



HAL
open science

Études fonctionnelles et structurales de l'isoforme α et de l'ADN topoisomérase humaine et ses complexes ciblés par des composés thérapeutiques

Claire Bedez

► To cite this version:

Claire Bedez. Études fonctionnelles et structurales de l'isoforme α et de l'ADN topoisomérase humaine et ses complexes ciblés par des composés thérapeutiques. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ074 . tel-01392403

HAL Id: tel-01392403

<https://theses.hal.science/tel-01392403>

Submitted on 4 Nov 2016

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.



THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : **Sciences du Vivant**

Spécialité : **Biologie Structurale**

Par

Claire BEDEZ

Études fonctionnelles et structurales de l'isoforme α de l'ADN topoisomérase humaine et ses complexes ciblés par des composés thérapeutiques

Soutenue publiquement le **01 Décembre 2015** à IGBMC Illkirch France

THÈSE dirigée par :
Valérie LAMOUR

MCU-PH, IGBMC- Hôpitaux Universitaires de
Strasbourg

RAPPORTEURS Externes:
Anne-Catherine DOCK BREGEON
Yves MECHULAM

DR CNRS, IBENS Paris
DR CNRS, Ecole polytechnique Université Paris-Saclay

RAPPORTEURS Interne:
Jean-Noël FREUND

DR INSERM, UMR_S1113 Strasbourg

A Papi Stutz,

Remerciements

Tous d'abord je tiens à souligner à quel point cette aventure qu'est la thèse a été intense et enrichissante. Autant d'un point de vu intellectuel que privé. Je dois ces 4 dernières années absolument géniales mais aussi parfois difficiles à toutes les personnes de mon entourage. Je m'excuse d'avance auprès de ceux que je pourrais oublier dans les prochains paragraphes.

Je tiens à remercier chaleureusement Anne-catherine Dock-Bregeon, Yves Méchulam et Jean-Noel Freund qui ont acceptés d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Patrick Schultz et Pierre Oudet qui m'ont apportés leurs soutiens dans ce projet. Céline Klein pour les corrections de dernières minutes.

Valérie

Un très grand merci pour ces 5 années passées à tes cotés. Autant pour la recherche que tu m'as enseignée avec beaucoup de patience que pour les nombreuses discussions sur des aspects plus privé de ma vie que nous avons eu. Encore merci de m'avoir mis le pied à l'étrier de la recherche je n'aurais pas souhaité un meilleur guide pour commencer.

Les Lamourettes :

Julie, minichef

Merci de m'avoir guidé lors de mes premières années dans le laboratoire. J'ai pu tisser mes premiers liens amicaux au sein de l'institut grâce à toi. Ton travail m'a inspiré, comme tu le souhaitais, lors de ma dernière année de thèse et surtout lors de la rédaction de ce manuscrit.

Claire, Clairounette

Merci Merci, tu as été pour moi la collègue idéale. Nous étions complètement à l'opposé et pourtant tellement à l'écoute. J'ai toujours trouvé en toi le soutien dont j'avais besoin. Je souhaite à tout thésard qu'ils aient une Clairounette à leurs cotés.

Arnaud

Je te passe le flambeau comme Julie l'a fait pour moi. Prends soin de ces magnifiques bébés que sont les topos elles ont encore beaucoup de choses à raconter. Merci pour les bons moments que nous avons pu partager.

Le Labo 1065 :

Nico, Nicoco

Merci pour ton soutien dans le labo. A la moindre question ou doutes tu étais là.

Karine,

Merci pour ton soutien et les discussions que nous avons eu.

Les Podjarniens :

Alexandra

Merci pour ton dynamisme et ta présence. Tu es un vrai rayon de soleil dans le labo.

Edouardo

Merci pour ce calme que j'ai tellement apprécié lors de mes derniers mois de thèse. Et surtout pour tout le travail que tu as réalisé sur la purification de la Top2 mutante.

Les microscopistes :

Jean-françois

Merci de m'avoir initié à la Cryo-EM et de toute la patience dont tu as fait preuve.

Sacha et Gabor

Merci à vous deux d'avoir répondu à toutes mes questions sur la microscopie et surtout d'avoir pris le temps de m'aider.

Christine et Corinne

Merci pour les nombreux coups de mains que vous m'avez donné.

Robert,

Un très grand merci pour tout. Pour ton aide précieuse avec l'expression de la top2 en cellules de mammifère et les nombreuses discussions autour de ce sujet. Pour les fois où nous faisons les trajets ensemble jusqu'à l'institut. Et surtout pour ta disponibilité, tes corrections pour ce manuscrit et pour les nombreuses discussions que nous avons eu.

SPB and Co. :

Simone, camarade,

Merci pour cette géniale aventure qu'a été le forum BIOTechno. J'ai vraiment apprécié notre collaboration et recommencerais demain sans hésiter.

David,

Merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble. En particulier merci d'avoir présenté l'homme qui partage ma vie. Ces années de thèses n'aurait pas été les mêmes sans toi.

Justine,

Merci pour les nombreux conseils que tu m'as donné.

Jasmine,

Merci pour ton écoute et ta fraîcheur. Tu sais toujours trouver les bons mots et j'ai rarement rencontré quelqu'un avec qui il est si facile de discuter.

A mes tops copines Nounette et Pupici

Merci les filles je vous aime, cette amitié fait parti de celle qu'on espère et qui dure le temps d'une vie.

Laura, Pupici

Merci, Merci, Merci, pour tout. Merci pour ton calme et ta patience qui sont tellement reposants quand on se trouve à tes côtés. Merci pour les nombreuses soirées et les fous rires que nous avons partagé. Je n'ose même pas imaginer cette thèse sans ton soutien quotidien. Merci ma pupici.

Perrine, Nounette

Je n'aurai jamais imaginé que la première fois que je t'aborderai sur un banc à l'IPCB juste après un cours de L2 totalement indigeste on se retrouvera si proche 8 ans après. Merci pour tout ce qu'on a vécu d'hallucinant toutes les deux. Merci pour cette formidable amitié. C'est passé tellement vite, ça a été tellement intense. ON L'A FAIT !!! ENFIN !!! Tu auras été d'un soutien inestimable tout du long et tu resteras toujours ma sœur de fac et de boulot.

A ma belle famille :

Merci de m'avoir accueillit les bras grands ouvert et plein d'amour. Merci en particulier à Isa et Nico pour nos échanges.

Mes Frères et Sœurs :

Cette thèse est aussi un peu la votre.

Anna,

Merci pour tout ces moments qu'on à passé ensemble, pour les fou rires, les discussions sur l'histoire de notre famille et ton soutien.

Aubin,

Voilà frère j'ai atteint le but que je m'étais fixé quand on été encore en couches culottes. Merci d'être présent, malgré la distance je sais que je pourrais toujours compter sur toi.

Ceux qui me sont le plus proches :

Yannick,

Merci pour ces 9 années passé à tes cotés. Tu m'as soutenu de lycée jusqu'à mes dernières années de fac. Je n'aurai pas pu faire ça sans toi.

Magali,

Merci ma copine, ma meilleur amie, ma sœur d'esprit et de cœur.

Mamie Stutz,

Merci pour tout. Tu as été et restera ma second mère. Cette thèse je l'ai faite aussi grâce à tout ce que toi et papi m'avez apporté dans mon enfance. Encore merci Mamie.

Stéphane,

Les mots me manquent pour te dire à quel point notre rencontre a bouleversé ma vie. Tu m'as appris à donner et surtout à recevoir de l'amour. Ma dernière année de thèse a été entouré d'une douceur qui m'était inconnue jusqu'à lors. Je t'aime mon Choubi.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

B

BHK Baby Hamster Kidney

BrEth Bromure d'éthidium

BSA Bovine Serum Albumin

C

ccc cross correlation coefficient

CCD Charged couple device

CMOS Complementary Metal Oxid Semi-conductor

csm Complete Supplement Mixture

CTF ContrastTransfert Function

D

Da Dalton

DTT Dithiothréitol

E

EDTA Ethylène diamine Tétracétique

ESI Electro Spray Ionization

F

FCC Frozen Competent Cell

FEG Fiels Emission Gun

frc fourier ring correlation coefficient

G

H

HiFi Expand Hight Fidelity

Hs Top2 α Isoforme α de l'ADN topoisomérase de type 2 humaine

HsTop2 ADN topoisomérase de type 2 humaine, Hs = *Homo sapiens*

HsTop2 β Isoforme β de l'ADN topoisomérase de type 2 humaine

I

J

K

KDa Kilo Dalton

L

LC Liquid Chromatography

LiAc Acétate de Lithium

LIC Ligation Independent Cloning

M

MALDI Matrix Assisted Lazer Desorption Ionisation

mAU Mili Absorbance Unit

MBP Maltose Binding Protein

MET Microscopie électronique à transmission

MPT Modifications post traductionnelles

MSA Analyse statistique multivariée

MVA Modified Vaccinia Ankara

N

NEB New England Biolab

LISTE DES ABRÉVIATIONS

O

P

pCR	polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
pDEST	plasmide de destination
PEG	Poly Ethylène Glycol
pENTR	plasmide d'entrée
PEP	Phospho Enole Pyruvate
PK/LDH	Puryvate Kinase/Lactate déshydrogénase
PKR	dsRNA-dependent protein kinase
PMSF	fluoride de phenylmethylsulfonyl
PPX	PreScission protease

Q

R

rpm	rotation par minutes
-----	----------------------

S

ScTop2	ADN topoisomérase de type 2 de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

T

T7 pol	ARN polymérase T7
Taq polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase
TFA	Acide tétrafluoro acétique
Top	ADN toposimérases
topos	ADN topoisomérases

U

V

VAVC	Vaccinia Virus
------	----------------

W

X

Y

Yep	Yeast Episomal plasmid
YPAD	Yeast extract Peptone Adenine Dextrose
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

Z

SOMMAIRE

I. LA TOPOLOGIE DE L'ADN	19
1. Considérations générales.	19
2. Les descripteurs topologiques et géométriques.	20
II. LA FAMILLE DES ADN TOPOISOMERASES	23
1. La classification des ADN topoisomérase	23
2. Les ADN topoisomérase de type 1	23
3. Les ADN topoisomérase de type II eucaryotes (topos 2).	26
4. Répartition des fonctions catalytiques des topos dans les processus cellulaires	26
III. LES ADN TOPOISOMERASES DE TYPE II EUCARYOTES.	29
1. Les portes ou interfaces de dimérisation des topos 2 :	29
2. Le mécanisme de passage des brins d'ADN : Le cycle catalytique.	33
3. La diversité des domaines C-terminaux	33
4. Les études structurales réalisées sur les topos 2	37
IV. LE ROLE DES ADN TOPOISOMERASES DE TYPE II EUCARYOTES DANS LES PROCESSUS CELLULAIRES.	43
1. Les isoformes α et β des Top 2 humaines.	43
2. Rôle des Top2 dans la réplication du génome	45
3. Rôle des Top2 dans la ségrégation et la séparation des chromosomes.	47
4. Rôle des Top2 dans la régulation de la transcription des gènes	48
5. Les modifications et régulation des Top2	51
V. LES TOP2 SONT DES CIBLES MAJEURES DE MOLECULES UTILISEES DANS LES TRAITEMENTS ANTICANCEREUX	57
1. Les Bisdioxopiperazines	61
2. La famille des podophyllotoxines	62
3. La famille des anthracyclines	63
VI. MON PROJET DE THESE	65
RÉSULTATS	67

I. PRODUCTION, PURIFICATION ET ANALYSES FONCTIONNELLES DES ISOFORMES	68
A. Production	68
1. Historique de la production et de la purification des top2 eucaryotes.	68
2. Le système d'expression dans <i>S.cerevisiae</i>	71
3. Optimisation des vecteurs d'expression et du protocole de surexpression en levure.	71
4. Expression des isoformes dans les cellules BHK21 infectées par un virus de la vaccine recombinant	79
B. Purification des isoformes α et β	86
1. Optimisation de la lyse des cellules	86
2. La procédure de purification des isoformes	86
C. Analyses fonctionnelles des isoformes	97
1. Tests de relaxation d'un ADN plasmidique surenroulé.	97
2. Caractérisation des constantes catalytiques de l'isoforme α	99
3. Synthèse des résultats des analyses fonctionnelles	102
D. Analyse des phosphorylations et acétylations par spectrométrie de masse.	103
1. Détection et validation des sites potentiellement phosphorylés	107
2. Analyse détaillée des phosphorylations et leurs implications fonctionnelles	112
3. Détection et validation des positions potentiellement acétylées	123
4. Analyse détaillée des acétylations et implications fonctionnelles et structurales	129
5. Les résidus Lysines 168 et 278	135
6. Les Mutants K168A et K278A	138
7. Analyses structurales du domaine ATPase du mutant K168A	145
E. Conclusion	155
II. PROTEOMIQUE CHIMIQUE	158
A. Historique et Principe	158
B. Premiers essais de synthèse. Les sondes dérivées des Bisdioxopipérazines.	162
C. Mise au point des sondes dérivées de l'étoposide et leurs applications.	164
1. Dérivation chimique de l'étoposide et validation <i>in vitro</i> de la sonde et des intermédiaires de synthèse.	164

2.	Applications de la sonde étoposide : expériences de pulldown sur des lignées de cellules cancéreuses.	167
D.	La mise au point des sondes dérivées de la doxorubicine et leurs applications.	173
1.	Les expériences de pulldown sur les lignées cancéreuses <i>HeLa</i> et RS4,11.	178
2.	Validation <i>in cellulo</i> de la cible Ku80 par immunohistochimie	184
3.	Perspectives : reconstitution du complexe <i>in vivo</i>	191
 III. ÉTUDE STRUCTURALE DE L'ISOFORME A PAR CRYO MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.		193
A.	Formation du complexe HsTop2 α avec un ADN de 155 pb et l'étoposide	194
1.	Choix du premier ADN utilisé pour l'étude structurale.	194
B.	Acquisition d'images en Cryo microscopie électronique (Cryo-EM), reconstruction 3D et analyse de la carte de densité électronique.	198
1.	Optimisation de la préparation de l'échantillon.	200
2.	Reconstruction 3D des complexes HsTop2 α – ADN ₁₅₅ – étoposide.	202
3.	Conception d'un oligonucléotide de 55 et 85 paires de bases avec une séquence sensible à l'étoposide.	221
4.	Les complexes isoformes α ADN 58 et 85 pb et étoposide	226
 IV. ÉTUDES STRUCTURALES COMPLEMENTAIRES : ÉTUDE STRUCTURALE SUR LE DOMAINE C-TERMINAL DE L'ISOFORME B (CTD B).		229
A.	Alignement de séquences des domaines C-terminaux des deux isoformes.	229
B.	Clonage et production du domaine C-terminal de l'isoforme β.	233
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES		235
 MATÉRIELS ET MÉTHODES		239
 I. PRODUCTION, PURIFICATION ET ANALYSES FONCTIONNELLES DES ISOFORMES DE LA TOPOISOMERASE HUMAINE		240

A.	Clonage et Production	240
1.	Clonage dans le vecteur d'expression pYES2.1	240
2.	Transformation des levures <i>S.cerevisiae</i>	240
3.	Culture en milieu lactate/glycérol	241
4.	Culture en milieu raffinose	241
5.	Expression des isoformes dans BHK21 infecté par MVA	242
B.	Purification des isoformes α et β	246
1.	Purification des isoformes produit dans la levure <i>S.cerevisiae</i>	246
2.	Purification à partir des cellules de mammifère BHK21	248
3.	Détection de l'isoforme α produite en BHK21 par MALDI CovalX	248
C.	Analyses fonctionnelles des isoformes	249
1.	Test de mobilité électrophorétique d'isomères topologique d'ADN	249
2.	Caractérisation des constantes catalytiques par mesure de l'hydrolyse d'ATP	251
3.	Analyse de séquences par spectrométrie de masse Orbitrap	254
4.	Mutation ponctuelle K168A et K278A dans le domaine ATPase de l'isoforme α	256
II.	CHEMOPROTEOMIQUE	259
1.	Test de relaxation d'ADN plasmidique en présence des sondes dérivée de l'étoposide et de la doxorubicine.	259
2.	Test d'intercalation des sondes	259
3.	Culture cellulaire utilisée pour les expériences de « Pulldown »	259
4.	Préparation des extraits cellulaire totaux.	260
5.	Les expériences de "Pulldowns"	260
III.	ETUDE STRUCTURALE DE L'ISOFORME A	261
A.	Préparation des oligonucléotides	261
1.	Oligonucléotide de 155 paires de bases	261
2.	Oligonucléotides de 55 et 85 paires de bases	261
3.	Expérience de retard sur gel	261
4.	Formation du complexe avant la congélation	261
B.	La microscopie électronique à transmission (MET) appliquée à la biologie structurale	262
1.	Congélation de l'échantillon sur les grilles de microscopie électronique.	268
2.	Acquisition des images et reconstruction 3D.	269

INTRODUCTION

I. La topologie de l'ADN

1. Considérations générales.

La découverte de la structure en double hélice de la molécule d'ADN par Watson et Crick en 1953 a immédiatement conduit à la réalisation que la séparation des deux brins dans une molécule de grande taille poserait des problèmes d'ordre topologique. Watson et Crick y font référence dans leur article original:

« Since the two chains in our model are intertwined, **it is essential for them to untwist if they are to separate**. As they make one complete turn around each other in 34Å, there will be about 150 turn per million molecular weight, so that whatever the precise structure of the chromosome a **considerable amount of uncoiling would be necessary**. It is well known from microscopic observation that much coiling and uncoiling occurs during mitosis and though this is on a much larger scale it probably reflects similar processes on a molecular level. Although **it is difficult at the moment to see how these processes occur without everything getting tangled, we do not feel that this objection will be insuperable**. » (Watson & Crick 1953)

La structure en double hélice d'ADN permet de stocker de manière stable l'information génétique et de la protéger de nombreux dommages extérieurs. Cependant l'entrelacement du duplexe d'ADN implique que les processus moléculaires nécessitant la séparation des deux brins, comme la transcription et la réplication, génèrent un surenroulement des brins d'ADN (Liu and Wang, 1987). Ces intermédiaires topologiques représentent un challenge pour la cellule car ils peuvent interférer avec de nombreux processus cellulaires. Par ailleurs, la cellule tire également profit de ces contraintes pour la compaction du génome et la régulation de l'expression de certains gènes (Holmes and Cozzarelli, 2000; Wang, 2002). La régulation fine de l'équilibre topologique du génome est donc essentielle pour le fonctionnement normal de la cellule. Cette fonction est assurée par les enzymes de la famille des ADN topoisomérases (Topos) qui régulent de manière fine l'équilibre topologique global du génome de tous les organismes vivants.

INTRODUCTION

Dans un premier temps pour introduire les notions de topologie de l'ADN, la double hélice d'ADN peut être assimilée à une corde élastique linéaire. Lorsque qu'une torsion importante est introduite dans une corde, l'énergie de torsion va être répartie sur toute la longueur de cette dernière. À un certain point de torsion, la corde va générer des supertours qui permettront de poursuivre la torsion. Dans la cellule, la double hélice d'ADN est soumise à des énergies de torsions qui entraînent soit la compaction et la stabilisation de la double hélice, soit la séparation des brins.

Si on considère maintenant que les deux extrémités de la double hélice sont liées covalentement sans introduire de torsion, la molécule d'ADN forme un cercle avec une topologie relâchée. En revanche si on introduit une ou plusieurs torsions avant la ligation, la molécule d'ADN va minimiser l'énergie de torsion en adoptant des supertours d'ADN (Figure 1).

Dans la nature, le surenroulement négatif de l'ADN est un facteur important qui favorise la séparation des brins d'ADN de manière locale et globale. Cette séparation des brins relâche le stress de torsion des ADN surenroulés négativement. De plus la séparation des brins d'un point de vue énergétique est moins coûteuse sur un ADN surenroulé négativement que sur un ADN relâché.

2. Les descripteurs topologiques et géométriques.

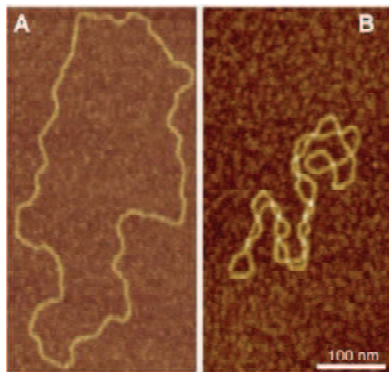


Figure 1 Visualisation par microscopie de force atomique d'un plasmide pBR322 sous forme relâchée (A) et surenroulée négativement (B). (Adamcik et al., 2008)

i. Descripteur Topologique : Le « Linking Number » (Lk)

Les descripteurs topologiques définissent la topologie d'une molécule d'ADN. Le « linking number », Lk, décrit le nombre de fois où les brins d'ADN d'une même molécule se croisent et son signe indique leur chiralité. La valeur absolue de ce descripteur représente le nombre minimum de croisements des deux brins d'ADN qu'il est nécessaire d'appliquer pour séparer complètement les deux brins d'ADN et cette valeur est invariante tant

INTRODUCTION

qu'aucune cassure n'est introduite dans l'ADN. Lorsque le Lk est positif, les brins d'ADN sont enroulés avec une « main droite » (« Right handed ») et avec une « main gauche » quand le Lk est négatif (« Left handed »).

ii. Les descripteurs géométriques : Le « Twist » (Tw) et le « Writhe » (Wr).

Le Twist (Tw) : décrit la rotation de la double hélice d'ADN autour de son axe. Ce nombre n'est en général pas entier. Il est défini comme l'intégration d'un angle Tw (nombre de rotations de 360°) entre deux paires de bases successives sur l'ensemble de la molécule d'ADN. Sa valeur est positive pour l'ADN droit et fluctue en fonction des modifications topologiques d'une molécule même si les extrémités sont liées covalentement.

Le Writhe (Wr) : décrit la rotation axiale de la double hélice d'ADN autour d'elle-même, comme dans le cas du surenroulement. Un plasmide relâché ou des fragments d'ADN linéaires ont un Wr proche de zéro. Les supertours d'ADN ont des Wr positif ou négatif en fonction de la chiralité des croisements. Ainsi les ADN surenroulés positivement possèdent un Wr positif et des croisements avec une chiralité droite, et les ADN surenroulés négativement, un Wr négatif et des croisements avec une chiralité gauche.

Pour une molécule d'ADN double brin fermé, les descripteurs sont liés par la relation suivante :

$$\mathbf{Lk = Tw + Wr} \quad [\text{eq.1}]$$

L'équation [1] illustre que les modifications topologiques, subies par une molécule d'ADN covalentement fermée, seront réparties sur les descripteurs Tw et Wr (Figure 2). Lk reste invariant.

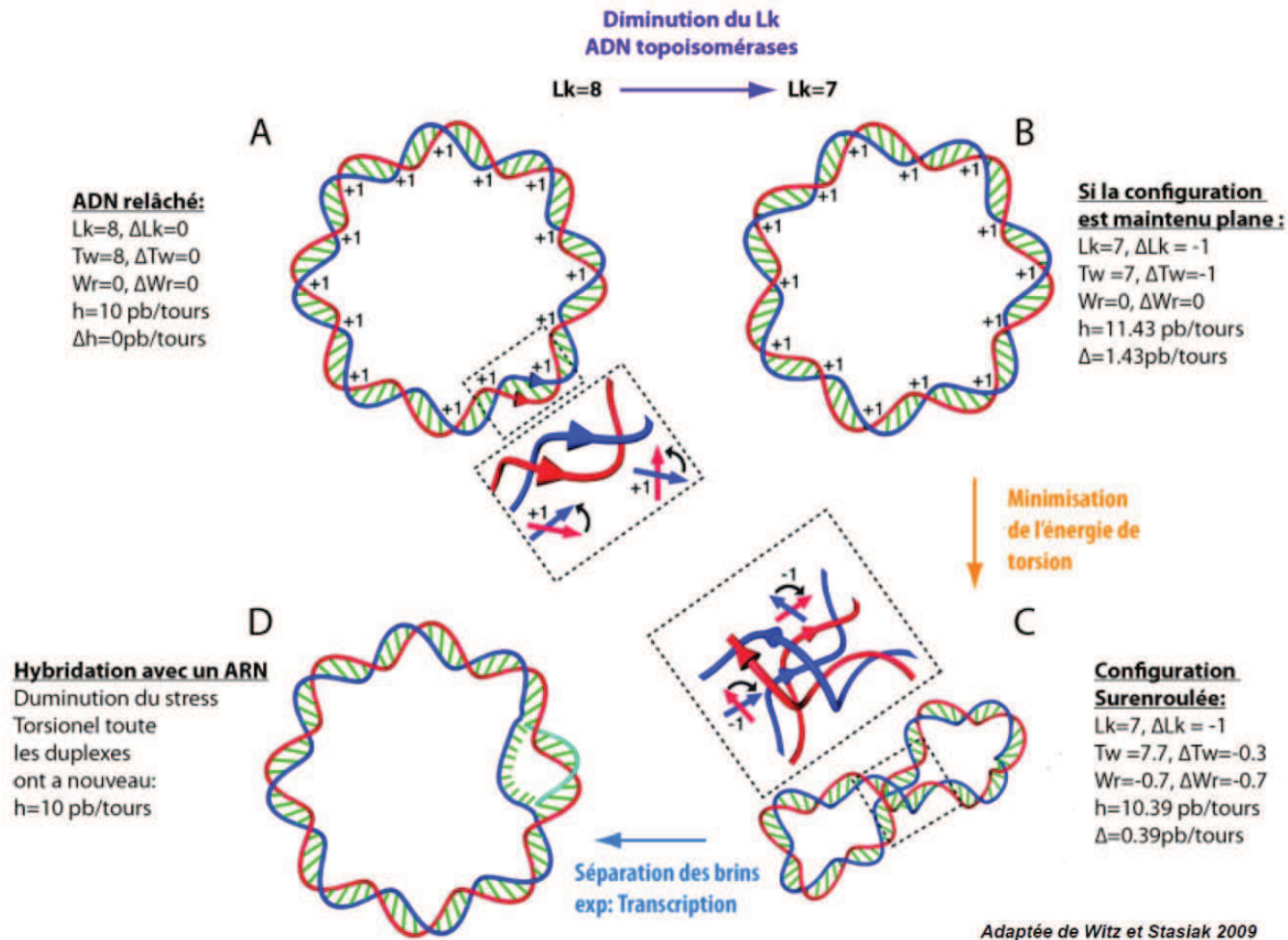


Figure 2 Topologie d'un ADN type plasmide bactérien. (A) ADN relâché. $Lk =$ (la somme des croisements des deux brins) / 2 et c'est aussi la somme de Tw et Wr . (B) Le Lk diminue de 1 sous l'action d'ADN topoisomérases. Si l'ADN est maintenu dans un plan Wr reste nul. (C) Si la molécule minimise son énergie de torsion en formant un supertour, la topologie globale est modifiée mais Lk reste invariant. Le surenroulement facilite la séparation des brins d'ADN (D) et libère le stress de torsion introduit par l'ADN topoisomérase (B).

II. La famille des ADN topoisomérases

1. La classification des ADN topoisomérases

Nomenclature : Les ADN topoisomérases de manière générales sont appelées « topos ». Les familles sont donc notées topos I et topos II. Les topos de type II eucaryotes humaines sont, elles, notées « Top », HsTop2 (*Homo sapiens* ADN topoisomérase de type 2).

Les ADN topoisomérases (topos) sont présentes dans tous les règnes du vivant, procaryotes, eucaryotes et les virus. Elles utilisent toutes le même type de réaction catalytique, consistant à former une liaison covalente entre une tyrosine du site catalytique et le phosphate d'un brin d'ADN. Les topos sont réparties en deux classes, les topos de type 1 qui coupent un brin d'ADN et les topos de type II (topos II) qui coupent deux brins d'ADN. Il existe de nombreux sous-types pour chaque classe de topos représentant des sous-groupes classés selon le mécanisme réactionnel ou selon leur similarité de séquences peptidiques.

Ce travail étant consacré aux topos de type II, les topos I ne seront abordées que brièvement ci-dessous.

2. Les ADN topoisomérases de type I

Les topos I sont réparties dans 3 sous-familles : Type IA, Type IB et Type IC (Figure 3).

La sous-famille des topos de type IA (topos IA) regroupe

- les topos I bactériennes, archées
- les topos III bactériennes et eucaryotes
- les topos I des *Mimivirus* (Raoult et al., 2004).

Les topos IA créent une liaison phosphotyrosine en 5' du brin d'ADN coupé et permettent le passage du brin d'ADN non coupé à travers l'ouverture du premier brin. Cette réaction est réalisée sans cofacteur. Ce mécanisme permet la décaténation et la résolution de nœud dans les régions possédant déjà des coupures simple brin mais également la relaxation d'ADN surenroulé négativement.

INTRODUCTION

La sous-famille des topoisomères de type IB (topoisomères IB) « swivelases » regroupe

- Les topoisomères I eucaryotes
- les topoisomères I eucaryotes mitochondriaux (Zhang et al., 2001)
- les topoisomères I des Poxvirus et des Mimivirus (Benarroch et al., 2006)

Ces enzymes coupent un brin d'ADN à son extrémité 3' sans cofacteur. Contrairement aux topoisomères IA, elles peuvent relaxer un ADN surenroulé positivement ou négativement car elles agissent en contrôlant la rotation du brin d'ADN non engagé dans la liaison phosphotyrosine, ce qui leur vaut l'appellation anglo-saxonne « swivelases ». Pendant longtemps les topoisomères IB ont été considérées comme inexistantes chez les procaryotes. Cependant des études montrent qu'il existe des orthologues chez les bactéries issues de transfert horizontal à partir de topoisomères d'origine virale (Gadelle et al., 2003; Krogh and Shuman, 2002).

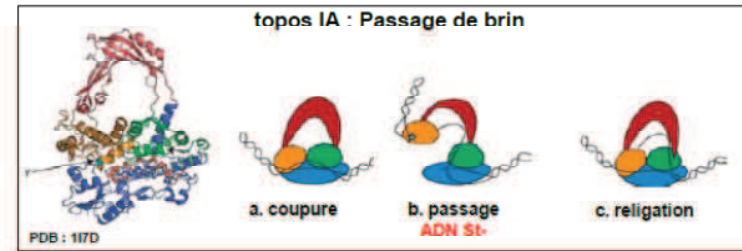
La topoisomère de type IC (topoisomère IC) ne comprend qu'un seul représentant identifié à l'heure actuelle

- la topo V chez les archées (Taneja et al., 2007) (Slesarev et al., 1993).

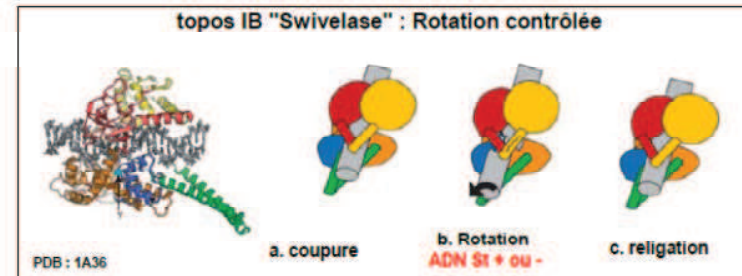
La topo V semble partager le mécanisme réactionnel des topoisomères IB. Elles coupent l'ADN, forment une liaison covalente en 3' et relaxent l'ADN surenroulé positivement et négativement par le contrôle de la rotation du brin non lié.

INTRODUCTION

IA	Procaryotes <i>(Extrémophiles)</i>	I III <i>Reverse Gyrase</i>
	Eucaryotes	III III α III β
	Archées <i>(Extrémophiles)</i>	I ou III <i>Reverse Gyrase RP1</i> <i>Reverse Gyrase RP2</i>



IB	Procaryotes	I
	Poxvirus Vaccinia	I
	Eucaryotes	I



IC	Archées	V
-----------	---------	---

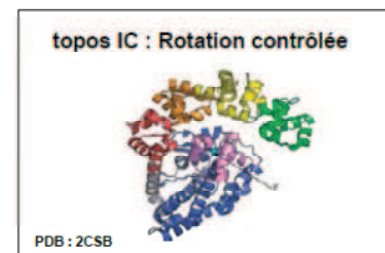


Figure 3 Les sous familles des ADN topoisomérases de type I. Adapté de Schoeffler et Berger 2008

3. Les ADN topoisomérases de type II eucaryotes (topos II).

Les topos II sont réparties par homologie de séquences et de structure 3D en deux sous familles (sous types), le type IIA (topos IIA) et le type IIB (topo IIB). Les topos II de ces deux sous types modifient la topologie de l'ADN par un mécanisme de passage de brins via l'introduction d'une coupure d'un ADN double brins.

Les topos IIB incluent uniquement les topos VI qui sont retrouvées chez les archées, les plantes et certaines algues. Cette sous familles semble provenir d'une branche évolutive des topos IIA (Gadelle et al., 2003). Je n'entrerai pas dans les détails de cette sous-famille.

Les topos IIA sont largement représentées. Elles incluent :

- Les topos II eucaryotes et virales.
- Les ADN gyrase bactériennes, archées et chloroplastiques.
- Les topos IV procaryotiques.

Les ADN gyrases sont des topos II particulières qui sont capables d'introduire des supertours négatifs dans ADN relâché. Toutes les topos IIA sont capables de faire de la relaxation, de la décaténation d'ADN avec une efficacité qui varie selon les espèces.

4. Répartition des fonctions catalytiques des topos dans les processus cellulaires

Les topos possèdent toutes des fonctions catalytiques très similaires et le lien évolutif entre toutes ces enzymes est complexe. Pour simplifier, on estime que tous les organismes possèdent au minimum une topo I et une topo II. Cependant en réalité la répartition fonctionnelle des topos est complexe. Chacune est responsable d'un ensemble spécifique de topologie à résoudre à des moments précis du cycle cellulaire (Figure 4).

Par exemple la bactérie *E.coli* code pour 6 topos au total. L'ADN gyrase est responsable du maintien du surenroulement négatif de son génome contribuant à sa compaction et à la séparation des brins d'ADN lors de différents processus cellulaires. *E.coli* possède un temps de génération très court (environ 20 minutes) nécessitant une décaténation des chromatides sœurs au moment de la réplication efficace. Cette tâche est réalisée par la topo IV, plus efficace en décaténation qu'en relaxation de l'ADN. La topo III

INTRODUCTION

quant à elle est responsable de la résolution par décaténation des zones de recombinaison et les intermédiaires de réplication. Les supertours positifs de l'ADN générés au moment de la transcription sont pris en charge par l'ADN gyrase et la topo I. Pour finir, le maintien de l'équilibre global de surenroulement négatif du génome est géré par l'ADN gyrase, la topo IA et la topoIV (Schoeffler and Berger, 2008).

INTRODUCTION

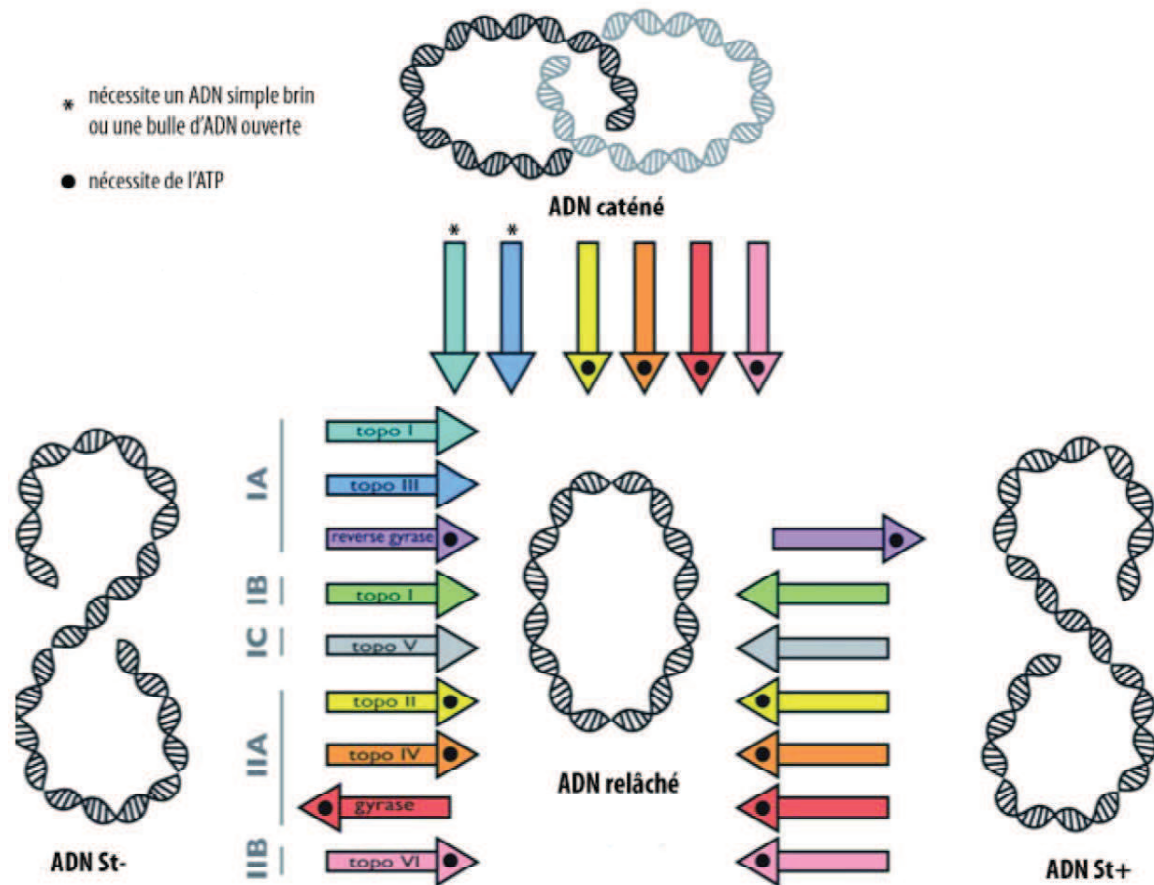


Figure 4 Répartition des différentes topoisomérases en fonction de la topologie d'ADN résolue. Les topoisomérases IA : topo I (cyan) et topo III (bleu) relaxent l'ADN surenroulé négativement et font de la décaténation en présence d'ADN simple brin ou d'ADN ouvert. La reverse gyrase (Violet) introduit des supertours négatifs donc relâche l'ADN surenroulé négativement ou surenroule l'ADN relâché, en présence d'ATP. Les topoisomérases IB (Vert) et la topoV (IC Gris) relaxent l'ADN surenroulé positivement et négativement. Les topoisomérases IIA : les topoisomérases II et IV (Jaune et orange) relâchent l'ADN surenroulé positivement et négativement, en présence d'ATP et réalisent de la décaténation. L'ADN gyrase (rouge) nécessite de l'ATP et introduit des supertours négatifs, donc relâche l'ADN surenroulé positivement et surenroule l'ADN relâché. Elle fait également de la décaténation. La topo VI (Rose) nécessite de l'ATP et relâche de l'ADN surenroulé positivement et négativement. Elle fait également de la décaténation. *Adapté de Schoeffler et Berger 2008.*

III. Les ADN topoisomérases de type II eucaryotes.

1. Les portes ou interfaces de dimérisation des topos 2 :

Les topos 2 eucaryotes sont des homodimères fonctionnels, issus de la dimérisation de deux chaînes polypeptidiques identiques. Toutes les topos 2 possèdent une organisation identique. Elles présentent une symétrie d'ordre 2 avec trois interfaces de dimérisation principales qui sont appelées portes ou « Gate » formant deux cavités dans l'enzyme. (Figure 5)

La porte N-terminale ou ATP Gate est formée par deux éléments, le domaine de fixation de l'ATP et le domaine transducer (Classen et al., 2003; Schmidt et al., 2012; Wei et al., 2005) (Figure 6). Le domaine de fixation de l'ATP fait partie de la famille GHKL (DNA **G**yrase ; **H**sp90, histidine **K**inase, Mut **L**) ; ce domaine est présent dans plusieurs familles de protéines (Dutta and Inouye, 2000). Ce repliement d'environ 200 résidus est un sous domaine α / β composé de 8 brins β antiparallèles connectés par 4 hélices α et des boucles [14]. La poche de fixation de l'ATP est formée par 3 hélices et une partie du feuillet β . Le « couvercle » de la poche catalytique est constitué par une boucle flexible très conservée en séquence parmi les Top2 « l'ATP lid ». Cette boucle change de position en fonction de la présence ou de l'absence du ligand. Chez les eucaryotes, le domaine GHKL possède une β hairpin supplémentaire, dont le rôle exact n'a pas encore été élucidé. Le domaine transducer, d'environ 150 résidus, a un rôle primordial dans la communication entre le domaine GHKL et le corps de l'enzyme [16-19]. Il est constitué d'un repliement α / β contenant 4 brins β avec une hélice α d'un côté et 2 de l'autre. La boucle QTK, contient la lysine 378 qui est strictement conservée chez les topos2 eucaryotes. Elle joue le rôle de « senseur » de l'hydrolyse de l'ATP car elle forme une liaison hydrogène avec le phosphate γ qui va être éliminé au moment de l'hydrolyse de l'ATP.

La porte ADN « DNA Gate » est formée par le domaine Toprim (**T**opoisomerase **P**rimase) qui fixe un ion magnésium et le domaine WHD (**W**inged **H**elix **D**omain) parfois appelé domaine « CAP like » car il possède un repliement similaire à la protéine CAP (Catabolite Activation Protein) (Berger et al., 1996; Wendorff et al., 2012; Wu et al., 2011) (Figure 6). Le domaine WHD contient la tyrosine catalytique (Y805 pour l'isoforme α humaine) et coopère avec le domaine Toprim pour la coupure de l'ADN avec 4 paires de bases sortantes sur les deux brins opposés. Le domaine « Tower » possède un repliement α

INTRODUCTION

β et participe également à la fixation et au maintien de l'ADN (Dong and Berger, 2007) (Figure 8). À partir du domaine «Tower» un repliement «coiled-coil» possédant un petit domaine globulaire à son extrémité la plus distale constitue la troisième interface de dimérisation, la porte C «C-gate».

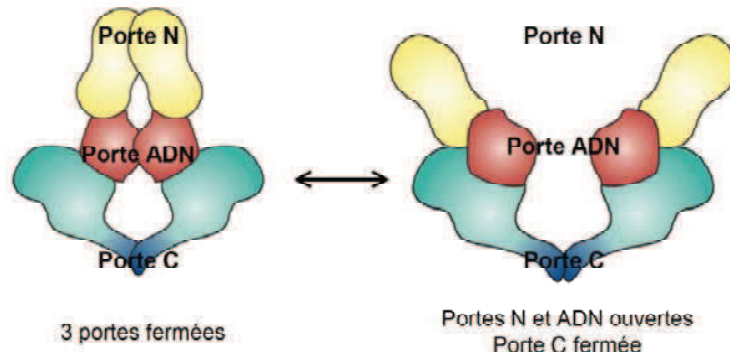


Figure 5 Les portes des topoisomérases II dans les conformations de l'enzyme ouverte et fermée. Les domaines C-terminaux ne sont pas représentés.

