des spectres MALDI-TOF ont ainsi été enregistrés à différents temps au cours de la digestion ménagée de l'oligonucléotide par des exonucléases.

Résultats

Partie I

Expression, Purification et
Caractérisation de la
Spore Photoproduct Lyase

similarités de séquence avec la famille d'enzyme « ADN photolyases– (6-4) photolyases – protéines photoréceptrices », ainsi qu'une forte homologie au niveau des résidus 80 à 115 avec des protéines à centre [Fe-S], comme les sous-unités activatrices de la Ribonucléotide Réductase anaérobie et de la Pyruvate-Formiate Lyase (Fajardocavazos *et al.*, 1993). En effet, au niveau de ces résidus, trois cystéines (notées en rouge dans la Figure 20) absolument conservées forment un motif CxxxCxxC, retrouvé dans les protéines dont l'activité est dépendante d'un centre Fe-S et de S-Adénosylméthionine (SAM).

Comme indiqué dans l'introduction, les séquences des SPL possèdent une quatrième cystéine conservée. Celle-ci est indiquée en vert sur la Figure 20. Dans le cas des espèces du genre *Bacillus*, cette cystéine est positionnée après le motif CxxxCxxC (en position 141, en utilisant la numérotation de *B. subtilis*). En revanche, dans le cas des espèces *Clostridium*, cette cystéine est positionnée en amont du motif CxxxCxxC (en position 77, en utilisant la numérotation de *B. subtilis*). A titre d'exemple, c'est la cystéine 74 chez *C. acetobutylicum*.

Le premier clonage a été effectué sur le gène *splB* de *B. subtilis*, souche modèle des bactéries à Gram⁺ sporulantes, et la protéine exprimée chez *Escherichia coli*, car l'expression de protéines recombinantes dans cet organisme est généralement assez facile à réaliser, et avait déjà été effectuée par l'équipe de W.L. Nicholson. Ce travail a été effectué au laboratoire par Olivier Berteau, chercheur post-doctorant de 2003 à 2004. Le travail avec la SPL de *C. acetobutylicum* a débuté avec mon arrivée au laboratoire et a été initié en vue d'une étude structurale de la SPL par cristallographie aux rayons X.

Ce chapitre traite donc de l'obtention et de la caractérisation de 2 protéines SPL sauvages (issues de *B. subtilis* et de *C. acetobutylicum*), ainsi que de la protéine SPL de *B. subtilis* mutée au niveau de la 4^e cystéine conservée (notée en vert sur la Figure 20).

Chapitre 1 : Résultats

I. Obtention des protéines (sauvages et mutées) de *Bacillus subtilis* et *Clostridium acetobutylicum*

I.1. Expression et purification des protéines recombinantes en aérobiose

I.1.1. La protéine SPL sauvage de *B. subtilis*

Le plasmide pT7-SPLBs, construit par Olivier Berteau avant mon arrivée au laboratoire, a été utilisé pour transformer la souche *E. coli* Tuner (DE3). La culture, la lyse cellulaire et l'étape de purification par colonne d'affinité suivies de l'étape de filtration sur gel (HiPrep Desalting) ont été effectuées comme décrit dans Matériels et Méthodes III.1.1, en présence d'oxygène. La Figure 21–A montre le pic détecté à 280 nm correspondant à la protéine SPL sauvage de *B. subtilis*, lors de l'élution de la colonne d'affinité Ni-NTA. L'étape de filtration sur gel est utilisée pour enlever l'imidazole, molécule qui conduit à la précipitation de la protéine en quelques minutes. La SPL possède une coloration brune qu'elle conserve jusqu'à la fin de la purification. Le premier pic de la Figure 21–B correspond à la protéine SPL, le deuxième pic correspond à l'imidazole.

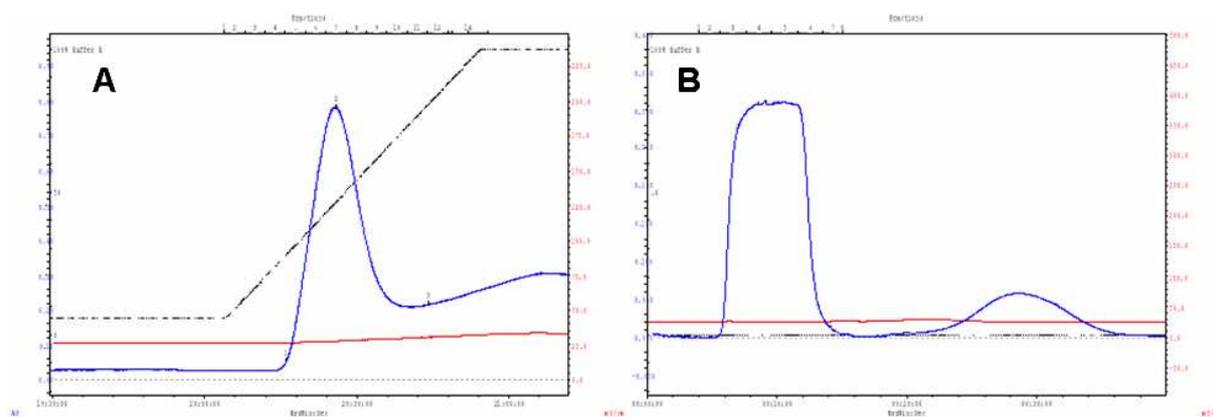


Figure 21 : Chromatogrammes FPLC obtenus lors de la purification de la SPL. A : Profil d'élution de la colonne d'affinité. En bleu, détection UV du pic de protéine élué vers 250 mM d'imidazole. En rouge, conductivité, en noir pointillé, gradient linéaire de 30 à 500 mM d'imidazole. **B :** Colonne de filtration sur gel indiquant l'élution de la SPL (1^{er} pic UV) séparé de l'imidazole (2^e pic UV).

Le gel d'électrophorèse montre l'état de pureté de la protéine pendant les étapes de purification (Figure 22). Il faut noter que, malgré les conditions utilisées pour minimiser la formation des corps d'inclusion, une grande partie de la protéine est produite sous forme

insoluble (Figure 22 – piste 3). Typiquement en fin de purification, 10 à 20 mg de SPL sont obtenus pour 10 L de culture, avec une pureté estimée à 86 % (Figure 22 – piste 7). C'est cette préparation qui a été testée (une fois reconstituée) pour les tests enzymatiques présentés Partie III.

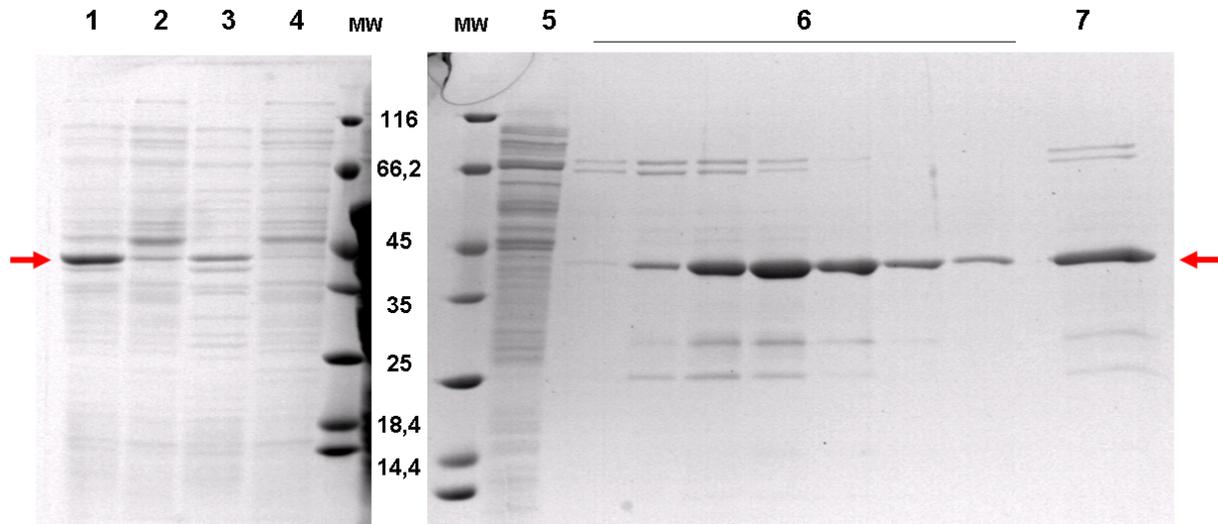


Figure 22 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE réalisé pendant la purification de la SPL sauvage de *B. subtilis*. MW : « Molecular weight » : Marqueurs de masse moléculaire (la masse moléculaire des marqueurs protéiques est exprimée en kDa). Piste 1 : Extraits totaux. Piste 2 : Extraits solubles. Piste 3 : Extraits insolubles. Piste 4 : Non retenu sur la colonne d'affinité ; Piste 5 : Lavage avec le tampon A contenant 30 mM d'imidazole. Pistes 6 : Fractions obtenues pendant l'élution par le gradient d'imidazole. Piste 7 : SPL sans imidazole après colonne de filtration sur gel (HiPrep Desalting), pureté estimée à 86 %.

La taille de la bande correspondant à la protéine majoritaire (flèche rouge, piste 7 – Figure 22) est compatible avec la masse moléculaire prédite à partir de la séquence (42 kDa). La bande de masse moléculaire 25 kDa (5%) correspond, d'après un séquençage N-terminal, à une protéine native d'*Escherichia coli* riche en histidines (SlyD : FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) et capable de fixer les ions Ni^{2+} . La bande à 30 kDa correspond à une SPL tronquée du côté C-terminal, tandis que les bandes à 66 kDa correspondent à un état dimérique de la SPL (Rebeil *et al.*, 2001).

I.1.2. La protéine SPL mutée C141A de *B. subtilis*

Les mêmes étapes concernant l'expression et la purification sont réalisées pour la SPL mutée au niveau de la 4^e cystéine. Cette protéine se montre beaucoup plus stable à la sortie de la colonne Ni-NTA, précipitant peu. L'étape de filtration sur gel pour enlever l'imidazole est tout de même réalisée. Le rendement classique de purification de ce mutant est de 30 à 40 mg pour 10 L de culture. Le gel SDS-PAGE de la protéine dont la pureté est estimée à 93% est

présenté Figure 23. Les bandes représentant les contaminants (SlyD, SPL tronquée, SPL dimérique) sont toujours présentes mais en plus faible proportion.

I.1.3. La protéine SPL sauvage de *C. acetobutylicum*

Cette protéine est purifiée comme décrit précédemment. 30 à 50 mg de SPL de cet organisme sont obtenus pour 10 L de culture, ce qui représente environ trois fois la quantité de SPL de *B. subtilis* obtenue. La pureté est estimée à 90 %. Le gel d'électrophorèse est présenté dans la Figure 23. Là encore les mêmes contaminants sont présents, également en plus faible quantité. La SPL sauvage de *C. acetobutylicum* semble plus stable que celle de *B. subtilis* en termes de précipitation (elle ne précipite pas jusqu'à 1 heure à 4°C même en présence d'imidazole, précipite peu à la décongélation contrairement à la SPL de *B. subtilis*).

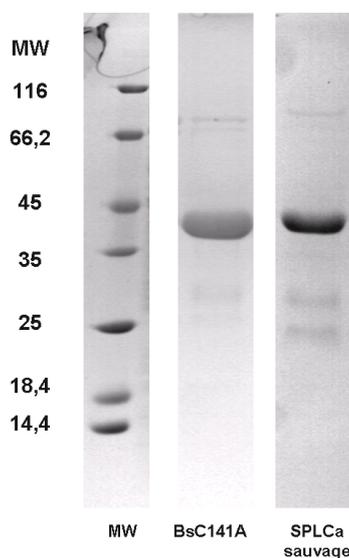


Figure 23 : Gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Protéines purifiées SPL BsC141A (pureté 93 %) et SPL Ca (pureté 90 %).

Le Tableau 8 résume les rendements et puretés obtenus pour 10 L de culture en milieu LB.

Organisme	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Clostridium acetobutylicum</i>
	Sauvage	C141A	Sauvage
Rendement /10 L	10-20 mg	30-40 mg	30-50 mg
Pureté %	86 %	93 %	90 %

Tableau 8 : Rendements obtenus en mg de SPL et pureté estimée sur le gel d'électrophorèse pour 10 L de culture en milieu LB.

I.2. Quantification du Fer et du Soufre

Les quantités de fer et de soufre ont été déterminées pour chaque protéine purifiée précédemment comme décrit dans Matériels et Méthodes III.3. Une moyenne de 0,5 à 1 nmol de fer et de soufre par nmol de SPL a été trouvée.

En accord avec ces dosages, les spectres UV-visible réalisés en aérobiose juste après la purification n'ont révélé qu'une faible trace de centre [Fe-S] (Figure 24). En effet, la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$ caractéristique d'un centre [Fe-S] et observable entre 310 et 500 nm est très peu intense. Seule la bande à 280 nm caractéristique des noyaux aromatiques de la protéine est visible.

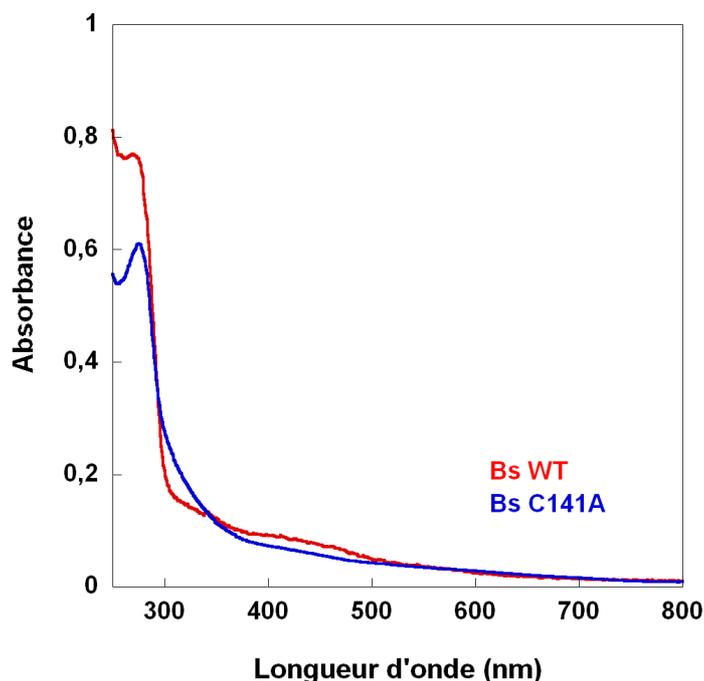


Figure 24 : Exemples de spectres UV-visibles enregistrés entre 250 et 800 nm. En rouge : SPL Bs sauvage (WT). En bleu : SPLBsC141A.

Afin d'augmenter la proportion de centres [Fe-S] dans la protéine, deux expériences ont été envisagées : d'une part la reconstitution du centre [Fe-S] en anaérobiose et d'autre part une purification en anaérobiose pour préparer la SPL. En effet, les centres [Fe-S] des protéines de la famille des « Radical-SAM » sont sensibles à l'oxygène. On peut donc penser que celui de la SPL l'est aussi.

I.3. Purification de la SPL recombinante de *C. acetobutylicum* en anaérobiose

La SPL de *C. acetobutylicum*, plus stable et produite en plus grande quantité a été choisie pour réaliser l'extraction et la purification en boîte à gants comme décrit dans

Matériels et Méthodes III.1.2. A la fin de la purification (rendement de 3 à 8 mg pour 10 L de culture, pureté estimée à 52 %), la protéine a une couleur brun foncé. La protéine contaminante, SlyD, de masse apparente 25 kDa est présente en assez grande quantité ici (31 % – Figure 25). Les quantités de fer et de soufre déterminées sont de $1,7 \pm 0,2$ nmol/nmol protéines. En émettant l'hypothèse que SlyD ne fixe pas de fer ni de soufre (cette protéine est connue pour fixer les ions Ni^{2+}), et en tenant compte de sa proportion par rapport à la SPL, la quantité de fer vaut alors 3,3 nmol/nmol SPL.

Manifestement, la purification en anaérobiose n'est pas un bon choix en termes de pureté de la protéine. Une autre étape de purification aurait été nécessaire, mais au risque de perdre le fer et le soufre.

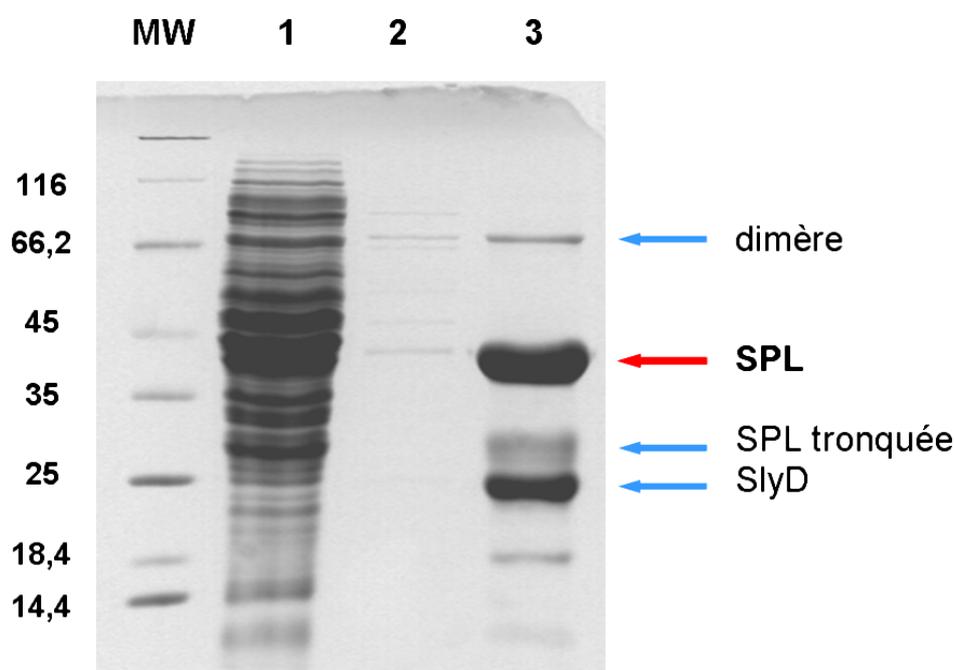


Figure 25 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la purification en anaérobiose de la SPL sauvage de *C. acetobutylicum*. MW : Marqueurs de poids moléculaire. Piste 1 : Extraits solubles. Piste 2 : Lavage avec le tampon A contenant 30 mM d'imidazole. Piste 3 : Elution de la protéine par le gradient d'imidazole.

I.4. Reconstitution des protéines purifiées en aérobiose

Toutes les protéines purifiées en présence d'oxygène ont alors été reconstituées en anaérobiose en présence de 5 excès molaires de Fe(II) et de sulfure S^{2-} . Dans une des expériences (SPLBs sauvage), le soufre est apporté par l'activité cystéine désulfurase d'IscS ou de CsdA, comme décrit dans Matériels et Méthodes III.2. A l'issue de cette reconstitution, et après une filtration sur gel permettant d'éliminer le fer et le soufre fixés de façon non

spécifique, les protéines contiennent des quantités de fer et de soufre situées entre 3,8 et 4,2 nmol/nmol de protéine.

I.5. Caractérisation biochimique de la SPL de *B. subtilis* reconstituée

L'état oligomérique des protéines SPL sauvage et mutée de *B. subtilis* dont le centre [Fe-S] a été reconstitué, a été déterminé par chromatographie d'exclusion de taille, sur une colonne Superdex-75. Les protéines (SPL Bs sauvage et SPLBsC141A) sont éluées majoritairement sous forme **monomérique** (70 %), avec une masse moléculaire d'environ 48 kDa, même si une certaine proportion de dimère peut être observée (30 %).

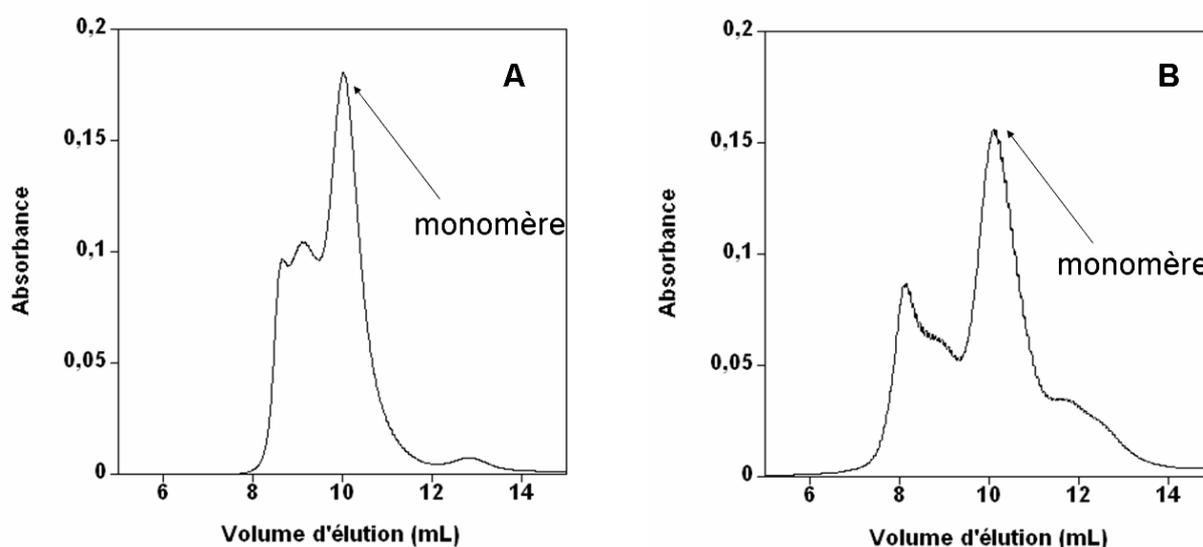


Figure 26 : Détermination de l'état oligomérique des protéines. Profils d'élué obtenus lors des chromatographies sur Superdex-75 des SPL sauvage (A) et mutée (B) reconstituées de *B. subtilis*, réalisées à un débit de 0,3 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, DTT 5 mM, pH 7,5.

II. Caractérisation spectroscopique du centre [Fe-S]

II.1. Caractérisation du centre [Fe-S] après reconstitution

II.1.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Les spectres UV-visible des protéines reconstituées en anaérobiose sont tous comparables entre eux (Figure 27). En effet, les spectres UV-visible enregistrés entre 250 et 800 nm présentent une bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$ située vers 420 nm et un épaulement beaucoup moins important situé à 330 nm plus ou moins visible selon les préparations. Ces caractéristiques suggèrent la présence d'un centre [Fe-S]. Ces spectres sont

comparables avec ceux de différentes protéines contenant un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (RNR, MiaB, HemN, etc...) et sont donc compatibles avec la présence d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (Layer *et al.*, 2002, Pierrel *et al.*, 2003, Tamarit *et al.*, 1999).

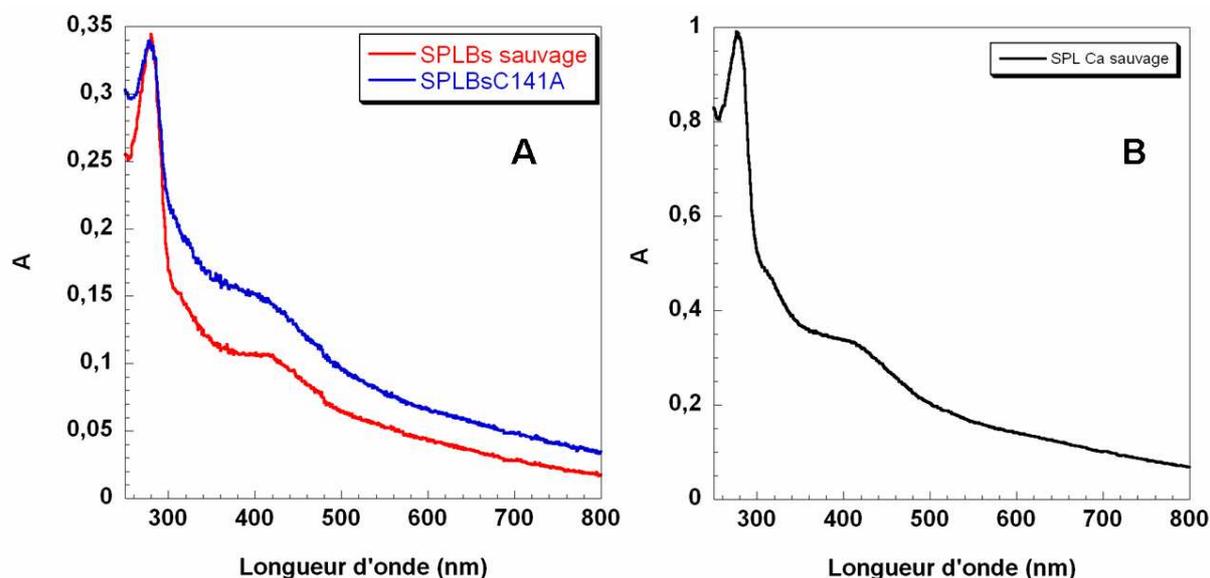


Figure 27 : Spectres UV-visible des SPL reconstituées. A. SPL reconstituées sauvage (rouge) et mutée (bleu) de *B. subtilis*. B. SPL sauvage reconstituée de *C. acetobutylicum*.

Lorsque les protéines reconstituées sont exposées à l'oxygène, l'intensité de la bande de transfert de charge diminue fortement conduisant à un spectre similaire à celui enregistré après purification.

La spectroscopie UV-visible ne suffisant pas pour identifier précisément la nature du centre $[\text{Fe-S}]$, une autre spectroscopie est nécessaire. La spectroscopie Mössbauer permet la caractérisation de l'état oxydé de ces centres.

II.1.2. Spectroscopie Mössbauer

Après reconstitution du centre $[\text{Fe-S}]$ avec du soufre et du ^{57}Fe , les échantillons concentrés peuvent être soumis à la spectroscopie Mössbauer (Matériels et Méthodes V.4), une spectroscopie spécifique du fer. Celle-ci permet notamment de distinguer les différentes formes de centres $[\text{Fe-S}]$: $[2\text{Fe-2S}]$, $[3\text{Fe-4S}]$, $[4\text{Fe-4S}]$ et leur état d'oxydation. Elle permet également de quantifier les proportions de ces différentes espèces ainsi que d'éventuelles formes de fer libre. Les échantillons sont préparés dans un volume de 400 μL comme décrit dans Matériels et Méthodes V.4.

Les spectres Mössbauer ont été réalisés à 78 K et 4,2 K pour les protéines dont le centre [Fe-S] a été reconstitué, à savoir les SPL sauvages de *B. subtilis* et de *C. acetobutylicum*, et la SPL mutée SPLBsC141A. Les spectres obtenus (● sur la Figure 28) sont alors simulés (trait plein noir sur la Figure 28) par une combinaison de différents signaux correspondant chacun à une espèce précise de centre [Fe-S] (en couleur sur la Figure 28). La proportion des différents doublets théoriques dans la représentation du spectre complet permet de quantifier la proportion des différentes espèces de centre [Fe-S] dans l'échantillon. La Figure 28 présente les spectres Mössbauer enregistrés à 4,2 K des SPL sauvages reconstituées de *B. subtilis* et *C. acetobutylicum* et le spectre de la SPLC141A de *B. subtilis* reconstituée. Le Tableau 9 et le Tableau 10 résument les différentes compositions en centres [Fe-S] des protéines de *B. subtilis* et *C. acetobutylicum* étudiées.

D'une manière générale, pour les protéines sauvages reconstituées (Tableau 9), le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ est l'espèce légèrement majoritaire (doublet bleu, 40 % pour SPLBs sauvage, 42 % pour SPLCa sauvage). Le centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ (doublet rouge), quant à lui, ne représente que 27 % et 31 % pour SPLBs sauvage et SPLCa sauvage respectivement. Ces protéines contiennent également des impuretés de fer ferreux dont une espèce non identifiée (doublet rose – X dans le Tableau 9 et le Tableau 10), et du Fe^{2+} octaédrique ($S = 2$, doublet vert). La quantité de fer présente sous la forme X représente 12 % et 6 % pour les SPLBs et SPLCa sauvages respectivement, tandis que 21 % de Fe^{2+} octaédrique sont observés pour les deux protéines.

Enfin, le spectre de la SPL mutée C141A de *B. subtilis*, présente des caractéristiques différentes (Figure 28, Tableau 10). Les espèces présentes dans le spectre Mössbauer sont exclusivement un $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (73%), et du Fe^{2+} (27 % au total). Cet échantillon ne contient pas de $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$.

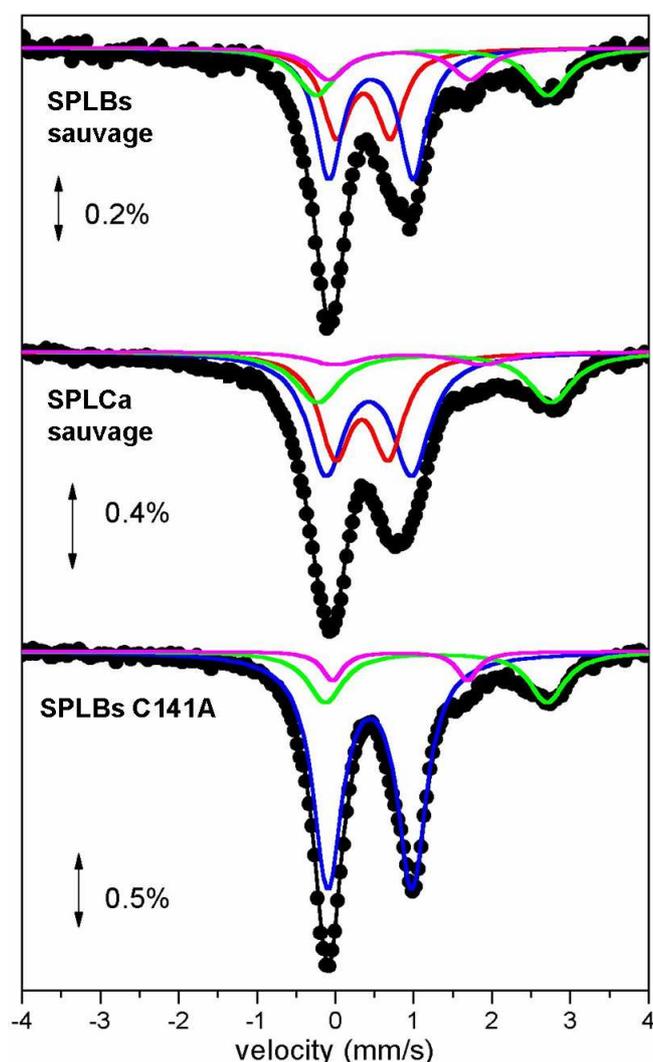


Figure 28 : Spectres Mössbauer (enregistrés à 4,2 K) obtenus pour les SPL sauvages de *B. subtilis* (SPLBs sauvage), *C. acetobutylicum* (SPLCa sauvage) et mutée SPLBsC141A. Les lignes de couleur correspondent aux différentes simulations des doublets présents dans les spectres : doublet **bleu** : $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, doublet **rouge** : $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, doublet **rose** : espèce de Fer non définie (C), doublet **vert** : Fe^{2+} octaédrique.

Espèces	SPL Bs sauvage			SPL Ca sauvage		
	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire %	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire %
$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	0,44(4)	1,06(12)	40(5)	0,43(2)	1,09(10)	42(5)
$[2\text{Fe-2S}]^{2+}$	0,33(5)	0,66(10)	27(5)	0,34(2)	0,67(5)	31(5)
X	0,70(10)	1,98(20)	12(2)	0,92	1,97	6(2)
$\text{Fe}^{2+}(\text{S}=2)$ Octaédrique	1,26(10)	2,88(20)	21(2)	1,26	2,89	21(2)

Tableau 9 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus par simulation (des spectres à 4,2 K) pour les SPL reconstituées sauvage SPL Bs et SPL Ca. Les nombres entre parenthèses sont les incertitudes sur le (ou les deux) dernier(s) chiffre(s).

Espèces	SPL Bs C141A		
	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire %
$[4Fe-4S]^{2+}$	0,44(1)	1,07(2)	73
$[2Fe-2S]^{2+}$	--	--	--
X	0,83(2)	1,72(2)	7
$Fe^{2+}(S=2)$ Octaédrique	1,29(2)	2,82(2)	20

Tableau 10 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus par simulation (des spectres à 4,2 K) pour la SPL mutée de *B. subtilis* SPLBsC141A. Les nombres entre parenthèses sont les incertitudes sur le dernier chiffre.

II.2. Caractérisation par RPE du centre après oxydation

Un centre $[4Fe-4S]^{2+}$ est diamagnétique (car il possède 2 ions Fe^{3+} et 2 ions Fe^{2+} donc son spin vaut $S = 0$) et est donc silencieux en RPE. Cependant, lorsque l'échantillon est exposé à l'oxygène pendant 10 minutes à température ambiante, le spectre RPE possède un signal caractéristique d'un centre $[3Fe-4S]^{1+}$ ($g = 2,01(8)$) comme le montre la Figure 29. L'intégration de ce signal montre que 50 à 60 % du fer est sous cette forme. La présence d'un centre $[3Fe-4S]^{1+}$ est une caractéristique des protéines de la famille des « Radical-SAM » (Jarrett, 2003). En effet, les centres $[Fe-S]$ sont extrêmement sensibles à l'oxygène. En présence de ce dernier, le centre $[4Fe-4S]$ subit une dégradation oxydative qui conduit à la formation d'un centre $[3Fe-4S]^{1+}$ stable de spin $S = \frac{1}{2}$.

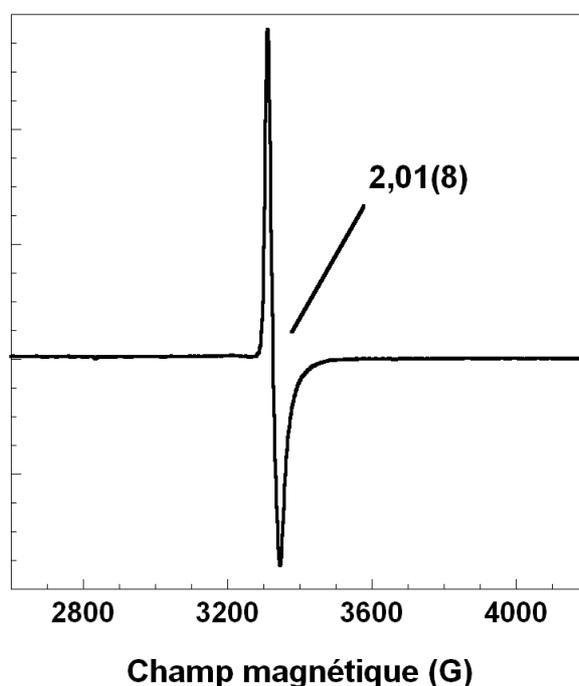


Figure 29 : Spectre RPE de la SPL de *Bacillus subtilis* (190 μ M) exposée pendant 10 minutes à l'oxygène. Enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain $2 \cdot 10^4$.

II.3. Caractérisation du centre [Fe-S] à l'état réduit ([4Fe-4S]¹⁺)

II.3.1. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique

Comme indiqué ci-dessus, un centre [4Fe-4S]²⁺ est silencieux en RPE. Or la réduction de ce centre conduit à un centre [4Fe-4S]¹⁺ de spin $S=1/2$ théoriquement observable en RPE. Lorsque les protéines reconstituées sont réduites avec 10 excès molaires de dithionite ($E^\circ \approx -550$ mV, pH 8), la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$ en spectrophotométrie UV-visible située à 420 nm disparaît (Figure 30 – A). Cette propriété a été utilisée pour suivre la réduction du centre [Fe-S] lors de la préparation des échantillons pour l'analyse par spectroscopie RPE.

Les valeurs de g de 2,03 et 1,93 obtenues à partir des signaux RPE en bande X à 10 K (ces valeurs sont identiques, quel que soit l'organisme (*B. subtilis* ou *C. acetobutylicum*) et à la fois pour les protéines sauvages et mutées), ainsi que les propriétés de relaxation du signal de spin $S = 1/2$ en température et en puissance sont caractéristiques d'un centre [4Fe-4S]¹⁺. Un exemple de spectre obtenu pour les SPL est donné Figure 30 dans le cas de la SPL sauvage reconstituée de *C. acetobutylicum* et réduite par le dithionite.

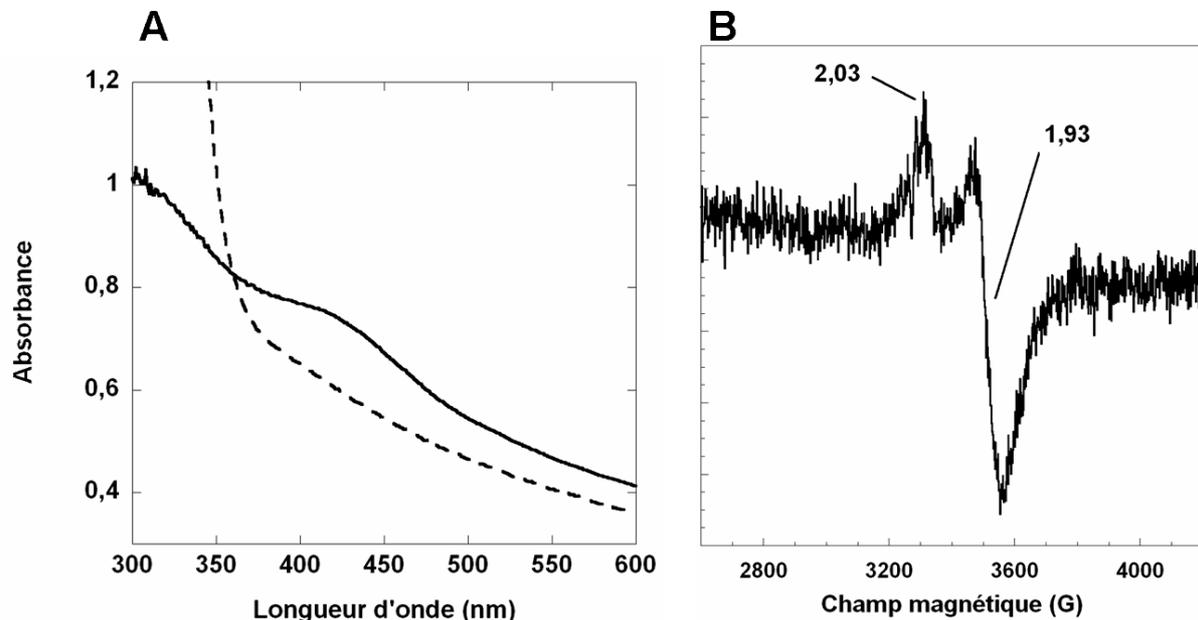


Figure 30 : Analyse RPE de SPLCa sauvage. A. Suivi UV-visible de la réduction de centre [Fe-S] de SPLCa sauvage. Agrandissement d'un spectre UV-visible entre 300 nm et 600 nm. SPLCa sauvage (200 μ M) avant réduction (trait plein) montrant la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(II)$ à 420 nm. Après réduction (tirets) avec 2 mM de dithionite, la bande à 420 nm disparaît après 30 minutes. **B. Spectre RPE en bande X.** Enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain $2 \cdot 10^5$.

Cependant, l'intégration du signal montre que seulement 10% de la quantité totale de fer est présente sous cette forme (double intégration du signal et quantification par rapport au standard Cu-EDTA) dans des conditions non saturantes. Ceci peut s'expliquer par une dégradation du centre dans les conditions de réduction. L'utilisation d'autres réducteurs, comme la 5-déazaflavine ($E^\circ \approx -650$ mV, pH 8), conduit à des résultats similaires.

II.3.2. Spectroscopie Hyscore – Mise en évidence de l'interaction du centre [4Fe-4S]¹⁺ avec la SAM

Comme indiqué dans l'introduction, la S-Adénosylméthionine peut coordonner l'atome de Fe différencié du centre [4Fe-4S], ce qui affecte généralement sa signature spectroscopique. Ainsi des changements dus à la coordination de la SAM ont-ils été observés sur les spectres de résonance Raman¹¹ du centre [4Fe-4S]²⁺ de la Biotine Synthase (Cosper *et al.*, 2002), sur le spectre RPE du centre [4Fe-4S]¹⁺ de la sous-unité activatrice de la RNR anaérobie (Ollagnier *et al.*, 1997), sur le spectre Hyscore de la sous-unité activatrice de la RNR anaérobie (Gambarelli *et al.*, 2005) et sur les spectres ENDOR¹² et Mössbauer de l'enzyme activatrice de la Pyruvate-Formiate Lyase (Krebs *et al.*, 2002, Walsby *et al.*, 2002a). Nous avons donc utilisé les propriétés paramagnétiques du centre [Fe-S] de la SPL afin de mettre en évidence la coordination de la SAM au centre [Fe-S] de la SPL.

Premièrement, l'ajout de 10 équivalents de SAM modifie quelque peu la forme du signal RPE (celui-ci passe d'une forme axiale à une forme rhombique, avec apparition d'une valeur de g de 1,83), suggérant l'interaction de la SAM avec le centre [Fe-S], comme le montre la Figure 31.

¹¹ Raman : Spectroscopie concernant les transitions entre différents niveaux vibrationnels dans la molécule.

¹² ENDOR : Electron Nuclear Double Resonance : technique de RPE couplée à la RMN.

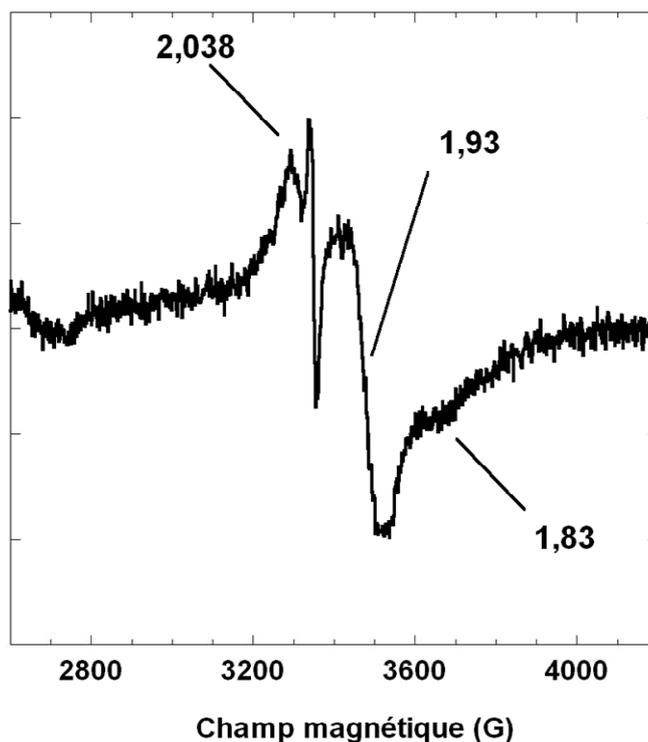


Figure 31 : Spectre RPE en bande X de la SPLCa sauvage reconstituée réduite en présence de SAM. La SPL (340 μ M) a été réduite par 10 équivalents de dithionite, puis 3 mM de SAM ont été ajoutés. Spectre enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain $2 \cdot 10^5$.

Deuxièmement, la mise en évidence non ambiguë du couplage entre le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ et un azote de la SAM a été obtenue grâce à la spectroscopie Hyscore.

Cette technique de RPE pulsée à deux dimensions (décrite dans Matériels et Méthodes V.3) a permis de voir une nette différence de spectre entre celui de la SPL réduite seule, et celui de la SPL réduite à laquelle 10 équivalents de SAM ont été ajoutés. En effet, dans le premier cas, seuls les couplages entre le centre et les noyaux « distants » (^{13}C en abondance naturelle, et ^1H) sont observés (Figure 32A, les couplages avec les hydrogènes ne sont pas montrés sur la figure car ils sortent à une fréquence de 14MHz). En revanche, après addition de SAM, le spectre est radicalement modifié, et un jeu de couplage symétrique par rapport à la diagonale du quadrant $(-,+)$ apparaît (Figure 32B).

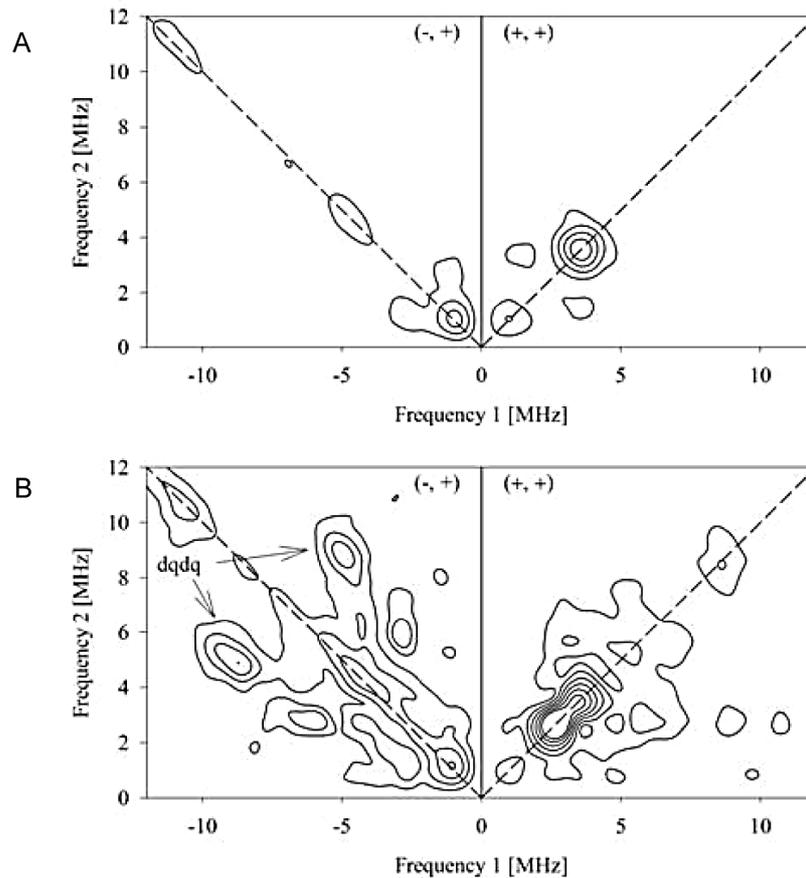


Figure 32 : Spectre Hyscore obtenu avec SPLCa sauvage reconstituée (240 μ M) enregistré à $g = 1,93$. Avant (A) et après (B) addition de 10 équivalents de SAM.

Par comparaison aux données de la littérature, la position de ce massif est caractéristique d'un noyau d'azote (de spin nucléaire $I = 1$) fortement couplé au centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ de spin $S=1/2$. La position des pics de corrélation double quanta-double quanta (dqdq dans la Figure 32) à (9.5;-5.7) et (5.7;-9.5) Mhz permet grâce à l'Équation 3 présentée en Matériels et Méthodes V.3, d'obtenir une estimation de la constante de couplage hyperfin isotrope a_N .

La valeur obtenue est de **9.1 Mhz**, ce qui est très proche de la valeur obtenue pour la sous-unité activatrice de la RNR anaérobie ($|a_N| = 8,9$ Mhz) et de celle obtenue par spectroscopie ENDOR de la lysine aminomutase ($|a_N| = 9,1$ Mhz) (Chen *et al.*, 2003, Gambarelli *et al.*, 2005). Ceci signifie que le groupe amino de la SAM est le ligand du 4^e fer du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ de la SPL, et ceci de la même manière que celle démontrée pour les autres enzymes citées.

Chapitre 2 : Discussion

Le clonage du gène *splB* codant pour la Spore Photoproduit Lyase (SPL) de *B. subtilis* a été réalisé au laboratoire avant mon arrivée par O. Berteau alors que celui de la bactérie *C. acetobutylicum* a été fait par Y. Nicolet (IBS/LCCP, Grenoble). Au début de ma thèse j'ai mis au point les conditions d'expression et de purification des deux protéines et assez rapidement nous nous sommes heurtés à des problèmes de stabilité de la protéine. En effet, malgré une très bonne surexpression des deux enzymes, la majorité des protéines surproduites se retrouvait sous forme de corps d'inclusion (70%). Sur la partie soluble (30%) et après purification en aérobie, seulement 1-5 mg de protéines ont été obtenus par litre de culture. Il est à noter que l'équipe de J.B. Broderick purifie la SPL avec un rendement similaire (2,5 mg/1L de culture) (Buis *et al.*, 2006), même si la purification se fait en anaérobiose. Il est donc clair que le faible rendement est plutôt un problème inhérent à la protéine qu'aux conditions de purification. De plus, l'enzyme est relativement instable, puisque elle précipite rapidement en présence d'imidazole ou encore à la décongélation.

Malgré le faible rendement de purification et l'instabilité de la protéine aux manipulations (congélation et décongélation) nous avons entrepris la caractérisation biochimique et spectroscopique de la SPL. La protéine purifiée présente une coloration légèrement brune avec une légère absorption entre 310 et 550 nm. Les quantifications en fer et soufre ont permis de montrer la présence de quantité équimolaires de fer et de soufre mais en quantité sous-stœchiométrique par rapport à la protéine (0,5 -1 Fe et S/monomère de SPL). Afin de mieux caractériser le centre métallique de la SPL deux stratégies ont été envisagées : purifier la protéine en anaérobiose ou reconstituer chimiquement son centre métallique. La purification en anaérobiose s'est avérée être inefficace puisque la protéine dans ces conditions n'était pas pure. Une étape supplémentaire de purification aurait pu permettre d'améliorer l'état de pureté avec en contrepartie la possible perte de fer et de soufre. Nous avons donc choisi de reconstituer chimiquement le centre [Fe-S] de la SPL et ce fut un bon choix. En effet, la SPL ainsi obtenue contient entre 3,8 et 4,2 atomes de fer et soufre par monomère de protéine. Il faut noter que la majorité de la protéine (70 %) est sous forme monomérique une fois reconstituée, comme l'observe également J.B. Broderick pour la SPL native de *B. subtilis*, purifiée en anaérobiose (Buis *et al.*, 2006).

La protéine ainsi reconstituée a été caractérisée par différentes techniques spectroscopiques. Grâce à la spectrophotométrie UV-visible et à la spectroscopie Mössbauer, nous avons pu identifier que le centre [Fe-S] de la SPL est un centre de type $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. L'analyse RPE de la protéine réduite par du dithionite a corroboré la nature de ce centre dans la protéine reconstituée puisqu'en effet un centre $[4\text{Fe-4S}]$ dans un état rédox +1 a été observé à 10K. Les équipes travaillant sur le sujet qui ont également purifié et caractérisé les SPL (Buis *et al.*, 2006, Pieck *et al.*, 2006, Rebeil *et al.*, 2001) par UV-visible et RPE concluent toutes à l'existence d'un centre $[4\text{Fe-4S}]$. Les études par spectroscopie Mössbauer présentées ici ont également permis de montrer la présence majoritaire du centre $[4\text{Fe-4S}]$ dans la protéine. Cependant, ces études ont révélé l'existence d'autres espèces, du fer ferreux (20%) et des centres [Fe-S] de type $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ en quantité non négligeable (de l'ordre de 30%). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la présence de ce type de centre. Soit la reconstitution du centre $[4\text{Fe-4S}]$ a été incomplète, mais ceci est peu probable étant donné le temps de reconstitution choisi (12 heures), soit le centre $[4\text{Fe-4S}]$ a subi une dégradation oxydative en $[2\text{Fe-2S}]$ due à la présence de traces d'oxygène. Cette hétérogénéité est fréquemment observée pour les protéines de la famille des « Radical-SAM » (notamment pour les sous-unités activatrices de la PFL (Broderick *et al.*, 1997) et de la RNR anaérobie (Mulliez *et al.*, 1999, Ollagnier *et al.*, 1999, Tamarit *et al.*, 1999), et pour la Lipoate synthase (Ollagnier-De Choudens *et al.*, 2000)). Une autre forme de centre généralement observée pour les « Radical-SAM » est la forme $[3\text{Fe-4S}]$ qui est due également à une dégradation oxydative du $[4\text{Fe-4S}]$ par perte d'un atome de fer ferreux (Broderick *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2000). Pour vérifier cette hypothèse, une analyse RPE de la SPL a été effectuée lorsque la protéine reconstituée est exposée à l'oxygène pendant 10 minutes. La présence d'un agrégat $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ est observée en quantité non négligeable (50 à 60 % du fer). Il faut noter que J.B. Broderick observe cette forme pour la SPL purifiée en anaérobiose (de l'ordre de 30 % – analysée par RPE sans traitement à l'oxygène) (Buis *et al.*, 2006). Les différentes formes de centres [Fe-S] observées pour la SPL en fonction du milieu environnant (oxydation, présence d'un réducteur), qui peuvent se résumer par le Schéma 36, confirment l'appartenance de la SPL à la famille des enzymes « Radical-SAM » (Jarrett, 2003). Il faut noter que la sensibilité à l'oxygène des centres $[4\text{Fe-4S}]$ des « Radical-SAM » explique pourquoi les protéines purifiées à l'air sont toujours dépourvues de centre [Fe-S].

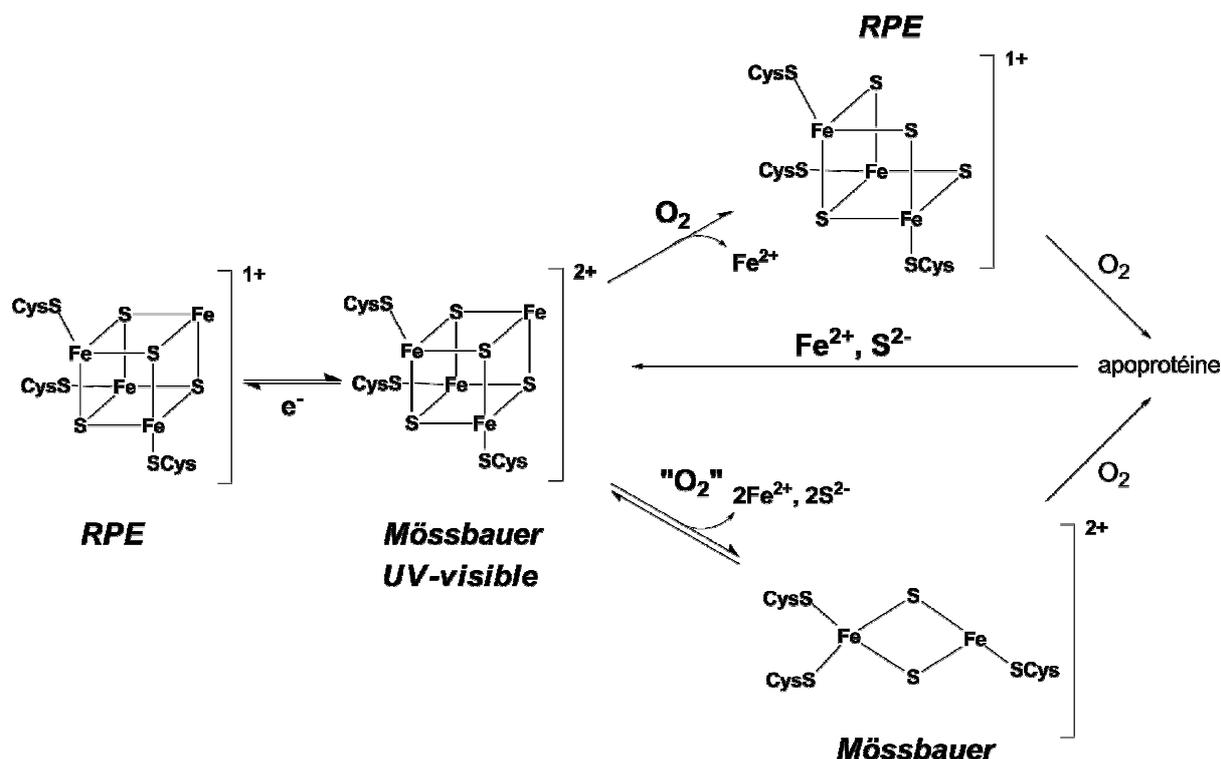


Schéma 36 : Résumé des interconversions proposées des centres [Fe-S] pour la SPL. La reconstitution chimique de l'apoptéine conduit majoritairement à la formation du centre [4Fe-4S]²⁺, mais la présence de [2Fe-2S]²⁺ est également observée par Mössbauer. L'exposition à l'oxygène de la SPL reconstituée conduit à la formation du centre [3Fe-4S]¹⁺. Comme pour de nombreuses protéines de la famille « Radical-SAM », le [3Fe-4S]¹⁺ et le [2Fe-2S]²⁺ sont complètement dégradés par exposition prolongée à d'oxygène et conduisent dans ces conditions à l'apoptéine.

Pour les enzymes de la superfamille « Radical-SAM », la SAM est le ligand d'un des atomes de fer du centre [4Fe-4S]. L'interaction [Fe-S]/SAM a déjà été démontrée pour d'autres protéines soit par cristallographie aux rayons X (HemN (Layer *et al.*, 2003), LAM (Lepore *et al.*, 2005), BioB (Berkovitch *et al.*, 2004), MoaA (Hanzelmann *et al.*, 2004), HydE (Nicolet *et al.*, 2008)), soit par des études spectroscopiques (ENDOR, Mössbauer) dans le cas de la LAM, de BioB, de la PFL (Chen *et al.*, 2003, Cospér *et al.*, 2002, Cospér *et al.*, 2000, Krebs *et al.*, 2002, Walsby *et al.*, 2002a, Walsby *et al.*, 2002b, Walsby *et al.*, 2005). Dans le cas de la SPL, nous avons mis en évidence l'interaction entre le centre fer-soufre et la SAM par des expériences de spectroscopie RPE (changement de la forme du signal) et surtout Hyscore. En effet, cette spectroscopie de RPE pulsée à deux dimensions permet de voir des couplages entre certains noyaux et le spin étudié. Nous avons ainsi montré qu'un des atomes de fer se fixe à la S-Adénosylméthionine par le groupement aminocarboxylate de la partie méthionine car un couplage avec un azote est observé avec cette spectroscopie Hyscore.

Tous ces résultats confirment l'appartenance de la SPL à la famille des « Radical-SAM ». Comme nous le verrons par la suite, la fixation de la SAM est essentielle pour

l'activation réductrice du sulfonium par un centre [4Fe-4S] réduit qui agit de façon catalytique.

Enfin, l'équipe de W.L. Nicholson a montré grâce à des études *in vivo*, que la cystéine 141, la seule cystéine autre que celles du motif CxxxCxxC, est absolument essentielle à la survie des spores irradiées. Dans ce contexte, nous avons exprimé, purifié et caractérisé la SPL mutée de *B. subtilis* SPLBsC141A, afin d'étudier son rôle *in vitro*. Nos résultats ont montré que la protéine mutée possède un centre [4Fe-4S] intact, confirmant que cette cystéine en position 141 n'est pas impliquée dans la chélation du centre [Fe-S]. Ceci avait déjà été suggéré par Nicholson (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005). Notons que ce résultat était quelque part attendu puisque les centres [4Fe-4S] des « Radical-SAM » ne sont coordonnés que par les trois cystéines du motif CxxxCxxC. De plus, il faut noter qu'un meilleur rendement, une meilleure pureté, ainsi qu'une plus grande stabilité de la protéine ont été obtenus avec cette protéine mutée. Une meilleure homogénéité en centre [Fe-S] a été obtenue avec notamment une plus grande proportion de centre [4Fe-4S], suggérant que l'absence de la cystéine 141 stabilise le centre [4Fe-4S] et de ce fait la protéine. La mortalité à la germination des spores irradiées n'est donc pas liée à la présence d'un centre [Fe-S] détérioré. Son rôle plus précis dans le mécanisme sera étudié dans la partie III.

Partie II

Synthèse du Photoproduit des
spores

L'objectif de cette partie est de décrire la synthèse de potentiels substrats de l'enzyme SPL et de les caractériser de façon structurale. Particulièrement, l'accent a été porté sur la synthèse d'un substrat minimum de l'enzyme, le Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate nommé SPTpT. L'objectif a été de l'obtenir en quantité suffisante afin d'effectuer une étude RMN approfondie pour déterminer la structure du Photoproduit des spores. En effet, comme indiqué dans l'introduction, il existe potentiellement 4 diastéréoisomères du SP. Même si certaines données de la littérature peuvent expliquer la formation préférentielle du composé « 5'*R* » (voir Introduction) – dans lequel le méthyle est porté du côté 5' par le carbone asymétrique de configuration *R* – aujourd'hui, la stéréochimie du Photoproduit des spores est toujours inconnue.

La synthèse d'un oligonucléotide de 11 bases de long (simple brin et double brin) dans lequel le Photoproduit des spores a été incorporé a également été effectuée, afin d'avoir accès à un substrat plus proche de celui rencontré dans l'ADN des spores. Ces divers dérivés du Photoproduit des spores ont été utilisés comme substrats dans les réactions enzymatiques avec la SPL décrites dans la Partie III.

Chapitre 1 : Résultats

I. Synthèse du SPTpT

Préalablement à mon arrivée au laboratoire, le SPTpT avait déjà été produit au laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, à partir d'irradiation UV-C de films secs d'ADN de thymus de veau, suivie d'une hydrolyse enzymatique pour libérer la lésion, alors purifiée par HPLC (appelé SPTpT_{ADN} par la suite). Cette méthode permet d'obtenir le Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate SPTpT, mais en très faible quantité (quelques dizaines de microgrammes). L'approche que nous avons retenue, afin d'obtenir le SPTpT en plus grande quantité, est d'irradier directement un film sec de dithymidine TpT en présence d'acide dipicolinique. Pour cela, le TpT doit être préalablement synthétisé par couplage entre deux thymines par la méthode aux phosphoramidites.

I.1. Préparation du dinucléoside monophosphate TpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine)

Les trois réactions nécessaires à l'obtention du dinucléotide modifié (couplage, oxydation et détritylation – méthode au phosphoramidite) se font successivement dans le même ballon et sont représentées Schéma 37.

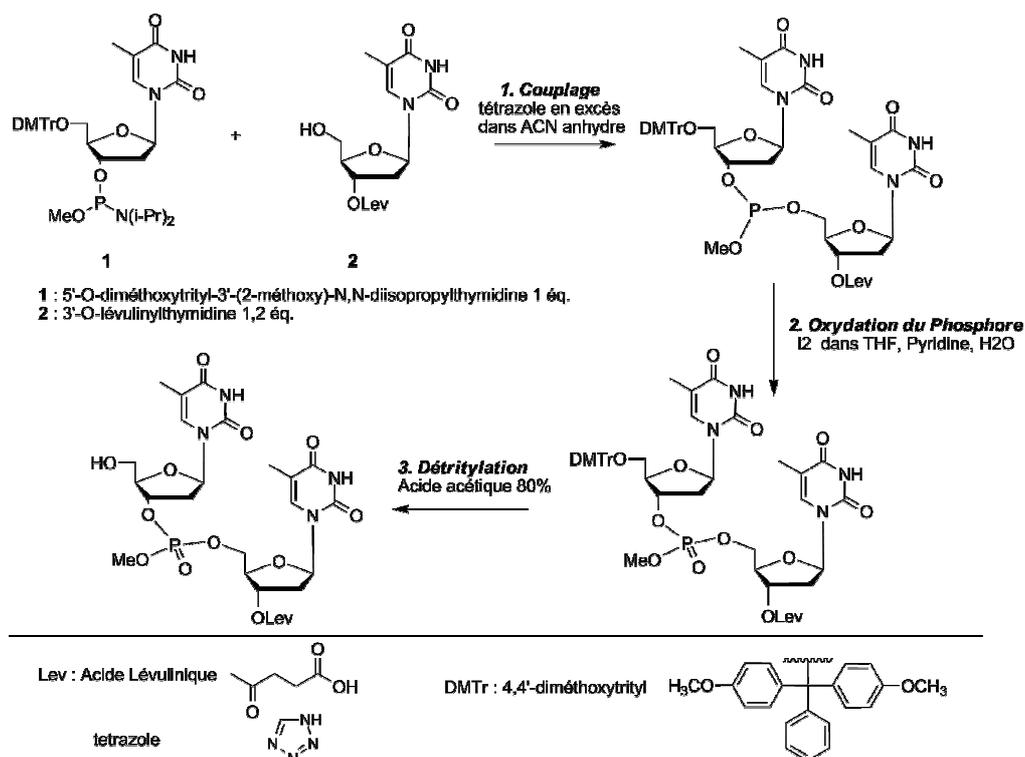


Schéma 37 : Les trois étapes de la synthèse du TpT. Couplage, Oxydation du P^{III} en P^V et détritylation

Le couplage s'effectue en une quinzaine de minutes sous atmosphère inerte (argon) dans l'acétonitrile anhydre. Il est indispensable d'opérer en absence d'eau (celle-ci étant susceptible de déplacer la diisopropylamine par substitution nucléophile (S_N2)), ainsi qu'en absence d'oxygène (celui-ci étant capable d'oxyder le phosphoramidite et ainsi de désactiver la réaction de couplage). Le tétrazole catalyse la réaction de couplage (cet acide faible protone l'azote du groupement isopropyle le rendant alors meilleur groupe partant).

Ensuite, le phosphore est oxydé au degré d'oxydation +V par l'iode afin d'obtenir le pont phosphodiester rencontré dans l'ADN. L'iode est neutralisé par addition d'une solution de thiosulfate de sodium 1M. L'hydrolyse de l'éther tritylé dans l'acide acétique conduit à un mélange entre le TpT et le diméthoxytrityle. Le TpT est purifié par chromatographie sur colonne de silice (95 :5 CH₂Cl₂/MeOH) puis par HPLC comme décrit dans Matériels et Méthodes IV.2.2.a.

Le TpT encore protégé par le lévulinate et le méthyle est pur d'après une analyse HPLC. Deux pics sont observés et correspondent aux deux diastéréoisomères ce qui est dû à la chiralité du phosphate. Les produits correspondant à ces deux pics sont caractérisés par spectrométrie de masse et leur masse correspond à celle du TpT protégé par le méthyle et le lévulinate (658 g.mol⁻¹) attestant de l'obtention du bon produit. 340 mg (517 μmol) de TpT protégé pur sont obtenus (à partir de 1,42 mmol et 1,7 mmol de réactifs), soit un rendement de 36 %. Ce produit est conservé à -20 °C.