INTRODUCTION

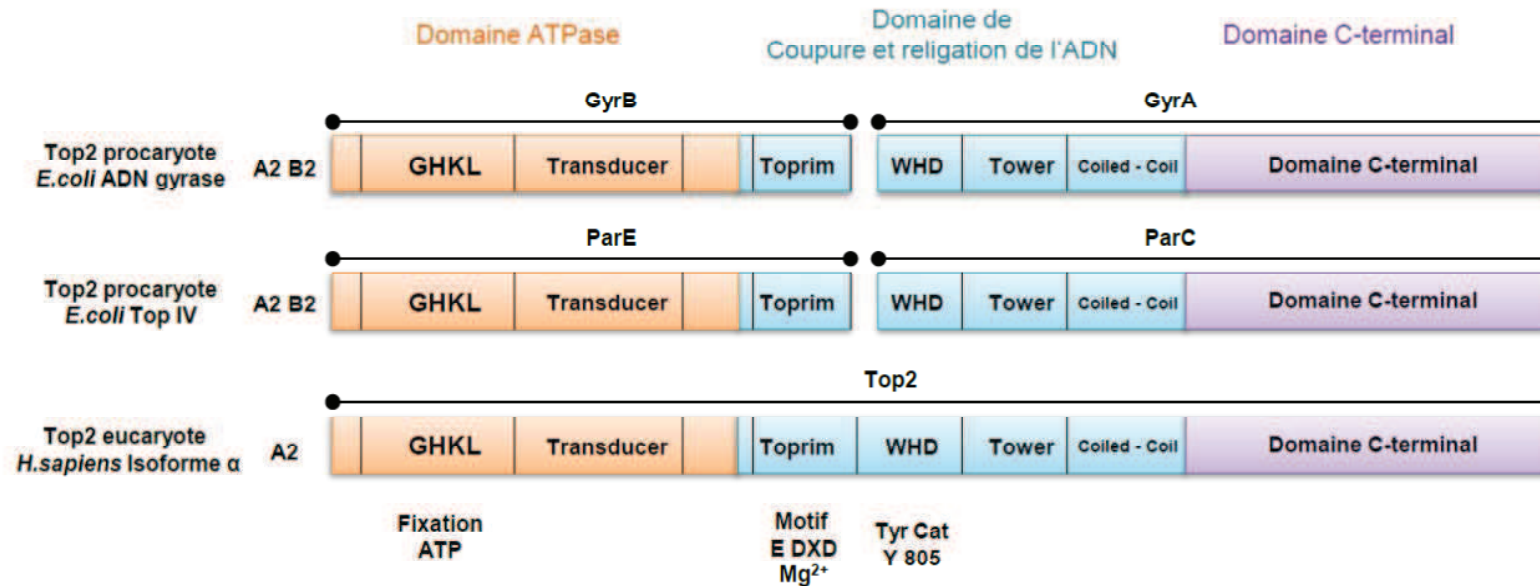


Figure 6 Organisation des séquences peptidiques des topos2. Les topos 2 procaryotes sont des hétéro-tétramères A2B2 composés de 4 chaînes polypeptidiques soit GyrB – GyrA pour l'ADN gyrase, soit ParE-ParC pour les topos IV. Le domaine Toprim est séparé dans la séquence du domaine de coupure et de religation contrairement aux topos 2 eucaryotes. Les topos 2 eucaryotes sont des homodimères, avec les chaînes correspondant à A et B des topos 2 procaryotes fusionnées.

INTRODUCTION

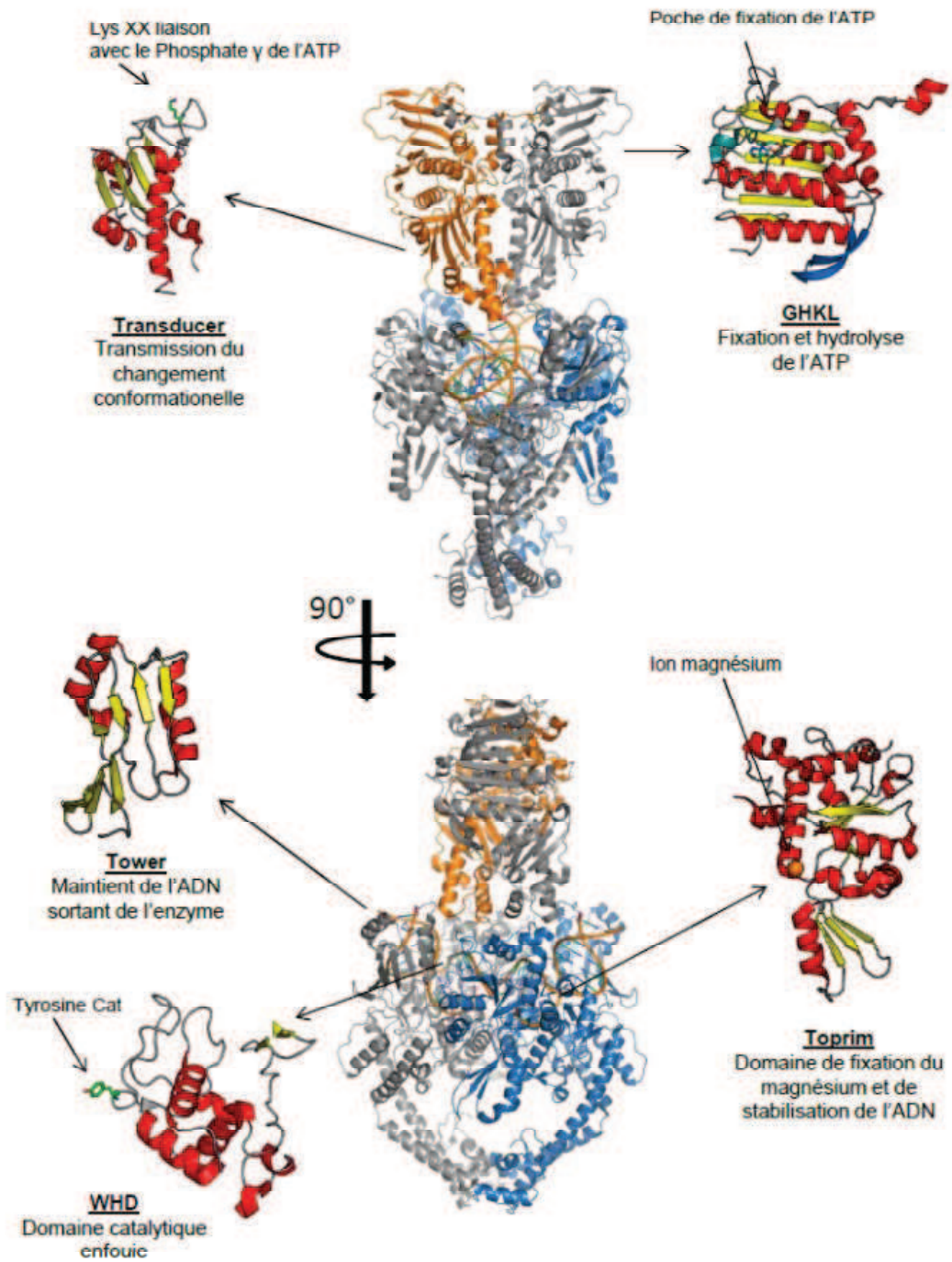


Figure 7 Structure 3D des domaines ATPase et du corps de la Top2 de *S.cerevisiae*. PDB : 4GFH [15].

2. Le mécanisme de passage des brins d'ADN : Le cycle catalytique.

Un premier modèle de passage des brins régulé par deux portes « two gates » avait été proposé pour la première fois dans les années 1980 (Wang and Kirkegaard, 1981). Dans ce modèle, deux interfaces régulent l'accès à la cavité centrale (Figure 7). Une porte lie, coupe et ouvre un premier segment d'ADN double brin. Puis un second brin d'ADN entre dans la cavité centrale du domaine ATPase, passe à travers la première porte ouverte et passe au travers de l'enzyme. Ceci constitue un événement de passage de brin qui affecte le Lk (± 2) de la molécule d'ADN fixée (Figure 9), même si les études structurales menées sur les topoisomères 2 ont montré l'existence de plus de 2 portes « physiques » entrant dans la régulation du passage de brin. Tout d'abord, les topoisomères 2 fixent un segment d'ADN double brin, le segment d'ADN G (« Gated »), au niveau de leurs domaines de coupure et de religation (Toprim/WHD/Tower). Puis les enzymes capturent un second ADN double brin, le segment d'ADN T (« Transported »), chaque Topo II présente une spécificité différente en fonction de la chiralité des croisements d'ADN (Bjergbaek et al., 1999; Roca et al., 1996). La fixation de l'ATP entraîne la fermeture de la porte N (Domaines ATPase) autour du segment T. L'hydrolyse d'une des deux molécules d'ATP en ADP + Pi et le départ du Pi entraîne des changements conformationnels qui aboutissent à l'ouverture de la porte ADN (Baird et al., 1999; Harkins et al., 1998; Harkins and Lindsley, 1998). Cette ouverture s'effectue grâce à la séparation des domaines WHD (Berger et al., 1996; Dong and Berger, 2007; Fass et al., 1999; Morais Cabral et al., 1997). Le segment T est poussé dans cette ouverture, le segment G est fermé et reliqué puis le segment T est libéré par l'ouverture transitoire de la porte C (Dong and Berger, 2007; Roca et al., 1996). L'hydrolyse du deuxième ATP entraîne l'ouverture de la porte N et le recyclage de l'enzyme qui est prête pour un nouveau cycle de passage de brin.

3. La diversité des domaines C-terminaux

À l'heure actuelle 4 structures de domaines C-terminaux (CTD) ont été résolues et uniquement pour les topoisomères 2 procaryotes (Corbett et al., 2005; Corbett et al., 2004; Hsieh et al., 2004; Ruthenburg et al., 2005), illustrant une grande diversité structurale comparée à la similarité des domaines ATPase et corps des topoisomères 2 (Figure 10). Les domaines C-terminaux des Topoisomères II bactériennes possèdent un repliement de type β -pinwheels constitué d'un nombre variable de pales ou lames en fonction des espèces et du sous-type. Il semblerait que les orthologues des ADN gyrase possèdent toutes 6 lames alors que le nombre de lames des orthologues de ParC (corps des topoisomères IV) semble plus diversifié, allant de 3 à 7

INTRODUCTION

(Corbett et al., 2005). Les ADN gyrases possèdent un domaine C-terminal avec un repliement β pinwheel complet contenant le motif GyrA box qui est essentiel pour l'activité de surenroulement négatif de l'ADN. Il n'a pas encore été clairement défini comment ces différentes structures impactent l'activité catalytique des topoisomères IV. Les HsTop2 possèdent deux isoformes α et β avec des caractéristiques bien distinctes. Ces isoformes possèdent des régions C-terminales non structurées, contenant des signaux de localisation nucléaire et de nombreux sites de modifications post-traductionnelles. Les CTD sont impliqués dans le recrutement de partenaires cellulaires et dans la reconnaissance de la chiralité des croisements d'ADN (McClendon et al., 2005). Il existe également des top2 qui n'ont pas de CTD, comme celle du virus *Chlorella*.

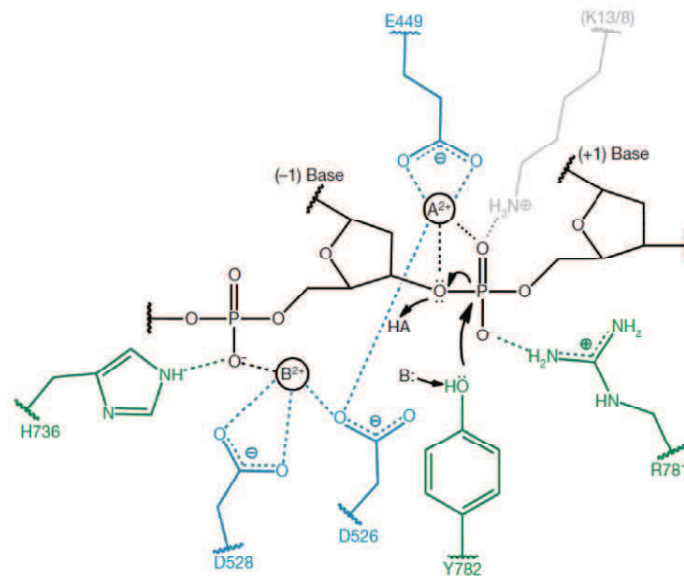


Figure 8 Mécanisme de coupe d'un brin d'ADN illustré chez la Top2 de *S.cerevisiae*. La base (B:) et l'acide (HA) ne sont pas connus mais sont certainement des molécules d'eau. A et R781 stabilisent l'état de transition et B et H736 permettent d'ancrer le phosphate lié à la base en -1 du site de coupe. En bleu les résidus appartenant au domaine Toprim et en vert au domaine WHD Adapté de Schmidt *et al* 2010 (Schmidt et al.)

INTRODUCTION

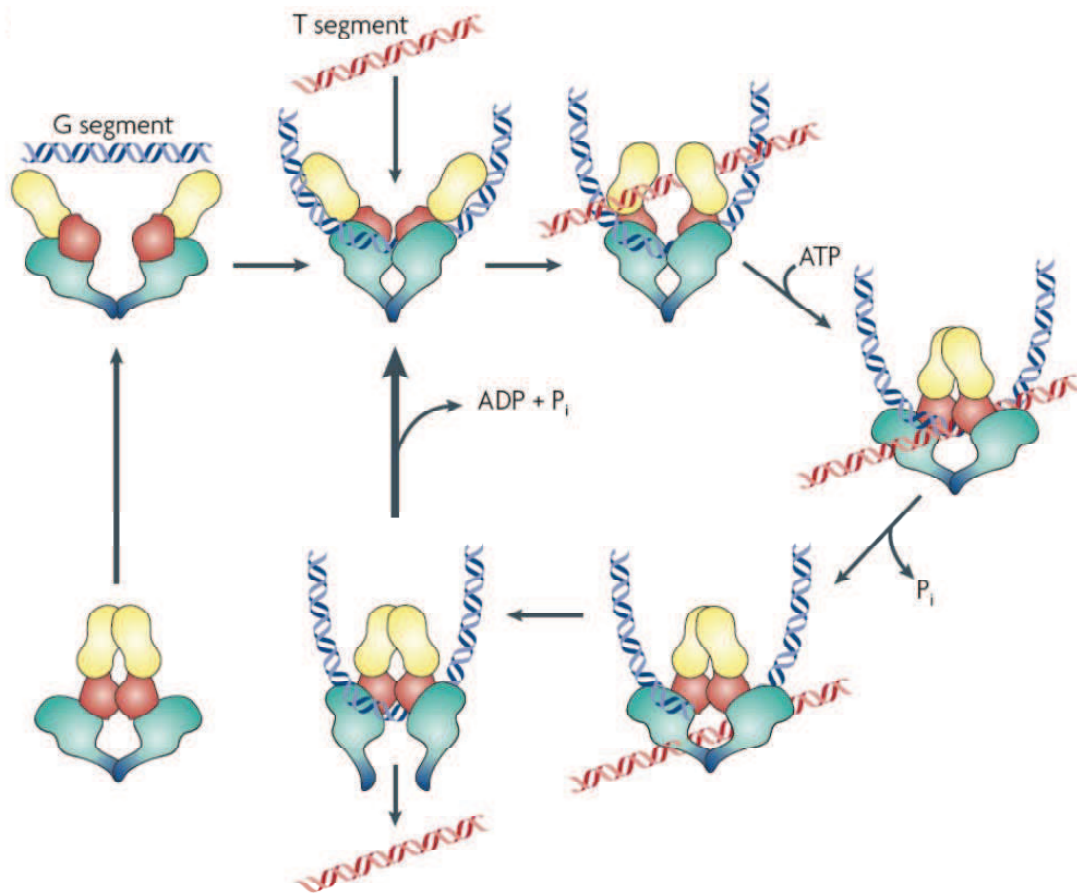


Figure 9 Cycle catalytique des topoisomérases II. Un premier brin d'ADN (G) (Brin bleu) est fixé dans le corps de l'enzyme (rouge : le domaine Toprim et bleu/vert : la porte C). Un second brin (T : Brin rouge) est capturé par la dimérisation des domaines ATPase ayant fixé de l'ATP (Jaune). Puis le clivage et l'ouverture du segment G permet le passage du brin T à travers l'enzyme. L'hydrolyse du second brin permet la régénération de l'enzyme qui libère le brin G ou capture un nouveau brin T. Les domaines C-terminaux ne sont pas représentés.

INTRODUCTION

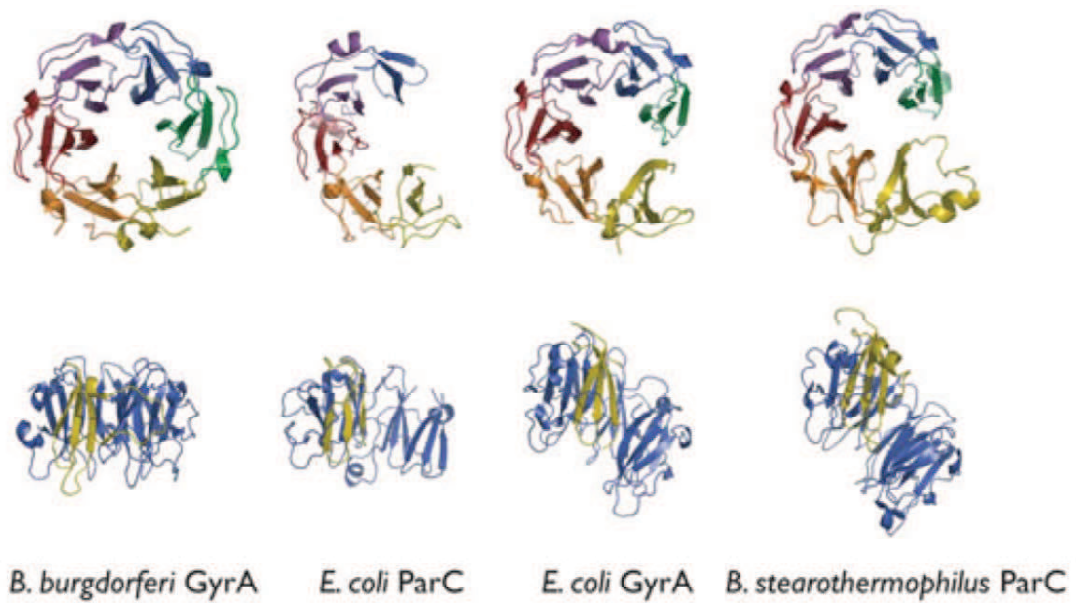


Figure 10 Structures 3D des 4 domaines C-terminaux de Topos II bactériennes dont la structure est connue à ce jour. PDB : 1SUU, 1ZVT, 1ZIO, 1WP5.

4. Les études structurales réalisées sur les topos 2

La première étude structurale a été réalisée sur l'ADN gyrase de *M.luteus* en complexe avec un ADN de 541 paires de bases (Kirchhausen et al., 1985). Les complexes ont été visualisés par microscopie électronique à transmission par ombrage au platine (Figure 11a.). Cette étude a permis de montrer deux états conformationnels de l'enzyme en complexe avec de l'ADN et d'enroulement de l'ADN autour de l'enzyme. L'enroulement de l'ADN autour de la gyrase est réalisé lors de la génération de supertours d'ADN négatifs (Figure 11b.).

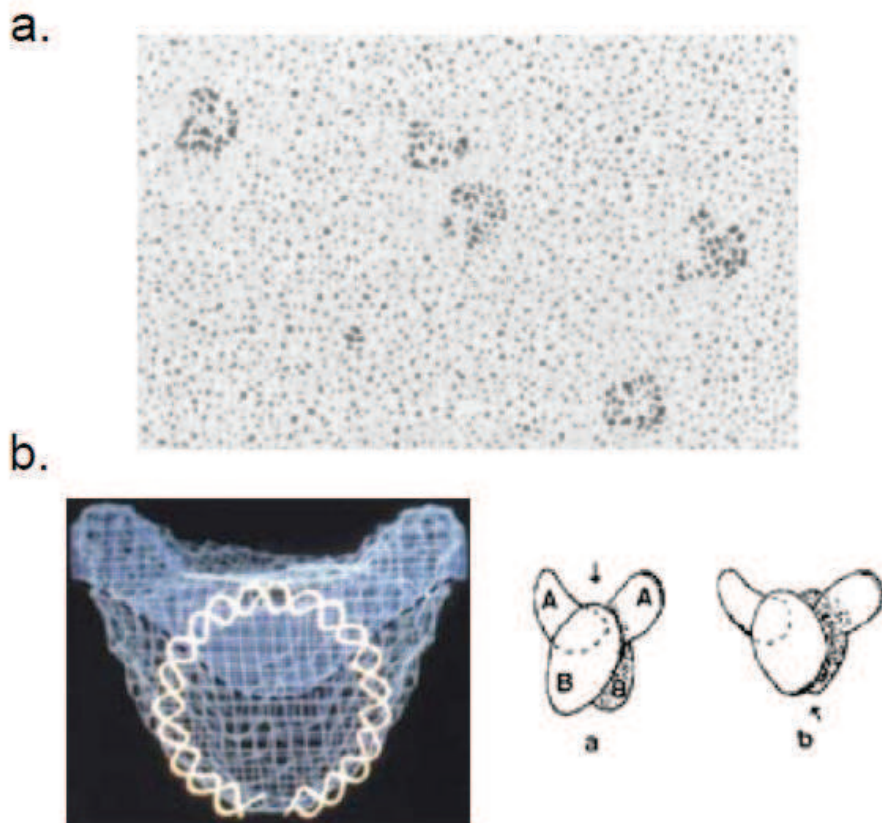


Figure 11 La première étude structurale réalisée en microscopie électronique. a. Une image des Top2 préparée avec un ombrage au platine. b. La reconstruction 3D et le modèle proposé pour les conformations observées sur les images (Kirchhausen et al., 1985).

INTRODUCTION

Une succession de structures cristallographiques a été réalisée sur les domaines isolés des Top2. En effet les Top2 sont des homodimères de grandes tailles dont le point limitant pour des études structurales est leur grande flexibilité. Elles possèdent trois sous-domaines fonctionnels, le domaine ATPase, le corps de coupure et de religation de l'ADN et le domaine C-terminal. Il y a donc deux points pivots qui permettent une multitude de combinaisons lesquelles aboutissent à un grand nombre de conformations possibles générant de l'hétérogénéité. Dans les années 1990, trois structures du domaine de coupure et de religation de l'ADN, une de l'ADN gyrase et deux de *S.cerevisiae* ont été résolues par cristallographie aux rayons X (PDB : 1BGW, 1AB4, 1BJT) (Berger et al., 1996; Fass et al., 1999; Morais Cabral et al., 1997). Ces structures des sous-domaines WHD : Winged-Helix Domain et Tower sont très conservées en séquence et présentent donc une grande similarité de repliement tridimensionnel. On retrouve également une grande similarité dans leur agencement spatial les uns par rapport aux autres. De plus la comparaison de ces trois structures a mis en évidence différents états conformationnels, permettant de visualiser ce qui pourrait être l'ouverture du « DNA Gate », une des étapes du cycle catalytique des Top2.

De très nombreuses structures du domaine ATPase de l'ADN Gyrase, de la TopIV et des Top2 de *S.cerevisiae* et humaine ont été résolues [16-20]. Ces structures résolues en présence d'AMPPNP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, ou en présence d'ADP ont permis de mieux comprendre comment l'hydrolyse d'ATP est impliquée dans le cycle catalytique de ces enzymes.

Les structures cristallographiques du domaine de coupure et de religation de l'ADN en présence d'inhibiteurs et /ou d'ADN ont par la suite permis deux observations principales : (i) l'ADN fixé au niveau du corps de l'enzyme subit une courbure importante (environ 120°). Cette courbure a été observée dans différentes structures de Top2 procaryotes et eucaryotes. De plus l'interaction de l'ADN avec les différents domaines, notamment le sous-domaine TOPRIM a pu être caractérisée. (ii) Le mode d'interaction des inhibiteurs interfaciaux (Quinolones, Etoposide) a pu être caractérisé et intégré au modèle du cycle catalytique de l'enzyme. Les inhibiteurs interfaciaux sont placés de manière à inhiber l'étape de religation de l'ADN G en déplaçant légèrement les extrémités d'ADN à relier covalentement. Ces structures ont également permis une compréhension plus approfondie des mécanismes de résistance aux inhibiteurs interfaciaux liés aux mutations des Top2 [13, 14, 24, 25].

Pour finir les domaines C-terminaux ont été résolus pour l'ADN gyrase et la TopIV montrant que ces domaines guident le positionnement de l'enzyme sur le brin d'ADN G, soit par enroulement de l'ADN autour du domaine dans le cas des ADN gyrase, soit par

INTRODUCTION

positionnement de ces domaines dans les croisements d'ADN pour les TopIV [21-23]. Aucune information structurale n'est disponible pour ces domaines chez les Top2 eucaryotes. Contrairement aux domaines ATPase et au corps de coupure et de religation de l'ADN, les domaines C-terminaux sont les parties les plus divergentes des Top2 eucaryotes.

Des études de SAXS (Small Angles Xray Scattering) ont permis la constitution d'enveloppes de l'ADN gyrase entière permettant de se faire une première idée de la structure 3D entière de l'ADN gyrase, notamment du positionnement des domaines C-terminaux (Baker et al.; Costenaro et al., 2005, 2007). Au moins deux positions ont été observées, contre le Coiled-coil du C-gate ou proche du domaine TOPRIM. En absence de structure plus précise il n'était pas encore possible à ce stade de conclure sur la disposition spatiale des trois domaines fonctionnels.

Toutes ces informations structurales sont précieuses pour la compréhension des mécanismes fonctionnels associés à chaque sous domaine. Cependant le lien fonctionnel et mécanistique entre ces domaines nécessite, pour être compris, la résolution de la structure des enzymes entières. En 2012, Schmidt et al. ont résolu la structure cristallographique du domaine ATPase et du corps de la Top2 de *S.cerevisiae* [29]. Cette structure montre une organisation orthogonale entre le domaine ATPase et le corps de l'enzyme, et suggère un entrecroisement des domaines ATPase. Cette structure a permis de positionner correctement le domaine ATPase par rapport au corps de l'enzyme, ajoutant un degré de complexité dans la compréhension mécanistique du cycle des Top2. Pour finir notre équipe a résolu en 2013 la structure de l'ADN gyrase entière de *T.thermophilus* en complexe avec un ADN de 155 paires de bases par cryo microscopie électronique [30]. Cette structure a permis de visualiser le positionnement des domaines C-terminaux de l'enzyme en présence d'ADN et de proposer un mécanisme de surenroulement négatif de l'ADN (Figure 12). Cette structure a confirmé que le dimère de la gyrase est entrelacé, suggérant que cet entrelacement est une caractéristique structurale conservée des procaryotes aux eucaryotes. Cette étude a permis de montrer que le domaine ATPase s'entrelace et se referme sur les croisements d'ADN pour les séquestrer dans le domaine de liaison de l'ADN, assurant l'unidirectionnalité de la réaction.

INTRODUCTION

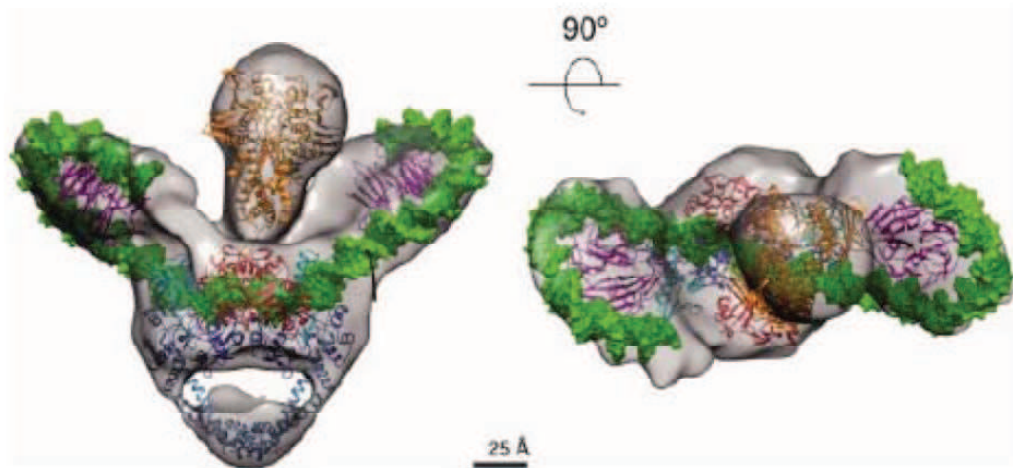


Figure 12 Structure de l'ADN gyrase entière en présence d'ADN résolue par Cryo microscopie électronique. Les structures cristallographique des domaines isolés sont placées dans la densité électronique et ont permis de proposer un modèle pour le mécanisme de surenroulement négatif de l'ADN (Papillon et al., 2013).

INTRODUCTION

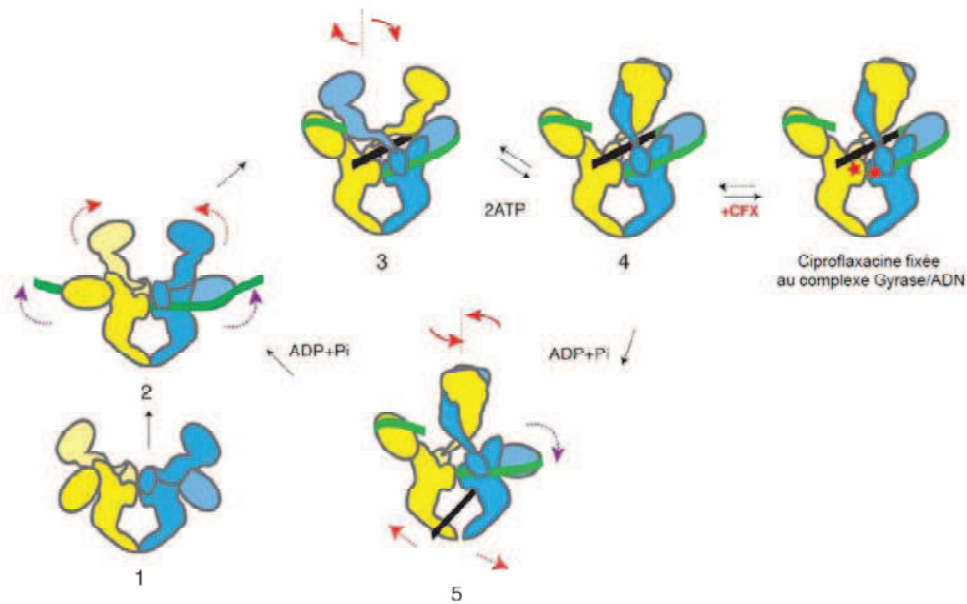


Figure 13 Cycle catalytique de l'ADN gyrase à la lumière de l'architecture de l'enzyme entière. 1 : Avant la fixation de l'ADN les domaines ATPase sont ouverts. 2,3 : Au moment de la fixation du segment d'ADN G (Vert) les CTD remontent et les domaines ATPases remontent, s'entrecroisent en capturant le segment d'ADN T provenant de l'enroulement du brin d'ADN G autour d'un CTD. La fixation de l'ATP entraîne la dimérisation des domaines ATPase et la formation d'un croisement d'ADN G/T positif. D'après la structure résolue dans le laboratoire en Cryo-EM, la ciprofloxacine semble capturer cette étape, juste avant le passage du brin d'ADN T. 5 : Puis l'hydrolyse d'un premier ATP permet le passage du brin d'ADN T à travers l'enzyme corrélé à la descente du CTD et l'ouverture de la porte C. L'hydrolyse du deuxième ATP permet le recyclage de l'enzyme.

INTRODUCTION

IV. Le rôle des ADN topoisomérases de type II eucaryotes dans les processus cellulaires.

1. Les isoformes α et β des Top 2 humaines.

Les isoformes des Top2 humaines ont été clonées pour la première fois à la fin des années 80. L'isoforme α par Tsai Pflugfelder *et al.* en 1988 (Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988) et l'isoforme β Chung *et al.* (Chung *et al.*, 1989) et Austin *et al.* en 1989 (Austin and Fisher, 1990). Les isoformes des Top2 n'ont à ce jour été retrouvées que chez les vertébrés. Les deux isoformes humaines partagent 68% d'identité de séquence sur l'ensemble de leurs séquences et 78% sur leurs domaines ATPase et le corps des enzymes alors que leurs CTD ne partagent que 34% d'identité de séquence (Austin and Marsh, 1998). Entre elles, les isoformes de différentes espèces sont très proches, par exemple on retrouve 95% d'identité entre les Top2 β humaines et celles du Rat (Austin and Marsh, 1998). Les deux isoformes possèdent des caractéristiques bien distinctes (Tableau 1). Elles ont des tailles différentes (90 résidus aminés de différence) et des sensibilités aux molécules inhibitrices légèrement différentes. Le CTD est la partie la plus divergente des deux isoformes. Ce domaine est responsable de leurs différences fonctionnelles.

L'isoforme α est essentielle pour la survie et la prolifération cellulaire (Carpenter and Porter, 2004; Grue *et al.*, 1998). Elle est impliquée dans la réplication et la ségrégation des chromosomes (Bauman *et al.*, 1997; Heck and Earnshaw, 1986; Hsiang *et al.*, 1988; Woessner *et al.*, 1991). L'isoforme β est non essentielle, cependant elle semblerait nécessaire pour un développement neuronal correct et la régulation de la transcription (Dereuddre *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 2006; Ju and Rosenfeld, 2006; Yang *et al.*, 2000). Les deux isoformes possèdent des signaux de localisation nucléaires et de nombreux sites de phosphorylations situés dans les CTD (Isaacs *et al.*, 1998; Mirski *et al.*, 2003; Mirski *et al.*, 1997). Les isoformes ont également une distribution tissulaire différente (Bauman *et al.*, 1997; Holden *et al.*, 1992; Juenke and Holden, 1993; Zandvliet *et al.*, 1996). Les tissus contenant un nombre élevé de cellules en prolifération ont un taux élevé d'ARN messager de l'isoforme α , alors que l'isoforme β est présente dans un nombre plus étendu de tissus indifféremment de son état de prolifération, elle est particulièrement présente dans les tissus neuronaux (Capranico *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1994). En résumé l'isoforme β est présente de manière ubiquitaire alors que l'isoforme α est présente en grande quantité dans les cellules en prolifération.

INTRODUCTION

L'isoforme α relaxe les supertours d'ADN de manière plus processive que les supertours négatifs ce qui n'est pas le cas pour l'isoforme β qui est de plus incapable de compenser la perte de l'isoforme α dans la cellule (Grue et al., 1998; McClendon et al., 2005). Linka *et al.* ont montré que le CTD serait responsable de la spécificité de substrat en construisant des chimères Top2 α + CTD β et Top2 β + CTD α . L'isoforme β avec les CTD α est capable de remplir le rôle de son homologue est inversement (Linka et al., 2007). Des études montrent également que le CTD serait capable de réguler l'activité catalytique (McClendon et al., 2006; McClendon and Osheroff, 2006; McClendon et al., 2005). De plus l'isoforme α serait plus active en présence d'ADN surenroulé positivement contrairement à l'isoforme β qui ne présente pas de différence de processivité en fonction de la chiralité des supertours d'ADN (McClendon et al., 2005). Les Top2 des *Drosophila melanogaster* et de *S.cerevisiae* ne montrent pas de préférence pour la géométrie des croisement d'ADN ce qui indiquerait que cette capacité est apparue avec les isoformes des Top2 et n'est pas universellement répartie chez les Top2 eucaryotes.

Tableau 1 Caractéristiques et différences entre les isoformes α et β des Top2 humaines. * et ** illustrent que l'isoforme β est plus processive que l'isoforme α en terme de relaxation d'ADN.

		α	β
	Gène	17q21-22	3p24
	Clonage	1988	1989
	Relaxation d'ADN	*	**
	Masse molaire KDa	172	180
	Nombre d'AA	1531	1621
	Epissage alternatif	3 insertions	2 insertions
	Séquence préf.	Riche en AT	Non
Sensibilité aux inhibiteurs	<u>Merbarone</u>	2-3	1
	Teniposide	1	1
	Etoposide	1	1
	m-AMSA	1	1
	Suramine	1	1
	<u>Mitoxanthrone</u>	1	4
Sites de clivage	Etoposide	Identique	Identique
	m-AMSA	Identique	Identique

2. Rôle des Top2 dans la réplication du génome

L'un des rôles principaux de la famille des topoisomères est de résoudre les problèmes topologiques associés à la réplication des chromosomes. En l'absence de topoisomères, des supertours positifs s'accumulent devant la fourche de réplication, ces tensions sont résolues soit par les Top1, soit par les Top2. De plus les supertours positifs présents devant la fourche de réplication peuvent migrer vers les deux brins répliqués et former des structures appelées « précaténates » qui deviendront les substrats des Top2 (Figure 14a.). La décaténation de l'ADN est le rôle principal des Top2 au cours de l'élongation de la réplication que ce soit dans les cellules procaryotes ou eucaryotes (Lucas et al., 2001; Peter et al., 1998; Postow et al., 2001). À la fin de la réplication les deux fourches de réplication se rencontrent et génèrent des brins d'ADN caténés. Les Top1 laissent alors place aux Top2 pour la réaction de décaténation (Figure 14b.). Il a été montré que le produit de la réplication *in vitro* d'un ADN circulaire sont des ADN caténés en absence de Top2 mais cette observation a également été réalisée sur de l'ADN génomique eucaryote avec les Top2 de levures *S.cerevisiae*. Des levures possédant uniquement une Top2, pas de Top1, se répliquent normalement et passent la phase S sans problème, alors qu'en absence de Top2 mais avec une Top1 les cellules meurent lors de la mitose (Bermejo et al., 2007; Brill et al., 1987; Holm et al., 1985; Kim and Wang, 1989). Il a été montré que les cellules ne réagissent pas de la même manière en absence de Top2 ou en présence de Top2 inactive (Baxter and Diffley, 2008). Alors que les cellules sans Top2 meurent lors de l'entrée en mitose, celles avec une Top2 inactive ont une incapacité de résoudre les brins d'ADN lorsque les deux fourches de réplication se rencontrent. Une explication apportée par les auteurs est que les Top2 sont recrutées et agissent à l'endroit où les fourches de réplication se rencontrent. En absence de Top2, la réplication se termine avec des chromatides sœurs caténées, et en présence de Top2 inactives celles-ci interfèrent avec la fin de la réplication et conduisent à l'activation du point de contrôle de la phase S. Des études sur les Top2 α exprimées de manière conditionnelle ou « Knock Down » dans des cellules de mammifères ont confirmé ce modèle (Carpenter and Porter, 2004; Li et al., 2008). Il semblerait que la phosphorylation de l'isoforme α au moment de la phase S serait déterminante pour la progression du cycle cellulaire (Li et al., 2008). L'isoforme β n'est certainement pas directement impliquée dans la réplication car les cellules privées de Top2 β gardent la capacité à se diviser.

INTRODUCTION

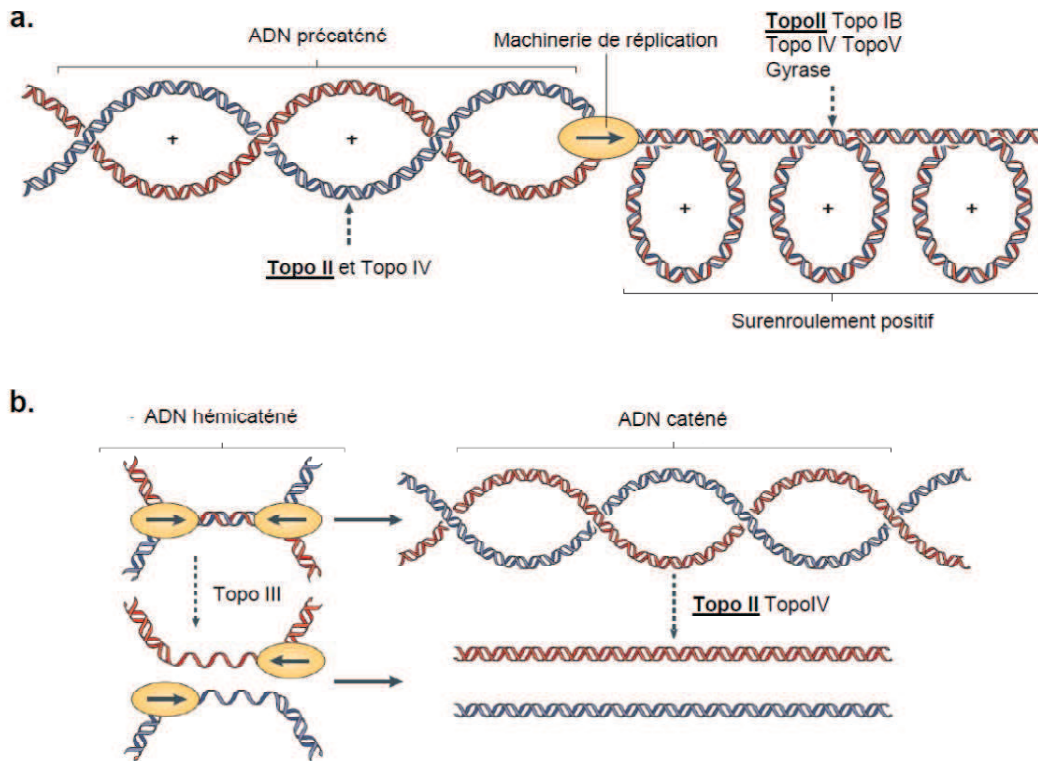


Figure 14 Rôle des topos pendant la réplication. a. Lors de l'élongation de la transcription les topos interviennent à l'arrière et à l'avant de la machinerie. La résolution de l'ADN précaténé et des supertours positifs est indispensable pour éviter la formation des structures d'ADN dommageable telles que des nœuds et pour éviter l'arrêt de la réplication. b. La convergence des fourches de réplication. La séparation des brins est nécessaire pour la séparation des chromatides sœurs lors de la division cellulaire. Adapté de Vos *et al.* 2011 (Vos *et al.*, 2011) .

3. Rôle des Top2 dans la ségrégation et la séparation des chromosomes.

La génération de chromatides sœurs caténées lors de la réplication pourrait en fait permettre une bonne ségrégation des chromosomes (Murray and Szostak, 1985). Après la réplication les chromatides sœurs doivent rester ensemble jusqu'à la mitose car une séparation trop prématurée pourrait affecter la répartition et transmission correcte des chromosomes aux cellules filles. Cette cohésion des chromosomes est assurée entre autres par le complexe cohésine mais également par la caténation des chromatides sœurs. La décaténation nécessite très certainement une synchronisation temporelle et spatiale fine de l'activité des Top2. La localisation des Top2 repose sur les interactions protéine-protéine et les modifications post traductionnelles (Bhat et al., 1996; Coelho et al., 2003). De plus, des études ont montré que l'isoforme α se localise au niveau des régions centromériques (Barthelmes et al., 2000; Christensen et al., 2002; Rattner et al., 1996). Des études dans *D.melanogaster* utilisant des ARN interférents dirigés vers la Top2 ont montré un défaut dans la séparation des chromosomes dans les cellules privées de la Top2. Par ailleurs Coelho *et al.* ont observé un lien entre les Top2 et la dynamique de la mitose, en particulier dans la régulation de points de contrôles qui permet de vérifier les tensions présentes au niveau des kinétochores. Pour finir, des études plus récentes en cellules de mammifères attribuent une fonction primordiale des Top2 au niveau centromérique bien que les détails moléculaires ne soient pas encore totalement compris (Porter and Farr, 2004).

4. Rôle des Top2 dans la régulation de la transcription des gènes

La perte de la Top1 ou de la Top2 chez la levure n'implique pas l'arrêt de la l'élongation ou de la initiation de transcription. Cependant ces processus sont totalement inhibés, particulièrement l'ARN polymérase I, si les deux enzymes sont absentes (Gartenberg and Wang, 1992; Goto and Wang, 1985; Kim and Wang, 1989; Schultz et al., 1992). Dans un premier temps, des études de transcription *in vitro* sur chromatine, ont suggéré que la transcription nécessite uniquement la présence de la Top2 car l'isoforme α se lie à l'ARN polymérase II (Mondal and Parvin, 2001). Cependant des études supplémentaires ont montré que les Top1 et les Top2 sont capables d'assister la transcription *in vitro* sur chromatine suggérant le rôle central de la relaxation de l'ADN lors de la transcription (Mondal et al., 2003). Liu et Wang ont décrit un modèle illustrant la génération de supertours d'ADN lors de la transcription. L'avancement de l'ARN polymérase génère des supertours positifs à l'avant de la machinerie transcriptionnelle et des supertours négatifs à l'arrière de la machinerie. Ces supertours peuvent être accentués par la chromatine (Liu and Wang, 1987; Wang, 2002) (Figure 15). Ce modèle suggère le rôle primordial des topoisomères au cours de l'élongation de la transcription.

Par ailleurs, des études récentes suggèrent un rôle de l'isoforme β dans l'initiation de la transcription. Ju *et al.* ont mis en évidence la localisation de l'isoforme β au niveau de promoteurs de gènes activés par des récepteurs nucléaires hormonaux par des expériences d'immunoprécipitation (Ju et al., 2006; Ju and Rosenfeld, 2006). Ils ont montré que la Top2 β s'associe avec des promoteurs via la formation d'un complexe incluant des protéines essentielles à la réparation de l'ADN, comme la PARP et le complexe Ku. Ces protéines ne seraient pas nécessaires pour la réparation de coupure induite par la Top2 β . Cette dernière serait un partenaire d'un complexe spécifiquement recruté au niveau de ces promoteurs et dont la fonction catalytique serait nécessaire pour leur activation (Figure 16). Cette étude apporte des informations importantes sur l'implication des Top2 dans d'autres fonctions que la régulation de la topologie de l'ADN. Elle montre que les Top2 sont également impliquées dans des régulations plus fines telles que l'initiation de la transcription de certains gènes. Ces travaux ouvrent des questions sur le rôle des différents membres de la famille des topoisomères dans la transcription des gènes et sur les spécificités du recrutement de la Top2 β au niveau de certains promoteurs.

Pour finir, des études proposent que les Top2 sont impliquées dans l'activation et la répression de la transcription (Wang, 2002). McNamara *et al.* ont montré que la Top2 β est

INTRODUCTION

capable de réprimer la transcription activée par le RAR α (Retinoic Acid Receptor α) dans les cellules NB4 (isolé de cellule de leucémie aigue promyélocytaire) (McNamara et al., 2008). Les auteurs ont émis l'hypothèse que la Top2 β appartient à un complexe différent de celui mis en évidence par Ju *et al.* Des éléments appuyant l'implication de la Top2 β dans la régulation de la transcription ont été mis en évidence par Luy *et al.* qui ont émis l'hypothèse que comme cette isoforme est impliquée dans la différenciation neuronale, une perte cette enzyme devrait altérer l'expression de gènes dans les tissus neuronaux (Lyu et al., 2006; Lyu and Wang, 2003). En effet, des souris portant le phénotype *Top2^{-/-}* ne sont pas viables et présentent de multiples déficits neuronaux notamment un défaut d'innervation du diaphragme avec environ 1-4% des gènes ayant une expression modifiée. Cette étude a également mis en évidence la localisation de la Top2 β au niveau de gènes de régulation du développement. L'ensemble de ces résultats montre l'importance de l'isoforme β pour la régulation de l'expression de certains types de gènes.

INTRODUCTION

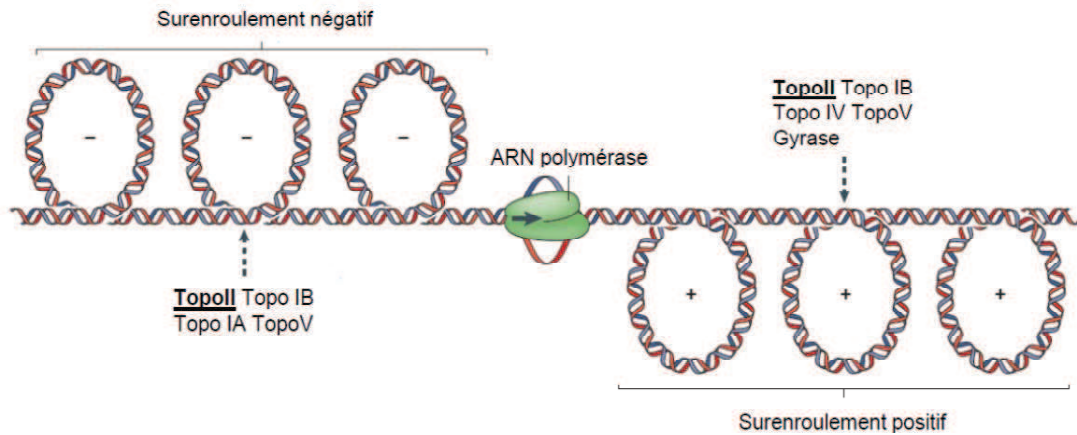


Figure 15 Implication des topos dans la transcription des gènes. Des supertours négatifs et positifs se forment derrière et devant la machinerie de transcription. Sans l'activité des topos l'ARN pol serait bloquée par l'accumulation de supertours. Adapté de Vos *et al.* 2011 [4]

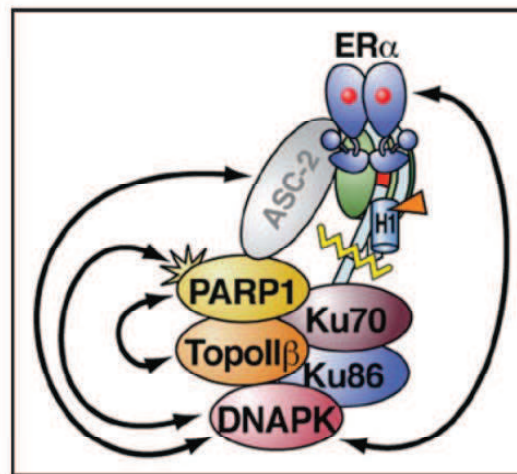


Figure 16 Rôle du complexe Top2 β / PARP/Ku dans la régulation de l'expression des gènes via les récepteurs hormonaux. La formation d'une coupure double brin par HsTop2 β entraîne l'activation de la PARP qui entraîne l'échange de l'histone H1 initiant la transcription des gènes. Le rôle mécanistique du complexe Ku (DNAPK/Ku70/Ku86) au sein de ce complexe n'est pas encore bien connu. Adapté de Ju *et al.* 2006 (Ju and Rosenfeld, 2006).

5. Les modifications et régulation des Top2

Les Top2 eucaryotes sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) qui influencent leur localisation et leurs activités catalytiques à différents moments du cycle cellulaire. À l'heure actuelle trois types de modifications ont été observés : les phosphorylations (Isaacs et al., 1998), les sumoylations (Azuma et al., 2005; Bachant et al., 2002; Dawlaty et al., 2008; Diaz-Martinez et al., 2006; Nitiss, 2009a; Ryu et al., 2010; Wong et al., 2004) et les ubiquitinations (Mao et al., 2001).

i. Les phosphorylations

La découverte du rôle physiologique de la phosphorylation date des travaux d'Eddie Fischer et Ed Krebs en 1955, puis de la découverte de la protéine kinase A (PKA) en 1968. Les phosphorylations ont un rôle majeur dans la régulation de la fonction des protéines dans la cellule. Chez l'homme, La sérine, la thréonine et la tyrosine sont phosphorylées avec une proportion de 86%, 12% et 2% (Johnson, 2009). En 2002 la publication du « kinome » humain a permis l'identification de 518 protéines kinases au total. Des études phylogénétiques ont mis en évidence que la majorité des familles de kinases sont partagées parmi les eucaryotes (Johnson, 2009).

La réaction de phosphorylation est toujours réalisée de la façon suivante : une protéine kinase catalyse le transfert du phosphate γ (PO_4^{3-}) d'un ATP sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine. La réaction inverse est catalysée par les protéines phosphatases. Lié de manière covalente au résidu, le groupement phosphate possède à pH physiologique une double charge négative ($\text{pI} : \sim 6,7$) et deux atomes d'oxygène capables de former des liaisons hydrogènes avec les groupements chargés des résidus à proximité. Aucune chaîne latérale ne possède ces caractéristiques physico-chimiques. Plusieurs types d'interactions peuvent être observés. Le groupement phosphate interagit fréquemment avec les groupements guanidiniums des chaînes latérales d'arginine induisant une stabilisation d'un état conformationnel particulier. Une interaction avec l'extrémité libre NH^+ de la chaîne principale des hélices α peut également être observées, ainsi qu'une interaction avec les acides aminés polaires. Cette modification locale peut induire des modifications structurales drastiques telles que l'activation ou l'inhibition enzymatique mais également la création d'interface de reconnaissance pour des partenaires protéiques (Johnson, 2009). Les phosphorylations jouent un rôle majeur dans la cellule. Elles régulent l'activité de nombreuses enzymes par activation/inactivation. Elles sont impliquées à de nombreux niveaux cellulaires.

INTRODUCTION

La phosphorylation des ADN topoisomérases a été reportée pour la première fois dans les années 1980 après identification d'une topo I qui fut à l'origine purifiée comme une phosphoprotéine nucléaire à partir de cellules d'hépatome humain (Durban et al., 1983). En 1984, Sander *et al.* ont mis en évidence l'association d'une protéine kinase avec la Top2 de *Drosophila melanogaster* (Sander et al., 1984). Les études *in vitro* menées dans le but de comprendre le rôle des phosphorylations sur l'activité enzymatique des Top2 ont donné lieu à des résultats contradictoires. En effet, la phosphorylation *in vitro* de la Top2 de drosophile par la caséine kinase et la protéine kinase C résulte en une augmentation de l'activité enzymatique ; le même résultat a été observé sur ScTop2 (Ackerman et al., 1985; Cardenas et al., 1992; Cardenas and Gasser, 1993). Une expérience équivalente réalisée sur les cellules HL60, a entraîné une diminution de l'activité enzymatique (Constantinou et al., 1989). Deux études ont montré que l'augmentation de l'activité des Top2 phosphorylées pourrait être liée à l'augmentation de l'hydrolyse d'ATP et l'augmentation de l'affinité pour l'ADN (Corbett et al., 1992; Dang et al., 1994). L'hypothèse selon laquelle la phosphorylation du domaine C-terminal servirait à annuler son rôle de régulateur négatif de l'activité de l'enzyme a également été envisagée (Cardenas and Gasser, 1993).

Les Top2 eucaryotes sont phosphorylées *in vivo* et en fonction du cycle cellulaire avec une augmentation en G2/M (Cardenas et al., 1992; Heck et al., 1989). En 1994 et 1995 Wells et al. (Wells et al., 1994; Wells et al., 1995; Wells and Hickson, 1995) furent les premiers à cartographier les sites de phosphorylations sur l'isoforme α humain et observer les variations de phosphorylation de chaque site en fonction du cycle cellulaire. Les deux isoformes humaines sont phosphorylées *in vivo* mais les modifications spécifiques à l'isoforme β sont encore mal connues (Burden and Sullivan, 1994; Kimura et al., 1994). Plusieurs types de kinases ont été identifiés comme responsables de la catalyse des phosphorylations sur l'isoforme α : la Caséine kinase II (CKII) (Isaacs et al., 1998), Caséine kinase 1 (Grozav et al., 2009), proline directed kinase (Wells and Hickson, 1995), polo like kinase 1 (Iida et al., 2008; Li et al., 2008), p34^{cdc2}, MAP (mitogen-activated protein kinase), protéine kinase C (Wells et al., 1995). De plus certaines études suggèrent que la régulation de l'activité des HsTop2 via leur degré de phosphorylation au cours du cycle cellulaire pourrait influencer leur sensibilité aux molécules inhibitrices utilisées en chimiothérapie des cancers (Aoyama et al., 1998; Ganapathi et al., 1996). Takano *et al.* ont observé une hyperphosphorylation de l'isoforme α dans une lignée de cellules résistantes à l'étoposide (Takano et al., 1991). d'autres études ont relevé une corrélation entre l'hypophosphorylation de l'isoforme α et la résistance aux inhibiteurs Doxorubicine, étoposide et m-AMSA ((Ganapathi et al., 1996; Ritke et al., 1995; Wells and Hickson, 1995).

INTRODUCTION

ii. Les acétylations

Les acétylations sont des modifications de première importance dans la cellule. Les HDAC (Histone déacétylase) ont été très largement étudiées car elles régulent l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle par la modification des queues d'histones.

En 2000 Tsai *et al.* ont montré que les deux isoformes de Top2 interagissent *in vivo* avec les HDACs dans une région conservée dans toute la famille (Tsai et al., 2000). Comme le suggèrent les auteurs, cette interaction pourrait appartenir à un complexe d'activité de remodelage de l'ADN. Il reste encore à établir si les HsTop2 sont acétylées *in vivo*. À l'heure actuelle, même si quelques acétylations ont été découvertes lors de l'analyse de protéome sur lignée cellulaire (PhosphoSite plus), aucune information *in vivo* ou *in vitro* n'est disponible sur l'état d'acétylation des Top2 humaines. De manière générale la réaction d'acétylation est réalisée par le transfert d'un groupement acétylé (CH_3CO) à partir d'une Acétyl Coenzyme A vers sur une lysine. Cette réaction est catalysée par une lysine transférase (KAT) dont les plus connues sont les HAT (Histone Acétyl Transférase). Le groupement acétylé neutralise la charge positive du résidu. Comme pour les phosphorylations, le changement de charge locale induit des remaniements structuraux sur la protéine entière.

iii. Les sumoylations

Les sumoylations ont été découvertes fin des années 1990 par les groupes de Günter Blobel et Frauke Melchior (Hay, 2005). Cette modification post-traductionnelle aboutit à la fixation covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (**S**mall **U**biquitine like **M**odifier) sur un résidu lysine accepteur de la protéine ciblée. Cette modification permet la régulation des fonctions cellulaires des protéines cibles, telles que le trafic intracellulaire, l'interaction avec des partenaires cellulaires (Hay, 2005).

En 2002, Bachant *et al.* ont montré que la Top2 de *S.cerevisiae* est régulée par la protéine SUMO. La mutation de *SMT4*, une isopeptidase qui intervient dans la maturation de SUMO, conduit à la séparation précoce des chromatides sœurs lors de la métaphase et avec un défaut de cohésion spécifique des régions proches du centromère (Bachant et al., 2002). Ce défaut est compensé par une surexpression de Top2 ou par la mutation de tous les sites potentiellement modifiés par SUMO. Il est possible que la sumoylation des Top2 limite leur capacité à participer au maintien de la cohésion des chromosomes et que cette modification inhibe leur capacité de décaténation. Il est connu que les Top2 interviennent dans la maintenance de la structure des chromosomes, la sumoylation peut donc avoir un

INTRODUCTION

impact important sur cette structure. Les sumoylations des isoformes des Top2 sont très importantes dans les cellules mammifères. Des expériences dans *Xenopus laevis* ont montré que PIAS γ , une SUMO E3 ligase, joue un rôle dans la séparation des chromosomes et dans la sumoylation des protéines situées au niveau du centromère notamment la Top2 α qui en plus aurait un défaut de localisation si elle n'est pas sumoylée (Azuma et al., 2005; Diaz-Martinez et al., 2006). Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés chez la souris (Roth et al., 2004; Wong et al., 2004). Des études récentes ont contribué au questionnement du rôle de PIAS γ dans la sumoylation des Top2.

RANBP2 est une nucléoporine qui possède une activité SUMO E3 ligase, c'est un gène essentiel dans la souris dont la sous expression entraîne un défaut de ségrégation, la constitution de structures anormales lors de l'anaphase et un degré élevé d'aneuploïdie (Dawlaty et al., 2008). Des analyses *in vitro* ont montré que la « sous » expression de RANBP2 entraînait un défaut de sumoylation des Top2 α et un défaut de localisation au niveau du centromère. Cet effet est compensé lorsque des Top2 α sumoylées ou RANBP2 sont ajoutées au système. Dawlaty *et al.* ont également montré que ce résultat n'est pas transposable chez la souris. RANBP2 serait donc la principale SUMO de Top2 α chez l'homme. Les résultats observés chez *Xenopus laevis* pourrait indiquer que d'autres protéines sumoylées par PIAS γ sont essentielles à la bonne ségrégation des chromosomes. Les observations faites via RANBP2 montrent que les Top2 α sont essentielles à la stabilité des chromosomes.

INTRODUCTION

Tableau 2 Liste des partenaires protéiques des HsTop2 répertoriés dans la littérature.

APC, adenomatous polyposis coli; CAPH, condensin complex subunit 2; CDC2, cell division cycle 2; CHRAC1, chromatin accessibility complex protein 1; CK2, casein kinase II; CRM1, chromosome region maintenance 1; HDAC, histone deacetylase; MDC1, mediator of DNA damage checkpoint 1; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase 1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RANBP2, RAN-binding protein 2; RAR α , retinoic acid receptor- α ; TOPBP1, topoisomerase binding protein 1.

Isoformes	Partenaires	Rôles cellulaires	Réf.
Top2 <i>D.melanogaster</i>	CHRAC1	Complexe de remodelage de la chromatine	(Varga-Weisz et al., 1997)
Top2 α	PCNA	Réplication de l'ADN	(Niimi et al., 2001)
Top2 α	RanBP2	SUMO E3 ligase	(Dawlaty et al., 2008)
Top2 α	PIASy	SUMO E3 ligase	(Ryu et al., 2010)
Top2 α	Polo-like kinase (PLK)	Phosphorylation	(Li et al., 2008)
Top2 α	Aurora B Kinase	Phosphorylation	(Coelho et al., 2008)
Top2 α	HMGB1	Chaperonne des Top2 sur certaines structures d'ADN	(Stros et al., 2007)
Top2 α	14-3-3-e	Modulation de l'activité	(Kurz et al., 2000)
Top2 α	APC	Régulation des protéines mitotiques	(Wang et al., 2008)
Top2 α	BRCA1	Activation de la décaténation	(Lou et al., 2005)
Top2 α	CAPH	Nécessaire pour la séparation des chromatides sœurs	(Bhat et al., 1996)
Top2 α	CDC2	Protéine kinase qui régulera progression du cycle cellulaire	(Wells and Hickson, 1995)
Top2 α	CRM1	Protéine d'export nucléaire, élimine les Top2 du noyau.	(Mirski et al., 2007; Turner et al., 2004)
Top2 α	Jab1 ou CSN5	Régulation de la stabilité des Top2	(Yun et al., 2004)
Top2 α	MDC1	Protéine de point de contrôle	(Luo et al., 2009)
Top2 α	PIN1	Terminaison de la réplication et condensation des chromosomes	(Cuvier et al., 2008)
Top2 α	Toposome	Fonction non déterminé, complexe multiprotéique	(Lee et al., 2004)
Top2 α	Sgs1/BLM/RECQL5	Progression du cycle cellulaire	
Top2 α / β	HDAC1	répression de l'expression des gènes	(Tsai et al., 2000)
Top2 α / β	HDAC2	répression de l'expression des gènes	(Tsai et al., 2000)
Top2 α / β	CK2	Protéine kinase	(Ackerman et al., 1985; Ahn et al., 2001; Cardenas and Gasser, 1993; DeVore et al., 1992; Isaacs et al., 1998; Redwood et al., 1998)
Top2 α / β	Ku 70 / Ku 80	NHEJ et transcription	(Ju et al., 2006; Ju and Rosenfeld, 2006)
Top2 α / β	p53	Suppresseur de tumeurs	(Cowell et al., 2000)
Top2 α / β	SUMO 1/2/3	Diverses fonctions cellulaires	(Mao et al., 2000)
Top2 β	PARP	Fonction multiple notamment la réparation de l'ADN	(Ju et al., 2006; McNamara et al., 2008)
Top2 β	RAR α	Régulation de la transcription	(McNamara et al., 2008)
Top2 β	TOPBP1	Contrôle des dommages à l'ADN	(Yamane et al., 1997; Yamane et al., 2002)

INTRODUCTION

V. Les Top2 sont des cibles majeures de molécules utilisées dans les traitements anticancéreux

Les topoisomères sont des cibles moléculaires de première importance en chimiothérapie des cancers. 14 molécules visant les topoisomères ont déjà été approuvées par la US Food and Drug Administration (FDA) et plusieurs autres sont actuellement en phase d'essais cliniques. Le topotecan et l'irinotecan ciblent la Top1B alors que les 12 autres visent les Top2 α et β .

La découverte des Top2 comme cibles moléculaires de certaines molécules utilisées en chimiothérapie des cancers a ouvert un champ d'études intensives sur cette famille de protéines (Liu, 1989). Ces études ont révélé que la plupart des molécules anti-topoisomères génèrent des dommages à l'ADN via les Top2, notamment l'étoposide et la doxorubicine, qui sont très largement utilisés en chimiothérapie des cancers (Pommier et al., 1985). Cette découverte a été à l'origine d'études approfondies sur leurs mécanismes moléculaires.

Les molécules anti-topoisomères sont divisées en deux classes :

(i) Les poisons à Top2 qui augmentent le taux de complexe covalent Top2-ADN coupés (Top2cc). Ces Top2cc sont considérés comme des lésions double brin de l'ADN sur lesquelles sont fixées covalentement une Top2. Parmi ces molécules figurent l'étoposide (ETO ou VP16) et la doxorubicine (DXO).

(ii) La seconde classe de molécules inhibe l'activité catalytique des Top2 sans augmenter le taux de complexes de coupure, ce sont les inhibiteurs de Top2, comme les bisdioxopipérazines.

Les molécules de la première classe sont utilisées dans les traitements anticancéreux contrairement à celles de la deuxième classe qui sont le plus souvent utilisées pour limiter les effets secondaires des poisons à Top2.

Les mécanismes moléculaires associés aux molécules anti-topoisomères sont nombreux et ils ne se limitent pas à l'inhibition de l'activité des Top2. De plus elles interviennent à différentes étapes du cycle catalytique (Figure 17). Les poisons à Top2 génèrent des complexes de coupures Top2cc par deux mécanismes : par l'inhibition de la religation de l'ADN après

INTRODUCTION

coupure par les Top2, comme ETO et DXO, ou par l'augmentation de la formation de Top2cc (Fortune and Osheroff, 2000). De plus des molécules intercalant de l'ADN telles que la DXO altèrent la structure de l'ADN et limitent la fixation des Top2 et donc la formation de Top2cc (Pommier et al., 1984; Tewey et al., 1984b). Ceci explique pourquoi la DXO génère des Top2cc à faible concentration et les inhibe à des concentrations plus élevées. Les inhibiteurs catalytiques tels que les bisdioxopipérazines (ICRF) agissent en maintenant les domaines ATPases des Top2 sous forme dimérique limitant ainsi l'hydrolyse de l'ATP.

Les poisons à Top2 génèrent des dommages à l'ADN dans des régions du génome différentes (Capranico and Binaschi, 1998; Capranico et al., 1990; Fortune and Osheroff, 2000; Pommier et al., 1991a, b) . Par exemple la DXO est sensible à une adénine en position -1 de son site de coupure alors que l'ETO est sensible à une cytosine en -1.

Enfin les anti-topos possèdent des cibles secondaires. Par exemple la DXO affecte un grand nombre de processus cellulaires en générant des espèces oxygénées réactives (ROS) qui sont notamment impliquées dans la cardiotoxicité de cette famille de molécules. La réparation des Top2cc est pour le moment peu comprise. Une des hypothèses avancée est une dégradation via le protéasome après modification par sumoylation (Zhang et al., 2006). En 2009 Cortes Ledesma *et al.* ont identifié la 5' tyrosine phosphodiesterase comme potentiellement responsable de la coupure des Top2cc (Cortes Ledesma et al., 2009).

La toxicité des anti-topos est complexe et de nombreux mécanismes de résistances peuvent entrer en jeu, à savoir, la diminution du taux de Top2, des mutations, la localisation cellulaires des Top2, les modifications post traductionnelles des Top2 (Nitiss, 2009a, b).

Finalement un des problèmes majeurs dans l'utilisation de ces molécules anti-topos est que leur cible principale est une enzyme dont l'activité est primordiale au bon fonctionnement de la cellule saine. L'étoposide peut induire l'apparition de cancers secondaires suite et notamment des leucémies myéloïdes aiguës (t-AML) et des syndromes de myélodysplasie (t-MDS). Ces syndromes sont caractérisés par une translocation entre les régions chromosomales 11q23 et 21q22. La translocation au niveau de la région 11q23 responsable de l'activation du gène qui déclenche ces syndromes a été directement reliée à la présence de Top2cc sur ce même gène même si le mécanisme moléculaire exact reste à élucider (Azarova et al., 2007; Felix et al., 2006; Lovett et al., 2001). En 2007 Azarova *et al.* ont mis en évidence grâce à des souris KO pour la Top2 β que l'inhibition de cette isoforme pourrait être impliquée dans la malignité secondaire de l'étoposide et ont ainsi ouvert un nouveau

INTRODUCTION

champ de recherche pharmacologique pour le développement de molécules anti-topos visant plus spécifiquement l'isoforme α (Azarova et al., 2007).

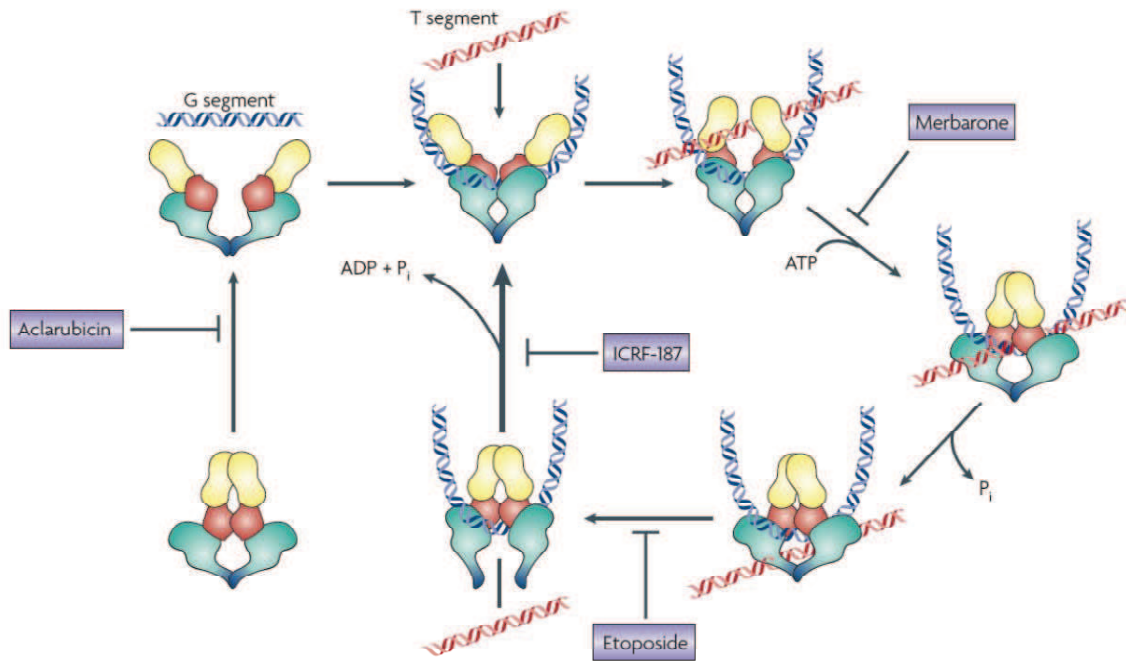


Figure 17 Inhibition des Top2 à différentes étapes du cycle catalytique. L'inhibition des Top2 à différentes étapes de leur cycle n'a pas le même impact au niveau cellulaire. Les molécules comme l'ICRF 187 ne génèrent pas de complexe de clivage contrairement à l'étoposide et la merbarone qui préviennent la formation de complexe de clivage. Adaptée de Nitiss, J.L. 2009 (Nitiss, 2009b).

INTRODUCTION

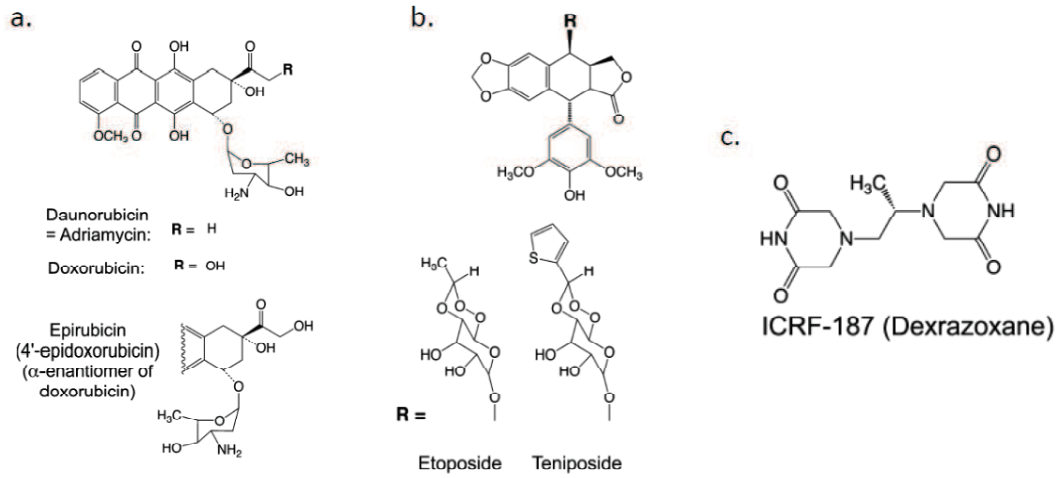


Figure 18 Trois principales molécules anti-topos. a. Les anthracyclines b. les dérivés des podophyllotoxines c. Un membre des bisdioxopipérazines.

1. Les Bisdioxopiperazines

La bisdioxopiperazine a été synthétisée pour la première fois dans les années 50 pour des applications dans l'industrie du textile et des applications pharmaceutiques. Par la suite Creighton *et al.* ont repris la synthèse de cette molécule afin de l'utiliser comme un potentiel agent chélatant, en se basant sur les observations que de nombreuses molécules retardant la croissance de cellules tumorales sont potentiellement chélatantes (Creighton *et al.*, 1969). Effectivement une étude en particulier a montré que cette molécule présentait une activité anti tumorale pour certains types de cancers (Leucémie aiguë, sarcome lymphoïde) (Hellmann *et al.*, 1969). Par la suite, le laboratoire Imperial Cancer Research Fund (ICRF) à Londres a repris l'étude de cette famille de molécules auxquelles il a donné son nom (Herman *et al.*, 1982). Il existe plusieurs dérivés de bisdioxopiperazine, tous portent le nom ICRF suivi d'un numéro. ICRF-159 dérivée de ICRF-154, ICRF-187 dérivé énantiomère de ICRF-159 et ICFR-193 (Figure 18c.). En 1991, les Top2 ont été identifiées comme étant la cible moléculaire des ICRF (Ishida *et al.*, 1991; Tanabe *et al.*, 1991). Par la suite il a été montré que l'inhibiteur ICRF-193 bloque l'enzyme sur le brin d'ADN et inhibe l'activité ATPase de celle-ci, suggérant que la fixation de l'inhibiteur se fait au niveau du domaine N-terminal des Top2 (Roca *et al.*, 1994). En 2003 Classen *et al.* ont co-cristallisé le domaine ATPase de la Top2 de *S.cerevisiae* en présence d'ADP et d'ICRF-187 (Classen *et al.*, 2003). Cette structure a permis de confirmer le mode d'action de l'inhibition des bisdioxopiperazines. Une molécule d'ICRF bloque les domaines ATPase en position fermée en dehors du site actif de l'ATP. L'enzyme est bloquée sur l'ADN de manière non covalente contrairement aux inhibiteurs interfaciaux. Ces molécules ont donc deux activités ; elles sont des agents chélatants et elles bloquent les Top2 en gardant le domaine ATPase sous forme de dimère (Andoh and Ishida, 1998; Roca and Wang, 1992). Cependant les bisdioxopiperazines ont une faible activité anti-tumorale et sont utilisées en thérapeutique principalement pour réduire la cardiotoxicité des anthracyclines.

2. La famille des podophyllotoxines

L'étoposide et la teniposide, de la famille des podophyllotoxines, ont été pendant de nombreuses années les seules molécules efficaces dans la lutte contre le cancer. Elles sont encore à l'heure actuelle parmi les plus utilisées dans le traitement des cancers du poumon à petites cellules, les carcinomes testiculaires, les lymphomes et sarcomes de Kaposi et de nombreux cancers métastatiques (Hande, 1998, 2003). La Podophyllotoxine, est un produit naturel issu de *Podophyllum peltatum*, qui est utilisé depuis plus de mille ans comme remède traditionnel en Asie. C'est un antimétabolite qui agit en prévenant la formation des microtubules. Cependant la toxicité de la podophyllotoxine a empêché son utilisation en clinique. Dans les années 1950, une série d'analogues semi-synthétiques ont été produits dont l'étoposide VP16 et la teniposide VM26, qui ont une activité anti-néoplasique significative et présentent une diminution de la toxicité (Hande, 1998). L'étoposide a été approuvé pour utilisation clinique dans les années 1980. Les deux molécules ainsi synthétisées ont perdu leur capacité à interagir avec les microtubules du fait de l'ajout des groupements carbohydrate méthyle pour VP16, et carbohydrate thiophène pour VM26 (Figure 18b.).

L'étoposide a été utilisé pendant de nombreuses années sans que sa cible moléculaire ne soit connue, ce n'est que dans les années 80 que la HsTop2 a été identifiée comme cible majeure (Hande, 1998). Les molécules VP16 et VM26 ne sont pas des intercalants de l'ADN. De nombreuses études ont tenté de localiser les sites de fixation sur l'enzyme (Bromberg et al., 2003; Chee et al.; Leroy et al., 2001; Wilstermann et al., 2007), émettant l'hypothèse que l'étoposide se fixerait dans le site actif de l'enzyme mais également entre le domaine ATPase et le corps catalytique. En 2011 Wu. *et al.* ont co-cristallisé l'isoforme β en présence d'étoposide (Wu et al.). Ils ont ainsi confirmé par une structure 3D l'hypothèse que deux molécules d'étoposide se fixent dans l'ADN clivé et empêchent la religation de celui-ci. De nombreuses études ont montré que l'étoposide, classé dans la catégorie des poisons à topoisomérase, stabilise et augmente la concentration en complexes d'ADN clivés formés par les HsTop2. Passé un certain seuil, le système de réparation de l'ADN est débordé et déclenche la mort cellulaire programmée (Bailly; Deweese et al., 2008; Deweese and Osheroff, 2009; McClendon and Osheroff, 2007; Pommier; Pommier et al.; Pommier and Marchand, 2005).

3. La famille des anthracyclines

La doxorubicine (adriamycine), premier agent anticancéreux de la famille des anthracyclines, a été isolé dans les années 1960 à partir de *Streptomyces peucetius* (Figure 18a.). Cette molécule est encore utilisée à l'heure actuelle dans le traitement de lymphomes malins, sarcome de Kaposi, leucémie aiguë et chronique, tumeur solide de différents types (néphroblastomes, Ewing, sarcomes, cancers du sein) (Masson, 2001). Les mécanismes d'actions des anthracyclines sont complexes. La doxorubicine est connue pour induire un arrêt de la croissance en phase G2/M de certaines lignées de cellules cancéreuses (cancer du sein et carcinome ovarien). Les effets cytotoxiques sont potentiellement liés à plusieurs facteurs ; l'activité inhibitrice dirigée contre les Top2, le principal effet, la propriété d'intercalant de l'ADN, et la production d'intermédiaires oxygénés réactifs. Ces trois actions agissent probablement de concert dans l'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.

En 1978 Kohn *et al.* ont été les premiers à suggérer un effet de cette classe d'inhibiteurs sur les Top2 (Ross *et al.*, 1978; Tewey *et al.*, 1984a). L'inhibition des Top2 par les anthracyclines possède quelques particularités. Premièrement les anthracyclines sont des intercalants très efficaces. De nombreuses études ont montré que l'intercalation de la daunorubicine dans un plasmide bactérien induit un changement des valeurs de surenroulement de négatif à positif en introduisant un déroulement de 8° par paire de bases dans la double hélice d'ADN [36] (Quigley *et al.*, 1980). La formation de complexes de clivage est réalisable dans une gamme de concentration en anthracyclines allant jusqu'à $10\mu\text{M}$, au-delà de cette concentration l'intercalation interfère avec la formation de complexes ternaires (Alonso-Sarduy *et al.*; Pommier *et al.*, 1984; Tewey *et al.*, 1984a). De plus, contrairement à l'étoposide, les anthracyclines nécessitent une adénine en position -1 du site de clivage, ce qui limite le nombre de sites génomiques potentiellement visés par ces molécules (Capranico *et al.*, 1990). Les anthracyclines sont cardiotoxiques. Jusqu'à récemment cet effet était attribué à la génération d'intermédiaires oxygénés réactifs. Cependant une étude récente semble lier la cardiotoxicité aux effets de l'inhibition de l'isoforme β nucléaire et mitochondrial (Low *et al.*, 2003; Zhang *et al.*). En effet les cardiomyocytes ne possèdent que l'isoforme β qui est également une cible des anthracyclines. Comme décrit précédemment l'isoforme β est impliquée dans la régulation de la transcription de certains types de gènes. L'hypothèse la plus probable serait que

INTRODUCTION

l'inhibition de cette isoforme β entraînerait une mort cellulaire liée à des défauts de transcription de nombreux facteurs (Zhang et al., 2012).

VI. Mon projet de thèse

Mon projet de thèse s'articule autour de la caractérisation fonctionnelle et structurale des isoformes de la HsTop2 et plus particulièrement l'isoforme α .

Dans un premier temps nous avons voulu optimiser les protocoles, la production et la purification des 2 isoformes dont les protocoles utilisés par la communauté scientifique datent des années 1990. Nous avons également voulu savoir si l'expression de ces enzymes en cellules de mammifère ne serait pas plus adaptée pour ces protéines de grandes tailles avec de multiples sites de modifications post-traductionnelles. Nous avons comparé les caractéristiques fonctionnelles de l'isoforme α que nous produisons à celles déjà publiées afin de valider nos protocoles de production, de purification et l'expression en cellules de mammifères. Enfin, les HsTop2 étant soumises à de nombreuses modifications post traductionnelles nous avons voulu connaître l'état de modifications des enzymes que nous produisons en particulier les phosphorylations et les acétylations. Ce travail comprenant l'ensemble des résultats obtenus ainsi que les conclusions et discussions qui en découlent, seront exposés dans la première partie du manuscrit. Les HsTop2 sont *a priori* les principales cibles moléculaires des familles de molécules thérapeutiques utilisées en chimiothérapie des cancers telles que l'étoposide et la doxorubicine. Cependant l'ensemble des cibles moléculaires de ces molécules thérapeutiques et les complexes associés aux Top2 lorsqu'ils sont visés par ces composés sont encore mal connus. Nous avons cherché à déconvoluer les cibles moléculaires de l'étoposide et de la doxorubicine par des protocoles de protéomique chimique. Ces résultats ainsi que les discussions et conclusions qui en découlent seront présentés dans la deuxième partie du manuscrit.

Pour finir, de nombreuses structures cristallographiques des domaines isolés des Top2 sont disponibles à l'heure actuelle. Ces structures ont contribué à comprendre les mécanismes fonctionnels propres à chaque sous-domaine. Cependant l'agencement des différents domaines au cours du cycle catalytique de l'enzyme nécessite une vue globale de l'architecture de ces enzymes, en particulier l'architecture des HsTop2 dans un complexe fonctionnel en présence d'ADN et de molécules thérapeutiques. Nous avons donc décidé d'entamer une étude structurale en Cryo-microscopie électronique. Les résultats de ce travail ainsi que les conclusions et discussions qui en découlent seront présentés dans la troisième partie du manuscrit.

INTRODUCTION

Ce travail a été entamé avec pour objectif premier d'apporter de nouveaux éléments d'une part purement techniques pour la production des ces enzymes, d'autre part fonctionnels avec la caractérisation des modifications post-traductionnelles et enfin structuraux avec l'objectif de caractériser la conformation d'une HsTop2 **entière** dans un complexe fonctionnel ciblé par un composé thérapeutique, l'étoposide.

RÉSULTATS

I. Production, purification et analyses fonctionnelles des isoformes

A. Production

1. Historique de la production et de la purification des top2 eucaryotes.

Les premières purifications des Top2 eucaryotes ont été réalisées dans les années 80. Liu *et al.* en 1979 ont découvert l'ADN topoisomérase II du phage T4 lors la reconstitution *in vitro* de la machinerie de réplication du phage T4 (Liu et al., 1979). En 1980, Baldi *et al.* ont purifié l'ADN Top2 à partir de vésicules germinales de *Xenopus laevis* et Hsieh *et al.* à partir d'extrait d'embryons de *Drosophila melanogaster* (Baldi et al., 1980) (Hsieh and Brutlag, 1980). En 1984 Goto *et al.* ont été les premiers à publier un travail de surexpression et de purification de Top2 eucaryote, celle de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTop2) (Goto and Wang, 1984). Le gène entier a été reconstitué et cloné dans un plasmide d'expression procaryote pIIE101, puis l'enzyme recombinante surexprimée dans *E.coli* (souche E7074). Cependant la difficulté des protocoles et les faibles quantités d'enzymes pures obtenues ont rendu nécessaire le changement de système d'expression. En 1988, Giaever *et al.* ont développé un plasmide d'expression spécifique à *S.cerevisiae* (YEpTOP2-pGAL1) contenant le gène entier de ScTop2 (Giaever et al., 1988). Ce plasmide a été utilisé par Worland *et al.* en 1989, pour le développement de protocoles de surexpression et de purification adaptés à l'étude des Top2 (Worland and Wang, 1989). À partir de quelques litres de cultures de *S.cerevisiae* suivi d'une purification classique, ce plasmide a permis d'obtenir plusieurs milligrammes de ScTop2 rendant ainsi les tests fonctionnels et les études structurales sur les Top2 eucaryotes réalisables.

La première purification de la Top2 humaine (HsTop2) a été réalisée à partir de noyaux de cellules HeLa (Miller et al., 1981). Mais à ce moment-là, on ne connaissait pas encore l'existence des deux isoformes, celles-ci ont été découvertes par deux groupes différents dans les années 90 (Austin and Fisher, 1990; Chung et al., 1989). Le gène, désigné quelque années plus tard comme l'isoforme α , a été reconstitué en 1988 (Tsai-Pflugfelder et al., 1988). Il fut cloné dans le plasmide YEpWob6 issu de la combinaison des plasmides contenant le gène entier, sous forme d'ADNc (pBS-hTOP2) et des éléments permettant la surexpression dans *S.cerevisiae* (YEpTOP2-pGAL1) (Wasserman et al., 1993). Le plasmide

RÉSULTATS : Partie I

d'expression YEphTOP2 β contenant le gène de l'isoforme β , reconstitué en 1990, est une combinaison de fragments d'ADNc du gène de Top2 β et des éléments de surexpression du plasmide pYEPWob6 (Figure 19). Les protocoles de production et de purification de ScTop2 ont été appliqués aux deux isoformes humaines. Ceci a permis d'obtenir suffisamment d'enzyme pure pour des études aussi bien fonctionnelles des protéines recombinantes humaines, que structurales de leurs domaines catalytiques (Austin et al., 1995; Wasserman et al., 1993).