Parallèlement, les groupes protecteurs méthyle et lévulinyle d'une autre synthèse de TpT (provenant d'une synthèse de TpT réalisée précédemment par Didier Gasparutto) ont été libérés par un traitement à l'ammoniaque pendant 16 h à 50 °C. Le TpT est alors de nouveau purifié par HPLC. Les fractions contenant ce TpT sont rassemblées, l'acétonitrile est évaporé puis la solution est congelée et lyophilisée. Cette étape permet de se débarrasser du formiate d'ammonium. Le lyophilisat est solubilisé dans 4 mL d'eau ultra-pure et dosé par spectrophotométrie UV-visible, le coefficient d'extinction molaire du TpT étant de 16 800 M⁻¹.cm⁻¹ (Kibbe, 2007). La solution obtenue de TpT a une concentration de **38,3 mM**, et contient donc **83,6 mg (154 μmol)** de TpT.

I.2. Préparation du Photoproduit des spores SPTpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine)

I.2.1. Préparation du Photoproduit des spores SPTpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine)

Le SPTpT a été préparé par irradiation UV-C de films secs de dithymidine en présence de DPA. Ces conditions s'approchent des conditions des spores (faible hydratation, présence de dipicolinate de calcium) dans lesquelles le Photoproduit des spores se forme. Il faut rappeler que 4 diastéréoisomères peuvent théoriquement être synthétisés. Le « SPTpT 5' » *R* ou *S*, pour lequel le carbone asymétrique est sur la thymine côté 5', et le « SPTpT 3' », *R* ou *S*, dans le cas contraire (Schéma 38).

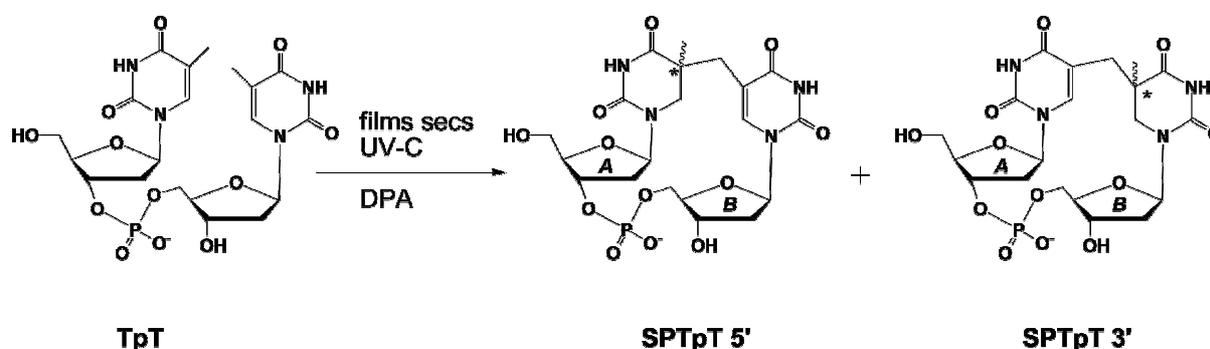


Schéma 38 : Synthèse du SPTpT par photochimie à partir du TpT. Formation potentielle des 4 diastéréoisomères SPTpT 5' « 5' *R* » et « 5' *S* » et SPTpT 3' « 3' *R* » et « 3' *S* ».

Pour cela, la solution de TpT (83,6 mg – 154 μ mol) est diluée dans 346 mL d'une solution de dipicolinate de sodium 10 mM puis répartie dans des boîtes de pétri. Les solutions sont congelées et lyophilisées pendant 24 heures de façon à avoir des films secs de TpT. Ces films sont exposés pendant une heure aux UV-C (254 nm), solubilisés afin d'homogénéiser les surfaces irradiées, puis lyophilisés et de nouveau irradiés.

Après chaque cycle, une fraction aliquote du mélange est prélevée et analysée par HPLC-MS/MS afin de connaître le contenu en photoproduits et leur évolution de cycle en cycle. La méthode utilisée dans ce chapitre est la même que celle utilisée dans l'ADN et les oligonucléotides. Elle a pour but de séparer et d'identifier tous les photoproduits des bases pyrimidiques (C et T), les photoproduits des cytosines n'étant évidemment pas attendus après irradiation de TpT. Le Tableau 11 résume les transitions utilisées et les temps de rétention nécessaires à l'identification de chacun des photoproduits des bases pyrimidiques.

Dimère	CPD CC	CPD TC	CPD CT	(6-4)PP CT	CPD TT
Transitions	517/195	531/195 530/195	531/195 530/195	531/195 530/195	545/447
Rt (min)	4	7,1	9,1	12, 1	14
Dimère	(6-4)PP TC	(6-4)PP TT	Trans,syn CPD TT	SP	
Transitions	531/195 530/195	545/432	545/447 545/251	545/447 545/251	
Rt (min)	17,2	17,2	18,1	19,1	

Tableau 11 : Données permettant l'identification des photoproduits bipyrimidiques CPD et (6-4)PP. Transitions utilisées et temps de rétention (Rt), pour chaque photoproduit.

Il faut 6 cycles d'irradiation des films pour former une assez grande quantité de Photoproduit des spores. Les films sont alors solubilisés dans un volume final de 10 mL d'eau, donnant une solution jaune. Le SPTpT est isolé par deux purifications successives par HPLC semi-préparative comme indiqué dans Matériels et Méthodes IV.2.2.b, suivies d'une troisième sur une colonne plus fine et plus résolutive (Inertsil ODS2 250 x 4 mm 5 μ).

I.2.2. Caractérisation du Photoproduit des spores SPTpT (thymidylyl-(3'-5')-thymidine) et comparaison au SP naturel

Une solution pure de SPTpT est obtenue (5 mL), comme le montrent le chromatogramme HPLC enregistré à 260 nm et le spectre de masse du produit (Figure 33). Il faut noter qu'un seul diastéréoisomère est obtenu lors de la synthèse du SPTpT par irradiation de TpT en présence de DPA. En effet, un seul pic HPLC est observé et le spectre RMN ^1H dans D_2O détaillé plus loin prouve qu'il n'y a qu'un isomère présent en solution.

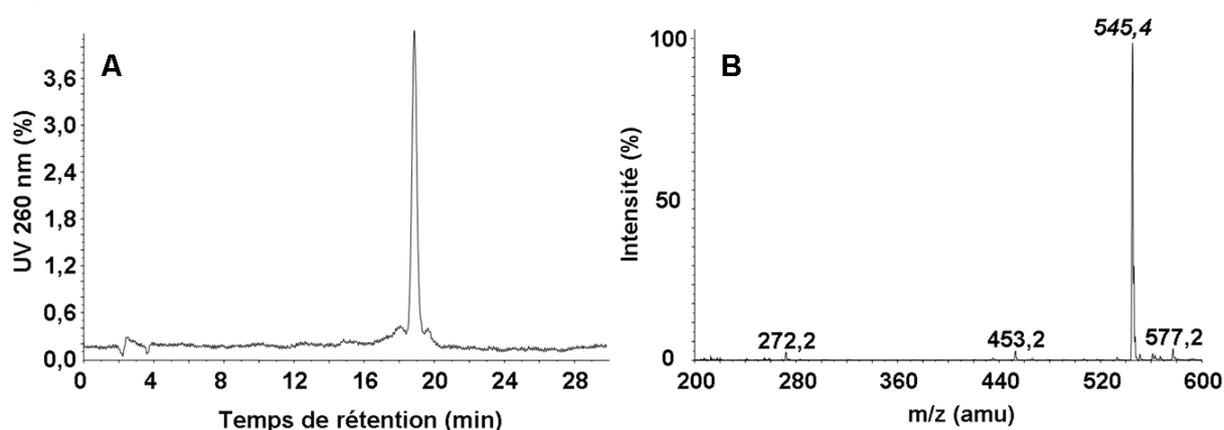


Figure 33 : Caractérisation du SPTpT obtenu après irradiation de TpT en présence de DPA et purification. A. Chromatogramme HPLC enregistré à 260 nm (Rt = 19,1 min). B. Spectre de masse MS1 du SPTpT, l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ a un rapport m/z de 545,4 amu (masse moléculaire calculée : 546,4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Le SPTpT pur a été quantifié par spectrophotométrie UV-visible. L'absorbance au maximum d'absorption (267 nm) d'1 mL d'une solution diluée au 1/100^e est de **0,049** unités d'absorbance.

Différentes dilutions de cette solution ont été utilisées afin de déterminer le coefficient d'absorption molaire (ϵ) de cette molécule. Pour cela, chaque dilution a été injectée en HPLC-MS/MS et quantifiée grâce à une solution de SPTpT isolé à partir de l'ADN (préparée précédemment par Thierry Douki) de concentration connue. Ainsi un graphe représentant l'absorbance à 267 nm des solutions en fonction de leur concentration a-t-il été tracé (Figure 34). Grâce à la loi de Beer-Lambert, le coefficient directeur de la droite passant par les points expérimentaux nous donne la valeur d' ϵ qui vaut **11 258 M⁻¹.cm⁻¹**.

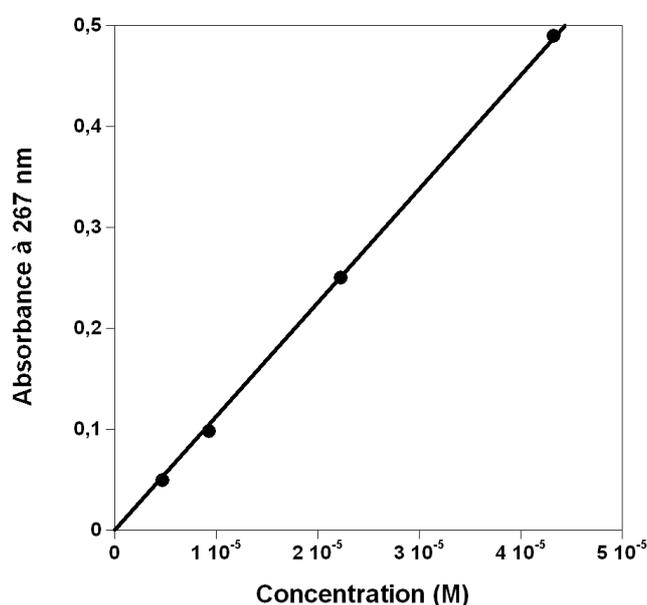


Figure 34 : Détermination du coefficient d'absorption molaire ϵ du SPTpT. La droite de régression linéaire a pour équation $y = 11258 x$, $R^2 = 0,999$.

Grâce à ce calcul, il est maintenant possible de quantifier le SPTpT en solution par spectrophotométrie UV-visible. La solution pure de SPTpT (5 mL) a une concentration de **435 μ M**. On a donc obtenu **1,2 mg** de SPTpT, soit un rendement de synthèse de **1,4 %**.

Le SPTpT synthétisé dans ces conditions possède le même temps de rétention que le SPTpT obtenu à partir d'hydrolyse enzymatique de l'ADN de spores irradiées, noté SPTpT_{spore} par la suite (Douki *et al.*, 2005a) lorsqu'il est analysé avec la même colonne et le même gradient. Afin de comparer plus précisément le SPTpT synthétisé dans cette étude au SPTpT_{spore}, un spectre de fragmentation MS2 a été réalisé en mode négatif pour les deux

molécules (Figure 35). Les deux spectres sont absolument identiques, à la fois en termes de rapport m/z des ions fils ainsi qu'en termes d'intensité relative des fragments. Le SPTpT obtenu par irradiation de TpT est donc absolument identique au SP issu de l'ADN de spores irradiées aux UV-C. Il constitue alors un bon candidat pour l'étude de la stéréochimie du Photoproduit des spores, ainsi que pour des études enzymatiques. De plus, ce résultat montre qu'un seul diastéréoisomère du Photoproduit des spores est produit dans l'ADN des spores. Ce produit a été utilisé comme substrat de l'enzyme SPL purifiée et reconstituée, et l'activité de l'enzyme avec ce substrat est détaillée dans la partie III.

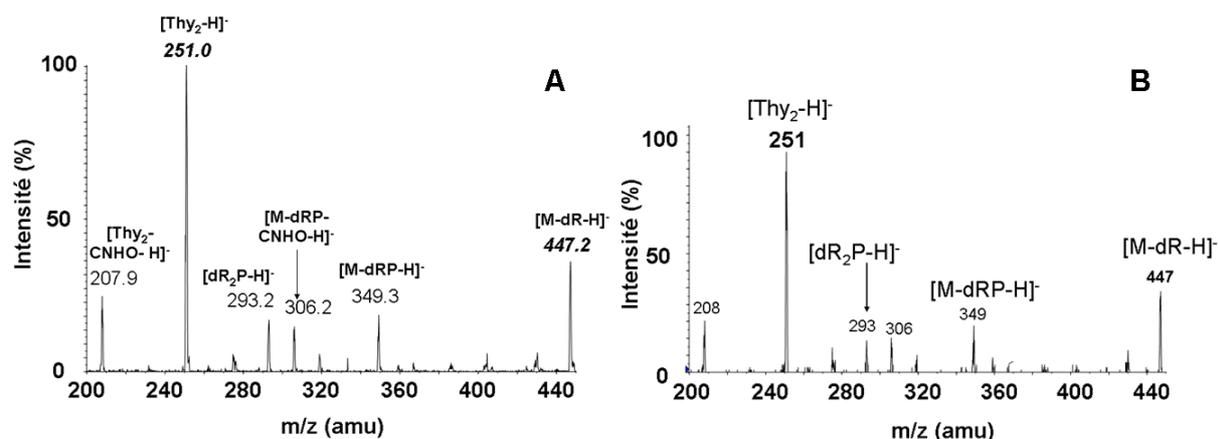


Figure 35 : Comparaison des spectres de masse MS2 du SPTpT obtenu après irradiation de TpT en présence de DPA et du SPTpT_{spore} isolé de l'ADN de spores irradiées. A. Spectre MS2 du SPTpT. B. Spectre MS2 du SPTpT_{spore} issu de l'ADN des spores (Reproduction de la figure de T. Douki *et coll.* (Douki *et al.*, 2003a)). L'ion précurseur est à $m/z = 545$ dans les deux spectres.

I.3. Détermination de la configuration absolue du C5 du SPTpT par RMN

Comme indiqué dans l'introduction, la stéréochimie exacte du Photoproduit des spores est encore inconnue, même si quelques études ont déjà été réalisées sur ce sujet. En effet, grâce à une synthèse totale, T.P. Begley *et coll.* (Kim *et al.*, 1995) ont pu obtenir deux diastéréoisomères du SP sous la forme d'un dinucléoside monophosphate (SPTpT) pour lesquels le méthyle non modifié est sur le carbone en 5' (voir Introduction page 62 – Figure 13). Une caractérisation RMN des deux diastéréoisomères *R* et *S* a été effectuée sans identification précise de la configuration absolue du carbone asymétrique des deux isomères. Cependant, le manque de comparaison de ces produits de synthèse avec le SP naturel ne permet pas de conclure quant à la stéréoconfiguration du Photoproduit des spores naturel. De plus, ces produits n'ont jamais été testés en termes de réparation avec la Spore Photoproduit

Lyase. Plus récemment, T. Carell *et coll.* (Friedel *et al.*, 2006a, Friedel *et al.*, 2006b) ont déterminé, également par RMN, la configuration de deux analogues du SP, le dinucléoside sans le pont phosphodiester (SPTT sur le Schéma 39), ainsi qu'un dinucléoside dans lequel les sucres sont reliés par une chaîne alkyle (SPT=T sur le Schéma 39). Ils montrent que seul le dinucléoside SPTT de configuration *S* est réparé par l'enzyme SPL (SPL de *B. subtilis* et SPL de *Geobacillus stearothermophilus* reconstituées) suggérant que le Photoproduit des spores naturel soit de configuration *S*.

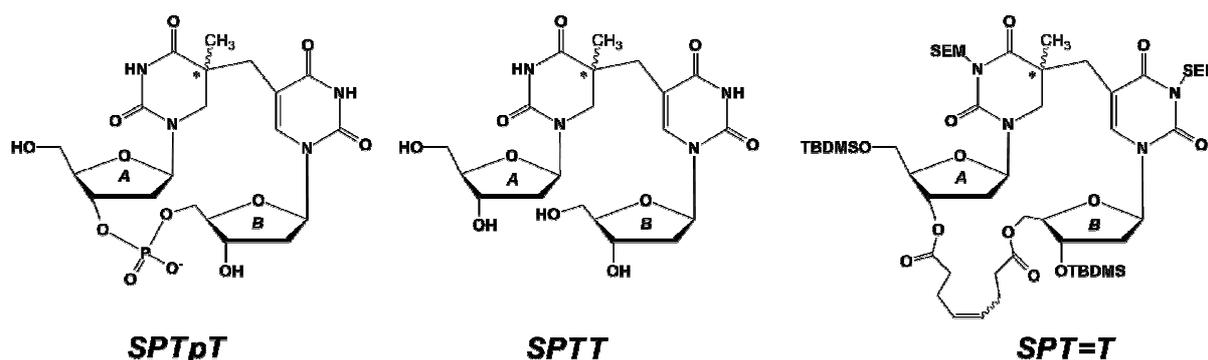


Schéma 39 : Analogues du Photoproduit des spores synthétisés et caractérisés par RMN. Le dinucléoside sans le pont phosphate est noté SPTT, le dinucléoside dont les sucres sont reliés par une chaîne alkyle est noté SPT=T. Kim *et coll.*, Friedel *et coll.* ont tous synthétisé et caractérisé à chaque fois les deux isomères *R* et *S*.

Le SPTpT synthétisé au cours de ma thèse, identique au SP trouvé dans les spores, a été obtenu en quantité suffisante pour nous permettre de débiter une étude structurale complète. Nous avons choisi une étude par RMN. Cette étude comporte deux objectifs : 1) déterminer le côté du dinucléoside monophosphate où le carbone asymétrique est présent (base côté 5' ou base côté 3'), c'est ce que nous appelons par la suite le **sens de fixation**, et 2) la **configuration absolue** du C5 asymétrique (*R* ou *S*) de cette base. En parallèle, des études théoriques ont été accomplies par Claire Mantel et Jean-Marie Mouesca (Laboratoire de Résonances Magnétiques du CEA Grenoble) afin de conforter les résultats obtenus par l'étude RMN.

Deux séries d'expériences RMN ont été effectuées à 500 MHz. Une première série a été réalisée sur le SPTpT en solution dans D₂O et une deuxième série sur le SPTpT en solution dans le DMSO deutéré. Les différentes expériences RMN réalisées sont récapitulées dans le Tableau 12 et la notation utilisée pour nommer les atomes d'hydrogène et de carbone du SPTpT est présentée Schéma 40.

	^1H	^{13}C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC	^{31}P	$^1\text{H}-^{31}\text{P}$ HSQC	COSY	TOCSY	NOESY	ROESY
D ₂ O	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
DMSO	✓	✓	✓	✓			✓	✓		✓

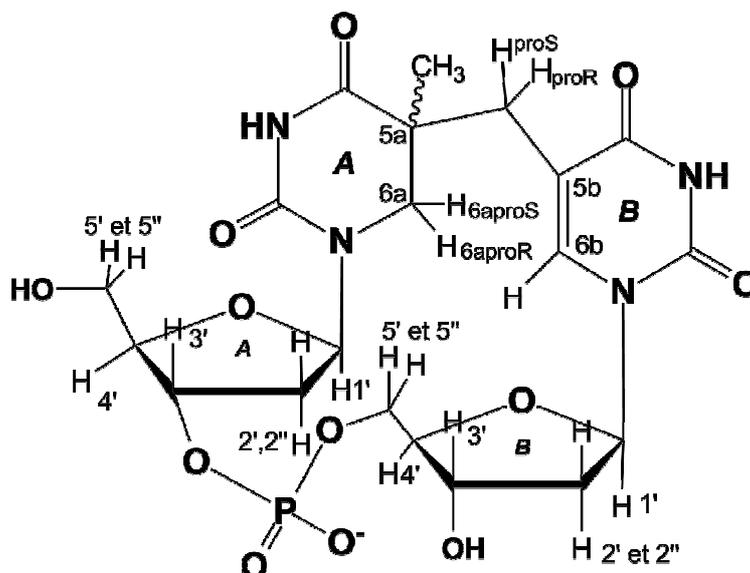
Tableau 12 : Récapitulatif des expériences RMN réalisées dans D₂O ou DMSO.

Schéma 40 : Numérotation des hydrogènes et carbones du SPTpT. La position du méthyle inchangé sur le côté 5' (base A) n'a été complètement établie qu'en cours d'analyse RMN. La numérotation est utilisée indifféremment pour le carbone et le(s) atome(s) d'hydrogène correspondant(s). A titre d'exemple, 1' est utilisé pour l'hydrogène H1' porté par le carbone C1'.

I.3.1. Etude RMN du SPTpT dilué dans D₂O

La première série d'expériences RMN a permis de réaliser l'attribution complète des déplacements chimiques des protons de la molécule dans D₂O, ainsi que ceux des atomes de carbone. Plusieurs faits sont à retenir pour cette série d'expériences.

Premièrement, les déplacements chimiques des protons sont identiques à ceux apportés par l'équipe de T.P. Begley pour leur molécule de SPTpT de synthèse supposée de configuration *S*, à l'exception des δ des protons H_{1'A}, H_{1'B} d'une part, et H_{2'A/2''A} et H_{2'B/2''B} d'autre part, qui sont inversés par rapport aux nôtres (Kim *et al.*, 1995). L'hypothèse d'une erreur de leur part est la plus probable et sera discutée plus loin, car les expériences effectuées ici, notamment HMBC, permettent d'attribuer sans ambiguïté les protons anomériques (H_{1'A}, H_{1'B}) et par conséquent les protons H_{2'A/2''A} et H_{2'B/2''B} qui sont couplés avec eux.

Deuxièmement, les protons H_{6a} (nommés proR et proS) sont isochrones dans les conditions utilisées, comme le montre le spectre 1H présenté Figure 36.

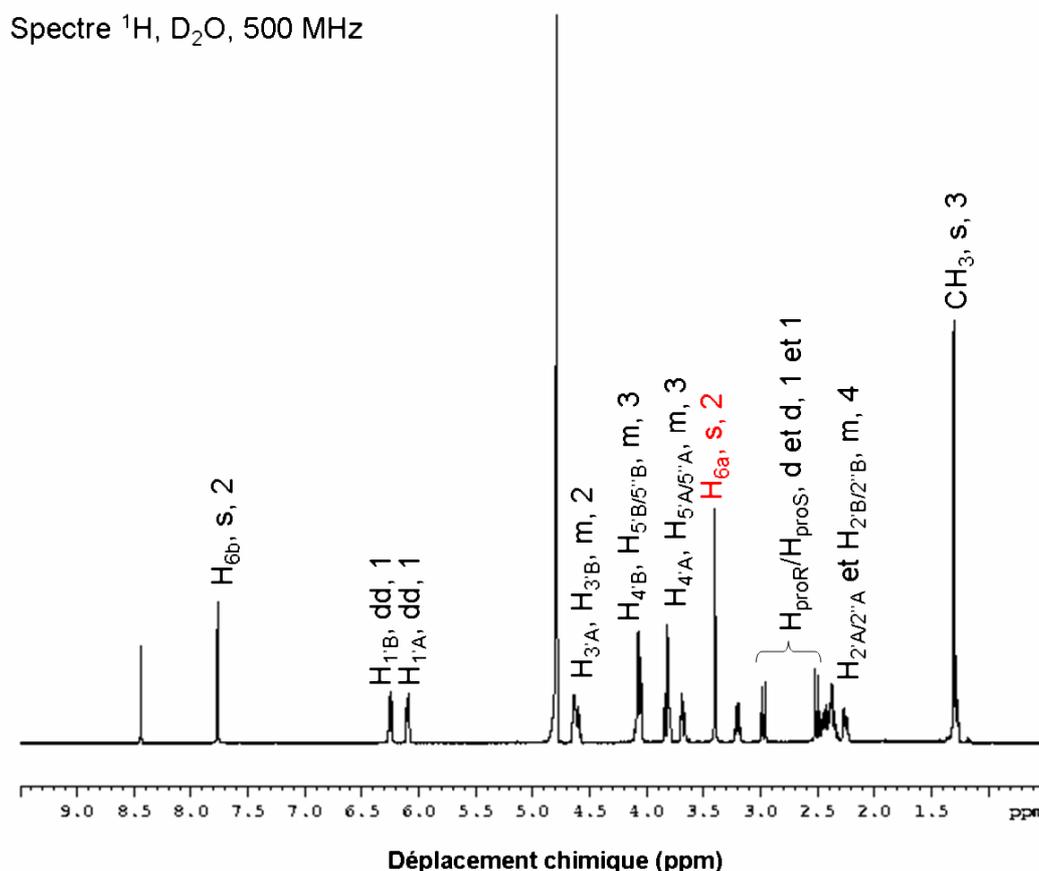


Figure 36 : Spectre 1H du SPTpT enregistré dans D_2O à 500 MHz.

D'autre part, les corrélations proton-carbone, proton-phosphate et NOESY obtenues à partir des expériences RMN à 2 dimensions dans D_2O permettent de déterminer comment les bases et les sucres sont reliés entre eux, et plus précisément de quelle thymine provient le groupe méthylène du pont reliant les deux bases. Les corrélations les plus significatives sont indiquées sur la Figure 37 et les déplacements chimiques et les corrélations observées sont résumés dans le Tableau 13.

Identification du proton ou du carbone	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Corrélation longue distance ^1H - ^{13}C ^a du carbone avec :	Corrélation NOESY ^1H - ^1H ^b
$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}} - \text{C}$	2.97 / 2.50	37	CH_3 (^3J) - H_{6a} (^3J)	$\text{CH}_3 / \text{CH}_3, \text{H}_{6b}$
CH_3	1.30	23.56	H_{proR} (^3J) - H_{6a} (^3J)	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}, \text{H}_{6a}$
$\text{H}_{6a} (\text{proS et proR}) - \text{C}_{6a}$	3.40	45.71	$\text{H}_{1'A}$ (^3J) - CH_3 (^3J)	$\text{CH}_3, \text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}$
$\text{H}_{1'A} - \text{C}_{1'A}$	6.09	82.57	-	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}$
$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A} - \text{C}_{2'A}$	2.37 / 2.38	33.79	$\text{H}_{4'A}$ (^3J)	$\text{H}_{6a}, \text{H}_{1'A}$
$\text{H}_{3'A} - \text{C}_{3'A}$	4.59	72.31	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}$ (^2J) - $\text{H}_{4'A}$ (^2J)	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}$
$\text{H}_{4'A} - \text{C}_{4'A}$	3.81	82.06	-	$\text{H}_{3'A}, \text{H}_{5'A}$
$\text{H}_{5'A} / \text{H}_{5''A} - \text{C}_{5'A}$	3.68 / 3.82	60.05	$\text{H}_{3'A}$ (^3J)	$\text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{6b} - \text{C}_{6b}$	7.76	138.86	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}$ (^3J) - $\text{H}_{1'B}$ (^3J)	$\text{H}_{\text{proR}}, \text{H}_{6a}, \text{H}_{2''B}$
$\text{H}_{1'B} - \text{C}_{1'B}$	6.25	83.28	H_{6b} (^3J) - $\text{H}_{2'B}$ ou $\text{H}_{2''B}$ (^2J)	$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B}$
$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B} - \text{C}_{2'B}$	2.25 / 2.44	37	H_{6b} (^4J)	$\text{H}_{1'B}, \text{H}_{3'B}$
$\text{H}_{3'B} - \text{C}_{3'B}$	4.63	69.11	-	$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B}$
$\text{H}_{4'B} - \text{C}_{4'B}$	4.05	83.87	-	$\text{H}_{3'B}$
$\text{H}_{5'B} / \text{H}_{5''B} - \text{C}_{5'B}$	4.08	64.13	-	-
C_{5b}	-	111.39	H_{proR} (^2J)	-
C_{5a}	-	40.27	H_{6a} (^2J) - H_{proR} (^2J) - CH_3 (^2J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{2b}$	-	151.60	$\text{H}_{1'B}$ (^3J) - H_{6b} (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{4b}$	-	164.82	H_{6b} (^3J) - $\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}$ (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{2a}$	-	154.83	$\text{H}_{1'A}$ (^3J) - H_{6a} (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{4a}$	-	177.45	H_{6a} (^3J) - H_{proR} (^3J) - CH_3 (^3J)	-

Tableau 13 : Données RMN ^1H et ^{13}C du SPTpT dans D_2O enregistrées à température ambiante. a. obtenues avec une séquence HMBC, b. obtenues avec des expériences NOESY.

Comme le montrent les pics de corrélation observés entre H_{6b} et $\text{C}_{1'B}$ (flèche bleue sur la Figure 37), ainsi qu'entre $\text{H}_{1'B}$ et $(\text{C}=\text{O})_{2b}$ (flèche rouge – Figure 37), le proton H_{6b} est relié au sucre B. D'autre part, le sucre B est relié au pont phosphodiester par le carbone $\text{C}_{5'B}$ comme le montre l'interaction entre le proton $\text{H}_{5'B/5''B}$ et l'atome de phosphore (en rose – Figure 37). Le groupement phosphate est également relié au sucre A via le carbone $\text{C}_{3'A}$ (interaction entre P et $\text{H}_{3'A}$ en rose et carte 2D de la Figure 37). Enfin, le proton anomérique $\text{H}_{1'A}$ est relié à la base portant le CH_3 (corrélations entre $\text{H}_{1'A}$ et $(\text{C}=\text{O})_{2a}$, $\text{H}_{1'A}$ et C_{6a} – flèches oranges sur la Figure 37, ainsi qu'entre CH_3 et C_{6a} – flèche verte).

Ces corrélations montrent l'enchaînement entre la base insaturée et le sucre B, entre le sucre B et le sucre A via le pont phosphodiester, et enfin entre le sucre A et la base saturée. Elles permettent de déduire sans ambiguïté que le **carbone asymétrique C_{5a} portant le méthyle est du côté du sucre A et donc à l'extrémité 5' de la molécule.**

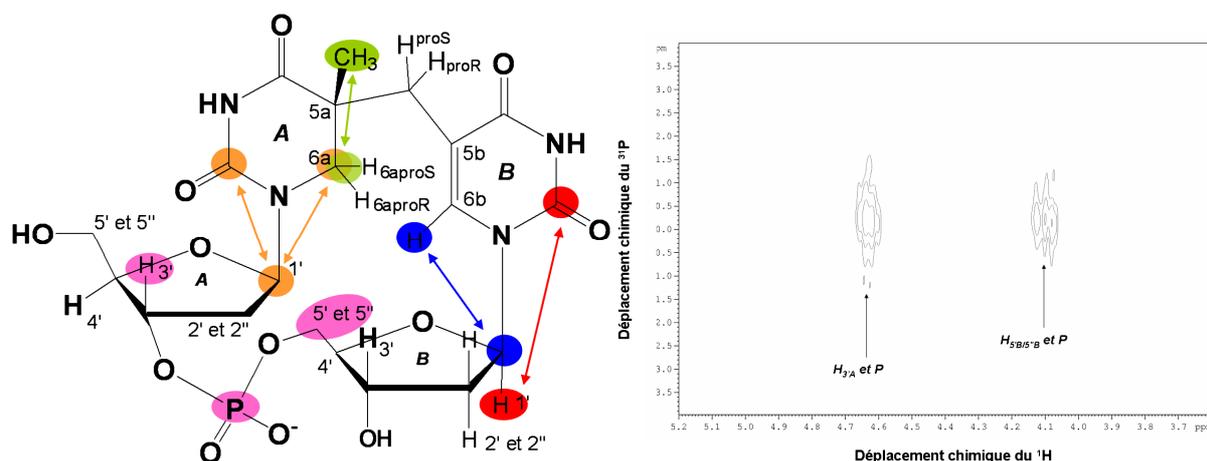


Figure 37 : Corrélations permettant de déduire le sens de fixation. A gauche : schématisation des corrélations sur la molécule grâce aux données issues de la carte 2D $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC : $\text{H}_{1'B}/(\text{C}=\text{O})_{2b}$ (flèche rouge), $\text{H}_{6b}/\text{C}_{1'B}$ (flèche bleue), $\text{H}_{1'A}/(\text{C}=\text{O})_{2a}$ (flèche orange), $\text{H}_{1'A}/\text{C}_{6a}$ (flèche orange) et $\text{C}_{6a}/\text{CH}_3$ (flèche verte). Données issues de la carte 2D $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HSQC (en rose) : corrélations $\text{H}_{3'A}/\text{P}$, et $\text{H}_{5'B/5''B}/\text{P}$. A droite : carte 2D $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HSQC.

Cependant, dans D_2O , l'isochronie des protons $\text{H}_{6\text{aproR}}$ et $\text{H}_{6\text{aproS}}$ mène à insuffisance de corrélation entre les différents protons de la molécule et donc à un manque d'informations nécessaires à la détermination de la configuration *R* ou *S*. C'est pourquoi des expériences RMN dans le DMSO ont été réalisées.

I.3.2. Etude RMN du SPTpT dilué dans le DMSO deutéré

Comme pour la première série d'analyses menées dans D_2O , l'attribution complète des déplacements chimiques des protons et des carbones du SPTpT en solution dans *d6*-DMSO a été faite (Tableau 14). Là encore, plusieurs remarques peuvent être faites. Premièrement, les déplacements chimiques obtenus ne peuvent pas être comparés à d'autres car aucune expérience RMN n'a été réalisée dans le DMSO pour SPTpT. Ce sont donc les premiers résultats obtenus dans ces conditions. Deuxièmement, les protons $\text{H}_{6\text{aproS}}$ et $\text{H}_{6\text{aproR}}$ ne sont plus isochrones, ce qui permet d'observer de nouveaux couplages pouvant conduire à la détermination de la configuration absolue du carbone asymétrique. Il faut noter que le DMSO est un solvant plus visqueux que D_2O , par conséquent dans les conditions utilisées, l'effet

NOE s'est révélé quasi nul. Par conséquent, des expériences weft-ROESY (Water Eliminated Fourier Transform) ont été réalisées.

Identification du proton ou du carbone	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Corrélation longue distance ^1H - ^{13}C ^a du carbone avec :	Corrélation ROESY ^1H - ^1H ^b
$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}} - \text{C}$	2.64 / 2.50	33.12	CH_3 (^3J) - H_{6b} (^3J)	$\text{CH}_3, \text{H}_{6b}$
CH_3	1.03	22.21	-	$\text{H}_{\text{proS}}, \text{H}_{6\text{aproR}}$ $\text{H}_{6\text{aproS}} : \text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}, \text{H}_{3'A},$
$\text{H}_{6\text{aproS}} / \text{H}_{6\text{aproR}} - \text{C}_{6a}$	3.15 / 2.98	45.28	CH_3 (^3J)	H_{6b} $\text{H}_{6\text{aproR}} : \text{H}_{3'A}, \text{CH}_3$
$\text{H}_{1'A} - \text{C}_{1'A}$	5.99	81.68	-	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}, \text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A} - \text{C}_{2'A}$	2.11	35.21	-	$\text{H}_{1'A}, \text{H}_{6\text{aproS}}, \text{H}_{3'A}, \text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{3'A} - \text{C}_{3'A}$	4.43	73.50	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}$ (^2J)	$\text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}, \text{H}_{6\text{aproS}} / \text{H}_{6\text{aproR}},$ $\text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{4'A} - \text{C}_{4'A}$	3.41	83.07	-	$\text{H}_{3'A}, \text{H}_{2'A} / \text{H}_{2''A}, (\text{OH})_A$
$\text{H}_{5'A} / \text{H}_{5''A} - \text{C}_{5'A}$	3.44	62.36	-	$(\text{OH})_A$
$\text{H}_{6b} - \text{C}_{6b}$	7.50	138.80	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}$ (^3J)	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}, \text{H}_{6\text{aproS}}$
$\text{H}_{1'B} - \text{C}_{1'B}$	5.86	84.66	H_{6b} (^3J)	$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B}, \text{H}_{4'B}$
$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B} - \text{C}_{2'B}$	2.16	40.70	-	$\text{H}_{1'B}, \text{H}_{3'B}$
$\text{H}_{3'B} - \text{C}_{3'B}$	4.27	69.92	-	$\text{H}_{2'B} / \text{H}_{2''B}, (\text{OH})_B, \text{H}_{4'B}$
$\text{H}_{4'B} - \text{C}_{4'B}$	3.76	86.06	-	$\text{H}_{3'B}, \text{H}_{1'B}, \text{H}_{5'B} / \text{H}_{5''B}$
$\text{H}_{5'B} / \text{H}_{5''B} - \text{C}_{5'B}$	3.87	64.51	-	$\text{H}_{4'B}$
C_{5b}	-	109.60	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}$ (^2J)	-
C_{5a}	-	40.47	CH_3 (^3J) - NH (^3J) - $\text{H}_{6\text{aproS}}$ (^2J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{2b}$	-	150.82	H_{6b} (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{4b}$	-	164.10	$\text{H}_{\text{proS}} / \text{H}_{\text{proR}}$ (^3J) - H_{6b} (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{2a}$	-	153.36	$\text{H}_{6\text{aproS}}$ (^3J)	-
$(\text{C}=\text{O})_{4a}$	-	174.72	$\text{H}_{6\text{aproS}} / \text{H}_{6\text{aproR}}$ (^3J) - CH_3 (^3J) - H_{proS} (^3J)	-
$(\text{OH})_A$	5.63	-	-	$\text{H}_{5'A} / \text{H}_{5''A}, \text{H}_{4'A}$
$(\text{OH})_B$	5.27	-	-	$\text{H}_{3'B}$
NH	10.07 / 7.06	-	-	-

Tableau 14 : Données RMN ^1H et ^{13}C du SPTpT dans DMSO enregistrées à température ambiante. a. obtenues avec une séquence HMBC, b. obtenues avec des expériences ROESY.

Les pics de corrélation de la carte 2D ROESY (Figure 38) montrent que les protons peuvent être répartis en deux groupes grâce à des corrélations ROESY spécifiques. Un premier groupe est défini par les protons H_{6aproR} , CH_3 et H_{proS} , situés à l'avant d'un plan formé par les atomes de carbone de la thymine A (Figure 38). Le deuxième est défini par les protons H_{6aproS} , H_{6b} et H_{proR} , situés à l'arrière de ce plan. Les données montrent sans ambiguïté que le carbone asymétrique C_{5a} est à l'avant et donc de configuration *R*.

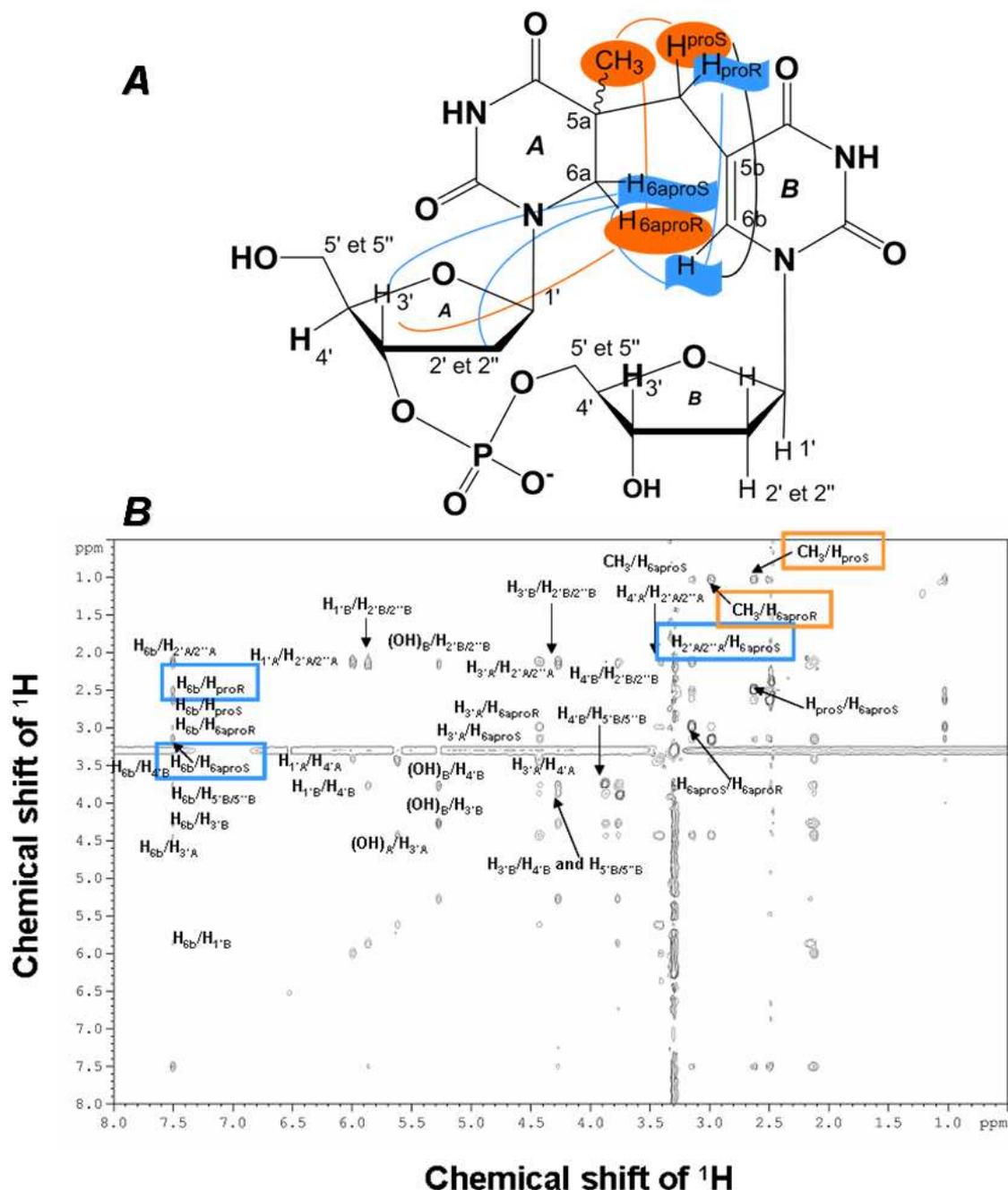


Figure 38 : Expériences ROESY. A : Récapitulatif des corrélations ROESY mettant en évidence les deux groupes de protons en avant du plan (orange) formé par la thymine A ou en arrière (bleu). B : Weft-ROESY ($t_m = 300$ ms) du SPTpT dans *d6*-DMSO. Les couplages significatifs pour la détermination de la configuration absolue du C5 sont encadrés de la même couleur que le groupe de protons correspondant.

Une dernière information tirée des spectres RMN concerne la conformation des sucres en solution. Deux groupes ont décrit la possibilité d'identifier le type de conformère du 2'-désoxyribose grâce aux valeurs des constantes de couplage des protons (Altona *et al.*, 1973, Cheng *et al.*, 1977). En particulier, l'équipe de M. Sundaralingam a montré qu'une valeur de $(J_{1'2'}+J_{1''2''})$ située entre 7,1 et 16,1 Hz est caractéristique d'une conformation C2'-endo (conformation sud). Les valeurs expérimentales de cette somme pour le SPTpT sont de 11,7 Hz pour le sucre **A** et 15,1 Hz pour le sucre **B**, indiquant que les sucres ont la conformation C2'-endo, la plus fréquemment rencontrée dans l'ADN en solution de conformation B (voir Introduction page 34).

I.3.3. Calculs théoriques

De façon à confirmer la configuration absolue *R*, des modèles théoriques des deux isomères (*R* et *S*) ont été obtenus par mécanique moléculaire et calculs DFT (Théorie de la Fonctionnelle de la Densité). Plus précisément, deux modèles de configuration *R* et *S* du SPTpT pour lesquels le carbone asymétrique est côté 5', ont été construits. Pour chaque isomère, deux structures de plus basse énergie ont été obtenues par mécanique moléculaire. Ces quatre structures ont ensuite été optimisées par DFT, et la structure la plus stable énergétiquement pour chacun des isomères a été retenue. Il est intéressant de noter que les deux structures retenues pour *R* et *S* ont la même énergie. La Figure 39 présente les deux molécules de plus basse énergie modélisées.

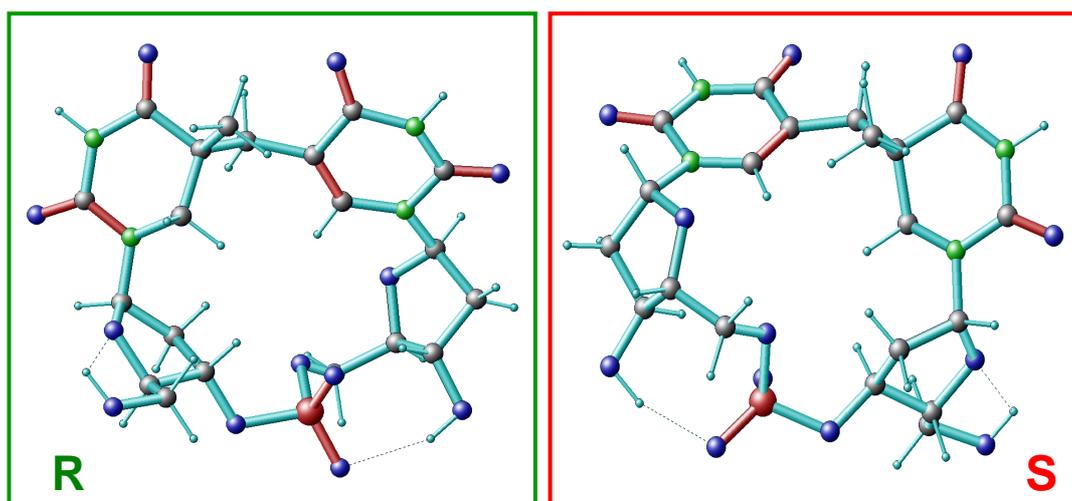


Figure 39 : Structures les plus stables des isomères *R* et *S* de SPTpT obtenues par mécanique moléculaire puis optimisation DFT.

Ces structures ont permis d'obtenir des distances inter-protons théoriques. Les données expérimentales NOESY et ROESY permettent de calculer les distances expérimentales inter-protons. Cependant, la comparaison de ces trois jeux de données (expérimentales, théoriques pour *R* et théoriques pour *S*) n'a pas permis de conclure de façon nette quant à la configuration du SPTpT. En effet, un mauvais accord a été obtenu aussi bien pour l'isomère *S* que pour le *R*, principalement dû à la difficulté de calculer les distances expérimentales à partir des données NOE (à cause entre autres de la complexité du système de spin). Par conséquent une approche qualitative a été effectuée. Lorsque la distance inter-protons calculée est inférieure à 2,5 Å, on considère qu'il s'agit d'une forte corrélation (notée **F**), lorsque cette distance est supérieure à 3,5 Å, il s'agit d'une faible corrélation (notée *f*). Entre ces deux valeurs, la corrélation est moyenne (notée F). Ces intensités de corrélations sont alors comparées aux intensités des taches de corrélation ROESY (forte corrélation ROESY notée **R**, moyenne notée R et faible notée *r*). Le tableau de vérité (Tableau 15) résume cette étude qualitative. Les cellules colorées indiquent un bon accord entre théorie (les deux colonnes de gauche) et expérience (colonne de droite). Résultat important, le meilleur accord a été obtenu pour le diastéréoisomère *R*.

Distances inter-protons	Intensités de corrélation théoriques pour l'isomère	Intensités de corrélation théoriques pour l'isomère	Intensité de corrélation ROESY
	R	S	
H _{6b} - H _{proS}	<i>f</i>	<i>f</i>	R
H _{6b} - H _{proR}	F	<i>f</i>	R
H _{6b} - H _{5a}	<i>f</i>	F	-
H _{6b} - H _{6aproS} / H _{6aproR}	F / <i>f</i>	F / <i>f</i>	R / -
H _{proR} - H _{5a}	<i>f</i>	F	<i>r</i>
H _{proR} - H _{6aproS} / H _{6aproR}	F / <i>f</i>	<i>f</i> / <i>f</i>	- / -
H _{proS} - H _{5a}	F	<i>f</i>	R
H _{6aproS} / H _{6aproR} - H _{5a}	F / F	F / <i>f</i>	<i>r</i> / R
H _{6aproS} / H _{6aproR} - H _{1'A}	<i>f</i> / <i>f</i>	<i>f</i> / <i>f</i>	- / -
H _{6aproS} - H _{2'A/2''A} / H _{2'A/2''A}	F / <i>f</i>	F / <i>f</i>	R / -
H _{6aproS} / H _{6aproR} - H _{3'A}	F / F	F / F	R / R

Tableau 15 : Tableau de vérité permettant de comparer les intensités de corrélation ROESY expérimentales aux intensités de corrélation théoriques pour les isomères *R* et *S*. Les cellules colorées indiquent un bon accord entre théorie et expérience.

Des calculs de déplacements chimiques théoriques (proton et carbone) ont été effectués pour les deux diastéréoisomères *R* et *S* de façon à avoir une analyse plus quantitative. Ces valeurs ont été comparées avec celles obtenues expérimentalement.

Le Tableau 16 présente les déplacements chimiques théoriques et expérimentaux de quelques protons et carbones essentiels pour la détermination de la configuration électronique.

On note que l'accord expérience – théorie est ainsi très mauvais pour 3 des 5 ^{13}C de l'isomère *S* ($\text{CH}_2 - \text{CH}_3$ et C_{6b}). En revanche, cet accord est très bon pour 4 sur 5 des ^{13}C testés dans le cas du *R*. Le désaccord pour deux des ^1H de l'isomère *S* est également assez prononcé, alors que pour l'isomère *R*, les déplacements chimiques théoriques sont tous en accord avec les valeurs expérimentales.

Proton ou carbone	$\delta \text{ } ^1\text{H}$				$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$			
	Expérimental		Théorique		Expérimental		Théorique	
	D ₂ O	DMSO	<i>R</i>	<i>S</i>	D ₂ O	DMSO	<i>R</i>	<i>S</i>
HproS/HproR	2,97/2,50	2,64/2,50	2,3/3,2	<i>1,3/1,7</i>	37	33,12	34,7	<i>84,2</i>
CH ₃	1,30	1,03	1,40	<i>3,3</i>	23,56	22,21	20,5	<i>33,1</i>
H _{6aproR} /H _{6aproS} – C _{6a}	3,40	3,15/2,98	3,2/3,7	<i>3,4/4,2</i>	45,71	45,28	46,9	<i>49,1</i>
H _{6b} – C _{6b}	7,76	7,50	8,2	8,2	138,86	138,80	141,2	<i>110,4</i>
C _{5a}	–	–	–	–	40,27	40,47	46,5	44,5

Tableau 16 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C expérimentaux dans D₂O et DMSO et théoriques pour les diastéréoisomères *R* ou *S* du SPTpT. Les nombres en gras sont ceux pour lesquels un bon accord avec les valeurs expérimentales est observé, ceux en italique un mauvais accord.

Les graphes suivants (Figure 40) représentent les déplacements chimiques théoriques en fonction des valeurs expérimentales (dans le DMSO) pour les protons et les carbones du SPTpT. Ils permettent une visualisation plus nette de l'accord théorie/expérience existant pour l'isomère *R* (en vert).

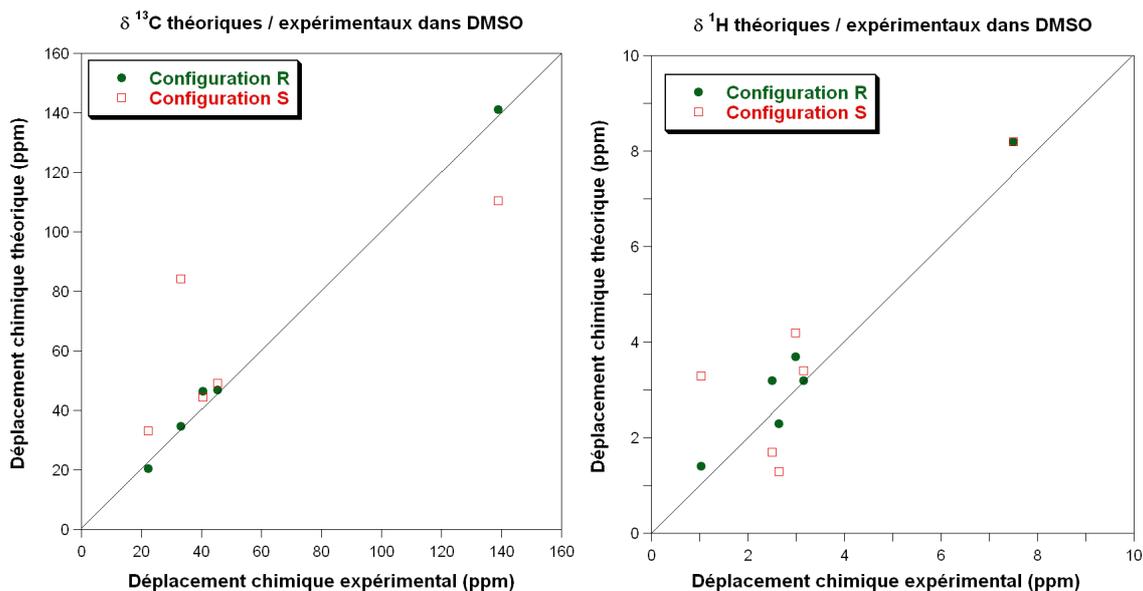


Figure 40 : Déplacements chimiques théoriques pour le ¹³C à gauche et ¹H à droite en fonction du déplacement chimique expérimental du SPTpT dissout dans le DMSO.

Grâce à ces calculs, on voit nettement que le meilleur accord est obtenu pour les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques de la **configuration R**, quel que soit le type d'atome (proton ou carbone) et le solvant (D₂O ou DMSO), confirmant ainsi les conclusions obtenues par RMN.

II. Obtention du 11mer contenant le Photoproduit des spores, simple et double brin

De façon à posséder un substrat représentant mieux un brin d'ADN, le choix a été fait de synthétiser un oligonucléotide de 11 bases, portant un SP en un site précis. En effet, à l'état double brin, 11 est le nombre de nucléotides minimum nécessaires pour réaliser un tour d'hélice (en conformation A, il suffit de 10 bases en conformation B), et un oligonucléotide de cette longueur est relativement facilement obtenu par synthèse automatisée sur support solide. Deux stratégies étaient possibles pour obtenir le SP dans un oligonucléotide. Une première stratégie consiste en l'incorporation d'un synthon SPTpT dans le synthétiseur, de manière à synthétiser *in situ* un oligonucléotide comportant la lésion SP. Cette méthode n'a pas été choisie car d'une part trop peu de SPTpT a été obtenu par la méthode présentée précédemment, et d'autre part il aurait fallu préparer le synthon phosphoramidite correspondant spécifiquement protégé, et modifier la procédure de synthèse sur support solide. Cette stratégie a tout récemment été choisie par l'équipe de T. Carell pour la synthèse

d'oligonucléotides 13mer et 14mer (Bürckstümmer *et al.*, 2008) contenant le SPTT 5R ou 5S (sans le pont phosphodiester entre les deux thymines). La deuxième méthode, qui est celle que nous avons retenue, consiste à synthétiser un oligonucléotide 11mer non modifié comportant deux thymines adjacentes, puis à l'irradier à sec en présence de DPA afin de provoquer la formation du SP. Il est à noter que cette dernière méthode a été utilisée par T. Carell pour synthétiser le SP incorporé dans un oligonucléotide 6mer.

II.1. Synthèse de l'oligonucléotide 11mer GCGAATTCACG et de son complémentaire

Les oligonucléotides 11mer et 11mer_{comp} ont été produits par synthèse automatisée sur support solide à l'échelle de la micromole puis purifiés par HPLC. Les rendements de couplage (déterminés par conductimétrie de l'ion DMTr⁺ libéré comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes IV.2.3) ont été supérieurs à 97 % par étape. La Figure 41 présente le chromatogramme HPLC ainsi que le spectre MALDI-TOF du 11mer purifié permettant de vérifier la pureté et l'intégrité de l'oligonucléotide synthétisé. Un seul pic est obtenu en HPLC. Sur le spectre de masse MALDI-TOF, on observe un pic de masse 3341,456 amu qui correspond à la masse de l'ion pseudo-moléculaire (m/z – la masse calculée étant 3341,2 amu). Le pic de masse 1669,480 correspond à l'oligonucléotide dichargé ($m/2z$). Des données équivalentes ont été obtenues pour le 11mer_{comp}. Après purification, 652 nmol de 11mer ont été obtenus et 448 nmol de 11mer_{comp}.

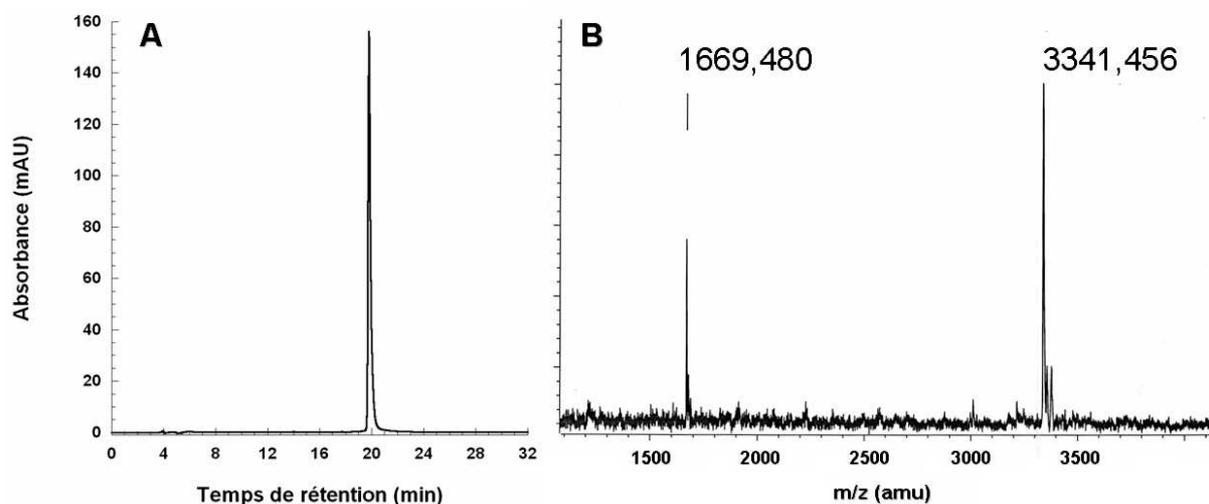


Figure 41 : Analyses de la pureté et de l'intégrité de l'oligonucléotide 11mer. **A.** Chromatogramme HPLC du 11mer purifié. **B.** Spectre de masse MALDI-TOF

II.2. Irradiation UV-C – Incorporation du SP dans l'oligonucléotide

L'oligonucléotide 11mer a été mis en solution avec 10 équivalents de DPA puis lyophilisé dans une petite boîte de pétri (Matériels et Méthodes IV.2.3.b). Une accumulation de 8 cycles de lyophilisation/irradiation/solubilisation a été nécessaire pour avoir un bon compromis entre dégradation de l'oligonucléotide et production suffisante du SP (l'oligonucléotide 11mer semble instable lors des expositions aux UV et se dégrade rapidement). Deux séries d'irradiations ont été réalisées sur deux lots différents. Une fois ces irradiations effectuées et la solution dessalée, les bruts d'irradiation ont été rassemblés et purifiés par HPLC. Le pic majoritaire a été identifié par analyse HPLC-MS/MS d'une fraction aliquote hydrolysée enzymatiquement. Le Photoproduit des spores au sein de l'oligonucléotide comme lésion majoritaire y est largement observé, comme le montre la Figure 42.

La mesure de l'absorbance à 260 nm de l'oligonucléotide purifié (1,65 unités d'absorbance) a permis de calculer la concentration en oligonucléotide grâce à une valeur du coefficient d'absorption molaire de $120\,481\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, estimée par le logiciel OligoCalc développé par Kibbe *et coll.* (Kibbe, 2007). Nous avons donc obtenu **13,80 nmol** d'oligonucléotide 11mer contenant le SP (pour 355 nmol de 11mer irradié). Le produit obtenu est pur à 80% selon une analyse HPLC-MS/MS. Il y a 19% de photoproduit (6-4)PP TC, et 1% de photoproduit (6-4)PP TT comme le montre la Figure 42. Il faut noter que ces derniers produits, lorsqu'ils sont inclus dans l'oligonucléotide, ont le même temps de rétention HPLC que le SP et n'ont pas pu être éliminés lors des purifications HPLC. Le rendement de la préparation du 11merSP à partir d'irradiation de 11mer est donc de **3,1%** en tenant compte de cette pureté.

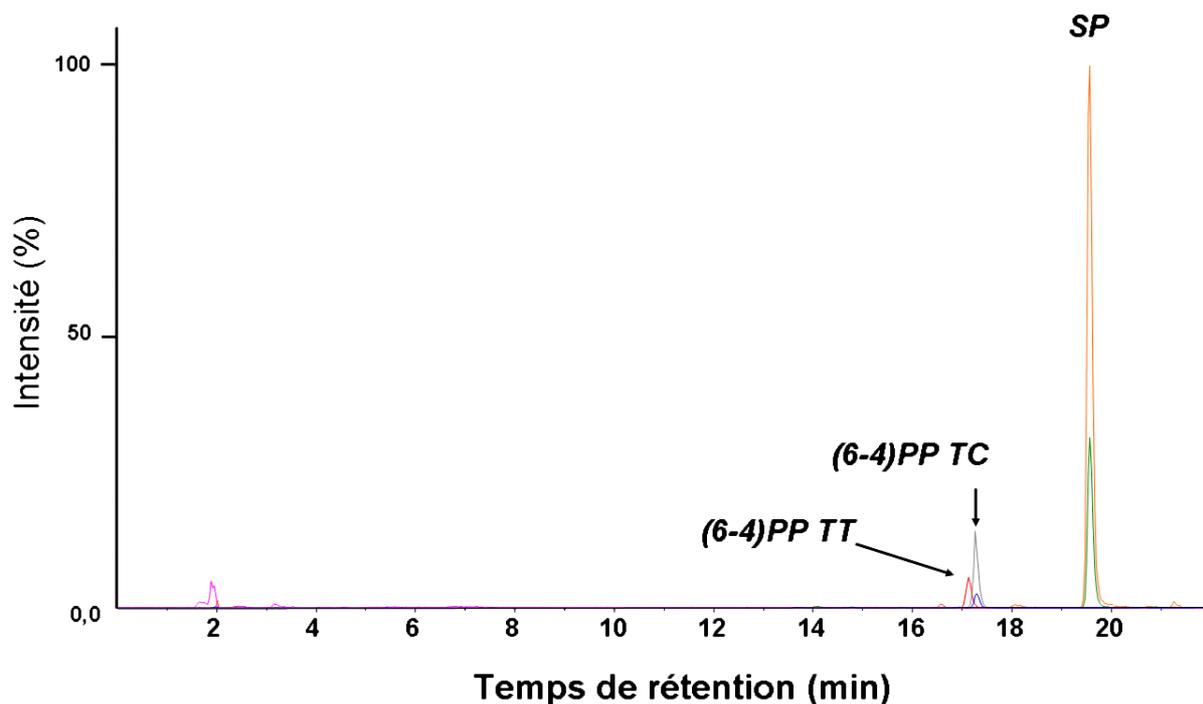


Figure 42 : Chromatogramme HPLC-MS/MS en mode MRM négatif de 138 pmol de 11merSP purifié et digéré enzymatiquement.

II.3. Séquençage de l'oligonucléotide 11merSP

L'oligonucléotide contenant la lésion a été séquencé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Pour cela, l'oligonucléotide a été digéré parallèlement par deux exonucléases, les phosphodiesterases I et II. A différents temps d'incubation assez courts (de façon à suivre la digestion nucléotide par nucléotide), des spectres MALDI-TOF sont enregistrés.

La phosphodiesterase II, qui est une 3'-exonucléase, digère l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' et libère des nucléotides 3'-phosphate. Dans ces conditions, comme le montre la Figure 43, dès deux minutes de digestion avec cette enzyme, on voit que le premier nucléotide G a été coupé (Perte de 329 unités de masse). Au cours du temps, on observe le raccourcissement de l'oligonucléotide par l'extrémité 5' jusqu'à la lésion où l'enzyme est bloquée. Il est alors possible de reconstituer la séquence à partir de l'extrémité 5' vers 3' jusqu'à la lésion. Celle-ci est 5'-GCGAAT^T, comme attendu.

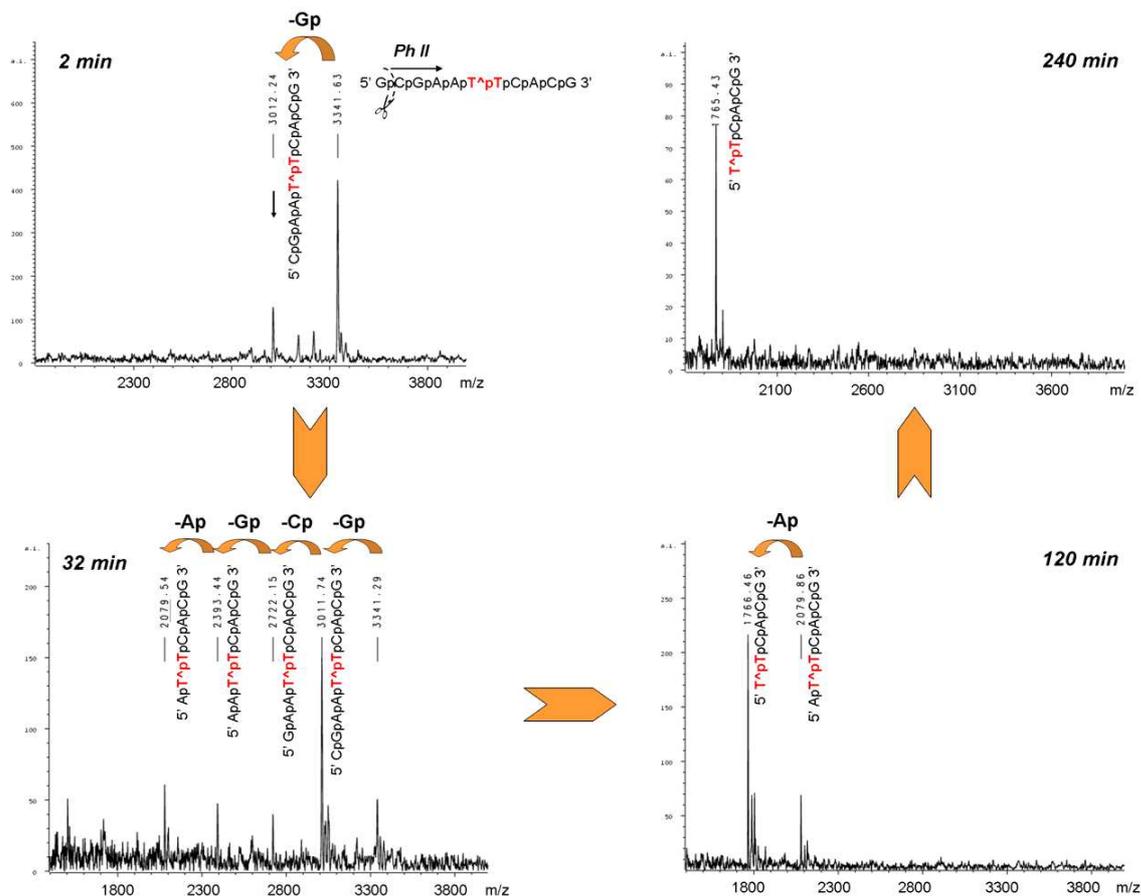


Figure 43 : Digestion enzymatique de l'oligonucléotide 11merSP par la phosphodiesterase II.

L'expérience a été répétée avec la phosphodiesterase I, qui est une 5'-exonucléase hydrolysant l'ADN de 3' vers 5'. Les résultats sont présentés Figure 44. Dès 4 minutes, on observe la coupure de G, C A et C, mais l'oligonucléotide complet est encore prépondérant ($m/z = 3341$). Par la suite, à la faveur de l'intensité des pics, on voit le « déplacement » de l'oligonucléotide majoritaire (au sens de la « concentration ») en solution vers les masses plus faibles, jusqu'à ce que l'enzyme soit bloquée par la lésion. De la même façon, la séquence de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide a été reconstituée. Il s'agit de T[^]TCACG-3', comme attendu. Le pic de masse ($m/z = 2408$) observé après 60 minutes de digestion peut être dû à la lésion (6-4)PP TC qui a également bloqué la 5'-exonucléase.

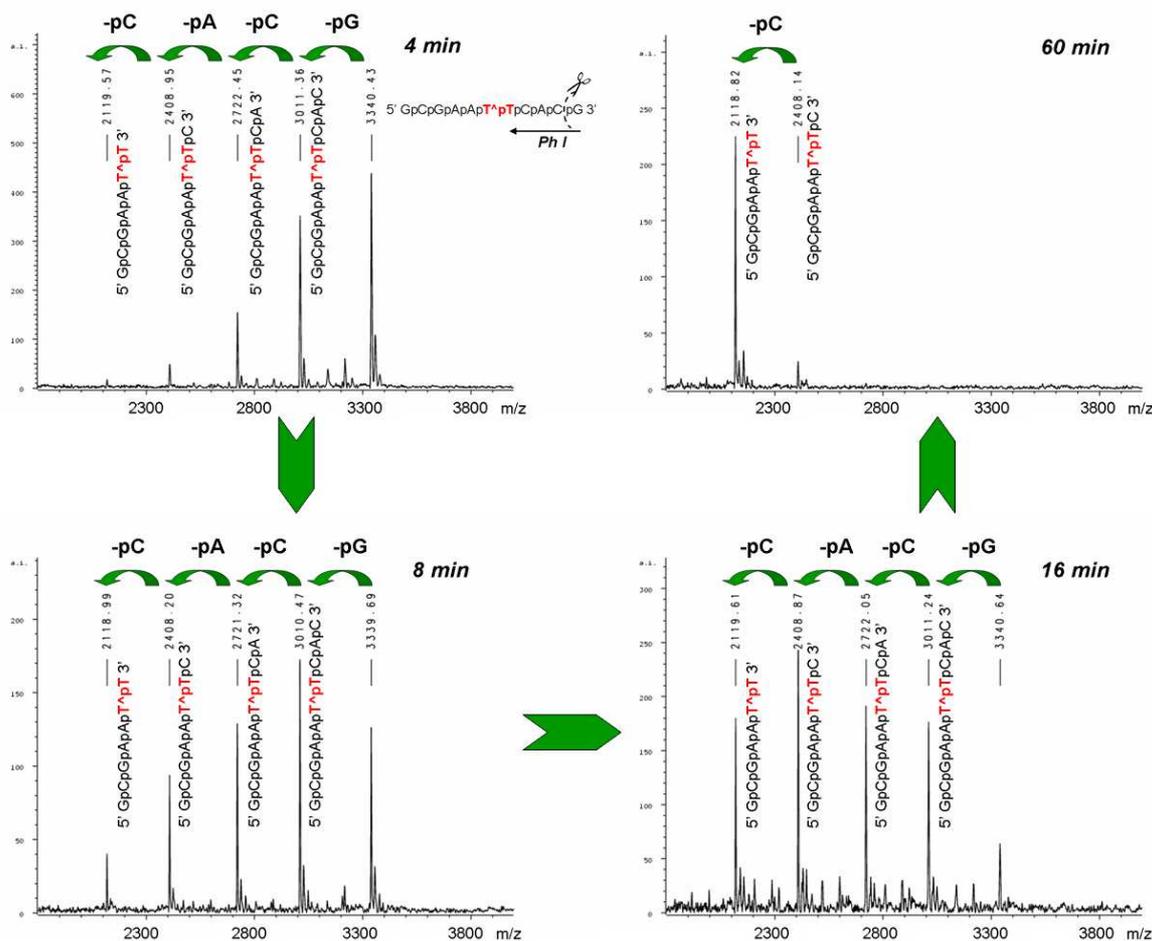


Figure 44 : Digestion enzymatique de l'oligonucléotide 11merSP par la phosphodiesterase I.

Ces expériences MALDI montrent que la lésion SP est présente, que celle-ci bloque la progression d'exonucléases, et permettent de vérifier la séquence de l'oligonucléotide qui est bien 5'-GCGAAT^{*}TCACG-3'.

II.4. Hybridation du 11merSP avec le 11mer_{comp}

L'oligonucléotide 11merSP pur à 80 % a été mis en solution dans un tampon Tris-HCl 10 mM, KCl 100 mM, pH 7,5 avec 2 équivalents de 11mer_{comp} puis porté à 70°C. Le refroidissement à température ambiante permet l'hybridation et la formation du duplex.

Ce mélange a été utilisé directement pour étudier la réparation du double brin avec la SPL purifiée et reconstituée. Cette étude est présentée dans la partie III.

Chapitre 2 : Discussion

Dans cette partie ont été décrites, par une méthode photochimique résumée dans le Schéma 41, la synthèse du Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate, ainsi que celle d'un oligonucléotide 11mer contenant la lésion.

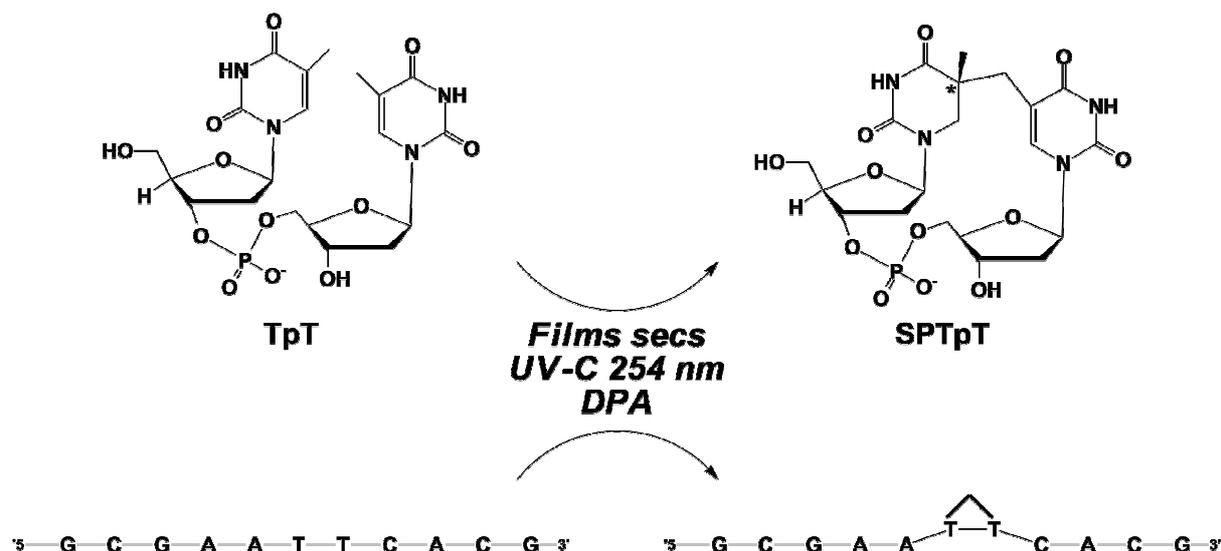


Schéma 41 : Synthèse photochimique du Photoproduit des spores. Conditions : Plusieurs irradiations UV-C sous forme de films secs, en présence de DPA, que ce soit pour l'irradiation de TpT ou de l'oligonucléotide.

Le choix de synthétiser un substrat potentiel de l'enzyme sous la forme d'un dinucléotide (SPTpT) a été motivé par plusieurs raisons. La principale concerne la quantité de produit que nous souhaitons obtenir. En effet, l'irradiation UV d'ADN plasmidique ou l'irradiation de spores directement conduit à de trop faibles quantités de SP pour effectuer une étude structurale ainsi qu'une étude enzymatique de réparation. De plus, l'ADN plasmidique marqué au tritium et irradié possède le SP en faible quantité et en mélange avec d'autres photoproduits constituant ainsi un substrat de l'enzyme SPL assez mal défini. En outre, l'analyse de ces substrats contenant le SP est fastidieuse (hydrolyse acide, suivie d'une analyse HPLC et comptage de la radioactivité par scintillation liquide), et seul le suivi de la disparition du SP peut être étudié (Buis *et al.*, 2006, Cheek *et al.*, 2002, Rebeil *et al.*, 2001, Rebeil *et al.*, 1998, Slieman *et al.*, 2000b, Sun *et al.*, 1994). L'objectif de notre étude était donc d'avoir en assez grande quantité un substrat pur, et relativement facilement caractérisable de façon à réaliser une étude structurale puis enzymatique (Partie III). Pour cela le SPTpT, Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate, nous a semblé remplir ces conditions. Cependant, sa synthèse devait être relativement simple et

efficace de façon à obtenir rapidement la molécule pour entreprendre les études structurales et de réparation enzymatique, c'est pourquoi la synthèse chimique totale n'a pas été envisagée. Une première méthode effectuée par T. Douki consistait en l'irradiation d'ADN de thymus de veau à l'état sec, suivi d'une hydrolyse enzymatique de façon à libérer le Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate (SPTpT_{ADN}). Là encore, cette méthode ne permet de produire le SPTpT qu'en très faible quantité (quelques dizaines de microgrammes). Nous avons donc choisi d'irradier la dithymidine TpT sous forme de films secs et en présence de DPA, ces conditions favorisant la production du SP au détriment des autres photoproduits comme indiqué dans l'introduction. Pour cela, plusieurs irradiations ont été nécessaires afin d'accumuler les quantités de SPTpT produites. Entre chaque irradiation, les films ont dû être remis en solution et de nouveau lyophilisés afin d'homogénéiser les surfaces irradiées. Ces opérations étant extrêmement longues (26 heures), nous avons arrêté les irradiations après 6 cycles, ce qui nous a permis d'obtenir un bon compromis entre le temps de préparation et la quantité de SPTpT formée. Nous avons donc obtenu le SPTpT en quantité suffisante pour effectuer des études RMN et les études enzymatiques présentées dans la partie suivante. La caractérisation préliminaire du SPTpT (analyse HPLC, spectrométrie de masse MS1 et MS2) a permis de montrer que le dinucléotide synthétisé ici est absolument identique à la fois au SPTpT_{ADN} et surtout au SPTpT_{spore}, indiquant que nous avons synthétisé une lésion représentant exactement le Photoproduit des spores naturel, dans une séquence minimale, ce qui est très encourageant pour les études enzymatiques.

Un autre avantage quant à la possession du SPTpT est son analyse directe. En effet, les analyses HPLC suivies d'un comptage par scintillation liquide de la quantité de lésions marquées au tritium contenues dans l'ADN permettent de voir seulement la disparition de la lésion SP, puisque les thymines réparées ne peuvent se distinguer des thymines intactes présentes dans l'ADN. Dans notre cas, il est possible de suivre directement, sans hydrolyse préalable, la conversion du SPTpT en TpT, dans le cas d'une réparation. Ceci est développé dans la Partie III.

Enfin, le résultat le plus important de cette partie a été obtenu par des études RMN, grâce auxquelles nous avons pu obtenir des données structurales sur le SPTpT. Nous avons montré que **le méthyle est positionné sur la base en 5'**, ce qui nous donne des indications sur la formation du Photoproduit des spores. Ceci prouve que c'est donc le méthyle de la thymine située en 3' qui est à l'origine du pont méthylène entre les deux bases, produisant le Photoproduit des spores. De plus, la configuration absolue du carbone asymétrique créé lors de cette formation a été déterminée sans ambiguïté pour la première fois sur une molécule

absolument identique au Photoproduit des spores naturel. Ce carbone est de configuration **R**, comme suggéré par la conformation de l'ADN et les considérations stériques présentées en introduction. Ces informations semblent pourtant contradictoires avec plusieurs données : d'une part, avec les attributions *R* ou *S* de T.P. Begley pour les molécules qu'il a synthétisées (Kim *et al.*, 1995), et d'autre part, avec les récentes données du groupe de T. Carell, rapportant la réparation spécifique d'un analogue du substrat de configuration *S*.

- Premièrement, T.P. Begley *et coll.* ont décrit une synthèse du Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate. Les deux diastéréoisomères (*R* et *S*), portant le carbone asymétrique sur la base en 5', ont été synthétisés et caractérisés par RMN dans D₂O dans des conditions comparables à celles présentées dans cette étude. Comme attendu, un des deux diastéréoisomères présente des déplacements chimiques quasiment identiques au SPTpT que nous avons synthétisé. Selon T.P. Begley, ce composé serait le *S*, alors que nous avons clairement établi que la configuration du C_{5a} du SPTpT est *R*. Sans prendre en compte la détermination du carbone asymétrique, les attributions RMN ¹H de T.P. Begley sont identiques à celles présentées ici à l'exception des protons H_{1'A}/H_{1'B} et H_{2'A/2''A}/H_{2'B/2''B}. Les données que nous apportons ici (notamment RMN 2D ¹H-¹³C HMBC) nous ont permis d'attribuer sans ambiguïté les protons anomériques (H_{1'}) et par conséquent les protons H_{2'A/2''A} et H_{2'B/2''B} qui sont couplés avec eux. L'origine du désaccord à propos de la configuration du carbone asymétrique de ce composé n'est pas claire, mais l'étude RMN détaillée et les études théoriques exposées ici suggèrent fortement une erreur d'attribution de la configuration absolue dans l'étude de T.P. Begley.

- Deuxièmement, T. Carell *et coll.* ont décrit la synthèse du Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside (sans que les sucres ne soient reliés par un pont phosphodiester). Là encore, les deux isomères *5R* et *5S* ont été synthétisés et caractérisés par une étude RMN complète. Nous ne pouvons pas comparer précisément nos résultats en termes de structure avec ceux de T. Carell, car il ne s'agit pas de la même molécule. Le désaccord réside ici dans le fait que seul l'isomère *S* est réparé par l'enzyme, suggérant que l'isomère naturel est le *S* et non le *R*. Néanmoins, la flexibilité de ce substrat ne permet pas de conclure définitivement quant à la stéréochimie du Photoproduit des spores naturel.

Une dernière information présentée ici concerne le plissage des sucres. D'après les constantes de couplage RMN, les sucres du SPTpT ont la conformation **C2'-endo**, ce qui est la conformation la plus répandue pour l'ADN en solution. En revanche, l'ADN des spores serait de conformation *A*, à cause entre autres de la faible hydratation de l'ADN. Or dans cette conformation, le plissage des sucres est **C2'-exo**. On peut penser que cette conformation est

présente lors de la préparation du SPTpT à l'état sec, et qu'elle est passée à C2'-endo en solution. Il est donc intéressant de noter que la distorsion provoquée par la lésion entre les deux thymines ne bloque pas la conformation des sucres. Ceux-ci sont donc toujours libres d'adopter en solution la conformation C2'-endo même si à l'origine elle était théoriquement C2'-exo à l'état sec.

Il reste à déterminer si le SPTpT que nous avons synthétisé, qui est de configuration **R** et identique au SP naturel, est bien substrat de l'enzyme, c'est-à-dire s'il est réparé par la SPL. Cette étude est détaillée dans la partie III.

Partie III

Quel mécanisme pour la
SPL ?

Nous disposons désormais à la fois de la protéine SPL et de substrats potentiels de l'enzyme tous deux bien caractérisés, ce qui nous a permis d'effectuer des études enzymatiques. Deux objectifs majeurs ont été définis pour ces études. Le premier consiste en l'étude de la sélectivité de substrats de la SPL. Pour cela deux substrats ont été synthétisés (Partie II), le SPTpT et un oligonucléotide contenant le Photoproduit des spores. Le deuxième objectif est d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme réactionnel de la Spore Photoproduit Lyase, et notamment de mettre en évidence les différents intermédiaires réactionnels.

Le mécanisme proposé par T.P. Begley (Mehl *et al.*, 1999) et vérifié en partie par J.B. Broderick (Buis *et al.*, 2006, Cheek *et al.*, 2002) présenté en introduction nous a servi de point de départ pour tester les deux activités (corrélées) de l'enzyme, à savoir l'activité de réparation du Photoproduit des spores, et l'activité de réductolyse de la SAM.

Les observations *in vivo* de W.L. Nicholson sur le caractère essentiel de la quatrième cystéine ont orienté notre travail en particulier vers l'étude du rôle de ce résidu dans le mécanisme enzymatique. Pour cela, nous avons entrepris des études enzymatiques *in vitro* sur la protéine sauvage et la protéine mutée avec le substrat SPTpT, et l'oligonucléotide.

Chapitre 1 : Résultats

I. Activité et spécificité de la SPL sauvage de *Bacillus subtilis*

La première expérience réalisée avait pour but de savoir i) si la SPL purifiée et reconstituée est active et ii) si elle est bien spécifique de la réparation du SP au détriment des autres photoproduits. Pour cela, la SPL sauvage de *B. subtilis* a été incubée avec de l'ADN de thymus de veau contenant toutes les lésions des bases pyrimidiques à savoir : les CPD, les (6-4)PP, et le Photoproduit des spores (SP). La quantité de photoproduits après un temps d'incubation de 0 minute et 30 minutes d'incubation a été mesurée après hydrolyse enzymatique et analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse. La Figure 45 montre la quantité de photoproduits restant après 30 minutes. Aucune disparition significative des dimères CPD et (6-4)PP n'est observée (moyenne sur deux expériences). En revanche, quasiment la totalité des lésions SP disparaît après 30 minutes d'incubation. Ceci indique que notre préparation de SPL dont le centre fer-soufre a été reconstitué de façon chimique est active et confirme que l'enzyme est bien spécifique de ce photoproduit, comme cela a déjà été montré (Slieman *et al.*, 2000b).

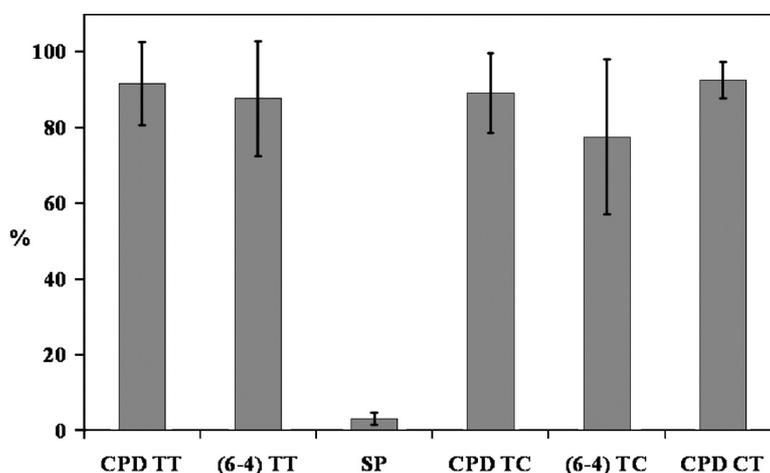


Figure 45 : Spécificité de l'activité de réparation du SP par la SPL. Quantité de photoproduits restant (en %) après 30 min d'incubation de la SPL de *B. subtilis* avec de l'ADN de thymus de veau irradié et contenant les photoproduits CPD TT, TC et CT, (6-4)PP TT et TC. Conditions : 0,5 µg/µL d'ADN (25 µg), 10 µM de SPL, 1 mM de SAM, 2 mM de DTT et 2 mM de dithionite dans du tampon Tris HCl 100 mM, KCl 200 mM, pH 8.

II. Activités de la SPL sauvage de *Bacillus subtilis* avec le SPTpT

II.1. Cinétique de l'activité de réparation du Photoproduit des spores

La réaction suivie par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem est présentée Schéma 42. Il s'agit de savoir si le SPTpT est substrat de la SPL sauvage de *B. subtilis*, et le cas échéant, de connaître les paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis de ce substrat.

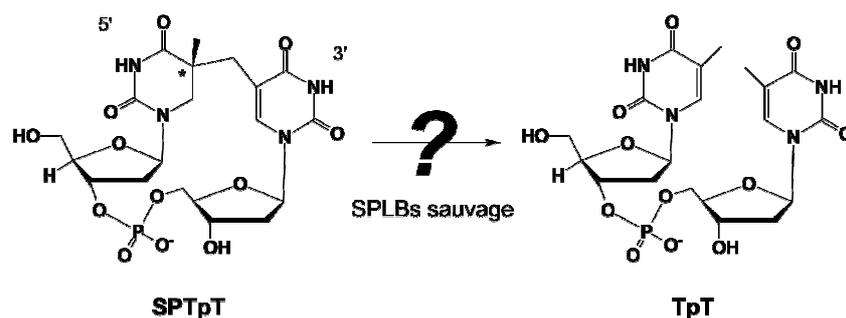


Schéma 42 : Réaction suivie par HPLC-MS/MS. Réparation éventuelle par la SPL du SPTpT en TpT non modifié.

Le Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate SPTpT (dont la synthèse est décrite dans la partie II) a été incubé avec la SPL reconstituée et contenant 3,8 à 4,2 nanomoles de fer et de soufre par nanomole de protéine (Partie I) en conditions d'anaérobiose dans les conditions décrites dans la partie Matériels et Méthodes III.5.1 (page 95). Typiquement, la protéine est mise en présence de tampon et de DTT, puis réduite par le dithionite. Ce réducteur à bas potentiel (-550 mV) permet de réduire le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ à l'état $1+$. De la SAM est alors ajoutée. La réaction de réparation est déclenchée par l'ajout du substrat SPTpT. A différents temps d'incubation à 37°C en boîte à gants, des fractions aliquotes de 10 μL sont prélevées, immédiatement sorties de la boîte à gants et congelées dans l'azote liquide. Ces échantillons sont traités comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes III.5.3. La disparition du SPTpT (temps de rétention $R_t = 20$ min) est suivie par HPLC-MS/MS en utilisant les transitions 545/447, 545/251 et 545/195, tandis que l'apparition de TpT ($R_t = 26,6$ min) est suivie grâce aux transitions 545/419 et 545/195. La Figure 46 montre la courbe de la conversion du SPTpT (●) en TpT (○) en fonction du temps ainsi que les chromatogrammes HPLC-MS/MS obtenus à 0 minute et à 60 minutes. Comme on peut le voir, en 60 minutes, le substrat SPTpT a complètement disparu et est totalement converti en produit TpT. Ces premiers résultats démontrent que le Photoproduit des spores sous la forme d'un dinucléoside monophosphate (SPTpT) est un substrat de la SPL de *B.*

subtilis, et que notre préparation d'enzyme dont le centre [4Fe-4S] a été reconstitué est active de façon catalytique avec ce substrat, puisque 1 μM d'enzyme convertit 10 μM de substrat SPTpT. Il faut noter que lorsque la SPL est sous forme « apo », c'est-à-dire sans le centre [Fe-S], aucune activité n'est observée, de même que lorsque la SAM est absente.

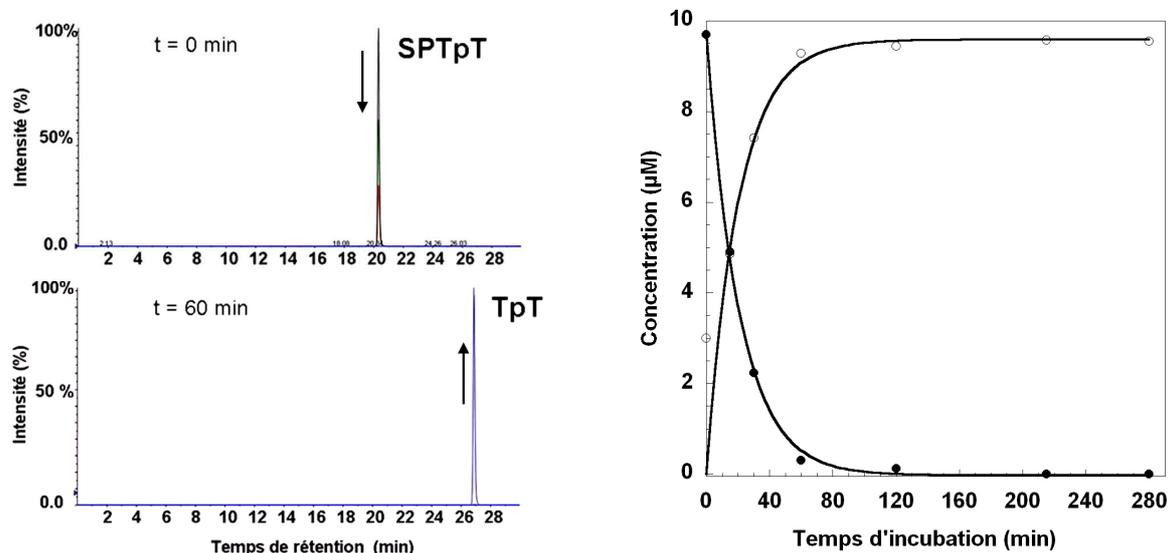


Figure 46 : Réparation du SPTpT par la Spore Photoproduit Lyase de *B. subtilis*. A gauche : Chromatogrammes HPLC-MS/MS de conversion du SPTpT ($R_t = 20$ min) en TpT ($R_t = 26,6$ min). A droite : cinétique de réparation du SPTpT (●) en TpT (○) par la Spore Photoproduit Lyase de *B. subtilis*.

II.2. Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la SPL sauvage de *B. subtilis* pour le substrat SPTpT

La vitesse initiale a été mesurée pour chaque concentration de SPTpT (allant de 0,1 à 30 μM) puis reportée sur une courbe en fonction de la concentration en SPTpT (Figure 47). Un phénomène de saturation est observé pour les concentrations de SPTpT supérieures à 10 μM . Le graphe en double-inverse a été tracé pour permettre une détermination plus précise des paramètres K_m et V_{max} (Figure 47). Celui-ci permet de représenter les données sous la forme d'une fonction affine d'équation $1/v = (K_m/V_{max}) \cdot 1/(S) + 1/V_{max}$. L'ordonnée à l'origine donne $1/V_m$ qui vaut 3,9, et l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses donne accès à $-1/K_m$, qui vaut -0,2. Après calcul, on trouve un K_m de **6 μM** , et une V_{max} de **0,25 mol/mol SPL/min**.

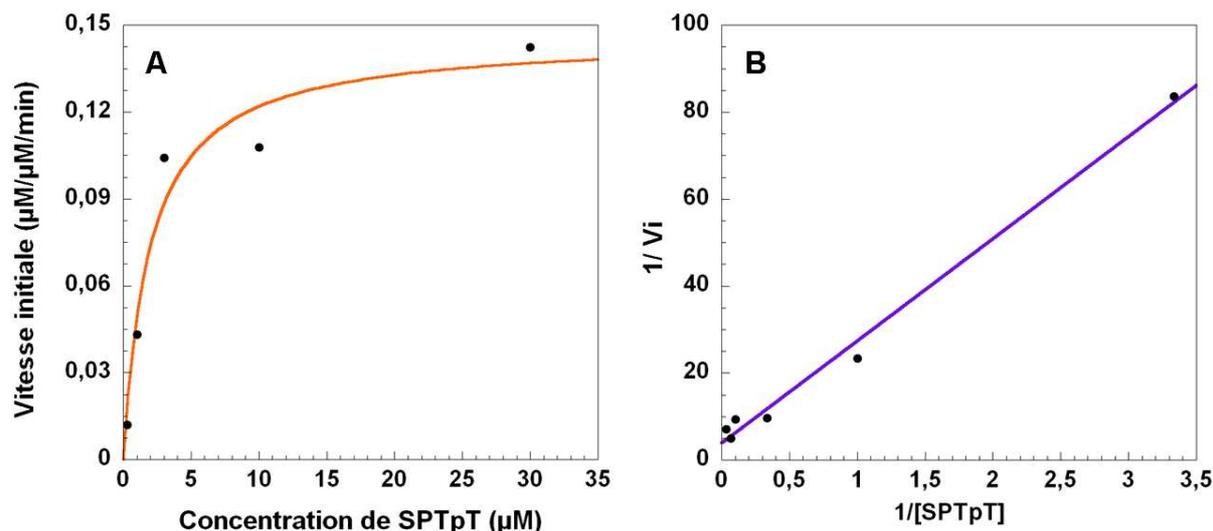


Figure 47 : Détermination des paramètres cinétiques de la SPL. A. Vitesse initiale de production de TpT en fonction de la concentration de SPTpT. **B.** Représentation en double inverse (ou représentation de Lineweaver et Burk). Droite violette d'équation $y = 23,5x + 3,9$, $R^2 = 0,9958$.

II.3. Mesure de l'activité de réductolyse de la S-Adénosylméthionine

L'activité commune à toutes les protéines de la famille des « Radical-SAM » consiste en la coupure de la S-Adénosylméthionine pour former le radical 5'-désoxyadénosyle, initiateur de la réaction radicalaire propre à chaque enzyme de cette superfamille. Comme énoncé dans l'introduction, ce radical n'a jamais été mis en évidence directement car il est très réactif. En revanche, suite à l'arrachement d'un hydrogène du substrat, ce radical est converti en 5'-désoxyadénosine, quantifiable par HPLC. Afin de comparer notre préparation reconstituée de SPL sauvage de *B. subtilis* aux autres protéines de la superfamille et d'étudier son activité en terme de clivage de la SAM, nous avons mesuré par HPLC la production de 5'-désoxyadénosine (AdoH), en présence ou non de SPTpT, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes III.5.2. Les résultats sont présentés Figure 48.

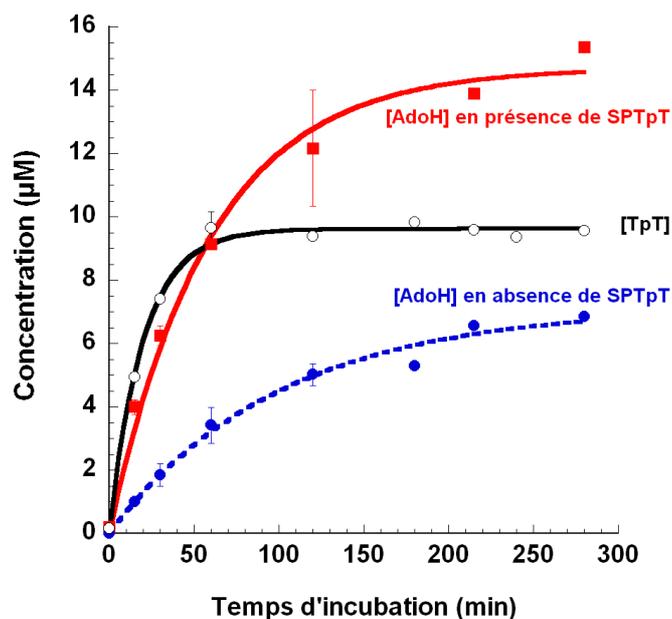


Figure 48 : Activité de réductolyse de la SAM par la SPL sauvage de *B. subtilis* (1 µM). En bleu, production d'AdoH par l'activité de réductolyse de la SAM en absence de substrat SPTpT. En rouge, production d'AdoH en présence de SPTpT. En noir, production de TpT.

Dans un premier temps, nous observons que la SPL de *B. subtilis* reconstituée est capable, en présence de dithionite comme réducteur (source d'électrons), de cliver la SAM pour produire AdoH, et ceci même lorsque le SPTpT est absent du mélange réactionnel. En revanche, aucune production d'AdoH n'est observée en absence de SPL. Lorsque le SPTpT n'est pas présent du milieu réactionnel (courbe bleue sur la Figure 48), la vitesse initiale de production d'AdoH est de $0,06 \pm 0,01$ mol/mol SPL/min, et on observe jusqu'à 7 équivalents d'AdoH (7 µM) produits par équivalent de protéine, en 280 minutes. L'activité de réductolyse de la SAM est fortement augmentée en présence de SPTpT avec une vitesse initiale de production d'AdoH de $0,25 \pm 0,04$ mol/mol SPL/min et une quantité maximale d'AdoH produite d'environ 15 µM. De plus, la vitesse initiale de production de TpT est de $0,32 \pm 0,04$ mol/mol SPL/min, c'est-à-dire du même ordre de grandeur. Ceci indique qu'une molécule de SAM est nécessaire à la réparation d'une molécule de SPTpT. Ces observations montrent que, dans nos conditions de test enzymatique, la SAM n'est pas un cofacteur utilisé de façon catalytique dans le mécanisme de réparation, mais plutôt de façon stœchiométrique.

En revanche, après 60 min, c'est-à-dire une fois que tout le substrat SPTpT est réparé en produit TpT, la production d'AdoH continue. Il est intéressant de remarquer que la vitesse de production d'AdoH après 60 min ($0,05$ mol/mol SPL/min) est alors du même ordre de grandeur que la vitesse initiale de production d'AdoH dans les conditions sans substrat.

III. Activités de la SPLBsC141A de *Bacillus subtilis* en présence du SPTpT

Comme indiqué dans l'introduction, la séquence primaire des SPL contient une quatrième cystéine conservée, non impliquée dans la chélation du centre [4Fe-4S], mais essentielle à la survie des spores irradiées (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005). Comme nous l'avons montré dans la partie I, l'intégrité du centre [Fe-S] n'est pas affectée par cette mutation ponctuelle. Afin de comprendre le rôle de cette cystéine dans le mécanisme de réparation, nous avons effectué les mêmes tests que précédemment, avec la SPL mutée SPLBsC141A dont le centre métallique a été reconstitué chimiquement.

III.1. Activité de réparation du SPTpT par la SPLBsC141A de *B. subtilis*

La protéine a été incubée à 37°C en présence de DTT (2,5 mM), de dithionite (1,5 mM), de SAM (1,5 mM) et de SPTpT (10 µM) comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes III.5.1. Le chromatogramme, obtenu par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem utilisée en mode MRM, donné Figure 49, montre la composition du milieu réactionnel après 20 min de réaction.

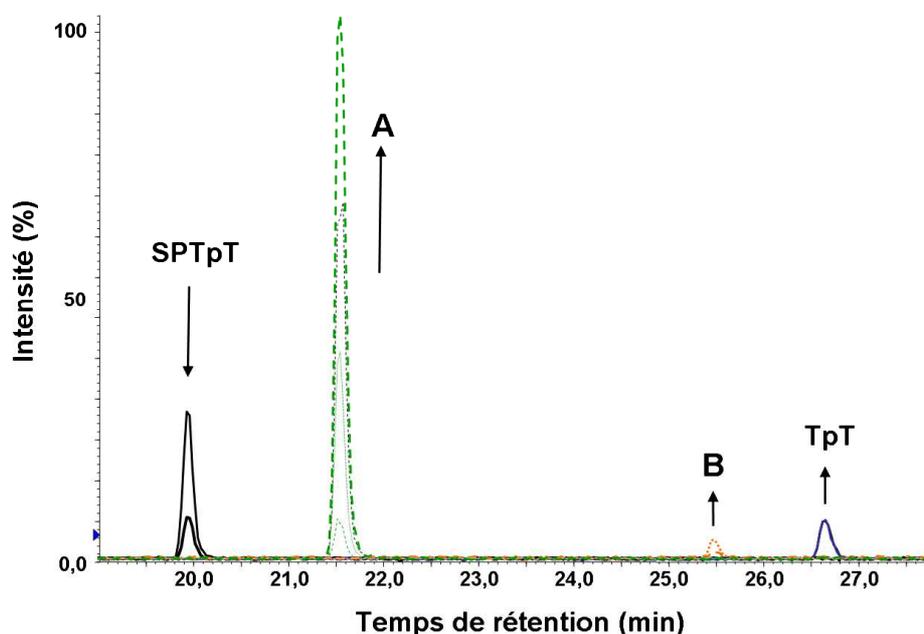


Figure 49 : Activité *in vitro* de SPLBsC141A avec SPTpT. Chromatogramme HPLC-MS/MS obtenu après 20 minutes de réaction à 37°C de SPLBsC141A avec SPTpT dans les conditions données dans Matériels et Méthodes.

On observe que le SPTpT est consommé au cours de la réaction, ce qui est au premier abord surprenant d'après les résultats obtenus *in vivo* par l'équipe de W.L. Nicholson¹³ (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005). Le SPTpT est converti en TpT en petite quantité (maximum 1 μM , pic bleu sur la Figure 49), ainsi qu'en deux autres produits. (**A** – $R_t = 21,6$ min, $m/z = 609$ et **B** – $R_t = 25,5$ min, $m/z = 561$) représentés respectivement en vert et orange sur la Figure 49. **A** est le produit majoritaire de la réaction. Il faut noter que ces derniers produits sont absents quand la réaction est faite avec la SPL sauvage. **A** et **B** ont des masses molaires respectives de $610 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour **A** et $562 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour **B**, déterminées par analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse MS1.

La cinétique de conversion de SPTpT en ces produits est représentée Figure 50. On note qu'en 40 minutes, tout le SPTpT est consommé (10 μM) indiquant que la disparition du SPTpT est plus rapide avec la SPLBsC141A qu'avec la protéine sauvage. Celui-ci est converti en produit **A** en majorité (8,8 μM), en produit **B** de façon minoritaire (0,2 μM) et on observe jusqu'à 1 μM de TpT réparé, ce qui ne représente que 10 % de réparation. Avec la SPLBsC141A, la non-activité de réparation s'explique par l'absence de formation de TpT et par la formation majoritaire du produit **A**.

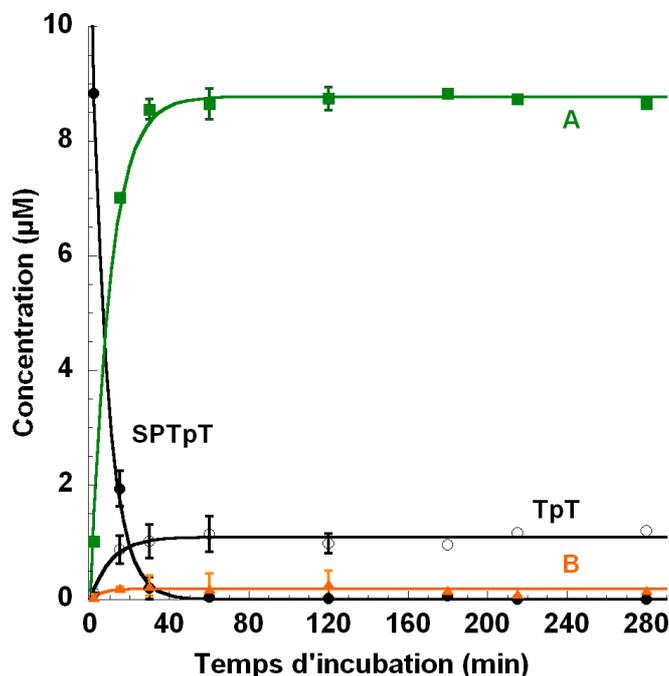


Figure 50 : Cinétique de conversion de SPTpT en présence de SPLBsC141A. En noir cercles pleins (●) disparition du SPTpT, en noir cercles ouverts (○) apparition de TpT, triangles oranges (▲) apparition du produit minoritaire **B** de rapport masse sur charge 561, carrés verts (■) apparition du produit majoritaire **A** de rapport masse sur charge 609.

¹³ Rappelons que les spores ne survivent pas lorsque la SPL contient la mutation C141A. (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005)

III.2. Activité de réductolyse de la SAM de la SPLBsC141A

Afin de savoir si l'activité de réductolyse de la SAM de la SPL mutée est perturbée, nous avons suivi la production d'AdoH, comme dans le cas de la SPL sauvage, en présence et en absence de SPTpT, après incubation avec la SPLBsC141A, comme décrit dans Matériels et Méthodes III.5.2. En parallèle, étant donné que le produit majoritaire de la réaction est le produit **A**, dont l'identification est détaillée plus loin, nous l'avons également quantifié pour chaque temps d'incubation. Les résultats sont présentés Figure 51.

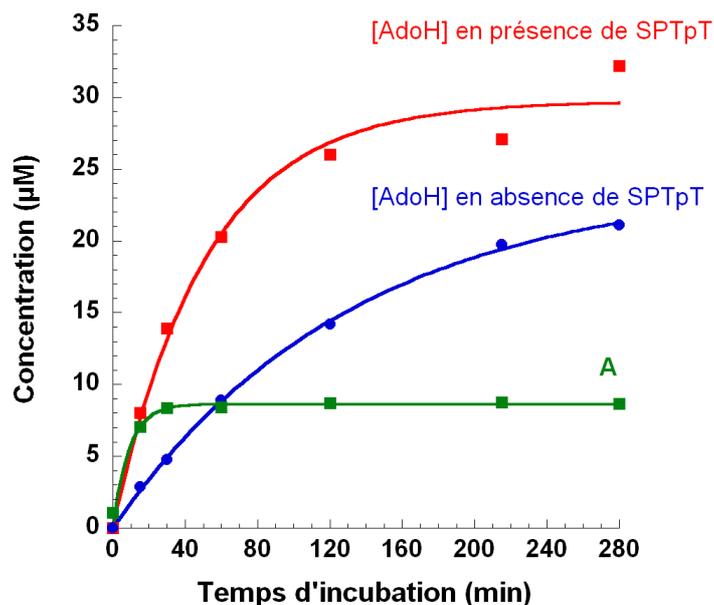


Figure 51 : Activité de réductolyse de la SAM par la SPLBsC141A de *B. subtilis*. En bleu, production d'AdoH en absence de substrat SPTpT. En rouge, production d'AdoH en présence de SPTpT. En vert, production du produit majoritaire (**A**) de la réaction d'incubation de la SPLBsC141A avec SPTpT.

Dans un premier temps, nous observons que la SPL mutée possède une activité de réductolyse de la SAM sans substrat SPTpT (la vitesse initiale est de **0,19 mol/mol SPL/min**) ainsi qu'en présence de SPTpT avec une vitesse initiale de **0,53 mol/mol SPL/min**. Ces activités sont supérieures à celles de l'enzyme sauvage. D'autre part, de la même façon que pour l'enzyme sauvage, la quantité d'AdoH produite pendant la phase linéaire de la réaction (15 minutes) est stœchiométrique par rapport à la production du produit majoritaire **A**, et ces deux produits se forment avec des vitesses initiales similaires : **0,53 mol/mol SPL/min** pour AdoH, et **0,47 mol/mol SPL/min** pour **A**. Ainsi, comme pour la protéine sauvage, une molécule de SAM est-elle nécessaire pour produire une molécule de **A**, via le radical Ado•. La SAM est donc utilisée de façon stœchiométrique.

Ces résultats montrent que la cystéine n'est pas essentielle à l'initiation de la réaction, à savoir la production d'Ado•. Autrement dit, l'arrachement de l'atome d'hydrogène en position 6 par Ado• n'est pas dépendant de la cystéine en position 141.

III.3. Identification des produits issus de l'incubation de la SPLBsC141A avec le substrat SPTpT par spectrométrie de masse MS2

Pour essayer de comprendre l'influence de cette cystéine dans la suite du mécanisme, nous avons identifié les produits de réaction A et B. Pour cela, ces produits ont été purifiés par HPLC et caractérisés de façon structurale par spectrométrie de masse.

III.3.1. Identification du produit minoritaire B

Le produit minoritaire **B**, de temps de rétention HPLC de 25,5 min, observé lors de l'incubation du substrat SPTpT avec la SPLBsC141A, donne un ion de rapport m/z en spectrométrie de masse electrospray négatif de 561. Ceci correspond à la masse molaire du TpT + 16 unités de masse, c'est-à-dire à l'addition d'un groupement OH sur la molécule de TpT. Le mécanisme en trois étapes proposé par J.B. Broderick fait intervenir, à la fin de la deuxième étape (Introduction page 76), un dinucléoside comportant une thymine intacte et un radical sur la deuxième thymine. Notre hypothèse est donc que ce radical aurait été piégé pour former l'adduit **B**.

Pour vérifier cette hypothèse, le composé **B** a été purifié comme décrit dans le paragraphe III.5.4 de la partie Matériels et Méthodes. Un spectre de fragmentation MS2 de celui-ci a ensuite été réalisé en mode négatif afin d'identifier quelle thymine porte le groupement OH, celle en 3' ou celle en 5'.

En effet, la fragmentation des dinucléosides monophosphates non modifiés est bien connue (Ni *et al.*, 1996). En mode négatif, elle est caractérisée par la perte de la base du nucléotide côté 5' conduisant à deux fragments majoritaires : la base libre déprotonée (en bleu - Schéma 43), et le dinucléoside monophosphate avec une seule base du côté 3' (en orange - Schéma 43). On peut également observer la formation du nucléotide monophosphate portant la base côté 3'. Un exemple de cette fragmentation est illustré Schéma 43 avec un dinucléoside monophosphate de thymine et d'uracile. Pour dUpT, l'uracile est côté 5', la thymine est côté 3'. Pour TpdU, la thymine est côté 5' et l'uracile côté 3'.

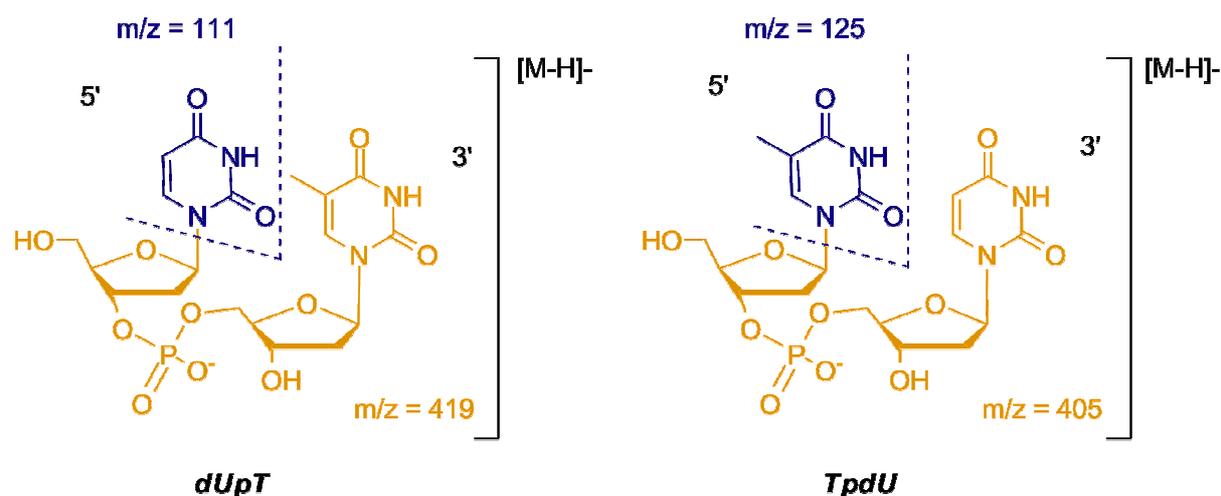


Schéma 43 : Fragmentation typique des dinucléosides monophosphates non modifiés en mode négatif. Exemples de dUpT et TpdU.

Le spectre de fragmentation MS2 de l'adduit OH **B** est représenté Figure 52. Sur ce spectre on voit le pic d'une thymine non modifiée ($m/z = 125$, en bleu sur la Figure 52), et la formation d'un dinucléoside monophosphate abasique ($[M-Thy-H]^-$, $m/z = 435$, en orange sur la Figure 52). D'après les fragmentations typiques en mode négatif de dinucléosides (présentées Schéma 43), une thymidine non modifiée se situe du côté 5', et le dinucléoside monophosphate abasique comporte côté 3' une thymine monohydroxylée. L'absence de pic $[M-ThyOH-H]^-$, de $m/z = 419$, correspondant à une thymine qui serait hydroxylée côté 5', prouve que le groupe hydroxyle est bien situé sur la thymine côté 3', comme indiqué sur le schéma inséré dans la Figure 52.

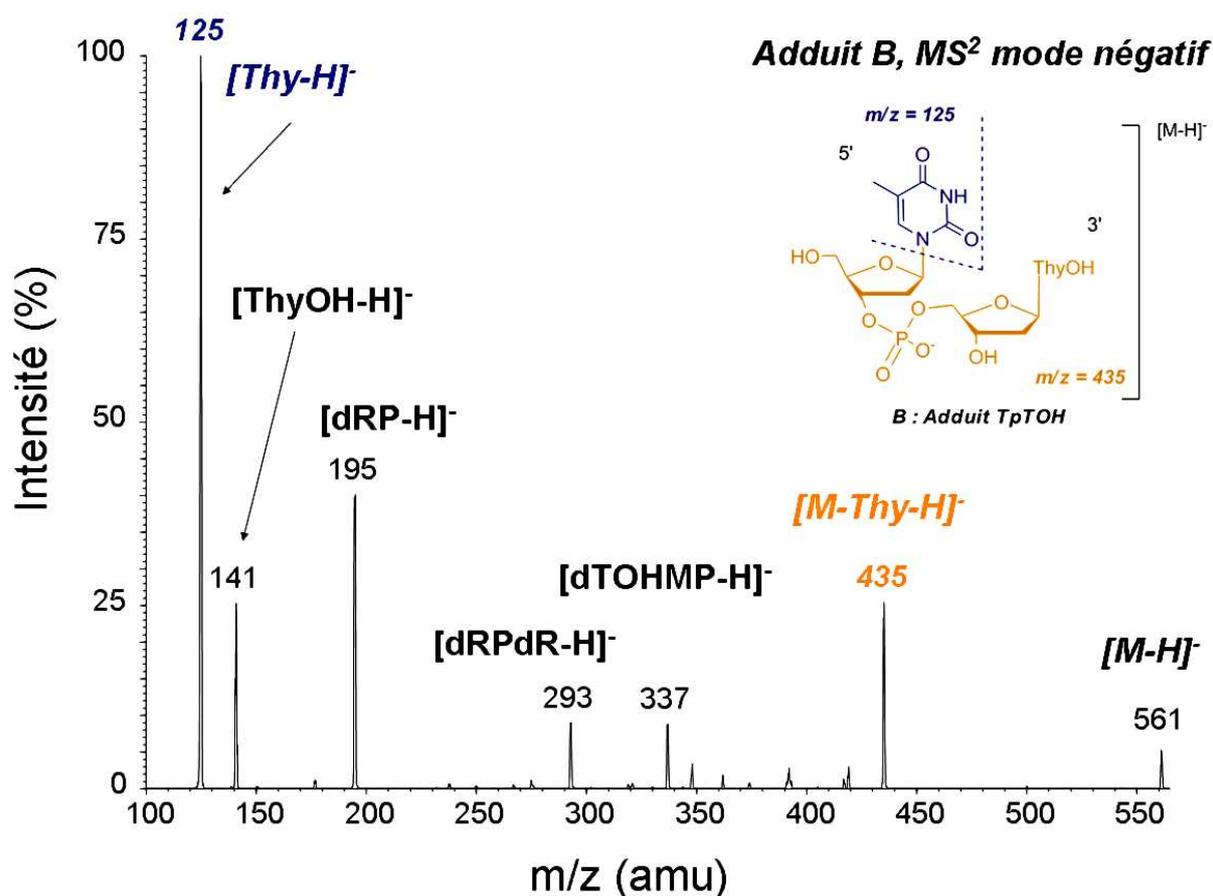


Figure 52 : Spectre de fragmentation de l'adduit B en mode négatif. Le pic $[M\text{-Thy-H}]^-$ de $m/z = 435$ (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3'), le pic $[Thy\text{-H}]^-$ de $m/z = 125$ (en bleu) correspond à la thymine déprotonée. Thy : Thymine. ThyOH : thymine hydroxylée. dRP : désoxyribose phosphate. dRPdR : didésoxyribose monophosphate. dTOHMP : thymidine monophosphate hydroxylée. M : ion parent.

III.3.2. Identification du produit majoritaire A

Nous avons procédé de la même façon pour identifier le produit majoritaire A issu de l'incubation de SPLBsC141A avec le SPTpT (Figure 49), c'est-à-dire par purification du composé puis réalisation du spectre de fragmentation MS2. Ce produit, de temps de rétention HPLC de 21,6 min donne un rapport m/z en spectrométrie de masse electrospray négatif égal à 609. La différence de masse par rapport au dinucléoside monophosphate de thymines (TpT) est de 64 unités de masse, ce qui correspond à l'addition d'une fonction acide sulfonique sur une des thymines. Cette fonction SO_2H pourrait provenir du dithionite ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) utilisé comme réducteur du centre $[4\text{Fe-4S}]$. La même hypothèse que précédemment, selon laquelle un radical sur une des thymines serait piégé par le dithionite en solution (« $\text{SO}_2\cdot^-$ »), peut donc également être envisagée.

Le spectre de fragmentation MS2 réalisé en mode négatif est présenté Figure 53. Malheureusement, la présence des deux dinucléosides monophosphates abasiques

$[M\text{-ThySO}_2\text{-H}]^-$ et $[M\text{-Thy-H}]^-$, ne permet pas de conclure quant à la position du groupement SO_2 sur le dinucléoside monophosphate.

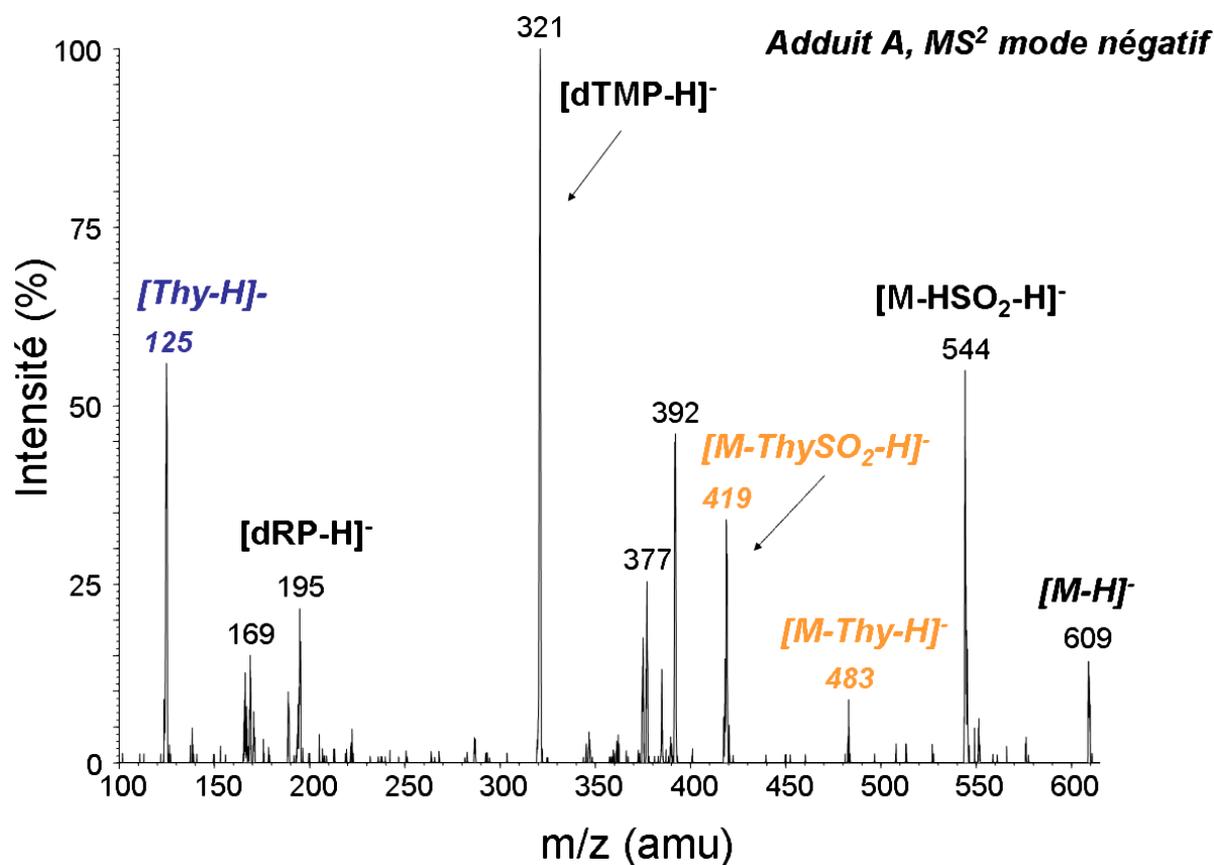


Figure 53 : Spectre de fragmentation de l'adduit A en mode négatif. Le pic $[M\text{-Thy-H}]^-$ de $m/z = 483$ (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3'), le pic $[M\text{-ThySO}_2\text{-H}]^-$ de $m/z = 419$ (en orange) correspond à la perte de la thymine modifiée en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3') le pic $[Thy-H]^-$ de $m/z = 125$ (en bleu) correspond à la thymine déprotonée perdue. Thy : Thymine. dRP : désoxyribose phosphate. dTMP : thymidine monophosphate. M : ion parent.

Cette incertitude a pu être levée grâce à la réalisation du spectre de fragmentation en mode MS2 positif. Les dinucléosides monophosphates non modifiés présentent également une fragmentation typique dans ces conditions d'ionisation. En effet, celle-ci est caractérisée par la perte du nucléotide protoné du côté 3' (en vert sur le Schéma 44), ainsi que du nucléoside déshydraté du côté 5' (en rouge sur le Schéma 44). Un exemple est représenté avec les dinucléosides dUpT et TpdU sur le Schéma 44.

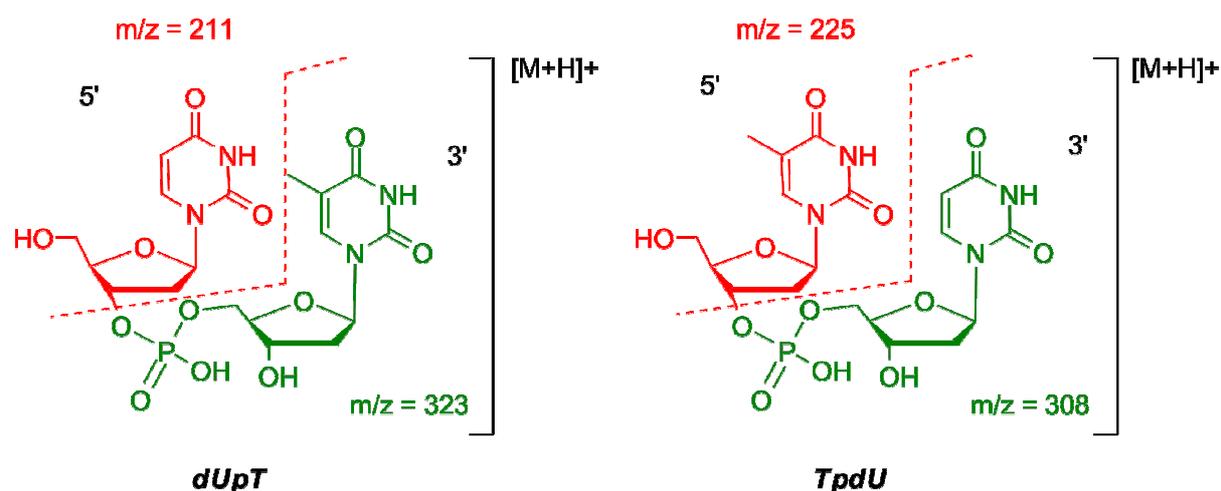


Schéma 44 : Fragmentation typique des dinucléosides monophosphates non modifiés en mode positif. Exemples de dUpT et TpdU.

La fragmentation en mode positif du composé A suit bien cette règle comme le montre la Figure 54. En effet, côté 3', le nucléotide protoné (vert) correspond à la thymidine monophosphate modifiée par le groupement SO_2H ($m/z = 369$). Côté 5', le fragment correspondant au nucléoside déshydraté est ici la thymidine non modifiée ($m/z = 225$).

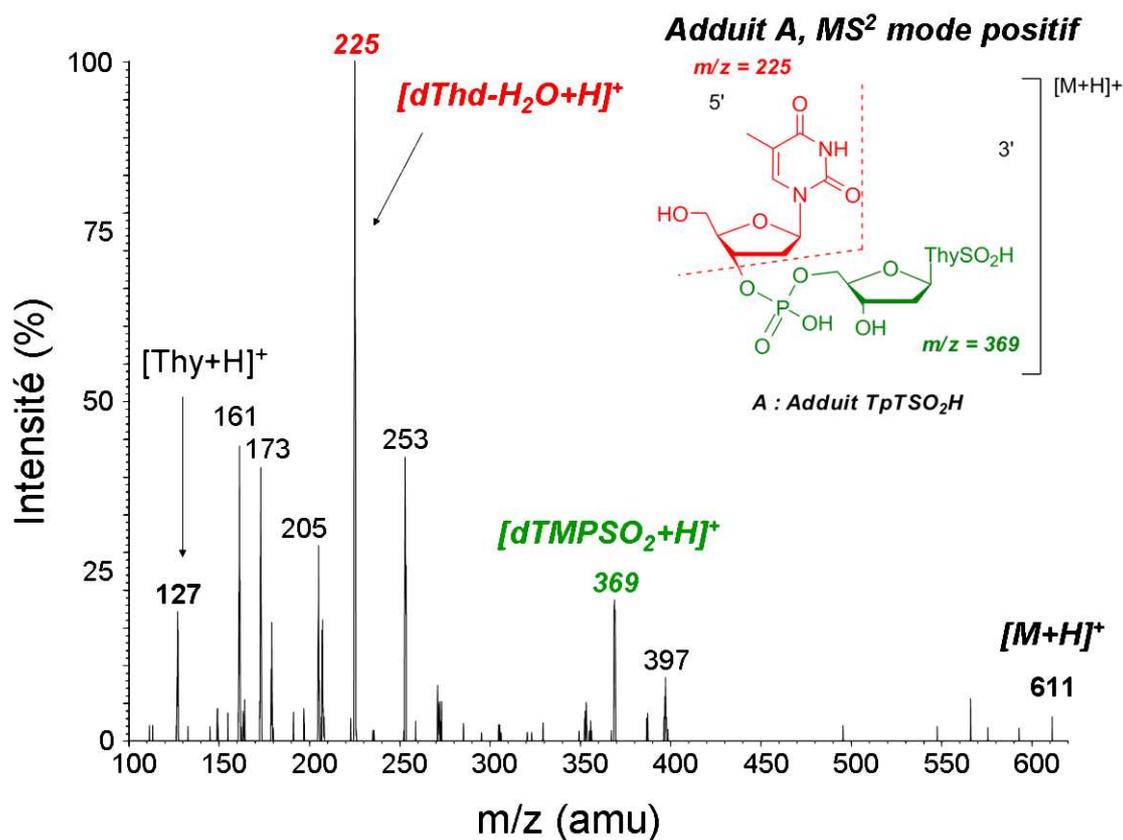


Figure 54 : Spectre de fragmentation de l'adduit A en mode positif. Le pic $[d\text{TMP}\text{SO}_2+\text{H}]^+$ de $m/z = 369$ (en vert) correspond à la thymidine monophosphate en 3' modifiée, le pic $[d\text{Thd}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ de $m/z = 252$ (en rouge) correspond thymidine déshydratée en 5' non modifiée. Thy : Thymine. Thd : Thymidine. dTMP : thymidine monophosphate. M : ion parent.

Si le groupement SO_2H était sur la base en 5', la fragmentation aurait donné les pics de masse suivant : $m/z = 323$ pour la thymidine monophosphate intacte et $m/z = 289$ pour la thymidine déshydratée additionnée du groupe SO_2H . La Figure 54 montre que ces pics de masse n'apparaissent pas sur le spectre, excluant cette possibilité.

Il est possible d'en conclure que le composé **A**, obtenu de façon majoritaire lors de l'incubation de la SPLBsC141A avec le substrat SPTpT, est une dithymidine monophosphate modifiée en 3' par la fonction acide sulfonique.

Ces résultats sont également cohérents avec l'identification du produit minoritaire **B**, la dithymidine monophosphate hydroxylée côté 3', indiquant qu'un radical se forme sur la base en 3' dans les deux cas.

III.4. Modélisation chimique de la formation des produits **A** et **B**

Pour identifier de façon non ambiguë la position exacte des groupements SO_2H et OH présents sur les thymines des adduits **A** et **B**, des précurseurs chimiques de ce radical centré sur le méthyle ont été utilisés. Il s'agit des 5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridylyl-(3'→5')-thymidine ($\text{TS}\Phi\text{pT}$) et thymidylyl-(3'→5')-5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridine ($\text{TpTS}\Phi$). Ce sont des dérivés du TpT (Thymidilyl(3'→5')thymidine) portant une fonction thiophényle sur le méthyle d'une des thymines, soit en 3' soit en 5' (Schéma 45). Pour plus de clarté, ces composés seront appelés $\text{TS}\Phi\text{pT}$ lorsque le thiophényle est positionné sur la thymine côté 5', et $\text{TpTS}\Phi$ lorsque le thiophényle est positionné sur la thymine côté 3'. Ces composés sont connus pour générer de façon photochimique le radical α -thyminyne par rupture homolytique de la liaison carbone – soufre comme le montre le Schéma 45.