RÉSULTATS : Partie I

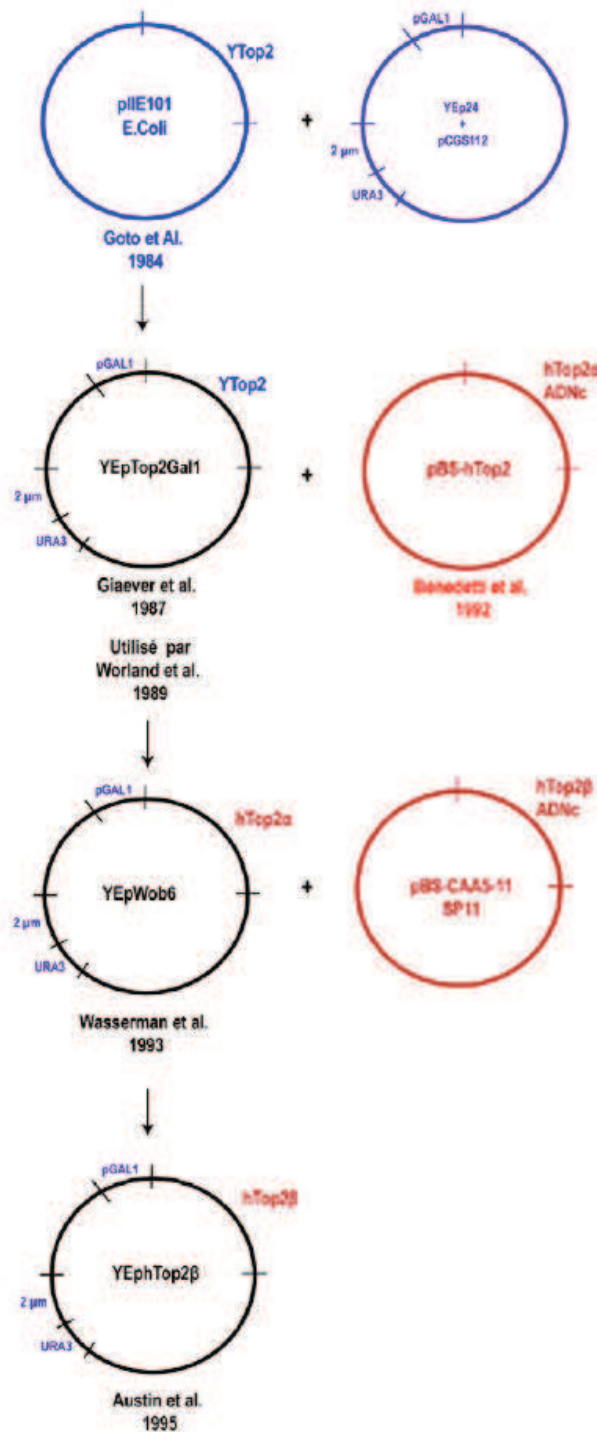


Figure 19 Historique de la construction des plasmides utilisés pour l'expression des Top2 eucaryotes. En bleu le premier plasmide d'expression dans *E. coli* de la Top2 de *S. cerevisiae* (ScTop2) En violet YEp24, un plasmide standard d'expression dans *S. cerevisiae* qui a été utilisé pour la construction du premier plasmide de surexpression de la ScTop2, YepTop2Gal1. Les éléments apportés par le plasmide YEp24 sont représentés en violet dans les constructions suivantes. En rouge les plasmides utilisés pour la reconstitution des gènes des isoformes des HsTop2 à partir d'ADNc (ADN complémentaire)

2. Le système d'expression dans *S.cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est aussi connue sous le nom de « levure de bière » ou « levure de boulanger ». Son rôle majeur dans l'industrie agroalimentaire a été le moteur de recherche intensive sur cet organisme et a permis une connaissance approfondie de cet organisme. Très utilisée pour l'expression des protéines eucaryotes recombinantes, elle offre de nombreux avantages : (i) C'est un organisme eucaryote unicellulaire apportant de nombreuses modifications post-traductionnelles dont la plupart sont proches de l'homme ; (ii) La culture des cellules est simple à réaliser car on utilise le même matériel que pour les cultures bactériennes ; (iii) Les coûts de production sont abordables ; (iv) Les levures possèdent un temps de génération court; (v) C'est le premier organisme eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé (1996) ce qui a permis une étude génétique intensive. À l'heure actuelle, la génétique et la biologie moléculaire de cet organisme sont largement utilisées comme outils d'investigation dans les laboratoires de recherche (Bergman, 2001; Sherman, 2002).

3. Optimisation des vecteurs d'expression et du protocole de surexpression en levure.

i. Clonage du gène entier des HsTop2 dans le vecteur d'expression pYES2.1

Les gènes des deux isoformes ont été clonés dans des vecteurs d'expression issus de la combinaison de plusieurs plasmides (ci-dessus paragraphe 1) qui nous ont été gracieusement fournis par Caroline Austin (*Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School University of Newcastle, UK*) (Austin et al., 1995; Worland and Wang, 1989). Les isoformes avec lesquels nous travaillons sont des chimères entre les Top2 humaines et la Top2 de levure *S.cerevisiae* (ScTop2). Pour des raisons de compatibilité des sites d'enzymes de restriction, lors de la construction de ces plasmides, les 5 premiers codons de ScTop2 ont été fusionnés au 28^{ème} codon du gène de l'isoforme α et au 46^{ème} codon du gène de l'isoforme β . Il a été montré que malgré les extrémités N-terminales tronquées, les enzymes recombinantes conservent leurs activités *in vivo* et *in vitro* (Austin et al., 1995; Wasserman et al., 1993). Avant mon arrivée dans le laboratoire, une étiquette 10 histidines précédées du site de coupure de la PPX (PreScission protease) a été ajoutée aux constructions en C-terminal des enzymes produites (Figure 20). L'expérience du laboratoire sur les protéines de grandes tailles nous a montré qu'une étiquette de 10 histidines

RÉSULTATS : Partie I

permettrait une rétention plus efficace des protéines sur la colonne d'affinité au nickel, lors de la purification.

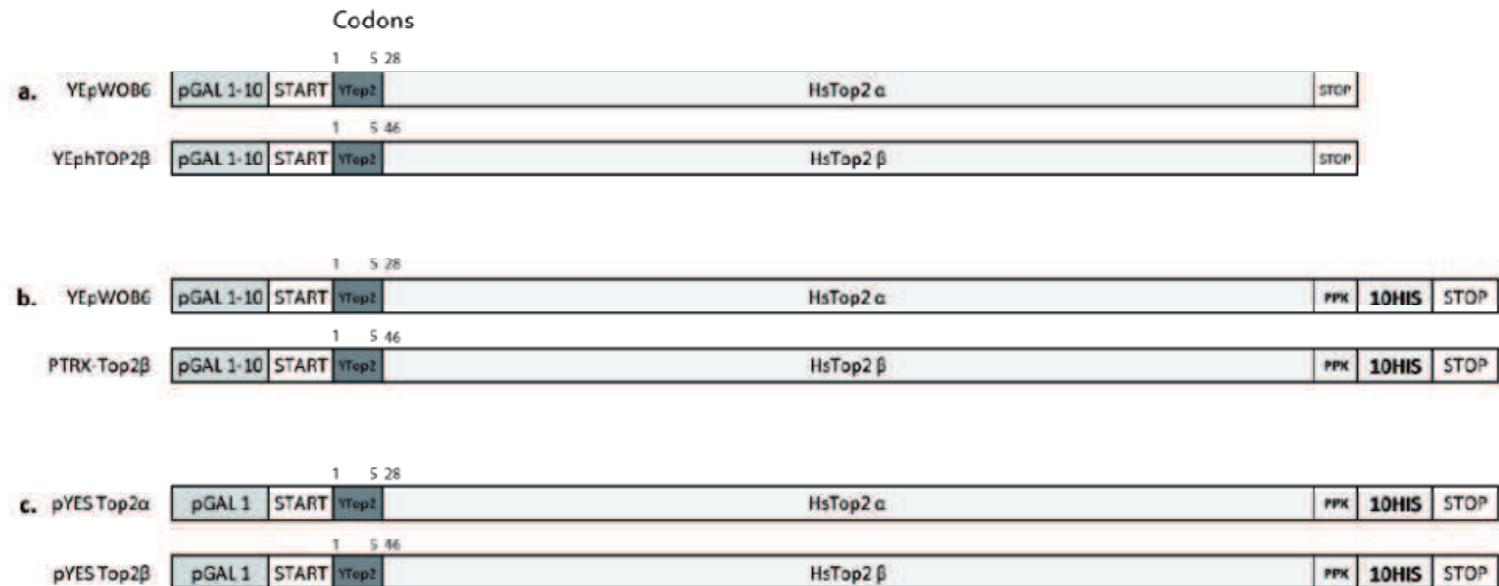


Figure 20 Construction des gènes chimères des isoformes des Hstop2 avec les éléments de régulation **a.** Construction d'origine de l'isoforme α par Wassermann et al. en 1993 et l'isoforme β par Austin et al. en 1995. **b.** Ajout des étiquettes 10 histidines précédées par un site de coupure à la PPX (PreScission protease) sur les constructions d'origines. **c.** Transfert des constructions intactes dans le plasmide pYES2.1

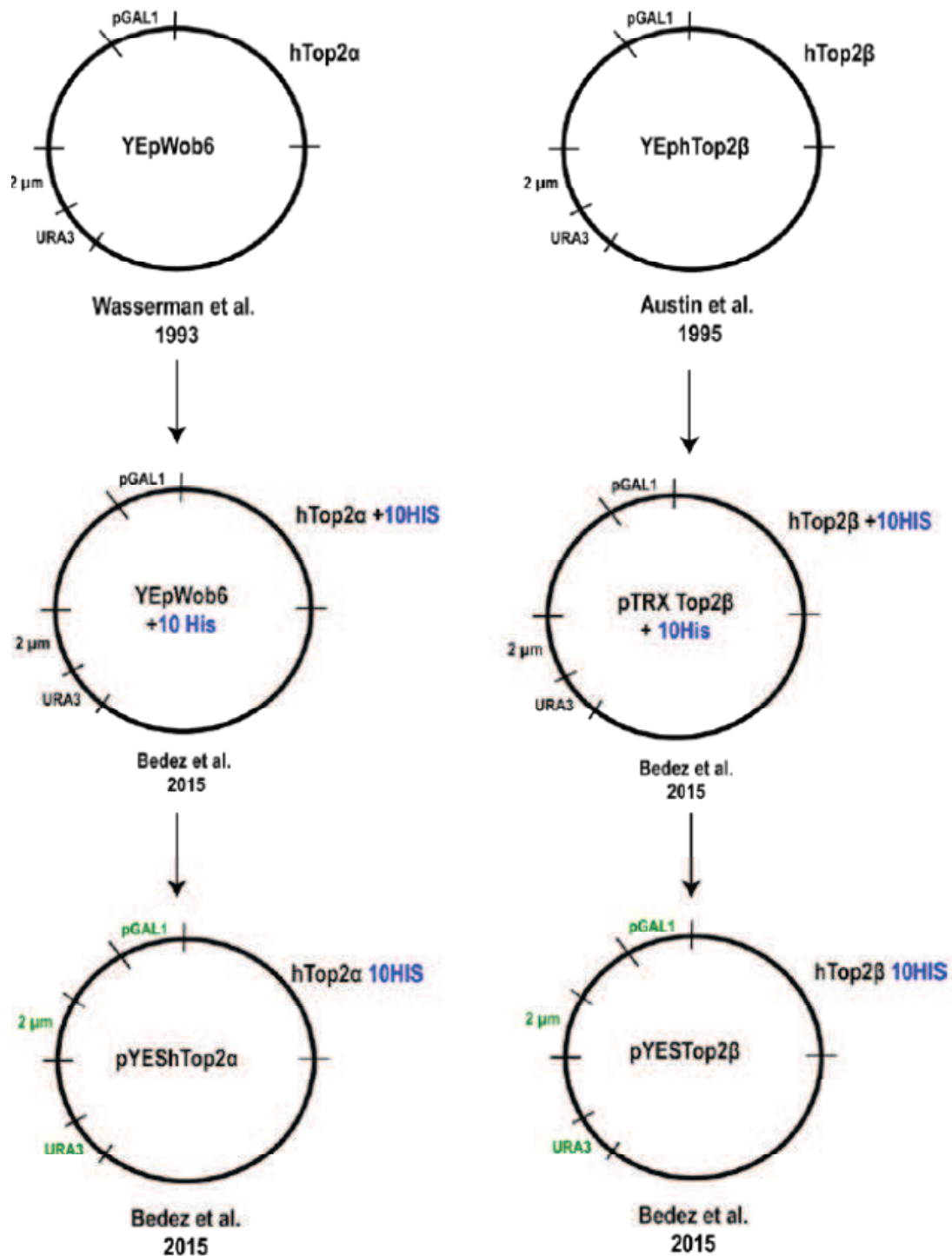


Figure 21 Plasmides d'expression des isoformes de HsTop2 dans *S.cerevisiae*, construites par l'équipe. En bleu l'étiquette polyhistidines ajoutée en C-terminal de l'enzyme. En vert les éléments du plasmide pYES2.1 (Invitrogen).

Afin de s’émanciper des origines multiples des plasmides et de faciliter les clonages de ces gènes à l’avenir, nous avons introduit les gènes entiers dans le vecteur pYES2.1 (Invitrogen™) spécialement conçu pour faciliter l’insertion de gène (Ligation Topo TA) et la surexpression des protéines recombinantes dans la levure (promoteur pGAL1) (Figure 21). Nous avons conservé les constructions originales des gènes avec les 5 premiers codons de ScTop2, le site de coupure à la PPX et l’étiquette 10 histidines en C-terminal. Les gènes ont été amplifiés par PCR avec des extrémités franches, aucun site de restriction n’a été introduit car la méthode Topo TA s’affranchit des étapes de restriction/ligation classiques (Zhou and Gomez-Sanchez, 2000). Aux produits PCR ont été ajoutées des adénines aux extrémités 3’ par incubation avec de la Taq polymérase (matériels et méthodes). L’amplification a été réalisée de sorte que la complémentation des extrémités A en 3’ cohésives du produit PCR avec l’extrémité T en 5’ sortante du plasmide linéarisé permette la reconstruction du codon « start » du gène. Le codon stop a été conservé après l’étiquette 10 histidines (Figure 22).

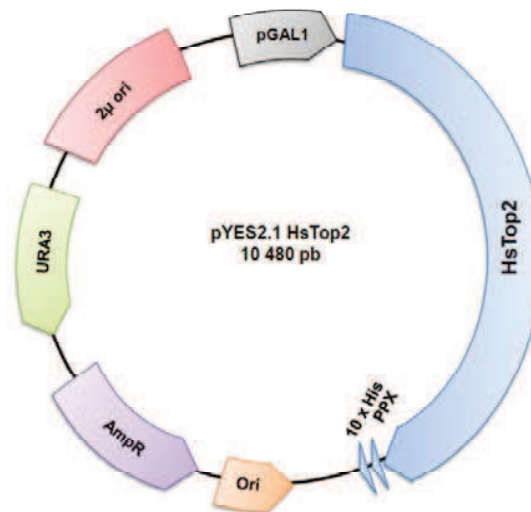


Figure 22 Carte du plasmide pYES2.1-HsTop2. Les éléments spécifiques aux levures : 2μ ori est l’origine de réplication des plasmides de levures (rouge). Le gène URA3 est un marqueur de sélection d’auxotrophie pour l’uracile (vert), le promoteur GAL1 est inductible au galactose (gris). Les éléments bactériens : ori, l’origine de réplication bactérienne pour son amplification (orange), AmpR le gène de résistance à l’ampicilline (violet).

ii. Optimisation du protocole de culture

Les transformations des plasmides dans les cellules *S.cerevisiae* ont été réalisées par choc thermique avec la méthode LiAc/ssDNA carrier/PEG (Matériels et Méthodes). Dans un premier temps, comme décrit dans les articles de références (Austin et al., 1995; Worland and Wang, 1989), le plasmide pTRX-hTOP2 β (isoforme β) a été transformé dans la souche Jel1 Δ Top1 (Knab et al., 1993; Lindsley and Wang, 1991) et le plasmide YepWOB6 (isoforme α) dans la souche BCY123. Les deux souches sont déficientes en protéases et auxotrophes pour l'uracile (*ura3*). Par la suite, nous avons utilisé la souche Jel1 Δ Top1 pour les deux isoformes car BCY123, s'est révélée moins efficace lors de la surexpression.

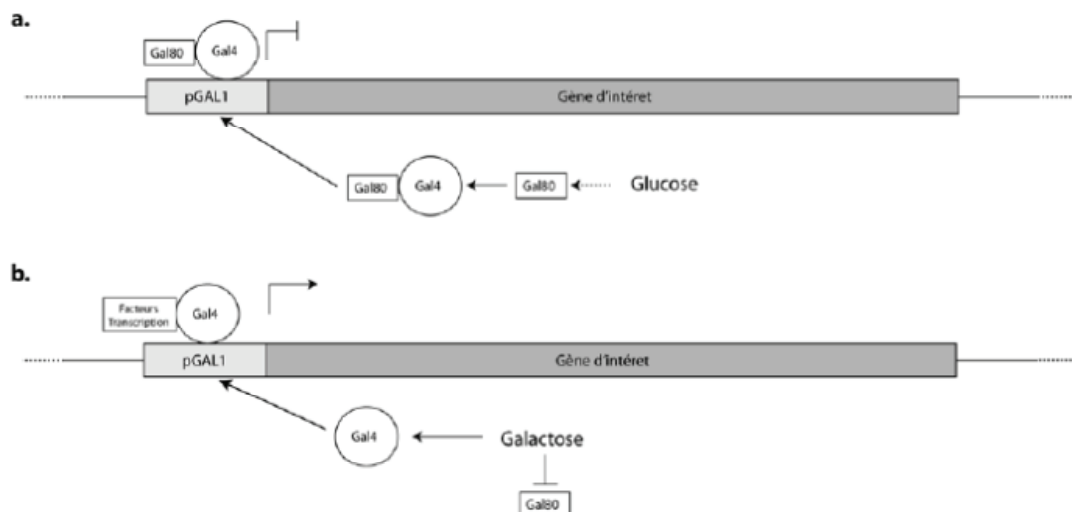


Figure 23 Régulation de l'expression des gènes par le promoteur pGAL. Les protéines Gal4 et Gal80 sont des protéines de régulation. Gal4 est un activateur et Gal80 un inhibiteur de la transcription. **a.** Dans un milieu sans galactose et avec glucose la protéine Gal4 est inhibée par interaction avec le répresseur Gal80 **b.** En présence de galactose la protéine Gal80 est inhibée par interaction avec Gal3 (non représentée sur le schéma). La protéine Gal4 active la transcription par le recrutement de co-activateurs et de facteurs généraux de la machinerie de transcription (SAGA, TBP, Pol II).

La souche Jel1 Δ Top1, dérivée de la souche JEL1, est déficiente en Top1 ce qui ralentit sa croissance (temps de génération de 90 minutes au lieu de 40 minutes). Elle a été utilisée dans des études de mutants des Top1 et l'étude de la camptothécine, un inhibiteur des Top1 (Knab et al., 1993). Les cellules transformées sont mises en culture dans un milieu minimum sans uracile contenant 2% de glucose, 2% de glycérol et 2% d'acide lactique. En phase de croissance logarithmique tardive environ 24h après l'inoculation, l'ajout de 2% de galactose

RÉSULTATS : Partie I

dans le milieu de culture va induire l'expression du gène sous la dépendance de pGAL1 (Figure 23) (Austin et al., 1995; Wasserman et al., 1993). Ce protocole nécessite deux étapes de préculture de 24h avant l'inoculation et il s'étale sur 8 jours. Au moment de changer de vecteur d'expression, nous avons modifié le protocole de surexpression. Nous avons créé un protocole de 5 jours avec une seule préculture qui est réalisée dans un milieu minimum sans uracile contenant 2% de glucose jusqu'à ce que les cellules soient en phase logarithmique tardive favorable à l'induction. Puis elles sont inoculées et la surexpression est induite au même moment dans un milieu de croissance minimum sans uracile contenant 2% de raffinose et 2% de galactose. Le temps d'induction a été allongé de 16 à 24 heures sans impacter la qualité des enzymes produites (Figure 24). Les gels d'induction montrent un enrichissement protéique équivalent pour les deux protocoles et les deux vecteurs d'expressions (Figure 24).

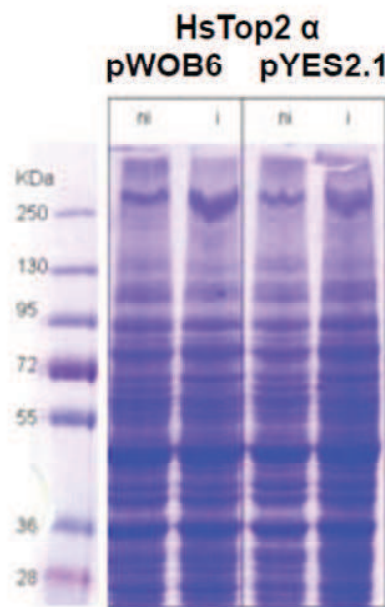


Figure 24 Gel d'induction de l'isoforme α produite à partir des plasmides pWOB6 (milieu Acide lactique / Glycérol) et pYES2.1 (milieu Raffinose). ni = cellules non induites, i= cellules induites. Le léger décalage des poids moléculaires élevés vers le haut, par rapport au marqueur de poids moléculaire, peut être imputé au dépôt d'extraits totaux, très riche en protéines et acides nucléiques.

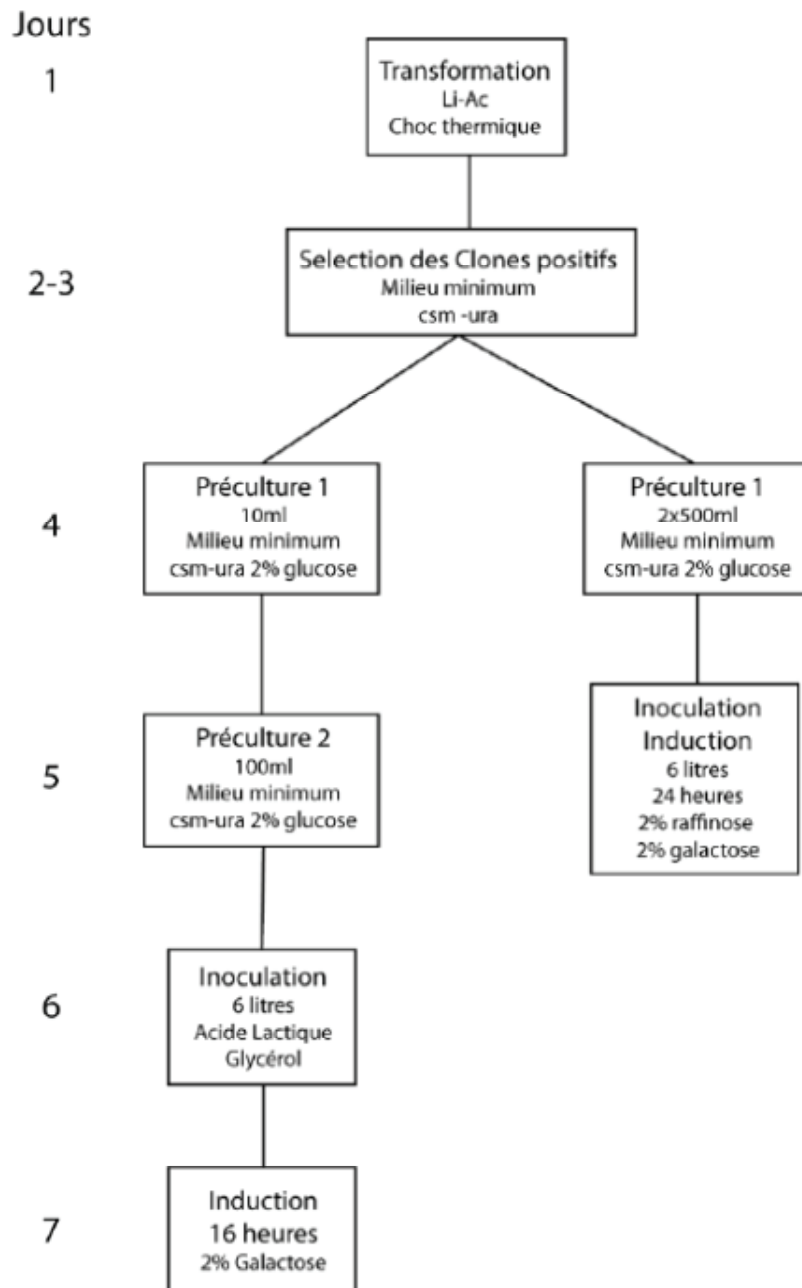


Figure 25 Optimisation du protocole de production des isoformes de HsTop2. À gauche la culture sur 7 jours dans un milieu Acide lactique/Glycérol. L'induction est déclenchée le 6^{ème} jour après 24 heures de culture. À droite le protocole de culture optimisé en milieu raffinose, les étapes d'inoculation et d'induction se font au même moment le 5^{ème} jour.

4. Expression des isoformes dans les cellules BHK21 infectées par un virus de la vaccine recombinant

Les HsTop2 sont des protéines de grande taille avec de nombreux sites de modifications post-traductionnelles (Austin and Marsh, 1998; Nitiss, 2009a; Vos et al., 2011; Wells et al., 1995; Wells and Hickson, 1995). Nous avons voulu nous rapprocher des cellules eucaryotes supérieures en surexprimant les deux isoformes dans des cellules de mammifère BHK21 (Baby Hamster Kidney fibroblast). Pour cela, Le virus de la vaccine modifié (MVA) a été utilisé comme vecteur d'expression pour surexprimer les deux isoformes. Le génome du virus de la vaccine (VAVC) est utilisé depuis plus de 20 ans pour surexprimer des protéines recombinantes en cellules de mammifères. Comme tous les membres de la famille des Poxviridae, le VAVC, réplique son génome dans le cytoplasme des cellules infectées (Alexander et al., 1992). La souche du VAVC modifié, MVA (Ankara virus modifié), est non pathogène, elle a été optimisée pour surexprimer de manière efficace des protéines recombinantes (Hebben et al., 2007). Tous les éléments permettant cette surexpression sont intégrés dans le génome du virus. Après infection des cellules et réplication du génome viral, l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture lève la répression due à la fixation de la protéine codée par lacI sur l'opérateur lacO placé en amont du gène codant la T7 ARN polymérase (T7pol) ainsi que du gène codant la topoisomérase. Ce double contrôle permet d'isoler des virus renfermant les gènes des isoformes de la topoisomérase sans que leur expression ait lieu avant le moment choisi (Figure 26)

RÉSULTATS : Partie I

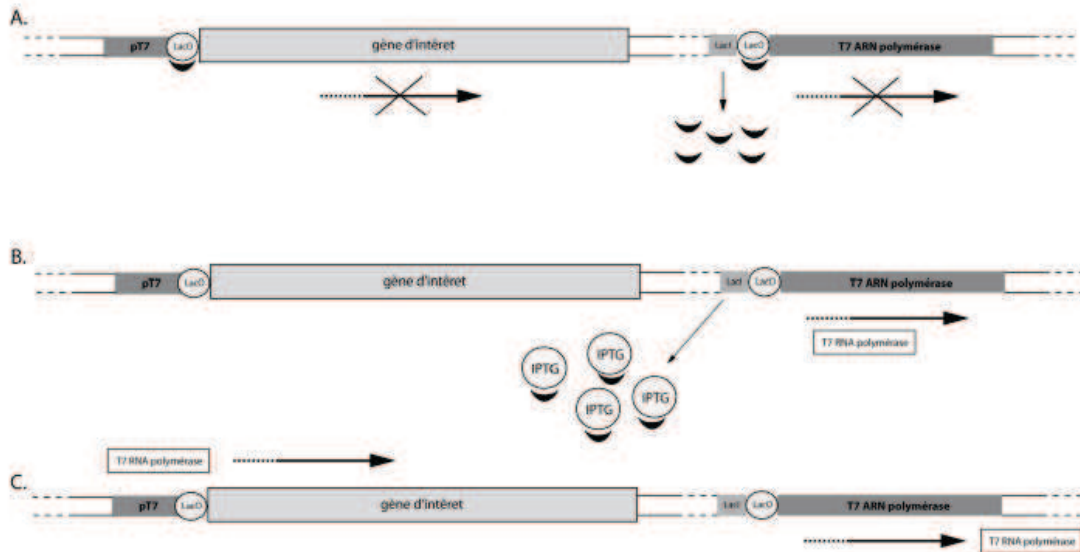


Figure 26 Principe de la surexpression dans les cellules BHK21 infectées par le virus MVA recombinant. A. La protéine Lac I réprime la transcription du gène T7 ARN polymérase (T7 pol) par fixation à la séquence LacO. B. L'ajout d'IPTG entraîne une fixation du répresseur, permettant l'activation de la transcription de la T7 pol. C. La T7 pol transcrit le gène d'intérêt sous la dépendance du promoteur T7.

i. Tests d'expression transitoire

Les premiers tests d'expression transitoire ont été réalisés par infection des cellules BHK21 avec les virus MVA puis transfection des cellules avec le plasmide pYES2.1. Ce plasmide contient un promoteur pT7 permettant la transcription des gènes des isoformes. Les deux isoformes ont été surexprimées avec succès (Figure 27). Nous avons donc entrepris d'intégrer les gènes dans le génome du virus.

RÉSULTATS : Partie I

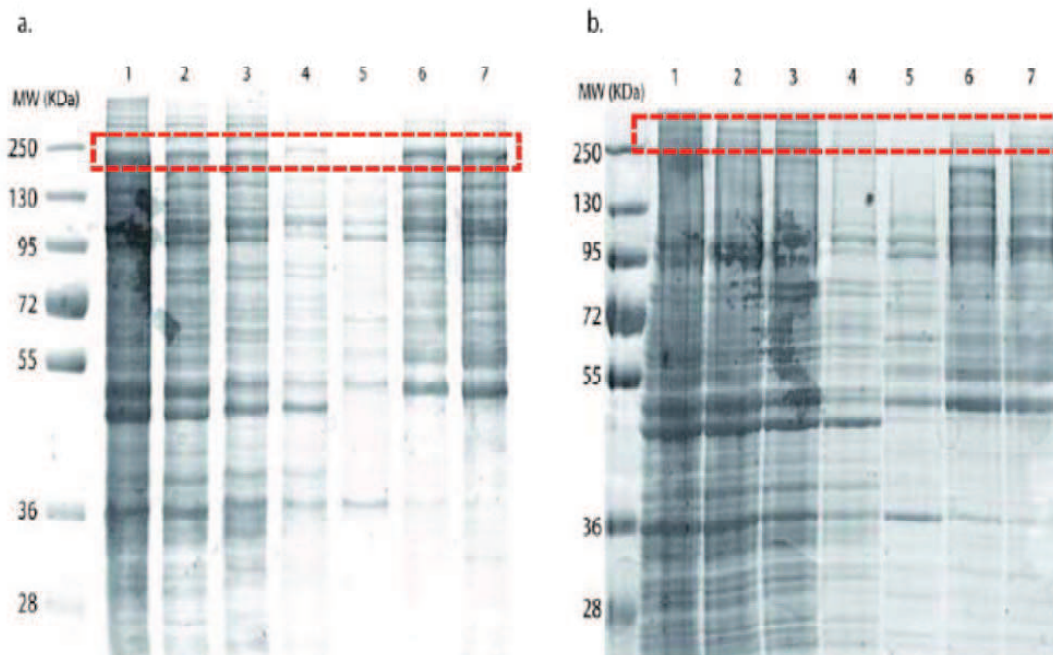


Figure 27 Gels d'expression transitoire des isoformes α (a.) et β (b.) dans les cellules BHK21 infectées par le virus MVA. La purification a été réalisée en une seule étape (Billes Ni-NTA) sur un petit volume de cellules. 1 : Extrait total 2 : Extrait soluble 3 : Protéines non retenues sur les billes d'affinité au nickel. La protéine produite possède une étiquette 10 histidines en C-terminal. 4 : Premier lavage des billes sans imidazole 5 : Deuxième lavage à 5mM d'imidazole, 6 : dépôt d'une fraction des billes Ni-NTA et 7 : Éluion à 250 mM imidazole.

ii. Intégration du gène dans le génome du virus

L'intégration des gènes dans le génome du virus MVA est réalisée en plusieurs étapes : (i) le clonage des gènes dans un plasmide permettant la recombinaison homologue dans le génome de MVA, (ii) La sélection et la purification des virus recombinants via l'infection de cellules BHK21.

Les gènes des deux isoformes ont été traités de la même manière. Le clonage des gènes dans le plasmide d'expression pVOTE-VV a été réalisé par recombinaison Gateway (Hartley et al., 2000; Katzen, 2007). La technologie Gateway® (LifeTechnologie) est basée sur le système de recombinaison site-spécifique du bactériophage Lambda qui permet l'intégration de ses chromosomes dans le génome de *E.coli*. Après amplification PCR des gènes entiers à partir des plasmides pYES, le clonage dans le vecteur pENTR (plasmide d'entrée) entre les séquences de recombinaison attL (att = « attachement sites » pour les protéines de recombinaison) a été réalisé par LIC (Ligase Independent Cloning). Les gènes

RÉSULTATS : Partie I

ont ensuite été intégrés au vecteur pVOTE (Vaccinia Virus/ Lac Operon / T7 RNA polymerase / EMC) qui est un plasmide de DESTination (pDEST) par recombinaison Gateway® pour donner le vecteur d'expression pVE-VVoTop2 (Figure 28) (Ward et al., 1995). Le vecteur pVOTE-VV contient les séquences de recombinaison VV du virus de la vaccine (Vaccinia Virus), qui appartiennent au gène non essentiel de l'hémagglutinine (HA). Dans un troisième temps le vecteur pVE-VVoTop2 est utilisé pour intégrer les gènes d'intérêts dans le génome du virus MVA par recombinaison homologue (Carroll and Moss, 1997; Hebben et al., 2007) (Matériels et Méthodes).

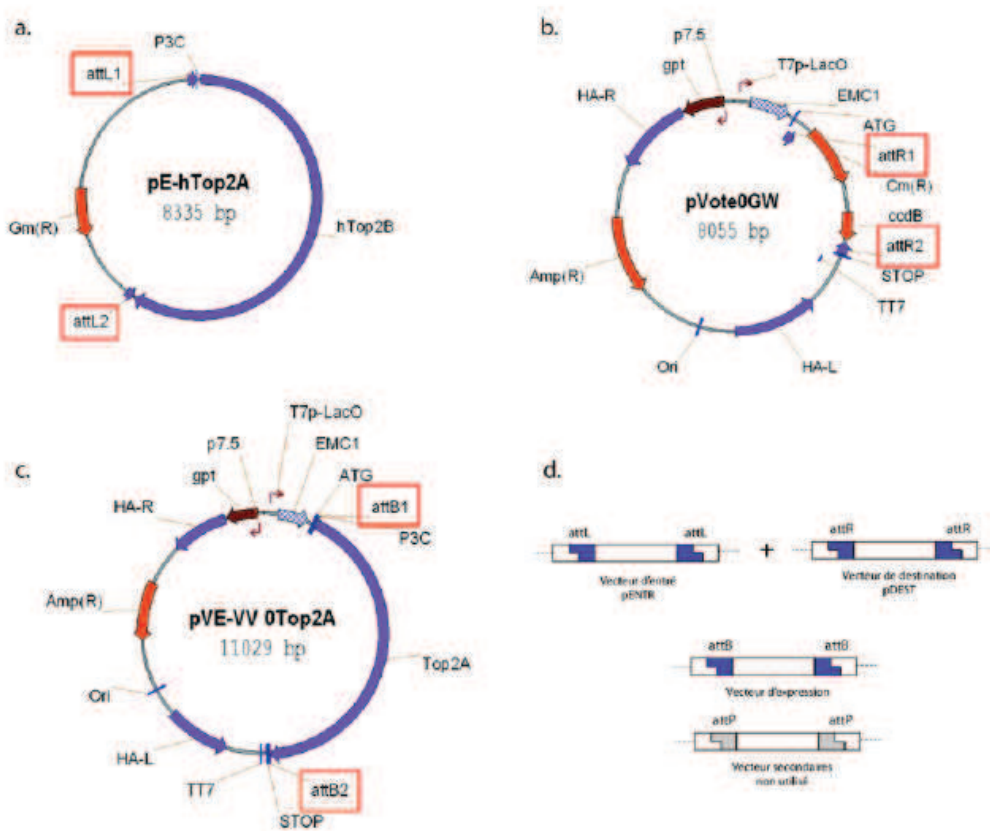


Figure 28 Construction du plasmide d'intégration des HsTop2 dans le génome de MVA. a. Plasmide pEntre attL = séquence de recombinaison. b. pVOTE est le plasmide de destination pDEST attR = séquence de recombinaison c. Plasmide d'expression avec les cassettes (HA) qui permettent la recombinaison dans le génome de MVA gp1 = marqueur de sélection à l'acide mycophénolique. d. Principe de la recombinaison Gateway®.

RÉSULTATS : Partie I

Les cellules BHK21 sont infectées avec le virus MVA puis transfectées avec pVE-VVoTop2, permettant ainsi la recombinaison homologue entre le plasmide et le génome des virus au niveau des séquences HA. L'acide mycophénolique permet uniquement la réplication des virus qui ont intégré la cassette contenant le gène d'intérêt et le gène de résistance gpt, c'est-à-dire les constructions (PVOTE-VV) issues d'une recombinaison Gateway qui ont correctement été recombinées. Cette première sélection permet de récupérer une majorité de virus recombinant.

Afin d'obtenir une souche de virus recombinant pure, une sélection négative à la coumermycine est réalisée. La coumermycine inhibe la réplication virale (White et al.). En effet la PKR (ds RNA dependent protein kinase) est une protéine qui inhibe la réplication virale. Elle est fusionnée à la gyrB qui, en présence de coumermycine, active la formation du dimère fonctionnel de PKR. Lorsque la recombinaison homologue dans le génome viral se passe comme prévu, le gène gyrB-PKR et la protéine mCherry sont remplacés par la cassette contenant le gène d'intérêt. Cette sélection supplémentaire permet de distinguer les virus vides (non recombinants) qui expriment de la fluorescence rouge (mCherry) et de préserver les virus recombinants qui expriment la GFP (Green Fluorescent Protein). Après plusieurs séries de sélection, un stock de virus recombinant purifié est généré (Figure 29).

RÉSULTATS : Partie I

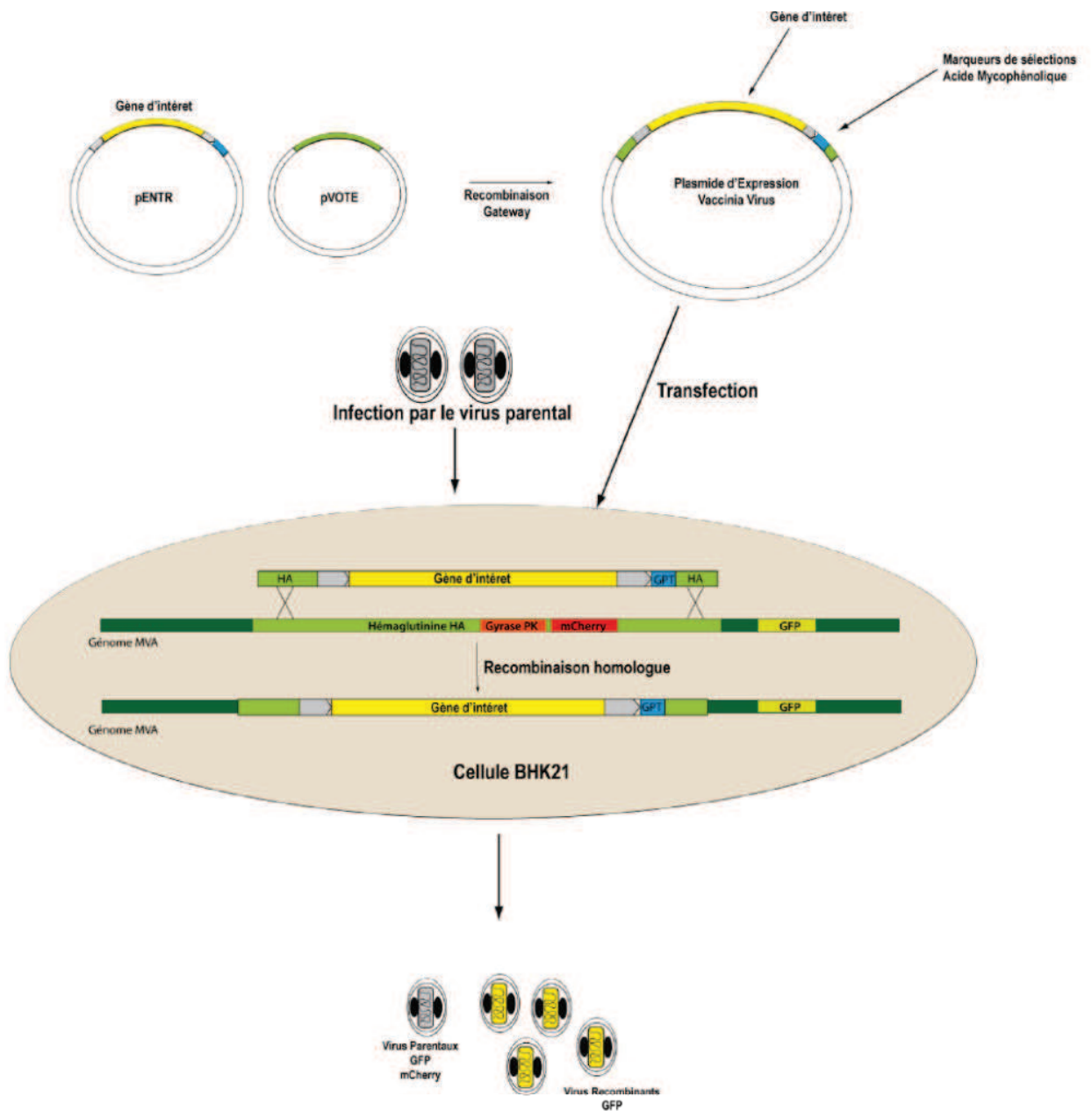


Figure 29 Principe de l'Insertion d'un gène d'intérêt dans le génome de MVA. Les plasmides pENTRE et pVOTE permettent la création d'un vecteur d'expression par recombinaison Gateway. Puis la transfection du vecteur et l'infection des cellules BHK21 par les virus MVA entraînent la recombinaison homologue au niveau du gène de l'hémagglutinine dans le génome viral. Les virus recombinants sont ensuite séparés des virus parentaux et amplifiés par une double sélection.

iii. Surexpression des isoformes.

Les virus contenant les gènes des isoformes ont finalement été utilisés pour surexprimer les enzymes. 4,5 à 10 litres de milieu de culture sont inoculés avec une préculture de cellules infectées par le virus recombinant. L'induction sur 24 heures est déclenchée au moment de l'inoculation par ajout d'IPTG (Figure 30).