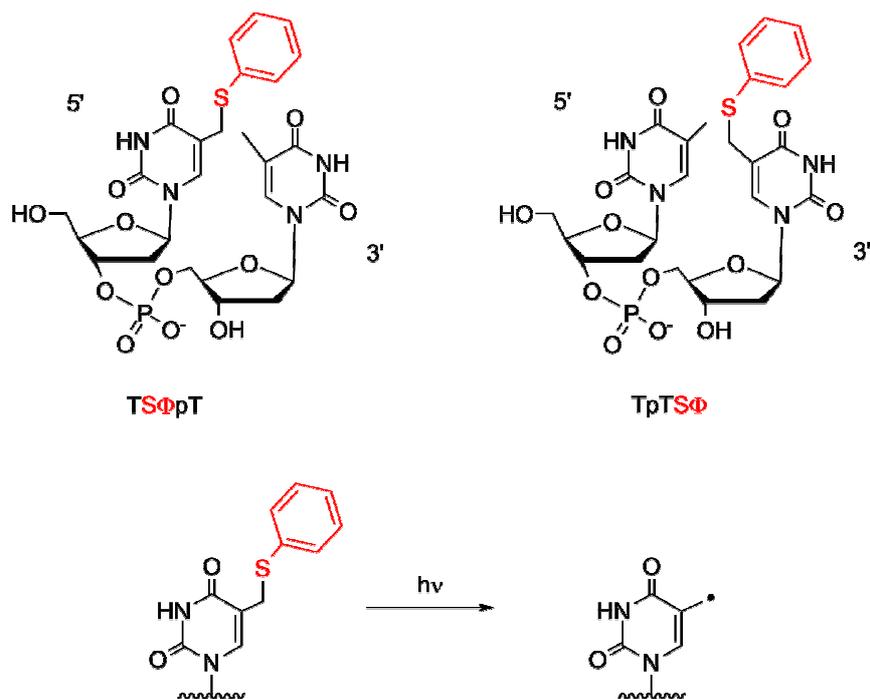


Schéma 45 : Dérivés thiophényles précurseurs de radical. TSΦpT : 5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridylyl-(3'→5')-thymidine. TpTSΦ : thymidylyl-(3'→5')-5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridine. En bas, schéma de la rupture homolytique de la liaison C – S par irradiation UV.

Ces composés ont été mis en présence ou non de dithionite ou d'oxygène puis exposés au rayonnement UV-C. Les différents mélanges réactionnels sont décrits dans le Tableau 17.

cuve	TpTSΦ (~40 μM)	TSΦpT (~40 μM)	+/- O ₂	+/- dithionite (2 mM)
1	+	–	+	–
2	+	–	–	–
3	+	–	–	+
4	–	+	–	+
5	–	+	+	–

Tableau 17 : Composition des mélanges réactionnels à irradier. + signifie en présence d'O₂ ou de dithionite, – signifie en absence d'O₂ ou de dithionite.

Après exposition de ces solutions aux UV (254 nm) pendant 5 minutes, celles-ci sont analysées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse d'abord en mode MRM pour suivre les différents produits de réaction (TpT de $m/z = 545$, adduit SO₂H de $m/z = 609$ et adduit OH de $m/z = 561$) puis en mode MS2 afin d'obtenir les spectres de fragmentation des différents adduits. Les spectres des différents produits sont alors comparés avec ceux des composés **A** et **B** obtenus précédemment (Figure 52 et Figure 53).

Premièrement, l'irradiation conduit bien à la disparition des dérivés thiophényles et à l'apparition de nouveaux produits. En absence de dithionite (cuves 1, 2 et 5), les produits

majoritairement formés sont les deux produits hydroxylés respectivement TpTOH après irradiation de TpTS Φ et TOHpT, issu de la décomposition de TS Φ pT, dont le rapport m/z est égal à 561 en mode négatif. Ces deux composés ont des temps de rétention différents : 24,8 minutes et 25,5 minutes (Figure 55 – II), et également des spectres de fragmentation en mode négatif différents. En présence de dithionite et en conditions d'anaérobiose (cuves 3 et 4), l'irradiation conduit à la formation de deux adduits SO₂H (m/z = 609) distincts selon que le thiophényle était initialement côté 5' ou 3'. C'est donc bien le dithionite présent en solution qui induit la formation de l'adduit par recombinaison radicalaire entre le radical centré sur le méthyle de la thymine et SO₂•⁻. Ces deux adduits SO₂H ont des temps de rétention HPLC différents comme le montre la Figure 55 – I : TpTSO₂H (Rt = 21,6 min, issu de TpTS Φ) et TSO₂HpT (Rt = 22,2 min, issu de TS Φ pT). La comparaison de ces temps de rétention avec ceux des produits issus de la réaction enzymatique (Figure 55 – III) permet de conclure sans ambiguïté que le produit majoritaire **A** est TpTSO₂H (21,8 min) alors que le produit minoritaire **B** est TpTOH (25,5 min). Dans les deux cas, les fonctions additionnées sur le radical intermédiaire sont bien sur le méthyle de la base en position 3'.

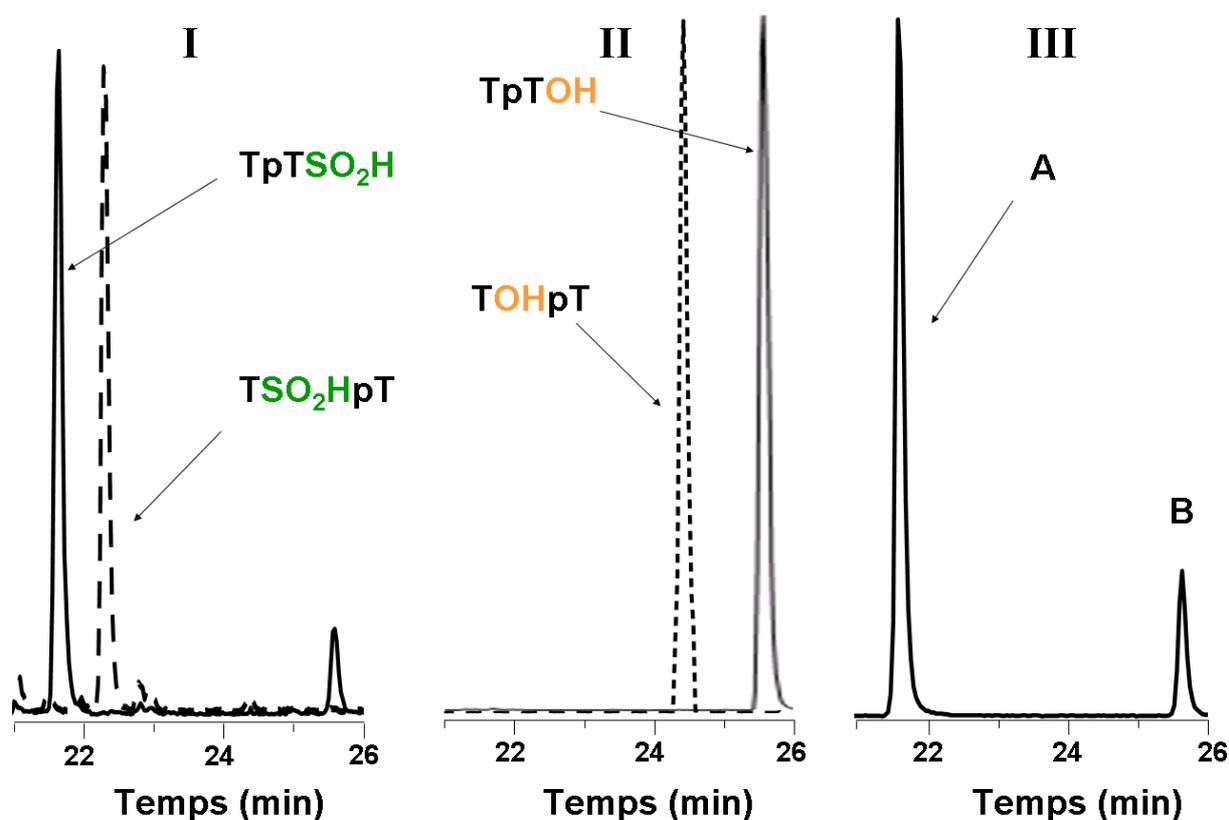


Figure 55 : Chromatogrammes HPLC-MS/MS. Adduits SO₂H issus de l'irradiation en anaérobiose en présence de dithionite (I), adduits OH issus de l'irradiation en absence de dithionite (II). Comparaison avec les produits A et B obtenus lors de l'incubation de SPTpT avec SPLBsC141A (III).

Le Schéma 46 récapitule les différents produits observés lors de l'irradiation de ces modèles.

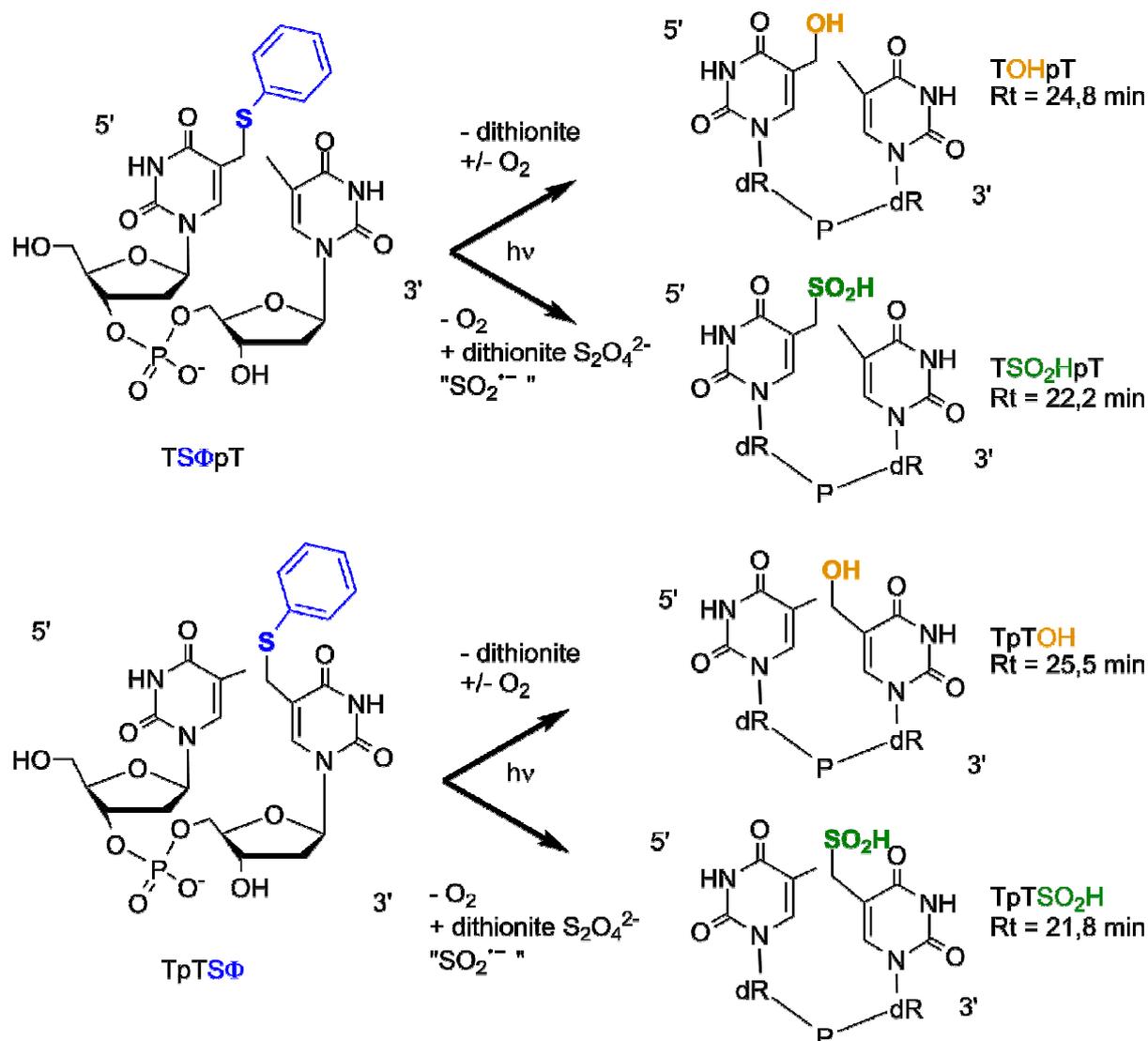


Schéma 46 : Récapitulatif des adduits obtenus après irradiation de TSΦpT et TpTSΦ. dR : désoxyribose, P pont phosphodiester.

En plus des analyses HPLC montrant des temps de rétention identiques entre **A** et TpTSO₂H, ainsi qu'entre **B** et TpTOH, ce sont aussi les spectres MS2 en mode négatif de l'adduit **A** (Figure 53) et de TpTSO₂H (Figure 56 – I) qui sont identiques. En effet, les deux spectres possèdent les mêmes ions fils avec les mêmes intensités, signifiant que les deux produits sont identiques. Ces spectres sont radicalement différents de ceux de TSO₂HpT (Figure 56 – II). La même observation peut être faite pour l'adduit **B** identifié comme TpTOH.

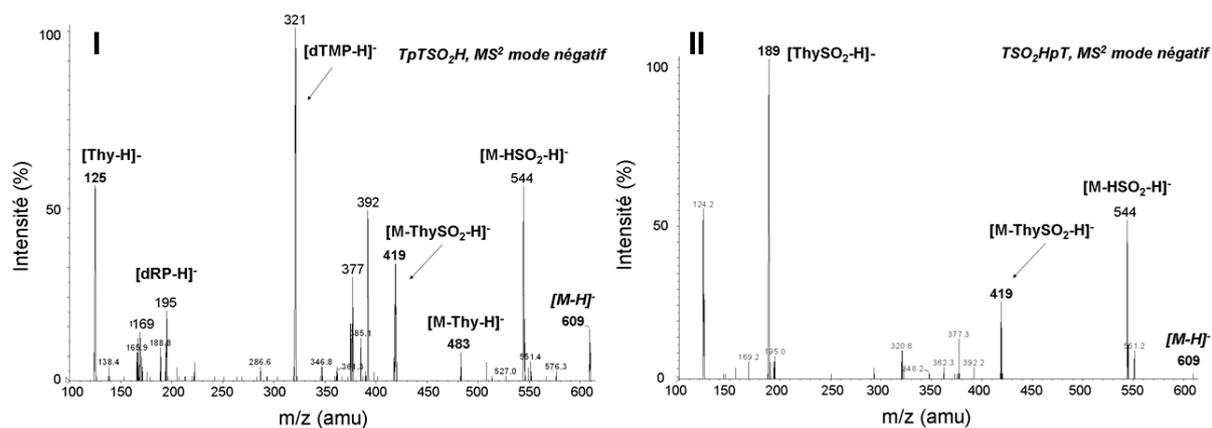


Figure 56 : Spectres de fragmentation en mode négatif des adduits SO₂H obtenus après irradiation de TpTSP et TSP. I. Spectre MS2 de TpTSP. II. Spectre MS2 de TSP.

L'ensemble de ces données montre qu'en absence de la cystéine C141, la réaction de réparation est bloquée à un intermédiaire radicalaire, qui est majoritairement piégé *in vitro* par le dithionite en solution. Une deuxième information apportée par ces expériences concerne la position de ce radical. Les données HPLC-MS/MS démontrent clairement que ce radical est positionné sur le méthyle de la thymine en 3'.

IV. Détermination du rôle de la cystéine 141 dans la réaction enzymatique

D'après les résultats précédents, nous pouvons émettre l'hypothèse que le thiol de la cystéine 141 soit un donneur d'atome d'hydrogène dans la dernière partie du cycle enzymatique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué plusieurs expériences de marquage isotopique au deutérium, afin de suivre des transferts d'atomes de deutérium au cours de la réaction. Les deux expériences effectuées sont les suivantes :

- utilisation de la SAM deutérée en position 5', afin d'étudier le transfert de deutérium de AdoH vers le produit de la réaction. Selon notre hypothèse, on ne devrait pas observer de transfert ;
- marquage de la protéine avec du deutérium, de façon à étudier le transfert de deutérium de la protéine au(x) produit(s) de réaction. Selon notre hypothèse, nous nous attendons à observer une incorporation de deutérium sur le produit final de la réaction avec la SPL sauvage, mais pas avec la SPL mutée.

IV.1. Transfert de deutérium par la S-Adénosylméthionine marquée en position 5'

La faible quantité de TpT formé lors de l'incubation avec la SPL mutée indique non seulement que le donneur final majoritaire d'atome d'hydrogène est absent, mais aussi qu'un donneur minoritaire d'atome d'hydrogène est présent dans le milieu réactionnel, puisqu'un peu de TpT est tout de même formé (10 % de réparation). Un donneur potentiel pourrait être AdoH, comme le propose J.B. Broderick (Buis *et al.*, 2006, Cheek *et al.*, 2002). Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons utilisé de la S-Adénosylméthionine marquée au deutérium en position 5' (notée [5'-(²H)₂]SAM ou AdoCD₂Met) dans le test enzymatique.

L'état de deutération de la SAM a été vérifié par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en mode SIM négatif (Single Ion Monitoring). Pour cela, les ions 399, 400, 401, 402 et 403 ont été suivis : 73 % de la SAM deutérée possède bien les 2 deutériums ([5'-(²H)₂]SAM m/z = 401), 18% de la SAM possède un seul deutérium et 9 % de la SAM ne possède aucun deutérium. La SAM deutérée a été utilisée pour effectuer le test enzymatique avec la SPL sauvage et la SPL mutée C141A en présence de SPTpT (Matériels et Méthodes III.5.1 et III.5.6). La formation d'AdoH ainsi que son état de deutération ont été suivis par HPLC-MS/MS en mode MRM positif (transitions 252/136, 253/136, 254/136, 255/136).

La production d'AdoH est observée, et notamment 70 % de la 5'-désoxyadénosine formée est sous la forme AdoCD₂H (avec deux deutériums et un hydrogène), indiquant que sa formation est due à l'arrachement d'un atome d'hydrogène, probablement du substrat car la disparition de SPTpT est observée, que ce soit avec la SPL sauvage ou la SPL mutée.

En parallèle, la quantité de TpT ayant incorporé un deutérium est mesurée par HPLC-MS/MS en mode MRM négatif. Les transitions utilisées sont résumées dans le Tableau 18.

545/195	545/419	546/195	546/419	546/420
M	M	M+1	M+1	M+1
TpT et SPTpT	TpT	TpT et SPTpT	TpT deutéré en 5'	TpT deutéré en 3'

Tableau 18 : Transitions utilisées pour la détection de SPTpT (« M » m/z = 545), TpT (« M » m/z = 545) et TpT deutéré (« M+1 » m/z = 546).

Aucune différence n'est observée entre les ratios TpT/TpTdeuté en 5' pour la protéine sauvage et le mutant (12,0 ± 1,3 % de TpT deutéré avec SPL sauvage, et 12,8 ± 2,2 % avec SPLBsC141A). La très faible proportion de TpT deutéré observé avec la SPLBsC141A ne

peut donc pas résulter d'un transfert de deutérium provenant d'AdoH. AdoH n'est donc pas le donneur final d'atome d'hydrogène.

IV.2. Marquage de la SPL par du deutérium

IV.2.1. Principe de l'expérience et effet du marquage sur la cinétique

Les hydrogènes échangeables (cystéines, sérines, etc...) des SPL (sauvage et mutée) ont été échangés dans un tampon Tris-HCl préparé dans du deutérium 100% comme décrit dans Matériels et Méthodes III.5.5. Le Schéma 47 présente les différentes étapes de cette expérience. Des colonnes MicroBioSpin P6 (Biorad) ont été utilisées pour effectuer le changement de tampon. Elles ont été équilibrées comme indiqué par le fabricant par 4 passages successifs de tampon deutéré Tris-HCl 100 mM, KCl 50 mM, pH 8. Ensuite, entre 20 et 50 μ L de SPLBs sauvage ou SPLBsC141A concentrées sont déposés sur le haut du gel et les colonnes centrifugées pour récupérer les protéines échangées. Une fraction aliquote de la solution d'enzymes échangées est conservée pour doser la quantité de protéines, ainsi que les quantités de fer et de soufre. La SPL ainsi échangée est diluée à la concentration souhaitée (entre 10 et 20 fois) dans le tampon Tris deutéré. Le test enzymatique est alors effectué comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes III.5.1, avec des tampons deutérés, l'eau remplacée par D₂O et donc les solutions des réactifs préparées dans ces tampons. A différents temps d'incubation (15, 60 et 120 minutes) pour l'étude cinétique ou à 60 minutes pour les études de transfert de deutérium, 10 μ L sont prélevés puis traités de la façon suivante : 5 μ L des échantillons sont dilués dans du TEAA 2 mM, puis congelés, lyophilisés et resolubilisés dans du TEAA 2 mM non deutéré, et ceci deux fois de suite. Cette étape est nécessaire afin de perdre les hydrogènes échangeables du SPTpT et des produits de réaction, notamment les NH de la base et OH des sucres, qui auraient été échangés dans le tampon deutéré. De cette façon, les deutériums incorporés seront uniquement ceux qui proviennent de la capture d'un deutérium par un intermédiaire réactionnel, et qui ne sont donc pas échangeables.

Les échantillons sont alors analysés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en mode SIM négatif (Single Ion Monitoring). Les ions suivis sont 544, 545, 546, 547 et 548 pour TpT et SPTpT (notés M-1, M, M+1, M+2 et M+3 par la suite), ainsi que 609, 610, 611, 612 (M-1, M, M+1, M+2 et M+3). Le suivi de l'ion M-1 sert à vérifier l'intégrité de SPTpT, TpT ainsi que de l'adduit SO₂H.

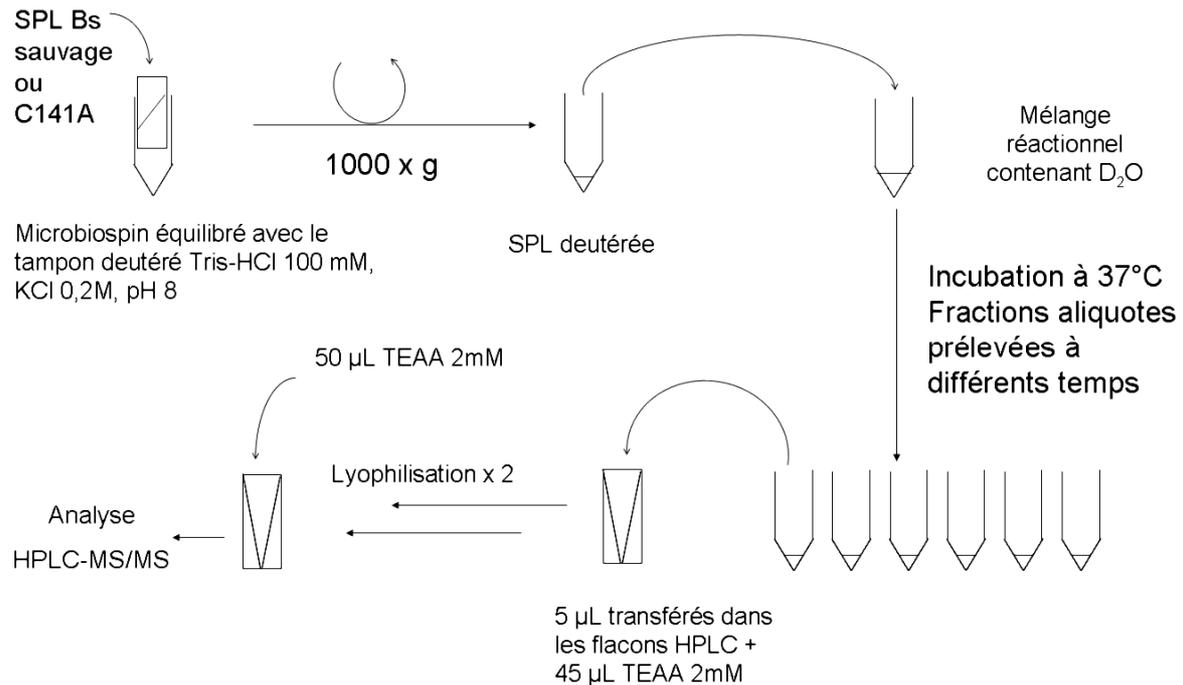


Schéma 47 : Principe du test d'activité effectué dans D₂O. Après échange de la protéine et réaction avec SPTpT, les échantillons doivent être rééchangés afin de ne pas perturber l'analyse par la présence de deutériums échangeables.

Des expériences de contrôle ont été réalisées avec les protéines ayant subi le même traitement, à savoir le passage sur la colonne MicroBioSpin mais dans un tampon ne contenant pas de deutérium (Schéma 47). Ces expériences permettent non seulement de vérifier que le passage sur la colonne n'affecte pas le centre métallique de la SPL, et donc l'activité de la protéine ; mais aussi de corriger les quantités de deutérium mesurées dans les produits de réaction par l'abondance naturelle du ¹³C. Ainsi, les proportions des formes isotopiques du TpT formé au cours de la réaction avec la SPL sauvage dans H₂O sont données dans la Figure 57. L'abondance naturelle du carbone 13 est à l'origine des 18,9 % de TpT de rapport m/z = 546, et des 4,6 % de TpT de rapport m/z = 547.

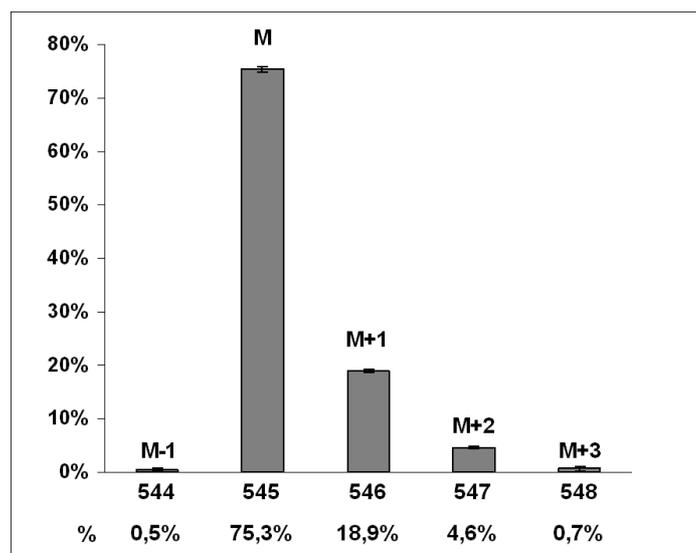


Figure 57 : Mesure des proportions (%) des formes isotopiques du TpT dans H₂O dues à l'abondance naturelle du ¹³C. Une moyenne a été faite sur 12 échantillons.

Lorsque l'expérience est effectuée dans D₂O, une première observation peut être faite sur les cinétiques de la réaction (il faut noter que celles-ci n'ont été déterminées qu'une seule fois et donc cette observation est plutôt une tendance). La vitesse initiale de disparition de SPTpT est environ 4,5 fois plus lente dans D₂O (0,09 molSPTpT/mol/min) pour la SPL sauvage que dans H₂O (0,40 molSPTpT/mol/min), et 4,4 fois plus lente pour la SPLBsC141A. Ces vitesses sont résumées dans le Tableau 19. Il faut noter que de plus, la conversion de SPTpT n'est pas totale (20 % de conversion pour SPLBs sauvage et 50 % pour SPLBsC141A), et la réaction s'arrête après 60 minutes, quel que soit le tampon.

	Bs H ₂ O	Bs D ₂ O	BsC141A H ₂ O	BsC141A D ₂ O
Vitesse initiale de disparition de SPTpT en mol/mol/min	0,40	0,09	0,66	0,15

Tableau 19 : Vitesses initiales de réaction dans H₂O ou D₂O avec les SPL de *B. subtilis* sauvage ou mutée.

IV.2.2. Analyse du transfert de deutérium avec la SPL sauvage

Lorsque la SPL sauvage (1 μM) est échangée dans D₂O et mise en présence de SPTpT (6,2 μM), TpT est le seul produit observé (1,2 μM), et les proportions des différents ions sont modifiées par rapport à la réaction dans H₂O. En effet, comme le montre la Figure 58, on observe une majorité de M+1 (51 %) par rapport au M (34%). Cependant il est nécessaire de corriger cette valeur et celles des autres ions par l'abondance naturelle du ¹³C observée dans le TpT (Figure 57). En effet, une partie de ces 51 % provient d'un ion M+1 présent

naturellement dans TpT (à cause de l'abondance naturelle du carbone 13, voir Figure 57 et rappel sur la Figure 58), appelé par la suite « M+1 naturel ». Le Tableau 20 donne les proportions de ces ions lorsque la correction est effectuée grâce à un calcul de proportionnalité.

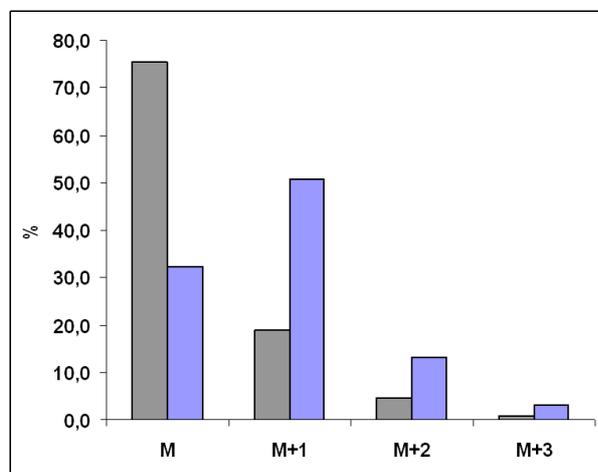


Figure 58 : Proportions relatives en % des différents ions de masse M, M+1, M+2 et M+3 du TpT formé lors de la réaction de SPTpT avec la SPL sauvage deutérée (en bleu), et non deutérée (en gris, dues à l'abondance naturelle du ^{13}C).

TpT	M	M+1 naturel	M+1	M+2 naturel	M+2	M+3
% après correction	$32,5 \pm 1,8$	$8,1 \pm 0,5$	$42,6 \pm 1,4$	$12,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,8$

Tableau 20 : Proportion des différents ions TpT ayant incorporé 1,2 ou 3 atomes de deutérium lorsque la SPL sauvage est incubée dans D_2O en présence de SPTpT. Une moyenne a été faite sur tous les échantillons de 3 expériences.

Une moyenne a été effectuée sur les 4 échantillons d'une même série d'analyse, et ceci sur 3 séries. La proportion de M+2, c'est-à-dire de TpT ayant incorporé 2 deutériums est quasi-nulle ($0,5 \pm 1,1$ %), ce qui signifie que la quantité totale de M+2 retrouvée dans le milieu réactionnel provient de l'abondance naturelle de cet ion, et non de l'incorporation de 2 deutériums, de même que pour l'ion M+3. En revanche, on retrouve $42,6 \pm 1,4$ % de M+1, c'est-à-dire de TpT ayant réellement incorporé un seul deutérium. La proportion de TpT n'ayant incorporé aucun deutérium est de $32,5 \pm 1,8$ %, ce qui est inférieur à la quantité de TpT deutéré.

Le ratio entre TpT et TpTD (M+1) est de $43,3 : 56,7$. Il y donc une légère majorité de TpT deutéré une seule fois ($0,7 \mu\text{M}$ sur les $1,2 \mu\text{M}$ formés au total).

Un spectre MS2 de ce TpT deutéré a été réalisé en mode négatif, de façon à connaître la position de l'atome de deutérium incorporé, en utilisant la même méthode d'interprétation concernant les règles de fragmentation de dinucléosides monophosphates (paragraphe III.3.1).

Ce spectre est présenté Figure 59. Une thymine intacte du côté 5' est libérée, ainsi que le dinucléoside monophosphate abasique correspondant possédant une thymine deutérée en position 3'. On peut donc en déduire que le deutérium est incorporé sur la thymine de l'extrémité 3' du dinucléoside monophosphate, et plus précisément sur le méthyle en position 5.

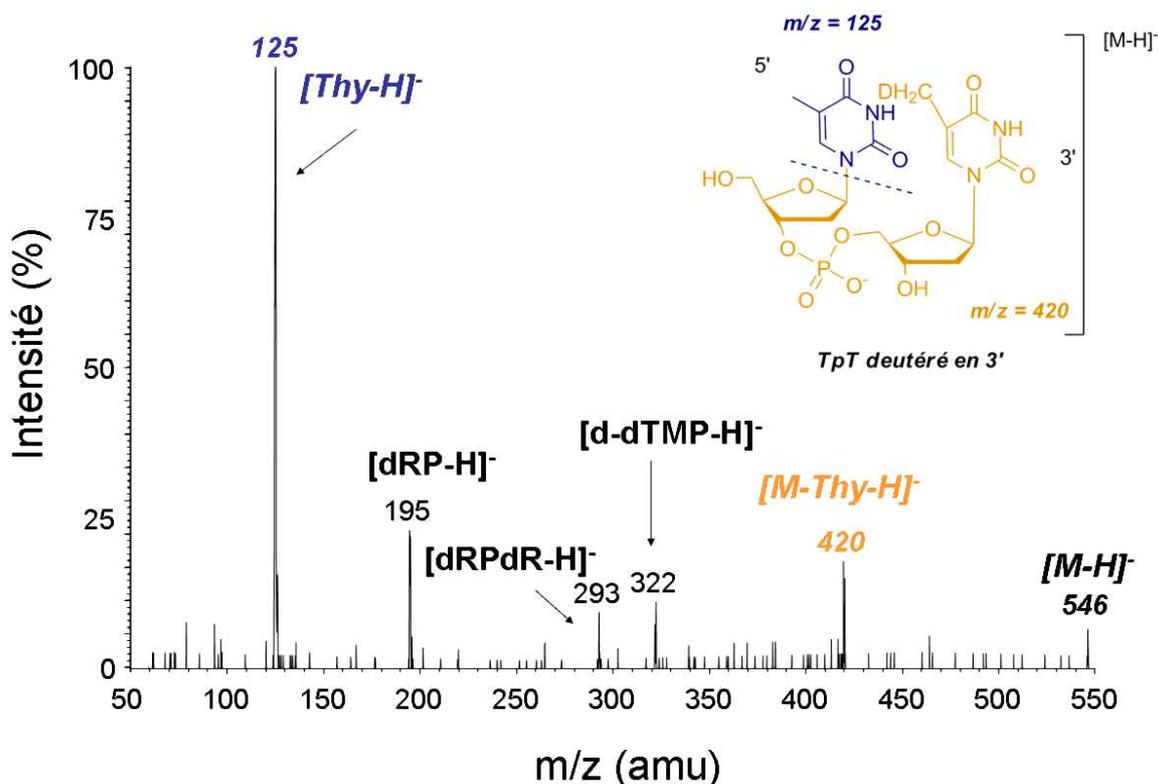


Figure 59 : Spectre de fragmentation MS2 en mode négatif de TpT ayant incorporé un deutérium. Spectre obtenu lors de l'expérience avec échange H/D de la SPL sauvage incubée avec SPTpT. Le pic [M-Thy-H]⁻ de m/z = 420 (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base deutérée en 3'), le pic [Thy-H]⁻ de m/z = 125 (en bleu) correspond à la thymine déprotonée perdue. Thy : Thymine. dRP : désoxyribose phosphate. dRPaR : didésoxyribose monophosphate. d-dTMP : thymidine monophosphate deutérée. M : ion parent.

IV.2.3. Analyse du transfert de deutérium avec la SPL mutée SPLC141A

Lorsque le test enzymatique est réalisé avec la SPLBsC141A (1 μM) échangée dans le tampon deutéré, on peut observer la formation majoritaire de TpTSO₂H (2,7 μM), et une petite quantité de TpT (0,3 μM – qui correspond toujours aux 10 % de réparation), cependant le SPTpT n'est converti qu'à moitié (3,2 μM sur les 6,2 μM quantifiés au départ). La détermination des proportions relatives des différents ions M, M+1, M+2 et M+3 a été effectuée pour TpTSO₂H et TpT.

Pour TpTSO₂H, ces proportions sont quasiment toutes identiques, que l'incubation ait été réalisée dans H₂O ou D₂O (M : 68,5 ± 3,5 % ; M+1 : 22,9 ± 4,1 % ; M+2 : 6,2 ± 3,2 % ;

M+3 : $1,2 \pm 1,9$ %), indiquant qu'aucun atome de deutérium n'est incorporé sur cet adduit majoritaire. En revanche, on trouve une légère incorporation de deutérium dans TpT (M : 56,3 % ; M+1 : 32,2 %, soit $18,0 \pm 1,9$ % de TpT deutéré après correction par l'abondance naturelle), formé en très petites quantités (0,3 μ M). Il y a donc un total de 0,06 μ M de TpT deutéré, 0,24 μ M de TpT non deutéré et 2,7 μ M de TpTSO₂H non deutéré (le ratio **TpT/TpTD** est donc de **79,7 :20,3** dans le cas de la SPLBsC141A).

Une différence est ainsi observée entre la protéine sauvage et la protéine mutée dans les conditions de deutération de la protéine. En effet, lorsque la cystéine 141 est absente, TpT est formé en très petite quantité (de l'ordre de 0,3 μ M pour 6,2 μ M de SPTpT au départ) et n'est que peu deutéré (18 % des 0,3 μ M), et le TpTSO₂H, adduit piégé par le dithionite, n'incorpore aucun deutérium. En revanche, en présence de cette cystéine, c'est-à-dire avec la protéine sauvage, le TpT (1,2 μ M) incorpore majoritairement un seul deutérium non échangeable sur la thymine en position 3'. Ceci suggère que la cystéine 141 puisse être effectivement impliquée dans le mécanisme de réparation en tant que donneur d'atome d'hydrogène.

Un handicap majeur à l'analyse quantitative plus précise de ces données est le manque d'information sur l'état de marquage des protéines. En effet, leur deutération n'a certainement pas été complète, compte tenu des conditions dans lesquelles l'échange a été effectué et de l'absence de connaissance en ce qui concerne l'accessibilité de la cystéine au solvant. C'est donc plutôt sur les tendances mises au jour qu'il faut s'attarder.

V. Test d'activité de la SPL de *B. subtilis* avec le substrat oligonucléotidique

Avec le substrat oligonucléotidique, dont la préparation est décrite Partie II, nous avons voulu savoir d'une part, si un enchaînement plus long de nucléotides modifiait la vitesse de la réaction et les paramètres cinétiques de l'enzyme, et d'autre part si l'adduit TpTSO₂H était également formé sur un substrat qui « ressemble » plus à de l'ADN.

La réaction avec le simple brin a été réalisée à 37°C dans les conditions décrites dans Matériels et Méthodes III.5.1, avec 1 μ M de SPL sauvage ou mutée et 10 μ M de lésion SP. La quantification du Photoproduit des spores a été effectuée après digestion enzymatique de l'oligonucléotide par dosage HPLC-MS/MS en utilisant du SPTpT de concentration connue comme standard. Cette première étape de digestion enzymatique (Matériels et Méthodes III.4.1) est nécessaire afin de libérer le SPTpT sous forme dinucléoside monophosphate. Dans ce cas, le TpT n'est plus observable car le phosphate entre les deux thymidines adjacentes est

digéré par les phosphodiesterases. L'adduit TpTSO₂H et l'adduit TpTOH éventuellement formés seraient observables sous la forme d'une thymidine modifiée (**ThySO₂H** : m/z = 305, transition 305 → 175 – **ThyOH** : m/z = 257, transition 257 → 124). Le gradient utilisé est un gradient linéaire de 0% à 10% d'acétonitrile en 20 min suivi d'un débit isocratique à 10 % d'acétonitrile pendant 10 minutes.

L'activité de la SPL a été vérifiée en utilisant le SPTpT comme substrat. Malheureusement, aucune activité de réparation n'est observable avec le substrat oligonucléotidique simple brin que ce soit avec la SPL sauvage ou mutée. Or le SPTpT (10 µM) est réparé entièrement en TpT en 60 minutes avec SPLBs sauvage, de même qu'il est converti entièrement en TpTSO₂H (9 µM) et TpT (1 µM) en 60 minutes avec SPLBsC141A.

Le test enzymatique a alors été effectué avec l'oligonucléotide double brin, préparé par hybridation à 70°C entre le 11mer simple brin contenant la lésion et le brin complémentaire, puis refroidissement lent à température ambiante. Le test a été réalisé à 25°C pour éviter la dénaturation du double brin. En effet, la température de fusion théorique sans lésion du 11mer n'est que de 35°C. De plus, la lésion contribue à l'abaissement de cette valeur, c'est pourquoi le test a été réalisé à 25°C. De la même façon, une expérience témoin a été effectuée avec SPTpT comme substrat, à 25°C. Alors que dans ces conditions, le SPTpT est consommé (40 % pour SPLBs sauvage, et 49 % avec SPLBsC141A, voir Tableau 21), avec l'oligonucléotide double brin, nous n'observons ni diminution de SP, ni apparition du pic correspondant à TSO₂H au cours de la réaction. Il n'y a pas de réparation.

Quantité (µM) après 120 min à 25°C	SPTpT	TpT	Adduit SO ₂ H	Adduit OH
SPLBs sauvage avec SPTpT	6,02	3,98	0	0
SPLBsC141A avec SPTpT	5,15	0,25	4,56	0,04
SPLBs sauvage avec 11merSPdb	10	0	0	0
SPLBsC141A avec 11merSPdb	10	0	0	0

Tableau 21 : Test de réparation du SP (10 µM de SP contenu soit dans SPTpT soit dans l'oligonucléotide double brin « 11merSPdb ») à 25°C en présence de SPLBs sauvage ou SPLBsC141A (1µM), de dithionite (1,5 mM), de DTT (2,5 mM) et de SAM (1,5 mM). Les quantités sont données en µM, et sont les résultats obtenus après 120 minutes de réaction à 25°C.

Chapitre 2 : Discussion

I. **Activité de réparation de la SPL sauvage**

I.1. **Le substrat SPTpT**

Le substrat SPTpT, dont la synthèse est décrite dans la partie II, nous a permis d'effectuer des tests enzymatiques avec la SPL purifiée de *B. subtilis*, dont le centre [Fe-S] a été chimiquement reconstitué, afin d'en étudier le mécanisme. Ce substrat minimum a été choisi pour les tests d'une part car il a été bien caractérisé, et d'autre part car il permet une analyse directe, spécifique et sensible de la réaction de réparation du SPTpT en TpT, contrairement aux lésions incorporées dans une séquence d'ADN. Le fait que le SPTpT synthétisé soit exactement identique au SPTpT issu de l'hydrolyse enzymatique de l'ADN de thymus de veau irradié était un résultat très encourageant pour les tests enzymatiques, car ce dernier substrat est réparé par l'enzyme SPL reconstituée de *B. subtilis* (résultats obtenus par Olivier Berteau (Chandor *et al.*, 2006)).

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que premièrement la SPL sauvage de *B. subtilis* reconstituée est active *in vitro* et est spécifique de la lésion SP, et deuxièmement, que le SPTpT synthétisé est reconnu par la SPL reconstituée de *B. subtilis*, et converti à 100% en TpT, correspondant au produit réparé contenant deux thymines intactes. Avec ce substrat, la SPL est catalytique puisque en 60 minutes, 10 μM de lésion sont réparées par 1 μM d'enzyme. Ceci nous a permis de déterminer une constante d'affinité K_m de **6 μM** , ainsi qu'une V_{max} de **0,25 mol/molSPL/min**. Cette activité est 37 fois supérieure à celle obtenue pour le substrat SPTT (Friedel *et al.*, 2006a), avec la même protéine et dans des conditions comparables, soulignant ainsi l'importance du pont phosphodiester pour l'activité de réparation en améliorant probablement la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Ceci suggère d'ailleurs que la SPL est plus efficace pour réparer une lésion intra-brin qu'une lésion inter-brin (représentée par SPTT), comme attendu car une majorité de lésions intra-brin est obtenue dans l'ADN des spores de *B. subtilis* (Douki *et al.*, 2005a).

Pour en revenir aux activités, celle que nous avons mesurée avec notre enzyme est 50 fois inférieure à celle mesurée par J.B. Broderick, dans le cas de l'étude réalisée avec la SPL de *B. subtilis* et la lésion SP contenue dans un ADN double brin. Ceci suggère que la chaîne d'acides nucléiques améliore probablement la reconnaissance de la lésion par l'enzyme. Toutefois, la comparaison est délicate car les conditions de réparation sont différentes : pour

J.B. Broderick, il ne s'agit pas d'une protéine reconstituée mais d'une protéine purifiée contenant déjà son centre métallique (3,1 fer et 3,0 soufre par monomère), ce qui peut avoir une influence sur l'activité (Buis *et al.*, 2006).

Ces résultats signifient néanmoins qu'un substrat minimum, composé de deux thymines reliées par un pont phosphate, peut être reconnu et réparé par l'enzyme, sans qu'il y ait nécessairement besoin d'une chaîne d'acides nucléiques. Ceci suggère que le site actif de l'enzyme est conçu de manière à reconnaître seulement le dinucléotide à réparer, probablement par un mécanisme de type « base-flipping », comme rencontré dans les photolyases (Mees *et al.*, 2004, Sancar, 2003). Dans ce mécanisme, représenté Schéma 48, la première étape consiste en la reconnaissance de la lésion par la protéine. La lésion est alors positionnée de façon extrahélicoïdale par rapport à l'ADN. Une fois reconnue par l'enzyme, la lésion est réparée. La dernière étape correspond à la dissociation du complexe enzyme-substrat.

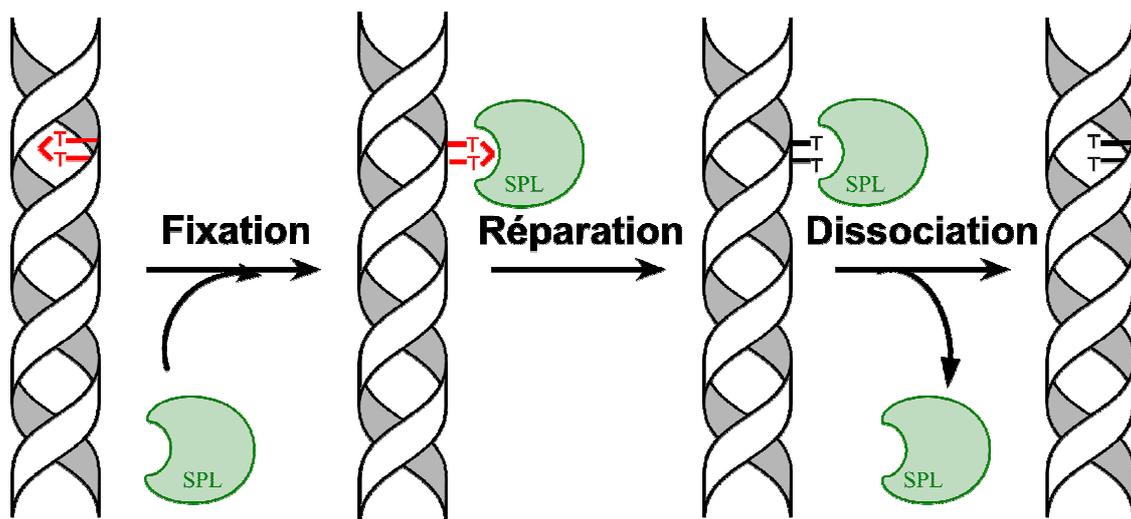


Schéma 48 : Mécanisme de « base-flipping » proposé pour la SPL. La lésion bascule en dehors de la matrice ADN afin d'être réparée par l'enzyme.

1.2. Le substrat oligonucléotidique

Les expériences réalisées avec les oligonucléotides 11merSP montrent qu'aucune activité de réparation n'est observée, que ce soit avec le substrat simple brin ou double brin, et avec la SPL sauvage ou mutée. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses, afin d'expliquer ce phénomène.

- i) Le 11merSP simple brin, même s'il a été purifié plusieurs fois, contient encore les photoproduits (6-4)PP TT et (6-4)PP TC en faible quantité, qui peuvent être des inhibiteurs de la réaction. Cependant, ces photoproduits étaient présents dans

l'ADN génomique lors de l'étude de la spécificité de substrats et nous avons montré qu'ils n'empêchaient pas la réparation du SP, donc cette hypothèse est peu probable. Cependant, il faut noter que dans ce dernier cas, la SPL était en large excès par rapport au SP, ce qui n'est pas le cas avec l'oligonucléotide, ceci peut constituer une différence notable ;

- ii) La SPL ne reconnaît pas le substrat oligonucléotidique 11mer sous la forme simple brin, même si T. Carell observe la réparation et donc la reconnaissance, par la SPL de *G. stearothermophilus*, du Photoproduit des spores contenu dans un oligonucléotide 6mer simple brin (Pieck *et al.*, 2006).
- iii) Dans le cas du double brin, aucune disparition du SP n'est observée. Il faut noter que l'hybridation a été effectuée en mélangeant 2 équivalents de 11mer complémentaire avec 1 équivalent de 11merSP, et est supposée être totale. Le « double brin » ainsi obtenu a été directement testé en réparation, et ce, sans purification du double brin ni vérification préalable de l'état d'hybridation. Il est possible que le 11mer complémentaire en excès inhibe la réaction de réparation.

De nombreuses mises au point (conditions d'hybridation, purification du double brin, concentrations enzyme/substrat, température, pH, ...) restent donc à effectuer pour l'étude de la réparation de ce substrat.

II. Activité de réductolyse de la SAM

Comme décrit en introduction, il existe une contradiction entre l'équipe de J.B. Broderick, et les équipes de W.L. Nicholson et T. Carell, en ce qui concerne le rôle de la SAM. L'équipe de J.B. Broderick, à la faveur d'expériences de marquage au tritium sur la SAM ou l'ADN-pUC18 contenant le SP¹⁴, propose un rôle catalytique pour la SAM (Buis *et al.*, 2006, Cheek *et al.*, 2002). Dans ce cas, la 5'-désoxyadénosine (AdoH) générée au cours de la réaction est immédiatement reconvertie en radical 5'-désoxyadénosyle (Ado•) par arrachement de l'atome d'hydrogène en 5' par un intermédiaire radicalaire de la réaction proposé comme étant localisé sur le méthyle d'une des deux thymines (Schéma 49). AdoH n'est donc pas accumulé dans le milieu et n'est donc pas observable par HPLC. Notons que pour les protéines de la famille « Radical-SAM », ce rôle catalytique de la SAM, pourtant très

¹⁴ Les mélanges réactionnels des tests enzymatiques de J.B. Broderick sont composés de 1 µM de SPL native, 4 mM de DTT, 3 mM de dithionite, 2 mM de SAM et environ 1 mM de lésion SP

économique pour la cellule, n'a été démontré que dans le cas de la Lysine 2,3-aminomutase (Moss *et al.*, 1987). En revanche, l'équipe de W.L. Nicholson observe la formation d'AdoH¹⁵, même sans ADN (8 % d'AdoMet convertie, 1,8 mol_{AdoH}/mol_{SPL}), et cette production est stimulée en présence d'ADN (10 % d'AdoMet convertie, 2,4 mol_{AdoH}/mol_{SPL}) (Rebeil *et al.*, 2001). De même, T. Carell, avec la SPL de *Geobacillus stearothermophilus*¹⁶, observe la formation d'AdoH sans substrat (1 mol_{AdoH}/mol_{SPLGdimère}). Cette production est également augmentée en présence du substrat SPTT, sans donner une quantification précise dans ce dernier cas (Pieck *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus ici concernant l'activité de réductolyse de la SAM par la protéine sauvage et la protéine mutée SPLBsC141A, sont en accord avec ceux de W.L. Nicholson et T. Carell. Ils indiquent clairement que la SPL dont le centre [Fe-S] est réduit, est capable de catalyser le clivage de la SAM, et ce, même sans substrat. Cette activité de réductolyse de la SAM est stimulée par ajout du substrat SPTpT. Durant la phase de conversion du SPTpT, 1 molécule d'AdoH est produite pour 1 molécule de TpT formée dans le cas de la SPLBs sauvage et une molécule de TpTSO₂H dans le cas de SPLBsC141A. L'utilisation de la SAM comme co-substrat a déjà été observée dans le cas de la lipoate synthase, pour laquelle 2 molécules d'AdoH sont produites par molécule d'acide lipoïque formée, car il y a deux liaisons C–H à activer (Cicchillo *et al.*, 2004). De même pour la biotine synthase, où deux molécules d'AdoH sont irréversiblement formées pour activer les deux liaisons C–H de la déthiobiotine (Guianvarc'h *et al.*, 1997, Lotierzo *et al.*, 2005, Shaw *et al.*, 1998).

Pour résumer, lorsque le substrat est absent, c'est-à-dire quand le SPTpT est omis du milieu ou lorsqu'il a été entièrement consommé (après 60 minutes de réaction), la formation d'AdoH est observée, ce qui est en accord avec les observations de W.L. Nicholson et T. Carell. En présence de substrat et durant la phase de conversion de celui-ci, une parfaite corrélation est observée entre la formation d'AdoH et la formation du produit de la réaction en présence du substrat SPTpT. La S-Adénosylméthionine est donc utilisée comme co-substrat par la SPL, avec une stoechiométrie 1 : 1 par rapport au substrat.

Enfin, dans le cas de la SPL mutée, la vitesse de disparition du SPTpT, ainsi que les vitesses d'apparition d'AdoH et de TpTSO₂H sont plus élevées que dans le cas de la protéine sauvage. Ceci peut notamment s'expliquer par la meilleure homogénéité en centres [Fe-S] de

¹⁵ L'expérience de W.L. Nicholson met en jeu la SPL de *B. subtilis* reconstituée (38 µM) et réduite par 3 mM de dithionite et mise en présence de 435 µM de SAM et de 0,6 µM de lésion SP.

¹⁶ Dans l'expérience de T. Carell, la SPL reconstituée chimiquement (50 µM) est mise en présence de 3 mM de dithionite, 5 mM de DTT, 450 µM de SAM et 1 mM de substrat.

la SPLBsC141A puisque cette protéine possède une plus grande proportion d'agrégats $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (spectroscopie Mössbauer) que la protéine sauvage, et donc une plus grande proportion de centre métallique « actif ».

III. Informations mécanistiques obtenues grâce à l'étude de la SPL mutée

L'équipe de W.L. Nicholson a montré que les spores pour lesquelles la SPL a été mutée au niveau de la 4^e cystéine (SPLBsC141A) ne survivent pas au rayonnement ultra-violet (Fajardo-Cavazos *et al.*, 2005). Pourtant, cette cystéine n'est pas ligand du centre $[4\text{Fe-4S}]$ et sa mutation en alanine n'affecte pas l'intégrité du cofacteur métallique (voir Partie I). Afin de comprendre le rôle de cette cystéine dans le mécanisme de réparation du Photoproduit des spores, nous avons effectué les tests enzymatiques avec ce mutant SPLBsC141A en présence du SPTpT.

Pour discuter les résultats que nous avons obtenus avec la protéine mutée, il est nécessaire de rappeler le mécanisme proposé par J.B. Broderick (Schéma 49). Dans une première étape, la SAM est clivée par le centre $[4\text{Fe-4S}]$ réduit pour donner de la méthionine et le radical 5'-désoxyadénosine. Ce radical arrache un hydrogène en position 6 de la thymine en 5', générant AdoH, ainsi qu'un premier radical 6-yl intermédiaire (**2**) (Cheek *et al.*, 2002). Ce dernier subit une β -scission rapide, comme proposé par T.P. Begley (Mehl *et al.*, 1999), ce qui conduit à la coupure du pont méthylène entre les deux thymines et à un radical (**3**) sur le méthyle de la thymine en 3'. Enfin, un atome d'hydrogène est de nouveau arraché à AdoH pour régénérer Ado•, qui peut initier la réparation d'une autre molécule de SPTpT, et ainsi de suite. On voit bien dans ce mécanisme que la cystéine 141 n'aurait pas de rôle dans le mécanisme catalytique.

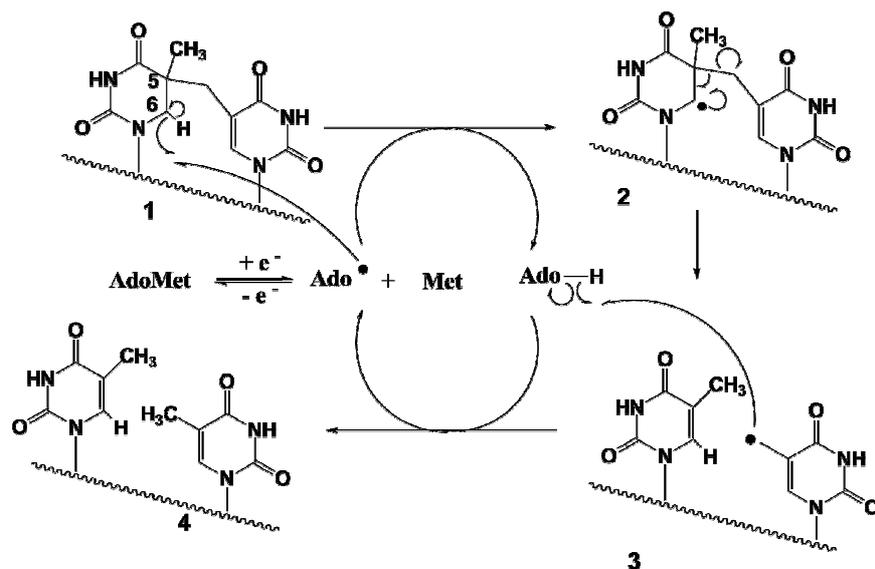


Schéma 49 : Mécanisme proposé par J.B. Broderick, dans lequel AdoMet est utilisée de façon catalytique (Buis *et al.*, 2006, Cheek *et al.*, 2002).

Avec la protéine SPLBsC141A reconstituée, nous avons observé que cette forme modifiée de la SPL est capable d'initier la réaction de réparation, car on observe la disparition totale du SPTpT. Cependant, celui-ci n'est pas réparé en 2 thymines intactes. A la place, on observe l'apparition de deux produits (A et B) qui sont des adduits SO₂H et OH de la dithymidine, l'adduit SO₂H étant majoritaire. Ces produits ont pu être caractérisés sans ambiguïté, tout d'abord par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem, ce qui nous a permis de déterminer que la fonction hydroxyle et la fonction acide sulfinique sont additionnées sur la thymine située côté 3' du dinucléotide. Cette attribution structurale a été confirmée par une modélisation chimique de la formation de ces adduits, en utilisant des dithymidines portant une fonction thiophényle photolabile sur le méthyle de la thymine côté 3' ou 5'. Cette expérience nous a permis de prouver que la présence de dithionite est bien à l'origine de l'adduit TpT_{SO}₂H, et que cette fonction acide sulfinique est additionnée spécifiquement sur le méthyle de la thymine en 3' par un couplage radicalaire entre le radical centré sur le méthyle et le radical provenant du dithionite en solution « SO₂^{•-} ».

L'étude de ce mutant nous a donc permis de piéger un intermédiaire radicalaire (formé au cours de la réaction de réparation) par des réactifs présents dans le milieu réactionnel, notamment le dithionite. Nos résultats apportent donc plusieurs informations d'importance concernant le mécanisme enzymatique. D'une part, nous montrons que la cystéine n'est pas impliquée dans les deux premières étapes de la réaction (disparition du SPTpT, formation d'AdoH de façon stœchiométrique). D'autre part, nous montrons que l'étape suivante correspond à la formation d'un radical centré sur le méthyle de la thymine en position 3' du

dinucléotide (**3** sur le Schéma 49), puisque nous l'avons piégé en présence de dithionite. Ce radical provient du réarrangement du premier intermédiaire 6-yl qui était sur la thymine en 5' (**2** sur le Schéma 49), conduisant à la rupture du lien entre les deux bases. Enfin, nos expériences ont prouvé qu'AdoH n'agit pas comme donneur final d'atome d'hydrogène avec SPTpT comme substrat puisque dans les expériences de marquage avec la SAM deutérée, aucun marquage n'a été retrouvé sur les thymines réparées.

Ces observations, qui conduisent à proposer un rôle pour la cystéine 141, peuvent se traduire par le Schéma 50. Dans ce schéma, les deux premières étapes (conduisant au radical **3**) sont identiques à celles proposées par J.B. Broderick. Seule la dernière étape est différente. En absence de la cystéine 141, le radical **3** ne conduit pas au produit final car il est piégé par le dithionite. Même si nous n'excluons pas un rôle structural de cette cystéine dans le contrôle des réactions radicalaires, le rôle que nous proposons pour cet acide aminé est de fournir un atome d'hydrogène au radical **3** pour obtenir le produit de la réaction.

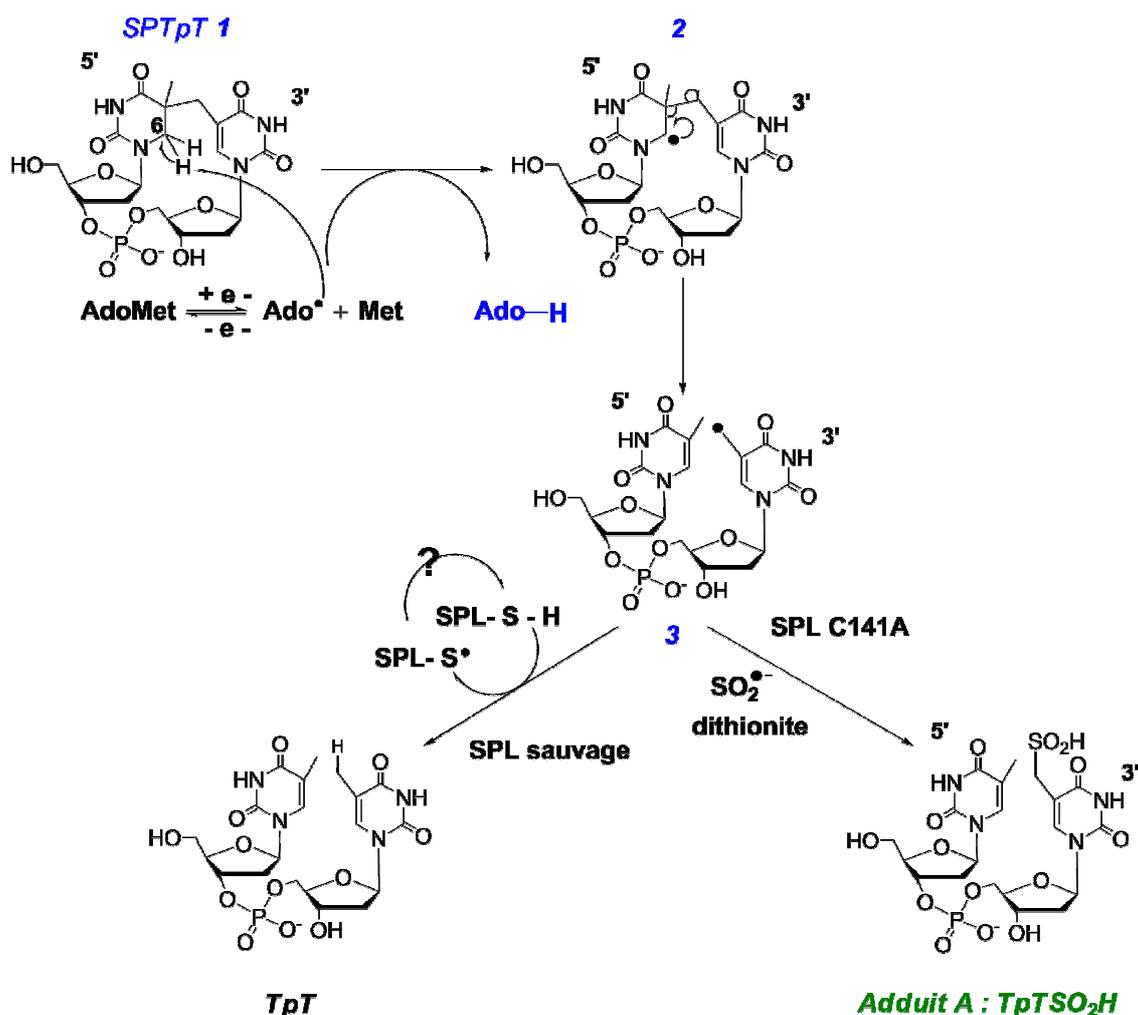


Schéma 50 : Résumé des observations réalisées grâce aux tests d'activité des SPL sauvage et C141A. AdoMet est la SAM

Cette hypothèse est étayée par les expériences de marquage de la SPL par du deutérium. Avec la protéine sauvage, la formation de TpT possédant un deutérium sur le méthyle en 3' est majoritairement observée (56,7 % contre 43,3 % de TpT non deutéré), contrairement à l'expérience avec la SPL ne possédant pas la cystéine 141 (79,7 % de TpT non deutéré contre 20,3 % de TpT deutéré). Le deutérium incorporé dans TpT lors de l'incubation avec la SPL sauvage proviendrait donc bien du thiol de la cystéine 141.

Se pose alors la question du devenir du radical thiyle ainsi formé, qui doit arracher un atome d'hydrogène pour régénérer la fonction thiol de la cystéine et permettre à la SPL d'être utilisée de façon catalytique, comme nous l'observons. Plusieurs possibilités peuvent se présenter.

- Premièrement, le radical thiyle arrache un atome d'hydrogène à AdoH formé. Même si cette réaction (arrachement d'un hydrogène d'une liaison C-H par le radical thiyle) est thermodynamiquement défavorisée (ΔG de l'ordre de + 20 kcal/mol), il est possible qu'*in vivo*, la situation soit différente, grâce à l'environnement protéique. Ceci a déjà été observé dans le cas des Ribonucléotide réductases de classe III (Knappe *et al.*, 2001). Dans cette hypothèse, sont régénérés à la fois le radical Ado• (qui peut alors initier une autre réparation du Photoproduit des spores), et également le thiol S-H de la cystéine, nécessaire pour terminer un nouveau cycle catalytique. La SAM serait donc utilisée de façon catalytique, ce qui n'est pas ce que nous observons *in vitro*.

- Deuxièmement, le radical thiyle arrache un atome d'hydrogène en C6 sur une nouvelle molécule de SPTpT (ce n'est plus Ado• qui arrache cet atome d'H). Dans ce cas, on ne verrait la production que d'une molécule d'AdoH par enzyme. De plus, avec le mutant, seule une molécule de SPTpT disparaîtrait alors que nous voyons que tout est consommé.

A ce jour, l'origine de l'atome d'hydrogène servant à régénérer le thiol n'a pas été identifiée. Une expérience envisageable serait l'utilisation d'un substrat marqué spécifiquement au niveau des hydrogènes en C6 du SPTpT, afin d'étudier le transfert de marquage du substrat soit vers la protéine soit vers AdoH.

Enfin, il nous a semblé important de discuter une dernière information, obtenue par les expériences de marquage. Elle concerne la différence entre la quantité de TpT deutéré et celle de TpT non deutéré qui n'est que peu élevée dans le cas de la SPL sauvage (56,7 % : 43,3 %). Deux hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer cette faible majorité de TpT deutéré. Premièrement, il pourrait y avoir un autre donneur d'hydrogène non échangé dans D₂O présent dans le milieu expliquant la formation des 43,3% du TpT non deutéré. Dans cette

hypothèse, lors du test d'activité classique avec le mutant, ce donneur devrait également être présent, et conduire donc à une quantité plus importante de TpT formé (au moins 40 % et non 10 %). Deuxièmement, et c'est l'hypothèse la plus probable, la deutération de la SPL est incomplète. D'une part, les tampons utilisés contiennent encore une proportion non négligeable d'H₂O (environ 5 %) provenant de la méthode de préparation de ceux-ci : ils ne sont pas tamponnés dans D₂O mais dans H₂O, puis dilués dans D₂O. Une solution serait de les tamponner avec DCl et NaOD dans D₂O, mais nous ne possédons pas le matériel nécessaire au laboratoire. D'autre part, la méthode la plus utilisée pour échanger les hydrogènes en deutériums consiste en général à lyophiliser l'échantillon puis à le dissoudre dans le tampon deutéré. Cependant, du fait de la sensibilité à l'oxygène du centre [Fe-S] et de la fragilité de la protéine, cette méthode n'a pas pu être employée. Une perspective intéressante serait de lyophiliser la SPL sous la forme « apoprotéine » (c'est-à-dire n'ayant pas son centre [Fe-S]) puis de la reconstituer chimiquement dans les tampons deutérés.

conclusion générale

Les lésions de l'ADN induites notamment par une exposition aux UV peuvent être, lorsqu'elles ne sont pas létales, source de mutations délétères pour les cellules.

Certains organismes procaryotes ont acquis un mécanisme leur permettant de se défendre très efficacement contre de tels phénomènes. Ainsi, les bactéries du genre *Bacillus* ou *Clostridium* peuvent former des endospores, une forme dormante de la bactérie, lorsque les conditions environnantes deviennent défavorables (carence du milieu en éléments nutritifs). Ces spores sont extrêmement résistantes à toutes sortes d'agents (chimiques, physiques,...), et en particulier à l'irradiation UV. Plusieurs phénomènes comme le compactage particulier de l'ADN, l'état de déshydratation ou encore la présence d'acide dipicolinique, sont responsables de la photochimie tout à fait originale de ce type de cellule. En effet, les lésions rencontrées dans l'ADN des spores irradiées par les UV surviennent exclusivement au niveau de deux thymines adjacentes et sont appelées le Photoproduit des spores (5-(α -thyminy)-5,6-dihydrothymine). A la germination, une enzyme de réparation de l'ADN, la Spore Photoproduit Lyase catalyse efficacement la réversion directe et spécifique de cette lésion.

Cette enzyme a été découverte dans les années 70, puis le clonage et le séquençage du gène en 1993 a ouvert la voie aux études structurales et fonctionnelles. L'analyse de la séquence en acides aminés a permis de découvrir des similarités avec d'autres protéines possédant toutes trois cystéines conservées selon le motif CxxxCxxC. Ce motif définit la famille d'enzymes « Radical-SAM », identifiée en 2001. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est articulé autour de trois axes : tout d'abord, la caractérisation biochimique et spectroscopique du centre métallique ; ensuite, la synthèse et la caractérisation structurale du SPTpT, un substrat minimum identique au Photoproduit des spores ; et pour finir, l'étude du mécanisme enzymatique. Ces trois axes ont requis une approche pluridisciplinaire impliquant entre autres la biologie moléculaire, la biochimie des protéines, l'enzymologie, la chimie de synthèse, la chimie analytique...

Tout d'abord, nous avons caractérisé le centre métallique des SPL de *B. subtilis* et de *C. acetobutylicum* de façon biochimique et spectroscopique, après avoir mis au point la production et la purification de ces deux protéines surexprimées dans un système bactérien. Nous avons montré que le centre [Fe-S] majoritairement présent est un $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ (Mössbauer, UV-visible, RPE), comme attendu, même si une certaine hétérogénéité, caractéristique des protéines appartenant à la famille des « radical-SAM », est observée. Ce centre possède un fer différencié non chélaté par les trois cystéines du motif CxxxCxxC qui fixe la SAM au niveau du groupement aminocarboxylate de la partie méthionine de la

molécule. Cette fixation est essentielle pour l'activation réductrice du sulfonium nécessaire à l'initiation de la réaction radicalaire. Cette caractérisation a donné lieu à la publication de deux articles donnés en annexe (Chandor *et al.*, 2006, Chandor *et al.*, 2007).

Ensuite, notre but étant d'étudier *in vitro* la réaction catalysée par la SPL, il nous fallait obtenir un substrat pur, en grande quantité et facilement quantifiable. Le Photoproduit des spores, sous la forme d'un dinucléoside monophosphate a été synthétisé et correspond à ces critères. Plusieurs résultats importants ont été obtenus. Notre méthode de synthèse (synthèse photochimique dans des conditions proches de celles des spores) ne conduit qu'à un seul diastéréoisomère sur les quatre possibles. Cet isomère est absolument identique au Photoproduit des spores isolé à partir d'ADN de spores irradiées (analyses HPLC, MS1, MS2) et représente donc un substrat potentiel de l'enzyme exactement identique à celui extrait des spores irradiées par les UV. La caractérisation détaillée et complète de ce substrat par RMN nous a permis d'identifier sans ambiguïté la position du carbone asymétrique (sur la base en 5') ainsi que sa configuration absolue *R*, qui avaient déjà été préalablement suggérés par des considérations stériques et de distance. Ces résultats représentent la première étude structurale complète du photoproduit naturel des spores, et ont également permis d'obtenir des informations nouvelles concernant le mécanisme de formation de la lésion (engagement du méthyle de la base en 3' dans le pont méthylène reliant les deux bases, créant le carbone asymétrique en 5'). La publication de ces résultats a été acceptée dans le *Journal of the American Chemical Society* (Mantel *et al.*, 2008).

Enfin, la purification et la caractérisation de la SPL ainsi que la synthèse d'un substrat, nous ont permis d'étudier le mécanisme de réparation, et notamment de valider une étape du mécanisme proposé par T.P. Begley et J.B. Broderick, mais jamais démontrée jusqu'ici.

Tout d'abord, la SPL purifiée et reconstituée de *B. subtilis* est active et répare spécifiquement le Photoproduit des spores au détriment des autres photoproduits. Plus particulièrement, le SPTpT, substrat minimum, est reconnu et entièrement réparé par la SPL. Ceci montre qu'un enchaînement d'acides nucléiques n'est pas nécessaire pour la reconnaissance du substrat, suggérant un mécanisme de type « base-flipping ».

Du point de vue du mécanisme réactionnel, nous observons qu'une molécule de SAM est réduite par le centre $[4Fe-4S]^{1+}$ de la SPL pour former un radical 5'-désoxyadénosine. Ce radical active le carbone 6 de la base en 5' du SP en lui arrachant son atome d'hydrogène, comme proposé et démontré par T.P. Begley et J.B. Broderick. Les études du mutant de la

SPL au niveau de la quatrième cystéine ont permis d'établir *in vitro* l'importance de la cystéine 141 dans la réparation complète de la lésion. En effet, le produit final de la réaction piégé dans les conditions du test enzymatique (présence de dithionite) avec le mutant a été identifié comme étant un intermédiaire radicalaire. Nous avons déterminé sans ambiguïté la position de ce radical sur le méthyle de la base en 3'. Ceci confirme l'hypothèse de T.P. Begley concernant le réarrangement par β -scission du radical centré sur le C6 de la base en 5' vers le méthyle en 3'. Par ailleurs, nos expériences nous permettent de proposer que la SAM soit utilisée comme cofacteur de façon stœchiométrique puisqu'une mole d'AdoH est produite pour une mole de SPTpT réparée, et d'autre part nous avons montré qu'AdoH n'est pas utilisé comme donneur final d'atome d'hydrogène. Ce dernier étant absent dans le cas du mutant, nous avons donc proposé que ce donneur soit le groupement thiol de la cystéine 141. Ces résultats sont présentés dans un article accepté dans le *Journal of Biological Chemistry* (Chandor-Proust *et al.*, 2008).

Les perspectives de ce travail sont multiples et pourraient entre autres permettre de répondre à plusieurs questions concernant le mécanisme réactionnel de la SPL.

- Concernant l'étude du rôle de la cystéine 141 dans le mécanisme réactionnel, il serait intéressant de substituer ce résidu par un acide aminé autre que l'alanine, comme par exemple, une sérine. En effet, cet acide aminé structuralement proche de la cystéine et possédant une fonction alcool au lieu de thiol pourrait permettre d'obtenir de plus amples informations sur le rôle structural ou catalytique de la cystéine 141 ;
- La compréhension du rôle *in vivo* de la cystéine 141 dans la réparation du Photoproduit des spores est importante. Pour cela, il est nécessaire de travailler avec des souches de *B. subtilis* dans lesquelles le gène chromosomique de la SPL a été rendu silencieux. Les souches seraient ensuite transformées avec des plasmides contenant le gène de la protéine sauvage ou mutée. Après irradiation UV des spores et extraction de l'ADN, une analyse quantitative et qualitative des produits éventuellement formés s'avèrerait informative. *In vivo*, dans le cas de la protéine mutée, soit la lésion SP n'est pas modifiée, et est donc la cause directe de la létalité des spores, soit l'intermédiaire radicalaire – que nous avons mis en évidence *in vitro* – donne lieu un produit plus toxique que le SP, soit il forme des adduits avec des protéines entourant l'ADN, causant la mortalité ;

- La synthèse de substrats oligonucléotidiques de différentes tailles serait intéressante afin d'étudier leur influence sur la cinétique de l'enzyme et donc d'obtenir des informations sur le mode de reconnaissance du substrat ;
- La résolution d'une structure tridimensionnelle de la protéine en présence d'un substrat et de la SAM permettrait de visualiser les différentes interactions impliquant la cystéine 141 ainsi que d'établir sa position par rapport au site actif et donc d'apporter des informations sur le rôle structural ou catalytique de cette cystéine ;
- Enfin, la synthèse d'inhibiteurs de la SPL pourrait s'avérer intéressante. La SPL pourrait en effet être une cible potentielle d'agents antibactériens pour la désinfection des lieux contaminés par des bactéries sporulantes pathogènes (*C. difficile*, *B. anthracis*...). Dans ce cas, une stratégie serait d'induire la formation du Photoproduit des spores par irradiation UV des lieux potentiellement contaminés par des spores de bactéries, puis d'empêcher la réparation du SP par l'emploi de molécules inhibitrices de la SPL.

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Observation au microscope de spores de <i>Bacillus subtilis</i> après coloration au vert de malachite. _____	25
Figure 2 : Structure des spores, d'après une image au microscope électronique _____	26
Figure 3 : Les différents types de spores, classées selon leur forme et leur position dans la bactérie initiale _____	27
Figure 4 : Les différentes étapes de la sporulation. Image de droite : microscopie de fluorescence à différentes étapes de la sporulation de <i>B. subtilis</i> – d'après D. Rudner HMS – Harvard. _____	28
Figure 5 : Les différentes étapes de la germination (Hashimoto et al., 1969). Temps de latence : de 1 à 20 minutes, phase I de la germination : quelques secondes, phase II : de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes. _____	30
Figure 6 : Orientation de la base syn ou anti par rapport au sucre _____	33
Figure 7 : De gauche à droite, conformation A, B et Z de l'ADN. _____	35
Figure 8 : La réparation de l'ADN par excision de nucléotides chez <i>E. coli</i> (Van Houten, 1990). _____	45
Figure 9 : Etapes de réparation d'ADN par une photolyase. La première étape, dite « base-flipping » est activée thermiquement (Sancar, 2003). La lésion, en jaune est positionnée dans le site actif de la protéine, puis la lésion est réparée par la photolyase. _____	48
Figure 10 : Motif 5-(α -thyminy)-5,6-dihydrothymine : le Photoproduit des spores. _____	49
Figure 11 : Pyridine-2,6-dicarboxylate de Calcium – DPA. _____	53
Figure 12 : Distances entre deux thymines adjacentes d'un ADN de conformation A. Les bases ont l'orientation anti. Distance « jaune » : 3,69 Å entre le méthyle de la base en 3' vers le C5 de la base en 5'. Distance « rouge » : 5,52 Å entre le méthyle de la base en 5' vers le C5 de la base en 3'. D'après le fichier pdb 1G4Q. _____	58
Figure 13 : Voie de synthèse selon Kim et coll. (Kim et al., 1995). _____	62
Figure 14 : Alignement des séquences d'acides aminés de SPL de différents organismes. La position du motif CxxxCxxC est surlignée en vert. La position de la quatrième cystéine est indiquée en rose. Celle-ci est située en position 141 (numérotation de <i>B. subtilis</i>) pour les espèces du genre <i>Bacillus</i> , et en position 77 pour les espèces du genre <i>Clostridium</i> . _____	65
Figure 15 : Résistance aux UV de spores de <i>B. subtilis</i> portant différentes mutations sur le gène <i>splB</i> . LD ₉₀ est la dose UV létale pour 90% de la population (Fajardo-Cavazos et al., 2005) _____	66

Figure 16 : Alignement d'une partie des séquences de différentes protéines possédant le motif CxxxCxxC conservé. LAM : Lysine 2,3-aminomutase ; PFL-AE : sous-unité activatrice de la Pyruvate-Formiate Lyase ; RNR-AE : sous-unité activatrice de la Ribonucléotide réductase anaérobie ; BioB : Biotine synthase ; SPL : Spore Photoproduct Lyase ; HemN : Coproporphyrinogène III oxydase ; MoaA : Biosynthèse des molybdoptérines ; HydE : Maturase des hydrogénases à fer. _____ 69

Figure 17 : Schéma issu de la structure tridimensionnelle de HemN d'après (Layer et al., 2003). Les atomes de fer sont indiqués en vert. Trois d'entre eux sont chélatés par les trois cystéines du motif CxxxCxxC C62, C66 et C69 (pointillés rouges). Le quatrième ligand du 4^e fer est le groupement aminocarboxylate de la SAM (pointillés bleus). Les atomes de soufre sont indiqués en jaune. _____ 73

Figure 18 : Structures des 6 protéines de la famille des « Radical-SAM » disponibles actuellement présentant toutes le repliement de type tonneau TIM. HemN : coproporphyrinogène III oxydase (code pdb 1olt), BioB : Biotine synthase (1r30), LAM : Lysine 2,3-aminomutase (2a5h), MoaA : protéine impliquée dans la biosynthèse d'un cofacteur à molybdène (1tv8), HydE : Maturase des hydrogénase à Fe (3ciw), TywI : protéine impliquée dans la modification de la wyosine (2z2u). _____ 74

Figure 19 : Signal d'absorption χ'' et sa dérivée $d\chi''/dB_0$ obtenus en faisant varier le champ B_0 . La dérivée du signal d'absorption permet de déterminer les grandeurs tensorielles g_x , g_y et g_z qui sont caractéristiques du centre paramagnétique étudié. _____ 108

Figure 20 : Alignement des séquences de SPL de différents organismes. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* (« B. amylo »), *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium acetobutylicum* (« C. aceto »). La numérotation indiquée pour repérer les cystéines conservées est celle de *B. subtilis*. Les cystéines indiquées en rouge sont celles du motif CxxxCxxC, retrouvé pour toutes les « Radical-SAM ». La 4^e cystéine conservée est indiquée en vert. * signifie acides aminés strictement conservés pour les 5 espèces de l'alignement, : signifie résidus fortement conservés et ayant des propriétés physico-chimiques proches. . signifie résidus moyennement conservés. _____ 127

Figure 21 : Chromatogrammes FPLC obtenus lors de la purification de la SPL. A : Profil d'élution de la colonne d'affinité. En bleu, détection UV du pic de protéine élué vers 250 mM d'imidazole. En rouge, conductivité, en noir pointillé, gradient linéaire de 30 à 500 mM d'imidazole. B : Colonne de filtration sur gel indiquant l'élution de la SPL (1^{er} pic UV) séparé de l'imidazole (2^e pic UV). _____ 129

Figure 22 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE réalisé pendant la purification de la SPL sauvage de *B. subtilis*. MW : « Molecular weight » : Marqueurs de masse moléculaire (la masse moléculaire des marqueurs protéiques est exprimée en kDa). Piste 1 : Extraits totaux. Piste 2 : Extraits solubles. Piste 3 : Extraits insolubles. Piste 4 : Non retenu sur la colonne d'affinité ; Piste 5 : Lavage avec le tampon A contenant 30 mM d'imidazole. Pistes 6 : Fractions obtenues pendant l'élution par le gradient d'imidazole. Piste 7 : SPL sans imidazole après colonne de filtration sur gel (HiPrep Desalting), pureté estimée à 86 %. _ 130

Figure 23 : Gels d'électrophorèse SDS-PAGE. Protéines purifiées SPL BsC141A (pureté 93 %) et SPL Ca (pureté 90 %). _____ 131

Figure 24 : Exemples de spectres UV-visibles enregistrés entre 250 et 800 nm. En rouge : SPL Bs sauvage (WT). En bleu : SPLBsC141A. _____ 132

Figure 25 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la purification en anaérobiose de la SPL sauvage de *C. acetobutylicum*. MW : Marqueurs de poids moléculaire. Piste 1 : Extraits solubles. Piste 2 : Lavage avec le tampon A contenant 30 mM d'imidazole. Piste 3 : Elution de la protéine par le gradient d'imidazole. _____ 133

Figure 26 : Détermination de l'état oligomérique des protéines. Profils d'élution obtenus lors des chromatographies sur Superdex-75 des SPL sauvage (A) et mutée (B) reconstituées de *B. subtilis*, réalisées à un débit de 0,3 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 200 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. _____ 134

Figure 27 : Spectres UV-visible des SPL reconstituées. A. SPL reconstituées sauvage (rouge) et mutée (bleu) de *B. subtilis*. B. SPL sauvage reconstituée de *C. acetobutylicum*. _____ 135

Figure 28 : Spectres Mössbauer (enregistrés à 4,2 K) obtenus pour les SPL sauvages de *B. subtilis* (SPLBs sauvage), *C. acetobutylicum* (SPLCa sauvage) et mutée SPLBsC141A. Les lignes de couleur correspondent aux différentes simulations des doublets présents dans les spectres : doublet bleu : $[4Fe-4S]^{2+}$, doublet rouge : $[2Fe-2S]^{2+}$, doublet rose : espèce de Fer non définie (C), doublet vert : Fe^{2+} octaédrique. _____ 137

Figure 29 : Spectre RPE de la SPL de *Bacillus subtilis* (190 μ M) exposée pendant 10 minutes à l'oxygène. Enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain 2.10^4 . _____ 138

Figure 30 : Analyse RPE de SPLCa sauvage. A. Suivi UV-visible de la réduction de centre $[Fe-S]$ de SPLCa sauvage. Agrandissement d'un spectre UV-visible entre 300 nm et 600 nm. SPLCa sauvage (200 μ M) avant réduction (trait plein) montrant la bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(II)$ à 420 nm. Après réduction (tirets) avec 2 mM de dithionite, la bande à 420 nm disparaît après 30 minutes. B. Spectre RPE en bande X. Enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain 2.10^5 . _____ 139

Figure 31 : Spectre RPE en bande X de la SPLCa sauvage reconstituée réduite en présence de SAM. La SPL (340 μ M) a été réduite par 10 équivalents de dithionite, puis 3 mM de SAM on été ajoutés. Spectre enregistré à 10 K, puissance 0,1 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, gain 2.10^5 . _____ 141

Figure 32 : Spectre Hyscore obtenu avec SPLCa sauvage reconstituée (240 μ M) enregistré à $g = 1,93$. Avant (A) et après (B) addition de 10 équivalents de SAM. _____ 142

Figure 33 : Caractérisation du SPTpT obtenu après irradiation de TpT en présence de DPA et purification. A. Chromatogramme HPLC enregistré à 260 nm ($R_t = 19,1$ min). B. Spectre de masse MS1 du SPTpT, l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ a un rapport m/z de 545,4 amu (masse moléculaire calculée : $546,4 \text{ g.mol}^{-1}$). _____ 153

Figure 34 : Détermination du coefficient d'absorption molaire ϵ du SPTpT. La droite de régression linéaire a pour équation $y = 11258 x$, $R^2 = 0,999$. _____ 154

Figure 35 : Comparaison des spectres de masse MS2 du SPTpT obtenu après irradiation de TpT en présence de DPA et du SPTpT_{spore} isolé de l'ADN de spores irradiées. A. Spectre MS2 du SPTpT. B. Spectre MS2 du SPTpT_{spore} issu de l'ADN des spores (Reproduction de la figure

- de T. Douki et coll. (Douki et al., 2003a)). L'ion précurseur est à $m/z = 545$ dans les deux spectres. _____ 155
- Figure 36 : Spectre ^1H du SPTpT enregistré dans D_2O à 500 MHz. _____ 158
- Figure 37 : Corrélations permettant de déduire le sens de fixation. A gauche : schématisation des corrélations sur la molécule grâce aux données issues de la carte $2\text{D } ^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC : $\text{H}_{1'\text{B}}/(\text{C}=\text{O})_{2\text{b}}$ (flèche rouge), $\text{H}_{6\text{b}}/\text{C}_{1'\text{B}}$ (flèche bleue), $\text{H}_{1'\text{A}}/(\text{C}=\text{O})_{2\text{a}}$ (flèche orange), $\text{H}_{1'\text{A}}/\text{C}_{6\text{a}}$ (flèche orange) et $\text{C}_{6\text{a}}/\text{CH}_3$ (flèche verte). Données issues de la carte $2\text{D } ^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HSQC (en rose) : corrélations $\text{H}_{3'\text{A}}/\text{P}$, et $\text{H}_{5'\text{B}/5'\text{B}}/\text{P}$. A droite : carte $2\text{D } ^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HSQC. _____ 160
- Figure 38 : Expériences ROESY. A : Récapitulatif des corrélations ROESY mettant en évidence les deux groupes de protons en avant du plan (orange) formé par la thymine A ou en arrière (bleu). B : Weft-ROESY ($t_m = 300$ ms) du SPTpT dans d_6 -DMSO. Les couplages significatifs pour la détermination de la configuration absolue du C5 sont encadrés de la même couleur que le groupe de protons correspondant. _____ 162
- Figure 39 : Structures les plus stables des isomères R et S de SPTpT obtenues par mécanique moléculaire puis optimisation DFT. _____ 163
- Figure 40 : Déplacements chimiques théoriques pour le ^{13}C à gauche et ^1H à droite en fonction du déplacement chimique expérimental du SPTpT dissout dans le DMSO. _____ 166
- Figure 41 : Analyses de la pureté et de l'intégrité de l'oligonucléotide 11mer. A. Chromatogramme HPLC du 11mer purifié. B. Spectre de masse MALDI-TOF _____ 167
- Figure 42 : Chromatogramme HPLC-MS/MS en mode MRM négatif de 138 pmol de 11merSP purifié et digéré enzymatiquement. _____ 169
- Figure 43 : Digestion enzymatique de l'oligonucléotide 11merSP par la phosphodiesterase II. _____ 170
- Figure 44 : Digestion enzymatique de l'oligonucléotide 11merSP par la phosphodiesterase I. _____ 171
- Figure 45 : Spécificité de l'activité de réparation du SP par la SPL. Quantité de photoproduits restant (en %) après 30 min d'incubation de la SPL de *B. subtilis* avec de l'ADN de thymus de veau irradié et contenant les photoproduits CPD TT, TC et CT, (6-4)PP TT et TC. Conditions : 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'ADN (25 μg), 10 μM de SPL, 1 mM de SAM, 2 mM de DTT et 2 mM de dithionite dans du tampon Tris HCl 100 mM, KCl 200 mM, pH 8. _____ 180
- Figure 46 : Réparation du SPTpT par la Spore Photoproduct Lyase de *B. subtilis*. A gauche : Chromatogrammes HPLC-MS/MS de conversion du SPTpT ($R_t = 20$ min) en TpT ($R_t = 26,6$ min). A droite : cinétique de réparation du SPTpT (●) en TpT (○) par la Spore Photoproduct Lyase de *B. subtilis*. _____ 182
- Figure 47 : Détermination des paramètres cinétiques de la SPL. A. Vitesse initiale de production de TpT en fonction de la concentration de SPTpT. B. Représentation en double inverse (ou représentation de Lineweaver et Burk). Droite violette d'équation $y = 23,5x + 3,9$, $R^2 = 0,9958$. _____ 183

Figure 48 : Activité de réductolyse de la SAM par la SPL sauvage de *B. subtilis* (1 μ M). En bleu, production d'AdoH par l'activité de réductolyse de la SAM en absence de substrat SPTpT. En rouge, production d'AdoH en présence de SPTpT. En noir, production de TpT. 184

Figure 49 : Activité *in vitro* de SPLBsC141A avec SPTpT. Chromatogramme HPLC-MS/MS obtenu après 20 minutes de réaction à 37°C de SPLBsC141A avec SPTpT dans les conditions données dans Matériels et Méthodes. _____ 185

Figure 50 : Cinétique de conversion de SPTpT en présence de SPLBsC141A. En noir cercles pleins (●) disparition du SPTpT, en noir cercles ouverts (○) apparition de TpT, triangles oranges (▲) apparition du produit minoritaire B de rapport masse sur charge 561, carrés verts (■) apparition du produit majoritaire A de rapport masse sur charge 609. _____ 186

Figure 51 : Activité de réductolyse de la SAM par la SPLBsC141A de *B. subtilis*. En bleu, production d'AdoH en absence de substrat SPTpT. En rouge, production d'AdoH en présence de SPTpT. En vert, production du produit majoritaire (A) de la réaction d'incubation de la SPLBsC141A avec SPTpT. _____ 187

Figure 52 : Spectre de fragmentation de l'adduit B en mode négatif. Le pic [M-Thy-H]⁻ de m/z = 435 (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3'), le pic [Thy-H]⁻ de m/z = 125 (en bleu) correspond à la thymine déprotonée perdue. Thy : Thymine. ThyOH : thymine hydroxylée. dRP : désoxyribose phosphate. dRPdR : didésoxyribose monophosphate. dTOHMP : thymidine monophosphate hydroxylée. M : ion parent. _____ 190

Figure 53 : Spectre de fragmentation de l'adduit A en mode négatif. Le pic [M-Thy-H]⁻ de m/z = 483 (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3'), le pic [M-ThySO₂-H]⁻ de m/z = 419 (en orange) correspond à la perte de la thymine modifiée en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base en 3') le pic [Thy-H]⁻ de m/z = 125 (en bleu) correspond à la thymine déprotonée perdue. Thy : Thymine. dRP : désoxyribose phosphate. dTMP : thymidine monophosphate. M : ion parent. _____ 191

Figure 54 : Spectre de fragmentation de l'adduit A en mode positif. Le pic [dTMPSO₂+H]⁺ de m/z = 369 (en vert) correspond à la thymidine monophosphate en 3' modifiée, le pic [dThd-H₂O+H]⁺ de m/z = 252 (en rouge) correspond thymidine déshydratée en 5' non modifiée. Thy : Thymine. Thd : Thymidine. dTMP : thymidine monophosphate. M : ion parent. _____ 192

Figure 55 : Chromatogrammes HPLC-MS/MS. Adduits SO₂H issus de l'irradiation en anaérobiose en présence de dithionite (I), adduits OH issus de l'irradiation en absence de dithionite (II). Comparaison avec les produits A et B obtenus lors de l'incubation de SPTpT avec SPLBsC141A (III). _____ 195

Figure 56 : Spectres de fragmentation en mode négatif des adduits SO₂H obtenus après irradiation de TpT Φ et TS Φ pT. I. Spectre MS2 de TpTSO₂H. II. Spectre MS2 de TSO₂HpT. _____ 197

Figure 57 : Mesure des proportions (%) des formes isotopiques du TpT dans H₂O dues à la l'abondance naturelle du ¹³C. Une moyenne a été faite sur 12 échantillons. _____ 201

Figure 58 : Proportions relatives en % des différents ions de masse M , $M+1$, $M+2$ et $M+3$ du TpT formé lors de la réaction de SPTpT avec la SPL sauvage deutérée (en bleu), et non deutérée (en gris, dues à l'abondance naturelle du ^{13}C). _____ 202

Figure 59 : Spectre de fragmentation MS2 en mode négatif de TpT ayant incorporé un deutérium. Spectre obtenu lors de l'expérience avec échange H/D de la SPL sauvage incubée avec SPTpT. Le pic $[M\text{-Thy-H}]^-$ de $m/z = 420$ (en orange) correspond à la perte de la thymine en 5' (dinucléoside monophosphate avec une seule base deutérée en 3'), le pic $[\text{Thy-H}]^-$ de $m/z = 125$ (en bleu) correspond à la thymine déprotonée perdue. Thy : Thymine. dRP : désoxyribose phosphate. dRPdR : didésoxyribose monophosphate. d-dTMP : thymidine monophosphate deutérée. M : ion parent. _____ 203

Table des schémas

Schéma 1 : Cycle de vie des bactéries sporulantes. _____	24
Schéma 2 : Structure des quatre bases de l'ADN et des nucléotides. Adénine (A), Thymine (T), Cytosine (C) et Guanine (G). Numérotation des carbones du 2'-désoxyribose de 1' à 5'. B représente une des quatre bases de l'ADN. Les N en vert indiquent les azotes impliqués dans la liaison N-glycosidique avec le désoxyribose. _____	31
Schéma 3 : Structure des nucléotides dans l'ADN et complémentarité des bases selon Watson et Crick : A – T, C – G _____	32
Schéma 4 : Forme enveloppe (E), 1 atome est en dehors du plan formé par les 4 autres. Forme (T), deux atomes adjacents sont de part et d'autre du plan formé par les 3 autres. ____	34
Schéma 5 : Notation endo/exo du « puckering » du sucre. _____	34
Schéma 6 : Exemples de lésions subies par l'ADN. _____	37
Schéma 7 : Exemples de lésions fréquemment rencontrées dans l'ADN. a) Désamination. b) Rupture de la liaison N-Glycosidique conduisant à la formation de site abasique. c) Oxydation de la guanine par HO• conduisant à la formation de 8-oxo-2'-désoxyguanosine. dR signifie désoxyribose. _____	38
Schéma 8 : Effet indirect des UV-A sur l'ADN via un photosensibilisateur P. B signifie la base nucléique _____	39
Schéma 9 : Structure chimique du dimère cyclobutabipyrimidique TT, et les différents diastéréoisomères. dR signifie désoxyribose. _____	41
Schéma 10 : Structures chimiques des photoproduits (6-4) et formation de l'isomère de valence Dewar. _____	42
Schéma 11 : Conséquences biologiques des lésions sur l'ADN. _____	43
Schéma 12 : Représentation des cofacteurs des photolyases et mécanisme réactionnel. F2 absorbe un photon et transfère son énergie à F1, étapes (1) et (2). La flavine réduite excitée transfère un électron au dimère Pyr<>Pyr. La monomérisation s'effectue par voie concertée (3), avec rétro-donation d'un électron à FADH• (F1•), afin de le régénérer dans sa forme catalytiquement active (4). _____	47
Schéma 13 : Principe de la méthode utilisée par Douki et coll. pour l'analyse des lésions bipyrimidiques (Douki et al., 2003b). _____	56
Schéma 14 : Les quatre diastéréoisomères du Photoproduit des spores obtenus selon l'orientation des bases syn ou anti et l'origine du méthyle engagé dans le pont méthylène. La notation « 3' S » signifie que le carbone asymétrique est sur la base en 3' et de configuration absolue S. _____	57

Schéma 15 : Les deux hypothèses concernant le mécanisme de formation du SP : (1) voie radicalaire proposée par Varghese, (2) voie concertée proposée par Cadet. _____	59
Schéma 16 : Les centres [Fe-S] majoritairement rencontrés dans les protéines. Cys : cystéine. _____	67
Schéma 17 : Mécanisme commun à toutes les protéines « Radical-SAM » : Réductolyse de la S-Adénosylméthionine avec formation du radical 5'-désoxyadénosyle (Ado•). _____	69
Schéma 18 : Observation du radical Ado• stabilisé par P.A. Frey et al. _____	70
Schéma 19 : Piégeage du radical 5'-désoxyadénosine par l'octapeptide, où seule la déshydroalanine est représentée. _____	71
Schéma 20 : Les deux mécanismes hypothétiques de formation du radical 5'-désoxyadénosyle. (Fontecave et al., 2004) _____	71
Schéma 21 : Mécanisme des deux sous-familles de « Radical-SAM ». S-H représente le substrat. Gly-H représente le résidu Glycine de l'enzyme. _____	72
Schéma 22 : Fragmentation du modèle du Photoproduit des spores faisant intervenir un probable intermédiaire radicalaire dans la réaction de réparation du SP par la SPL, en position 6 (Mehl et al., 1999). _____	75
Schéma 23 : Mécanisme deréparation par la SPL proposé par J.B. Broderick (Cheek et al., 2002). * signifie que du marquage est retrouvé sur la SAM (AdoMet) _____	76
Schéma 24 : Schématisation de l'expérience de transfert de marquage de la SAM vers la thymine réparée (Buis et al., 2006). * signifie que du tritium est présent dans la molécule. _	76
Schéma 25 : Principe de l'expression sous contrôle des promoteurs T7. A gauche, pas d'induction : le gène lacI exprime le répresseur lac, réprimant l'expression de l'ARN T7 polymérase. A droite, l'IPTG empêche le répresseur lac de se fixer sur le promoteur de l'ARN T7 polymérase, il y a traduction. _____	81
Schéma 26 : Schématisation des fonctions des enzymes utilisées dans cette étude. _____	94
Schéma 27 : Cycle de synthèse d'oligonucléotides sur support solide faisant appel à la méthode au phosphoramidite. _____	100
Schéma 28 : Principe de la RPE selon l'effet Zeeman – séparation des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique externe. _____	107
Schéma 29 : Niveaux d'énergie correspondant au couplage hyperfin entre un spin électronique $S = 1/2$ et un spin nucléaire $I = 1$. _____	110
Schéma 30 : Exemple de spectre Hyscore. _____	111
Schéma 31 : Principe de l'effet Mössbauer _____	112
Schéma 32 : Déplacement isomérique δ et éclatement quadripolaire ΔE_q des composés du ^{57}Fe ; schématisation des spectres Mössbauer résultants _____	113

- Schéma 33 : Ensemble de N spins nucléaires identiques ($1/2$). M^0 représente la résultante des moments magnétiques μ . Influence du champ $B1$. M s'écarte de Z et possède deux composantes : M_Z et M_{XY} . _____ 115
- Schéma 34 : Système de vanne d'injection. Position load, à gauche, remplissage de la boucle de volume fixe. Position inject, à droite, le solvant venant de la pompe pousse l'échantillon dans la colonne _____ 119
- Schéma 35 : Représentation schématique d'une source électrospray (en mode positif) associée à un analyseur triple quadripôles. _____ 120
- Schéma 36 : Résumé des interconversions proposées des centres $[Fe-S]$ pour la SPL. La reconstitution chimique de l'apoprotéine conduit majoritairement à la formation du centre $[4Fe-4S]^{2+}$, mais la présence de $[2Fe-2S]^{2+}$ est également observée par Mössbauer. L'exposition à l'oxygène de la SPL reconstituée conduit à la formation du centre $[3Fe-4S]^{1+}$. Comme pour de nombreuses protéines de la famille « Radical-SAM », le $[3Fe-4S]^{1+}$ et le $[2Fe-2S]^{2+}$ sont complètement dégradés par exposition prolongée à d'oxygène et conduisent dans ces conditions à l'apoprotéine. _____ 145
- Schéma 37 : Les trois étapes de la synthèse du TpT. Couplage, Oxydation du P^{III} en P^V et détritylation _____ 150
- Schéma 38 : Synthèse du SPTpT par photochimie à partir du TpT. Formation potentielle des 4 diastéréoisomères SPTpT 5' « 5' R » et « 5' S » et SPTpT 3' « 3' R » et « 3' S ». _____ 152
- Schéma 39 : Analogues du Photoproduit des spores synthétisés et caractérisés par RMN. Le dinucléoside sans le pont phosphate est noté SPTT, le dinucléoside dont les sucres sont reliés par une chaîne alkyle est noté SPT=T. Kim et coll., Friedel et coll. ont tous synthétisé et caractérisé à chaque fois les deux isomères R et S. _____ 156
- Schéma 40 : Numérotation des hydrogènes et carbones du SPTpT. La position du méthyle inchangé sur le côté 5' (base A) n'a été complètement établie qu'en cours d'analyse RMN. La numérotation est utilisée indifféremment pour le carbone et le(s) atome(s) d'hydrogène correspondant(s). A titre d'exemple, 1' est utilisé pour l'hydrogène H1' porté par le carbone C1'. _____ 157
- Schéma 41 : Synthèse photochimique du Photoproduit des spores. Conditions : Plusieurs irradiations UV-C sous forme de films secs, en présence de DPA, que ce soit pour l'irradiation de TpT ou de l'oligonucléotide. _____ 172
- Schéma 42 : Réaction suivie par HPLC-MS/MS. Réparation éventuelle par la SPL du SPTpT en TpT non modifié. _____ 181
- Schéma 43 : Fragmentation typique des dinucléosides monophosphates non modifiés en mode négatif. Exemples de dUpT et TpdU. _____ 189
- Schéma 44 : Fragmentation typique des dinucléosides monophosphates non modifiés en mode positif. Exemples de dUpT et TpdU. _____ 192
- Schéma 45 : Dérivés thiophénylés précurseurs de radical. $TS\Phi pT$: 5-(thiophénylméthyl)-2'-désoxyuridylyl-(3' \rightarrow 5')-thymidine. $TpTS\Phi$: thymidylyl-(3' \rightarrow 5')-5-(thiophénylméthyl)-2'-

désoxyuridine. En bas, schéma de la rupture homolytique de la liaison C – S par irradiation UV. _____ 194

Schéma 46 : Récapitulatif des adduits obtenus après irradiation de TS Φ pt et TpTS Φ . dR : désoxyribose, P pont phosphodiester. _____ 196

Schéma 47 : Principe du test d'activité effectué dans D₂O. Après échange de la protéine et réaction avec SPTpT, les échantillons doivent être rééchangés afin de ne pas perturber l'analyse par la présence de deutériums échangeables. _____ 200

Schéma 48 : Mécanisme de « base-flipping » proposé pour la SPL. La lésion bascule en dehors de la matrice ADN afin d'être réparée par l'enzyme. _____ 207

Schéma 49 : Mécanisme proposé par J.B. Broderick, dans lequel AdoMet est utilisée de façon catalytique (Buis et al., 2006, Cheek et al., 2002). _____ 211

Schéma 50 : Résumé des observations réalisées grâce aux tests d'activité des SPL sauvage et C141A. AdoMet est la SAM _____ 212

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison de quelques propriétés des spores et des cellules végétatives. ____	27
Tableau 2 : Données sur la structure de l'ADN idéal respectivement A, B et Z. (Voet et al., 2002). _____	35
Tableau 3 : amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée sur le gène <i>splB</i> . Les bases mutées sont indiquées en gras / couleur bleue. Les codons soulignés codent alors pour une alanine. _____	84
Tableau 4 : Conditions d'amplification par PCR. Etape 1 : Dénaturation de l'ADN parental. Etape 2 : Amplification de l'ADN muté. Ce cycle est répété 16 fois de suite. Etape 3 : Elongation de l'ADN muté. _____	85
Tableau 5 : gamme étalon pour le dosage du fer dans les protéines. _____	90
Tableau 6 : gamme étalon pour le dosage de soufre dans les protéines. _____	91
Tableau 7 : Concentrations finales dans les tubes eppendorfs de chaque réactif. _____	95
Tableau 8 : Rendements obtenus en mg de SPL et pureté estimée sur le gel d'électrophorèse pour 10 L de culture en milieu LB. _____	131
Tableau 9 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus par simulation (des spectres à 4,2 K) pour les SPL reconstituées sauvage SPL Bs et SPL Ca. Les nombres entre parenthèses sont les incertitudes sur le (ou les deux) dernier(s) chiffre(s). _____	137
Tableau 10 : Paramètres et quantités relatives des doublets Mössbauer obtenus par simulation (des spectres à 4,2 K) pour la SPL mutée de <i>B. subtilis</i> SPLBsC141A. Les nombres entre parenthèses sont les incertitudes sur le dernier chiffre. _____	138
Tableau 11 : Données permettant l'identification des photoproduits bipyrimidiques CPD et (6-4)PP. Transitions utilisées et temps de rétention (Rt), pour chaque photoproduit. _____	153
Tableau 12 : Récapitulatif des expériences RMN réalisées dans D ₂ O ou DMSO. _____	157
Tableau 13 : Données RMN ¹ H et ¹³ C du SPTpT dans D ₂ O enregistrées à température ambiante. a. obtenues avec une séquence HMBC, b. obtenues avec des expériences NOESY. _____	159
Tableau 14 : Données RMN ¹ H et ¹³ C du SPTpT dans DMSO enregistrées à température ambiante. a. obtenues avec une séquence HMBC, b. obtenues avec des expériences ROESY. _____	161
Tableau 15 : Tableau de vérité permettant de comparer les intensités de corrélation ROESY expérimentales aux intensités de corrélation théoriques pour les isomères R et S. Les cellules colorées indiquent un bon accord entre théorie et expérience. _____	164

Tableau 16 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C expérimentaux dans D_2O et DMSO et théoriques pour les diastéréoisomères R ou S du SPTpT. Les nombres en gras sont ceux pour lesquels un bon accord avec les valeurs expérimentales est observé, ceux en italique un mauvais accord. _____ 165

Tableau 17 : Composition des mélanges réactionnels à irradier. + signifie en présence d' O_2 ou de dithionite, – signifie en absence d' O_2 ou de dithionite. _____ 194

Tableau 18 : Transitions utilisées pour la détection de SPTpT (« M » $m/z = 545$), TpT (« M » $m/z = 545$) et TpT deutéré (« M+1 » $m/z = 546$). _____ 198

Tableau 19 : Vitesses initiales de réaction dans H_2O ou D_2O avec les SPL de *B. subtilis* sauvage ou mutée. _____ 201

Tableau 20 : Proportion des différents ions TpT ayant incorporé 1,2 ou 3 atomes de deutérium lorsque la SPL sauvage est incubée dans D_2O en présence de SPTpT. Une moyenne a été faite sur tous les échantillons de 3 expériences. _____ 202

Tableau 21 : Test de réparation du SP (10 μM de SP contenu soit dans SPTpT soit dans l'oligonucléotide double brin « 11merSPdb ») à 25°C en présence de SPLBs sauvage ou SPLBsC141A (1 μM), de dithionite (1,5 mM), de DTT (2,5 mM) et de SAM (1,5 mM). Les quantités sont données en μM , et sont les résultats obtenus après 120 minutes de réaction à 25°C . _____ 205

Références
bibliographiques

– A –

Alcantara R, Wang SY (1965), Photochemistry of thymine in aqueous solution. *Photochemistry and Photobiology*, 4, pp. 473-476.

Altona C, Sundaralingam M (1973), Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. Improved method for the interpretation of proton magnetic resonance coupling constants. *Journal of the American Chemical Society*, 95, 7, pp. 2333-44.

Aubin F (2001). Rayonnement ultraviolet et peau. pp. 9-16. John Libbey Eurotext.

Avery OT, McLeod CM, McCarthy M (1944), Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79, pp. 137-158.

Azhayev AV (1999), A new universal solid support for oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron*, 55, 3, pp. 787-800.

– B –

Baraniak J, Moss ML, Frey PA (1989), Lysine 2,3-aminomutase. Support for a mechanism of hydrogen transfer involving S-adenosylmethionine. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 3, pp. 1357-60.

Beinert H (1983), Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical Biochemistry*, 131, 2, pp. 373-8.

Bellon S, Ravanat JL, Gasparutto D, Cadet J (2002), Cross-linked thymine-purine base tandem lesions: synthesis, characterization, and measurement in gamma-irradiated isolated DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 4, pp. 598-606.

Bergstrom DE, Rash KF (1977), Synthesis of a Photoproduct from UV-irradiated bacterial-spores - 5,6-dihydro-5-(alpha-thyminy)thymine. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 174, Sep, pp. 4-4.

Bergstrom DE, Rash KF (1979), Synthesis of 5,6-dihydro-5-(alpha-thyminy)thymine. *Journal of Organic Chemistry*, 44, 9, pp. 1414-1417.

Berkovitch F, Nicolet Y, Wan JT, Jarrett JT, Drennan CL (2004), Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science*, 303, 5654, pp. 76-9.

Birch OM, Fuhrmann M, Shaw NM (1995), Biotin synthase from Escherichia coli, an investigation of the low molecular weight and protein components required for activity in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 32, pp. 19158-65.

Blaschkowski HP, Neuer G, Ludwig-Festl M, Knappe J (1982), Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in Escherichia coli. CoA-acylating pyruvate: flavodoxin and NADPH: flavodoxin oxidoreductases participating in the activation of pyruvate formate-lyase. *European Journal of Biochemistry*, 123, 3, pp. 563-9.

Bradford MM (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-54.

Brennan R, Matthews B (1989), The helix-turn-helix DNA-binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 4, pp. 1903-1906.

Brereton PS, Duderstadt RE, Staples CR, Johnson MK, Adams MW (1999), Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [Fe₄S₄] cluster of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties. *Biochemistry*, 38, 32, pp. 10594-605.

Broderick JB, Duderstadt RE, Fernandez DC, Wojtuszewski K, Henshaw TF, Johnson MK (1997), Pyruvate formate-lyase activating enzyme is an iron-sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society*, 119, pp. 7396-7397.

Broderick JB, Henshaw TF, Cheek J, Wojtuszewski K, Smith SR, Trojan MR, McGhan RM, Kopf A, Kibbey M, Broderick WE (2000), Pyruvate formate-lyase-activating enzyme: Strictly anaerobic isolation yields active enzyme containing a [3Fe-4S](+) cluster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269, 2, pp. 451-456.

Buis JM, Cheek J, Kalliri E, Broderick JB (2006), Characterization of an active spore photoproduct lyase, a DNA repair enzyme in the radical S-adenosylmethionine superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 36, pp. 25994-6003.

Bürckstümmer E, Carell T (2008), Synthesis and properties of DNA containing a spore photoproduct analog. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, pp.

– C –

Cadet J, Anselmino C, Douki T, Voituriez L (1992), Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B*, 15, 4, pp. 277-98.

Calzolari L, Gorst CM, Zhao ZH, Teng Q, Adams MW, La Mar GN (1995), ¹H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry*, 34, 36, pp. 11373-84.

Caruthers MH, Barone AD, Beaucage SL, Dodds DR, Fisher EF, McBride LJ, Matteucci M, Stabinsky Z, Tang JY (1987), Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods in Enzymology*, 154, pp. 287-313.

Caruthers MH, Beaucage SL, Efcavitch JW, Fisher EF, Matteucci MD, Stabinsky Y (1980), New chemical methods for synthesizing polynucleotides. *Nucleic Acids Symposium Series*, 7, pp. 215-23.

Chandor-Proust A, Berteau O, Douki T, Gasparutto D, Ollagnier-de-Choudens S, Atta M, Fontecave M (2008), DNA repair and free radicals: New insights into the mechanism of spore photoproduct lyase revealed by single mutation. *Journal of Biological Chemistry*, pp.

- Chandor A, Berteau O, Douki T, Gasparutto D, Sanakis Y, Ollagnier-de-Choudens S, Atta M, Fontecave M (2006), Dinucleotide spore photoproduct: A minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 37, pp. 26922-26931.
- Chandor A, Douki T, Gasparutto D, Gambarelli S, Sanakis Y, Nicolet Y, Ollagnier-De-Choudens S, Atta M, Fontecave M (2007), Characterization of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Clostridium acetobutylicum*: A radical-SAM enzyme. *Comptes Rendus Chimie*, 10, 8, pp. 756-765.
- Charlier M, Helene C (1972), Photochemical reactions of aromatic ketones with nucleic acids and their components. 3. Chain breakage and thymine dimerization in benzophenone photosensitized DNA. *Photochemistry and Photobiology*, 15, 6, pp. 527-36.
- Cheek J, Broderick JB (2002), Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 12, pp. 2860-1.
- Chen D, Walsby C, Hoffman BM, Frey PA (2003), Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe-4S] center in lysine 2,3-aminomutase. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 39, pp. 11788-9.
- Cheng DM, Sarma RH (1977), Intimate details of the conformational characteristics of deoxyribodinucleoside monophosphates in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 22, pp. 7333-48.
- Chirpich TP, Zappia V, Costilow RN, Barker HA (1970), Lysine 2,3-aminomutase. Purification and properties of a pyridoxal phosphate and S-adenosylmethionine-activated enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 7, pp. 1778-89.
- Chow F, Kempe T, Palm G (1981), Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides on Silica-Gel Support. *Nucleic Acids Research*, 9, 12, pp. 2807-2817.
- Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, Tu L, Booker SJ (2004), Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry*, 43, 21, pp. 6378-86.
- Cosper MM, Jameson GN, Davydov R, Eidsness MK, Hoffman BM, Huynh BH, Johnson MK (2002), The [4Fe-4S](2+) cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 47, pp. 14006-7.
- Cosper NJ, Booker SJ, Ruzicka F, Frey PA, Scott RA (2000), Direct FeS cluster involvement in generation of a radical in lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry*, 39, 51, pp. 15668-73.
- Crea R, Horn T (1980), Synthesis of Oligonucleotides on Cellulose by a Phosphotriester Method. *Nucleic Acids Research*, 8, 10, pp. 2331-2348.

– D –

- Daniel RA, Errington J (1993), Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 232, 2, pp. 468-83.
- Devivar RV, Koontz SL, Peltier WJ, Pearson JE, Guillory TA, Fabricant JD (1999), A new solid-phase support for oligonucleotide synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 9, pp. 1239-1242.
- Dobritzsch D, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y (2001), Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO Journal*, 20, 4, pp. 650-60.
- Donnellan JJ, Hosszu J, Rahn R, Stafford R (1968), Effect of temperature on the photobiology and photochemistry of bacterial spores. *Nature*, 219, 5157, pp. 964-5.
- Donnellan Jr. JE, Setlow RB (1965), Thymine photoproducts but not thymine dimers are found in ultraviolet-irradiated bacterial spores. *Science*, 149, pp. 308-310.
- Douki T, Cadet J (2001), Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry*, 40, 8, pp. 2495-501.
- Douki T, Cadet J (2003a), Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2, 4, pp. 433-6.
- Douki T, Court M, Cadet J (2000), Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 54, 2-3, pp. 145-54.
- Douki T, Laporte G, Cadet J (2003b), Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Research*, 31, 12, pp. 3134-42.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003c), Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*, 42, 30, pp. 9221-6.
- Douki T, Setlow B, Setlow P (2005a), Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and in vitro. *Photochemistry and Photobiology*, 81, 1, pp. 163-9.
- Douki T, Setlow B, Setlow P (2005b), Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4, 8, pp. 591-7.

– E –

Euzéby JP (2006). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale. La spore (endospore) bactérienne. <http://www.bacteriologie.net/generale/spore.html>.

– F –

Fajardo-Cavazos P, Rebeil R, Nicholson WL (2005), Essential cysteine residues in *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis. *Current Microbiology*, 51, 5, pp. 331-5.

Fajardocavazos P, Salazar C, Nicholson WL (1993), Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (SPL) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination. *Journal of Bacteriology*, 175, 6, pp. 1735-1744.

Fish WW (1988), Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods in Enzymology*, 158, pp. 357-64.

Fontecave M, Atta M, Mulliez E (2004), S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 5, pp. 243-9.

Fontecave M, Mulliez E, Ollagnier-de-Choudens S (2001), Adenosylmethionine as a source of 5'-deoxyadenosyl radicals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 5, pp. 506-11.

Frey PA, Booker SJ (2001), Radical mechanisms of S-adenosylmethionine-dependent enzymes. *Adv Protein Chem*, 58, pp. 1-45.

Frey PA, Hegeman AD, Ruzicka FJ (2008), The Radical SAM Superfamily. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 1, pp. 63-88.

Frey PA, Magnusson OT (2003), S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, 103, 6, pp. 2129-48.

Friedberg E (2003), DNA damage and repair. *Nature*, 421, 6921, pp. 436-440.

Friedel MG, Berteau O, Pieck JC, Atta M, Ollagnier-de-Choudens S, Fontecave M, Carell T (2006a), The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R-configured spore photoproduct DNA lesion. *Chem Commun (Camb)*, 4, pp. 445-7.

Friedel MG, Pieck JC, Klages J, Dauth C, Kessler H, Carell T (2006b), Synthesis and stereochemical assignment of DNA spore photoproduct analogues. *Chemistry*, 12, 23, pp. 6081-94.

– G –

Gait MJ, Singh M, Sheppard RC, Edge MD, Greene AR, Heathcliffe GR, Atkinson TC, Newton CR, Markham AF (1980), Rapid Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides .4.

Improved Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides through Phosphotriester Intermediates. *Nucleic Acids Research*, 8, 5, pp. 1081-1096.

Gambarelli S, Luttringer F, Padovani D, Mulliez E, Fontecave M (2005), Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase by S-adenosylmethionine. *ChemBioChem*, 6, 11, pp. 1960-2.

Goto-Ito S, Ishii R, Ito T, Shibata R, Fusatomi E, Sekine SI, Bessho Y, Yokoyama S (2007), Structure of an archaeal TYW1, the enzyme catalyzing the second step of wye-base biosynthesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63, Pt 10, pp. 1059-68.

Gould GW (2006), History of science--spores. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 3, pp. 507-13.

Guianvarc'h D, Florentin D, Tse Sum Bui B, Nunzi F, Marquet A (1997), Biotin synthase, a new member of the family of enzymes which uses S-adenosylmethionine as a source of deoxyadenosyl radical. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 2, pp. 402-6.

Gunzenhauser S, Biala E, Strazewski P (1999), Tetraethylene glycol-derived spacer for oligonucleotide synthesis. *Nucleosides & Nucleotides*, 18, 6-7, pp. 1223-1224.

Guo JD, Luo Y, Himo F (2003), DNA repair by spore photoproduct lyase: A density functional theory study. *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 40, pp. 11188-11192.

Gurbiel RJ, Ohnishi T, Robertson DE, Daldal F, Hoffman BM (1991), Q-band ENDOR spectra of the Rieske protein from *Rhodobacter capsulatus* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase show two histidines coordinated to the [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*, 30, 49, pp. 11579-84.

Guzaev AP, Manoharan M (2003), A conformationally preorganized universal solid support for efficient oligonucleotide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 9, pp. 2380-2381.

– H –

Hackett RH, Setlow P (1988), Properties of spores of *Bacillus subtilis* strains which lack the major small, acid-soluble protein. *J Bacteriol*, 170, 3, pp. 1403-4.

Hanzelmann P, Schindelin H (2004), Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 35, pp. 12870-5.

Hashimoto T, Frieben W, Conti S (1969), Germination of single bacterial spores. *J Bacteriol*, 98, 3, pp. 1011-20.

Holliday GL, Thornton JM, Marquet A, Smith AG, Rebeille F, Mendel R, Schubert HL, Lawrence AD, Warren MJ (2007), Evolution of enzymes and pathways for the biosynthesis of cofactors. *Natural Product Reports*, 24, 5, pp. 972-87.

– I –

Ifuku O, Koga N, Haze S, Kishimoto J, Wachi Y (1994), Flavodoxin is required for conversion of dethiobiotin to biotin in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 224, 1, pp. 173-8.

Ito H, Ike Y, Ikuta S, Itakura K (1982), Solid-Phase Synthesis of Polynucleotides .6. Further-Studies on Polystyrene Copolymers for the Solid Support. *Nucleic Acids Research*, 10, 5, pp. 1755-1767.

Ivanov VI, Minchenkova LE, Minyat EE, Frank-Kamenetskii MD, Schyolkina AK (1974), The B to A transition of DNA in solution. *Journal of Molecular Biology*, 87, 4, pp. 817-33.

– J –

Jarrett JT (2003), The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 2, pp. 174-82.

Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005), Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74, pp. 247-281.

– K –

Khorana HG (1961). *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*. Wiley, New York.

Kibbe WA (2007), OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35, Web Server issue, pp. W43-6.

Kim SJ, Lester C, Begley TP (1995), Synthesis of the dinucleotide spore photoproduct. *Journal of Organic Chemistry*, 60, pp. 6256-6257.

Knappe J, Wagner AF (2001), Stable glycy radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase (III). *Adv Protein Chem*, 58, pp. 277-315.

Koc H, Swenberg J (2002), Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 778, 1-2, pp. 323-343.

Krebs C, Broderick WE, Henshaw TF, Broderick JB, Huynh BH (2002), Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: a Mossbauer spectroscopic study. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 6, pp. 912-3.

Kumar P, Gupta KC (2003), Rapid cleavage of oligodeoxyribonucleotides from cis-diol-bearing universal polymer support. *Helvetica Chimica Acta*, 86, 1, pp. 59-64.

– L –

Lamola AA (1970), Triplet photosensitization and the photobiology of thymine dimers in DNA. *Pure and Applied Chemistry*, 24, 3, pp. 599-610.

Lauble H, Kennedy MC, Beinert H, Stout CD (1992), Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry*, 31, 10, pp. 2735-48.

Layer G, Kervio E, Morlock G, Heinz DW, Jahn D, Retey J, Schubert WD (2005), Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biological Chemistry*, 386, 10, pp. 971-980.

Layer G, Moser J, Heinz DW, Jahn D, Schubert WD (2003), Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *EMBO Journal*, 22, 23, pp. 6214-24.

Layer G, Verfurth K, Mahlitz E, Jahn D (2002), Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37, pp. 34136-42.

Lepore BW, Ruzicka FJ, Frey PA, Ringe D (2005), The x-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 39, pp. 13819-24.

Lindahl T (1993), Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 6422, pp. 709-15.

Lindberg C, Horneck G (1991), Action spectra for survival and spore photoproduct formation of *Bacillus subtilis* irradiated with short-wavelength (200-300 nm) UV at atmospheric pressure and in vacuo. *J Photochem Photobiol B*, 11, 1, pp. 69-80.

Lindsay JA, Murrell WG (1985), Changes in density of DNA after interaction with dipicolinic acid and its possible role in spore heat resistance. *Current Microbiology*, 12, pp. 329-334.

Lindsay JA, Murrell WG (1986), Solution spectroscopy of dipicolinic acid interaction with nucleic acids: role in spore heat resistance. *Current Microbiology*, 13, pp. 255-259.

Liu A, Graslund A (2000), Electron paramagnetic resonance evidence for a novel interconversion of [3Fe-4S](+) and [4Fe-4S](+) clusters with endogenous iron and sulfide in anaerobic ribonucleotide reductase activase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 17, pp. 12367-73.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J (2004). *Molecular Biology of the Cell*. WH Freeman NY, New York.

Lotierzo M, Tse Sum Bui B, Florentin D, Escalettes F, Marquet A (2005), Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem Soc Trans*, 33, Pt 4, pp. 820-3.

– M –

Magnusson OT, Reed GH, Frey PA (2001), Characterization of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical: An intermediate in the reaction of lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry*, 40, 26, pp. 7773-7782.

Mantel C, Chandor-Proust A, Gasparutto D, Douki T, Atta M, Fontecave M, Bayle P, Mouesca JM, Bardet M (2008), Combined NMR and DFT studies for the absolute configuration elucidation of the spore photoproduct, a UV-induced DNA lesion. *Journal of the American Chemical Society*, pp.

Matteucci MD, Caruthers MH (1981), Nucleotide Chemistry .4. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *Journal of the American Chemical Society*, 103, 11, pp. 3185-3191.

Mees A, Klar T, Gnau P, Hennecke U, Eker A, Carell T, Essen LO (2004), Crystal Structure of a Photolyase bound to a CPD-Like DNA Lesion after in Situ Repair. *Science*, 306, pp. 1789-93.

Mehl RA, Begley TP (1999), Mechanistic studies on the repair of a novel DNA photolesion: the spore photoproduct. *Organic Letters*, 1, 7, pp. 1065-6.

Mishina Y, Duguid EM, He C (2006), Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem Rev*, 106, 2, pp. 215-32.

Miyoshi KI, Arentzen R, Huang T, Itakura K (1980), Solid-Phase Synthesis of Polynucleotides .4. Usage of Polystyrene Resins for the Synthesis of Polydeoxyribonucleotides by the Phosphotriester Method. *Nucleic Acids Research*, 8, 22, pp. 5507-5517.

Mohr SC, Sokolov NV, He CM, Setlow P (1991), Binding of small acid-soluble spore proteins from *Bacillus subtilis* changes the conformation of DNA from B to A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 1, pp. 77-81.

Moir A (2006), How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101, 3, pp. 526-30.

Mortenson L, Carnahan J, Valentine R (1962), An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7, 6, pp. 448-&.

Moss M, Frey PA (1987), The role of S-Adenosylmethionine in the Lysine 2,3-Aminomutase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 31, pp. 14859-14862.

Mulliez E, Ollagnier-de Choudens S, Meier C, Cremonini M, Luchinat C, Trautwein AX, Fontecave M (1999), Iron-sulfur interconversions in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem*, 4, 5, pp. 614-20.

Mulliez E, Padovani D, Atta M, Alcouffe C, Fontecave M (2001), Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center. *Biochemistry*, 40, 12, pp. 3730-6.

Munakata N, Rupert CS (1974), Dark repair of DNA containing "spore photoproduct" in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 130, 3, pp. 239-50.

Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C (1995), SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 247, 4, pp. 536-40.

– N –

Ni J, Pomerantz C, Rozenski J, Zhang Y, McCloskey JA (1996), Interpretation of oligonucleotide mass spectra for determination of sequence using electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 68, 13, pp. 1989-99.

Nicewonger R, Begley T (1997), Synthesis of the spore photoproduct. *Tetrahedron Letters*, 38, 6, pp. 935-936.

Nicholson WL, Chooback L, FajardoCavazos P (1997), Analysis of spore photoproduct lyase operon (splAB) function using targeted deletion-insertion mutations spanning the *Bacillus subtilis* operons ptsHI and splAB. *Molecular and General Genetics*, 255, 6, pp. 587-594.

Nicholson WL, Fajardo-Cavazos P, Rebeil R, Slieman TA, Riesenman PJ, Law JF, Xue YM (2002), Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, 1-4, pp. 27-32.

Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000), Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 3, pp. 548-+.

Nicholson WL, Setlow B, Setlow P (1990), Binding of DNA in vitro by a small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology. *J Bacteriol*, 172, 12, pp. 6900-6.

Nicholson WL, Setlow B, Setlow P (1991), Ultraviolet irradiation of DNA complexed with alpha/beta-type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 19, pp. 8288-92.

Nicolet Y, Drennan CL (2004), AdoMet radical proteins--from structure to evolution--alignment of divergent protein sequences reveals strong secondary structure element conservation. *Nucleic Acids Research*, 32, 13, pp. 4015-25.

Nicolet Y, Rubach JK, Posewitz MC, Amara P, Mathevon C, Atta M, Fontecave M, Fontecilla-Camps JC (2008), X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 27, pp. 18861-72.

Nirenberg MW, Matthaei JH (1961), The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, pp. 1588-602.

– O –

Ollagnier-De Choudens S, Sanakis Y, Hewitson KS, Roach P, Baldwin JE, Munck E, Fontecave M (2000), Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase. *Biochemistry*, 39, 14, pp. 4165-73.

Ollagnier S, Meier C, Mulliez E, Gaillard J, Schunemann V, Trautwein AX, Mattioli T, Lutz M, Fontecave M (1999), Assembly of 2Fe-2S and 4Fe-4S Clusters in the Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 27, pp. 6344-6350.

Ollagnier S, Mulliez E, Schmidt PP, Eliasson R, Gaillard J, Deronzier C, Bergman T, Graslund A, Reichard P, Fontecave M (1997), Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 39, pp. 24216-23.

– P –

Paidhungat M, Setlow B, Driks A, Setlow P (2000), Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, 182, 19, pp. 5505-5512.

Patrick M, Gray D (1976), Independence of photoproduct formation on DNA conformation. *Photochemistry and Photobiology*, 24, 6, pp. 507-513.

Pedrazareyes M, Gutierrezcorona F, Nicholson WL (1994), Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA-Polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Bacteriology*, 176, 13, pp. 3983-3991.

Pershan P, Shulman R, Wyluda B, Eisinger J (1965), Electron spin resonance of irradiated DNA. *Science*, 148, 3668, pp. 378-&.

Petit C, Sancar A (1999), Nucleotide excision repair : from *E. Coli* to man. *Biochimie*, 81, 1-2, pp. 15-25.

Petrovich RM, Ruzicka FJ, Reed GH, Frey PA (1991), Metal cofactors of lysine-2,3-aminomutase. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 12, pp. 7656-60.

Petrovich RM, Ruzicka FJ, Reed GH, Frey PA (1992), Characterization of iron-sulfur clusters in lysine 2,3-aminomutase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 31, 44, pp. 10774-81.

Pieck JC, Hennecke U, Pierik AJ, Friedel MG, Carell T (2006), Characterization of a new thermophilic spore photoproduct lyase from *Geobacillus stearothermophilus* (splG) with defined lesion containing DNA substrates. *Journal of Biological Chemistry*, pp.

Pierrel F, Hernandez HL, Johnson MK, Fontecave M, Atta M (2003), MiaB protein from *Thermotoga maritima*. Characterization of an extremely thermophilic tRNA-methylthiotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 32, pp. 29515-24.

Pon RT, Yu SY (2001), Linker phosphoramidite reagents for oligonucleotide synthesis on underivatized solid-phase supports. *Tetrahedron Letters*, 42, 51, pp. 8943-8946.

Prescott MD, Harley JP, Klein DA (2007). Microbiologie. De Boeck Université.

– R –

Rahn R, Hosszu H (1969), Influence of relative humidity on the photochemistry of DNA films. *Biochimica et Biophysica Acta*, 190, 1, pp. 126-31.

Rebeil R, Nicholson WL (2001), The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* DNA repair enzyme spore photoproduct lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 16, pp. 9038-43.

Rebeil R, Sun YB, Chooback L, Pedraza-Reyes M, Kinsland C, Begley TP, Nicholson WL (1998), Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases. *Journal of Bacteriology*, 180, 18, pp. 4879-4885.

Roberts RJ (1995), On base flipping. *Cell*, 82, 1, pp. 9-12.

Romieu A, Bellon S, Gasparutto D, Cadet J (2000), Synthesis and UV photolysis of oligodeoxynucleotides that contain 5-(phenylthiomethyl)-2'-deoxyuridine: a specific photolabile precursor of 5-(2'-deoxyuridilyl)methyl radical. *Organic Letters*, 2, 8, pp. 1085-8.

Ryter A, Schaeffe P, Ionesco H (1966), Classification cytologique par leur stade de blocage des mutants de sporulation de *Bacillus subtilis* *Annales de l'Institut Pasteur*, 110, 3, pp. 305.

– S –

Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sancar A (2003), Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews*, 103, 6, pp. 2203-2237.

Setlow B, Atluri S, Kitchel R, Koziol-Dube K, Setlow P (2006), Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. *J Bacteriol*, 188, 11, pp. 3740-7.