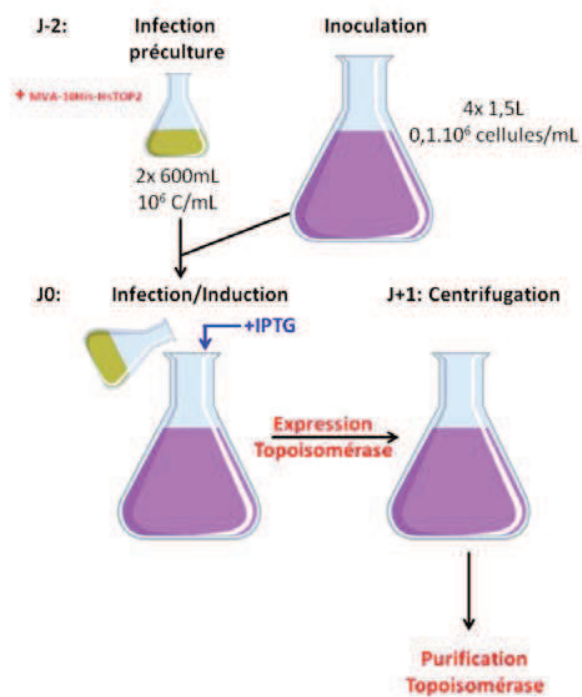


Figure 30 Surexpression des HsTop2 par infection de 6L cellules BHK21 avec les virus recombinants purifiés MVA-HsTop2. La culture est réalisée sur 5 jours et consiste à infecter les 4,5 litres de cellules BHK21 ($1 \cdot 10^6$ cellules/ml) déjà mis en culture avec une préculture infectée et à induire la surexpression simultanément avec de l'ajout d'IPTG dans le milieu.

B. Purification des isoformes α et β

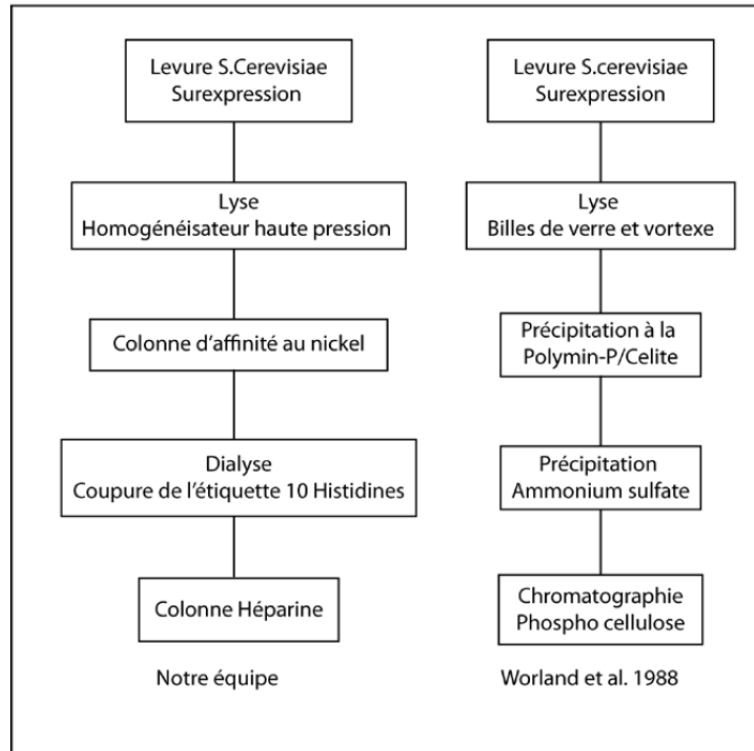
1. Optimisation de la lyse des cellules

La première étape de la purification d'enzymes recombinantes consiste à casser les cellules de manière efficace pour récupérer des protéines surexprimées. La technique utilisée pour la lyse dépend du type de cellules. Les levures possèdent une paroi épaisse qui entoure la membrane plasmique et la protège des agressions extérieures, contrairement aux cellules de mammifère. Le choc appliqué aux levures doit être suffisamment efficace pour casser cette barrière de protection. Nous avons tout d'abord utilisé une méthode de lyse mécanique avec des billes de verres de 0,5 mm de diamètre. Ces billes sont mélangées aux cellules et vigoureusement agitées. L'efficacité de ce système dépend du savoir-faire du manipulateur. Nous nous sommes donc orientés vers l'homogénéisateur FastPrep®-24 (MP Biomedical). Cet appareil permet de s'émanciper du biais introduit par l'utilisateur. Les tubes contenant les cellules et les billes sont soumis à une agitation mécanique par des mouvements elliptiques dont la vitesse est réglable. Il génère cependant une quantité non négligeable de mousse dans l'extrait cellulaire. Cette émulsion du lysat cellulaire est dénaturante pour les protéines. Nous avons finalement décidé d'utiliser l'Emusiflex® C3, un homogénéisateur haute pression (jusqu'à 6500 psi, 450 bar) dont l'efficacité de lyse est proche de 100% et qui génère très peu de mousse (Matériels et Méthodes).

2. La procédure de purification des isoformes

Les premières purifications des Top2 humaines ont été élaborées à partir de techniques disponibles dans les laboratoires de biochimie à cette époque. Le protocole mis au point par Worland *et al* en 1989 (Worland and Wang, 1989) est basé sur la précipitation des protéines de l'extrait cellulaire à la polymin-P puis à l'ammonium sulfate et finalement une chromatographie sur colonne phosphocellulose. Depuis, des techniques et outils pour faciliter la purification des protéines recombinantes ont été développés. Avant mon arrivée dans le laboratoire les protocoles de purification des Top2 humaines ont été optimisés. Une étiquette 10 histidines précédée par un site de coupure à la PPX (PreScission protease) a été ajoutée après les domaines C-terminaux des deux isoformes. Cette étiquette permet d'éliminer un grand nombre de contaminants lors de la première étape de purification par chromatographie d'affinité au nickel. La chromatographie d'affinité héparine, dont la matrice mime les charges de l'ADN, permet de se débarrasser de l'étiquette 10 histidines et de la PPX (PreScission protease), mais également d'éliminer des contaminants supplémentaires et de concentrer l'enzyme (Figure 31).

A.



B.

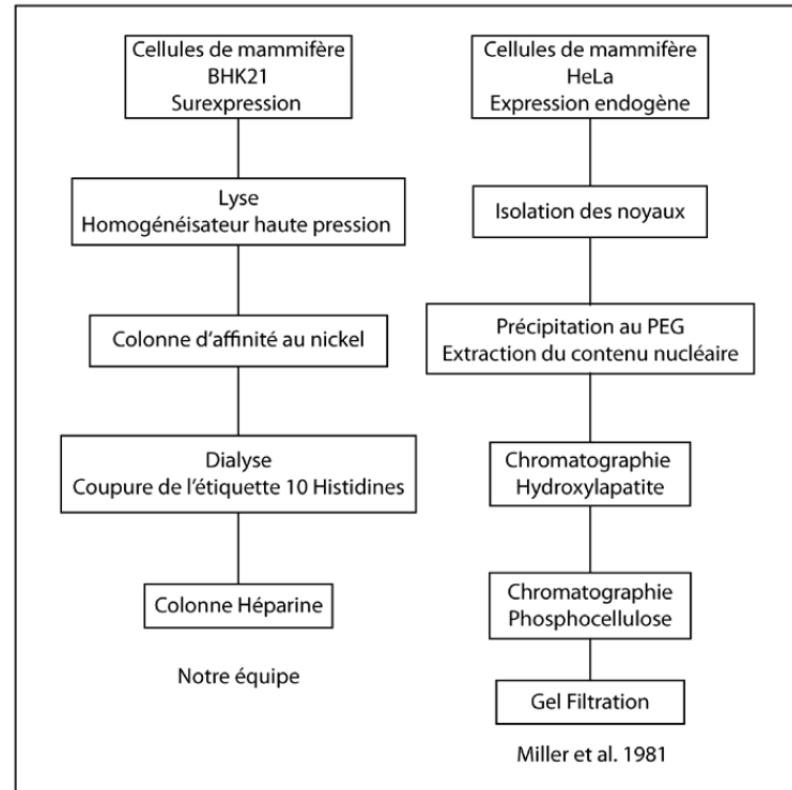


Figure 31 Étapes des différents protocoles de purification publiés et ceux mise au point par l'équipe. A. Protocoles de purification des protéines surexprimées dans *S.cerevisiae*. B. Protocoles de purification des protéines surexprimées ou endogènes en cellule de mammifère.

i. Purification de l'isoforme Top2 α à partir des cellules de *S.cerevisiae*.

Après lyse et centrifugation de l'extrait cellulaire total, une espèce protéique enrichie est visible dans la fraction soluble à la taille attendue pour l'isoforme α , 170KDa (Figure 33c). Le gel SDS PAGE et le chromatogramme à 280nm de la chromatographie au nickel, nous indiquent que la majorité des contaminants passent au travers de la colonne (Figure 33a. c.). Ceux fixés de manière aspécifique sont éliminés lors des lavages successifs. Le chromatogramme de la fraction éluée de l'héparine ne présente qu'un seul pic et le profil sur gel révèle une bande unique à 170KDa sans signe de dégradation (Figure 33b. d.). La colonne héparine permet de concentrer et limite les manipulations supplémentaires de la protéine. Nous avons tenté d'introduire une gel filtration après la première étape de purification, mais la protéine précipite et ne se concentre pas sur les membranes des concentrateurs. Lors de la deuxième étape de chromatographie, les fractions sur gel montrent des bandes fortement enrichies à 170KDa ainsi que quelques contaminants qui n'étaient pas visibles sur le premier gel. Un western blot avec un anticorps dirigé contre le domaine C-terminal a révélé la bande majoritaire confirmant ainsi que la protéine purifiée est bien l'isoforme α de HsTop2 et que celle-ci est intègre car aucune bande de dégradation n'a été révélée (Figure 32a.). À partir de 6 litres de culture nous obtenons entre 5 et 6 mg de protéine, soit 1 mg par litre de culture. Ce rendement est supérieur au rendement de la première purification publiée en 1993 par Wasserman *et al.* (Wasserman et al., 1993) qui était d'environ 0.35 mg par litre de culture.

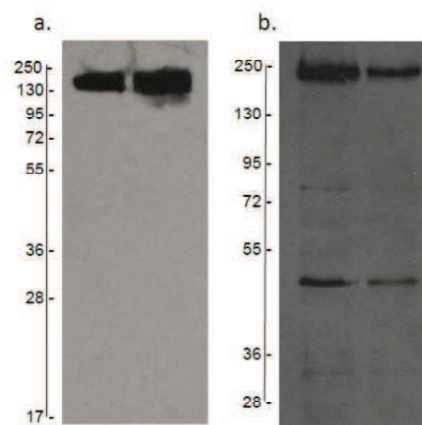


Figure 32 Western blot des isoformes de la HsTop2 recombinants purifiées. a. L'isoforme α b. L'isoforme β . Le marqueur de poids moléculaire est en KDa (échelle à gauche des

RÉSULTATS : Partie I

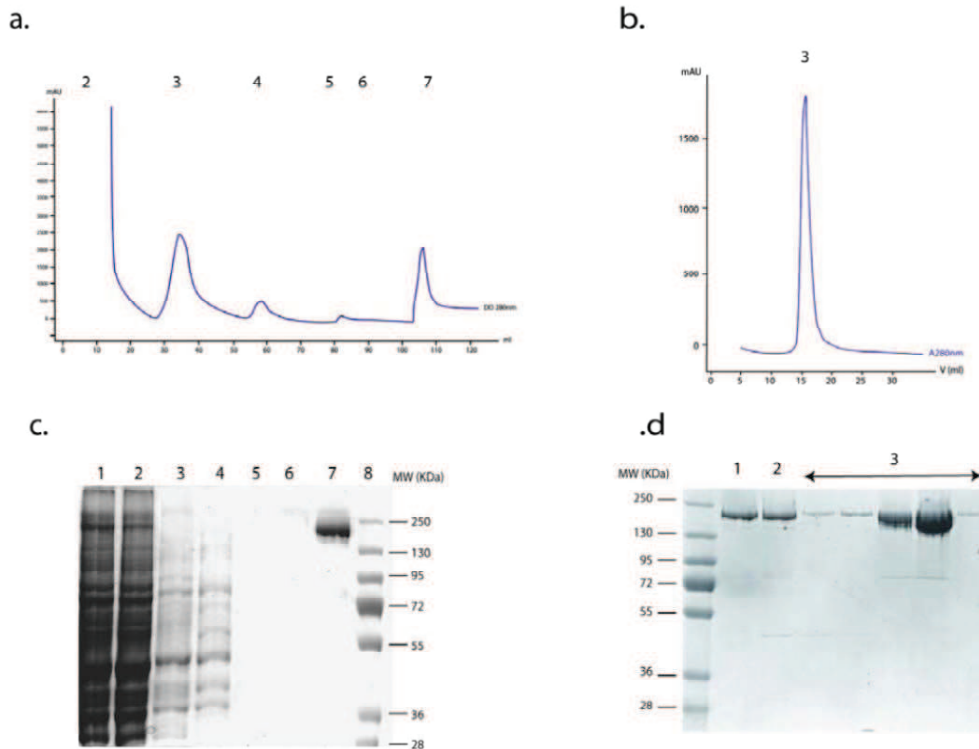


Figure 33 Chromatogramme et Gels SDS PAGE de la purification de l'isoforme α . a. Chromatogramme de la colonne d'affinité au nickel (OD 280nm). 2. charge de l'échantillon, 3-6 les lavages successifs à 20mM, 35mM et 60mM imidazole. 7, élution à 250 mM Imidazole. b. Le chromatogramme de la colonne héparine (OD 280nm). c. gel SDS PAGE dont les numéros des pistes correspondent aux fractions du chromatogramme auxquelles se rajoutent 1. L'extrait soluble et 8 le marqueur de poids moléculaire. d. le gel SDS PAGE correspondant au chromatogramme b. 1 protéine avant l'étape de dialyse et 2 : protéine après l'étape de la dialyse avant la charge sur la colonne héparine, 3 : Dépôts répartis sur l'ensemble du pic d'élution.

ii. **Purification de l'isoforme Top2 β à partir de cellules de *S.cerevisiae*.**

L'isoforme β est également produite de manière soluble. L'extrait soluble déposé sur gel SDS-PAGE montre une bande protéique faiblement enrichie à la taille attendue de 180 KDa. De nombreux contaminants passent à travers la colonne lors de la charge de l'extrait soluble et ceux accrochés de manière aspécifique sont éliminés lors du premier lavage. De plus l'élution révèle un enrichissement à la taille attendue pour l'isoforme β (180KDa) (Figure 34). Ce profil a été confirmé par western blot grâce à un anticorps anti-top2b dirigé contre le domaine C-terminal (Figure 32b.). Nous avons constaté que la dialyse et le passage sur colonne héparine conduisent dans la majorité des cas à une perte importante voir complète de l'enzyme recombinante. Nous avons donc décidé de limiter la manipulation en ne conservant que la première étape de la purification. Nous obtenons environ 2 mg pour 6 litres de culture (0,3 mg par litre). Les quantités obtenues sont équivalentes à celles obtenues par Austin *et al.* en 1995 entre 0,3 et 0,7 mg par litre de culture (Austin et al., 1995). De plus nous avons constaté à de nombreuses reprises que cette isoforme se dégrade rapidement. Cette dégradation est visible sur les westerns blots réalisés (Figure 32 b.) Malgré la grande ressemblance structurale et fonctionnelle des deux isoformes, leurs caractéristiques physico-chimiques divergent suffisamment pour que le protocole de purification et/ou de production que nous utilisons pour l'isoforme α ne soit pas transposable à l'isoforme β pour des analyses fonctionnelles et structurales. Des modifications des protocoles devront être apportées pour la suite des analyses sur cette isoforme.

RÉSULTATS : Partie I

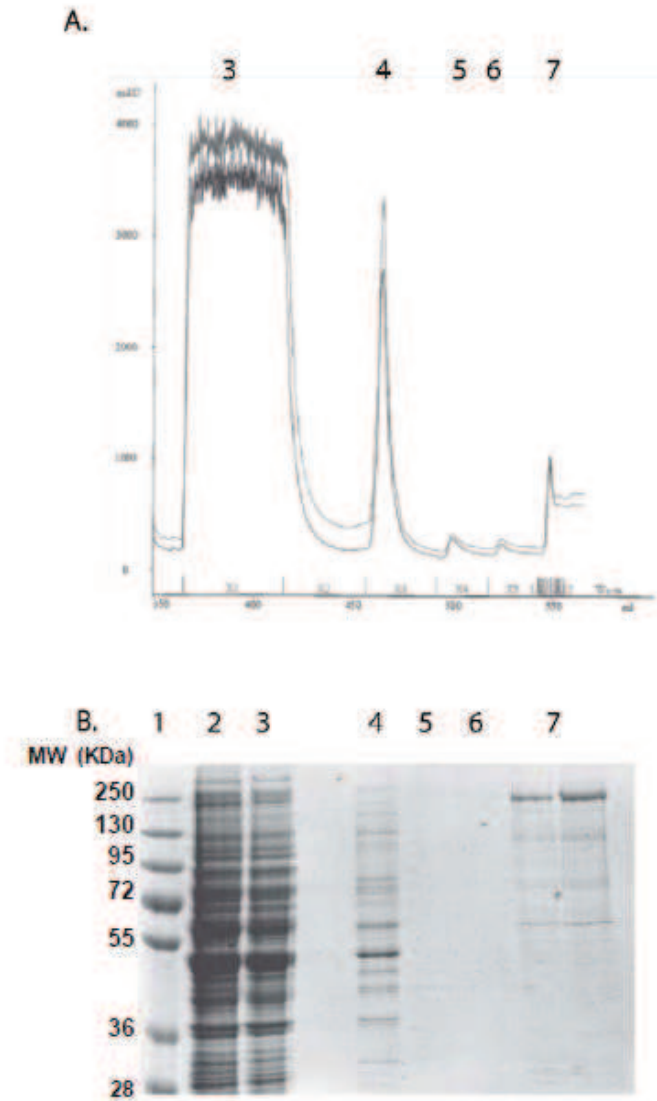


Figure 34 Purification de l'isoforme β . A. Le chromatogramme de la colonne d'affinité au nickel. 3. La charge de l'échantillon, 4-6 les lavages successifs à 20mM, 35mM et 60mM imidazole. 7. élution à 250 mM Imidazole. B. Le gel SDS PAGE de la première étape de purification, les numéros correspondent à ceux du chromatogramme avec en plus 1 Le marqueur de poids moléculaire et 2 l'extrait soluble.

iii. Purification des isoformes à partir des cellules de mammifère

L'étape de lyse cellulaire est la seule modification apportée au protocole de purification des isoformes à partir des levures *S.cerevisiae*. Les cellules de mammifère ne possèdent pas de paroi extracellulaire type peptidoglycane, elles sont facilement lysées par congélation/décongélation, par choc hypotonique ou par sonication. Nous avons utilisé cette dernière option. Contrairement à la production en *S.cerevisiae*, l'isoforme β a pu être purifiée en deux étapes. Nous en avons obtenu environ 0,5 mg par litre de culture. Le rendement de la purification de cette isoforme produite en cellule BHK21 est supérieur à celle produite dans *S.cerevisiae* ce qui permettra d'envisager des tests fonctionnels et structuraux sur cette enzyme. Il est possible que le système d'expression, plus proche des cellules humaines permette un meilleur repliement tridimensionnel de cette enzyme. Pour l'isoforme α nous avons obtenu 1,5 mg par litre de culture. La quantité obtenue est légèrement supérieure à la production dans *S.cerevisiae* (ci-dessus). Cependant plusieurs bandes supplémentaires sont apparues et majoritairement au poids moléculaire aux alentours de 130KDa sur les gels de contrôle après chacune des étapes de purification (Figure 35).

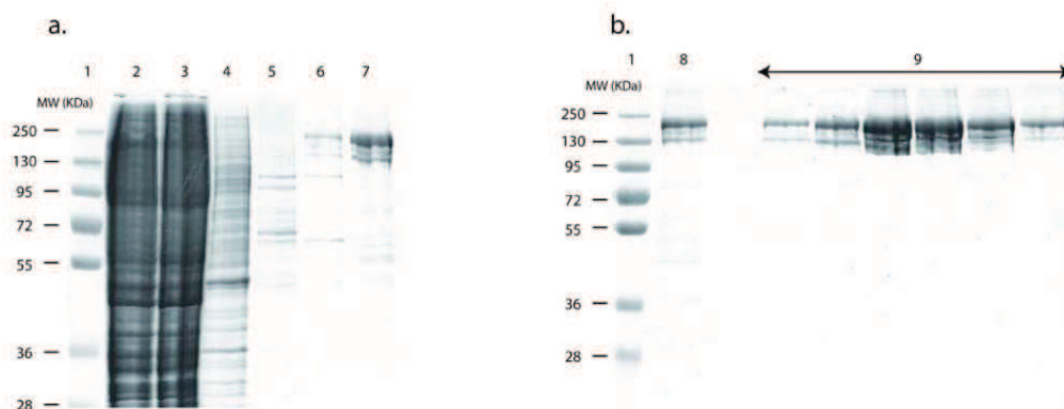


Figure 35 Purification de HsTop2 α produite dans BHK21. a. Le gel de la colonne d'affinité au nickel. 1. Marqueur de poids moléculaire, 2 extrait soluble 3 Charge de la colonne 4-6 lavage à 20 mM, 35mM, 60mM Imidazole. 7 élution à 250mM Imidazole. b. Le gel de la colonne héparine 8. Après dialyse et coupure de l'étiquette. 9. Elution à environ 800 mM NaCl.

RÉSULTATS : Partie I

✓ Analyse par spectrométrie de masse MALDI

La taille de la bande supplémentaire observée sur le gel est d'environ 140 KDa. Nous avons voulu confirmer cette masse moléculaire par analyse en spectrométrie de masse MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization).

Lors de l'analyse, la lecture du spectre nous a révélé la présence de 4 populations de protéines de tailles différentes, 173 KDa, 136KDa, 87KDa et 46KDa (Figure 36). La taille la plus élevée, 173KDa, concorde avec la masse attendue pour l'enzyme entière qui est de 171KDa (calculée avec ProtParam, ExPASy Bioinformatics tools). La légère différence de masse observée (171KDa théorique et 173KDa expérimentale) pour l'enzyme entière peut provenir de la marge d'erreur de la mesure MALDI. Pour l'isoforme α , le domaine ATPase comprend entre 400 et 450 acides aminés (aa) selon les constructions, correspondant à une masse de 44 à 49,5KDa. Le domaine C-terminal comprend 250 à 300 aa, correspondant à une masse entre 27,5 et 33 KDa et le corps de l'enzyme entre 700 et 800 aa, correspondant à une masse de 77 à 88KDa.

En résumé :

<u>Domaine</u>	<u>Masse moléculaire théorique (KDa)</u>
ATPase	44-49,5
Corps	77,5-88
C-terminale	27 – 33
<u>Pics MALDI</u>	<u>Masse moléculaire expérimentale (KDa)</u>
#1	173
#2	136
#3	87
#4	46

RÉSULTATS : Partie I

Si on compare les masses théoriques calculées avec les masses expérimentales on peut en conclure que #4 (46KDa) est proche de la masse du domaine ATPase (44-49 KDa), #3 (87 KDa) est proche de la masse du corps de la protéine (77,5-88 KDa) est que #2 (136KDa) est proche des masses #3 et #4 additionnées ($87 + 46 = 133$). Cette masse correspond très probablement au corps de l'enzyme avec le domaine ATPase. Selon ces approximations, nous aurions perdu le domaine C-terminal lors de la purification ou par une dégradation graduelle sur le temps. Cependant nous avons observé que la dégradation apparaît déjà après la première étape, la chromatographie au nickel. L'étiquette 10 histidines est placée en C-terminal de la protéine recombinante donc les protéines éluées possèdent encore leurs domaines C-terminaux. En complément, nous avons réalisé des Western blot avec des anticorps dirigés vers le domaine C-terminal qui nous ont donné des résultats contradictoires, les anticorps commercialisés variant grandement d'un lot à l'autre en termes de spécificité. Des expériences de digestion limitées à la Trypsine sur l'enzyme intacte produite dans la levure ont révélé des motifs de dégradation ne pouvant être interprétés de manière non ambiguë et n'ont pas pu être corrélés au profil de dégradation de la protéine produite dans les cellules de mammifère

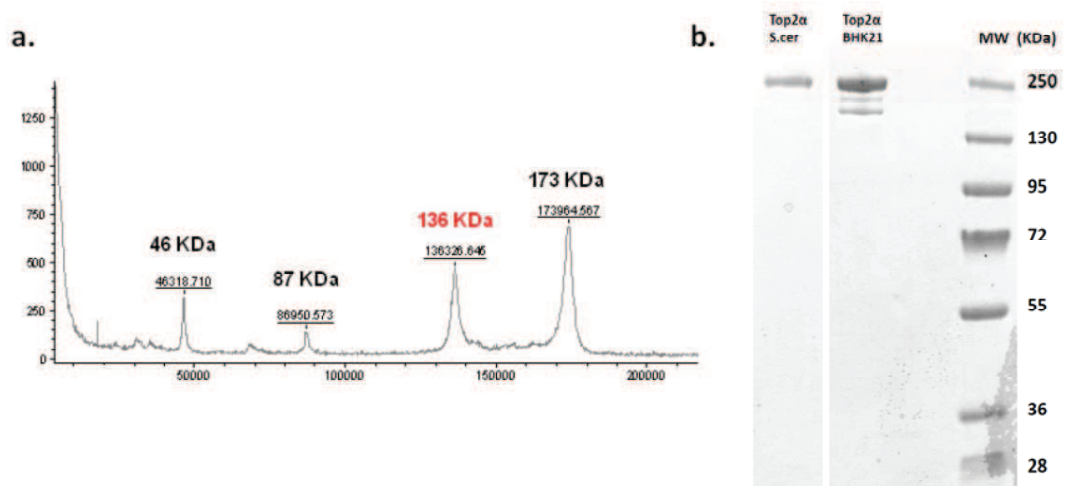


Figure 36 Analyse de la dégradation de l'isoforme α produite en cellule de mammifère. a. Le spectre MALDI-TOF de l'échantillon. b. Le gel SDS PAGE dont la bande de migration entre Top2 α S.cer et Top2 α BHK21 a été coupée, montrant la différence entre la Top2 produite en levure (Top2 Sc) et en cellule BHK21 (Top2 BHK21)

RÉSULTATS : Partie I

✓ Couverture de séquence par spectrométrie de masse Orbitrap.

Afin d'identifier le domaine manquant, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse.

L'échantillon a été déposé sur gel SDS-PAGE puis la bande de dégradation a été digérée par la Trypsine et la Chymotrypsine (Matériels et Méthodes). La Trypsine coupe en C-terminal des résidus Lysine et Arginine sauf quand ceux-ci sont suivis d'une proline. La Chymotrypsine coupe en C-terminal des résidus Phénylalanine, Tyrosine, Leucine, Méthionine et Tryptophane. Les peptides générés ont été analysés dans un spectromètre de masse Orbitrap Elite couplé à une chromatographie liquide. Malgré une couverture de séquence à 72,9%, l'analyse n'a pas mis en évidence de grandes zones manquantes bien que le domaine C-terminal semble bien moins représenté (Figure 37). Ceci peut être lié à une contamination par l'enzyme non dégradée, plus abondante, par diffusion dans le gel SDS-PAGE, masquant l'absence d'un domaine.

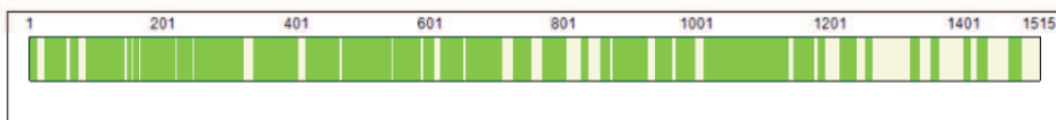


Figure 37 Couverture de séquence en spectrométrie de masse après digestion de l'enzyme à la trypsine et Chymotrypsine. En vert les régions de la séquence couvertes par l'analyse.

✓ Séquençage des résidus N-terminaux par la méthode d'Edman.

Afin d'identifier de manière précise les bornes exactes de la protéine dégradée, l'échantillon a été séquençé en N-terminal par la technique d'Edman. Nous avons réalisé un transfert des protéines après migration sur gel SDS sur une membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) (Figure 38) et envoyé cette membrane à analyser sur une plateforme dotée d'un séquenceur d'Edman (Grenoble). Le séquençage a mis en évidence que les bandes de la protéine entière **1** et la bande présumée de dégradation **2** possèdent la même séquence ¹GPKMSTEPSVER¹², correspondant aux 12 premiers résidus de l'extrémité N-terminale attendus pour une protéine HsTop2α intacte.

RÉSULTATS : Partie I

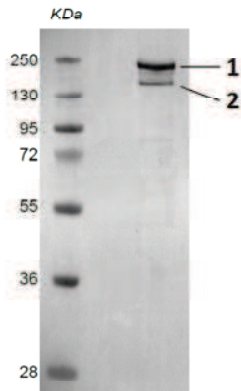


Figure 38 Membrane PVDF utilisée pour le séquençage N-terminal de l'isoforme α produit en BHK21. Deux bandes discrètes 1 et 2 sont visibles après coloration au bleu de coomassie.

Nous en déduisons que la bande de dégradation **2** contient la protéine HsTop2 α intacte en N-terminal et probablement dégradée en région C-terminale bien que l'analyse MALDI n'ait pas pu confirmer de façon certaine la disparition de la zone C-terminale. Moins de peptides ont été retrouvés dans la zone comprenant les résidus 1201-1515 lors de l'analyse de la couverture de séquence (Figure 19), ce qui pourrait laisser penser que la protéine a perdu son domaine C-terminal bien qu'elle soit purifiée sur colonne d'affinité à l'aide de l'étiquette 10 histidines en C-terminal. La protéine étant un homodimère, il est possible qu'une seule des sous unités ai subi une dégradation en C-terminal.

C. Analyses fonctionnelles des isoformes

Les protocoles de production et de purification que nous avons mis en place sont inédits, il est donc important de procéder à une caractérisation fonctionnelle des protéines. Au vu des difficultés rencontrées lors de la production et de la purification de l'isoforme β nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de l'isoforme α .

Les tests fonctionnels classiquement utilisés pour les ADN topoisomérases de type 2 sont le test de relaxation d'un ADN plasmidique, le test de mesure de l'hydrolyse d'ATP, le test de décaténation et le test de clivage d'un ADN plasmidique. L'ensemble de ces tests ainsi que les principes sont détaillés dans la partie « Matériels et Méthodes ».

1. Tests de relaxation d'un ADN plasmidique surenroulé.

Ce test classique consiste à mettre en évidence les isomères topologiques générés par une ADN topoisomérase à partir d'un ADN plasmidique surenroulé. Dans notre cas, les HsTop2 comme toutes les Top2 eucaryotes, relaxent un plasmide surenroulé en présence d'ATP et de magnésium. L'isoforme α est environ 10 fois plus active pour la relaxation des supertours d'ADN positifs (sc+) que les négatifs (sc-) (McClendon et al., 2005). Cependant, pour des raisons techniques, tous nos tests de relaxation ont été réalisés avec de l'ADN sc-, comme pour la majorité des groupes de recherche dans le domaine. En effet, *E.coli* génère naturellement des plasmides sc- en grande quantité. On peut donc les purifier en quantité importante à partir de simples préparations de plasmide. La préparation d'ADN sc+ nécessite de réaliser une réaction de relaxation préparatoire avec de la reverse gyrase (une Top2 capable d'introduire des supertours positifs dans l'ADN). Cependant, il faut disposer de reverse gyrase et donc la purifier. Les quantités d'ADN sc+ obtenues de cette manière sont insuffisantes pour des tests de relaxation en routine.

RÉSULTATS : Partie I

Lors de nos tests nous avons comparé les activités des isoformes α produits dans *S.cerevisiae* et dans BHK21.

Nous avons observé que les isoformes α produites dans la levure *S.cerevisiae* ainsi que dans les cellules BHK21 sont fonctionnelle dès 8 nM d'enzyme (Figure 39). Les isoformes issus des deux systèmes d'expressions génèrent la même population d'isomère topologique, en effet, leur migration dans le gel d'agarose montre une répartition identique pour les deux protéines testées. On observe une disparition complète de la forme surenroulée du plasmide pUC19 dès 17 nM d'enzyme pour les protéines produites en cellules BHK21 et une disparition complète aux alentours de 36 nM pour les protéines produites dans la levure (Figure 39). Les protéines produites en cellules de mammifère semblent donc légèrement plus actives en relaxation que celles produites dans la levure. Cependant nous ne savons pas dans quelle mesure la population d'enzymes dégradées influence ce résultat. Nous avons approfondi cette analyse fonctionnelle comparative par des tests de mesure de l'hydrolyse d'ATP.

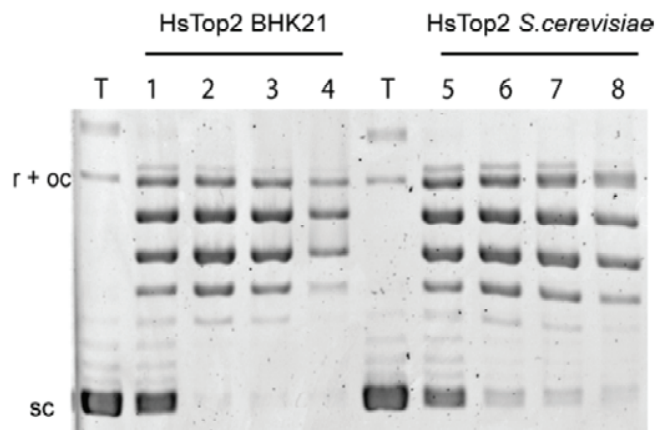


Figure 39 Test de relaxation d'un ADN plasmidique. r (relaxed) = ADN relâché, oc (open circular) = ADN avec coupure simple brin, sc (supercoiled) = ADN surenroulé. Bande de migration : 1 à 4 et de 5 à 8: 8nM, 17nM, 36nM, et 72nM de HsTop2 produite en *S.cerevisiae* ou en BHK21 T (témoin) = pUC19 surenroulé, aucune protéine n'a été ajoutée dans cette réaction contrôle.

2. Caractérisation des constantes catalytiques de l'isoforme α

Nous avons déterminé et comparé les constantes catalytiques (K_{cat}) et la constante de Michaelis (K_m) de l'isoforme α produite dans *S.cerevisiae* et dans BHK21.

De nombreuses études ont montré que lors de la détermination du K_{cat} le ratio dimère d'enzyme/ nombre de paires de bases d'ADN a un fort impact sur le taux d'hydrolyse de l'ATP (Halligan et al., 1985; Hammonds and Maxwell, 1997; Lindsley and Wang, 1993). Nous avons donc prêté attention à respecter le ratio 1:1000 dans toutes nos expériences afin d'être en concentration saturante en ADN (Figure 40).

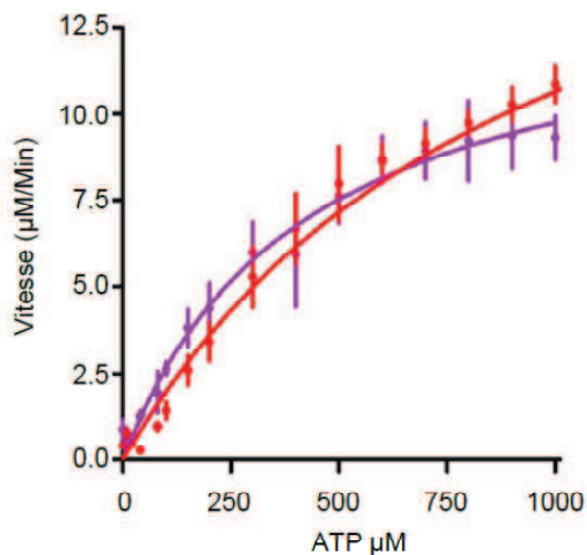


Figure 40 Représentation de Michaelis et Menten de l'isoforme α . Les vitesses d'hydrolyse d'ATP sont représentées en fonction de la concentration en ATP. En rouge l'isoforme produit en cellule de mammifère BHK21, en violet l'isoforme produit dans la levure *S.cerevisiae*. Le graphique a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism. Nous nous sommes assurés pour le calcul des K_m que les derniers points reportés sur la courbe atteignent bien le début du plateau attendu aux alentours de 1000µM d'ATP par des mesures supplémentaires qui ne sont pas reportées car elles n'ont pas été réalisées en triplicatas.

La constante catalytique K_{cat} , est calculée à partir de mesures effectuées en triplicata à une concentration saturante en substrat, 1mM d'ATP, pour une concentration donnée en enzyme (13 μg). Pour l'enzyme produite dans *S.cerevisiae* le K_{cat} est de **$2,05 \pm 0,035 \text{ s}^{-1}$** qui est comparable au K_{cat} retrouvé par Hammonds *et al.* sur l'enzyme endogène de cellule HeLa $2,17 \text{ s}^{-1}$ et sur les mesures effectuées par Austin *et al.* sur l'isoforme β K_{cat} de $2,25 \text{ s}^{-1}$ (Hammonds and Maxwell, 1997; West *et al.*, 2002). Le K_{cat} des protéines produites en BHK21 est de **$2,7 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$** (Tableau 3). L'enzyme produite dans les cellules de mammifère présente un K_{cat} légèrement plus élevé malgré les bandes de dégradations observées. Il est possible qu'un système d'expression plus proche du système humain favorise légèrement l'activité de cette enzyme.

La constante de Michaelis K_m , a été calculée à partir de cinétiques d'hydrolyse d'ATP en fonction du temps réalisées en triplicata (matériels et méthodes) (Figure 40). Le K_m de l'enzyme produite dans *S.cerevisiae* est de **$420 \pm 90 \mu\text{M}$** et de **$947 \pm 122 \mu\text{M}$** pour les protéines produites dans BHK21. Ces valeurs sont supérieures à celles retrouvées dans la littérature qui sont d'ailleurs très variables selon les sources d'enzymes (Tableau 3). L'enzyme produite en cellules de mammifère possède le K_m le plus élevé. L'enzyme produit en BHK21 présente donc une affinité ($1/K_m$) pour l'ATP moins importante que celle produite en *S.cerevisiae*.

Les efficacités catalytiques k_{eff} : représentent la quantité d'ATP consommée par l'enzyme par seconde. L'isoforme α produite en *S.cerevisiae* a une efficacité de $4.88 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et l'isoforme α produite dans BHK21 une efficacité de $2.90 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Donc l'enzyme produite dans *S.cerevisiae* est 1,68 fois plus efficace que celle produite en BHK21 (Tableau 3).

Tableau 3 La constante catalytique et la constante de Michaelis de l'isoforme α produite par notre équipe et quelques valeurs retrouvées dans la littérature. * Les mesures ont été réalisées sur un échantillon contenant un mélange des deux isoformes. ** Ces protéines sont des chimères possédant 5 résidus aminé de la Top2 de *S.cerevisiae* en N-terminal de la séquence de la Top2 humaine (voir paragraphe historique de la purification des HsTop2).

Protéine	Organisme	Type de production	Organisme de production	Kcat (S^{-1})	Km (μM)	Kcat/Km ($M^{-1}.s^{-1}$)	Références
HsTop2 α	<i>H.sapiens</i> **	Surexpression	<i>S.cerevisiae</i>	2,05	420	4.88	Notre équipe
HsTop2 α	<i>H.sapiens</i> **	Surexpression	Cellules BHK21	2,70	920	2.93	
HsTop2 α (et β ?) *	<i>H.sapiens</i>	Endogène	Cellules HeLa	2,17	170	12,70	(Hammonds and Maxwell, 1997)
ScTop2	<i>S.cerevisiae</i>	Surexpression	<i>S.cerevisiae</i>	8,00	130	61,50	(Lindsley and Wang, 1993)
BtTop2 α et β *	<i>B.taurus</i>	Endogène	Bovine Calf thymus	1,10	400	2,70	(Halligan et al., 1985)
HsTop2 β	<i>H.sapiens</i> **	Surexpression	<i>S.cerevisiae</i>	2,25	630	3,50	(West et al., 2002)

3. Synthèse des résultats des analyses fonctionnelles

L'isoforme α que nous utilisons est une chimère composée en N-terminal des 5 premiers acides aminés de la Top2 de *S.cerevisiae* directement accolés au 29^{ème} acide aminé de la protéine humaine. Cette modification dans une zone variable non catalytique des Top2 ne semble pas affecter la constante catalytique de l'enzyme par rapport à l'enzyme de source endogène.

Cependant nous avons noté des différences non négligeables entre les deux systèmes d'expression et avec les données déjà publiées. L'isoforme produit en cellules de mammifère a une constante catalytique légèrement supérieure et un Km très supérieur à celle produite dans *S.cerevisiae*. La dégradation observée lors de la purification peut avoir impacté ces valeurs (Figure 36).

Le domaine C-terminal des Top2 participe à la fixation des ADN et la reconnaissance de ses croisements. La présence d'ADN dans les tests enzymatiques stimulant l'activité ATPase, il est possible que la dégradation observée dans BHK21 soit à l'origine de cette différence, si on suppose que le domaine C-terminal est absent pour une partie de la protéine.

Le Kcat de l'enzyme produite dans BHK21 est par contre supérieur à l'enzyme produite en levure. Il n'est pas à exclure que la surexpression en cellules de mammifères améliore la stabilité de l'enzyme grâce à sa machinerie de traduction et aux modifications post traductionnelles toutes deux plus proches de son système d'origine

D. Analyse des phosphorylations et acétylations par spectrométrie de masse.

*Les Top2 sont des protéines soumises à de nombreuses modifications post traductionnelles (MPTs). Celles-ci ont une influence sur la localisation et l'activité des enzymes à différents stades du cycle cellulaire (Nitiss, 2009a; Vos et al., 2011; Wells and Hickson, 1995). À l'heure actuelle 3 types de modifications ont été répertoriés sur les HsTop2 : des phosphorylations (Austin and Marsh, 1998), des sumoylations (Nitiss, 2009a) ou ubiquitinations, et des acétylations (Tsai et al., 2000). Dans le cadre de notre projet nous avons cherché à identifier les phosphorylations et acétylations des enzymes surexprimées dans deux systèmes d'expression eucaryote différents, la levure *S.cerevisiae* et les cellules de mammifère BHK21.*

De nombreuses techniques biochimiques permettent l'analyse des MPTs. Par exemple la cartographie des peptides modifiés par électrophorèse 2D. Les peptides sont migrés dans deux dimensions sur gel d'électrophorèse et les modifications sont mises en évidence grâce à un marquage, radioactif au P³², anticorps ou enzymatique. Cependant cette technique manque de sensibilité pour la localisation exacte des modifications dans les séquences d'acides aminés. Lors des deux dernières décennies l'émergence de la protéomique et en particulier la phosphoprotéomique, a poussé le développement la spectrométrie de masse. Cette technique est devenue un outil essentiel dont les applications sont nombreuses et variées pour l'analyse des protéines. Par exemple, l'identification des protéines dans un mélange complexe, l'analyse de la masse moléculaire de peptides et protéines, le séquençage peptidique, la détection et la localisation des modifications post-traductionnelles (Domon and Aebersold, 2006).

Dans le cas d'analyse des modifications post-traductionnelles, les protéines peuvent être directement analysées en solution ou après migration sur gel. Elles sont digérées par une protéase, en générale la trypsine, mais la chymotrypsine, l'ArgC, l'Asp N, la GluC peuvent également être utilisées pour générer différents peptides. Les peptides sont enrichis par affinité avec la modification recherchée puis les peptides enrichis sont analysés par le spectromètre de masse (Matériels et Méthode).