Setlow B, Setlow P (1993), Dipicolinic Acid Greatly Enhances Production of Spore Photoproduct in Bacterial Spores upon UV Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2, pp. 640-643.

Setlow P (1988), Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annual Review of Microbiology*, 42, pp. 319-38.

Setlow P (2001), Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38, 2-3, pp. 97-104.

- Setlow P (2006), Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 3, pp. 514-25.
- Setlow R, Carrier W (1964), The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, pp. 226-31.
- Setlow RB (1966), Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science*, 153, 734, pp. 379-86.
- Shaw NM, Birch OM, Tinschert A, Venetz V, Dietrich R, Savoy LA (1998), Biotin synthase from *Escherichia coli*: isolation of an enzyme-generated intermediate and stoichiometry of S-adenosylmethionine use. *Biochem J*, 330 (Pt 3), pp. 1079-85.
- Shcherbakova PV, Fijalkowska IJ (2006), Translesion synthesis DNA polymerases and control of genome stability. *Frontiers in Bioscience*, 11, pp. 2496-517.
- Singh R, Farmer P (2006), Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis*, 27, 2, pp. 178-196.
- Slieman TA, Nicholson WL (2000a), Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1, pp. 199-205.
- Slieman TA, Nicholson WL (2001), Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3, pp. 1274-1279.
- Slieman TA, Rebeil R, Nicholson WL (2000b), Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thymine-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA. *J Bacteriol*, 182, 22, pp. 6412-7.
- Smith K, Yoshikawa H (1966), Variation in the photochemical reactivity of thymine in the DNA of *B. subtilis* spores, vegetative cells and spores germinated in chloramphenicol. *Photochemistry and Photobiology*, 5, 10, pp. 777-86.
- Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE (2001), Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research*, 29, 5, pp. 1097-106.
- Sun Y, Palasingam K, Nicholson WL (1994), High-pressure liquid chromatography assay for quantitatively monitoring spore photoproduct repair mediated by spore photoproduct lyase during germination of uv-irradiated *Bacillus subtilis* spores. *Analytical Biochemistry*, 221, 1, pp. 61-5.
- Suzuki Y, Noma A, Suzuki T, Senda M, Senda T, Ishitani R, Nureki O (2007), Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *Journal of Molecular Biology*, 372, 5, pp. 1204-1214.

– T –

Tamarit J, Mulliez E, Meier C, Trautwein A, Fontecave M (1999), The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S](2+) center. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 44, pp. 31291-6.

Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Nomura T, Ikenaga M (1996), Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*, 272, 5258, pp. 109-112.

Tovar-Rojo F, Chander M, Setlow B, Setlow P (2002), The products of the *spoVA* operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 184, 2, pp. 584-7.

Tyrell R (1978), Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems. *Photochemistry and Photobiology*, 27, pp. 571-579.

– U –

Ugulava NB, Gibney BR, Jarrett JT (2001), Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry*, 40, 28, pp. 8343-51.

– V –

Van Houten B (1990), Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbial Rev*, 54, 1, pp. 18-51.

Varghese AJ (1970), 5-Thymine-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem Biophys Res Commun*, 38, 3, pp. 484-90.

Voet D, Voet JG, Dulieu H (2002). Structure des acides nucléiques et leur manipulation. In: *Biochimie. Université D. B. ed.*, pp. 853.

– W –

Wagner AFV, Demand J, Schilling G, Pils T, Knappe J (1999), A dehydroalanyl residue can capture the 5'-deoxyadenosyl radical generated from S-adenosylmethionine by pyruvate formate-lyase-activating enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254, 2, pp. 306-310.

Walsby CJ, Hong W, Broderick WE, Cheek J, Ortillo D, Broderick JB, Hoffman BM (2002a), Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S](+) cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 12, pp. 3143-51.

Walsby CJ, Ortillo D, Broderick WE, Broderick JB, Hoffman BM (2002b), An anchoring role for FeS clusters: chelation of the amino acid moiety of S-adenosylmethionine to the unique

iron site of the [4Fe-4S] cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 38, pp. 11270-1.

Walsby CJ, Ortillo D, Yang J, Nnyepi MR, Broderick WE, Hoffman BM, Broderick JB (2005), Spectroscopic approaches to elucidating novel iron-sulfur chemistry in the "radical-Sam" protein superfamily. *Inorganic Chemistry*, 44, 4, pp. 727-41.

Wang SY, Alcantara R (1965), The possible formation of dithymine peroxide in irradiated DNA. *Photochemistry and Photobiology*, 4, pp. 477-481.

Wang TC, Rupert CS (1977), Transitory germinative excision repair in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 129, 3, pp. 1313-9.

Watson JD, Crick FH (1953), Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 4356, pp. 737-8.

Winterbourn CC (2008), Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4, 5, pp. 278-86.

– Z –

Zappia V, Barker HA (1970), Studies on lysine-2,3-aminomutase. Subunit structure and sulfhydryl groups. *Biochimica et Biophysica Acta*, 207, 3, pp. 505-13.

Annexes

Dinucleotide Spore Photoproduct, a Minimal Substrate of the DNA Repair Spore Photoproduct Lyase Enzyme from *Bacillus subtilis**

Received for publication, March 10, 2006, and in revised form, June 23, 2006 Published, JBC Papers in Press, July 8, 2006, DOI 10.1074/jbc.M602297200

Alexia Chandor^{#1,2}, Olivier Berteau^{#1,3}, Thierry Douki[§], Didier Gasparutto[§], Yannis Sanakis[¶], Sandrine Ollagnier-de-Choudens[‡], Mohamed Atta[‡], and Marc Fontecave^{#4}

From the [#]Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques, DRDC-CB, UMR 5047, Commissariat à l'Energie Atomique/CNRS/Université Joseph Fourier, 17 Rue des Martyrs 38054, Grenoble Cedex 09, France, [§]Service de Chimie Inorganique et Biologique UMR-E3, 5047 Commissariat à l'Energie Atomique/Université Joseph Fourier, Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France, and [¶]NCSR Demokritos, Institute of Materials Science, Ag. Paraskevi, 15310 Attiki, Greece

The overwhelming majority of DNA photoproducts in UV-irradiated spores is a unique thymine dimer called spore photoproduct (SP, 5-thymine-5,6-dihydrothymine). This lesion is repaired by the spore photoproduct lyase (SP lyase) enzyme that directly reverts SP to two unmodified thymines. The SP lyase is an *S*-adenosylmethionine-dependent iron-sulfur protein that belongs to the radical *S*-adenosylmethionine superfamily. In this study, by using a well characterized preparation of the SP lyase enzyme from *Bacillus subtilis*, we show that SP in the form of a dinucleoside monophosphate (spore photoproduct of thymidilyl-(3'-5')-thymidine) is efficiently repaired, allowing a kinetic characterization of the enzyme. The preparation of this new substrate is described, and its identity is confirmed by mass spectrometry and comparison with authentic spore photoproduct. The fact that the spore photoproduct of thymidilyl-(3'-5')-thymidine dimer is repaired by SP lyase may indicate that the SP lesion does not absolutely need to be contained within a single- or double-stranded DNA for recognition and repaired by the SP lyase enzyme.

The DNA of all organisms is subject to modifications upon exposure to a wide variety of chemical and physical agents. Among them, solar ultraviolet radiation is known to induce dimerization reactions between adjacent pyrimidines (1). In the vast majority of living systems, the resulting photoproducts are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)⁵ and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (Scheme 1A) that can be generated

at any of the four bipyrimidine doublets (TT, CT, TC and CC), although the yields of the lesions depend on the bases involved (2). These lesions induce mutations and can be lethal because of blocking of the replication machinery. The photochemistry in bacterial spores is quite different. Indeed, in this dormant form produced by some bacteria such as *Bacillus subtilis*, the only photoproduct produced upon exposure to UV light corresponds to two thymines linked by the methyl group of one of the bases (3, 4). The formation of this specific lesion, 5-thymidyl-5,6-dihydrothymine (spore photoproduct, SP) (Scheme 1A), is explained by specific features of the spores, including DNA conformation (A form), dehydration, the presence of dipicolinic acid in the core, and binding of small acid-soluble proteins to DNA (5–8). The formation of SP as the unique DNA lesion in irradiated spores is proposed to account for their extreme resistance to UV radiation. Indeed, spores express a specific repair enzyme, the spore photoproduct lyase (SP lyase) that directly reverts SP to two unmodified thymines upon germination (9, 10), much more efficiently than dimeric photoproducts are removed from other cell types by the classical nucleotide excision repair pathway. The specific photochemistry of DNA in spores combined with the action of SP lyase appears to be a major evolutionary advantage for spore-forming bacteria in resistance to UV radiation.

In their N-terminal half, all SP lyase enzymes contain a strictly conserved amino acid sequence containing three cysteines CXXXCXXC that have been shown to be essential for activity by site-directed mutagenesis (11). These cysteines have therefore been proposed to provide protein ligands for a catalytically essential [4Fe-4S]^{+2/+1} cluster (11). This CXXXCXXC sequence is indeed the signature for a superfamily of [4Fe-4S] iron-sulfur enzymes, named "radical SAM" (12), involved in a variety of biosynthetic pathways and metabolic reactions that proceed via radical mechanisms (13–15). Spectroscopic and biochemical studies from Nicholson and co-workers (16) and Broderick and co-workers (17) have shown the following: (i) the protein carries a single iron-sulfur cluster (16); (ii) the reaction is absolutely dependent on *S*-adenosylmethionine (AdoMet) (16, 17); and (iii) the repair mechanism is likely to involve a 5'-deoxyadenosyl radical (Ado[•]) generated through reductive cleavage of AdoMet (16, 17). Labeling experiments indicate

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

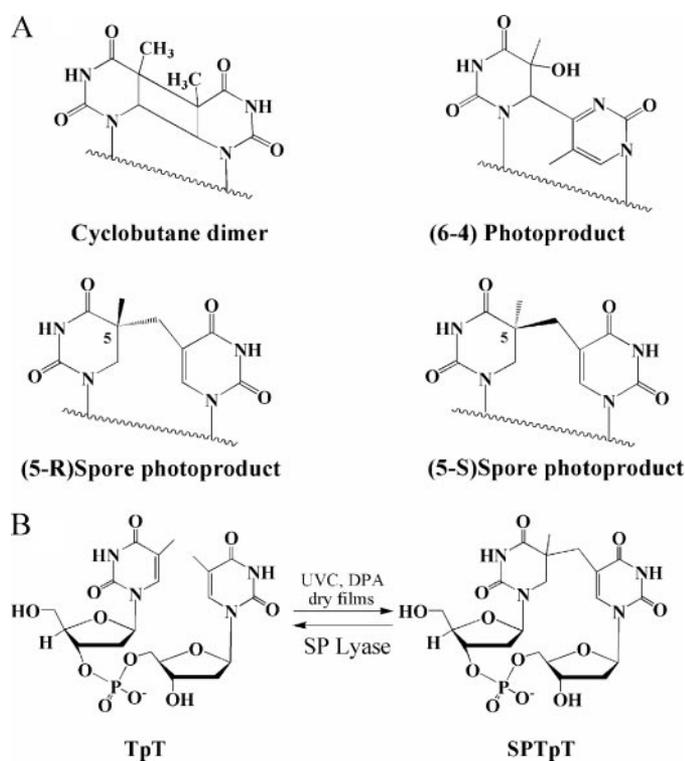
¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by a Ph.D. fellowship grant from the Commissariat à l'Energie Atomique.

³ Supported by a postdoctoral fellowship grant from the Commissariat à l'Energie Atomique.

⁴ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-38-78-91-03; Fax: 33-4-38-78-91-24; E-mail: marc.fontecave@cea.fr.

⁵ The abbreviations used are: CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; AdoMet, *S*-adenosylmethionine; [Fe-S], iron-sulfur cluster; DTT, dithiothreitol; TpT, thymidilyl-(3'-5')-thymidine; SPTpT, spore photoproduct of TpT; SP lyase, spore photoproduct lyase; HPLC, high pressure liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; DPA, dipicolinic acid.



SCHEME 1. A, different DNA dimer photoproducts formed upon UV irradiation; B, SPTpT, formation and repair.

that the reaction is initiated by direct C-6 hydrogen atom abstraction by Ado^{\bullet} , with the resulting substrate radical undergoing scission to re-generate the two initial thymines (Scheme 2) (17).

The SP lyase enzyme demonstrates a novel aspect of the diversity of DNA repair mechanisms in living organisms. In particular, it is remarkable that in the case of this enzyme, DNA repair is achieved through nucleotide radical intermediates, generally considered as precursors of DNA damage. To better understand the chemistry of this unique enzyme, we undertook this study. The first issues we address concern the substrate specificity of SP lyase. The following still are not known: (i) whether a dinucleotide SP lesion is a substrate; (ii) whether the phosphodiester bridge between the two nucleosides of the lesion is important; and (iii) whether the enzyme is stereoselective. To be able to answer these issues, it is absolutely required that well defined compounds rather than UV-irradiated plasmid DNA are used as substrates. Here we report an original preparation of the SP lesion in the form of a dinucleoside monophosphate (SPTpT) (Scheme 1B). Using a well characterized preparation of recombinant SP lyase from *B. subtilis*, we show that SPTpT is recognized and efficiently repaired by the enzyme (Scheme 1B). This new substrate provides a convenient assay for further enzymatic studies. Combined with a previous study addressing the question of the stereoselectivity of the enzyme (18), this work provides new insights into the chemistry of SP lyase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

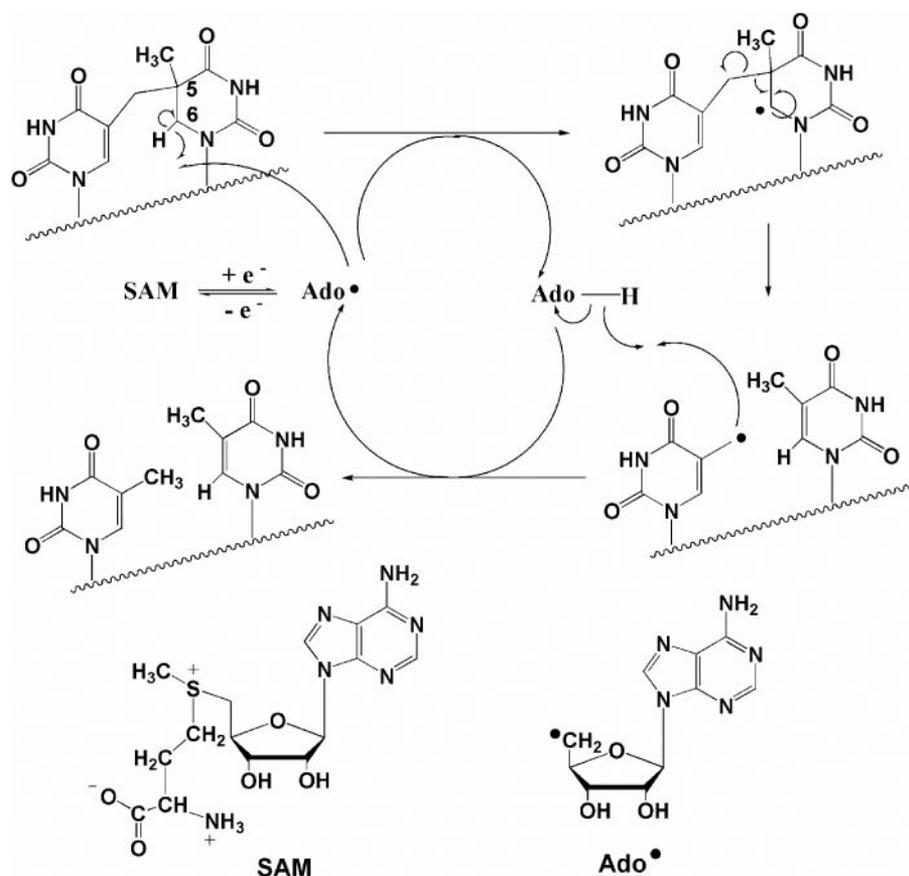
Materials—The following strains were used in this study. *Escherichia coli* DH5 α was used for routine DNA manipula-

tions. *E. coli* Tuner (DE3) (Stratagene) was used for SP lyase overexpression. Enzymes, oligonucleotides, and culture media were purchased from Invitrogen. T4 DNA ligase was from Promega. Bacterial alkaline phosphatase and plasmid DNA purification kit, FlexiprepTM, were from Amersham Biosciences. DNA fragments were extracted from agarose gel and purified with High Pure PCR product purification kit (Roche Applied Science), and DNA sequencing was performed by Genome Express (Grenoble, France). TpT was prepared as described previously (19).

Cloning and Construction of SP Lyase-overexpressing Plasmids—The *SplB* gene, encoding SP lyase, was amplified by a PCR-based method using *B. subtilis* genomic DNA as a template. The following primers were used: 5'-tgtggccatATGca-gaaccattgttccg-3' (NdeI site underlined and ATG codon in uppercase) hybridized to the noncoding strand at the 5' terminus of the gene and 5'-tttataaaaagcttctgttgatcacac-3' (HindIII site underlined) hybridized to the coding strand. PCR was run on a Stratagene RoboCycler Gradient 40 machine. The PCR product was digested with NdeI and HindIII and then ligated with T4 DNA ligase into the pT₇-7 plasmid, which had been digested previously with the same restriction enzymes. The cloned gene was entirely sequenced to ensure that no error was introduced during the PCR. The plasmid was then named pT₇-SPL. The hexahistidine linker sequence was introduced into pT₇-SPL as described previously (20). The new plasmid was named pT₇-SPL6H.

Protein Expression—*E. coli* Tuner (DE3) were transformed by pT₇-SPL6H and then grown overnight at 37 °C in LB medium (100 ml) supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The overnight culture was used to inoculate fresh LB medium (10 liters) supplemented with the same antibiotic, and bacterial growth was allowed to proceed at 37 °C until A_{600} reached 0.9. To reduce formation of inclusion bodies, protein expression was performed at 18 °C and induced by adding 500 μM of isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside. Cells were collected after 18 h of culture by centrifugation at 4000 $\times g$ at 4 °C for 30 min and resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl). The cells were disrupted by sonication and centrifuged at 220,000 $\times g$ at 4 °C for 1 h and 30 min. The solution obtained was then loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid-Sepharose-superflow column that had been equilibrated previously with buffer A. The column was washed extensively with the same buffer. Nonspecifically adsorbed proteins were eluted by a wash step with buffer A containing 30 mM imidazole, and then the SP lyase was eluted with buffer A containing 0.5 M imidazole. Fractions containing SP lyase were immediately concentrated in an Amicon cell fitted with a YM30 (Spectrapor) membrane, and 3 mM DTT was added before freezing.

Aggregation State Analysis—Fast protein liquid chromatography gel filtration with an analytical Superdex-75 (Amersham Biosciences) at a flow rate of 0.5 ml/min, equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7, containing 200 mM KCl, was used for size determination and was performed under strict anaerobic conditions. A gel filtration calibration kit (calibration protein II; Roche Applied Science) was used as molecular weight standards.



SCHEME 2. Proposed chemical mechanism for SP lyase-mediated DNA repair (17). SAM is AdoMet.

Iron and Sulfide Binding to SP Lyase—The following procedure was carried out anaerobically in a glove box (Jacomex B553 (NMT)). ApoSP lyase (100 μM monomer) was treated with 5 mM DTT and incubated overnight with a 5-fold molar excess of both Na_2S (Fluka) and $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (Aldrich) at 6 $^\circ\text{C}$. The protein was desalted on Sephadex G-25 (80 ml, same buffer), and the colored fractions were concentrated on Nanosep 10 (Amicon).

Production of SPTpT Substrates—The spore photoproduct of the dinucleoside monophosphate thymidylyl-(3'-5')-thymidine was prepared in two different ways. It was first obtained by hydrolysis of UVC-irradiated DNA, as described previously (21). Briefly, dry films of calf thymus DNA (Sigma) were prepared by freeze-drying an aqueous solution and subsequently exposing them to the UVC light emitted by a germicidal lamp. Irradiated DNA was then resuspended in water and digested by sequential incubation with nuclease P1 and phosphodiesterase II, pH 5, and alkaline phosphatase and phosphodiesterase I, pH 8. Normal bases were released as nucleosides, whereas bipyrimidine photoproducts were found as modified dinucleoside monophosphates. SPTpT was purified by HPLC. The concentration of the final solution was determined after acidic hydrolysis of an aliquot and comparison of the intensity of the HPLC signal of the released thymine spore photoproduct with that of an authentic standard. SPTpT was also prepared by exposure of dry films of TpT and dipicolinic acid (DPA) to UVC radiations (Scheme 1B). For this purpose, 300 ml of 1 mM TpT solution containing 10 mM DPA under its sodium form (pH 7) was pre-

pared. The solution was divided in six equal fractions that were poured in six 15-cm diameter Petri dishes and freeze-dried overnight. The dry films were then exposed for 1 h to UVC light. The dry residues were made soluble in 30 ml of water. The freeze-drying/irradiation/solubilization cycle was repeated six times. After the last irradiation, the whole dry residue was made soluble in 10 ml of water. SPTpT was isolated by reverse phase HPLC in the gradient mode by using triethyl ammonium acetate, pH 6.5, and acetonitrile as solvents. Identity and purity of the collected photoproduct were inferred from the comparison of its HPLC-MS/MS features with those of authentic SPTpT isolated from DNA. In addition, an aliquot fraction (100 μl) of the purified SPTpT was mixed with pure formic acid. The resulting solution was heated at 120 $^\circ\text{C}$ for 2 h and then dried under vacuum. The residue was made soluble in 100 μl of water and characterized by HPLC-MS/MS. Irradiation conditions were optimized by irradiating 1 \times 1-cm dry films pre-

pared from 1 ml of solutions containing 0.3 mM TpT and increasing concentration of either the Ca^{2+} or the Na^+ salt of DPA.

SP Lyase Activity—Typically, the reaction mixture contained wild-type SP lyase (1 μM), SPTpT substrate (10 μM), AdoMet (1 mM), and DTT (2 mM) in a final volume of 50 μl of 100 mM Tris-HCl, pH 8, containing 200 mM KCl. In addition, either dithionite (3 mM) or the physiological reducing system (Fldx/Fldx red/NADPH, 4:1:1 μM) was added as a reductant. The reactions were carried out under anaerobic conditions at 37 $^\circ\text{C}$ for various periods of time. At each time point (0, 10, 30, 60, 120, and 240 min) 5 μl of the solution was transferred to an Eppendorf tub, and the reaction stopped by flash-freezing in liquid nitrogen. Each sample was then diluted in 45 μl of 2 mM triethyl ammonium acetate and analyzed by HPLC coupled to mass spectrometry for their TpT and SPTpT content. When irradiated calf thymus DNA was used as a substrate, 10 μM enzyme was incubated with AdoMet (1 mM), dithionite (2 mM), DTT (2 mM) in a final volume of 50 μl of 100 mM Tris-HCl, pH 8, containing 200 mM KCl.

HPLC-Mass Spectrometry Analysis—Conversion of the spore photoproduct (SPTpT) into the unmodified dinucleoside monophosphate (TpT) in SP lyase-treated samples was quantified by HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Samples (20 μl from the initial 50 μl) were injected onto an Uptisphere ODB (particle size 3 μm , 150 \times 2 mm inner diameter) octadecylsilyl silica gel column (Interchim, Montluçon, France) connected to a series 1100 Agilent chromato-

graphic system. A gradient of acetonitrile (maximum proportion 10%) in 2 mM aqueous triethylammonium acetate was used at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The eluent was mixed with methanol (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) at the outlet of the HPLC column, and the mixture was directed on-line toward the inlet of an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (SCIEX/Applied Biosystems, Toronto, Canada). The mass spectrometer was used in the multiple reaction monitoring mode. Under these conditions, the ions produced in the electrospray source were filtered in the first quadrupole to select only ions of mass-to-charge ratio of 545 ($[\text{M} - \text{H}]^-$). The ions were then directed toward a second quadrupole used as a collision cell. Specific fragments, corresponding to the major peaks of the fragmentation spectrum of the compounds of interest, were quantified after selection in a third quadrupole. The monitored transitions were 545 to 251 (loss of the two 2-deoxyribose units and the phosphate group) for SP and 545 to 419 (loss of a thymine moiety) for TpT. A third transition, 545 to 195 (release of phosphorylated 2'-deoxyribose), was also used and gave a signal for both compounds. HPLC-MS/MS was also used to quantify the level of cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts within the DNA (22). For HPLC-MS identification purposes, the molecular mass of the compounds was first determined with the mass spectrometer recording full mass spectra in the 200–600 mass range. In a second step, the pseudo-molecular ion (545 for SPTpT and 251 for its hydrolysis product) was fragmented. Fragmentation spectra were recorded in the 200–600 and 30–260 mass range, respectively.

Protein Analysis—Protein concentration (by monomer) was determined by the method of Bradford (23). Protein-bound iron (24) and labile sulfide (25) were determined according to standard procedures.

Light Absorption Spectroscopy—UV-visible absorption spectra were recorded with a Cary 1 Bio (Varian) spectrophotometer.

EPR—Reconstituted SP lyase (250 μM , 3.9 iron/protein) was reduced with 3 mM dithionite under anaerobic conditions for 20 min and frozen inside the glove box. X-band EPR spectra were recorded on a Bruker Instruments ESP 300D spectrometer equipped with an Oxford Instruments ESR 900 flow cryostat (4.2–300 K). Spectra were quantified under nonsaturating conditions by double integration against a 1 mM Cu-EDTA standard.

Mössbauer Spectroscopy—For Mössbauer measurements, reconstituted SP lyase (6.23 mg) was prepared as described above in a total volume of 2.6 ml. After cluster reconstitution (3.9 iron/protein), the mixture was desalted on a NAP-25 column (Amersham Biosciences) and concentrated by ultrafiltration using a Nanosep 30 membrane (Amicon) to a final volume of 400 μL . The protein solution was transferred into a Mössbauer cup and frozen in liquid nitrogen. ^{57}Fe -Mössbauer spectra were recorded at zero magnetic field on a spectrometer operating in constant acceleration mode using an Oxford cryostat that allowed temperatures from 1.5 to 300 K and a ^{57}Co source in rhodium. Isomer shifts are reported relative to metallic iron at room temperature.

RESULTS

Characterization of the SP Lyase Enzyme—The enzyme was an N-terminal His-tagged protein purified from extracts of an *E. coli* strain overexpressing the *splB* gene from *B. subtilis* as described under “Experimental Procedures.” Analysis by denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that SP lyase was obtained as nearly pure protein with an apparent molecular mass of 41 kDa, as expected from the amino acid sequence (data not shown). The as-isolated pure protein, which lacked the light absorption bands in the visible spectrum characteristic for [Fe-S] clusters and did not contain measurable amounts of iron and sulfur, had a marked propensity to precipitate that was partly prevented by using buffers containing large concentrations of salt (200 mM KCl). Addition of DTT and glycerol also helped in this matter. Nevertheless, even under these conditions, only 30% of the SP lyase remained soluble after 48 h at 4 °C.

We prepared the holo-form of the enzyme by reconstituting the [Fe-S] cluster by treatment of the as-isolated apoform with iron and sulfide salts under anaerobic conditions in accordance with procedures described previously (26). After reconstitution, the enzyme was found to contain ~ 3.5 – 3.9 iron and sulfur atoms per protein monomer. In the holo-form, and under anaerobic conditions, the protein no longer precipitated and could resist several cycles of freezing-thawing without precipitation, loss of the cluster, or inactivation. Size exclusion chromatography analysis of the reconstituted enzyme under anaerobic conditions showed that SP lyase exists predominantly as a dimer in solution, as shown previously (16).

The light absorption spectrum of the reconstituted protein, shown in Fig. 1A, is very different from that reported previously (20) and is most similar to spectra of other [Fe-S] proteins of the radical SAM enzyme superfamily (ribonucleotide reductase, MiaB, and HemN) (26–28). It is thus consistent with the presence of a large proportion of polypeptides carrying a [4Fe-4S] cluster in solution. If [2Fe-2S] clusters are present, the UV-visible spectrum indicates that they account for a minor proportion of total iron. Exposure of the protein to air resulted in a rapid degradation of the cluster, as measured by the decrease of the absorption band at 420 nm (data not shown). This explained why the as-isolated protein was in the apo-form. During anaerobic reduction of the reconstituted protein with an excess of sodium dithionite, the solution bleached with a concomitant decrease of the absorption band at 420 nm. The resulting reduced solution displayed an axial EPR spectrum with g values of 2.03 and 1.93 (Fig. 1B). The temperature dependence and microwave power saturation properties of the EPR signals were characteristic for the $S = 1/2$ ground state of a $[\text{4Fe-4S}]^{+1}$ cluster (data not shown). Integration of the signal indicated that only 10% of total iron present in the sample was in the form of a reduced $[\text{4Fe-4S}]^{+1}$ cluster. This likely results from incomplete reduction of the cluster because of a low redox potential, as generally observed in the radical SAM family of enzymes, and may also be related to partial degradation of the protein under reducing conditions.

The following provides the first characterization of the SP lyase iron centers by Mössbauer spectroscopy, using a protein

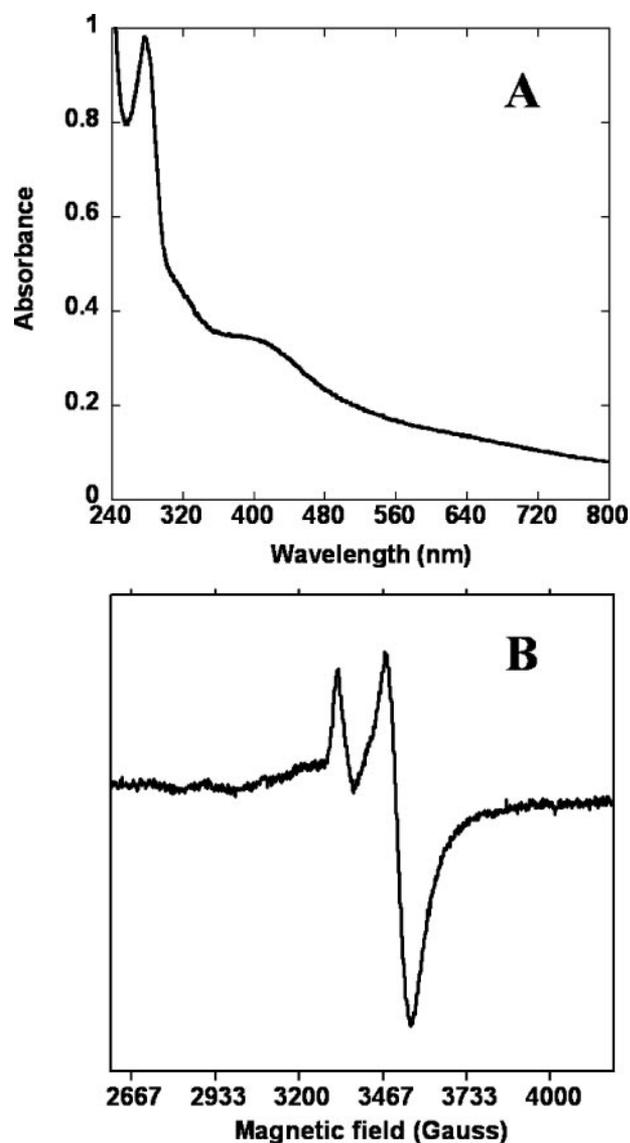


FIGURE 1. Spectroscopic characterization of the anaerobically reconstituted SP lyase protein from *B. subtilis*. *A*, UV-visible absorption spectrum (1 mg/ml SP lyase in 100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl). *B*, X-band EPR spectrum of the anaerobically reduced protein (250 μ M in 100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl). The spectrum was recorded under the following conditions: temperature, 10 K; microwave power, 0.2 milliwatt; modulation amplitude, 10 G.

sample that had been anaerobically reconstituted with ^{57}Fe and sulfide. This study was carried out because we are aware of examples for which Mössbauer spectroscopy contradicted UV-visible spectroscopy regarding the nature and diversity of protein-bound clusters. The Mössbauer spectra, obtained at 78 and 4.2 K, are displayed in Fig. 2. At both temperatures, quadrupole doublets were observed. Inspection of the spectra indicates that the protein sample was not homogeneous and contained at least four different species labeled A–D, respectively. In Fig. 2 the *solid lines* are simulations obtained with four different doublets using the parameters and relative amounts listed in Table 1. Because the left line of the four quadrupole doublets coalesces at approximately +0 mm/s, the determination of the hyperfine parameters of these species suffers from a rather large degree of uncertainty. Moreover, there is a significant overlap between doublets A and B, and therefore their relative area ratios cannot

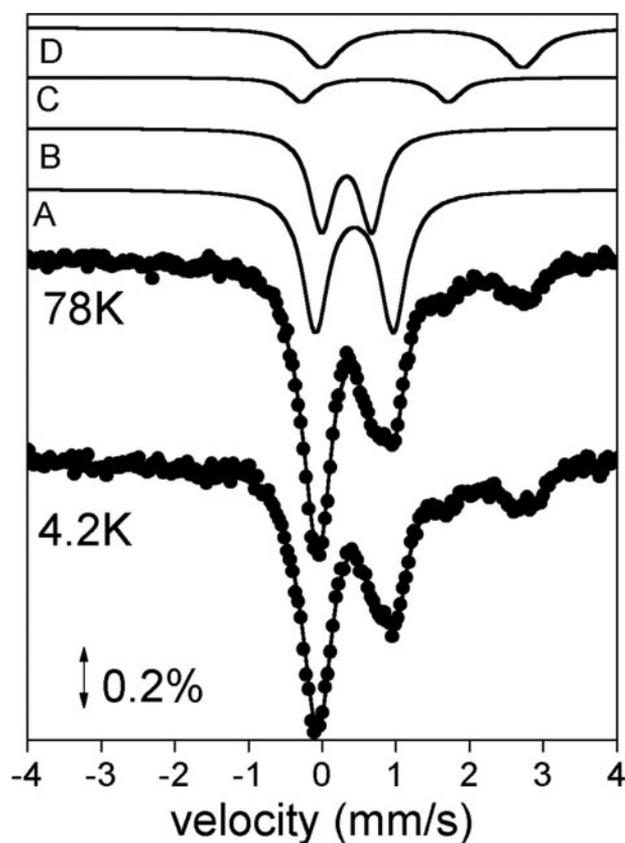


FIGURE 2. ^{57}Fe -Mössbauer spectra recorded at 4.2 and 78 K. *Solid lines* represent theoretical simulations assuming four different species with the parameters quoted in Table 1. The subspectra corresponding to species A–D at 78 K are displayed above the experimental spectrum. See text for details.

TABLE 1
Parameters and relative amounts of Mössbauer doublets obtained by simulations

Numbers in parentheses are estimated uncertainties in the last one or two digits. The relative areas are derived from the 4.2 K spectrum.

Site	δ	ΔE_Q	Area
		mm/s	%
A	0.44 (4)	1.06 (12)	40 (5)
B	0.33 (5)	0.66 (10)	27 (5)
C	0.70 (10)	1.98 (20)	12 (2)
D	1.26 (10)	2.88 (20)	21 (2)

be determined accurately. For C and D, the determination of the area is more reliable because the high energy absorption peaks are well resolved. The 4.2 and 78 K spectra are almost identical except for an apparent small decrease of the area attributed to doublet B. The ratios quoted in Table 1 are derived from the spectrum at 4.2 K.

Doublet D is attributed to octahedral Fe^{2+} ($S = 2$) impurities accounting for $\sim 20\%$ of total iron. Doublet C can also be assigned to ferrous iron (about 10% of total iron), but whether it belongs to an [Fe-S] complex cannot be established. The hyperfine parameters of the major doublet A (Table 1) are consistent with a $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ($S = 0$) cluster, accounting for 40% of total iron, and are comparable with parameters reported for clusters of other radical SAM enzymes (29–32). As is often the case with such enzymes, $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ ($S = 0$) clusters are also present in the SP lyase preparations. The parameters of doublet B are consistent with such a cluster, and they are in the range of those

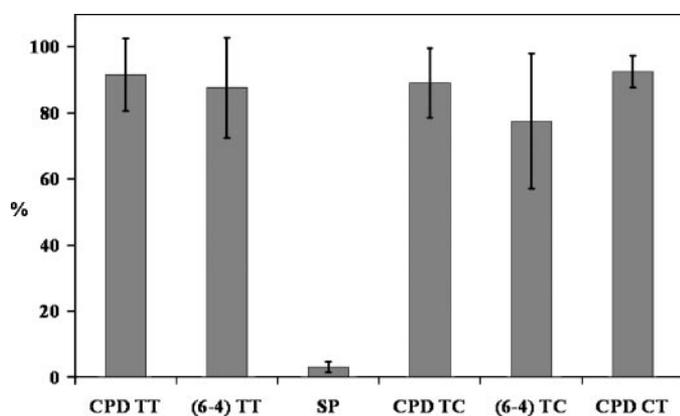


FIGURE 3. **Specificity of SP lyase activity.** Enzyme specificity was investigated using calf thymus DNA exposed to UVC radiation in the dry state. This substrate contains cyclobutane dimers (CPD) and (6-4) photoproducts in addition to the SP. The figure shows the proportion of substrate remaining after a 30-min reaction.

obtained for $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ clusters found in ribonucleotide reductase-activating enzyme and in biotin synthase (31, 32). Furthermore, we exclude the presence of $[3\text{Fe-4S}]^+$ clusters in SP lyase preparations on the basis of the absence of characteristic $S = 1/2$ signals in the EPR spectrum (data not shown).

As a conclusion the Mössbauer spectra from preparations from anaerobically reconstituted SP lyase indicate a large degree of inhomogeneity regarding the nature of the $[\text{Fe-S}]$ clusters, despite a well defined UV-visible spectrum. Apart from the presence of high spin ferrous impurities, the results are consistent with the presence of $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ and $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ clusters. The minor species, B, C, and D, revealed by Mössbauer spectroscopy, could represent either intermediate forms on the way to the $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster or derive from the $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster by degradation, as observed with many radical SAM enzymes (31, 33).

Substrate Specificity of the Reconstituted SP Lyase—SP lyase was tested for its ability to repair a mixture of DNA lesions. For this purpose, samples of calf thymus DNA were exposed to UV-C radiation in the dry state as described under “Experimental Procedures.” These substrates are interesting for specificity studies because they contain all types of lesions (Scheme 1A) as follows: cyclobutane dimers, (6-4) photoproducts, and the spore photoproduct (22). *B. subtilis* reconstituted SP lyase (10 μM) was incubated with 0.5 mg/ml of irradiated DNA in the presence of 1 mM AdoMet, an excess of sodium dithionite (2 mM), and 2 mM DTT under anaerobic conditions. The DNA was then enzymatically hydrolyzed and analyzed by HPLC-MS/MS to establish its content in each of the bipyrimidine photoproducts at $t = 0$ min and after 30 min of incubation. Comparison of the two samples showed that no significant decrease in the level of cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts (both thymine-thymine and thymine-cytosine derivatives) could be observed (Fig. 3). In contrast, almost all SP lesions initially present were repaired after 30 min of incubation. This established that our recombinant SP lyase was active and confirmed its remarkable substrate selectivity with respect to photolesions of DNA, as reported previously (10). As a complementary assay for the activity of our preparations, we showed that reconstituted SP lyase in the absence of DNA substrate was able

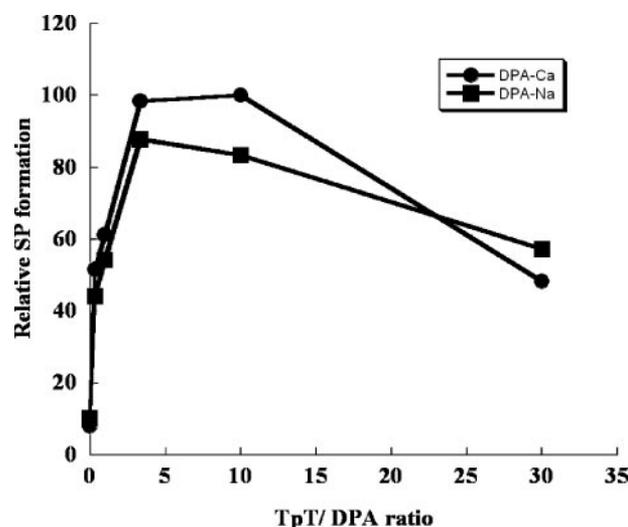


FIGURE 4. **Effect of the addition of DPA to dry films of TpT on the UVC-induced formation of the spore photoproduct.** Either the Ca^{2+} or Na^+ salt was used.

to catalyze the reductive cleavage of AdoMet to 5'-deoxyadenosine by dithionite (data not shown), as reported previously (16).

Preparation of SPTpT, the Dinucleoside Monophosphate SP Lesion—To date, SP lyase activity has been assayed using either SP-containing $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{DNA}$ extracted from irradiated spores or tritiated pUC18 plasmid DNA exposed to UV radiation in the presence of a small acid-soluble protein from *B. subtilis*, as a substrate (17). The repair activity was defined in terms of remaining SP after a given reaction time, determined after hydrolysis of DNA, isolation of the released SP, and scintillation counting (10, 17, 20). To study the repair reaction with a better defined substrate, available in larger quantities, we decided to use instead the modified dinucleoside monophosphate SPTpT in a pure form (Scheme 1B). This compound was first prepared by UV irradiation of dry films of DNA followed by hydrolysis and purification (see “Experimental Procedures”). It thus represents the natural dinucleotide substrate of the enzyme. In particular, the presence of the phosphodiester linkage between the two thymidine bases locks the photoproduct in a conformation similar to that occurring within DNA. To prepare larger amounts of SPTpT, a strategy was designed for using the dinucleoside monophosphate (TpT) rather than DNA as the starting material (19). Unfortunately, irradiation of TpT in the dry state yielded only trace amounts of SPTpT, whereas the (6-4) photoproduct together with the *cis,syn* and *trans,syn* cyclobutane dimers were the major photoproducts (data not shown). This problem was overcome by adding DPA into the dry film to be irradiated (Scheme 1B). Indeed, it is now well established that DPA in spores behaves as a photosensitizer that favors the formation of SP at the expense of the other bipyrimidine photoproducts (8). Addition of DPA had the same effect within dry films of TpT (Fig. 4). DPA is associated with Ca^{2+} in spores, and DPA- Ca^{2+} was thus used initially in our experiments. However, DPA- Ca^{2+} solutions are difficult to prepare and are quite unstable. We thus repeated the experiments with the sodium salt. Both DPA salts were found to exhibit the same photochemical properties (Fig. 4). It is inter-

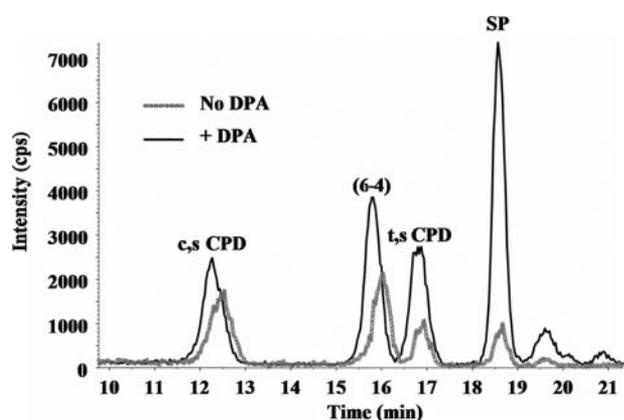


FIGURE 5. HPLC-MS/MS analyses of TpT exposed to UVC in the absence or the presence of DPA-Na (ratio DPA/TpT, 10). An increase in the yield of photoproducts is observed together with an increase in the ratio between the amount of SP and that of other dimeric photoproducts. (6-4) indicates the (6-4) photoproduct; *t,s* CPD and *c,s* CPD indicate *trans,syn* and *cis,syn* cyclobutane dimers, respectively.

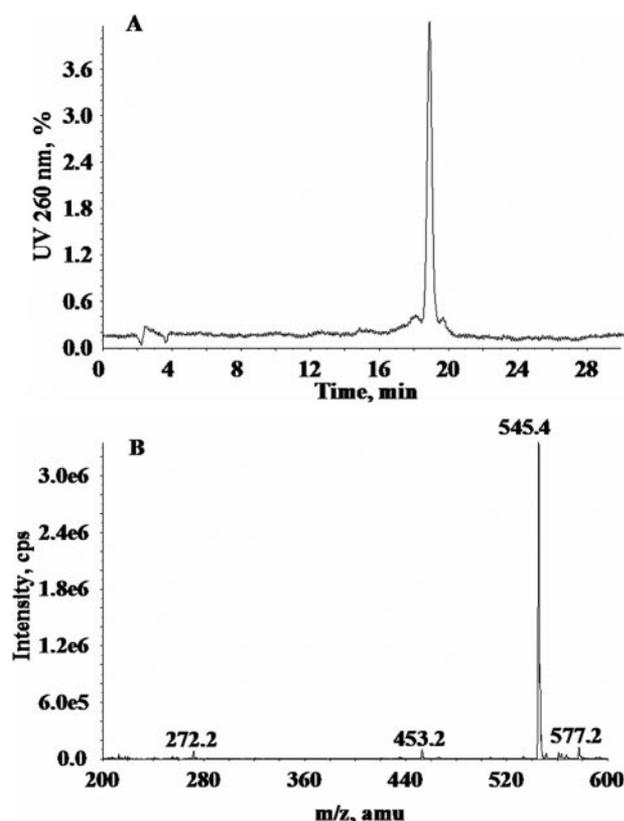


FIGURE 6. HPLC-MS analysis of SPTpT isolated after irradiation of TpT in the presence of DPA. A, shows the UV chromatogram monitored at 230 nm (retention time 19.1 min). B, shows the mass spectrum of the corresponding product.

esting to note that addition of DPA to the irradiated dry films had an effect on both the absolute and the relative amount of SPTpT produced because the latter was greatly favored with regard to the other photoproducts (Fig. 5), thereby facilitating the subsequent purification steps. SPTpT produced upon irradiation of TpT was extensively characterized by HPLC coupled to mass spectrometry. The molecular weight of the purified compound was found to be 546, as shown by a pseudo-molecular ion observed at $m/z = 545$ on the mass spectrum of the

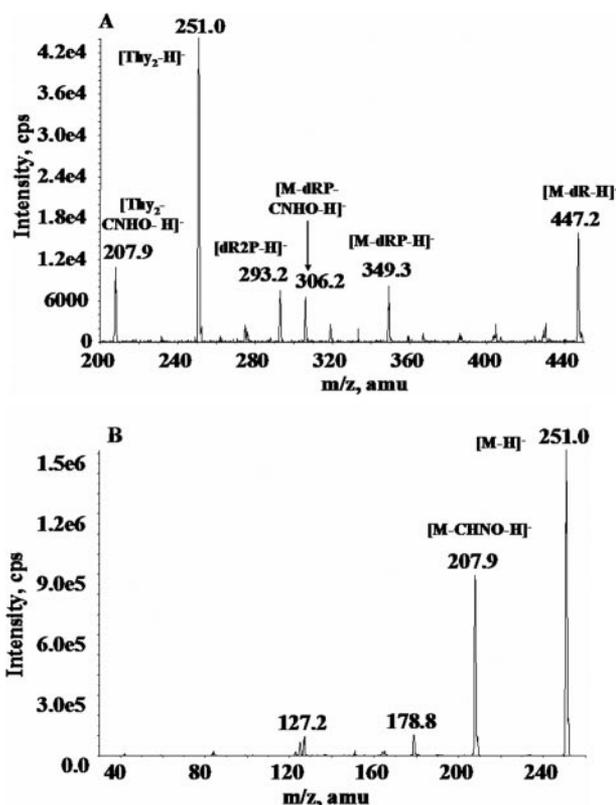


FIGURE 7. Fragmentation mass spectra of SPTpT obtained before (A) and after (B) acidic hydrolysis (*M*, molecular mass of the parent ion; *dR*, 2-deoxyribose; *P*, phosphate; *Thy*, thymine). The precursor ions were at $m/z = 545$ and 251, respectively.

corresponding HPLC peak (Fig. 6). Identification of the product as the spore photoproduct of TpT was then inferred from its fragmentation mass spectrum (Fig. 7A) that was absolutely identical (both in terms of mass and relative intensity of the fragments) to that of SP obtained either from isolated DNA (21) or, more interestingly, from irradiated spores (7). A last piece of evidence for the identity of SPTpT was its ability to release the spore photoproduct of thymine upon acidic hydrolysis as the result of the cleavage of the two *N*-glycosidic bonds. The assessment of the hydrolysis product was based on its chromatographic and mass spectrometry features (Fig. 7B) that were identical to those of authentic thymine spore photoproduct (34).

SPTpT Is a Substrate of SP Lyase—The use of SPTpT as a substrate facilitated analysis of the repair reaction because samples could be directly submitted to HPLC-MS/MS at the end of the incubation. This procedure allows easy monitoring and quantification of both substrate conversion and TpT (repaired dinucleotide) product formation. Indeed, these compounds can be easily separated by HPLC and identified, as they display characteristic well defined mass spectrometric features. Typical chromatograms obtained with the reconstituted SP lyase are presented in Fig. 8. The reaction was carried out anaerobically under the following standard conditions: 1 μM enzyme, 10 μM SPTpT substrate, 1 mM AdoMet, and either 2 mM dithionite or 1 mM NADPH (in the presence of catalytic amounts of flavodoxin and flavodoxin reductase) as the reducing agent. The results presented in Fig. 8 clearly showed that SPTpT, corre-

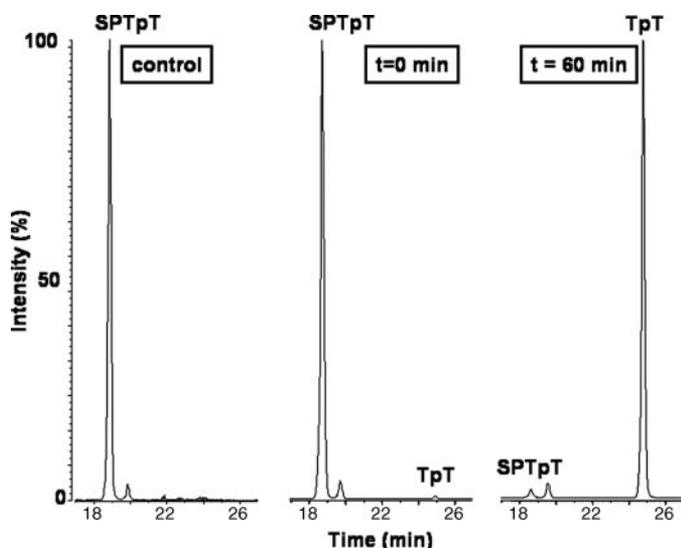


FIGURE 8. *In vitro* assay of SP lyase activity with SPTpT as a substrate. HPLCs of assay mixtures (1 μM SP lyase, 1 mM AdoMet, 2 mM dithionite, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM KCl) containing SPTpT (10 μM) after incubation for $T_0 = 0$ min and $T_{60} = 60$ min. The control chromatogram was obtained after 60 min of incubation in the absence of the enzyme. The identification of SPTpT and TpT was based on retention time, UV-visible absorption spectra, and mass spectrometry analysis.

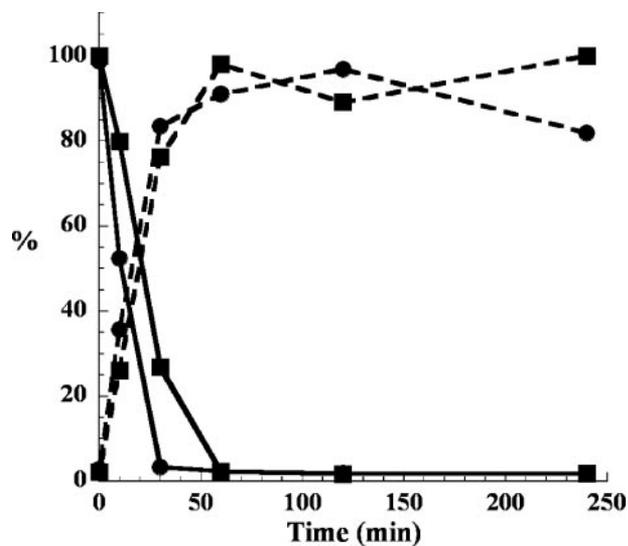


FIGURE 9. Time-dependent enzymatic SPTpT repair (solid line) and TpT formation (dashed line) using either dithionite (■) or NADPH in the presence of flavodoxin and flavodoxin reductase (●). 100% corresponds to 10 μM of SPTpT added to the reaction mixture (see "Experimental Procedures") and an equal amount of TpT formed. Conditions as in Fig. 8.

sponding to the peak eluted at 19 min, could be totally converted by the enzymatic reaction into the expected repaired TpT product (retention time, 25 min) after 60 min. The identity of the reaction product, not present initially in the reaction mixture, was assessed from the comparison of its chromatographic and mass spectrometry features with those of a standard sample. No TpT could be detected when protein or AdoMet was omitted from the reaction mixture (control). A typical time curve for SP lyase-dependent conversion of SPTpT to TpT is shown in Fig. 9. Complete conversion of SPTpT into TpT (100% yield; 10 turnovers) was observed after about 40–50 min, under the given assay conditions. These results demonstrate

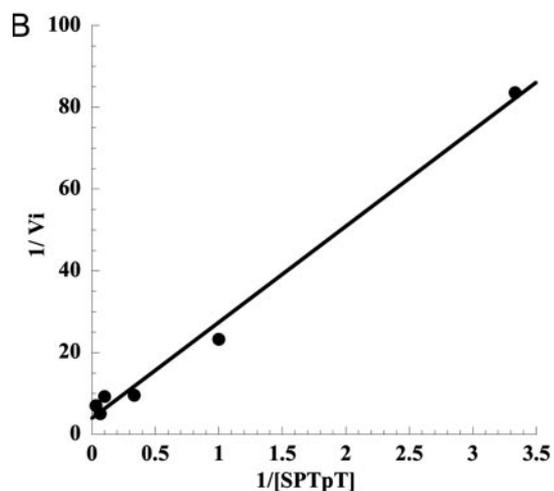
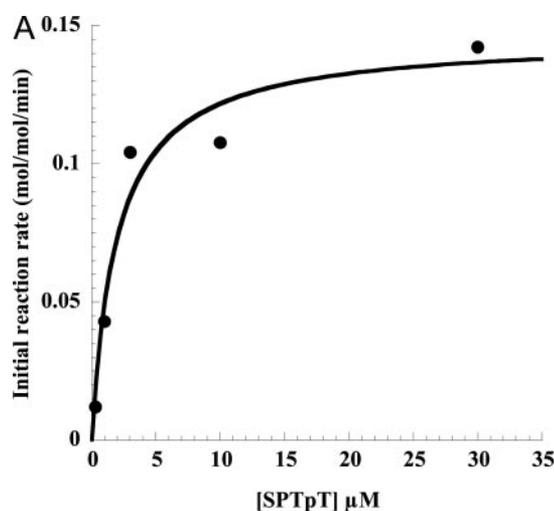


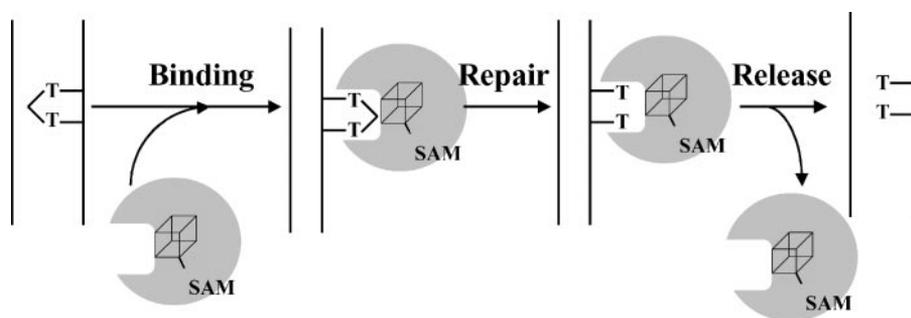
FIGURE 10. Initial repair reaction rate as a function of SPTpT concentration. A, conditions are as in the legend of Fig. 8, using dithionite as a reducing agent. B, shows the double-reciprocal plot $1/V_i$ as a function of $1/[SPTpT]$.

that SPTpT is a substrate for SP lyase and that SP lyase functions catalytically with such a substrate. Furthermore, Fig. 9 shows, for the first time, that an enzymatic system based on NADPH/flavodoxin/flavodoxin reductase can function as a reducing agent as efficiently as dithionite. Previously reported assays indeed were based on dithionite only (16–18, 20). It is interesting to note that similar results were obtained whether the SPTpT substrate was obtained from irradiated DNA or from irradiated TpT. As shown in Fig. 10, the initial reaction rate displayed a saturation behavior with respect to SPTpT concentration. The resulting double-reciprocal plot shown in Fig. 10B allowed the determination of a V_m -specific activity value of 0.24 mol/mol SP lyase/min and a K_m value for the SPTpT substrate of 6 μM .

DISCUSSION

To study the chemistry of spore photoproduct (SP) repair, we prepared the SP lyase enzyme from *B. subtilis* in pure form. As frequently observed with some radical SAM enzymes, reconstituted SP lyase preparations were not homogeneous because they contained polypeptides with either a $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ or a $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ cluster, as shown by Mössbauer spectroscopy. In the case

DNA Repair in *B. subtilis*



SCHEME 3. Schematic diagram showing the interactions between the DNA lesion and the enzyme. SAM is AdoMet.

of biotin synthase or the activating component of ribonucleotide reductase, readily $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ to $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ cluster interconversion has been demonstrated *in vitro* (31, 33, 35). It is likely that this interconversion also occurs in SP lyase. This first Mössbauer characterization of an SP lyase enzyme demonstrates that the clusters in this protein are very similar to those in biotin synthase or in ribonucleotide reductase activase, because comparable Mössbauer parameters were observed for all these proteins. There is no doubt that the $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster in SP lyase is very labile and oxygen-sensitive, and this explains why a cluster-free protein was obtained after purification. Although all clusters of reconstituted SP lyase were in the $S = 0$ state, in agreement with the absence of an EPR signal, reduction by sodium dithionite generated an EPR signal with g values and properties characteristic of an $S = 1/2$ $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ species. Despite this inhomogeneity, our preparation proved to be active and highly selective for *in vitro* repair of the SP lesion, as shown from the exclusive and total repair of the SP lesion within a DNA sample containing a variety of lesions as a consequence of UV irradiation: SP, cyclobutane dimers, and (6-4) photoproducts (Fig. 3).

Assaying DNA repair by SP lyase is not a trivial issue because of the difficulty of access to the substrate. Indeed, DNA containing the SP lesion cannot be routinely extracted from bacterial spores, whereas irradiation of DNA *in vitro* generally gives rise to a variety of base modifications, with minor production of the SP lesion. Consequently, assays are generally based on irradiated radioactively labeled DNA (17). There are also few reports on the synthesis of the SP lesion in the form of the corresponding dinucleoside. The currently available methods involve an important number of steps, because of the need for protection and deprotection of both the sugar and the base, and provide the product with very low yields (36). More importantly, the product obtained is the dinucleoside, lacking the phosphodiester bridge. Even though such a compound might serve as a mimic of an interstrand SP lesion, it is important to recall that the most abundant, almost unique, SP produced during spore DNA irradiation is the intrastrand one, resulting from coupling of two adjacent thymidines on the same strand (8). The results reported here demonstrate for the first time that SPTpT, the well defined dinucleotide SP lesion (Scheme 1B) in which the two bases are linked by the methylene group and the two 2-deoxyriboses by a phosphodiester bridge, behaves as a good substrate of SP lyase enzyme that catalyzes its conversion to the repaired TpT dinucleotide. Together with the TpT dinu-

cleotide product, this substrate also provides the great advantage that it can be monitored and quantified accurately by HPLC-MS/MS providing a very simple assay for the repair reaction. So far, very little information is available regarding the kinetic parameters associated with SP lyase. There is only one reported value for the specific enzyme activity using an SP-containing DNA, even though there is no information regarding satura-

tion of the enzyme and no reported K_m value. The well defined SPTpT substrate, studied here, provides a tool to establish those parameters.

As mentioned above, total synthesis of SPTpT is not straightforward. Therefore, it was first isolated, following enzymatic digestion, from isolated DNA exposed to UVC as a dry film. The major drawback of this approach is the low amount of photoproducts obtained. To increase the availability of this substrate, SPTpT was then prepared by exposure of TpT to UVC in the presence of DPA. The latter compound is present in large amounts in spores and is partly responsible for the specific formation of SP within DNA (8). The observation that DPA favors the formation of SP from the dinucleoside monophosphate TpT provides additional support that its impact on the photochemistry of spore DNA is mainly due to its photosensitizing properties. Interestingly, the product obtained upon irradiation of TpT cannot be distinguished from SPTpT isolated from irradiated DNA as follows. (i) They both exhibit the same chromatographic properties. (ii) Their fragmentation mass spectra are identical. (iii) They are repaired with the same efficiency by SP lyase. The latter result is of importance because, by using separated 5R and 5S isomers of the synthetically prepared SP thymidine derivative, we recently demonstrated that only the 5S-configured lesion was repaired, showing that SP lyase is highly stereoselective (18). The present series of observations thus strongly suggest that the same diastereoisomer was produced upon irradiation of TpT and DNA, even though further spectroscopic data are needed to definitively establish its absolute configuration (see Scheme 1A for the structure of the two stereoisomers).

Finally, the fact that the SPTpT dimer is a substrate indicates that the SP lesion does not absolutely need to be contained within a single- or double-stranded DNA for recognition and repair by the SP lyase enzyme. The fact that SPTpT is recognized ($K_m = 6 \mu\text{M}$) and repaired strongly suggests that the active site of the enzyme is finely designed to flip the thymine dimer to be repaired out of the duplex DNA target, in order to bind it specifically. A similar mechanism has been observed in the case of the DNA photolyase-CPD complex, which recently has been structurally characterized (37). A model is presented in Scheme 3. On the other hand, the nucleic acid environment, in which the thymine dimer is present, might play some role as well, as revealed by the comparison of the enzyme activities obtained *in vitro* when the assayed substrate was a DNA containing the SP lesion or the SPTpT dimer. In the former case an

activity of about 12 mol/mol/min was reported (17), whereas in the experiments reported here, repair was achieved with a V_m value of 0.24 mol/mol/min, indicating a 50-fold increase because of the presence of a double-stranded DNA in the SP environment. However, the comparison might not be totally relevant because the two substrates were assayed under slightly different conditions. In particular, the former value has been obtained at 37 °C, as compared with 20 °C for the assays reported here. Enzymatic activity with SPTpT can also be compared with that obtained with an interstrand synthetic SP dinucleoside. With the same enzyme preparations and comparable assay conditions as those used in this study, we reported a specific activity of about 0.004 mol/mol/min using the dinucleoside substrate (18). This 60-fold difference in repair activity demonstrates the importance of the phosphodiester bridge, probably because it limits the conformational freedom of the substrate dimer and suggests that the enzyme is not effective in repairing interstrand lesions. As indicated above, this is not a major problem for sporulating bacteria because irradiation of DNA in spores almost exclusively generates the intra-strand SP (8).

Future experiments should focus on the incorporation of the SPTpT dimer into oligonucleotides with different sequences, in order to further analyze the substrate selectivity properties of this fascinating enzyme.

Acknowledgments—We thank Dr. E. Mulliez (DRDC/CB, Grenoble) for providing us with *S*-adenosylmethionine and for stimulating discussions.

REFERENCES

- Lindahl, T. (1993) *Nature* **362**, 709–715
- Ravanat, J. L., Douki, T., and Cadet, J. (2001) *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **63**, 88–102
- Varghese, A. J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 484–490
- Donnellan, J. E., Jr., and Setlow, R. B. (1965) *Science* **149**, 308–310
- Setlow, B., and Setlow, P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 421–423
- Nicholson, W. L., Setlow, B., and Setlow, P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8288–8292
- Douki, T., Setlow, B., and Setlow, P. (2005) *Photochem. Photobiol.* **81**, 163–169
- Douki, T., Setlow, B., and Setlow, P. (2005) *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 591–597
- Setlow, P. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 29–54
- Slieman, T. A., Rebeil, R., and Nicholson, W. L. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 6412–6417
- Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., and Nicholson, W. L. (2005) *Curr. Microbiol.* **51**, 331–335
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., and Miller, N. E. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1097–1106
- Fontecave, M., Mulliez, E., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 506–511
- Cheek, J., and Broderick, J. B. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 209–226
- Frey, P. A., and Booker, S. J. (2001) *Adv. Protein Chem.* **58**, 1–45
- Rebeil, R., and Nicholson, W. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9038–9043
- Cheek, J., and Broderick, J. B. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2860–2861
- Friedel, M. G., Berteau, O., Pieck, J. C., Atta, M., Ollagnier-de-Choudens, S., Fontecave, M., and Carell, T. (2006) *Chem. Commun. (Camb.)* **4**, 445–447
- Beaucage, S. L., and Iyer, R. P. (1992) *Tetrahedron* **48**, 2223–2311
- Rebeil, R., Sun, Y., Chooback, L., Pedraza-Reyes, M., Kinsland, C., Begley, T. P., and Nicholson, W. L. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4879–4885
- Douki, T., and Cadet, J. (2003) *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, 433–436
- Douki, T., and Cadet, J. (2001) *Biochemistry* **40**, 2495–2501
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Fish, W. W. (1988) *Methods Enzymol.* **158**, 357–364
- Beinert, H. (1983) *Anal. Biochem.* **131**, 373–378
- Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A., and Fontecave, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31291–31296
- Pierrel, F., Hernandez, H. L., Johnson, M. K., Fontecave, M., and Atta, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 29515–29524
- Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E., and Jahn, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34136–34142
- Krebs, C., Broderick, W. E., Henshaw, T. F., Broderick, J. B., and Huynh, B. H. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 912–913
- Layer, G., Grage, K., Teschner, T., Schunemann, V., Breckau, D., Masoumi, A., Jahn, M., Heathcote, P., Trautwein, A. X., and Jahn, D. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 29038–29046
- Mulliez, E., Ollagnier-de Choudens, S., Meier, C., Cremonini, M., Luchinat, C., Trautwein, A. X., and Fontecave, M. (1999) *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 614–620
- Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., Hewitson, K. S., Roach, P., Munck, E., and Fontecave, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13449–13454
- Ollagnier-De Choudens, S., Sanakis, Y., Hewitson, K. S., Roach, P., Baldwin, J. E., Munck, E., and Fontecave, M. (2000) *Biochemistry* **39**, 4165–4173
- Douki, T., Court, M., and Cadet, J. (2000) *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **54**, 145–154
- Ollagnier, S., Meier, C., Mulliez, E., Gaillard, J., Schunemann, V., Trautwein, A. X., Mattioli, T., Lutz, M., and Fontecave, M. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6344–6350
- Mehl, R. A., and Begley, T. P. (1999) *Org. Lett.* **1**, 1065–1066
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T., and Essen, L. O. (2004) *Science* **306**, 1789–1793

Full paper / Mémoire

Characterization of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Clostridium acetobutylicum*: A radical-SAM enzyme

Alexia Chandor^a, Thierry Douki^b, Didier Gasparutto^b, Serge Gambarelli^b,
Yannis Sanakis^c, Yvain Nicolet^d, Sandrine Ollagnier-de-Choudens^a,
Mohamed Atta^a, Marc Fontecave^{a,*}

^a Laboratoire de chimie et biologie des métaux, iRTSV/LCBM UMR 5249, Commissariat à l'énergie atomique (CEA)/CNRS/Université Joseph-Fourier (UJF), 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France

^b Service de chimie inorganique et biologique UMR-E 3, CEA/UJF, Département de recherche fondamentale sur la matière condensée, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France

^c NCSR Demokritos, Institute of Materials Science, Ag. Paraskevi, Attiki 15310, Greece

^d Laboratoire de cristallographie et cristallogénèse des protéines, Institut de biologie structurale Jean-Pierre-Ebel, UMR 5045, CEA/CNRS/UJF, 41, rue Jules-Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, France

Received 27 October 2006; accepted after revision 13 February 2007

Available online 17 May 2007

Abstract

Spore photoproduct lyase (SPL) is a “Radical-SAM” repair enzyme which catalyzes the cleavage of spore photoproduct (SP, 5-thyminy-5,6-dihydrothymine), a specific lesion found in bacterial spore DNA, to thymine monomers by a free-radical mechanism. The enzyme requires *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM) and a [4Fe–4S] cluster for activity. SPL from *Bacillus subtilis* has been difficult to isolate and characterize due to problems with the solubility and stability of the overexpressed protein in *Escherichia coli* and the lability of the [Fe–S] cluster, even if the protein was purified under strictly anaerobic conditions. In order to overcome these problems we searched for another SPL enzyme and we found that the recombinant SPL enzyme from *Clostridium acetobutylicum*, isolated either aerobically or anaerobically from overexpressing *E. coli*, behaves more stably than the *B. subtilis* one. We report here a complete spectroscopic and biochemical characterization of this enzyme. In particular we show for the first time that, using HYSCORE spectroscopy, SAM binds to the cluster as observed in the case of other members of the “Radical-SAM” enzyme family such as the activases of pyruvate formate lyase and ribonucleotide reductase. **To cite this article:** A. Chandor et al., *C. R. Chimie* 10 (2007).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

La spore photoproduct lyase est une enzyme de réparation de l'ADN appartenant à la famille des enzymes « SAM-Radical ». Elle catalyse la réversion du photoproduit des spores (SP, 5-thyminy-5,6-dihydrothymine) – une lésion spécifique de l'ADN des spores de bactéries – en deux monomères de thymine via un mécanisme radicalaire. La *S*-Adénosyl-*L*-méthionine (SAM) ainsi qu'un cluster [4Fe–4S] sont nécessaires à l'activité de l'enzyme. La SPL de *Bacillus subtilis* a été difficile à isoler et à caractériser, à cause de problèmes de solubilité, de stabilité de la protéine surexprimée dans *E. coli*, ainsi que de labilité du cluster, même si la

* Corresponding author.

E-mail address: marc.fontecave@cea.fr (M. Fontecave).

protéine est purifiée dans des conditions d'anaérobiose stricte. Afin de surmonter ces problèmes, nous nous sommes intéressés à la SPL recombinante de *Clostridium acetobutylicum*, isolée, soit en aérobiose, soit en anaérobiose à partir d'une surexpression dans *E. coli*. Nous décrivons ici une caractérisation spectroscopique et biochimique complète de cette enzyme. En particulier, nous montrons pour la première fois, grâce à la spectroscopie HYSORE, que la SAM se lie au cluster, de la même façon que pour d'autres membres de la famille des « SAM-Radical », comme les activases de la pyruvate formate lyase et de la ribonucléotide réductase.

Pour citer cet article : A. Chandor et al., C. R. Chimie 10 (2007).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: SPL; Iron–sulfur; Spore photoproduct; DNA repair; S-Adenosylmethionine; *Clostridium acetobutylicum*

Mots clés : SPL ; Fer–soufre ; Photoproduit des spores ; Réparation de l'ADN ; S-Adénosylméthionine ; *Clostridium acetobutylicum*

1. Introduction

Solar ultraviolet radiation is known to induce reactions between adjacent pyrimidines in DNA, resulting in dimers which can block replication and transcription and are thus potentially lethal and mutagenic [1]. These photoproducts in general are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6–4) pyrimidone photoproducts, except in the bacterial spores, a dormant form produced by some bacteria such as the *Bacillus* and *Clostridium* species [2]. In that case the only photoproduct produced upon exposure to UV light corresponds to two thymines linked by the methyl group of one of the bases [3,4]. The formation of this specific lesion, 5-thymine-5,6-dihydrothymine (spore photoproduct, SP) is explained by specific features of the spores, including DNA conformation (A-like form), dehydration, presence of dipicolinic acid in the core and binding of small acid-soluble proteins to DNA [5–8]. In spite of the readily formation of this dimeric lesion, these bacterial spores are extremely resistant to UV radiation since they activate, early in the germination cycle, a very efficient specific repair enzyme, the spore photoproduct lyase (SPL) that directly reverts SP to two unmodified thymines [9,10].

Our current knowledge of the structure and reactivity of the SPL was almost exclusively derived from studies using the enzyme from *Bacillus subtilis* [11–16]. It was unambiguously shown to be a member of the large “radical-SAM” (S-adenosylmethionine) superfamily of enzymes [17] involved in a variety of biosynthetic pathways and metabolic reactions that proceed via radical mechanisms [18–20]. It contains a catalytically essential $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/+}$ cluster chelated by the CysXXXCysXXCys sequence, a signature for this class of enzymes, and the reaction is absolutely dependent on S-adenosylmethionine (SAM or AdoMet) [13,14]. Elegant studies, using labelled compounds, from J. Broderick's laboratory have shown that the repair

mechanism is likely to involve a 5'-deoxyadenosyl radical (Ado•) generated through reductive cleavage of SAM and is initiated by direct C-6 hydrogen atom abstraction by Ado•, with the resulting substrate radical undergoing scission to re-generate the two initial thymines (Fig. 1) [14,21]. SAM is suggested to be used by this enzyme as a catalytic cofactor. Our investigations demonstrated that the enzyme is active on SP-containing DNA as well as on a dinucleoside monophosphate SP substrate, suggesting that the active site of the enzyme is designed to flip the thymine dimer to be repaired out of the duplex DNA target and bind it specifically [22].

Unfortunately the SPL from *B. subtilis* is very difficult to characterize, since only limited amounts are accessible, the protein is very prone to precipitate under various conditions and the iron–sulfur cluster is particularly labile. As a consequence, a number of previous studies were based on poorly active preparations, with low cluster content. In order to obtain protein preparations with sufficient stability, in large amounts, in particular for mechanistic and X-ray crystallography studies, we searched for another source of SPL. We found that the recombinant SPL enzyme from *Clostridium acetobutylicum*, isolated either aerobically or anaerobically from overexpressing *E. coli*, was filling these criteria. We report here a complete spectroscopic and chemical characterization of this enzyme. In particular we show for the first time that SAM binds to the cluster as observed in the case of other members of the “Radical-SAM” enzyme family such as the activases of pyruvate formate lyase and ribonucleotide reductase [23–26].

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Strains: *E. coli* DH5 α was used for routine DNA manipulations. *E. coli* C41 (DE3) was used for SPL overexpression. Enzymes, oligonucleotides, and culture

loaded onto a Ni-NTA Superflow column (Qiagen) which had been previously equilibrated with buffer A. The column was washed extensively with the same buffer. Non-specifically adsorbed proteins were eluted by a wash step with buffer A containing 30 mM imidazole and then the SPL was eluted with a gradient of buffer A reaching 0.5 M imidazole. Fractions containing SPL were pooled, filtrated and loaded immediately on a Hi Prep desalting column (GE Healthcare) to remove imidazole and prevent from precipitation. The fractions containing SPL were concentrated in an Amicon cell fitted with a YM30 (Spectrapor) membrane and 3 mM DTT were added before freezing.

For anaerobic purification of the SPL, the same protocol was applied until the resuspension of cells, except that the growth medium was supplemented with 100 μ M Fe citrate or 35 μ M $^{57}\text{FeCl}_3$ for Mössbauer spectroscopy experiments. Bacterial growth and induction were performed as for the aerobic procedure. Cells were resuspended in the anaerobic glove box with buffer A and anti-proteases cocktail Complete EDTA-free (Roche). The following steps were carried out in the glove box. The cells were incubated under agitation with lysozyme (1 mg/mL) for 30 min and Triton x100 was added at a final concentration of 0.5%. The mixture was incubated for one more hour, then transferred into ultracentrifugation tubes and subjected to three cycles of freezing/thawing before centrifugation as stated above. The solution obtained was loaded anaerobically on a Ni-NTA Superflow column (Qiagen) equilibrated with buffer A and purified as described above. The fractions containing SPL were desalted on NAP 25 to remove imidazole, concentrated on Microcon YM 30 (Amicon) and 3 mM DTT were added. The preparation could be used for activity assays and Mössbauer spectroscopy.

2.4. Iron and sulfide binding to SPL

The procedure was carried out anaerobically in a glove box (Jacomex B553 (NMT)) as previously described for SPL from *B. subtilis* [22].

2.5. Production of SPTpT substrates

The spore photoproduct of the dinucleoside monophosphate thymidyl-(3'-5')-thymidine was prepared as previously described [22].

2.6. SPL activity

To assay SPL activity, we followed the same procedure as for *B. subtilis* SPL [22], using DTT, dithionite

and SAM in the same proportions. At each time point (0, 30, 60 and 120 min), 20 μ L of the solution were transferred to an Eppendorf tube and the reaction stopped by flash-freezing in liquid nitrogen. The same conditions were used to assay substrate affinity using different concentrations of SPTpT.

2.7. HPLC-mass spectrometry analysis

Conversion of the spore photoproduct (SPTpT) into the unmodified dinucleoside monophosphate (TpT) in SPL-treated samples was quantified by HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), using the same conditions as for samples treated by SPL from *B. subtilis* [22].

2.8. Protein analysis

Protein concentration (by monomer) was determined by the method of Bradford [28]. Protein-bound iron [29] and labile sulfide [30] concentrations were determined according to standard procedures.

2.9. UV-visible absorption spectroscopy

UV-visible absorption spectra were recorded with a Cary 1 Bio (Varian) spectrophotometer.

2.10. Electron paramagnetic resonance (EPR)

Reconstituted SPL (200 μ M, 3.9 iron/protein) or SPL purified anaerobically (375 μ M, 1.6 iron/protein) were reduced with 3 mM dithionite under anaerobic conditions for 20 min and frozen inside the glove box. X-band EPR spectra were recorded on a Bruker Instruments ESP 300D spectrometer equipped with an Oxford Instruments ESR 900 flow cryostat (4.2–300 K). Spectra were quantified under non-saturating conditions by double integration against a 1 mM Cu-EDTA standard.

2.11. Mössbauer spectroscopy

For Mössbauer measurements, reconstituted SPL (4.56 mg, 4.01 iron/protein) or anaerobic SPL (3.3 mg, 1.6 iron/protein) was prepared as described above in a final volume of 400 μ L. The protein solution was transferred into a Mössbauer cup and frozen in liquid nitrogen. ^{57}Fe -Mössbauer spectra were recorded at zero magnetic field on a spectrometer operating in constant acceleration mode using an Oxford cryostat that allowed temperatures from 1.5 to 300 K and

a ^{57}Co source in rhodium. Isomer shifts are reported relative to metallic iron at room temperature.

2.12. HYSORE spectroscopy

For HYSORE measurements, reconstituted SPL (3.84 mg, 3.9 iron/protein) was prepared as described above in a final volume of 400 μL . Dithionite (2 mM) was added and the protein incubated for 20 min. The mixture was divided into two: the first EPR tube was directly frozen and in the second, 5 mM SAM were added before freezing.

HYSORE experiments were performed on a Bruker Eleksys E-580 X-band pulsed spectrometer with a Bruker ER4118X dielectric resonator and a continuous flow He cryostat (Oxford Instrument CF935) controlled by an Oxford Instrument temperature controller ITC 503. Experiments were performed at 10 K using the standard four-pulse sequence ($\pi/2$ - τ - $\pi/2$ - t_1 - π - t_2 - $\pi/2$ -echo) with a nominal pulse width of 16 ns for $\pi/2$ and π pulses, a τ value of 128 ns and a pulse repetition rate of 2 kHz. Unwanted echoes were removed by four-step phase cycling. A 64×64 dataset was recorded with times t_1 and t_2 incremented in 24 ns steps from an initial value of 200 ns. This dataset was processed using Xepr software (Bruker). The background decay in both dimensions was subtracted using a linear fit followed by apodization with a Hamming window and zero-filling to 512 points in each dimension. The 2D Fourier Transform magnitude spectrum was calculated and presented as a contour plot.

3. Results

3.1. Cloning, overexpression, and purification of recombinant SPL from *C. acetobutylicum*

The pET-SPLCA plasmid, obtained as described in Section 2, was used to transform *E. coli* C41 (DE3) strain for production of a protein with a His-tag at the N-terminus part. The introduction of a His tag at the N-terminus has been reported in the case of *B. subtilis* SPL to exhibit no effect on enzymatic activity [11]. Unlike SPL from *B. subtilis*, SPL from *C. acetobutylicum* was mainly recovered in soluble extracts and very little in inclusion bodies. The cell-free extracts were loaded onto an affinity chromatography column (Ni-NTA Superflow – Qiagen) and after an extensive washing with buffer containing 30 mM imidazole, the protein eluted at 300 mM imidazole. In order to avoid precipitation of the Ni-NTA eluted protein due to the presence of imidazole, a desalting purification step was

immediately applied to the solution. About 50 mg of SPL could be obtained from 10 L of culture. The purity of the purified protein was judged by SDS electrophoresis analysis to be around 95% and its apparent molecular weight was 41 kDa, as expected from the amino-acid sequence (Fig. 2-I). The purified protein was slightly brown and was found to contain substoichiometric amounts of iron and sulfur atoms (<0.2 of each atom per equivalent protein). This low amount was possibly due to the loss of the oxygen-sensitive cluster during aerobic purification, as often observed with [Fe–S] proteins, and proved that the as-isolated protein was mainly under the apo form. As a matter of fact, when the extraction and purification were carried out in an anaerobic glove box, the purified SPL protein was much more colored and was found to contain up to about 2 Fe and S atoms per monomer. This preparation will be named anaerobic SPL in the following.

3.2. Reconstitution and characterization of the iron–sulfur center of SPL

The aerobically obtained apo form was treated with iron and sulfide salts under anaerobic conditions to convert it into the holoform using previously described procedures [31]. After reconstitution of the cluster, the enzyme was found to contain approximately 3.9 iron and sulfur atoms per protein monomer. In the following, this preparation will be named reconstituted SPL.

The UV–vis light absorption spectrum of the reconstituted protein, shown in Fig. 2-II, is very similar to spectra of other [Fe–S] proteins of the “Radical-SAM” enzyme superfamily (RNR activase, MiaB, HemN) [31–33] with a significant absorption band at 420 nm. It is thus consistent with the presence of a large proportion of polypeptides carrying a [4Fe–4S] cluster but also possibly a [2Fe–2S]. The UV–visible spectrum of the anaerobic SPL preparation was similar to that shown in Fig. 2-II. Exposure of the protein to air resulted in a rapid degradation of the cluster, as measured by the decrease of the absorption band at 420 nm (data not shown). During anaerobic reduction of the reconstituted protein with an excess of sodium dithionite, the solution bleached, with a concomitant decrease of the absorption band at 420 nm. The resulting reduced solution displayed an axial EPR spectrum with g values at $g = 2.03(7)$ and $1.93(7)$ (Fig. 2-III). The temperature dependence and microwave power saturation properties of the EPR signals were characteristic of the $S = 1/2$ ground state of a [4Fe–4S] $^+$ cluster (data not shown). Integration of the signal indicated that only 10% of total iron present in the sample was in the form of a reduced

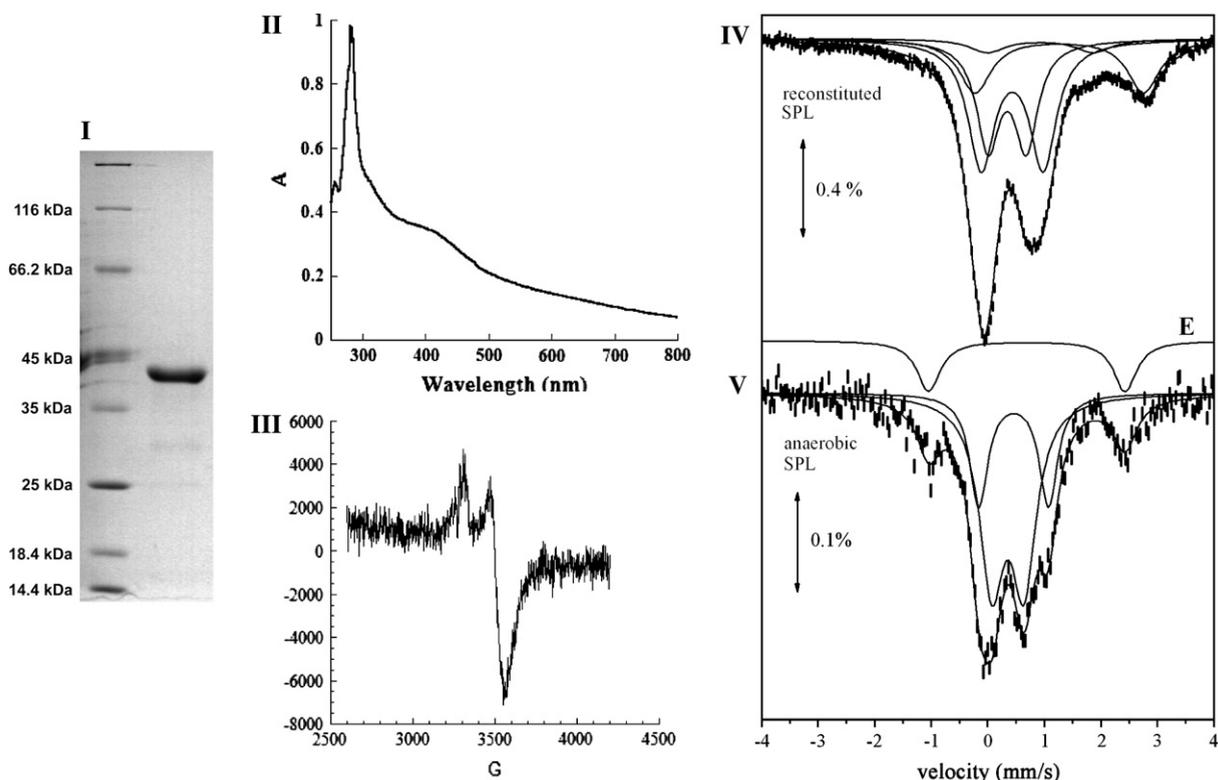


Fig. 2. Biochemical and spectroscopic characterization of SPL. (I) 12% SDS-PAGE: Lane 1: Molecular Weight markers, Lane 2: Reconstituted SPL. (II) UV–vis absorption spectrum of the anaerobically reconstituted SPL protein from *Clostridium acetobutylicum* (SPL 0.9 mg/mL in 100 mM Tris–HCl, pH 8, 50 mM KCl); (III) X-band EPR spectrum of the anaerobically reduced reconstituted SPL (200 μ M in 100 mM Tris–HCl, pH 8, 50 mM KCl). The spectrum was recorded under the following conditions: temperature: 10 K; microwave power: 0.2 mW; modulation amplitude: 10 G; (IV) and (V), ^{57}Fe -Mössbauer spectra at 4.2 K of 277 μ M reconstituted SPL (IV) and 208 μ M anaerobic SPL (V). Solid lines represent theoretical simulations assuming different species (see text) with the parameters quoted in Table 1. Doublet E is displayed above the spectrum of the anaerobic SPL.

$[\text{4Fe-4S}]^+$ cluster. This likely results from incomplete reduction of the cluster due to a low redox potential, as generally observed in “Radical-SAM” enzymes, and partly also from partial degradation of the cluster under reducing conditions.

The $[\text{Fe-S}]$ clusters were further analyzed by Mössbauer spectroscopy using a reconstituted protein sample (277 μ M, 4.01 iron/monomer) that had been obtained by incubating anaerobically the apo form with ^{57}Fe and sulfide for 15 h at 4 °C. In Fig. 2-IV the spectrum recorded at 4.2 K (upper spectrum) is shown. An almost identical spectrum was obtained at 78 K. The spectrum is remarkably similar to the one observed for SPL from *B. subtilis* reconstituted with Fe and S in a similar way [22]. As in the previous case the spectrum indicates the presence of at least four different species giving rise to quadruple doublets which significantly overlap. By keeping the same assignment as before [22], doublet A is attributed to a $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ($S=0$) cluster and

doublet B to a $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ ($S=0$) cluster. We recall that the large degree of overlapping between doublets A and B does not allow us to make an accurate determination of their relative ratio. We estimate that the $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ clusters account for 42% of total iron and the $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ clusters for 31%. Doublet D (21% of total iron) is attributed to octahedral high spin ferrous impurities. Doublet C accounts for minor species (6% of total iron) and has parameters which can be attributed to a high-spin ferrous species as well.

The 4.2 K spectrum from an anaerobic SPL enzyme sample is also shown in Fig. 2-V. A similar spectrum was obtained at 78 K. The low iron content in this sample (about 335 μ M) leads to a relatively noisy spectrum. However it is clear that the majority of the iron (85%) gives rise to a spectrum which can be considered as the superposition of two doublets similar to A and B of the reconstituted sample. Therefore we conclude that the spectrum contains $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ($S=0$) (27%

of total iron) and $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}(S=0)$ clusters (58% of total iron). Apparently, the amount of $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ clusters is larger in the anaerobic SPL sample. The rest of the iron (15%) gives rise to a doublet (E) with parameters which are typical for high-spin ferrous species in a tetrahedral environment with S donors.

As a conclusion, the Mössbauer spectra from reconstituted SPL preparations indicate the presence of $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ and $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ clusters. Anaerobic SPL enzyme containing ^{57}Fe also contained the two types of clusters, as shown by Mössbauer spectroscopy, with $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ ones in larger proportions (Table 1).

3.3. Characterization of SAM-[4Fe-4S]⁺ complex by HYSCORE spectroscopy

It is now generally accepted that in “Radical-SAM” enzymes, a [Fe-S]-SAM complex involving coordination of SAM to the unique Fe site through its aminocarboxylate moiety is formed as a reaction intermediate [18]. This complex has been directly characterized by spectroscopic methods in the case of the activase of pyruvate formate lyase and of lysine aminomutase [25,26,34] and by X-ray crystallography in the case of biotin synthase, MoaA enzyme and coproporphyrinogen oxidase for example [35–37]. In order to check whether such a [Fe-S]-SAM complex is also generated in the SPL enzyme, we used HYSCORE spectroscopy, a two-dimensional pulsed EPR technique previously used to investigate another “Radical-SAM” enzyme, the activase of ribonucleotide reductase [23]. One of the main advantages of HYSCORE is its ability to sort three types of nuclei: the strongly ($|a_{\text{N}}|/2 > \nu_{\text{N}}$) and weakly ($|a_{\text{N}}|/2 < \nu_{\text{N}}$) coupled ones and the “distant” nuclei, which are characterized by very low hyperfine couplings. In the latter case, the corresponding peaks lie on the diagonal of the (+, +) quadrant, whereas the strongly and weakly coupled nuclei appear in the (–, +) and the (+, –) quadrants, respectively [38,39].

The HYSCORE spectrum of the anaerobically reduced SPL presented no cross-correlation peaks in the (–, +) quadrant. In the (+, +) quadrant, only peaks from distant ^{13}C carbon atoms present in natural abundance and from ^1H hydrogen atoms are observed (Fig. 3A). Upon anaerobic addition of SAM to a solution of reconstituted SPL in the reduced $S = 1/2$ form, the HYSCORE spectrum was drastically modified (Fig. 3B) and a symmetrical set of new features appeared in the (–, +) quadrant. These peak patterns and their position are characteristic of a strongly coupled nitrogen atom (an $I = 1$ nucleus with quadrupolar coupling). From the position of the so-called double quanta double quanta correlation peaks (dqdq in Fig. 3B) at (9.5; –5.7) and (5.7; –9.5) MHz, it is possible to obtain a good estimation of the isotropic hyperfine coupling a_{N} using:

$$V_{\text{dqdq}\pm} = 2[(\nu_{\text{N}} \pm a_{\text{N}}/2)^2 + K^2(3 + \eta^2)]^{1/2}$$

where K is the quadrupole coupling constant and η is the asymmetry parameter [40].

The value obtained ($|a_{\text{N}}| = 6.5$ MHz), when scaled by $\gamma_{^{15}\text{N}}/\gamma_{^{14}\text{N}}$, gives a coupling constant of 9.1 MHz, which is very close to those obtained by HYSCORE spectroscopy for the anaerobic ribonucleotide reductase activating enzyme ($|a_{^{15}\text{N}}| = 8.9$ MHz) [23], and by ^{15}N ENDOR spectroscopy for the lysine aminomutase ($|a_{^{15}\text{N}}| = 9.1$ MHz) [34]. This strongly suggests that the amino group of SAM is coordinated to the unique Fe of the FeS center of SPL in a manner similar to that demonstrated in related enzymes.

3.4. In vitro DNA repair activity of the reconstituted SPL

In order to characterize the catalytic activity of SPL from *C. acetobutylicum*, we used the modified dinucleoside monophosphate SPTpT in a pure form as a substrate. SPTpT was prepared by UV irradiation of dry

Table 1

Parameters and relative amounts of Mössbauer doublets obtained by simulations for reconstituted and anaerobic SPL from *C. acetobutylicum*

Sites	Species	Reconstituted SPL			Anaerobic SPL		
		δ (mm/s)	ΔE_{Q} (mm/s)	Area (%)	δ (mm/s)	ΔE_{Q} (mm/s)	Area (%)
A	$[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$	0.43(2)	1.09(10)	42(5)	0.45(3)	1.22(10)	27(5)
B	$[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$	0.34(2)	0.67(5)	31(5)	0.35(3)	0.56(5)	58(5)
C	X	0.92	1.97	6(2)	–	–	–
D	Octahedral $\text{Fe}^{2+}(S=2)$	1.26	2.89	21(2)	–	–	–
E	Tetrahedral $\text{Fe}^{2+}(S=2)$	–	–	–	0.68(2)	3.47(3)	15(2)

The relative areas are derived from the 4.2 K spectrum.

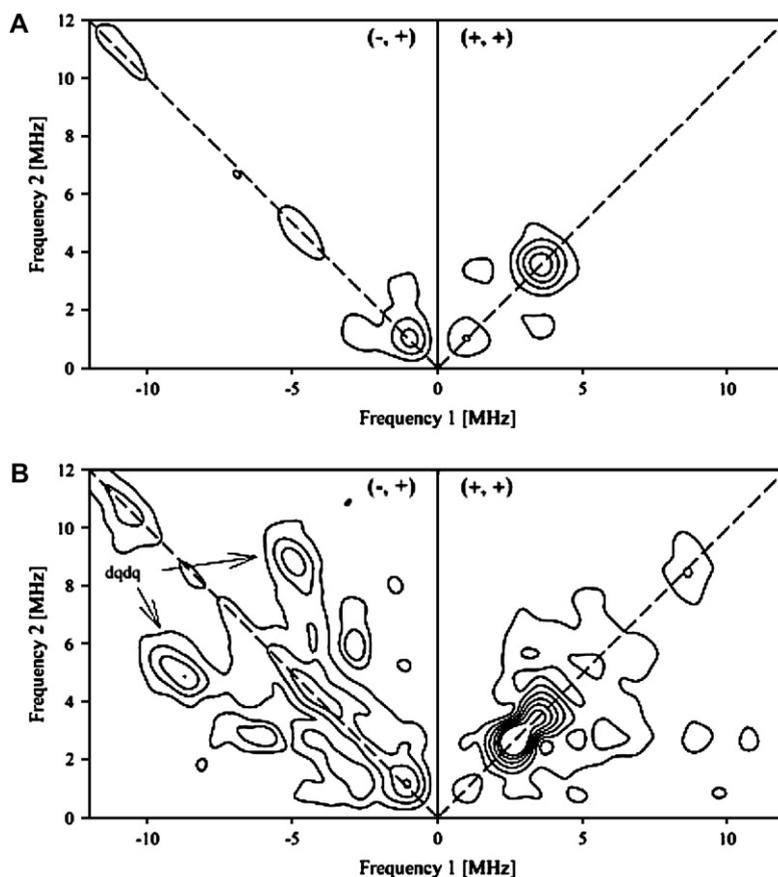


Fig. 3. HYSORE spectra of the anaerobically reduced reconstituted SPL (240 μM) recorded at $g = 1.93$, before (A) and after (B) addition of 10 molar excess of SAM.

films of the dinucleoside monophosphate TpT in the presence of DPA, as already described [22]. The reconstituted SPL (1 μM) was incubated together with 1.5 mM dithionite as a reducing agent, 1.5 mM SAM and 10 μM SPTpT under strict anaerobic conditions. The reaction mixture was then assayed at time intervals by HPLC-MS/MS for both substrate conversion and TpT (repaired dinucleotide) product formation. Indeed, these compounds can be easily separated by HPLC and identified, as they display characteristic well-defined mass spectrometric features. A typical time curve for SPL-dependent conversion of SPTpT to TpT is shown in Fig. 4. The results showed clearly that SPTpT could be totally converted by the enzymatic reaction into the expected repaired TpT product after 60 min reaction with an initial rate of approximately 0.2 mol/mol enzyme/min. Kinetic parameters were determined using increasing concentrations of the substrate. The K_m value was 6 μM , identical to that obtained with the *B. subtilis* enzyme, and the V_m value was 0.6 mol/mol/min. No

TpT could be detected when protein or SAM was omitted from the reaction mixture (control).

These results demonstrate that SPTpT is a substrate for SPL from *C. acetobutylicum* and that SPL functions catalytically with such a substrate.

4. Discussion

This work is the result of a search for an abundant source of SPL which would be compatible with spectroscopic, mechanistic and crystallographic studies. Indeed, until very recently, studies of SPL were done on poorly catalytically active and partially cleaved proteins, and proteins with low cluster content. This was due to the fact that the selected enzyme was that from *B. subtilis*, which is difficult to isolate. Furthermore, it is unstable, with a great tendency to precipitate, and its cluster is highly labile. On the other hand, these initial investigations, mainly by the group of W.L. Nicholson, provided the foundations for investigations of this

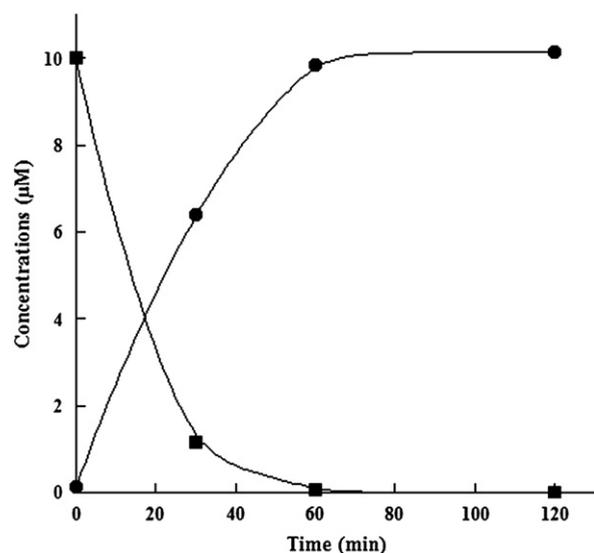


Fig. 4. In vitro assay of reconstituted SPL activity with SPTpT as a substrate. Time-dependent enzymatic SPTpT repair (■) and TpT formation (●).

fascinating DNA-repair enzyme [10,11,13,15]. In 2006, J. Broderick et al. reported a novel preparation for the *B. subtilis* recombinant enzyme in an active form, allowing the production of 25 mg pure protein from 10 L of growth media [21]. The anaerobic procedure used for the purification explained why the protein contained three Fe and three S atoms per monomer, a significant part (up to 35%) of them being in the form of [3Fe–4S] clusters. In the absence of Mössbauer spectroscopic study of this preparation, it is impossible to evaluate its cluster homogeneity. The addition of SAM to the purified protein was shown to increase its solubility.

Also in 2006, we reported an in vitro study of SP repair using a synthetic dimeric substrate and an SPL preparation from *B. subtilis* [22]. In order to have full content of Fe and S (about 4 per monomer), we used a reconstituted and active form of SPL, obtained by anaerobic treatment of the apo form by ferrous and sulfide salts. This form was found to be more soluble and stable. This study provided the first characterization of an SPL by Mössbauer spectroscopy, which demonstrated the presence of both [2Fe–2S] and [4Fe–4S] clusters. This is a characteristic of “Radical-SAM” enzymes and is probably a consequence of the lability of the [4Fe–4S] cluster. On the other hand, [2Fe–2S] clusters could be intermediates during [4Fe–4S] clusters’ assembly and thus their presence would reflect an incomplete reconstitution.

A last recent study using the SPL from *Geobacillus stearothermophilus* should be mentioned [41].

However, even though high turnovers are reported, very little information is provided regarding the stability of the protein, the nature and the stability of bound clusters as well as the amount of protein that can be obtained. Furthermore, the protein is a mixture of monomers and dimers together with a population of polypeptides cleaved at the C-Terminus.

We think that the SPL from *C. acetobutylicum* described here displays significant advantages with respect to the previously studied sources of enzyme.

First, this enzyme is much more soluble and stable. Less precipitation than with *B. subtilis* enzyme is observed, even in the absence of added SAM. Second, anaerobic purification yields a protein which contains defined clusters, both [2Fe–2S] and [4Fe–4S] with 85% of total iron residing in these clusters. The chemically reconstituted SPL also has about 80% of its Fe in the form of clusters, which is a larger value than in the case of *B. subtilis* [22]. The presence of a large proportion of [2Fe–2S] clusters in the anaerobically purified SPL was unexpected but might be due to freezing and thawing cycles required for Mössbauer experiments. Third, about 50 mg pure protein can be obtained from 10 L culture, which is the largest yield reported so far.

Furthermore, SPL from *C. acetobutylicum* displays a slightly greater specific activity as compared to other SPLs and it is interesting to note that it also recognizes and repairs the synthetic SP dimer, previously reported as a defined substrate [22]. This will allow further mechanistic studies.

Finally, HYSCORE spectroscopy has clearly demonstrated, for the first time in SPL, that the cluster of SPL binds the N atom of the aminocarboxylate moiety of SAM. We have also tried to carry out the same study with the *B. subtilis* enzyme, but this proved impossible because of the instability of the reduced cluster. This is a nice illustration of the superiority of the *C. acetobutylicum* enzyme. Since the hyperfine coupling constant a_N is identical to that obtained by ENDOR spectroscopy in the case of lysine aminomutase, it is very likely that coordination of SAM to the cluster is the same in the two enzymes. The structure of the complex has been crystallographically determined in the case of lysine aminomutase [34]. This provides an experimental support to the hypothesis that, as in all “Radical-SAM” enzymes, SPL activity begins with binding of SAM to the [4Fe–4S] cluster, followed by electron transfer and reductive cleavage of SAM to generate the 5′-deoxyadenosyl radical, Ado• [18–20]. The second step of the reaction which involves radical SP repair by Ado• has been quite well characterized by J. Broderick using labelled substrates and cofactors [14,21]. The molecular details of

the interactions between the enzyme and the DNA to be repaired await to be identified. The *C. acetobutylicum* enzyme might be a good choice for this project.

References

- [1] T. Lindahl, *Nature* 362 (1993) 709.
- [2] J.L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* 63 (2001) 88.
- [3] A.J. Varghese, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38 (1970) 484.
- [4] J.E. Donnellan Jr., R.B. Setlow, *Science* 149 (1965) 308.
- [5] B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84 (1987) 421.
- [6] W.L. Nicholson, B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88 (1991) 8288.
- [7] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* 81 (2005) 163.
- [8] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 591.
- [9] P. Setlow, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 29.
- [10] T.A. Slieman, R. Rebeil, W.L. Nicholson, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 6412.
- [11] R. Rebeil, Y. Sun, L. Chooback, M. Pedraza-Reyes, C. Kinsland, T.P. Begley, W.L. Nicholson, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 4879.
- [12] R.A. Mehl, T.P. Begley, *Org. Lett.* 1 (1999) 1065.
- [13] R. Rebeil, W.L. Nicholson, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 (2001) 9038.
- [14] J. Cheek, J.B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2860.
- [15] P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, W.L. Nicholson, *Curr. Microbiol.* 51 (2005) 331.
- [16] M.G. Friedel, O. Berteau, J.C. Pieck, M. Atta, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, T. Carell, *Chem. Commun. (Cambridge)* (2006) 445.
- [17] H.J. Sofia, G. Chen, B.G. Hetzler, J.F. Reyes-Spindola, N.E. Miller, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 1097.
- [18] M. Fontecave, E. Mulliez, S. Ollagnier-de-Choudens, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 506.
- [19] J. Cheek, J.B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 209.
- [20] P.A. Frey, S.J. Booker, *Adv. Protein Chem.* 58 (2001) 1.
- [21] J.M. Buis, J. Cheek, E. Kalliri, J.B. Broderick, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25994.
- [22] A. Chandor, O. Berteau, T. Douki, D. Gasparutto, Y. Sanakis, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Atta, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26922.
- [23] S. Gambarelli, F. Luttringer, D. Padovani, E. Mulliez, M. Fontecave, *ChemBiochem* 6 (2005) 1960.
- [24] C.J. Walsby, D. Ortillo, W.E. Broderick, J.B. Broderick, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 11270.
- [25] C. Krebs, W.E. Broderick, T.F. Henshaw, J.B. Broderick, B.H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 912.
- [26] C.J. Walsby, W. Hong, W.E. Broderick, J. Cheek, D. Ortillo, J.B. Broderick, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3143.
- [27] S.L. Beaucage, R.P. Iyer, *Tetrahedron* 48 (1992) 2223.
- [28] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- [29] W.W. Fish, *Methods Enzymol.* 158 (1988) 357.
- [30] H. Beinert, *Anal. Biochem.* 131 (1983) 373.
- [31] F. Pierrel, H.L. Hernandez, M.K. Johnson, M. Fontecave, M. Atta, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 29515.
- [32] G. Layer, K. Verfurth, E. Mahlitz, D. Jahn, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34136.
- [33] E. Mulliez, M. Fontecave, J. Gaillard, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2296.
- [34] D. Chen, C. Walsby, B.M. Hoffman, P.A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11788.
- [35] F. Berkovitch, Y. Nicolet, J.T. Wan, J.T. Jarrett, C.L. Drennan, *Science* 303 (2004) 76.
- [36] G. Layer, J. Moser, D.W. Heinz, D. Jahn, W.D. Schubert, *EMBO J.* 22 (2003) 6214.
- [37] P. Hanzelmann, H. Schindelin, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12870.
- [38] A. Schweiger, G. Jeschke, *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*, Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [39] A.G. Maryasov, M.K. Bowman, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 9412.
- [40] A.M. Tyryshkin, S.A. Dikanov, E.J. Reijerse, C. Burgard, J. Huttermann, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 3396.
- [41] J.C. Pieck, U. Hennecke, A.J. Pierik, M.G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.* (2006).

DNA Repair and Free Radicals, New Insights into the Mechanism of Spore Photoproduct Lyase Revealed by Single Amino Acid Substitution^{*[5]}

Received for publication, August 21, 2008, and in revised form, October 10, 2008. Published, JBC Papers in Press, October 27, 2008, DOI 10.1074/jbc.M806503200

Alexia Chandor-Proust^{‡§¶}, Olivier Berteau^{‡§¶1}, Thierry Douki^{||}, Didier Gasparutto^{||},
Sandrine Ollagnier-de-Choudens^{‡§¶1}, Marc Fontecave^{‡§¶2}, and Mohamed Atta^{‡§¶3}

From the [‡]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Recherches en Technologie et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble 38054, [§]CNRS, UMR5249, Grenoble, the [¶]Université Joseph Fourier, Grenoble 38081, and the ^{||}Direction des Sciences de la Matière, Institut Nanosciences et Cryogénie, Service de Chimie Inorganique et Biologique, UMR-E3, CEA-Université Joseph Fourier, Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques," CEA-Grenoble, Grenoble 38054, Cedex 9, France

The major DNA photoproduct in UV-irradiated *Bacillus subtilis* spores is the thymine dimer named spore photoproduct (SP, 5-(α -thyminyloxy)-5,6-dihydrothymine). The SP lesion has been found to be efficiently repaired by SP lyase (SPL) a very specific enzyme that reverses the SP to two intact thymines, at the origin of the great resistance of the spores to UV irradiation. SPL belongs to a superfamily of [4Fe-4S] iron-sulfur enzymes, called "Radical-SAM." Here, we show that the single substitution of cysteine 141 into alanine, a residue fully conserved in *Bacillus* species and previously shown to be essential for spore DNA repair *in vivo*, has a major impact on the outcome of the SPL-dependent repair reaction *in vitro*. Indeed the modified enzyme catalyzes the almost quantitative conversion of the SP lesion into one thymine and one thymine sulfinic acid derivative. This compound results from the trapping of the allyl-type radical intermediate by dithionite, used as reducing agent in the reaction mixture. Implications of the data reported here regarding the repair mechanism and the role of Cys-141 are discussed.

Because of their chemical reactivity with regard to biological macromolecules (proteins, lipids, DNA, and others), free radicals are responsible for major damages when produced in large amounts within living cells (1). On the other hand, there has been an explosive growth in the number of enzymatic reactions found to proceed by mechanisms involving free radicals as intermediates (2). This chemistry implies that enzymes have evolved delicate mechanisms to generate reaction-initiating primary radicals from stable substrates and to control these highly reactive species within the active sites so that they can undergo subsequent steps in the enzymatic process and do not get inactivated through radical coupling or harmful reactions

with the protein itself or with oxygen, for example. This represents a fascinating issue in enzymology, and many mysteries of this chemistry remain to be unraveled.

The spore photoproduct lyase enzyme (SPL)⁴ studied here is a nice illustration of how a radical chemistry is used for the cleavage of unreactive C–H and C–C bonds to repair DNA and how the control of intermediate radicals can be drastically lost by a single amino acid substitution. During exposure to UV light of bacterial spores, a dormant form produced by some bacteria such as *Bacillus* and *Clostridium* species, dimerization of adjacent thymine bases in DNA results in the specific formation of 5-(α -thyminyloxy)-5,6-dihydrothymine, the so-called spore photoproduct SP (Scheme 1A), a lesion that can block replication and transcription and is thus potentially lethal, mutagenic, and cytotoxic (3,4). Sporulating bacteria are extremely resistant to UV radiation, because they use SPL early in the spore germination cycle, to very efficiently and specifically revert SP to two unmodified thymines (Scheme 1A) (5–7).

The SPL enzymatic mechanism has been addressed only recently, when pure preparations of SPL became available, and the following data are consistent with a radical mechanism initially proposed by T. P. Begley, on the basis of model compounds (8). First, SPL is a "Radical-SAM (S-adenosyl-methionine)" iron-sulfur enzyme (9). This class of enzymes uses a 5'-deoxyadenosyl radical, produced from reductive cleavage of AdoMet, to initiate the reaction (Scheme 1B) (10, 11). Second, experimental evidence of label transfer to AdoMet from SP in DNA specifically ³H-labeled at C-6 indirectly shows that repair is initiated by abstraction of the C-6 hydrogen atom of SP by the 5'-deoxyadenosyl radical (12) (Scheme 1B). The subsequent steps have been less characterized, but it is likely that C–C bond homolytic cleavage follows to give an allyl-type radical together with a first repaired thymine. The last step of the reaction has been proposed to involve hydrogen atom transfer from 5'-deoxyadenosine (AdoH) to the thymine monomer radical (12).

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

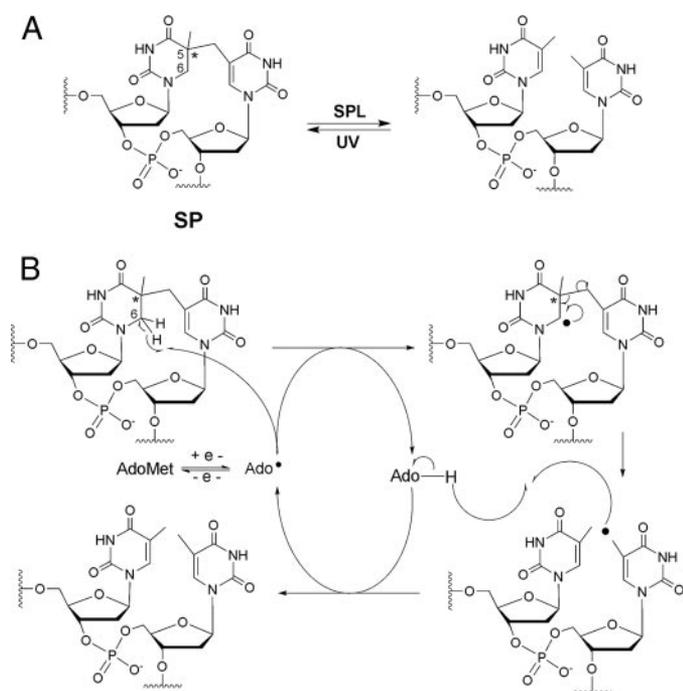
[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S8.

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, 78352 Jouy-en-Josas, France.

² To whom correspondence may be addressed: Tel.: 33-4-3878-9103; Fax: 33-4-3878-9124; marc.fontecave@cea.fr.

³ To whom correspondence may be addressed: Tel.: 33-4-3878-9115; Fax: 33-4-3878-9124; E-mail: mohamed.atta@cea.fr.

⁴ The abbreviations used are: SPL, spore photoproduct lyase; SP, spore photoproduct, 5-(α -thyminyloxy)-5,6-dihydrothymine; AdoMet, S-adenosylmethionine or S-adenosyl-L-methionine (SAM); AdoH, 5'-deoxyadenosyl; DTT, dithiothreitol; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; wt, wild type; Rt, retention time; TpT, dinucleoside monophosphate; TS Φ pT, 5-(thiophenylmethyl)-2'-deoxyuridylyl-(3',5')thymidine; TpTS Φ , thymidylyl-(3',5')-5-(thiophenylmethyl)-2'-deoxyuridine.



SCHEME 1. A, UV-dependent formation and SPL-catalyzed repair of SP. The wavy line represents the nucleic acid chain. B, proposed chemical mechanism for SP lyase DNA repair (12). AdoMet is S-adenosylmethionine, Ado• is 5'-deoxyadenosyl radical generated from reductive cleavage of AdoMet by the reduced [4Fe-4S]⁺¹ cluster of SPL.

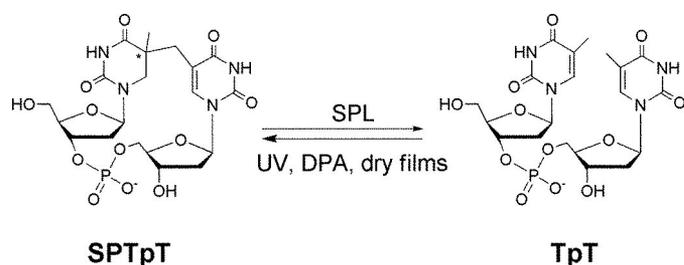
Preliminary experiments have indeed shown some label transfer from [5'-³H]AdoMet into thymine monomers, using a DNA substrate containing the SP lesion, thus supporting the mechanism shown in Scheme 1B (12, 13).

In this report, we provide evidence for the involvement of the allyl-type radical during *in vitro* *B. subtilis* SPL-dependent repair reaction. We took advantage of using pure preparations of a dinucleoside monophosphate substrate named SPTpT in the following (Scheme 2), in one hand, and, in another hand, an SPL mutant in which Cys-141, a residue fully conserved in *Bacillus* species and previously shown to be essential for spore DNA repair *in vivo*, has been changed into alanine (14). We were indeed intrigued by this observation, because Cys-141 is not a ligand of the [Fe-S] cluster present in the active site, in contrast to cysteines 91, 95, and 98 of the CysXXXCysXXCys motif characteristic of Radical-SAM enzymes. Implications of the data reported here regarding the reaction mechanism and the role of Cys-141 are discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Strains: *Escherichia coli* DH5α was used for routine DNA manipulations. *E. coli* Tuner (DE3) was used for enzymes overexpression. Enzymes, oligonucleotides, and culture media were purchased from Euromedex (Strasbourg, France). Plasmid DNA purification kit, Qiaprep™, was from Qiagen. DNA sequencing was performed by Genome Express (Grenoble, France).

Cloning and Construction of Mutant C141A SPL-overexpressing Plasmid—The plasmid containing the *SplB* gene, encoding wild-type N-terminal 6His-tagged SPL (pT₇-SPL6H), was obtained as previously described (7). A site-directed



SCHEME 2. SPTpT formation and repair. SPL is the spore photoproduct lyase enzyme from *B. subtilis*; DPA is dipicolinic acid.

mutagenesis was performed to change cysteine 141 into an alanine using QuikChange site-directed mutagenesis kits from Stratagene according to the manufacturer's protocol. The mutant plasmid was entirely sequenced to ensure that no error was introduced during PCR reaction. The plasmid was then named pT₇-SPLC141A.

Protein Expression—For both wt SPL and SPL-C141A, expression was conducted in LB medium in the *E. coli* Tuner (DE3), and proteins were purified under aerobic conditions as previously described (7).

Iron and Sulfide Binding to WT and C141A *B. subtilis* SPL—[Fe-S] cluster reconstitutions of wt and C141A *B. subtilis* SPL were carried out under strictly anaerobic conditions in a glove box containing <2 ppm O₂ as previously described (7).

Production of SPTpT Substrates—The spore photoproduct of the dinucleoside monophosphate thymidylyl-(3',5')thymidine was prepared as previously described (7).

SP-Lyase Activity—To assay SPL activity we followed the same procedure as for Wild-type SPL (7), using 2.5 mM DTT, 1.5 mM dithionite, and 1.5 mM AdoMet. At each time point (0, 15 30, 60, 120, 215, and 280 min) 20 μl and 10 μl of the solution were transferred into Eppendorf tubes, and the reaction was stopped by flash-freezing in liquid nitrogen. Conversion of the spore photoproduct (SPTpT) into the unmodified dinucleoside monophosphate (TpT) and other products in SPL-treated samples was quantified by HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), using the same conditions as for samples treated by wt SPL (7).

HPLC-MS Analysis—HPLC-MS/MS analyses were carried out on an API 3000 tandem mass spectrometer associated to a Series 1100 Agilent chromatography system. An Uptisphere ODB reversed-phase octadecylsilyl silica gel column (3-μm particle size, 150 × 2 mm inner diameter, Interchim, Montluçon, France) was used in all analyses. A gradient of acetonitrile in 2 mM aqueous triethylammonium acetate was used for most analyses, which were carried out in the negative electrospray ionization mode. These conditions were applied for TpT (retention time (Rt) 26.6 min), SPTpT (Rt 19.9 min), the SO₂ derivatives of TpT (TpTSO₂ Rt 21.7 min and TSO₂pT Rt 22.3 min), the hydroxylated derivatives of TpT (TpTOH Rt 25.6 min and TOHpT Rt 24.3 min). Experiments were also carried out in the positive electrospray ionization mode. For that purpose, acetate ammonium was used as the HPLC buffer. Under these conditions, the retention times were the following: TpTSO₂ 18.3 min, TSO₂pT 19.2 min, 5'-deoxyadenosyl (AdoH) 5.1 min, and AdoMet 3.1 min. The chromatograms were recorded either in the MS1 (full spectra without fragmentation), SIM

(selected ion monitoring without fragmentation), MS2 (full spectra of fragment arising from a specific parent ion), and MRM (multiple reaction monitoring, specific for transition corresponding to compounds of interest) modes.

SAM Reductase Activity—The cleavage of AdoMet was monitored by HPLC from the formation of AdoH as previously described (15).

Protein Analysis—Protein concentration (by monomer) was determined by the method of Bradford (16). Protein-bound iron (17) and labile sulfide (18) concentrations were determined according to standard procedures.

Preparation and Light-induced Decomposition of Thiophenyl Derivatives of TpT—5-(Thiophenylmethyl)-2'-deoxyuridylyl-(3',5')thymidine (TS Φ pT) and thymidylyl-(3',5')-5-(thiophenylmethyl)-2'-deoxyuridine (TpTS Φ) were prepared as previously described (19). In a first series of experiments, solutions containing 40 μ M TpTS Φ or TS Φ pT together with 1.5 mM Na₂S₂O₄ were kept overnight in an anaerobic glove box. Samples were then exposed for 5 min to UV-C radiation (254 nm) emitted by a germicidal lamp. A second series of irradiations was performed with aerated solutions of either TpTS Φ or TS Φ pT. Samples were then analyzed by HPLC-MS/MS without further treatment. Elution was monitored in the MS2 mode. Parent ions were set at *m/z* 609 and 561 in the negative mode and 611 in the positive mode.

UV-visible Absorption Spectroscopy—UV-visible absorption spectra were recorded with a Cary 1 Bio (Varian) spectrophotometer.

EPR—Reconstituted SPL-C141A (187 μ M, 4.2 iron/protein) were reduced with 2 mM dithionite under anaerobic conditions for 20 min and frozen inside the glove box. X-Band EPR spectra were recorded on a Bruker Instruments ESP 300D spectrometer equipped with an Oxford Instruments ESR 900 flow cryostat (4.2–300 K). Spectra were quantified under non-saturating conditions by double integration against a 1 mM Cu-EDTA standard.

Mössbauer Spectroscopy—For Mössbauer measurements, reconstituted SPL-C141A (9.6 mg and 4.2 iron/protein) was prepared as described above in a final volume of 400 μ l. The protein solution was transferred into a Mössbauer cup and frozen in liquid nitrogen. ⁵⁷Fe-Mössbauer spectra were recorded at zero magnetic field on a spectrometer operating in constant acceleration mode using an Oxford cryostat that allowed temperatures from 1.5 to 300 K and a ⁵⁷Co source in rhodium. Isomer shifts are reported relative to metallic iron at room temperature.

RESULTS

Cloning, Overexpression, and Purification of SPL C141A Variant—The pT₇-SPL-C141A plasmid, obtained as described under "Experimental Procedures," was used to transform *E. coli* Tuner (DE3) strain for production of a protein with a His tag at the N-terminal end and an alanine at position 141 in place of a cysteine. A His tag at this extremity is not detrimental to wild-type (wt) SPL enzyme activity (20). The SPL-C141A mutant protein could be obtained in pure form, with traces of protein-bound iron and acid-labile sulfide. Reconstitution of the [Fe-S] cluster yielded a SPL-C141A protein containing ~3–3.5 iron

and 3.5–4 sulfur atoms per monomer, in agreement with the presence of a [4Fe-4S] cluster. The UV-visible spectrum, with two broad bands at 330 and 420 nm, of the reconstituted mutant as well as the EPR spectrum of the dithionite-reduced protein, with a signal characteristic for a S = 1/2 [4Fe-4S]⁺ species, were similar to those of wt SPL (supplemental Figs. S1 and S2). The [Fe-S] cluster was further investigated by Mössbauer spectroscopy using a protein sample (277 μ M, 4.01 iron/monomer) reconstituted with ⁵⁷Fe and sulfide as previously described in the case of wt SPL (7). The spectra recorded at 78 K and 4.2 K were dominated by a quadrupole doublet, the parameters of which ($\delta \sim 0.44(1)$ mm.s⁻¹, $\Delta E_Q = 1.07(2)$ mm.s⁻¹) clearly corresponded to a [4Fe-4S]²⁺ cluster, accounting for ~73% of total Fe (supplemental Fig. S3). Extra iron was in the form of high spin ferrous iron, as observed in the case of wt SPL.

In Vitro SPTpT Repair Activity of the Wild-type SPL Enzyme—We assayed SPL activity using the SPTpT dimer, shown in Scheme 2, as a pure substrate. SPTpT is produced by UV irradiation of the unmodified dinucleoside monophosphate TpT. The methylene bridge in SP corresponds to the methyl group of the 3'-end thymine (7). This synthetic compound is identical to that released from DNA extracted from UV-irradiated spores as shown by their identical HPLC retention time and fragmentation mass spectrometry features (7). Use of this substrate facilitated monitoring of the repair reaction, because assay samples could be directly submitted to HPLC-MS/MS analysis at the end of the incubation time, for separation, identification, and quantitation of SPTpT and TpT (Scheme 2). We recently reported that this substrate is totally transformed into TpT under standard assay conditions, using wt SPL (7). For sake of comparison with the SPL-C141A enzyme, a standard highly reproducible wt SPL time-dependent repair experiment is shown in Fig. 1A. The assay mixture contained a pure preparation of reconstituted wt SPL (1 μ M) together with 1.5 mM dithionite as a reducing agent, 1.5 mM AdoMet and 10 μ M SPTpT in DTT-containing buffer at pH 8 under strict anaerobic conditions. The repair reaction was then assayed at time intervals by HPLC-MS/MS for its content in SPTpT and TpT. Fig. 1A shows that a quantitative conversion of SPTpT to TpT was achieved in <60 min.

In parallel, the reaction mixture was assayed for the production of AdoH, the product resulting from AdoMet-reductive cleavage. The results shown in Fig. 1B demonstrate that approximately one equivalent of AdoH with regard to the reaction TpT product was formed during repair. Further production of AdoH still took place after 60-min incubation reflecting the ability of the wt SPL enzyme to reductively cleave AdoMet in the absence of substrate, a property also reported by others (see Fig. 1B) (21,22). These data thus suggest that, at least with SPTpT as a substrate, the SPL enzyme reaction is not catalytic with regard to AdoMet and that AdoH does not serve as a hydrogen atom donor during the final step of the reaction, leading to TpT (see Scheme 1B). This has been confirmed by a labeling experiment, using an AdoMet preparation containing a partially deuterated 5'-methylene group, because no appreciable D incorporation into TpT, during SPTpT repair under standard conditions, could be observed. Buffer used in these *in*

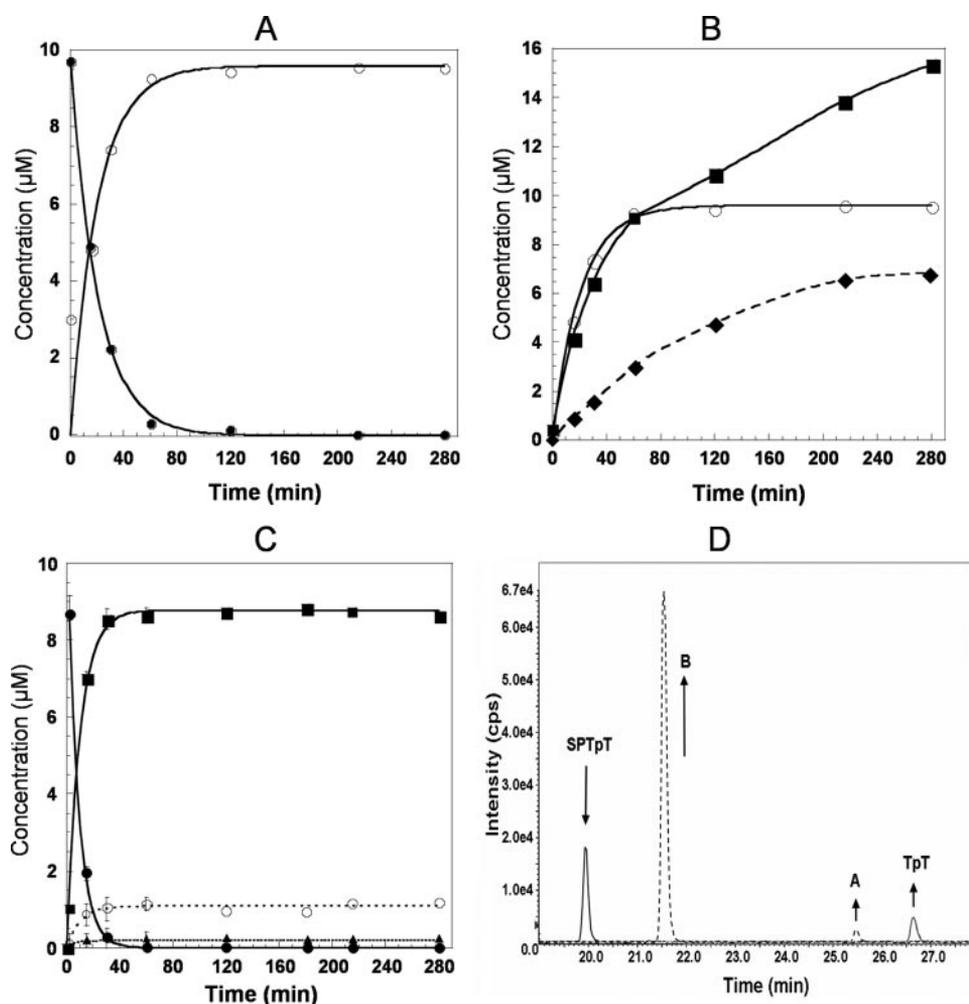


FIGURE 1. A, time-dependent enzymatic repair of SPTpT. SPTpT (10 μM) and SPL (1 μM) in 100 mM Tris-HCl, pH 8, containing 2.5 mM DTT, 1.5 mM dithionite, and 1.5 mM AdoMet anaerobically. SPTpT (●) and TpT (○) were separated by HPLC and quantitated at time intervals. B, time-dependent formation of AdoH (■) and TpT (○). Conditions as in A in the presence (■) or in the absence (◆) of SPTpT. AdoH and TpT are monitored by HPLC. C, time-dependent enzymatic of SPL-C141A on SPTpT. SPTpT (10 μM) and SPL-C141A (1 μM) in 100 mM Tris-HCl, pH 8, containing 2.5 mM DTT, 1.5 mM dithionite, and 1.5 mM AdoMet anaerobically. SPTpT (●), TpT (○), B (■), and A (▲). SPTpT, TpT, A, and B were separated by HPLC and quantitated at time intervals. D, HPLC chromatogram showing the different reaction products after 15-min incubation. Retention times: SPTpT, 19.9 min; B, 21.7 min; A, 25.6 min; and TpT, 26.6 min.

in vitro experiments contained DTT, which could function as a hydrogen atom donor.

In Vitro SPTpT Repair Activity of the SPL-C141A Mutant Enzyme—The SPL-C141A enzyme was also competent for AdoMet reductive cleavage in the absence of substrate, under anaerobic conditions showing that the protein interacts with the AdoMet cofactor (data not shown). A time curve for SPL-C141A-dependent conversion of SPTpT, assayed under the conditions used for the wt SPL, is shown in Fig. 1C. The results clearly showed that the SPTpT substrate, corresponding to the peak eluted at 19.9 min (Fig. 1D), was totally consumed after a 30-min reaction but, in contrast to the wt SPL-catalyzed reaction, repaired TpT product (retention time: 26.6 min, Fig. 1D) yield did not exceed 10%. No SPTpT consumption could be detected when protein SPL-C141A or AdoMet was omitted from the reaction mixture (data not shown). This showed that SPTpT was indeed modified by SPL-C141A but not primarily reverted back to TpT with two unmodified thymines.

Samples were then analyzed by HPLC with MS1 monitoring to search for putative incomplete reaction products. Besides SPTpT and TpT, two additional peaks (A, 25.6 min; B, 21.7 min), which increased in intensity during reaction, were observed (Fig. 1, C and D). The molecular weight of the corresponding compounds was found by MS1 to be 562 and 610 for compounds A and B, respectively (Fig. 2A). These values are consistent with a hydroxylated derivative of TpT for compound A and with a SO_2 adduct for compound B. Determination of their fragmentation mass spectra (Fig. 2, B and C, see comments below) allowed us to set up a specific and sensitive MRM HPLC-MS/MS method to monitor the time-dependent formation of products A and B upon conversion of SPTpT catalyzed by the SPL-C141A enzyme. The results are those shown in Fig. 1C. At the end of the reaction compound B (90% yield) was by far the major product, and very low amounts of compound A (1–2%) could be detected. In fact, this last product was also observed in tiny amounts in the case of the wt SPL-dependent reaction.

Identification of the Products of the Reaction Catalyzed by the SPL-C141A Enzyme—Further insights into the chemical structure of compounds A and B could be first obtained from the analysis of their MS2 fragmentation mass spectra

(Fig. 2). In the negative mode, the fragmentation of unmodified dinucleoside monophosphate compounds is dominated by the loss of the base of the 5'-terminal nucleotide leading to the following fragments: the deprotonated free base and the dinucleoside monophosphate with a single base at the 3'-terminal nucleotide (23). Such a typical fragmentation is illustrated in the supplemental Fig. S4 with uracil/thymine dinucleoside monophosphates dUpT and TpdU. The same fragmentation pattern was unambiguously observed for compound A, with release of unmodified thymine (noted "Thy-H") and formation of an abasic dinucleoside monophosphate with a single hydroxylated base at the 3'-terminal nucleotide (noted "M-Thy-H") (Fig. 2B). These data show that compound A is a derivative of TpT with an hydroxyl group at the 3'-end thymine exclusively.