RÉSULTATS : Partie I

Les séquences des protéines analysées étant connues ainsi que les sites de digestion enzymatiques, un programme informatique retrouve la séquence de chaque peptide en fonction des masses enregistrées. Les MPTs possèdent une masse bien définie et connue, 80 Da pour les phosphorylations, 42 Da pour les acétylations. L'incrément correspondant à ces modifications sur un peptide modifié par rapport à un peptide non modifié peut être détecté et localisé avec précision (Domon and Aebersold, 2006; Mann et al., 2001).

Dans notre cas nous avons analysé les protéines purifiées déposées sur gel SDS-PAGE puis digérées à la trypsine. La couverture de la séquence protéique à partir des peptides digérés varie entre 86% et 60% (Figure 41). La cartographie de la couverture de séquence met en évidence quelques zones systématiquement non couvertes. En particulier la zone entre les résidus 700 et 800. La trypsine ne permet pas de produire les peptides correspondant à cette zone, qui serait couverte par l'utilisation de la chymotrypsine en plus de la trypsine comme le montre l'analyse de couverture de séquence réalisée sur la HsTop2a BHK21 (Figure 37). L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée sur un Orbitrap Elite (Thermo Fisher). C'est un spectromètre de masse hybride « Ion Trap / Orbitrap » associé à un ESI (Figure 42).

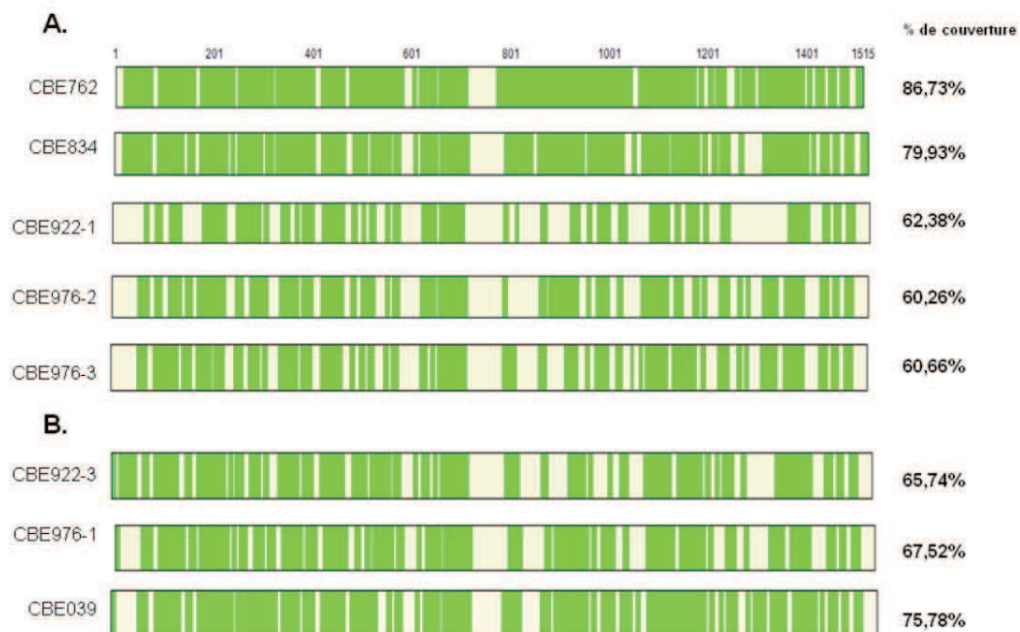


Figure 41 Couverture de séquence des analyses en spectrométrie de masse pour la recherche des phosphorylations et acétylations. Les zones vertes représentent les séquences couvertes par les peptides générés lors de la digestion de l'enzyme entière par la trypsine puis identifiés en spectrométrie de masse. Le pourcentage de couverture est indiqué à côté de chaque expérience CBE. Les régions blanches ne sont pas couvertes. A. Les 5 analyses réalisées sur l'isoforme α surexprimée en levure. B. Les 3 analyses réalisées sur l'isoforme α surexprimée en cellules de mammifère.

RÉSULTATS : Partie I

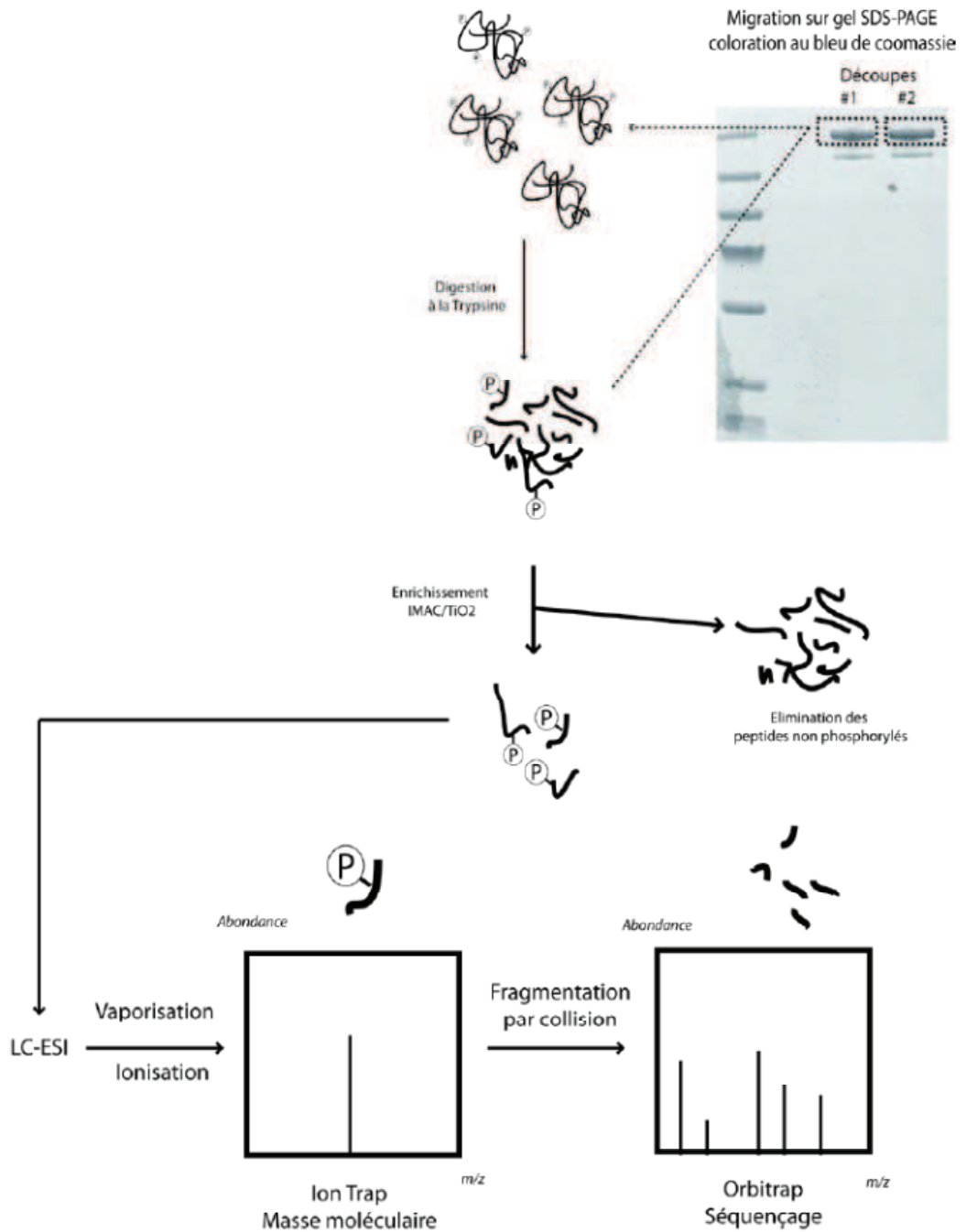


Figure 42. Principe de l'analyse LC-MS/MS. Les enzymes sont migrées sur gel SDS PAGE puis digérées à la Trypsine directement dans le gel. Après extraction, les peptides phosphorylés sont enrichis par affinité avec les Fe³⁺ sur colonne IMAC puis analysés par LC-MS/MS.

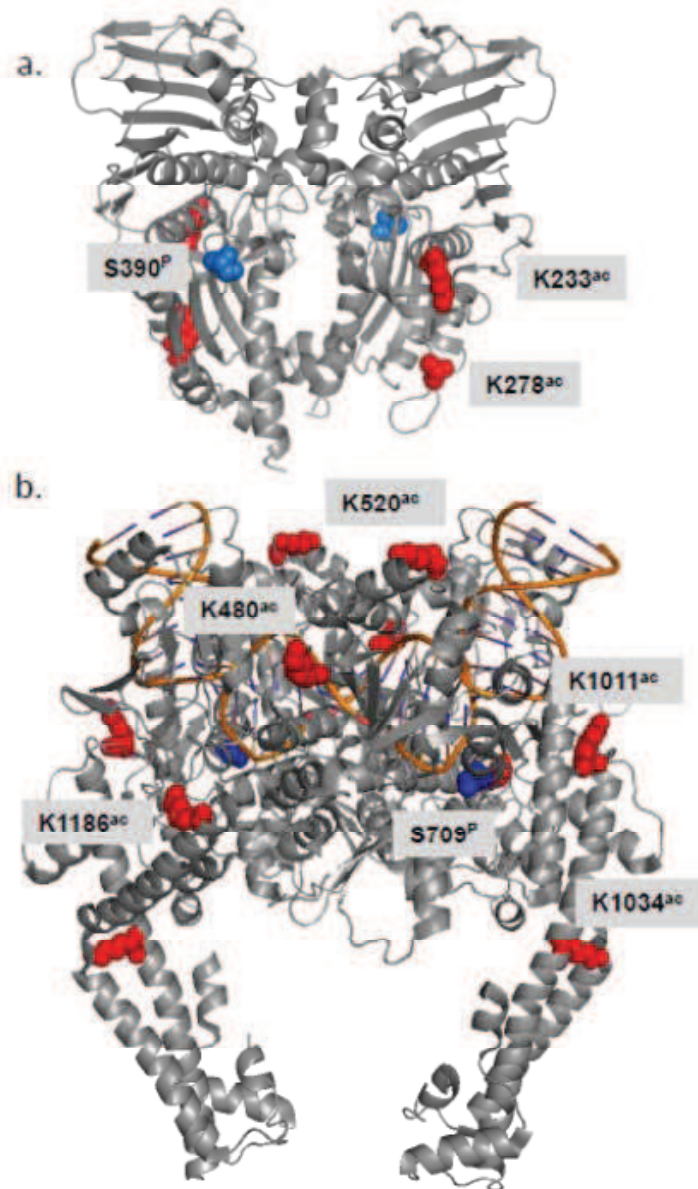


Figure 43 Quelques positions acétylées (Rouge) et Phosphorylées (Bleu) retrouvées dans une majorité d'expériences placées sur les structures du domaine ATPase (PDB : 1ZXM en haut) et du corps catalytique (PDB : 4FM9 en bas) de l'isoforme α humain.

1. Détection et validation des sites potentiellement phosphorylés

i. Observations réalisées dans les deux systèmes d'expression eucaryotes.

L'isoforme α surexprimée dans *S.cerevisiae* a été analysée 5 fois. Nous avons détecté 30 positions potentiellement phosphorylées. Parmi celles-ci 18 ont été conservées pour interprétation, car elles ont été détectées dans au moins la moitié des expériences (Tableau 4)

Tableau 4 Sites de phosphorylation potentiels détectés sur l'isoforme α surexprimée dans *S.cerevisiae*. En bleu foncé, les positions dont les spectres ont été validés manuellement. En bleu clair, les positions dont les spectres peuvent être interprétés avec un léger risque d'ambiguïté. La colonne « Détections/5 », est le nombre de fois où le résidu a été détecté comme potentiellement phosphorylé. La barre bleue est proportionnelle au nombre de détections. La dernière colonne répertorie, dans la base de données PhosphoSite Plus, le nombre d'expériences où le résidu modifié a été détecté par spectrométrie de masse dans la littérature.
****** Les positions retrouvées à chaque analyse. ***** les positions retrouvées dans la majorité des analyses.

Résidus	Analyses Orbitrap					Détections 5	PhosphoSite Plus Détections Spectr. Masse
	CB762	CBE834	CBE976-2	CBE976-3	CBE922		
S 390						1	0
S 452						0,5	1
T 453						0,5	0
S 497						0,5	0
* S 709						2,5	2
* S 1106						4	23
** S 1213						5	39
T 1244						0	6
** S 1247						5	36
T 1327						1,5	6
S 1332						3,5	29
* S 1337						2,5	31
* T 1343						3	16
S 1351						2	12
S 1354						0,5	24
S 1361						1	0
S 1365						1	3
** S 1374						5	30
** S 1377						5	50
S 1387						2	9
* S 1391						4	12
* S 1392						4	8
* S 1393						4	20
S 1449						0	6
* S 1469						4,5	128
* T 1470						3	79
* S 1471						4	90
* S 1474						4	93
S 1476						1	37
S 1491						1	5
** S 1495						5	8
S 1525						2	27

RÉSULTATS : Partie I

Tableau 5 Sites de phosphorylation potentiels détectés sur l'isoforme α surexprimée dans BHK21. En rouge foncé, les positions dont les spectres ont été validés manuellement. En rouge clair, les positions dont les spectres peuvent être interprétés avec un léger risque d'ambiguïté. La colonne « Détections/3 », le nombre de fois où le résidu a été détecté comme potentiellement phosphorylé. La barre rouge est proportionnelle au nombre de détections. La dernière colonne répertorie, dans la base de données PhosphoSite Plus, le nombre d'expériences où le résidu modifié a été détecté par spectrométrie de masse. ** Les positions retrouvées à chaque analyse. * les positions retrouvées dans la majorité des analyses.

	Résidus	Analyses Orbitrap			Détections 3	PhosphoSite plus Détections Spectr. Masse
		CBE922-3	CBE039	CBE976		
*	S 390				1,5	0
	S 452				0	1
	T 453				0	0
	S 497				0	0
	S 709				0	2
**	S 1106				3	23
**	S 1213				3	39
	T 1244				2	6
**	S 1247				3	36
	T 1327				1	6
	S 1332				2	29
	S 1337				1	31
	T 1343				1	16
	S 1351				1	12
	S 1354				1	24
	S 1361				0,5	0
	S 1365				0,5	3
**	S 1374				3	30
**	S 1377				3	50
	S 1387				0	9
	S 1391				2	12
	S 1392				2	8
	S 1393				2,5	20
**	S 1449				3	6
**	S 1469				3	128
*	T 1470				1,5	79
**	S 1471				3	90
	S 1474				2,5	93
	S 1476				0	37
**	S 1491				3	5
**	S 1495				3	8
	S 1525				0	27

RÉSULTATS : Partie I

Nous avons réalisé 3 analyses sur l'isoforme α surexprimée en cellules de mammifère BHK21. 25 positions ont été détectées comme potentiellement phosphorylées. 18 sont conservées pour l'interprétation car présentes au moins dans la moitié des d'expériences. (Tableau 5)

14 positions sont conservées entre les deux systèmes d'expressions (Tableau 4). Parmi celles-ci on peut noter les positions **S1213**, **S1247**, **S1374**, **S1377** et **S1495**, qui ont été retrouvées à chaque analyse. Les positions **S390**, **T1244** et **S1491** sont retrouvées uniquement dans le système d'expression en cellules de mammifère BHK21. De plus la position **S1491** est strictement conservée lors des analyses sur la Top2 produite en cellule de mammifère, elle n'a été repérée qu'une fois pour le système d'expression *S.cerevisiae* et avec un faible score de confiance lors de l'analyse CBE976-3. Les positions **S709**, **S1337** et **T1343**, sont uniques au système d'expression *S.cerevisiae* (Tableau 6).

Résidus	Résidus modifiés	
	S.cerevisiae	BHK21
S 390	1	1,5
S 452	0,5	0
T 453	0,5	0
S 497	0,5	0
S 709	2,5	0
S 1106	4	3
S 1213	5	3
T 1244	0	2
S 1247	5	3
T 1327	1,5	1
S 1332	3,5	2
S 1337	2,5	1
T 1343	3	1
S 1351	2	1
S 1354	0,5	1
S 1361	1	0,5
S 1365	1	0,5
S 1374	5	3
S 1377	5	3
S 1387	2	0
S 1391	4	2
S 1392	4	2
S 1393	4	2,5
S 1449	0	1
S 1469	4,5	3
T 1470	3	1,5
S 1471	4	3
S 1474	4	2,5
S 1476	1	0
S 1491	1	3
S 1495	5	3
S 1525	2	0

Tableau 6 Comparaison des modifications retrouvées dans les deux systèmes d'expression. En bleu, les positions détectées dans *S.cerevisiae* uniquement, en rouge les positions détectées dans les **cellules des mammifères** uniquement, en violet, les sites détectés dans **les deux systèmes**

RÉSULTATS : Partie I

Une des difficultés de l'analyse des phosphorylations par spectrométrie de masse est de couvrir suffisamment de séquences pour détecter l'ensemble des sites. De plus elles sont difficiles à détecter du fait de leur faible abondance relative et de la diminution de sensibilité que leur multiplicité induit lors des mesures. Donc une absence de détection de modifications peut signifier une absence de modification mais également une absence de couverture de séquence, une absence d'ionisation du peptide ou une perte de la modification. Cependant les phosphorylations qui ont fait l'objet d'études publiées, ont été retrouvées lors de nos analyses (Chikamori et al., 2003; Escargueil et al., 2000; Grozav et al., 2009; Iida et al., 2008; Ishida et al., 1996; Ishida et al., 2001; Li et al., 2008; Luo et al., 2009; Wells et al., 1995; Wells and Hickson, 1995) (Tableau 7). On peut en conclure que les deux systèmes d'expression apportent des phosphorylations de manière équivalente. Les analyses réalisées à ce jour n'apportent que des explications partielles sur le rôle exact des différents sites de phosphorylation. Il semble probable que comme en épigénétique ce soit la modification de plusieurs sites précis lors d'étapes du cycle cellulaire qui donnent le sens mécanistique et fonctionnel de ces modifications.

	Numérotation Uniprot	Phosphosite				
		SS	MS	Type d'analyse	Kinases	Réf.
Pos.uni. BHK21	S390					
	T1244		7	Phosphoprotéome		
	T1491		5	Phosphoprotéome		
Position unique S.cerevis	S709		2	Phosphoprotéome		
	S1337	1	36	Top2	Plk-1	1
	T1343	4	17	Top2	Plk3/CKII	2,3,4,5
Positions communes BHK21 + Sc	S1106	2	26	Top2	CKI	8,9
	S1213	4	45	Top2	Proline Directed Kinase	4,5
	S1247	1	42	Top2	Proline Directed Kinase	5
	S1332		34	Phosphoprotéome		
	S1374		33	Phosphoprotéome		
	S1377	2	55	Top2	CKII	5,7
	S1391		14	Phosphoprotéome		
	S1392		8	Phosphoprotéome		
	S1393	1	21	Top2	Proline Directed Kinase	5
	S1469	1	131	Top2	CKII	10
	T1470		82	Phosphoprotéome		
	S1471		93	Phosphoprotéome		
	S1474		96	Phosphoprotéome		
	S1495		8	Phosphoprotéome		

Tableau 7 Les phosphorylation répertoriées dans Phosphosite Plus et la bibliographie associée. Dans les colonnes SS et MS est reporté le nombre de fois que la position a été détectée lors d'une analyse. SS = Site spécifique, expériences réalisées sur des sites précis, par des analyses biochimiques type gel 2D. MS = Mass spectrometry, expériences réalisées par spectrométrie de masse uniquement.

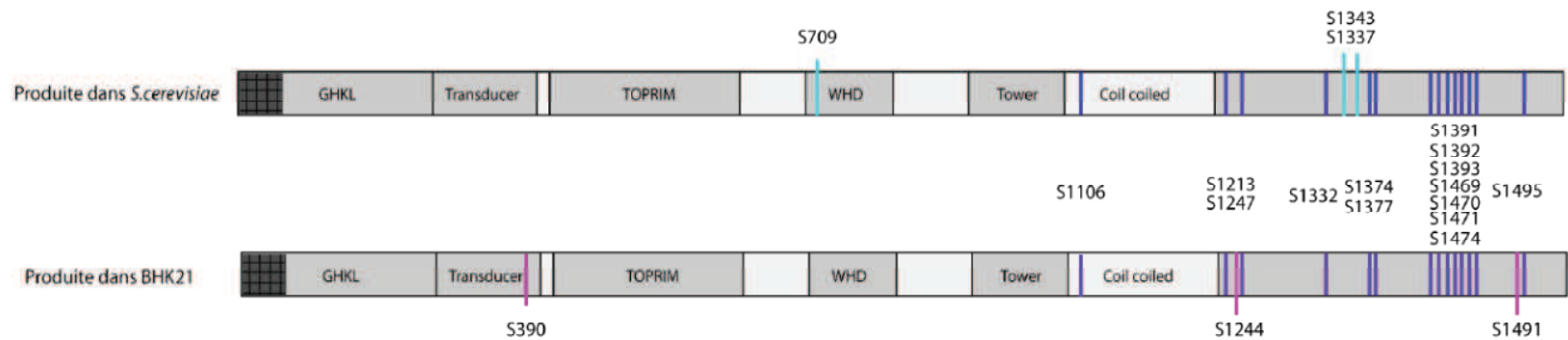


Figure 44 Récapitulatif des positions potentiellement phosphorylées retrouvées dans une majorité d'expériences en spectrométrie de masse. Les positions retrouvées sur les enzymes produites dans **les deux systèmes d'expressions** (Violet). Les positions retrouvées uniquement sur les enzymes produites en *S.cerevisiae* et *BHK21* en bleu et fuchsia respectivement.

2. Analyse détaillée des phosphorylations et leurs implications fonctionnelles

Toutes les positions ont été analysées avec l'appui des structures 3D lorsque celles-ci sont disponibles pour la zone concernée. Cependant les informations structurales actuellement disponibles pour les Top2 humaines se limitent aux domaines ATPase et au corps catalytique. La plupart des sites potentiellement phosphorylés que nous avons enregistrés sont situés dans le domaine C-terminal pour lequel aucune structure tridimensionnelle n'est à ce jour disponible (Figure 44). Les sites au delà de la position **S1106** n'ont pu être interprétés dans leurs contextes structuraux.

i. La base de données PhosphoSite Plus

PhosphoSite a été lancée par la compagnie privée CST (Cell signaling Technology) en 2003. Cette base de données centralise les données publiées sur les sites de phosphorylations protéiques retrouvées dans la littérature. En 2008 PhosphoSite est devenu PhosphoSite Plus (PSP), répondant ainsi à l'avènement de la spectrométrie de masse en tandem à haut débit, qui génère un très grand nombre de données. Cette base de données inclut 18 organismes, majoritairement des mammifères (99,7%). Les sites sont répertoriés à partir de deux sources expérimentales. Les LTP (Low-throughput experimental method) dont la source provient d'articles axés sur la caractérisation de positions spécifiques de protéines d'intérêts. Les HTP (High-throughput tandem mass spectrometry) dont les sources proviennent soit de publications portant sur l'analyse de phosphoprotéome, soit du groupe de recherche de la CST. Il existe d'autres bases de données répertoriant les modifications post-traductionnelles, HPRD, phospho ELM, PHOSIDA. J'ai travaillé avec PSP qui apparaît comme la plus complète, cependant toutes les positions et en particulier les moins représentées, ont été vérifiées dans les autres bases de données.

ii. Positions inédites mises en évidence dans cette étude.

S390 : Contexte KSF~~G~~STCQLSEK

Cette position est inédite. Elle n'a jamais été répertoriée ni dans la littérature, ni dans la PSP. Elle est située dans le domaine ATPase au niveau du domaine transducteur. Dans la structure du domaine ATPase résolue par *Wei et al.* **S390** est engagé dans une liaison hydrogène avec la proline 385 via une molécule d'eau (*Wei et al.*, 2005). Une phosphorylation sur ce résidu viendrait ajouter deux charges négatives qui pourraient créer des liaisons électrostatiques avec les groupements amines du squelette carbone des résidus

situés en vis à vis (Figure 45) et donc venir perturber le mouvement du domaine transducteur lors de l'hydrolyse de l'ATP. Ce résidu est strictement conservé chez les Top2 eucaryotes. Aucune séquence consensus de reconnaissance de protéine kinase n'a été détectée lors des essais de prédiction sur le serveur Protparam (NetPhos, NetPhosK). La modification de cette position nécessite d'être validée au niveau expérimental, car il est possible qu'il s'agisse d'un artefact lié au mode de production de l'enzyme (surexpression).

iii. Positions peu représentées :

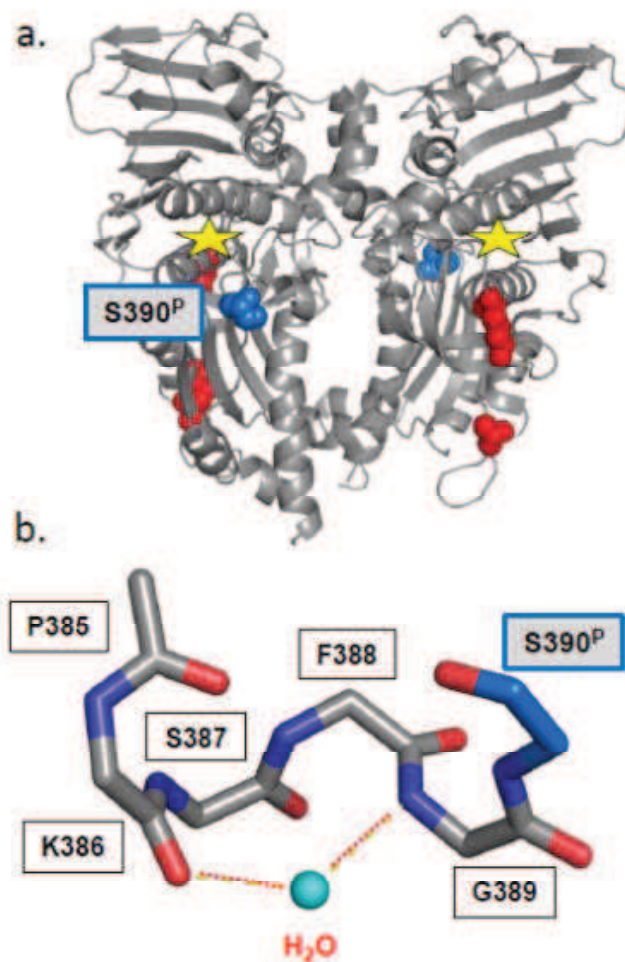


Figure 45 Position S390 potentiellement phosphorylée (Encadré bleu). a. Cette position est proche du point pivot (étoile jaune) dans la structure du domaine ATPase (PDB ID : 1ZXM) (Wei et al., 2005). b. Les chaînes principales des résidus précédents forment une liaison hydrogène avec une molécule d'eau ce qui participe au maintien local du repliement.

S709 : contexte ELILFSNSDNER :

Cette phosphorylation est répertoriée 2 fois dans PhosphositePlus suite à l'analyse phosphoprotéomique de cellules humaines par spectrométrie de masse. Nous l'avons détectée sur les enzymes produites dans *S.cerevisiae* uniquement. Elle est située sur le corps catalytique de l'enzyme entre le domaine TOPRIM et WHD. Dans la structure résolue par Wendorff *et al.* (Wendorff et al.), le résidu **S709** fait face à la triade de résidus acides E-DxD qui coordonnent un ion Mg²⁺ indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 46a.). Le résidu E de ce motif très conservé crée une liaison hydrogène avec le 3'OH de l'ADN (Figure 46b.). Une phosphorylation sur **S709** pourrait déstabiliser la coordination du Magnésium par la triade E-DxD et donc impacter le clivage ou religation de l'ADN. La sérine appartient au motif strictement conservé chez les eucaryotes. La prédiction réalisée avec NetPhosK a identifié une séquence consensus cible de CKII (Casein Kinase II). Au vu de ces éléments, il est peu probable qu'elle soit un artefact de la production en levure. Malgré la faible représentation de la position **S709** dans PSP, on peut penser qu'elle est phosphorylée *in vivo* et que cette phosphorylation joue un rôle dans la régulation de l'activité de coupure et de religation de l'enzyme. Dans ce cas elle pourrait avoir un impact sur la formation de complexes de clivage avec des molécules inhibitrices telles que l'étoposide et la doxorubicine qui se positionnent au niveau de l'ADN clivé pour empêcher la religation de celui-ci. Vue la faible fréquence de la modification de ce résidu dans la PSP, il est possible qu'elle soit très labile et donc qu'elle n'ait pas été détectée sur la protéine produite dans les cellules BHK21 où nous ne l'avons pas retrouvée.

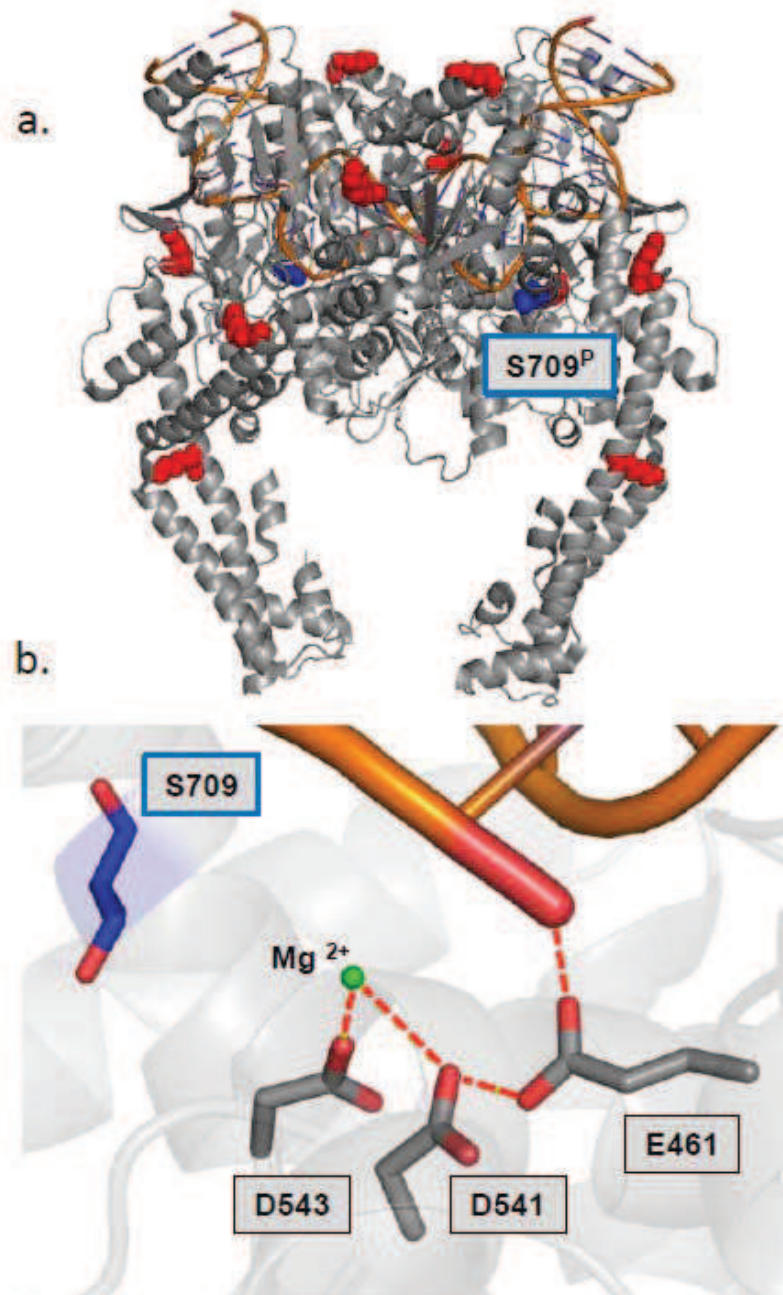


Figure 46 Position **S709** potentiellement phosphorylée. a. Sur la structure du corps de l'enzyme de la HsTop2 α , cette position est située entre le domaine Toprim et WHD et proche de la triade de résidus acides qui coordonnent un ion magnésium (b.). PDB ID : 4FM9 (Wendorff et al.).

T1244 : contexte KIKNENTEGSPQE

Cette modification a été détectée 7 fois lors d'analyse de phosphoprotéome sur lignées cellulaires humaines par spectrométrie de masse. Cette position appartient au domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Ce résidu n'est pas conservé parmi les Top2 eucaryotes. Aucun site consensus de kinases n'a été détecté par NetPhosK (ExPASy). Nous n'avons détecté cette phosphorylation que dans les cellules BHK21. Il est possible que seul un système d'expression mammifère amène cette modification. Une étude ciblée sur ce résidu devrait être menée pour établir si la phosphorylation de cette position est significative.

iv. **Position qui influence la sensibilité aux molécules utilisées en chimiothérapie des cancers**

S1106 : contexte DEEENEESDNEKET

26 détections de cette position ont été répertoriées dans PhosphositePlus suite à des analyses phosphoprotéomiques sur des lignées de cellules humaines cancéreuses et de différents types de tissus humains. En 2003, Chikamori *et al.* ont étudié spécifiquement cette position. Ils ont montré qu'elle est un site majeur de phosphorylation (Chikamori et al., 2003). Ils ont également établi un lien fonctionnel en générant un mutant alanine de ce résidu. L'enzyme mutée s'est révélée avoir une activité de décaténation et une quantité de complexe de clivage diminuée par rapport à la protéine sauvage, ce qui explique que l'hypophosphorylation de ce résidu soit corrélée à la diminution de la sensibilité à l'étoposide dans les cellules HL60. En 2009, Grozav *et al.* ont démontré que la kinase CKI δ/ϵ catalyse la phosphorylation du résidu 1106 *in vivo* (Grozav et al., 2009). Dans la structure du corps catalytique de l'isoforme α de Wendorff *et al.* la zone dans laquelle est situé ce résidu n'est pas représentée car elle est dans une boucle désordonnée (Wendorff et al.). Les études menées pour comprendre le rôle de la phosphorylation du résidu **1106** ont montré que les phosphorylations peuvent avoir un impact direct sur la sensibilité des Top2 aux molécules inhibitrices utilisées en chimiothérapie des cancers.

v. **Positions très représentées et phosphorylées en phase G2/M du cycle cellulaire :**

S1212 : Contexte TQMAEVLPSPR

Cette position a été répertoriée 45 fois dans PhosphositePlus suite à des études phosphoprotéomique sur des lignées de cellules humaines cancéreuses et sauvages. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Wells *et al.* en 1995 ont mené une étude visant à déterminer les résidus de l'isoforme α phosphorylé au cours du cycle cellulaire sur cellule HeLa en phase G2/M (Wells et al., 1995). Parmi les sites identifiés *in vivo*, **S1212** est hyperphosphorylé et probablement substrat de la MAP kinase (validé *in vitro*). Ishida *et al.* en 2001 ont mené une étude ciblée sur la phosphorylation du résidu **S1212** (Ishida et al., 2001). Ils ont montré que **S1212** n'est phosphorylé qu'au moment de la mitose. De plus, les auteurs ont mis en évidence que l'isoforme α phosphorylée en **S1212** relocalise des bras des chromosomes vers les centromères au moment de la mitose dans les cellules *HeLa*. Les auteurs ont observé que cette relocalisation est corrélée à l'activité catalytique de l'enzyme mais sans relocalisation en présence d'inhibiteur. Donc la phosphorylation de **S1212** module la relocalisation et probablement l'activité catalytique de l'enzyme. Aucune étude *in vitro* concernant l'impact de cette phosphorylation sur l'activité catalytique de l'enzyme n'a été réalisée à l'heure actuelle. En analysant les prédictions avec NetPhosK (ExPASy), la séquence consensus de la kinase MAP a été reconnue cependant aucune étude n'a été menée à ce jour pour valider la kinase responsable de la phosphorylation de ce résidu.

S1247 : contexte NENTEGSPQEDG :

Cette position a été répertoriée 42 fois dans Phosphosite Plus suite à des analyses de phosphoprotéome sur différents types de lignées cellulaires humaines cancéreuses et sauvages. Vu le nombre de détections, cette position a une forte probabilité d'être significative d'un point de vue biologique. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Wells *et al.* en 1995 ont identifié cette position lors de leur recherche des résidus phosphorylés au cours du cycle cellulaire sur l'isoforme α (Wells and Hickson, 1995). Ils ont observé qu'elle est hyperphosphorylée en phase G2/M. Ce résidu est peu conservé parmi les Top2 eucaryotes, cependant il appartient à une séquence consensus reconnue par CKII. La phosphorylation de ce résidu possède des points communs avec celle du résidu S1212 pour lequel une étude approfondie a été réalisée (ci-dessus). Il serait intéressant d'étudier s'il y a un effet

synergique entre la phosphorylation des deux résidus et l'impact sur l'activité catalytique de l'enzyme et sa localisation cellulaire au moment de la mitose.

T1343 : contexte DFDEKTDEDF

La phosphorylation de ce résidu a été enregistrée 17 fois dans Phosphosite Plus suite à l'analyse de phosphoprotéomes sur différents types de lignées cellulaires humaines cancéreuses et sauvages. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Une étude approfondie a été publiée par Ishida *et al.* en 1996, les auteurs ont utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine C-terminal de l'isoforme α phosphorylée en **T1343** (Ishida et al., 1996). Ils ont ainsi détecté cette modification *in vivo* dans des cellules *HeLa* et ce tout au long du cycle cellulaire avec une augmentation lors des phases G2/M. Les enzymes arborant cette phosphorylation ont une localisation nucléaire constante tout au long du cycle cellulaire. En 2008, Iida *et al.* ont démontré *in vitro* et *in vivo* que la kinase Plk3 est responsable de la phosphorylation de ce résidu (Iida et al., 2008). Ils ont émis l'hypothèse que plk3 pourrait moduler l'activité de l'isoforme α dans la cellule via le point de contrôle de la décaténation. Ce point de contrôle est activé lorsque la décaténation des chromatides est insuffisante, la cellule s'arrête alors en phase G2. Plk3 est connu pour activer des facteurs tels que chk2, facteurs de signalisation du point de contrôle de la décaténation de la phase G2 et les Top2 ont un rôle central pour le passage de ce point de contrôle. Cependant il reste à déterminer de manière expérimentale quel est l'impact exact de cette phosphorylation au cours du cycle cellulaire notamment l'impact sur l'activité catalytique de l'enzyme.

vi. **Positions détectées de nombreuses fois mais non analysées de manière ciblée**

S1332 : contexte FTMDLDSDEF:

Cette position a été répertoriée 34 fois dans Phosphosite Plus, elle est donc suffisamment représentée pour être considérée comme significative. Cependant aucune étude ciblée n'a été menée sur ce résidu à ce jour. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Une analyse de séquence montre qu'elle est conservée chez les isoformes α des Top2 et qu'elle est située dans une séquence consensus reconnue par la kinase CKII (prédiction de NetPhosK).

S1374 : contexte PQKSVVSDLEAD

Cette position est répertoriée 33 fois dans Phosphosite après analyse de phosphoprotéome sur différents types de cellules humaines cancéreuses et sauvages. Vu le nombre de « hit » elle peut être considérée comme significative. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Aucune étude ciblée n'a été réalisée sur ce résidu. Après analyse de la séquence, il est peu conservé parmi les Top2 eucaryotes et aucun site consensus de kinases n'a été détecté par NetPhosK (Expasy).

S1377 : contexte PQKSVVSDLEAD

55 détections ont été enregistrées dans PhosphoSite Plus. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Cette position a également été mise en évidence par Wells *et al.* en 1994 (Wells *et al.*, 1994). Dans cette étude visant à caractériser les phosphorylations de l'isoforme α dans les cellules humaines, **S1377** a été identifié comme un site majeur et une cible *in vitro* de CKII. Aucune analyse fonctionnelle ciblée supplémentaire n'a été réalisée sur ce résidu.

vii. « Patch » de résidus phosphorylés

S1391- S1392- S1393: contexte GSVPLSSSPATHF

Dans PhosphoSite Plus, les résidus **S1391**, **S1392** et **S1393** sont répertoriés 14, 8 et 21 fois respectivement. Ces positions sont localisées dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. **S1393** a été identifié par Wells *et al.* en 1995 lors de cette analyse, ils n'ont pas observé de modulation de la phosphorylation en fonction du cycle cellulaire (Wells *et al.*, 1995). De plus, contrairement à **S1391** et **S1392** ce résidu est conservé dans toutes les isoformes α des Top2. Dans nos analyses, les trois positions ont été détectées à l'état phosphorylé simultanément dans chaque analyse. Aucune analyse fonctionnelle ciblée n'a été menée sur ces résidus. Comme elles sont adjacentes dans la séquence, il serait intéressant de chercher un effet synergique de ces trois positions via des mutations ponctuelles non phosphorylables. Il est possible que ces trois résidus phosphorylés au même moment créent une zone chargée négativement ayant un gros impact sur la localisation de l'isoforme α dans la cellule, l'activité de l'enzyme, le recrutement de partenaire et la reconnaissance de l'ADN. De plus ce patch appartient à une séquence consensus prédite par NetPhosK (ExPASy) comme reconnue par 3 kinases différentes, Cdc2, Gsk3 et cdk5.

viii. Positions impliquées dans la ségrégation des chromosomes

S1337 : contexte DEDFSDFDEKT :

Cette position est répertoriée 36 fois dans Phosphosite Plus. Cette position est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Li *et al.* en 2008 ont mené une analyse ciblée sur le résidu **S1337** (Li et al., 2008). Ils ont montré que ce site est un site majeur de phosphorylation substrat de la kinase plk 1. D'un point de vue fonctionnel, ils ont montré que la phosphorylation du résidu **S1337** est indissociable de celle du résidu S1525. Les deux sites sont progressivement phosphorylés en phase S et atteignent un maximum lors de la mitose. Pour finir, les auteurs ont montré que la phosphorylation de l'isoforme α par plk-1 est nécessaire à la ségrégation des chromosomes, cette dernière observation est cohérente avec le fait que des mutations en alanine entraînent une diminution de l'activité de décaténation de l'enzyme. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ces observations : (i) La phosphorylation des deux sites des domaines C-terminaux ont une influence sur la structure tridimensionnelle du domaine et (ii) l'ajout de charges négatives impacte la capacité de ces domaines à interagir avec l'ADN et/ou les partenaires protéiques.

ix. Position située dans le signal de localisation nucléaire.

Signal de localisation nucléaire (NLS) :

En 1996, Mirski *et al.* ont identifié un NLS bipartite dans le domaine C-terminal de l'isoforme α (Mirski et al., 1997). Ce NLS s'étend du résidu K1454 au résidu D1494 et contient deux **domaines basiques** (en gras et police agrandies) et de nombreux **résidus potentiellement phosphorylés** (en gras soulignés police diminuée) :

¹⁴⁵⁴KPDPA**KTKNRRKRK**PSTSDDSDSNFEKIVSKAVTS**KK**SKGESDD¹⁴⁹⁴

De nombreux résidus adjacents aux domaines basiques du NLS sont phosphorylés. Les deux charges négatives apportées par le groupement phosphate pourraient neutraliser les charges positives des résidus basiques du NLS et ainsi affecter l'efficacité de localisation de la protéine dans le noyau.