Characterization of compound B was more tedious. Indeed, its fragmentation spectrum recorded in the negative mode (Fig. 2C) was not conclusive, regarding the presence of the SO_2

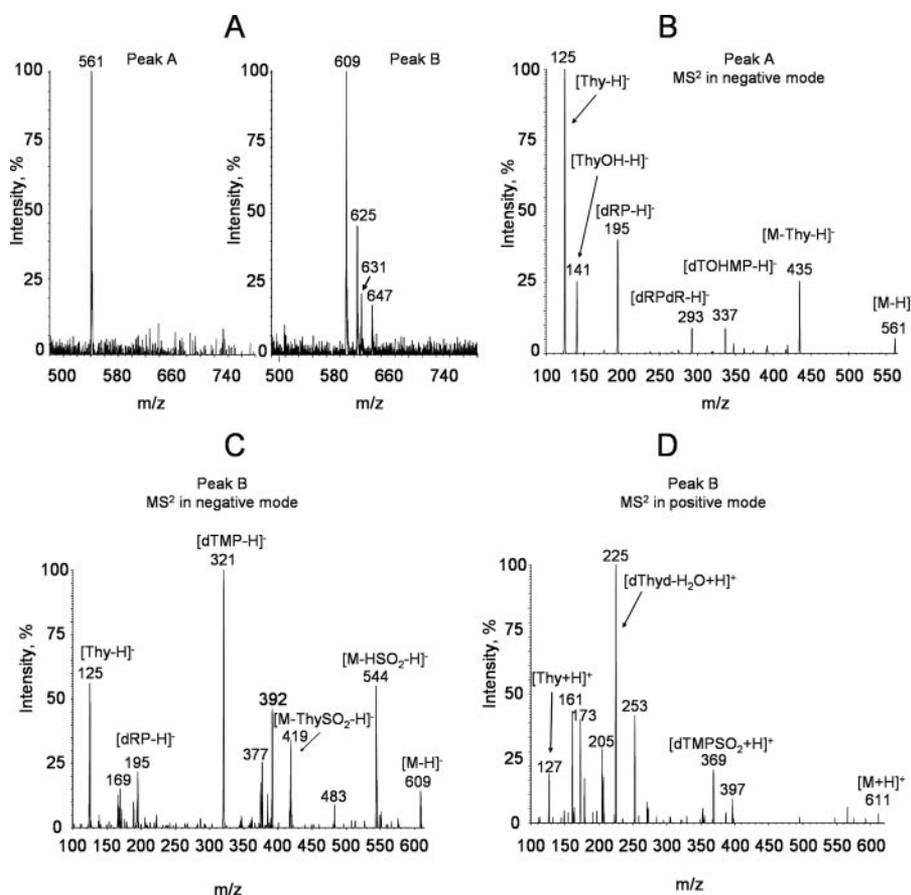
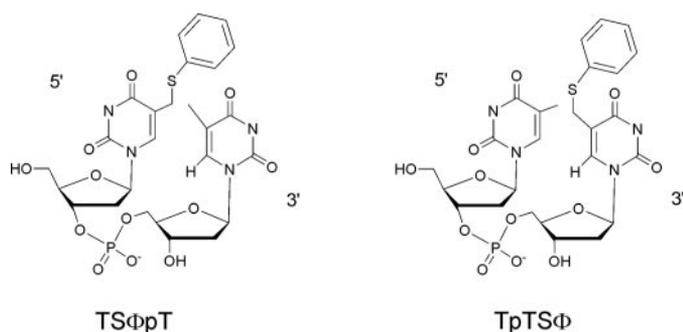


FIGURE 2. MS1 spectra of compounds A and B (panel A) and MS2 features of compound A (OH adduct, panel B) and B (SO₂ adduct, panels C and D).



SCHEME 3. 5-(Thiophenylmethyl)uracil dinucleoside monophosphates as precursors of the intermediate allylic radical. When the thiophenyl moiety SΦ is attached on the 5'-end base the compound is named TSΦpT. When SΦ is attached on the 3'-end base the compound is named TpTSΦ. The carbon-centered allylic radical is generated upon UV-C irradiation in the absence of oxygen through the homolytic cleavage of the C-S bond.

group on the 3'-end or 5'-end thymine: whereas a thymine fragment but no SO₂-thymine derivative was observed, detection of a fragment possibly resulting from the loss of ThySO₂ could also be explained by the presence of SO₂ at the 5'-end base (Fig. 2C). In contrast, fragmentation MS under positive ionization made conclusions possible (Fig. 2D). Under these conditions, a typical fragmentation pattern for dinucleoside monophosphates is the release of the protonated 3'-end nucleotide together with the dehydrated 5'-end nucleoside (see sup-

plemental Fig. S5 for the case of dUpT and TpdU). Fragmentation of product B followed this pattern with evidence for an unmodified dehydrated thymidine at the 5'-end (noted "*dThd-H₂O+H*" in Fig. 2D) and a SO₂-modified monophosphate thymidine at the 3'-end (noted "*dTMPPO₂+H*" in Fig. 2D).

These data thus clearly demonstrated that the major product during transformation of SPTpT catalyzed by the mutant enzyme was a dinucleoside monophosphate in which the covalent link between the two bases has been cleaved and that a SO₂ group was attached specifically to the base of the 3'-end nucleotide. In the next section we describe experiments aiming at showing, through a chemical approach, that the SO₂ moiety comes from dithionite and that SO₂ addition occurs at the methyl group of the modified thymine.

A Model Chemistry for the Formation of A and B—We reasoned that formation of B could arise from coupling between an intermediate dinucleoside monophosphate radical and an SO₂ radical derived from

dithionite. A good candidate for the former is the carbon-centered allylic radical generated after the homolytic cleavage of the C-C bond, shown in Scheme 1B. To study such a reaction, we generated this allylic radical photochemically in the presence of dithionite and identified the reaction products by HPLC and MS as discussed under "Experimental Procedures." The precursor was a synthetic dinucleoside monophosphate derivative in which a thiophenyl moiety is covalently attached to the methyl group of the thymine either at the 5'- (named TSΦpT) or the 3'- (named TpTSΦ) end (Scheme 3). This functionality is known to undergo homolytic cleavage of the sulfur-carbon bond during irradiation (19). In the presence of dithionite (1.5 mM) and the absence of oxygen, UV-C photolysis of TSΦpT and TpTSΦ (40 μM) each yielded a compound with an additional mass of 64 consistent with the addition of a SO₂ group, as shown by MS (supplemental Figs. S6–S8). However, the two compounds were different in terms of both HPLC retention times (Fig. 3I) and mass spectrometry features (supplemental Figs. S6–S8). Only the reaction product of the TpTSΦ compound irradiated in the presence of dithionite exhibited properties perfectly identical to those of compound B produced during the repair of SPTpT by SPL-C141A. Interestingly, the reaction also produced a very small amount of compound A by an undefined mechanism.

These data then unambiguously established a number of conclusions. First they confirm that compound B had the SO₂ adduct at the 3'-end thymine and not at the 5'-end one. Second,

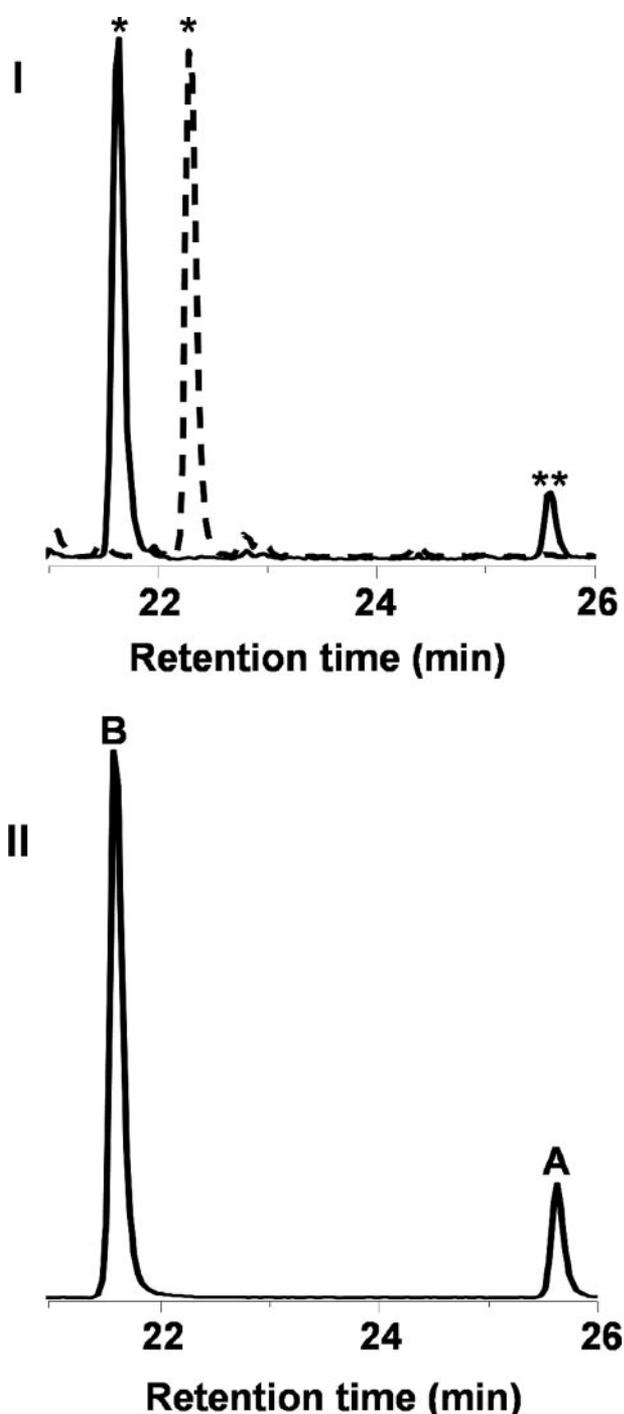


FIGURE 3. HPLC comparison of the reaction products obtained upon repair of SPTpT by SPL-C141A and by photolysis of radical precursor (TpT Φ and TS Φ pT). Panel I, SO₂ (*) and OH (**) TpT adducts obtained upon photolysis of TpT Φ (solid line) and TS Φ pT (dotted line), anaerobically in the presence of dithionite. Panel II, SO₂ (B) and OH (A) TpT adducts obtained upon incubation of SPTpT with SPL-C141A in the presence of dithionite, anaerobically.

they show that the addition occurred at the methyl carbon of the base and that dithionite was the source of SO₂.

DISCUSSION

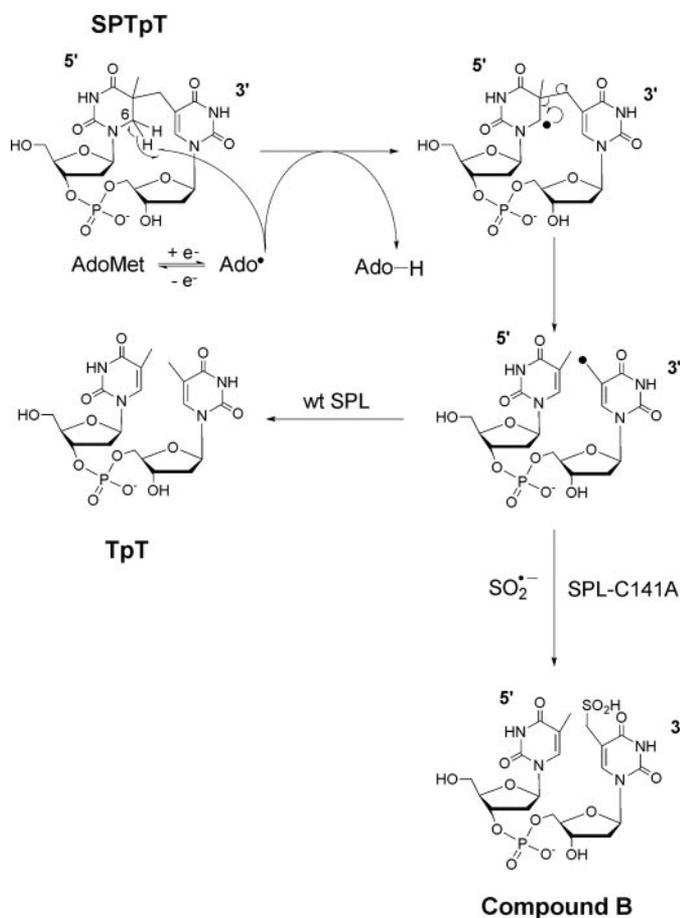
We earlier discovered that the SPTpT dimer (Scheme 2), identical to the dimer released from DNA extracted from UV-irradiated spores, behaves as a substrate of the spore photo-

product lyase (SPL) (7). Now, we show that with SPTpT as a substrate the enzyme reaction is not catalytic with regard to AdoMet and produces the repaired TpT compound and AdoH in stoichiometric amounts. This implies that the product radical intermediate, precursor of TpT, does not abstract a hydrogen atom from AdoH (Scheme 1B). Confirmation is provided from the lack of incorporation of deuterium into TpT when the reaction is carried out in the presence of deuterated AdoMet. The source of H atoms in this reaction has not been determined and will be discussed below. In contrast, in one study using irradiated DNA, SPL-dependent repair was found to be catalytic with regard to AdoMet, thus in agreement with the mechanism shown in Scheme 1B, in which AdoH is the H atom donor. Nevertheless, because SPTpT can be easily produced by UV irradiation of the unmodified dinucleoside monophosphate TpT in significant yields and in pure form and is a SPL substrate easy to monitor, we used it for mechanistic studies rather than an undefined preparation of irradiated DNA containing a mixture of lesions, with the spore photoproduct as a minor one (7). DNA from irradiated bacterial spores is another possible source of substrate but much less easily accessible.

Intrigued by the importance of Cys-141, a conserved cysteine in *Bacillus* SPLs, for spore survival under UV irradiation (14), we have investigated in detail the properties of the SPL-C141A mutant form and made a number of interesting unexpected observations.

Here, using *in vitro* experiments, we confirm that this cysteine residue plays an important function in the outcome of the repair reaction. Indeed, whereas SPTpT is still recognized by the mutant enzyme and transformed efficiently, the major product of the reaction is not the TpT dimer. HPLC analysis, mass spectrometry, and chemical model reactions, using photoreactive radical precursors, led us to unambiguously establish that the major product (>90% yield) of the reaction is a modified dinucleoside monophosphate containing one thymine and one thymine with a sulfinate moiety compound B (Scheme 4). We also demonstrate that the sulfinate group: (i) is attached to the methyl carbon of the base; (ii) is exclusively present in the thymine of the 3'-end of the dinucleoside monophosphate; and (iii) is derived from dithionite, the reducing agent present in the *in vitro* assay mixture. These results are interpreted by the mechanism shown in Scheme 4 for the repair of SPTpT catalyzed by the wt SPL and the mutant SPL-C141A enzyme.

Because both enzymes are able to generate products lacking the initial covalent bond between the bases it is likely that the first steps of the reaction, during which the cross-link is broken, are the same and that the substitution of cysteine 141 into alanine is not detrimental to substrate binding in the active site of the protein and reacting with the cofactor. This is consistent with the fact that the SPL-C141A enzyme chelates a [4Fe-4S] cluster with high yield, as shown by Mössbauer spectroscopy, and catalyzes the reductive cleavage of AdoMet in the absence of substrate, as does wt SPL (our results and Refs. 21, 22). Thus, in both cases the reaction starts with the reductive cleavage of AdoMet by the reduced cluster generating the 5'-deoxyadenosyl radical, which then abstracts one of the H atoms at the methylene C-6 position. This primary radical undergoes a β -scission leading to the homolytic cleavage of the C-C bond linking the



SCHEME 4. Our proposed mechanism for the repair of SPTpT catalyzed by either wt SPL or SPL-C141A. After reductive cleavage of AdoMet, Ado[•] abstracts one of the H atom at C6 carbon of the saturated base. The corresponding 6-yl radical is converted to the carbon-centered allylic radical at the 3'-end base. Whereas wt SPL allows generation of unmodified thymines, in the case of SPL-C141A, this allylic radical is trapped by dithionite derivating radical (SO₂⁻) leading to compound B (90%).

two thymines generating an allylic radical. Differences between the two enzymes appear in the last step of the reaction (Scheme 4). Our data suggest that the substitution of Cys-141 into alanine is responsible for a deficient control/protection of the allylic radical intermediate, which then is efficiently trapped by the SO₂⁻ radicals generated in solution by dithionite, through a radical-radical coupling reaction producing the sulfinate compound (Scheme 4).

This mechanism implies two key radical intermediates. The involvement of the first one, derived from H atom abstraction at C-6 methylene by the 5'-deoxyadenosyl radical Ado[•], has been demonstrated by DNA labeling experiments, using the wt enzyme, previously reported (12). The involvement of the second one, the allylic radical precursor of the repaired product, is now indirectly proven by the experiments reported here using the SPL-C141A mutant enzyme. The latter in that respect proved remarkable as it indeed unexpectedly allowed an efficient trapping of this second radical by dithionite, which could be easily monitored by HPLC/mass spectrometry.

At this stage it is not known how Cys-141 provides the radical control/protection mechanism, but two possibilities, requiring further investigation, are briefly discussed in the following. The

first hypothesis implies Cys-141 as an H atom donor to the intermediate allylic radical. Such a reaction is thermodynamically reasonable, considering that the energy of the S–H bond of a cysteine residue is slightly larger than to that of the C–H bond of an allyl group (25). Substitution of Cys-141 into alanine thus would result in a further stabilization of the intermediate allylic radical, thus facilitating its coupling with highly reactive free radicals in the environment such as those produced by dithionite in the *in vitro* experiments. To be catalytic, the resulting protein-bound cysteinyl radical generated in SPL after TpT formation needs to be converted back to a normal cysteine. This reaction implies an H atom donor, which has not been identified but might be DTT *in vitro*. A second hypothesis implies that cysteine 141 participates in the stabilization of a specific structure of the active site, which prevents the intermediate radical from reacting with exogenous free radicals. In this model, the wt enzyme has its active site in a “closed” conformation because of the presence of Cys-141 and the allylic radical does not react with the dithionite-derived radicals present in the *in vitro* reaction mixture. Instead, it reacts almost exclusively with an H atom donor, by H atom radical abstraction, to generate the final repaired TpT product. In the case of the SPTpT substrate used here, because AdoH is excluded, the nature of the H atom donor is unknown. Considering that with DNA substrate AdoH is the direct H atom donor (Scheme 1B), we consider the second hypothesis as more likely. Obviously a structural characterization of SPL is required to substantiate at the molecular level such a hypothesis.

In conclusion, our data confirm that a single substitution of cysteine-141 into alanine has a major impact on the SPL-dependent repair reaction and are consistent with the high sensitivity of bacterial spores containing a C141A SPL mutant enzyme to irradiation, as previously reported (14). How this amino acid residue contributes to tightly control the outcome of highly energetic and reactive radical intermediates during catalysis remains to be understood. Furthermore, the mutant enzyme studied here has allowed trapping of one of the key catalytically competent free radical intermediates, providing new insights into the mechanism of SP repair by the SPL enzyme.

Acknowledgments—We thank Y. Sanakis (Institut of Materials Science, National Center for Scientific Research, Attiki, Greece) for Mössbauer analysis on the SPL-C141A enzyme and P. Frey (Enzyme Institute, University of Madison, Madison, WI) for providing [5'-(²H)₂]SAM.

REFERENCES

- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, NY
- Frey, P. A., Hegeman, A. D., and Reed, G. H. (2006) *Chem. Rev.* **106**, 3302–3316
- Donnellan, J. E., Jr., and Setlow, R. B. (1965) *Science* **149**, 308–310
- Varghese, A. J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 484–490
- Setlow, P. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 29–54
- Slieman, T. A., Reibel, R., and Nicholson, W. L. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 6412–6417
- Chandor, A., Berteau, O., Douki, T., Gasparutto, D., Sanakis, Y., Ollagnier-de-Choudens, S., Atta, M., and Fontecave, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 26922–26931

DNA Repair and Free Radicals

- Mehl, R. A., and Begley, T. P. (1999) *Organic Lett.* **1**, 1065–1066
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., and Miller, N. E. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1097–1106
- Fontecave, M., Mulliez, E., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 506–511
- Frey, P. A., Hegeman, A. D., and Ruzicka, F. J. (2008) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 63–88
- Cheek, J., and Broderick, J. B. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2860–2861
- Buis, J. M., Cheek, J., Kalliri, E., and Broderick, J. B. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 25994–26003
- Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., and Nicholson, W. L. (2005) *Curr. Microbiol.* **51**, 331–335
- Pierrel, F., Douki, T., Fontecave, M., and Atta, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 47555–47563
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Fish, W. W. (1988) *Methods Enzymol.* **158**, 357–364
- Beinert, H. (1983) *Anal. Biochem.* **131**, 373–378
- Romieu, A., Bellon, S., Gasparutto, D., and Cadet, J. (2000) *Organic Lett.* **2**, 1085–1088
- Rebeil, R., Sun, Y., Chooback, L., Pedraza-Reyes, M., Kinsland, C., Begley, T. P., and Nicholson, W. L. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4879–4885
- Rebeil, R., and Nicholson, W. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9038–9043
- Pieck, J. C., Hennecke, U., Pierik, A. J., Friedel, M. G., and Carell, T. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 36317–36326
- Ni, J., Pomerantz, C., Rozenski, J., Zhang, Y., and McCloskey, J. A. (1996) *Anal. Chem.* **68**, 1989–1999
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T., and Essen, L. O. (2004) *Science* **306**, 1789–1793
- Stubbe, J., and van Der Donk, W. A. (1998) *Chem. Rev.* **98**, 705–762

Combined NMR and DFT Studies for the Absolute Configuration Elucidation of the Spore Photoproduct, a UV-Induced DNA Lesion

Claire Mantel,[§] Alexia Chandor,^{†,‡} Didier Gasparutto,[†] Thierry Douki,[†] Mohamed Atta,[‡] Marc Fontecave,[‡] Pierre-Alain Bayle,[§] Jean-Marie Mouesca,^{*,§} and Michel Bardet^{*,§}

CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France, and CEA, IRTSV, F-38054 Grenoble, France

Received July 1, 2008; E-mail: jean-marie.mouesca@cea.fr; michel.bardet@cea.fr

Abstract: By irradiation of bacterial spores under UV radiation, a photoproduct (SP) bearing a covalent methylene link between two adjacent thymines is formed in DNA. Because of the presence of an asymmetric carbon on the aglycone and of two possible orientations for the formation of the cross-link, four isomers could in principle be obtained. Currently, no conclusive structural information of this photoproduct is available. The structure of the isolated SPTpT dinucleotide was revisited in order to determine the type of cross-link and the absolute configuration of the C_{5a} carbon. For this purpose, a study combining NMR spectroscopy and DFT calculations was pursued on the spore photoproduct of the dinucleoside TpT since its structure was previously shown to be identical to the one produced in DNA. A full characterization of SPTpT by NMR analyses was performed in D₂O and DMSO. 2D NMR measurements (¹H–¹³C, ¹H–³¹P, COSY, NOESY, and ROESY) and DFT calculations (geometries optimization of *R* and *S* isomers and theoretical chemical shifts) lead us to conclude without ambiguity that the absolute configuration of the C_{5a} carbon is *R* and that the methylene bridge of the photoproduct corresponds to the methyl group of the thymine located on the 3'-end of the dinucleoside monophosphate.

Introduction

UVB and UVC radiation (190–280 nm) exhibit strong mutagenic and carcinogenic effects that are mostly explained by cellular DNA absorption.^{1,2} The photochemical excitation results in the dimerization of adjacent pyrimidines. In eukaryotic and vegetative prokaryotic cells, such photoproducts can be classified into two classes, the cyclobutane pyrimidine dimers and the pyrimidine (6–4) photoproducts. By contrast, UV irradiation of bacterial spores leads to the sole formation of a photoproduct involving two thymines: 5-(α -thyminy)-5,6-dihydrothymine, the so-called spore photoproduct (SP). The formation and the repair^{3–8} of this photoproduct has already been studied extensively over the last 40 years, but the 3D structure of the compound and its absolute configuration still need to be understood. Two types of SPTpT dinucleotide lesions can be theoretically obtained: (1) a dinucleotide, dubbed 5'→

3', in which the base containing the unmodified methyl group at carbon C_{5a} appears first when reading the DNA sequence from the 5'→3' carbons; (2) a dinucleotide, dubbed 3'→5', in which it appears second (respectively Figures 1A and 1B). Furthermore, during formation of the lesion, a chiral center is generated at carbon C_{5a}, which thus can adopt either an *R* or *S* configuration. Therefore, depending on the type of cross-link and the stereochemistry of carbon C_{5a}, the possible stereoisomers number stands at four (Figure 1). Only a limited amount of work has been devoted to answer this question. Using an elegant total synthesis, Begley et al.⁹ obtained two diastereoisomers of the 5'→3' SP as a dinucleoside monophosphate (here noted SPTpT) (Figure 1A, isomers *R* and *S*). NMR characterization of both diastereoisomers was carried out. However, lack of comparison with the natural SP precluded any definitive conclusion on the stereoconfiguration of this last photoproduct. More recently, Carrell et al.¹⁰ determined the configuration of two other SP dinucleoside analogues: the thymidine derivative without the phosphodiester bridge, and a dinucleoside dimer where sugar units were linked through an alkyl chain.

In this work, we reinvestigated the structure of SPTpT to determine the absolute configuration of the natural SP by combining NMR measurements and theoretical DFT calculations. For that purpose, SPTpT was produced by irradiation of the unmodified thymine-thymine dinucleoside monophosphate.

[§] CEA, INAC, SCIB UMR-E 3 CEA-UJF, Laboratoire de Résonance Magnétique.

[†] CEA, INAC, SCIB UMR-E 3 CEA-UJF, Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques.

[‡] CEA, IRTSV, Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux.

(1) Begley, T. P. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 394–401.

(2) Sancar, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2–9.

(3) Donnella, J.; Setlow, R. B. *Science* **1965**, *149*, 308–310.

(4) Varghese, A. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *38*, 484–490.

(5) Munakata, N.; Rupert, C. S. *J. Bacteriol.* **1972**, *11*, 192–198.

(6) Slieman, T. A.; Rebeil, R.; Nicholson, W. L. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6412–6417.

(7) Cheek, J.; Broderick, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2860–2861.

(8) Chandor, A.; Berteau, O.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Sanakis, Y.; Ollagnier-De-Choudens, S.; Atta, M.; Fontecave, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26922–26931.

(9) Kim, S. J.; Lester, C.; Begley, T. P. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6256–6257.

(10) Friedel, M. G.; Pieck, J. C.; Klages, J.; Dauth, C.; Kessler, H.; Carell, T. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 6081–6094.

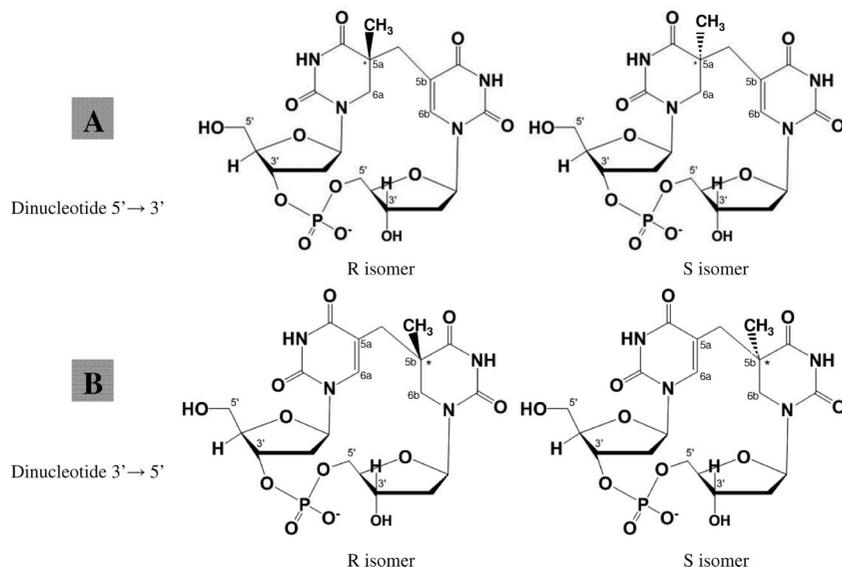


Figure 1. Representation of the two types of SPTpT lesions (A and B) and of their two respective *R* and *S* isomers.

HPLC–mass spectrometry characterization and ^1H NMR spectrum had previously shown⁸ that only one product was obtained in this way. Furthermore, HPLC retention time and fragmentation mass spectrometry features of that compound were found to be identical to the SPTpT enzymatically released from DNA extracted from UV-irradiated spores.⁸ The present work unambiguously demonstrates that this natural SPTpT compound is the dinucleotide $5'\rightarrow 3'$ with an *R* configuration at carbon C_{5a} (Figure 1A, *R* isomer).

Experimental Section

Preparation of SPTpT. SPTpT was prepared by exposure of dry films of TpT and dipicolinic acid (DPA) to UVC radiations. For this purpose, 300 mL of 1 mM TpT solution containing 10 mM DPA under its sodium form (pH 7) was prepared. The solution was divided in six equal fractions that were poured in six 15 cm diameter Petri dishes and freeze-dried overnight. The dry films were then exposed for 1 h to UVC light emitted by a germicidal lamp (254 nm). The dry residues were made soluble in 30 mL of water. The freeze-drying/irradiation/solubilization cycle was repeated six times. After the last irradiation, the whole dry residue was made soluble in 10 mL of water. SPTpT was isolated by reverse phase HPLC in the gradient mode by using triethylammonium acetate (pH 6.5) and acetonitrile as solvents. Identity and purity of the collected photoproduct were inferred from the comparison of its HPLC-MS/MS features (Figure S4 in Supporting Informations) with those of authentic SPTpT isolated from DNA.

NMR Spectroscopy. 1D and 2D spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer at a variable temperature (between 278 and 298 K) using a 5 mm indirect detection probe. ^1H and ^{13}C chemical shifts were referenced to D_2O and DMSO. The 1D ^{13}C spectrum in D_2O was recorded on a Varian Unity 400 MHz spectrometer. 2D-NMR experiments ^1H – ^1H COSY, TOCSY, ^1H – ^{13}C HSQC, ^1H – ^{13}C HMBC, ^1H – ^{31}P HMBC, NOESY, and ROESY were performed using the standard Bruker pulse sequences. The mixing times for the NOESY and ROESY experiments were between 50 ms and 1 s. For the ROESY experiments, a moderate spin lock pulse ($\gamma\text{B}_1/2\pi$) was used with field strength of 2126 Hz. In order to eliminate the signal of DMSO, weft-ROESY (typically used to remove the NMR signal of residual water) experiments were achieved. The SPTpT product was dissolved in deuterated water (D_2O) or in deuterated dimethyl sulfoxide ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

Theoretical Calculations. Molecular mechanics calculations were made with COSMOS 5.0 Pro-Version software.^{11–13} For each configuration, two calculations were carried out in ten thousand steps and geometries were registered every hundred steps. Following these calculations, for both diastereoisomers, the two geometries of lowest energies were stored and used for further geometry optimization by DFT means. DFT calculations relied on the LCAO-ADF (Amsterdam Density Functional 2006) code developed by Te Velde and Baerends.^{14–19} They include the VBP exchange-correlation potential (Vosko, Wilk, and Nusair exchange-correlation energy^{20,21}) completed by nonlocal gradient corrections to the exchange by Becke²² and to the correlation by Perdew.²³ We used triple- ζ (plus polarization) basis sets for all atoms, the numerical accuracy parameter being set to 6.0. We further relied on the ADF NMR subroutine for the computations of NMR shielding tensors and corresponding isotropic values (σ_i). The reference shielding values σ_{REF} for the ^1H and ^{13}C nuclei were set at 31.3 ppm and 176.9 ppm, respectively, and the NMR chemical shifts (δ_i) were computed as $\delta_i = \sigma_{\text{REF}} - \sigma_i$.

Results

Structure Determination of the SPTpT by NMR Experiments in D_2O . As SPTpT is a nucleic acid derivative, the structure was first studied in aqueous solution. Solubility was not a concern because the phosphodiester bridge makes the compound highly soluble in D_2O . The assignments of most of the ^1H and ^{13}C NMR signals were obtained by combining results from proton–proton COSY (through-bond correlation), proton–

- (11) Sternberg, U. *Mol. Phys.* **1988**, *63*, 249–267.
- (12) Sternberg, U.; Koch, F. T.; Mollhoff, M. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 524–531.
- (13) Sternberg, U.; Koch, F. T.; Brauer, M.; Kunert, M.; Anders, E. *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 54–64.
- (14) Baerends, E. J.; Ellis, D. E.; Ros, P. *Chem. Phys.* **1973**, *2*, 41–51.
- (15) Baerends, E. J.; Ros, P. *Chem. Phys.* **1973**, *2*, 52–59.
- (16) Baerends, E. J.; Ros, P. *Int. J. Quantum Chem.* **1978**, 169–190.
- (17) Bickelhaupt, F. M.; Baerends, E. J.; Ravenek, W. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 350–354.
- (18) Velde, G. T.; Baerends, E. J. *J. Comput. Phys.* **1992**, *99*, 84–98.
- (19) Ziegler, T. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 651–667.
- (20) Painter, G. S. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 5530–5535.
- (21) Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200–1211.
- (22) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- (23) Perdew, J. P.; Yue, W. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8800–8802.

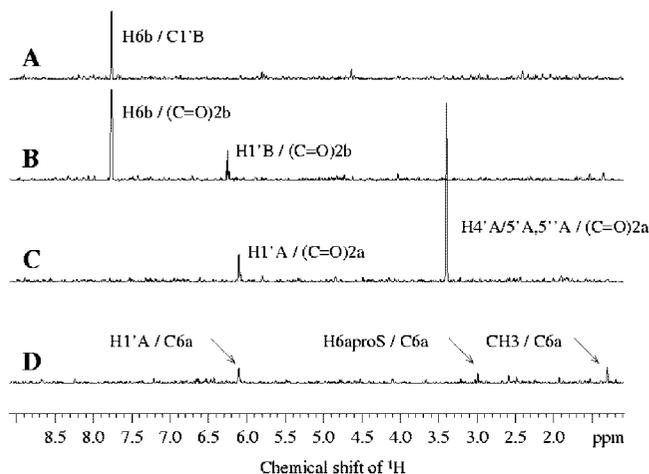


Figure 2. Extracted row from ^1H - ^{13}C HMBC of the dinucleotide spore photoproduct SPTpT diluted in D_2O . A: Row corresponding to the $\text{C}_{1'\text{B}}$ coupling; B: Row corresponding to the $(\text{C}=\text{O})_{2\text{b}}$ coupling; C: Row corresponding to the $(\text{C}=\text{O})_{2\text{a}}$ coupling; D: Row corresponding to the $\text{C}_{6\text{a}}$ coupling.

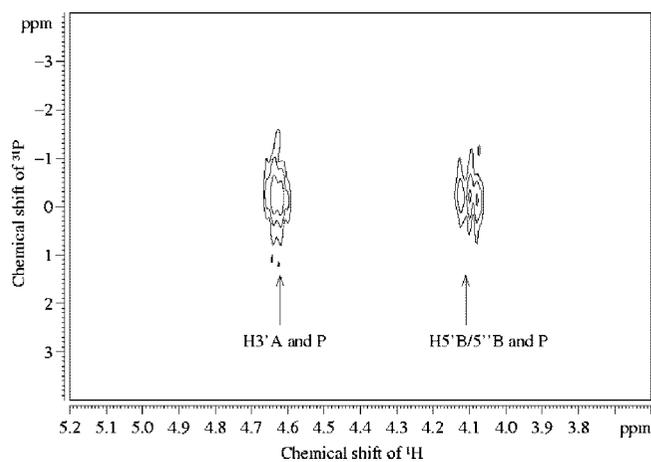


Figure 3. ^1H - ^{31}P HMBC of the dinucleotide spore photoproduct SPTpT diluted in D_2O . The correlations are indicated by the arrows.

proton NOESY (through space correlation), proton-carbon HSQC ($^1J_{\text{CH}}$ coupling), and HMBC ($^2,^3J_{\text{CH}}$ coupling) and proton-phosphate HSQC ($^1J_{\text{PH}}$ coupling) experiments. The assignments of the different signals are reported in Table S1 of Supporting Information together with the relevant correlations on which they rely. To avoid confusing numbering, the four protons belonging either to CH_2 of the base or to bridging CH_2 were directly denoted with their final assignments, namely respectively $\text{H}_{6\text{aproR}}/\text{H}_{6\text{aproS}}$ and $\text{H}_{\text{proR}}/\text{H}_{\text{proS}}$. The proton-carbon and proton-phosphate correlations obtained from the 2D NMR experiments in D_2O allowed us to unambiguously determine how the bases and sugars are linked to each other and more specifically from which thymine the bridging methylene group is derived (Figure 1). These assignments were carried out in the following way. The proton $\text{H}_{6\text{b}}$ is linked to sugar B as shown by the cross-peak between $\text{H}_{6\text{b}}$ and $\text{C}_{1'\text{B}}$ and between $\text{H}_{1'\text{B}}$ and $(\text{C}=\text{O})_{2\text{b}}$ (Figures 2A and 2B, respectively). Then sugar B is linked to the phosphate group from the carbon $\text{C}_{5'\text{B}}$ as evidenced by the interaction between protons $\text{H}_{5'\text{B}/5''\text{B}}$ and the phosphorus atom (Figure 3). The phosphate group is linked to sugar A by carbon $\text{C}_{3'\text{A}}$ (interaction between P and $\text{H}_{3'\text{A}}$, Figure 3). Finally, the anomeric proton $\text{H}_{1'\text{A}}$ is linked to the base bearing the unmodified methyl group (correlations between $\text{H}_{1'\text{A}}$ and

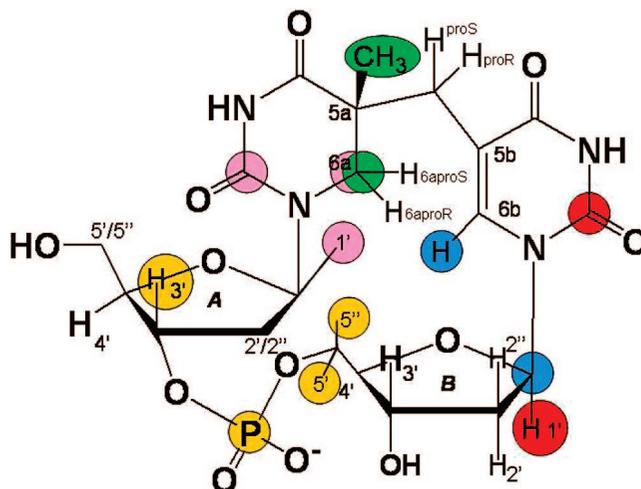


Figure 4. Structure of SPTpT indicating the through-bond correlations used to determine the enchainment of different chemical groups (thymine, sugar, and phosphate). Different colors were used to specify each group of coupled protons.

$(\text{C}=\text{O})_{2\text{a}}$, $\text{H}_{1'\text{A}}$ and $\text{C}_{6\text{a}}$ as well as CH_3 and $\text{C}_{6\text{a}}$, Figures 2C and 2D, respectively). Figure 4 summarizes all these through-bond correlations. Combined together, these results unambiguously demonstrate a $5' \rightarrow 3'$ dinucleotide structure and exclude a $3' \rightarrow 5'$ one (Figure 1A).

As a striking feature, the $\text{H}_{6\text{a}}$ protons are isochrone when the SPTpT is dissolved in D_2O , leading to a unique proton singlet at 3.40 ppm. As a consequence, the number of through-space correlations obtained with NOESY experiments was insufficient to allow an unambiguous determination of the absolute configuration of $\text{C}_{5\text{a}}$ carbon. Therefore, different experimental conditions (temperature, solvent, magnetic field) were tested. Only with DMSO as solvent did the isochrone feature of the two $\text{H}_{6\text{a}}$ protons disappear.

Absolute Configuration of SPTpT in $\text{DMSO-}d_6$ Determination by NMR. Table 1 shows the results of the complete and unambiguous assignment of proton and carbon chemical shifts obtained when the NMR spectra were recorded in hexadeuterated DMSO, using the same strategy as in D_2O . In contrast to the NMR experiments in D_2O , the $\text{H}_{6\text{a}}$ resonance becomes a doublet of doublet at 2.98 and 3.15 ppm corresponding to $\text{H}_{6\text{aproR}}$ and $\text{H}_{6\text{aproS}}$ protons, respectively. Thanks to the larger number of through-space correlations in DMSO, the different spin systems corresponding to sugar rings and thymine bases can be unambiguously identified, and the absolute configuration of $\text{C}_{5\text{a}}$ carbon can be determined as shown below. It should be noted that DMSO is more viscous than D_2O , thus, the $\omega\tau_c$ value (in DMSO) is larger and approaches 1. ROESY experiments were therefore used when SPTpT was dissolved in DMSO. Cross-peaks of the ROESY 2D maps clearly showed that the protons can be separated into two groups on the basis of their through-space correlations. One group can be defined by the protons ($\text{H}_{6\text{aproR}}$, CH_3 , H_{proS}) located in front of a plane defined by the carbon atoms of the thymine ring bearing the methyl group and the second one by protons ($\text{H}_{6\text{aproS}}$, $\text{H}_{6\text{b}}$, H_{proR}) located behind this plane (Figures 5 and 6 and Figure S1 in Supporting Information). For the protons of the bridging CH_2 , the H_{proS} proton presents a stronger correlation with the methyl group than does the H_{proR} proton. The protons $\text{H}_{6\text{aproS}}$ and $\text{H}_{6\text{aproR}}$ are discriminated by their ROESY cross-peaks with $\text{H}_{2'\text{A}/2''\text{A}}$ protons. Only $\text{H}_{6\text{aproS}}$ exhibits a strong interaction with them.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data of the Dinucleotide Spore Photoproduct Diluted in DMSO and at Room Temperature

identification of proton or carbon	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift (ppm)	^1H – ^{13}C long-range correlations ^a	^1H – ^1H through-space correlations ^b
$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$	2.64/2.50	33.12	CH_3 (3J)– H_{6b} (3J)	CH_3 , H_{6b}
CH_3	1.03	22.21	–	H_{proS} , $\text{H}_{6\text{aproR}}$
$\text{H}_{6\text{aproS}}/\text{H}_{6\text{aproR}}$	3.15/2.98	45.28	CH_3 (3J)	$\text{H}_{6\text{aproS}}$: $\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$, $\text{H}_{3'A}$, H_{6b} $\text{H}_{6\text{aproR}}$: $\text{H}_{3'A}$, CH_3
$\text{H}_{1'A}$	5.99	81.68	–	$\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$, $\text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$	2.11	35.21	–	$\text{H}_{1'A}$, $\text{H}_{6\text{aproS}}$, $\text{H}_{3'A}$, $\text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{3'A}$	4.43	73.50	$\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$ (2J)	$\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$, $\text{H}_{6\text{aproS}}/\text{H}_{6\text{aproR}}$, $\text{H}_{4'A}$
$\text{H}_{4'A}$	3.41	83.07	–	$\text{H}_{3'A}$, $\text{H}_{2'A}/\text{H}_{2''A}$, ($\text{OH})_A$
$\text{H}_{5'A}/\text{H}_{5''A}$	3.44	62.36	–	($\text{OH})_A$
H_{6b}	7.50	138.80	$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$ (3J)	$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$, $\text{H}_{6\text{aproS}}$
$\text{H}_{1'B}$	5.86	84.66	H_{6b} (3J)	$\text{H}_{2'B}/\text{H}_{2''B}$, $\text{H}_{4'B}$
$\text{H}_{2'B}/\text{H}_{2''B}$	2.16	40.70	–	$\text{H}_{1'B}$, $\text{H}_{3'B}$
$\text{H}_{3'B}$	4.27	69.92	–	$\text{H}_{2'B}/\text{H}_{2''B}$, ($\text{OH})_B$, $\text{H}_{4'B}$
$\text{H}_{4'B}$	3.76	86.06	–	$\text{H}_{3'B}$, $\text{H}_{1'B}$, $\text{H}_{5'B}/\text{H}_{5''B}$
$\text{H}_{5'B}/\text{H}_{5''B}$	3.87	64.51	–	$\text{H}_{4'B}$
C_{5b}	–	109.60	$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$ (2J)	–
C_{5a}	–	40.47	CH_3 (3J)– NH (3J)– $\text{H}_{6\text{aproS}}$ (2J)	–
($\text{C}=\text{O}$) _{2b}	–	150.82	H_{6b} (3J)	–
($\text{C}=\text{O}$) _{4b}	–	164.10	$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$ (3J)– H_{6b} (3J)	–
($\text{C}=\text{O}$) _{2a}	–	153.36	$\text{H}_{6\text{aproS}}$ (3J)	–
($\text{C}=\text{O}$) _{4a}	–	174.72	$\text{H}_{6\text{aproS}}/\text{H}_{6\text{aproR}}$ (3J)– CH_3 (3J)– H_{proS} (3J)	–
(OH) _A	5.63	–	–	$\text{H}_{5'A}/\text{H}_{5''A}$, $\text{H}_{4'A}$
(OH) _B	5.27	–	–	$\text{H}_{3'B}$
NH	10.07/7.06	–	–	–

^a Measured with a HMBC sequence. ^b Measured by 2D ROESY experiments.

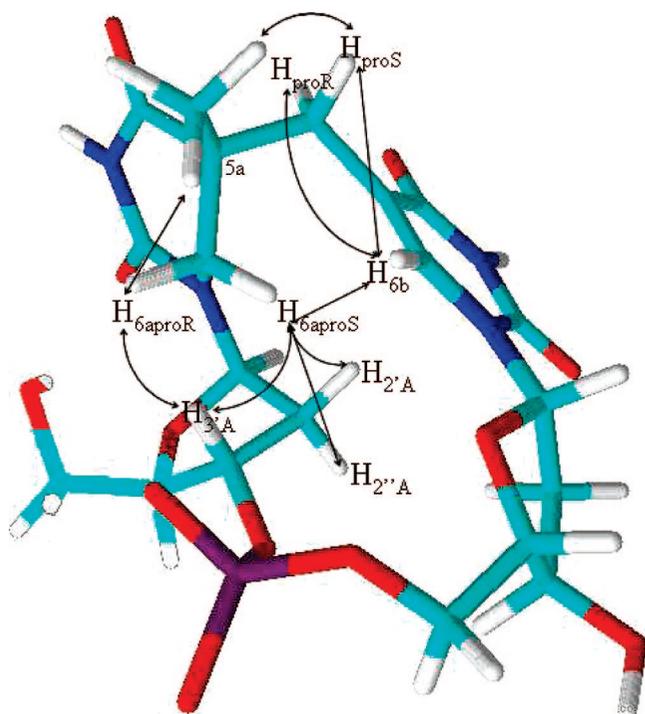


Figure 5. Three-dimensional model showing the main ROESY cross-peaks of the dinucleotide spore photoproduct SPTpT diluted in DMSO used for determining the stereochemistry at C_{5a} . To simplify the figure, only one ROESY correlation has been shown for the methyl group (correlation with a given proton). The protons $\text{H}_{2'A}$ and $\text{H}_{2''A}$ were annotated randomly.

Furthermore, $\text{H}_{6\text{aproS}}$ displays a weaker coupling to the methyl group compared to $\text{H}_{6\text{aproR}}$. These interactions indicate that the CH_2 group has to be located above the sugar A ring. In addition, the strong interaction between $\text{H}_{6\text{aproR}}$ and the methyl group unequivocally proves that the configuration of the C_{5a} carbon is *R*. In the case of an *S* configuration, the proton $\text{H}_{6\text{aproR}}$ could not display at the same time a strong coupling to $\text{H}_{3'A}$ and to protons of methyl group. Careful examination of molecular

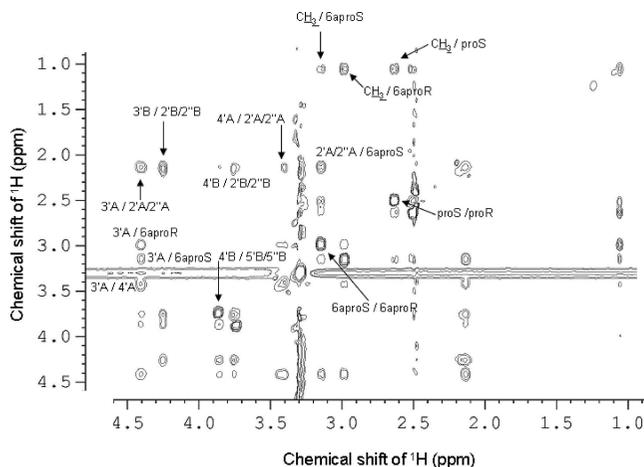


Figure 6. Zoom-in view of the 2D ROESY (mixing time = 300 ms) spectrum of the dinucleotide spore photoproduct SPTpT diluted in DMSO used for determining the stereochemistry at C_{5a} .

models indicates that it would be impossible to obtain the same correlation patterns within each of the two protons groups for an *S* configuration at C_{5a} .

For a spore photoproduct dinucleoside without the phosphodiester bridge, Carell et al.²⁴ used NOESY cross-peaks to highlight two groups of protons interacting together. Discrimination for the determination of the C_{5a} carbon stereochemistry was based only on the coupling between the methyl group and H_{6a} protons. In our study, we observed two additional correlations involving H_{6a} protons, namely between $\text{H}_{6\text{aproS}}$ and $\text{H}_{2'A}/2''A$ and between $\text{H}_{6\text{aproS}}$ and H_{6b} . The absence of a phosphodiester bridge in Carell's compound increases the flexibility of synthesized TpT and explains the absence of these two additional couplings. Accordingly, Carell et al.¹⁰ observed many more

(24) Friedel, M. G.; Berteau, O.; Pieck, J. C.; Atta, M.; Ollagnier-Choudens, S.; Fontecave, M.; Carell, T. *Chem. Commun.* **2006**, 445–447.

cross-peaks by investigating a SP analogue with a bulky alkyl chain bridging the two sugars.

Conformational Features of Sugars Using the NMR Coupling Constants. In order to complete the structural characterization of the spore photoproduct SPTpT, we have incorporated some conformational considerations on 2-deoxyribose, using the classical interpretation of coupling constants. There are twenty possible conformers for the furanose cycle depending on whether one (E form) or two atoms (T form) of this cycle are outside the plane drawn up by it. As previously described,^{25,26} it is possible to identify the type of conformer using coupling constants. Sundaralingam et al.²⁵ have shown that a ($J_{1'2'} + J_{1'2''}$) value ranging from 7.1 to 16.1 Hz is characteristic for the C2'-endo conformation. In our case, the value of ($J_{1'2'} + J_{1'2''}$) is about 11.7 Hz for sugar A and approximately 15.1 Hz for sugar B. Both sugars of our dinucleotide spore photoproduct SPTpT therefore present a C2'-endo conformation. This result is not surprising since sugars in nucleic acids preferentially adopt either the C3'-endo (North) or C2'-endo (South) conformations. The latter is the most common in solution. However, it is interesting to note that the conformation of sugars in our compound does not appear to be affected by structural constraints induced by the two cross-linked bases.

Comparison between Theoretical and NOE Experimental Interproton Distances. Calculations of interatomic distances were made on the two possible diastereoisomers of this compound exhibiting either an *R* or an *S* configuration at the C_{5a} atom. A requisite to such calculations was the availability of realistic geometries. Using a molecular mechanic approach (COSMOS^{11–13}), two structures with the lowest energies were retained for each diastereoisomer. These four structures were further geometry-optimized by DFT calculations, and the more stable geometry for each diastereoisomer was selected. It should be noted that these final structures are degenerated. The calculated distances within SPTpT were then compared to those that could be inferred from the NOESY and ROESY experiments (Table S2 and Figure S2 in Supporting Informations). In contrast to what we have obtained in previous studies using the same strategy on other modified nucleotides,^{27–31} several discrepancies appeared between the theoretical and experimental distances. These difficulties can arise from the complexity of the spin system where the protons are strongly interconnected through dipolar coupling and no longer fulfill the approximation of isolated spin pairs for the mixing times that we used in the study. Accordingly, it was not possible to calculate distances using mixing times shorter than 50 ms because the signal-to-noise ratio 2D maps, recorded with shorter mixing time, do not make quantitative measurements.^{32–36} Furthermore, whereas the

Table 2. Comparison of Theoretical and Experimental ¹H–¹H Correlations Used to Check the Stereochemistry at C_{5a}^a

distances	theoretical correlations strength of diastereoisomer <i>R</i>	theoretical correlations strength of diastereoisomer <i>S</i>	ROESY cross-peaks strength
H _{6b} –H _{proS}	f	f	R
H _{6b} –H _{proR}	F	f	R
H _{6b} –H _{5a}	f	F	–
H _{6b} –H _{6aproS/6aproR}	F/f	F/f	R/–
H _{6b} –H _{2'B} or H _{2''B}	f/f	f/f	r
H _{6b} –H _{2'A} and H _{2''A}	F/f	f/f	R
H _{proR} –H _{5a}	f	F	r
H _{proR} –H _{6aproS/6aproR}	F/f	f/f	–/–
H _{proS} –H _{5a}	F	f	R
H _{6aproS/6aproR} –H _{5a}	F/F	F/f	r/R
H _{6aproS/6aproR} –H _{1'A}	f/f	f/f	–/–
H _{6aproS} –H _{2'A/2''A}	F	F	R
H _{6aproR} –H _{2'A/2''A}	f	f	–
H _{6aproS/6aproR} –H _{3'A}	F/F	F/F	R/R

^a For theoretical distance <2.5 Å → correlation strength = **F**; for 2.5 Å < theoretical distance <3.5 Å → correlation strength = **F**; for theoretical distance > 3.5 Å → correlation strength = **f**. Strong ROESY cross-peak = **R**; medium ROESY cross-peak = **R**; weak ROESY cross-peak = **r**.

methyl group is very important for the distance constraints, its free rotation is likely to alter the measurement of dipolar interactions with other protons.

Therefore, a qualitative approach was used to overcome this difficulty. For both optimized geometries, the theoretical distances were used to define three different ranges (weak, medium, and strong) of correlation intensities. These data were then compared with experimental correlation intensities from ROESY experiments. The results show that the agreement between theory and experiment is greater in the case of the *R* isomer (Table 2). As a matter of fact, about ten correlations favor the *R* isomer against seven for the *S* isomer. On the basis of this truth table, the privileged absolute configuration would be *R*.

Proton and Carbon Chemical Shift Calculations. In order to further establish the absolute configuration of the C_{5a} atom, previously optimized geometries were used to predict NMR features. In particular, DFT methods were used to calculate proton and carbon chemical shifts. For the two optimized structures, the calculations were limited to the carbons and protons that are expected to be directly affected by the configuration at C_{5a}. The theoretical chemical shifts are reported in Table 3. For comparison, the theoretical values are plotted versus the experimental ones (Figure 7 (in DMSO) and Figure S3 (in D₂O) in Supporting Informations). This clearly shows that, whatever the solvent and the type of atom (carbon or proton), only the theoretical values found for the structure with an *R* configuration at C_{5a} are in agreement with experimental data, thus confirming the absolute configuration of the asymmetric carbon. For the ¹³C nuclei, notice in particular the very large discrepancies between experimental and (*S* isomer) theoretical data for three out of five nuclei whereas the agreement is satisfactory for all nuclei in the *R* isomer. Similar remarks apply to the case of proton nuclei. Root mean square deviations can be computed for both solvents, nuclei, and isomers. In D₂O, we have rms (¹H, *R*) = 0.27 ppm against 1.15 ppm for rms (¹H, *S*) (0.47 against 1.24 ppm in DMSO,

(25) Altona, C.; Sundaral, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205–8212.

(26) Cheng, D. M.; Sarma, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7333–7348.

(27) Ammalahiti, E.; Bardet, M.; Molko, D.; Cadet, J. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *122*, 230–232.

(28) Reggelin, M.; Hoffmann, H.; Kock, M.; Mierke, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3272–3277.

(29) Bougault, C.; Jordanov, J.; Bardet, M. *Magnetic Resonance In Chemistry* **1996**, *34*, 24–32.

(30) Ammalahiti, E.; Bardet, M.; Cadet, J.; Molko, D. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 363–370.

(31) Bombelli, C.; Borocci, S.; Lupi, F.; Mancini, G.; Mannina, L.; Segre, A. L.; Viel, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13354–13362.

(32) Cano, K. E.; Thrippleton, M. J.; Keeler, J.; Shaka, A. J. *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 291–297.

(33) Thrippleton, M. J.; Keeler, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941.

(34) Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*, 134–147.

(35) Esposito, G.; Pastore, A. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 331–336.

(36) Olejniczak, E. T.; Gampe, R. T.; Fesik, S. W. *J. Magn. Reson.* **1986**, *67*, 28–41.

Table 3. Experimental ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (D_2O and DMSO) and Theoretical ^1H and ^{13}C Chemical Shifts (R and S configurations) of the Dinucleotide Spore Photoproduct SPTpT

identification of proton or carbon	^1H chemical shift (ppm)				^{13}C theoretical chemical shift (ppm)			
	experimental		theoretical		experimental		theoretical	
	D_2O	DMSO	R	S	D_2O	DMSO	R	S
$\text{H}_{\text{proS}}/\text{H}_{\text{proR}}$	2.97/2.50	2.64/2.50	2.3/3.2	1.3/1.7	37	33.12	34.7	84.2
CH_3	1.30	1.03	1.40	3.3	23.56	22.21	20.5	33.1
$\text{H}_{6\text{aproS}}/\text{H}_{6\text{aproR}}$	3.40	3.15/2.98	3.2/3.7	3.4/4.2	45.71	45.28	46.9	49.1
$\text{H}_{6\text{b}}$	7.76	7.50	8.2	8.2	138.86	138.80	141.2	110.4
$\text{C}_{5\text{a}}$	—	—	—	—	40.27	40.47	46.5	44.5

respectively), as well as rms (^{13}C , R) = 3.47 ppm against 25.13 ppm for rms (^{13}C , S) (3.17 against 26.70 ppm in DMSO , respectively). The R isomer is therefore unambiguously established.

In conclusion, the full characterization of the dinucleoside monophosphate SPTpT (in two solvents) was accomplished through the NMR measurements and theoretical calculations, and it has been obviously shown that carbon $\text{C}_{5\text{a}}$ presents an R absolute configuration.

Discussion

The present work is the first complete characterization of the natural spore photoproduct SPTpT, using NMR spectroscopy

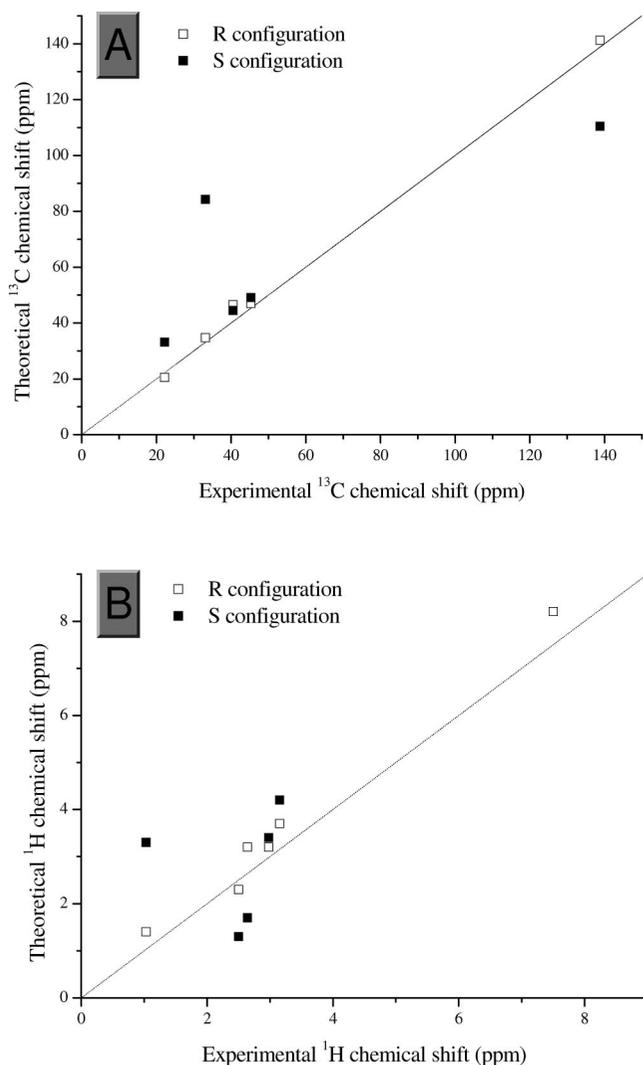


Figure 7. Theoretical chemical shift as a function of experimental chemical shift for ^{13}C (A) and ^1H (B) of the dinucleotide spore photoproduct SPTpT diluted in DMSO . In B, the point at 7.50 ppm is the same for both configurations.

in D_2O and $\text{DMSO}-d_6$ and theoretical calculations. The compound studied here was obtained in pure form by UV irradiation of the TpT dimer and was previously found to be identical to that obtained by irradiation of DNA under comparable conditions followed by enzymatic hydrolysis.⁸ In both cases, only one diastereoisomer was produced during the reaction as shown by HPLC and, in the present study, by NMR spectroscopy. Furthermore, this compound is efficiently changed into two unmodified thymines by the repair enzyme spore photoproduct lyase.⁸ Our present study firmly establishes that SPTpT has the structure shown in Figure 1A (R isomer), with the following characteristics: (i) a $5'\rightarrow 3'$ dinucleotide structure; (ii) the configuration of the asymmetric $\text{C}_{5\text{a}}$ carbon is R . These unambiguous results illustrate the efficiency of the applied strategy combining spectroscopic analyses and DFT calculations for structural assignment of complex molecules.

Very interestingly, the presently determined structure for SPTpT is also consistent with several other observations. First, reactions between thymine radicals and adjacent nucleosides within double-stranded DNA have been shown to be favored when thymine was on the $3'$ -end. These observations were rationalized in terms of shorter distances between the adjacent $5'$ -end base and the C_5 , C_6 , or methyl of the thymine moiety.^{37,38} Although experiments involving labeled thymine pointed to a concerted rather than a radical mechanism,³⁹ similar considerations are likely to explain why the methylene link between the two thymine rings of SP involves the methyl group of the $3'$ -end base (for conformation A of DNA: $\text{C}-\text{C}$ distances between $\text{Me}_{3'}$ and $\text{C}_{5'}$ = 3.69 Å and between $\text{Me}_{5'}$ and $\text{C}_{3'}$ = 5.52 Å). The absolute configuration of the $\text{C}_{5\text{a}}$ atom also reflects structural features of DNA. Indeed, pyrimidine nucleotides display an anti conformation of the bases with regard to deoxyribose. These constraints impose that the natural isomer of the spore photoproduct should be the one with an R configuration at $\text{C}_{5\text{a}}$, as previously suggested by Begley.⁹ Therefore, our structural assignment of SPTpT is also in agreement with that expected from the known conformation of DNA. The observation that the presently studied photoproduct is completely repaired by the spore photoproduct lyase further emphasizes that the determined configuration reflects natural structural features of DNA.⁸

Two studies from T. P. Begley's⁹ and T. Carell's¹⁰ groups had previously addressed this configuration issue. Here, we will discuss only the former since only in this case was the same SPTpT compound investigated. Begley et al.⁹ described a synthetic route to the dinucleoside monophosphate spore photoproduct. The two $5' \rightarrow 3'$ diastereoisomers, with either an R or an S configuration at carbon $\text{C}_{5\text{a}}$, were prepared and

(37) Bourdat, A. G.; Douki, T.; Frelon, S.; Gasparutto, D.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4549–4556.

(38) Bellon, S.; Ravanat, J. L.; Gasparutto, D.; Cadet, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 598–606.

(39) Cadet, J.; Vigny, P. *The photochemistry of nucleic acids*; 1990; Vol. 1.

characterized by NMR spectroscopy in D₂O under conditions comparable to those used in the present study. As expected, one of these isomers exhibits ¹H chemical shifts almost identical to those of the SPTpT compound studied here. According to Begley's work, this product is the *S* isomer whereas we clearly established that the absolute configuration at C_{5a} is *R*. Without taking into account this discrepancy in the absolute configuration determination, the ¹H NMR assignments were also identical between the two studies, with the exception of protons H_{1'A}, H_{1'B} on one hand and H_{2'A/2''A}, H_{2'B/2''B} on the other hand. We believe that the assignments proposed by Begley's group were incorrect since our data (NMR 2D ¹H–¹³C HMBC and TOCSY experiments) allowed us to unambiguously assign the anomeric protons of sugars A and B and consequently H_{2/2''} protons which are coupled to them (correlations between C_{1'B} and H_{6b} and between H_{1'B} and (C=O)_{2b}, respectively Figures 2A and 2B). The origin of the discrepancy about the absolute configuration of C_{5a} is unclear, but our detailed NMR analysis (including the truth table, Table 2) and the good agreement between experimental and calculated ¹³C and ¹H NMR chemical shifts (Table 3 and Figure 7) strongly suggest an incorrect configuration assignment in the previous study. Besides, it is worth reminding that the determination of absolute configuration is not something obvious but rather a difficult task to carry out.

Conclusions

The disagreement between our assignment of the configuration of SPTpT and those previously reported led us to realize a very extensive study combining NMR and DFT techniques, leading us to conclude an *R* absolute configuration of the 5'→3' SPTpT dinucleotide. In previous work,^{40–43} a quite classical approach consisting of two steps was used. First, interatomic

distances were estimated from NOESY and ROESY experiments. These distances were then used as constraints in a molecular mechanical calculation. A distance matrix was constructed, containing upper and lower distance bounds, and various structures were searched for which satisfied these constraints. Finally, potential energy terms were introduced, and the geometries yielding the lowest energies were selected. Motivated by the fact that the experimental and theoretical distances are not comparable, we proceeded otherwise. We alternatively optimized by DFT means the “best” geometries obtained for *R* and *S* conformations by standard molecular mechanics without constraints and further computed the NMR proton and carbon chemical shifts. Figure 7 shows clearly that only theoretical ¹H and ¹³C chemical shifts of the *R* configuration are in agreement with the experimental results, although these calculations have been performed in vacuum without solvent effects. In return, some of the distances determined from NMR data alone differ greatly from the geometry-optimized distances. It can be verified in Figure S2 and Table S2 in Supporting Informations that the NMR distances are systematically shorter than the DFT distances. Some suggestions on the experimental side, explaining these disagreements, have been proposed previously. Consequently, great caution should be exerted when determining experimental geometries from NMR distance constraints only, for systems characterized by an intermediate $\omega\tau_c$ regime.

Supporting Information Available: ¹H and ¹³C NMR data and theoretical and experimental distances of the SPTpT diluted in D₂O. Weft-ROESY of SPTpT diluted in DMSO. Theoretical distances as a function of experimental distances, and theoretical chemical shifts as a function of experimental chemical shift for ¹³C and ¹H of SPTpT diluted in D₂O. HPLC-MS/MS chromatogram of TpT exposed to UVC in the presence of DPA-Na. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA805032R

- (40) Koning, T. M. G.; Davies, R. J. H.; Kaptein, R. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 277–283.
- (41) Zhao, X. D.; Nadji, S.; Kao, J. L. F.; Taylor, J. S. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1554–1560.
- (42) Blommers, M. J. J.; Lucasius, C. B.; Kateman, G.; Kaptein, R. *Biopolymers* **1992**, *32*, 45–52.
- (43) Clivio, P.; Favre, A.; Fontaine, C.; Fourrey, J. L.; Gasche, J.; Guittet, E.; Laugaa, P. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1605–1616.