S1469 : contexte KRKPSTSDSDS

Cette position a été répertoriée 131 fois dans Phosphosite Plus suite à l'analyse de phosphoprotéome de différentes lignées cellulaires humaines cancéreuses et sauvages. Elle est localisée dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. En 2000, Escargueil *et al.* ont identifié et validé cette phosphorylation sur l'isoforme α (mais pas l'isoforme β) de cellules *HeLa* grâce aux anticorps MPM-2 (Escargueil *et al.*, 2000). Ces derniers reconnaissent les épitopes générés sur des protéines phosphorylées lors de la transition G2/M par certains types de kinases (CKII, cdc 2 kinase, NIMA, Polo like kinase, MAP kinase). Ils ont identifié CKII comme responsable de la modification de ce site. Les tests *in vitro* de phosphorylation (CKII) et déphosphorylation sur l'enzyme n'ont révélé aucun impact sur son activité catalytique. Les auteurs avancent l'hypothèse que la phosphorylation de ce site n'a pas de rôle dans la régulation de l'activité catalytique de l'enzyme, mais qu'elle pourrait être impliquée dans la localisation intracellulaire de l'enzyme et son interaction avec des partenaires cellulaires. En effet l'isoforme α possède plusieurs signaux de localisations nucléaires bipartites (NLS). Le NLS le plus fort est situé entre les résidus 1454 et 1497 (Mirski *et al.*, 1997). On peut donc supposer que l'ajout ou la suppression d'un groupement phosphate sur les résidus S/T appartenant à la séquence peptidique du NLS pourrait avoir un impact sur l'importation nucléaire de l'enzyme au cours de la mitose. Un tel effet a été mis en évidence sur la nucleoline (Schwab and Dreyer, 1997).

T1470-S1471-S1474: contexte KRKPSTSDSDS

Ces trois résidus constituent un patch répertorié respectivement 82, 91 et 93 fois dans Phosphosite Plus. Aucune de ces positions n'a fait l'objet d'analyse approfondie. De plus ces positions sont localisées dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Il a été montré que la phosphorylation du résidu S1469 n'affecte pas l'activité de l'enzyme (voir ci-dessus). La phosphorylation simultanée de ces 4 résidus pourrait avoir un fort impact sur la localisation nucléaire de l'enzyme. La prédiction réalisée avec NetPhosK (ExpASY) a révélé que les résidus sont dans une séquence potentiellement reconnue par plusieurs kinases CK2, cdc2, RSK, PKA, PKB, PKG.

S1491-S1495 : contexte VTSKKSKEGSDDFHM

Ces deux positions sont répertoriées 5 et 8 fois dans Phosphosite Plus. Elles sont localisées dans le domaine C-terminal dont aucune structure 3D n'est disponible à l'heure actuelle. Lors de l'identification du NLS des Top2 humaines Mirski *et al.* ont montré que la substitution de la lysine 1492 par une glutamine affecte la localisation efficace de l'enzyme dans le noyau (Mirski et al., 1997). Or les deux sérines potentiellement modifiées sont proches des lysines. Il est probable que la phosphorylation des deux sérines entraîne la neutralisation des charges des lysines qui sont indispensables à la localisation nucléaire de l'enzyme. La modification de ces résidus pourrait limiter l'entrée de l'enzyme dans le noyau et l'élimination de ces phosphorylations permettre à l'enzyme de se localiser dans le noyau au moment de la mitose. Aucune autre étude ciblée n'a été réalisée sur ces résidus.

3. Détection et validation des positions potentiellement acétylées

Les acétylations sont des modifications de première importance dans la cellule. Les HDAC (Histone déacétylase) ont été très largement étudiées car elles régulent l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle par la modification des queues d'histones. En 2000 Tsai *et al.* ont montré que les deux isoformes de Top2 interagissent *in vivo* avec les HDACs dans une région conservée dans toute la famille (Tsai *et al.*, 2000). Comme le suggèrent les auteurs, cette interaction pourrait appartenir à un complexe d'activité de remodelage de l'ADN. Il reste encore à établir si les HsTop2 sont acétylées *in vivo*. À l'heure actuelle, même si quelques acétylations ont été découvertes lors de l'analyse de protéome sur lignée cellulaire (PhosphoSite plus), aucune information *in vivo* ou *in vitro* n'est disponible sur l'état d'acétylation des Top2 humaines. L'analyse que nous avons réalisée est donc nouvelle. Nous avons reporté les sites potentiellement acétylés sur la structure du domaine ATPase de l'isoforme α humaine, ainsi que le corps catalytique (Wei *et al.*, 2005; Wendorff *et al.*). De manière générale la réaction d'acétylation est réalisée par le transfert d'un groupement acétyle (CH_3CO) à partir d'une Acétyl Coenzyme A vers sur une lysine. Cette réaction est catalysée par une lysine transférase (KAT) dont les plus connues sont les HAT (Histone Acétyl Transférase) (Figure 47). Le groupement acétyle neutralise la charge positive du résidu. Comme pour les phosphorylations, le changement de charge local induit des remaniements structuraux sur la protéine entière.

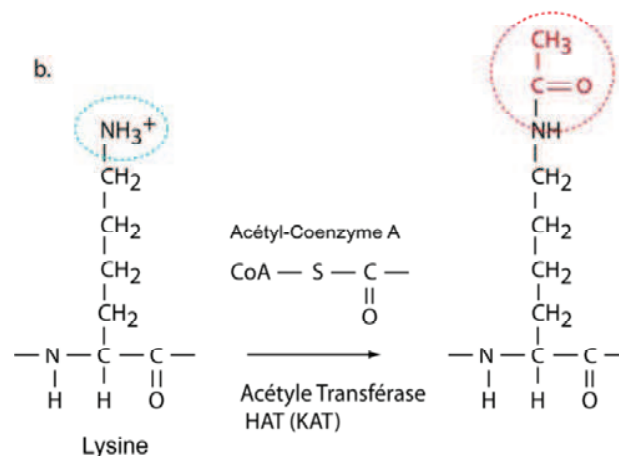


Figure 47 Acétylation d'une lysine catalysée par une acétyl transférase en présence de l'acétyle CoA.

RÉSULTATS : Partie I

La recherche des positions potentiellement acétylées a été réalisée en parallèle de la recherche des phosphorylations.

Sur les enzymes produites en levure *S.cerevisiae*, 5 analyses ont été réalisées, 15 positions potentiellement modifiées ont été détectées. 8 ont été conservées pour interprétations car elles ont été détectées dans la moitié, ou plus de la moitié, des expériences. La position **K1011** a été détectée dans chacune des 5 analyses (Tableau 8).

Tableau 8 Sites d'acétylations potentiels détectés sur l'isoforme α surexprimée dans *S.cerevisiae*. En bleu foncé, les positions dont les spectres ont été validés manuellement. En bleu clair, les positions dont les spectres peuvent être interprétés avec un léger risque d'ambiguïté. La colonne « Détections/5 » est le nombre de fois où le résidu a été détecté comme potentiellement acétylé. La barre bleu est proportionnelle au nombre de détections. ** Les positions retrouvées à chaque analyse. * les positions retrouvées dans la majorité des analyses.

Analyses Orbitrap						
Résidus	CB762	CBE834	CBE922	CBE976-2	CBE976-3	Détections 5
K 168						1
K 207						2
* K 233						3
* K 278						3
* K 480						3
* K 520						3
K 584						0
K 662						1,5
K 949						1
** K 1011						5
* K 1034						3
K 1096						1
K 1106						1
K 1151						2
* K 1186						3
* K 1240						4

RÉSULTATS : Partie I

Sur les 3 analyses menées sur les enzymes produites en cellules de mammifère, 10 positions ont été détectées comme potentiellement acétylées. Il y a probablement eu un problème de sensibilité lors de l'analyse CBE922-3 car une seule position est ressortie de cette analyse bien que 65% de la séquence aient été couverts lors de l'analyse (Tableau 9). 7 positions ont été validées pour l'interprétation, car elles ont été détectées sur la moitié ou plus de la moitié des analyses. En comparant les analyses menées dans les deux systèmes d'expression, aucun site n'a été retrouvé comme unique à la surexpression dans BHK21 et 3 sites sont uniques à la surexpression dans *S.cerevisiae* (Tableau 10).

Tableau 9 Sites d'acétylations potentiels détectés sur l'isoforme α surexprimée dans BHK21. En rouge foncé, les positions dont les spectres ont été validés manuellement. En rouge clair, les positions dont les spectres peuvent être interprétés avec un léger risque d'ambiguïté. La colonne « Détections/3 », est l'addition du nombre de fois où le résidu a été détecté comme potentiellement acétylé. La barre rouge est proportionnelle au nombre de détections. ** Les positions retrouvées à chaque analyse. * les positions retrouvées dans la majorité des analyses.

Analyses Orbitrap				
Résidus	CBE922-3	CBE976-3	CBE039	Détections 3
				0
				1
*				2
				1
				0
*				2
*				2
				0,5
				0
**				3
**				3
				0
				0
				0
*				2
*				2

RÉSULTATS : Partie I

Tableau 10 Comparaison des sites potentiellement acétylés retrouvés dans les deux systèmes d'expression. En bleu, les sites détectés dans *S.cerevisiae* uniquement, en violet, les sites détectés dans **les deux systèmes**. Aucun site propre à **BHK21** n'a été retrouvé

Résidus	Résidus modifiés	
	<i>S.cerevisiae</i>	BHK21
K 168	1	0
K 207	2	1
K 233	3	2
K 278	3	1
K 480	3	0
K 520	3	2
K 584	0	1
K 662	1,5	0,5
K 949	1	0
K 1011	5	3
K 1034	3	1
K 1096	1	0
K 1106	1	0
K 1151	2	0
K 1186	3	2
K 1240	4	2

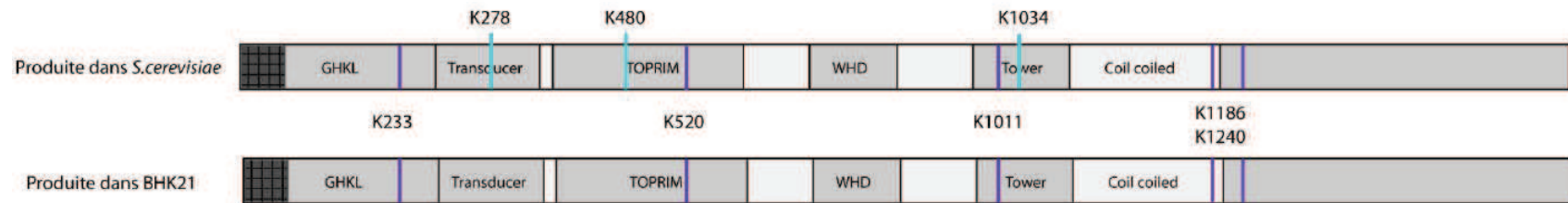


Figure 48 Récapitulatif des positions potentiellement acétylées sur les enzymes produites dans *S.cerevisiae* et **BHK21**. Les **positions communes** au deux systèmes sont représentées en violet. En bleu les positions uniquement trouvées sur les enzymes produites dans *S.cerevisiae*.

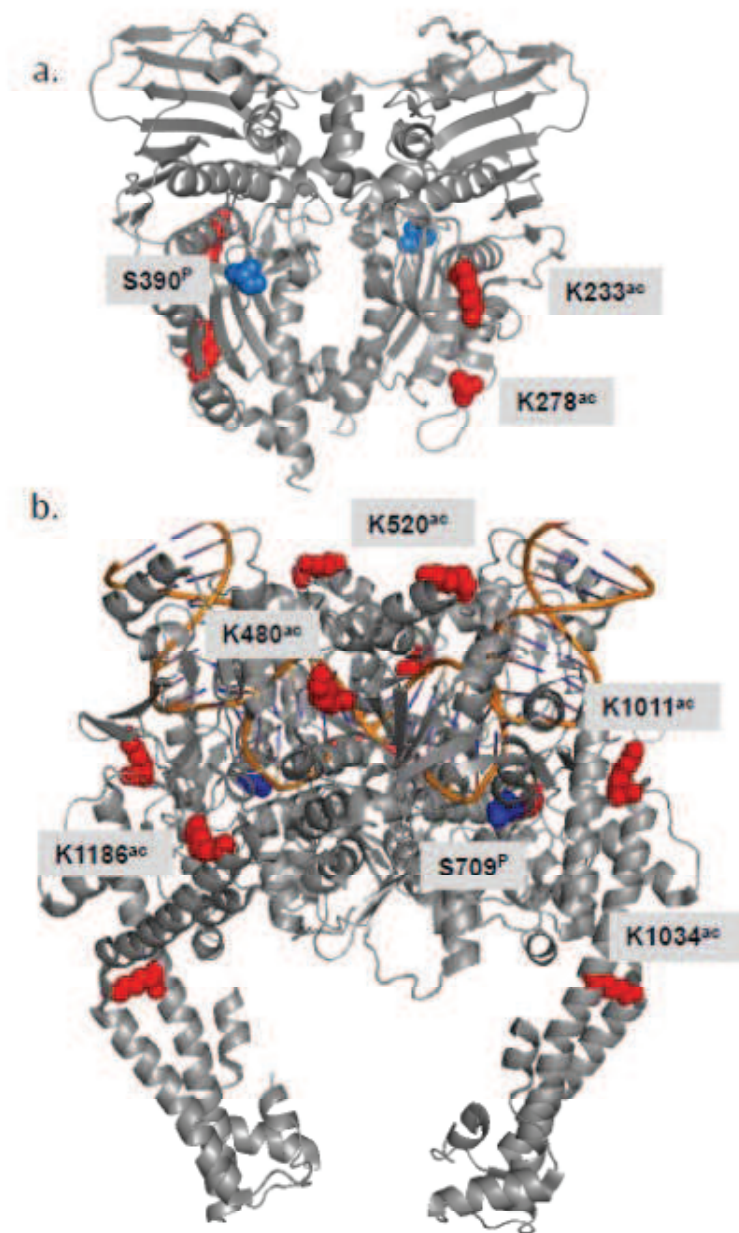


Figure 49 Quelques positions acétylées (Rouge) et Phosphorylées (Bleu) retrouvées dans une majorité d'expériences placées sur les structures du domaine ATPase (PDB : 1ZXM en haut) et du corps catalytique (PDB : 4FM9 en bas) de l'isoforme α humain.

4. Analyse détaillée des acétylations et implications fonctionnelles et structurales

i. Modification pouvant affecter la fixation de brin d'ADN T

K233 : contexte MQSLDKDIVALMVR

Ce résidu est situé dans le domaine ATPase sur le repliement GHKL. Il est positionné en face de la boucle β Hairpin de 22 acides aminés qui est propre aux Top2 eucaryotes, de plus il pointe vers l'extérieur du domaine (Wei et al., 2005). Le rôle de cette boucle n'a pas encore été élucidé. Elle obstrue la cavité centrale formée par les deux monomères, on peut donc faire l'hypothèse qu'elle participe à la régulation de la reconnaissance du brin d'ADN T. La lysine **233** est très conservée parmi les Top2 eucaryotes (Motif LDKD(I/T)(V/L)A), donc l'ajout d'un groupement acétyle sur ce résidu pourrait modifier le positionnement de cette β Hairpin et modifier la capacité de reconnaissance ou la capture du segment d'ADN T (Figure 50a.b.).

K278: contexte DKLDETGNSLK

Cette position est analysée en détail dans le paragraphe 5. Elle est positionnée au niveau du point pivot qui coordonne les mouvements du GHKL et transducer du domaine ATPase (Figure 50a.c.). Nous avons choisi de muter ce résidu en alanine pour étudier l'implication fonctionnelle de ce résidu et de son acétylation potentielle. Voir plus bas.

ii. Modifications pouvant affecter les mouvements d'ouverture et de fermeture du domaine ATPase.

K480 : contexte DKYGVFPLR et K520: contexte KNYEDEDLSK

Ces deux résidus sont situés dans le corps catalytique, domaine TOPRIM de l'enzyme. Ils sont très conservés chez les Top2 eucaryotes. Sur la structure du corps catalytique de l'isoforme α , tous les deux sont orientés vers l'extérieur. Du fait de leurs positions et de leur conservation, il est probable que la modification de ces résidus puisse impacter l'ouverture et/ou la fermeture du domaine ATPase. En 2013 Laponogov *et al.* ont résolu la structure cristallographique de la Topo IV de *Streptococcus pneumoniae* avec le corps catalytique et le domaine ATPase ouvert (Laponogov et al.). Dans cette structure le point de pivot du

domaine ATPase repose sur le domaine TOPRIM dans la zone contenant les deux résidus. Il est possible que l'ajout de groupement acétyle sur ces résidus ait un impact sur l'ouverture et/ou la fermeture de ce domaine (Figure 51a.). En absence de structure équivalente chez les eucaryotes il est difficile d'analyser plus avant les implications possibles de ces modifications (Figure 51b.).

iii. **Impact sur l'ouverture et la fermeture du « C-Gate »**

K1011: contexte **KYDTVLDILR**

La lysine **1011** est proche du brin d'ADN G et elle est située au « sommet » du repliement coiled coil du corps catalytique de l'enzyme. Même si ce résidu est potentiellement trop éloigné de l'ADN pour former une liaison directe, la charge positive de la chaîne latérale peut contribuer à la stabilisation de l'ADN et surtout pourrait participer à la configuration ouverte ou fermée de la région coiled coil du corps de l'enzyme (Figure 51a.). La neutralisation des charges de la chaîne latérale de ce résidu pourrait donc avoir un impact sur le mouvement d'ouverture et de fermeture du C-gate de l'enzyme (Porte C-terminale) (Figure 51d.).

K1034 : contexte **KEWLLGMLGAESAK**

Ce résidu se situe entre les deux hélices qui forment le repliement « coiled coil » du corps catalytique de l'enzyme (Figure 51a.). La chaîne latérale de la lysine est positionnée de manière à pouvoir former une liaison avec la chaîne carbonée de l'hélice adjacente(Figure 51c.). L'ajout d'un groupement acétyle à ce niveau pourrait avoir un gros impact sur le mouvement de ces hélices l'une par rapport à l'autre lors de l'ouverture et de la fermeture du « C-Gate ».

iv. **Modification pouvant influencer la position du domaine C-terminal**

K1186 : contexte **EKQDEQVG**

La lysine **1186** est positionnée sur une hélice α qui fait le lien entre le repliement « coiled coil » et le domaine C-terminal (Figure 51a.). Ce résidu est positionné de manière à pouvoir être impliqué dans une liaison hydrogène avec l'asparagine 894 (Figure 51e.). Un groupement acétyle pourrait donc modifier le positionnement du domaine C-terminal par rapport au corps de l'enzyme.

K1240 : contexte IKNENTEGSPQE

Aucune structure n'est disponible pour cette position qui est située dans le domaine C-terminal.

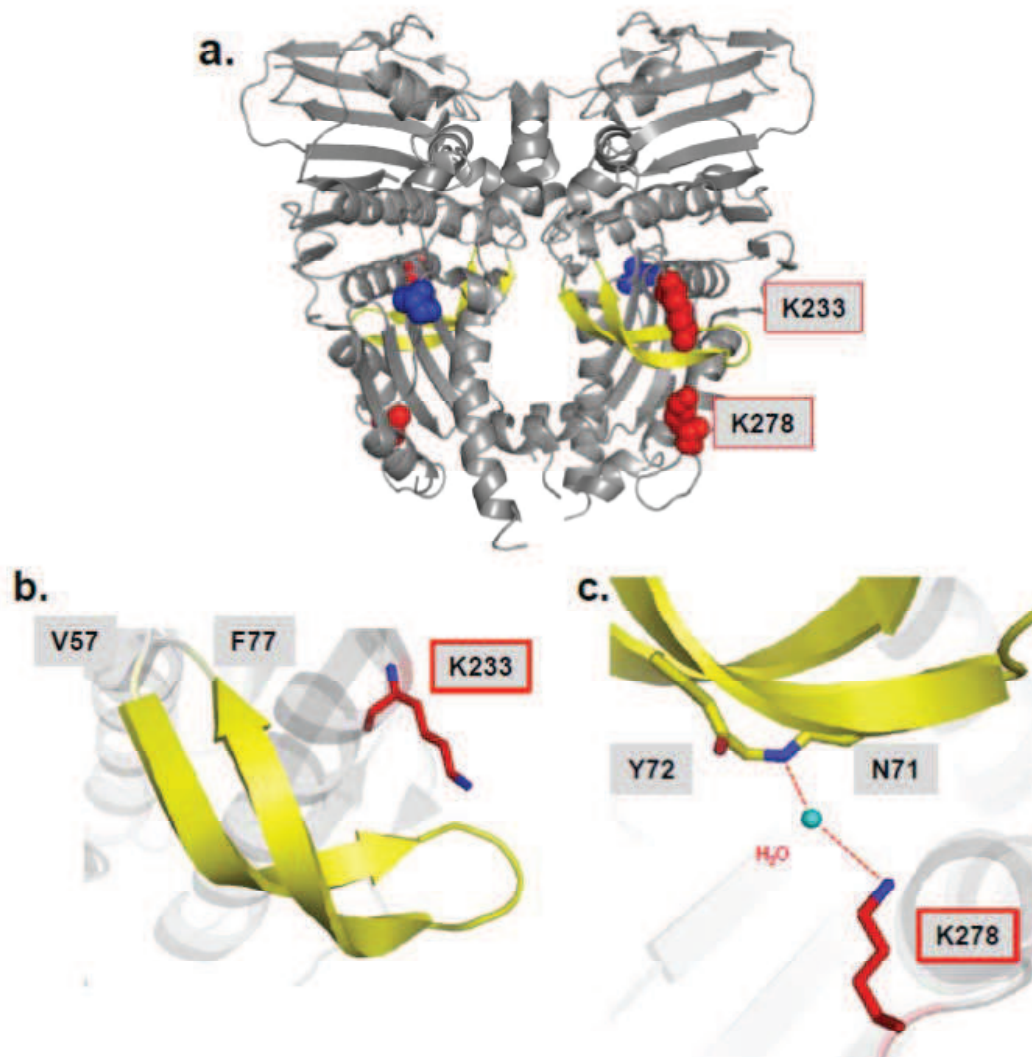


Figure 50 Résidus potentiellement acétylés du domaine ATPase de l'isoforme α . Dans la structure du domaine ATPase résolue en présence d'AMPPNP (a.), le résidu K233 est situé en face de la β Hairpin unique aux Top2 eucaryotes (b.) (PDB : 1ZXM). Une acétylation sur ce résidu pourrait modifier la position de la boucle (Jaune). (c) K278 forme une liaison hydrogène via une molécule d'eau avec la chaîne latérale de la boucle β hairpin (Jaune) (Wei et al., 2005).

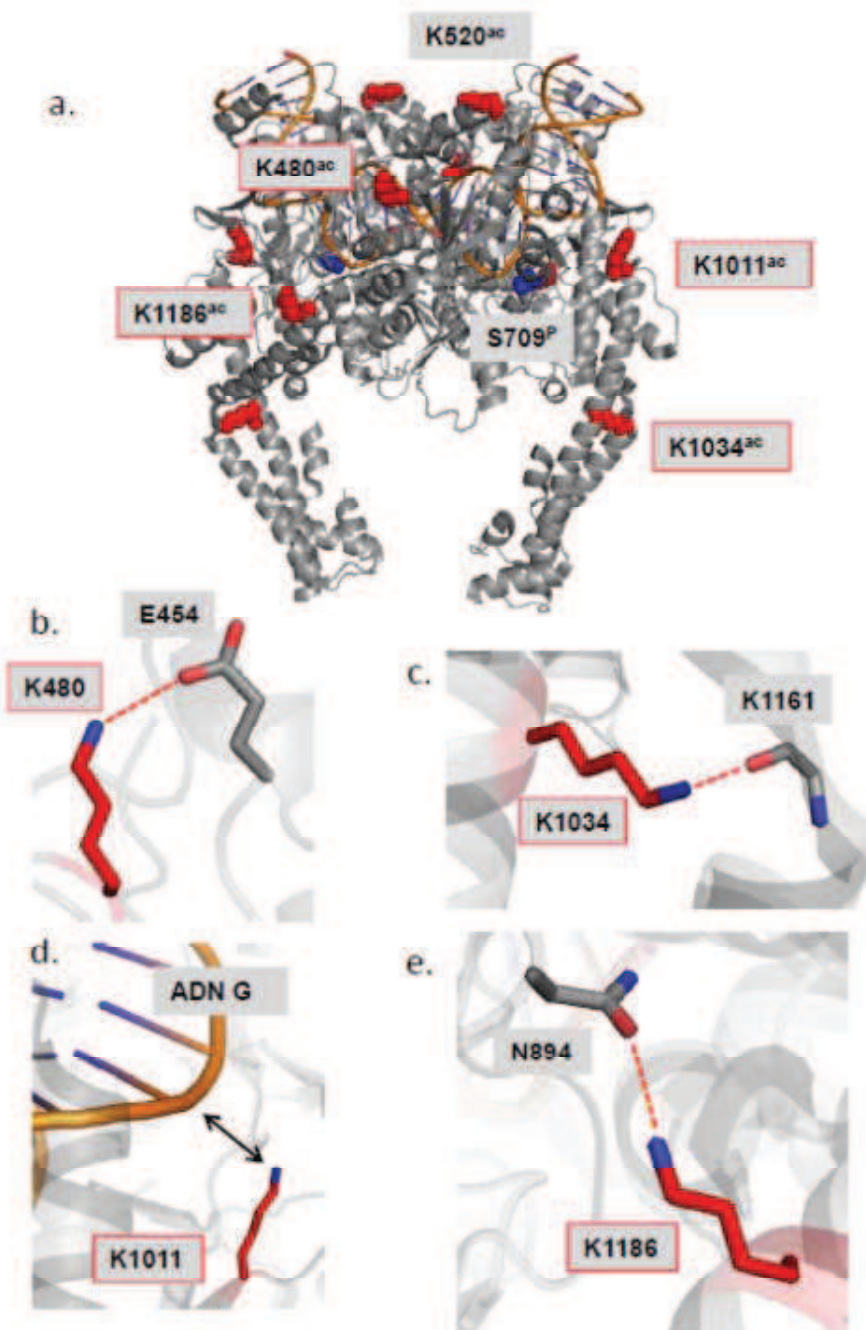


Figure 51 Les positions potentiellement acétylées K480 (b), K1101(d), K1186(e), K1034 (c) situées sur le corps catalytique de l'isoforme α cristallisée en présence d'un oligonucléotide. (a) (PDB ID : 4FM9) (Wendorff et al.).

v. Synthèse des observations réalisées sur les phosphorylations et acétylations retrouvées dans les deux systèmes.

Nous avons réalisé une cartographie des phosphorylations et acétylations présentes sur l'isoforme α recombinant surexprimée dans *S.cerevisiae* et BHK21. Les modifications post-traductionnelles (MPTs) ont un rôle physiologique majeur de régulation de la fonction des protéines dans la cellule. Bien que les deux systèmes d'expression que nous avons utilisés soient eucaryotes et que par conséquent de nombreuses voies de signalisations et familles de protéines (notamment les kinases) soient très proches voire conservées, des différences dans les MPTs même mineures doivent être répertoriées afin de faciliter les études fonctionnelles et structurales de cette enzyme. De plus, ces observations en elles-mêmes constituent une base pour des études approfondies sur le rôle des différents sites modifiés et leurs actions conjuguées dans le recrutement de partenaires cellulaires, la localisation cellulaire de l'isoforme α , la reconnaissance des croisements d'ADN et l'activité enzymatique.

Dans les deux systèmes des sites qui ont été répertoriés et analysés de manière ciblée, nous avons détecté la ségrégation des chromosomes et la sensibilité à l'étoposide comme importantes pour la localisation cellulaire,. De très nombreux sites de modifications ont été relevés et de nombreuses études ont montré que leur modification ciblée pouvait avoir des rôles très variés et que certains sites pouvaient agir de concert. Cependant nos observations sont réalisées sur des protéines recombinantes surexprimées, ces résultats ne sauraient être étendus aux protéines endogènes sans confirmation expérimentale. Nous avons analysé un échantillon hétérogène d'enzymes modifiées qui globalement représente une moyenne des phosphorylations et des acétylations apportées par un système d'expression donné. Nous pouvons conclure de ces résultats que les phosphorylations apportées par les deux systèmes sont équivalents. Cependant nous avons noté quelques différences. Notamment le résidu **S1337** n'est pas phosphorylé dans les cellules BHK21. *Li et al.* ont montré que la phosphorylation de ce résidu agit de concert avec celui du résidu S1525 comme régulateur positif de l'activité enzymatique et qu'un défaut de phosphorylation par plk-1 (dont les deux sites sont les substrats *in vivo*) mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S par un défaut de la ségrégation des chromosomes. Cependant leurs mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées sur des mutants non phosphorylables (alanine). La différence d'activité observée est le résultat de la disparition des chaînes latérales des sérines 1337 et 1524 et non de l'ajout d'un groupement phosphate (dont il n'est pas exclu qu'il pourrait avoir le même rôle *in vivo*). Dans notre cas, aucun des deux systèmes d'expression n'apporte de phosphorylation en S1524. Selon l'observation de *Li et al.* nos

RÉSULTATS : Partie I

protéines recombinantes devraient donc avoir un comportement similaire à leurs observations. Néanmoins nos tests de relaxation sur les deux protéines ne montrent pas de différence significative et les tests d'hydrolyse d'ATP sont conformes à la littérature pour l'isoforme α produite en *S.cerevisiae*. La différence trouvée pour l'isoforme α a pour le moment été mise sur le compte de la dégradation observée sur gel SDS PAGE après la purification des cellules BHK21.

Afin de corrélérer les différences d'activités observées entre les deux systèmes aux PMT, il faudrait réaliser des mesures complémentaires : (i) quantifier les phosphorylations et acétylations ajoutées par chaque système d'expression, (ii) réaliser des mutants ponctuels suivis de tests fonctionnels (relaxation/décaténation/hydrolyse d'ATP) pour chaque position unique à un système d'expression (iii) déphosphoryler et désacétyler les enzymes afin de mettre en évidence l'impact des MPTs sur l'activité des enzymes produites et la différencier d'un repliement 3D qui serait plus favorable dans les cellules BHK21. De plus les phosphorylations sont concentrées sur le domaine C-terminal qui a été prédit comme désordonné. Des études ont déjà reporté des cas de transitions de domaine d'un état désordonné à ordonné par phosphorylation (Johnson, 2009). Il serait intéressant d'analyser si le domaine C-terminal entre dans cette catégorie par RMN ou SAXS par exemple. C'est-à-dire, soumettre le domaine C-terminal complètement déphosphorylé à ce type d'analyse en présence ou en absence de différents types de kinases afin de détecter une différence de structure.

De plus Vassetzky *et al.* ont montré que la phosphorylation du C-terminal augmente son affinité pour les ADN linéaires (Vassetzky et al., 1994). Ce qui dans notre cas est une information non négligeable lorsque nous préparons des complexes protéine/oligonucléotide/étoposide pour la microscopie électronique. La migration de ces complexes sur gels natifs, après d'une part déphosphorylation et incubation en présence de kinase devrait nous indiquer l'importance des MPTs dans la stabilité des complexes que nous utilisons en Cryo-microscopie électronique.

5. Les résidus Lysines 168 et 278

Lors de la recherche des acétylations, deux résidus potentiellement modifiés ont attiré notre attention, la lysine 168 et la lysine 278.

Le résidu 168 est situé dans la poche de fixation et d'hydrolyse de l'ATP et plus particulièrement dans « l'ATP lid » qui est fortement conservé chez les Top2 eucaryotes (Figure 52A.). L'« ATP lid » appartient au domaine GHKL (ADN Gyrase HSP90 Histidine Kinase Mut L) et forme une boucle qui se referme sur la poche de fixation de l'ATP en fonction de l'étape catalytique de l'enzyme (Dutta and Inouye, 2000). En 2005 Wei *et al.* ont résolu la structure cristallographique du domaine ATPase de l'isoforme α humaine (Figure 54) (Wei et al., 2005). Cette structure montre que la lysine 168 forme une liaison hydrogène avec le phosphate α de l'ATP (Figure 54A.). La lysine semble être impliquée dans la stabilisation de l'ATP dans la poche. Un groupement acétyle sur ce résidu pourrait venir perturber la fixation et/ou la stabilisation de l'ATP et donc ralentir ou inhiber l'entrée et/ou la sortie des molécules d'ATP dans la poche. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons dans un premier temps cherché à comprendre le rôle du résidu lysine dans l'hydrolyse d'ATP en produisant une protéine entière avec la Lysine 168 mutée en Alanine (K168A), puis le domaine ATPase comportant la même mutation pour des analyses structurales. Cette mutation abolit l'environnement électrostatique du résidu lysine notamment la liaison hydrogène avec l'ATP.

Le résidu K278 est situé à l'extérieur du domaine ATPase entre les domaines GHKL et transducer. Ce résidu appartient à un motif KDK conservé chez les isoformes α et β (Figure 52B.). Dans les structures de Wei *et al.* ce résidu est placé de manière à pouvoir créer une liaison hydrogène avec une molécule d'eau placée en face d'un groupe carbonyle de la boucle de 22 acides aminés, boucle β « Hairpin » conservée et propre aux Top2 eucaryotes, (Figure 53 a b.). De plus le point de pivot permettant le mouvement des domaines GHKL et transducer l'un par rapport à l'autre se situe sur le même plan que ce résidu. Il est donc possible que l'ajout d'un groupement acétyle perturbe ce point de pivot en modifiant les liaisons entre ce résidu et la boucle β « Hairpin », limitant ainsi la transduction du mouvement entre le domaine ATPase et le corps de l'enzyme. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons analysé le comportement de l'enzyme entière lorsque ce résidu est muté en alanine, c'est-à-dire lorsque les charges correspondant à ce résidu sont éliminées.

RÉSULTATS : Partie I

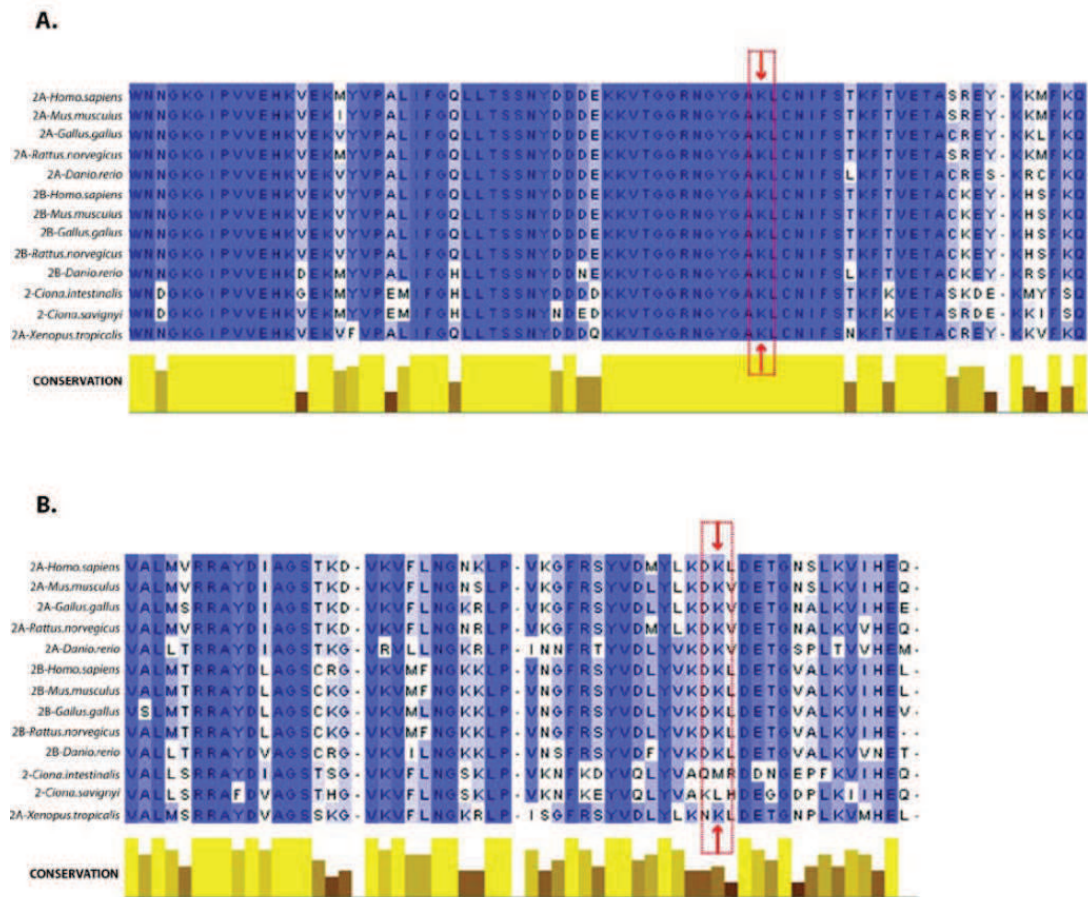


Figure 52 Alignement multiple de Top2 eucaryotes avec le programme Jalview. A. Alignement de la zone encadrant l'ATP lid. La flèche rouge pointe le résidu K168. B. Alignement sur la zone encadrant le résidu K278 pointé par la flèche rouge. Les résidus sont colorés avec différentes intensités de bleu en fonction de leurs conservations. Les plus intenses sont les plus conservés et inversement.

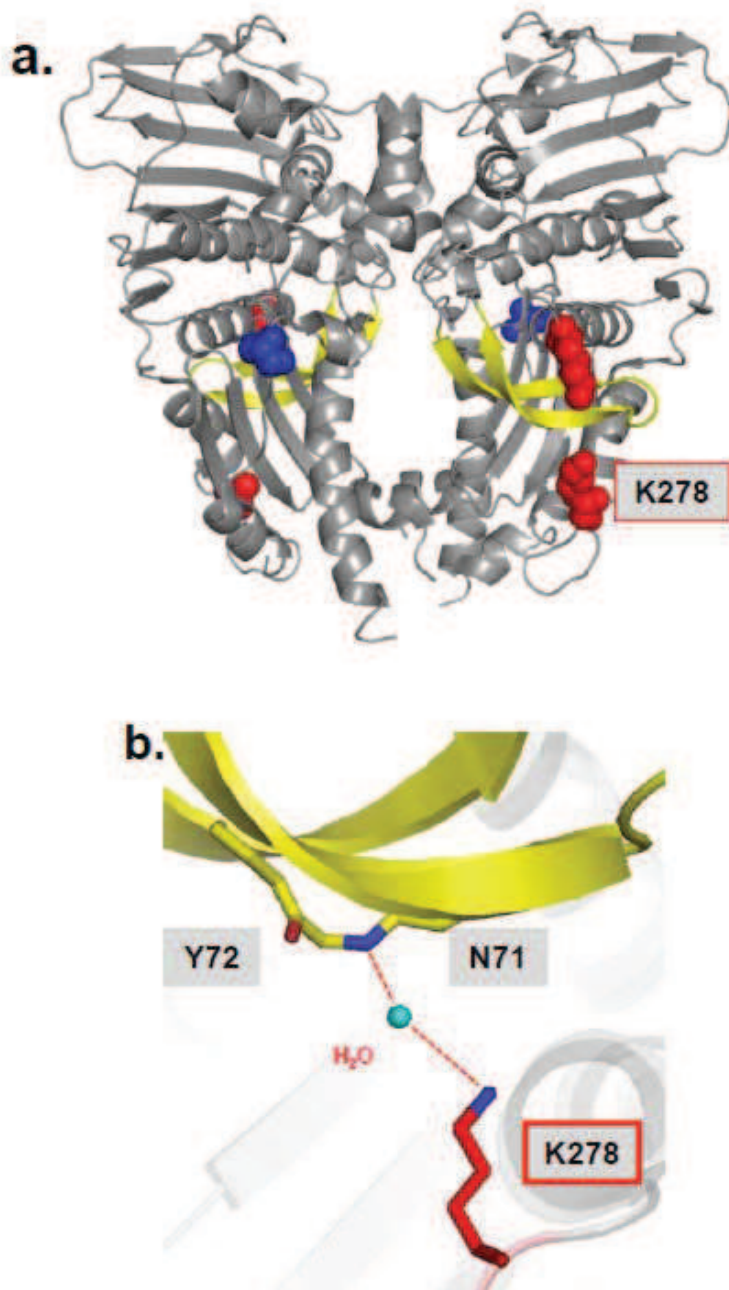


Figure 53 Position K278 potentiellement acétylé. a. Le résidu K278 est positionné sur le domaine ATPase entre les domaines GHKL et Toprim (PDB :1ZXM). b. La lysine K278 forme une liaison hydrogène avec la boucle β hairpin unique aux Top2 eucaryotes via une molécule d'eau.

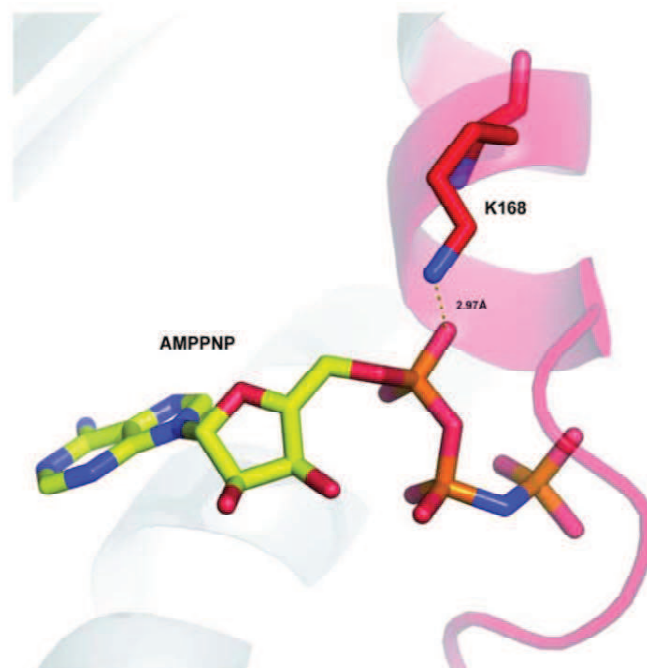


Figure 54 Le résidu K168 est engagé dans une liaison hydrogène avec le phosphate γ de l'AMPPNP dans la structure du domaine ATPase de l'isoforme α (PDB : 1ZXM).

6. Les Mutants K168A et K278A

Les deux mutants ont été sous-clonés et purifiés de la même manière.

i. Clonage, production et purification des mutants

Nous avons introduit les mutations en une étape PCR en utilisant le kit « Quick change II XL Site-Directed Mutagenesis » (Agilent Technologies). Ce kit est basé sur la technique de mutagenèse dirigée par « rolling circle ». Les mutants ont été produits et purifiés avec les protocoles mis en place pour l'enzyme sauvage (Figure 55a.b.). Les rendements et la qualité des enzymes sont équivalents à ceux de l'isoforme α sauvage.

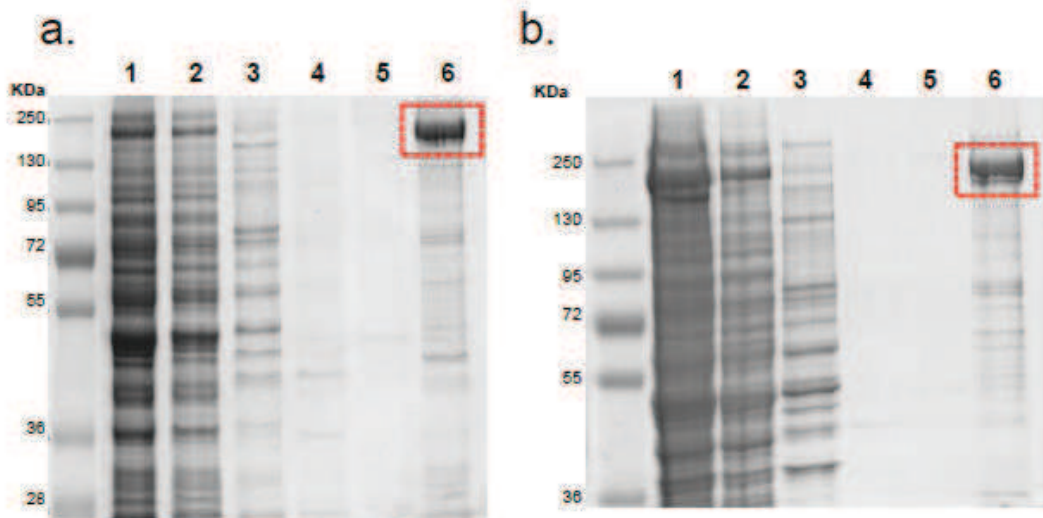


Figure 55 Purification des mutants ponctuels K1681 a. et K278A b. Les éluats de la première étape de purification montrent un enrichissement important et équivalent à l'enzyme non muté. 1 : extrait total, 2 : Flow through protéines non retenues, 3, 4, 5 : lavages à 20 mM 35 mM 60 mM Imidazole, 6 : éluât.

ii. Les analyses fonctionnelles des mutants

✓ Les tests de relaxation d'un ADN plasmidique surenroulé

Nous avons réalisé des tests de relaxation d'ADN plasmidique sur les deux mutants.

Le mutant K278A : est actif en relaxation dès la concentration de 9nM (Figure 56a.). Nous avons vu que l'enzyme sauvage est active dès 8nM d'ADN plasmidique (paragraphe C ci-dessus) Nous en avons conclu que cette mutation n'affecte pas l'activité de relaxation de l'enzyme. De plus la constante catalytique (K_{cat}) de ce mutant est identique à l'enzyme sauvage. Cette mutation n'affecte pas l'activité de l'enzyme ni pour le passage de brins, ni pour l'hydrolyse d'ATP.

Le mutant K168A : est inactif dans les tests de relaxation de l'ADN. (Figure 56b.) La mutation abolit complètement l'activité de passage de brin d'ADN de l'enzyme. Cependant cette mutation n'affecte pas la capacité de l'enzyme à fixer et cliver un ADN double brin, comme le montre le test de clivage (Figure 56c.). Le résidu K168 est donc indispensable pour l'activité de passage de brin de l'enzyme mais ne semble pas avoir d'impact sur la capacité de fixation et de clivage de l'enzyme. Ce résultat est appuyé par les observations faites sur la structure de Wei *et al.* (Wei et al., 2005). La position du résidu dans la poche de

fixation de l'ATP indique qu'il pourrait avoir un rôle majeur dans la stabilisation de l'ATP et donc dans la transmission du signal de l'hydrolyse au reste de la molécule (Figure 54).

✓ Tests de décaténation sur le mutant K168A

Nous avons réalisé des tests de décaténation d'un réseau d'ADN pour valider l'abolition de l'activité de passage de brins du mutant K168A (Figure 57) Ces tests consistent à mettre les protéines en présence de réseaux d'ADNk (ADN kinétoplastique). Les Top2 agissent en séparant deux ADNs entrecroisés. On observe l'activité de décaténation par l'apparition d'ADN minicercle de 2.5Kb lors de la migration sur gel d'agarose alors que l'ADNk reste dans le puits.

Nous avons observé que le mutant est totalement inactif comparé à l'enzyme sauvage dont on peut observer une bande d'ADN 2.5Kb jusqu'à 5nM d'enzyme (Figure 57). Nous avons confirmé que le mutant K168A ne possède plus d'activité de passage de brins, que ce soit en présence d'ADN surenroulé (tests de relaxation) ou en présence d'ADN caténé. Le résidu lysine K168 est donc directement impliqué dans le cycle catalytique de l'enzyme. Ce résidu est donc un point charnière de la coordination de l'hydrolyse d'ATP et le passage des brins d'ADN par le corps de l'enzyme.

RÉSULTATS : Partie I

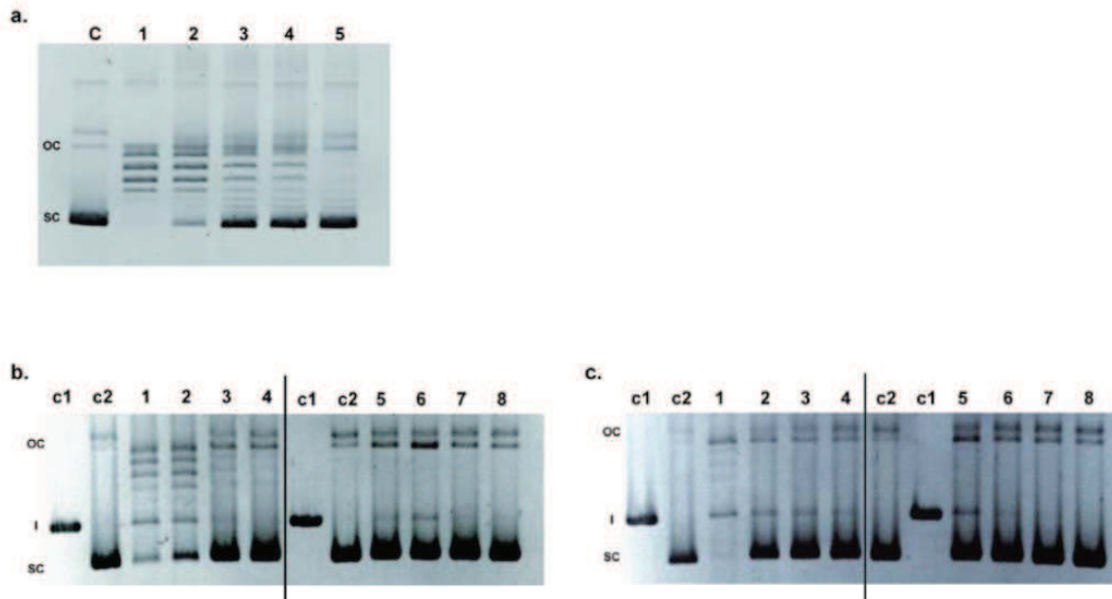


Figure 56 Tests de relaxation et clivage des mutants K168A et K278A. oc = open circular , ADN avec une coupure simple brin, sc = supercoiled, ADN surenroulé. a. Test de relaxation du mutant K278A. c= contrôle contenant de l'ADN surenroulé sans protéine. de 1 à 5 : 72 nM, 36nM, 18 nM, 9nM, 4,5 nM de Top2 K278A pour une concentration constante d'ADN 100ng. b. Test de relaxation de Top2 sauvage et Top2 mutante K168A. c1 = contrôle sans protéine contenant de l'ADN linéarisé, c2= contrôle sans protéine contenant de l'ADN surenroulé. de 1 à 4 72nM, 36nM, 18nM et 9nM de Top2 sauvage. De 5 à 8 72nM, 36nM, 18nM et 9nM de Top2 K168A. c. Test de clivage en présence d'étoposide. Les contrôles sont les mêmes que pour b. 1 à 4 72nM, 36nM, 18nM et 9nM de Top2 sauvage. De 5 à 8 72nM, 36nM, 18nM et 9nM de Top2 K168A.

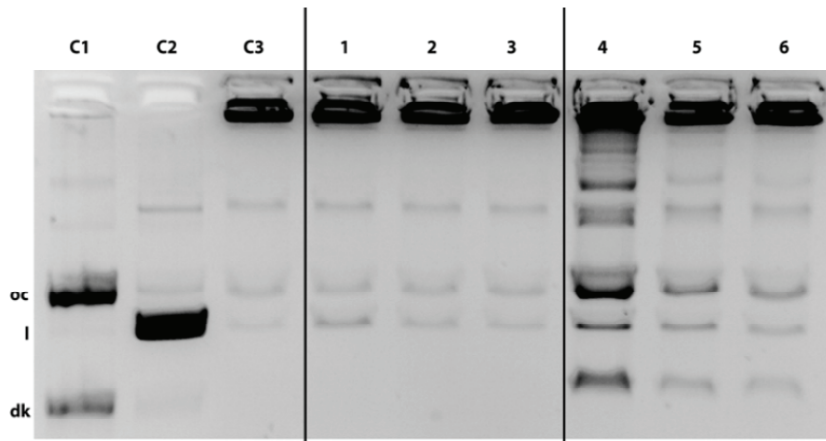


Figure 57 Tests de décaténation du mutant HsTop2 K168A. c1 = contrôle dans protéine ADN décaténé c2= contrôle sans protéine ADN linéaire c3 = contrôle sans protéine ADN caténé. oc = open circular, ADN avec une coupure simple brin I= ADN linéaire dk= ADN décaténé. De 1 à 3 43nM, 13 nM et 5 nM de mutant K168A. de 4 à 6 43 nM, 13nM, 5nM d'enzyme sauvage.

RÉSULTATS : Partie I

✓ Détermination des constantes cinétiques, K_{cat} et K_m , du mutant K168A.

Afin de vérifier dans quelle mesure la mutation du résidu K168 impacte l'hydrolyse de l'ATP, nous avons déterminé les constantes cinétiques K_{cat} et K_m de ce mutant. Nous avons utilisé le même protocole que celui décrit pour l'enzyme sauvage. Une concentration en enzyme 5 fois supérieure à la concentration habituelle en Top2 (375 nM au lieu de 72 nM) a été nécessaire pour pouvoir détecter la consommation d'ATP.

Les constantes catalytiques et de Michaelis ont été déterminées avec les valeurs respectives de **$K_{cat} = 0,31 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$** **$K_m = 205 \pm 60 \text{ }\mu\text{M}$** (Figure 58). L'efficacité catalytique (K_{cat}/K_m) du mutant est par conséquent de **$k_{eff} = 1,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$** . Il a été précédemment établi que l'isoforme α sauvage que nous produisons en levure *S.cerevisiae* possède un **$K_{cat} = 2 \pm 0,035 \text{ s}^{-1}$** et un **$K_m = 280 \pm 90 \text{ }\mu\text{M}$** avec une efficacité de **$k_{eff} = 7,14 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$** . Le mutant K168A est donc 4,6 fois moins efficace que l'enzyme sauvage que nous produisons (Tableau 11).

RÉSULTATS : Partie I

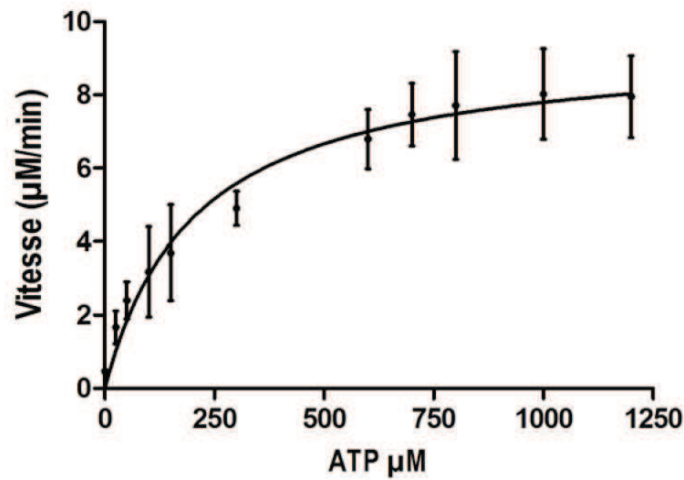


Figure 58 Vitesse d'hydrolyse d'ATP du mutant K168A en fonction de la concentration en ATP. La cinétique a été réalisée en triplicatas.

Tableau 11 Constantes cinétiques du mutant K168A comparé à l'enzyme sauvage.

	Constante Catalytique $K_{cat} \text{ s}^{-1}$	Constante de Michealis $K_m (\mu\text{M})$	Efficacité catalytique $(K_{cat}/K_m) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Sauvage	2	280	7,14
Mutant K168A	0,3	205	1,50

Nous avons observé que la constante de Michealis, K_m , est équivalente pour l'enzyme sauvage produite en levure et le mutant. C'est-à-dire que l'activité maximale des deux enzymes est atteinte pour une quantité en substrat équivalente. L'affinité pour l'ATP est la même pour les deux enzymes. Cependant le « turn-over » du mutant est 6 fois inférieur à celui de l'enzyme sauvage. Nous pouvons donc en conclure que la mutation de la lysine 168 en Alanine affecte l'hydrolyse de l'ATP sans affecter la fixation de ce dernier. Il est probable que le positionnement de la molécule d'ATP dans la poche avant le déclenchement de l'hydrolyse ne soit pas optimal ou que la libération des produit ADP + Pi soit affectée.

Nous avons voulu vérifier si l'abolition complète de l'activité de relaxation était corrélée à la baisse de l'efficacité de l'enzyme de 4,6 fois. En augmentant la quantité d'enzyme on devrait pouvoir observer des intermédiaires de relaxation. Nous avons donc réalisé un test de relaxation d'ADN plasmidique en augmentant le ratio molaire ADN:Protéine à 1:2,5 et 1:6,5. Aucune activité du mutant n'est détectée lors de ce test (Figure 59). Nous pouvons en

RÉSULTATS : Partie I

conclure que la lysine 168 intervient dans la stabilisation de l'ATP et qu'elle est indispensable pour l'activité de passage de brin du corps catalytique de l'enzyme.

L'ensemble des résidus de la poche de fixation de l'ATP forme un réseau d'interaction permettant un positionnement correct de l'ATP. Toute modification dans ce réseau serait susceptible de venir perturber l'efficacité de l'hydrolyse de l'ATP et donc le cycle catalytique de l'enzyme de manière plus ou moins importante en fonction du résidu modifié. West *et al.* en 2002 ont mené une étude similaire (West et al., 2002). Ils ont muté la sérine 165 de l'isoforme β en Arginine (S148 chez l'isoforme α). Ce résidu est situé dans l' « ATP lid ». Ce mutant a les mêmes caractéristiques que le nôtre. Le K_{cat} est diminué de 7 fois, l'activité de passage de brin diminuée de 80%, mais aucun impact n'a été révélé sur le clivage et la fixation de l'ADN.

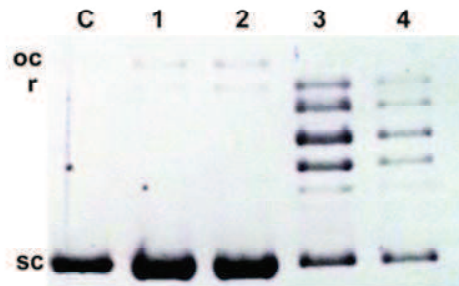


Figure 59 Augmentation de la concentration de K168A en test de relaxation. C = contrôle sans protéine. oc = open circular, ADN avec une coupure simple brin, r = ADN relâché, sc = ADN surenroulé. 1 et 2 enzyme mutant K168A au ratio de 1:2.5 et 1:6.5 (ADN : Protéine, en ng). 3 et 4 enzyme sauvage au ratio 1:2.5 et 1:6.5.

7. Analyses structurales du domaine ATPase du mutant K168A

Nous avons entamé une étude structurale du domaine ATPase du mutant K168A par cristallographie aux rayons X pour mettre en évidence l'impact de cette mutation sur le réseau de stabilisation de l'ATP.

i. Clonage production et purification du domaine ATPase du mutant K168A

Le domaine ATPase de l'isoforme α a été cristallisé par Wei *et al.* en 2005 en présence d'AMPPNP (Adénylyl-imidodiphosphate = analogue non hydrolysable de l'ATP) + SO_4^{2-} (PDB ID :1ZXM) à une résolution de 1.86 Å et en présence d'ADP (Adénosine-diphosphate) (PDB ID = 1ZXN) à une résolution de 2.51 Å (Wei *et al.*, 2005). Je ferai référence à ces structures par la notation HT2ATPsauv. (Domaine ATPase de HsTop2 α sauvage) et HT2ATP168 (domaine ATPase de HsTop2 α mutant K168A). Le clonage de HT2ATP168 a été réalisé en se conformant dans la mesure du possible au protocole publié par Wei *et al.* Nous avons amplifié la partie du gène correspondant au domaine ATPase à partir du plasmide pYE2.1-K168A (ci-dessus). Les bornes du domaine correspondent aux résidus 29 à 428, comme définis dans la partie matériel et méthode de l'article. Le produit de l'amplification a été introduit dans deux vecteurs différents. Un plasmide pSKB2-10His, qui a déjà été utilisé avec succès dans l'équipe pour produire le domaine ATPase de l'ADN Gyrase avec une étiquette 10 histidines, et un pET-6His-MBP-TEV qui permet la production en fusion avec la Maltose Binding Protein.

✓ La construction pSKB2-10His :

La séquence HT2ATP168 a été introduite entre les sites de restriction EcoRI et XhoI. En phase avec le site de coupure à la PPX (PreScission protease) et l'étiquette 10 histidines en 5' du gène. Après coupure de l'étiquette, 19 résidus excédentaires sont conservés en N-terminal de la protéine produite (alignement ci-dessous). La protéine recombinante exprimée avec cette construction est en partie insoluble.

✓ La construction pET-6His-MBP-TEV:

La séquence HT2ATP168 a été introduite par clonage LIC (Ligation Independent Cloning). Elle est en phase avec la séquence de coupure à la TEV protéase (Tobacco Etch Virus) et la protéine MBP (Figure 60). La MBP est une protéine bactérienne utilisée comme

RÉSULTATS : Partie I

étiquette favorisant la solubilité et le repliement des protéines insolubles (Kapust and Waugh, 1999; Nallamsetty and Waugh, 2007). 2 résidus excédentaires sont présents en N-terminal de HT2ATP168 après coupure à la TEV (alignement ci-dessous). Ces deux résidus ne se trouvent pas directement à l'interface de cristallisation dans les structures de Wei *et al.* Cependant pour être certain que la protéine produite est la même que celle publiée, nous avons éliminé ces deux résidus par mutation ponctuelle avec le kit quikchange XL site-directed mutagenesis (Agilent).

<p style="margin: 0;">SVERIQKK GPHMASMTGGQQMGRGSEFVERIQKK SNAVERIQKK SVERIQKK</p>	<p><i>Wei et al. 2005</i> <i>pSKB2-HT2ATP168-10His</i> <i>pET-6His-MBP-TEV-HT2ATP168</i> <i>pET-HT2ATP168-TEV2-MBP</i></p>
---	--

Les caractéristiques de la protéine HT2ATP168 produite calculées avec le serveur ExPASy ProtParam, sont les suivantes :

Protéine	Taille (Nombre d'AA)	Masse moléculaire (KDa)	Point isoélectrique
HT2ATP168-MBP	784	88	6,8
MBP	386	42,5	5,4
HT2ATP168	400	45,7	8,9

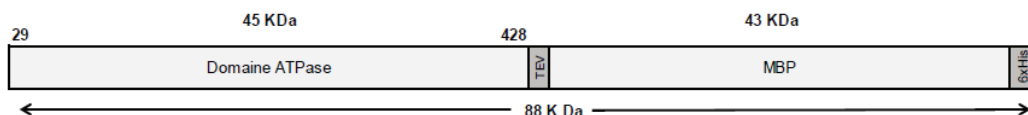


Figure 60 Protéine recombinante fusion HT2ATP168-MBP-6His. Cette protéine est issue du plasmide pET-6His-MBP-TEV à une taille de 88KDa. La MBP est éliminée par coupure à la TEV. Lors de la purification, la distinction sur gel entre HT2ATP168 de 45KDa et la MBP de 43KDa est délicate.

RÉSULTATS : Partie I

✓ Production et purification avec la construction pET-6His-MBP-TEV6 HT2ATP168:

Nous avons constaté que lors de la surexpression les cellules ont une forte croissance. Une partie non négligeable de la protéine surexprimée est insoluble. La purification est réalisée en 5 étapes (Figure 63a.). Après passage de l'extrait soluble sur colonne nickel, le gel SDS PAGE révèle une protéine enrichie à la taille attendue de 88KDa. L'éluât de la colonne nickel est ensuite passé sur colonne héparine et le gradient d'éluion permet de séparer de nombreux contaminants de la protéine d'intérêt. En effet 4 pics à un OD_{280nm} sont enregistrés à la sortie de la colonne tout au long du gradient d'éluion en NaCl (Figure 61) Les fractions G4 à G7 ont été rassemblées, environ 33 mg de protéine sont ainsi récupérés et digérés à la TEV. Après coupure, on récupère environ 10mg de protéine, une partie de HT2ATP168 a certainement précipité après séparation de la MBP. Le mélange est passé sur une colonne soustractive Q-Sépharose, échangeuse d'anions. Lors du passage du mélange sur la colonne équilibrée à pH7,4, la MBP-6His reste accrochée car sa charge globale est négative ($pI = 5,2$) et la HT2ATP168 passe sans s'accrocher car sa charge globale est positive ($pI = 8,9$) (Figure 63a.).

RÉSULTATS : Partie I

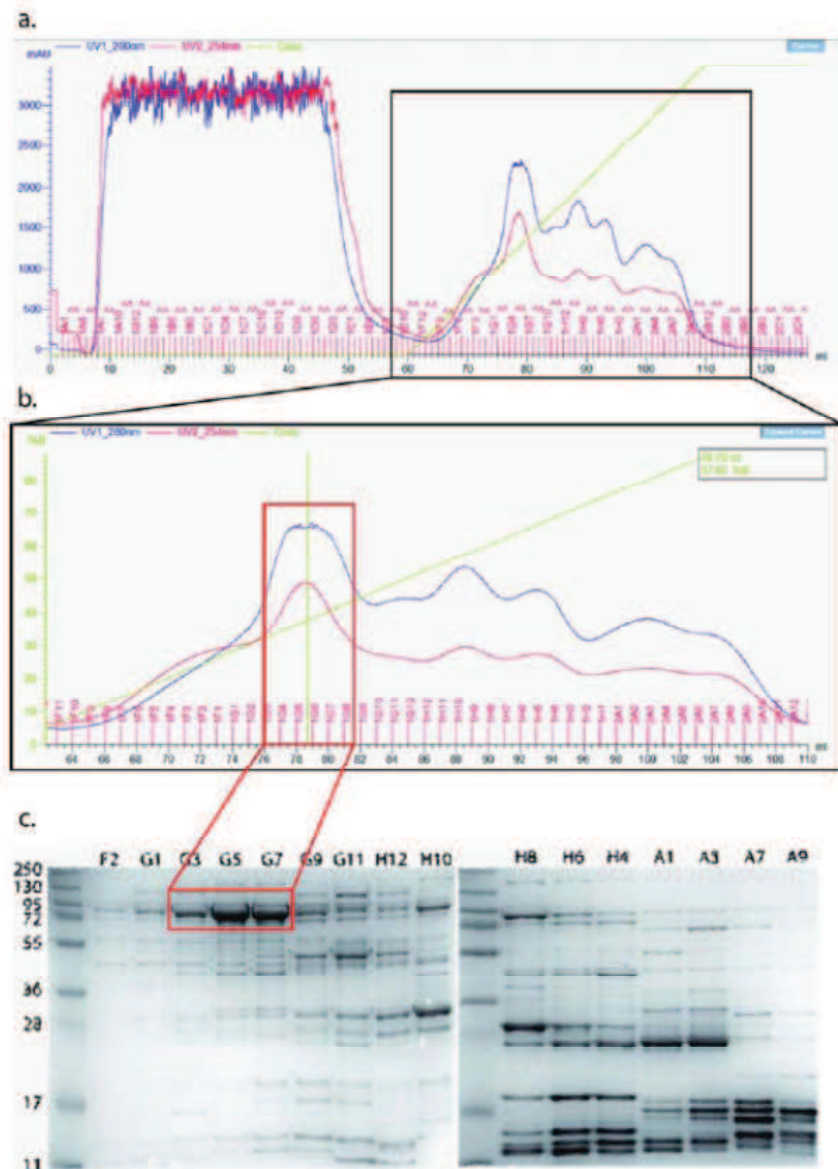


Figure 61 Chromatographie sur colonne héparine de HT2ATP168. a. Élué par un gradient de 150mM à 1M NaCl. Le volume d'élué (ml) en fonction de l'absorbance (mAU) En rouge OD_{260nm} et les fractions, en bleu OD_{280nm}, en vert le % de tampon B à 1M NaCl. La première partie du chromatogramme a une absorbance saturée. C'est la charge de l'échantillon sur la colonne. Les protéines sont éluées à différents % en tampon B dans le gradient NaCl. b. Zoom sur les pics d'élués. Le chromatogramme est représenté en fonction de % de tampon B. Il y a 4 pics d'élué. Le premier pic atteint son maximum à 37,6 % de B Il contient la protéine d'intérêt à la taille attendue 88KDa. c. Les autres pics contiennent des contaminants ou des produits de dégradation.

RÉSULTATS : Partie I

Lors du premier essai nous avons récupéré suffisamment d'enzyme en sortie de chromatographie d'exclusion pour réaliser des essais de cristallisation dans les conditions publiées. Cependant aucun cristal ne s'est formé. Nous avons donc réalisé un deuxième essai avec la construction mutante modifiée (Voir ci-dessus). Lors de ce deuxième essai nous avons estimé que la protéine récupérée en sortie de la Q-Sépharose pouvait être utilisée sans passer par un gel filtration pour des tests de cristallisations dans les conditions indiquées dans l'article d'origine. Nous avons obtenu des cristaux après 24 heures à 24°C en présence d'ADP. Cependant l'analyse aux rayons X a révélé que nous étions en présence de cristaux de sels. Nous avons alors décidé de simplifier le protocole de purification et de valider toutes les étapes (production, purification et cristallisation) sur le domaine non muté dont les conditions de cristallisations sont connues en présence d'ADP et d'AMPPNP.

- ✓ Optimisation du protocole de purification et validation du protocole sur le domaine non muté et muté :

Cette optimisation a été réalisée avec l'aide du chercheur associé à la plateforme d'expression des protéines, le Dr Eduardo Howard. Dans un premier temps nous avons voulu valider le protocole de purification et de cristallisation sur le domaine HT2ATPsauv non muté, car nous savons que cette construction a déjà été cristallisée et constitue donc un bon point de référence.

Les étapes de production et de lyse des cellules n'ont pas été modifiées. Une première chromatographie d'affinité aux ions nickel est utilisée pour sélectionner les constructions 6His-MBP-TEV-HT2ATPsauv de l'extrait cellulaire soluble (Figure 63b.). Le protocole de purification original ne prenait pas en compte l'étiquette MBP lors des étapes de purification. L'élution de la première colonne Nickel (affinité 6His) est donc chargée sur une colonne héparine (affinité par HT2ATPsauv), et l'élution de cette colonne est chargée sur une colonne amylose (affinité pour MBP) afin d'éliminer les contaminants restants. La 6His MBP et la HT2ATPase sont ensuite séparées par coupure à la protéase TEV et l'ensemble est passé sur une colonne d'affinité aux ions nickel pour séparer l'enzyme d'intérêt HT2ATPsauv, de la MBP-6His, des constructions non coupées et de la protéase TEV présente dans le milieu. La HT2ATPase qui passe au travers de la colonne d'affinité aux ions nickel est retenue sur une colonne héparine pour éliminer l'imidazole utilisé dans l'étape précédente (Matériels et méthodes) (Figure 63b.). Ce protocole permet d'obtenir environ 5 mg de protéine purifiée. Les essais de cristallisation ont été réalisés à partir de la protéine purifiée ensuite dialysée et concentrée.

RÉSULTATS : Partie I

Nous avons appliqué ce protocole sur le mutant K168A (Figure 62). Tous les résultats sont identiques. Nous avons donc décidé de conserver ces protocoles pour les purifications de cette protéine lors de la suite du projet.

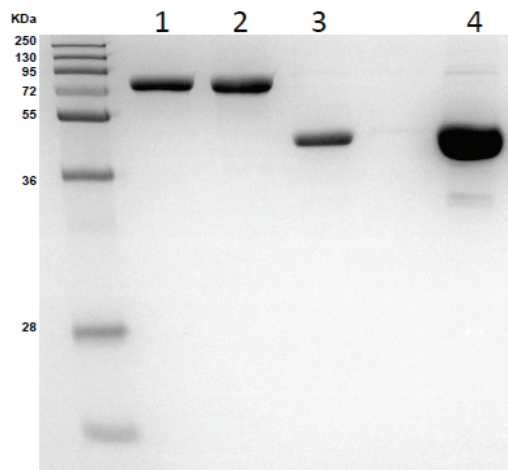


Figure 62 Gel SDS PAGE de la purification de HT2ATP168 avec le protocole optimisé. 1 et 2 la protéine avant la coupure à la TEV 3 : l'enzyme après la coupure à la TEV 4 : la protéine éluée de la colonne héparine prête à être utilisée pour les essais de cristallisation.

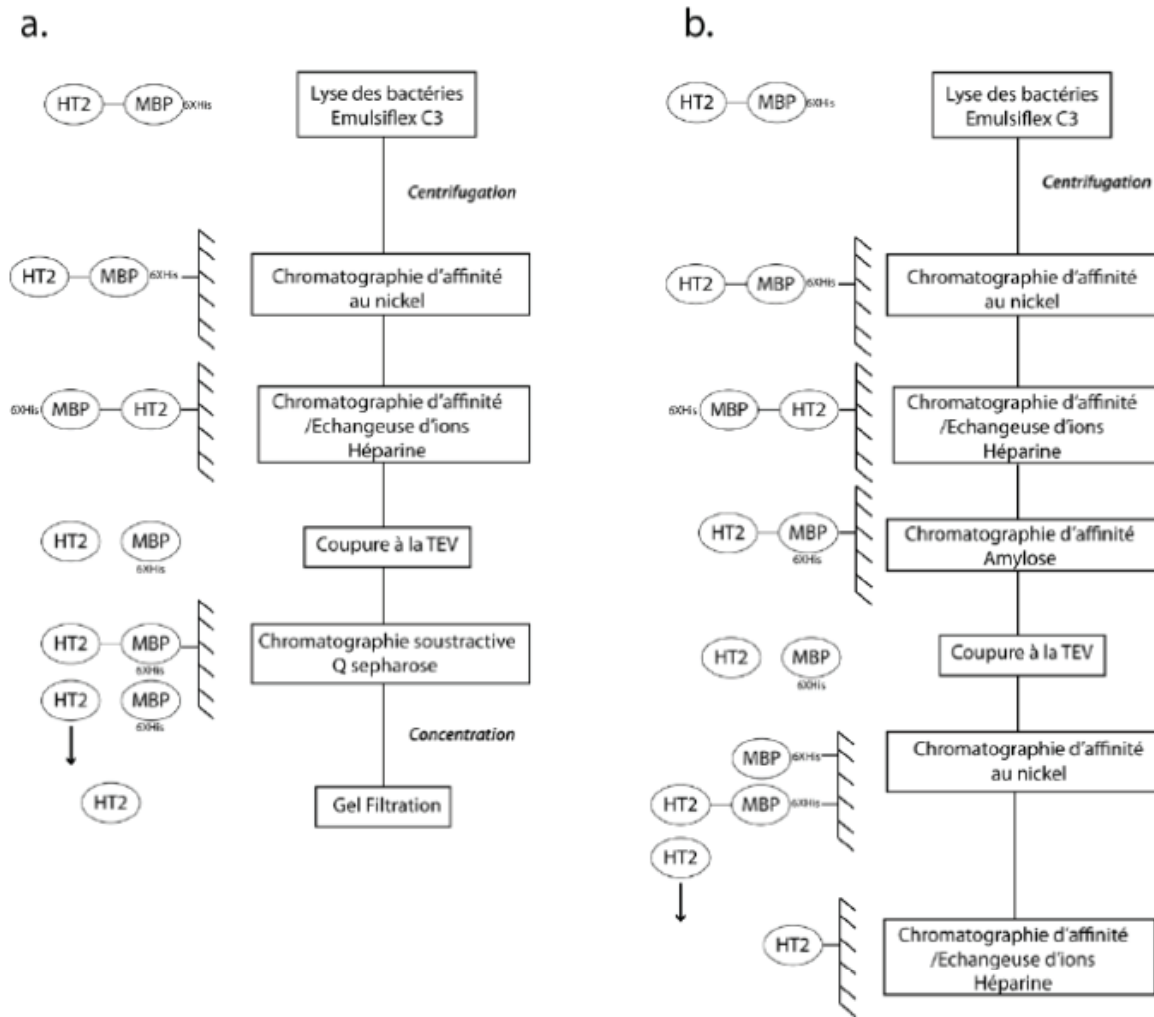


Figure 63 Protocoles de purification de domaine ATPase de l'isoforme α . a. Le protocole original de Wei et al. b. Le protocole optimisé.

ii. **Cristallisation de domaine ATPase de l'isoforme α mutée K168A**

Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés sur la protéine HT2ATPsavec non mutée comme décrit dans la publication de Wei et al. (Wei et al., 2005).

✓ La protéine non mutée

L'enzyme non mutée purifiée a été co-cristallisée en présence d'AMPPNP. Nous avons pu observer la formation de cristaux en présence d'AMPPNP à 4°C au bout de 3 jours (Figure 64). La diffraction aux rayons X de ces cristaux a été testée au laboratoire et les cristaux diffractent jusqu'à 2Å de résolution avec des paramètres de maille légèrement différents de ceux publiés : $a=70.7 \text{ \AA}$, $b=77 \text{ \AA}$ $c= 147,3 \text{ \AA}$ au lieu de 170 Å. Nous avons donc lancé une acquisition et résolu la structure par remplacement moléculaire à l'aide de la structure connue. La structure est essentiellement la même malgré le changement de paramètre de maille.

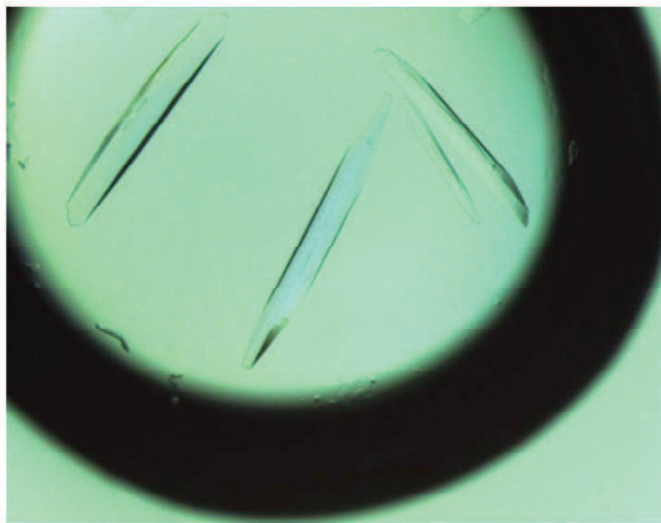


Figure 64 Cristaux du domaine ATPase de l'isoforme α avec AMPPNP.

✓ La protéine mutée K168A

Nous avons utilisé les mêmes conditions de cristallisation que pour l'enzyme non mutée. Cependant aucune de ces conditions n'a permis la formation de cristaux. Mise à part la mutation en K168A, les deux enzymes sont strictement identiques et ont été traitées dans les mêmes conditions de production jusqu'aux essais de cristallisation. Le fait que le mutant K168A ne cristallise pas dans les conditions où l'enzyme non mutée a cristallisé semble indiquer que la mutation K168A entraîne un changement de conformation global significatif.

Il serait désormais nécessaire de faire des tests de cristallisation à plus grande échelle avec des conditions de criblage larges pour identifier des conditions de cristallisation nouvelles.

Le résidu muté est situé dans le domaine ATPase en contact direct avec le phosphate α de l'ATP. De plus ce résidu se trouve à la base de la boucle de l'ATP lid et participe via des interactions hydrogène à stabiliser l'interface de dimérisation. Il est donc possible que la mutation de ce résidu vienne perturber l'interface de dimérisation et que les domaines ne soient plus capables de dimériser en présence d'AMPPNP.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons prévu de réaliser des expériences de gel filtration sur les domaines mutés en présence et en absence d'AMPPNP.

iii. Conclusions et Perspective : modélisation moléculaire

Le résidu K168 forme une liaison hydrogène avec le phosphate α de l'ATP mais il est également impliqué dans un réseau d'interactions hydrogène qui participe à la stabilisation de l'« ATP lid » à sa base ainsi qu'à la formation de l'interface dimérique. Le groupement amine de la lysine est non seulement impliqué dans une liaison hydrogène avec le phosphate α de l'ATP mais également avec des atomes de la chaîne principale à l'opposé dans la boucle ATP lid. La chaîne latérale de cet acide aminé, spatialement positionnée au centre de la boucle pourrait agir comme un véritable senseur. L'hydrolyse de l'ATP et le départ de l'ADP provoqueraient la déstabilisation des interactions au niveau de cette lysine et briseraient le réseau d'interaction en maintenant l'interface de dimérisation. La présence d'une acétylation pourrait donc perturber ces interactions. De même, nous pouvons imaginer que la mutation en alanine perturbe de façon importante non seulement la fixation d'ATP mais aussi et de façon coordonnée la dimérisation de l'enzyme.

Afin de mieux caractériser l'influence d'une mutation ou d'une acétylation au regard de nos résultats expérimentaux nous avons décidé d'entreprendre l'analyse du mutant alanine et d'une acétylation à cette position par simulation moléculaire.

Pour cette partie du projet nous avons travaillé en collaboration avec Roland Stote dans l'équipe d'Annick Dejaegere (IGBMC, Département BSI, Illkirch France). L'objectif est de simuler l'environnement physico-chimique du mutant K168A afin de confirmer nos observations expérimentales et dans un deuxième temps de simuler l'ajout d'un groupement acétylé sur ce résidu.

La structure du domaine ATPase co-cristallisé avec de l'ADPNP et de l'ADP a été utilisée comme base de travail pour la modélisation moléculaire. Dans un premier temps, les boucles non résolues dans les structures de Wei *et al.* déposées à la PDB (Protein Data Bank), ont été modélisées. Les étapes de simulation sont en cours à ce stade de l'écriture du manuscrit.

E. Conclusion

Au cours de ce travail nous avons dans un premier temps amélioré les protocoles de production et de purification mis en place dans les années 1990 par la communauté des chercheurs travaillant sur les Top2 eucaryotes. Le protocole de production a subi trois modifications majeures. Premièrement, avant mon arrivée au laboratoire une étiquette 10 histidines a été ajoutée en C-terminal des protéines produites afin d'introduire une première étape de purification par affinité sur colonne au nickel. Cette étape est cruciale pour diminuer le temps de manipulation et les pertes de matériels dus à un nombre élevé d'étapes. Deuxièmement les gènes des deux isoformes ont été introduits dans le plasmide pYES2.1 spécialement conçu pour la surexpression de protéines dans *S.cerevisiae*. Nous nous sommes émancipés de l'origine multiple des vecteurs d'expressions utilisés jusqu'à présent et avons ainsi gagné en robustesse lors de la surexpression. Troisièmement, le milieu de culture ainsi que le protocole de surexpression ont été modifiés ce qui nous a permis de diminuer le temps de culture. Concernant la purification des isoformes, nous avons mis en place un protocole inédit réalisé en trois étapes qui nous permet d'obtenir un rendement supérieur à ce qui a déjà été publié et qui a également permis d'entamer une étude fonctionnelle et structurale. L'isoforme β cependant s'est révélée plus délicate à produire et à purifier. Les caractéristiques fonctionnelles déterminées de l'isoforme α produite avec ces protocoles optimisés sont équivalentes à celles publiées.

De plus, les isoformes ont été exprimées en cellules de mammifère et purifiées avec un rendement légèrement supérieur à la surexpression dans *S.cerevisiae*, notamment l'isoforme β dont le rendement est nettement supérieur. Cette avancée laisse envisager que l'expression en cellules de mammifère pourrait être plus adaptée pour la surexpression de l'isoforme β et donc permettre de démarrer des études fonctionnelles et structurales plus approfondies sur cette isoforme. Lors de la surexpression de l'isoforme α en cellules de mammifères, nous avons observé l'apparition d'une bande supplémentaire sur les gels SDS PAGE de contrôle. Nous avons confirmé que cette bande était bien l'isoforme α mais nous n'avons pas réussi pour le moment à valider son origine. Nous l'attribuons pour le moment et d'après les tests que nous avons réalisés à la protéolyse partielle du domaine C-terminal.

Pour finir les HsTop2 subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. Nous avons caractérisé les phosphorylations et les acétylations de l'isoforme α dans les deux systèmes d'expressions. Nous avons observé que les deux systèmes apportent des modifications équivalentes à celles retrouvées dans la littérature. Cette analyse nous a poussé à entamer l'étude d'une position potentiellement acétylée K168 située dans la poche

RÉSULTATS : Partie I

de fixation de l'ATP. Nous avons généré un mutant alanine qui, lors des tests fonctionnels, a révélé que ce résidu strictement conservé est indispensable pour l'hydrolyse efficace de l'ATP et l'activité de passage de brin d'ADN. Nous continuons les analyses structurales sur ce mutant par cristallographie aux rayons X et modélisation moléculaire.

Ce travail a permis d'initier l'étude des isoformes de la HsTop2 au sein du laboratoire, en posant les bases de la production et de la purification de ces enzymes délicates à manipuler. L'ensemble des travaux de production et de purification sera mis à disposition de la communauté des chercheurs qui travaillent sur ces enzymes par la préparation d'une publication.

RESULTATS : Partie I

II. Protéomique Chimique

A. Historique et Principe

La protéomique ou étude du protéome a pour but la connaissance de la structure, la fonction et l'expression de toutes les protéines d'un organisme donné. Plusieurs aspects de la caractérisation des protéines totales peuvent être abordés : les séquences, leurs identités, leurs quantités à un moment donné, les interactions avec des partenaires cellulaires, leurs activités, leurs structures, leurs distributions cellulaires et tissulaires (Patterson, 2003). Cette discipline prend naissance suite au séquençage intensif de plusieurs génomes dont l'humain « Human genome project » commencé en 2000 et fini en 2004 (Venter et al., 2001). Cependant la liste de gènes obtenue à partir du séquençage du génome est largement insuffisante pour expliquer et comprendre la complexité d'un organisme vivant composé de milliers de protéines dont le fonctionnement est multifactoriel et très dépendant de l'environnement dans lequel il se trouve (Lottspeich, 1999).

Dans le cadre de l'analyse protéomique, de nombreuses techniques sont utilisées. L'identification des protéines en protéomique est dans la majorité des cas réalisée par spectrométrie de masse. La protéomique quantitative quant à elle permet de quantifier l'expression des protéines dans un échantillon, de comparer différents niveaux d'expression entre des systèmes biologiques différents. Les techniques employées dans ce cadre sont généralement : l'électrophorèse 2D et la spectrométrie de masse. Des techniques plus récentes basées sur l'incorporation d'isotopes stables sur les protéines sont également utilisées : par exemple les techniques SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) et ITAC (Isotope-Coded Affinity Tags) (Gygi et al., 1999; Ong et al., 2002). L'analyse des interactions protéine-protéine représente également une partie importante de l'exploration des protéomes. Les techniques les plus répandues pour l'analyse des interactions protéines-protéines sont : le système double hybride et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) qui permettent la validation *in vivo* des interactions. La spectrométrie de masse en condition native, les techniques de co purification (TAP, Tandem Affinity Purification, Pulldown, Immunoprécipitation, GF....) permettent la validation *in vitro* des interactions (Lottspeich, 1999; Patterson, 2003).

La protéomique peut également être utilisée dans le cadre de l'analyse des composés thérapeutiques. La protéomique chimique est utilisée pour l'identification de complexes/protéines associés aux molécules d'intérêt thérapeutique. L'isolement et

RÉSULTATS : Partie II

l'identification de protéines par protéomique chimique reposent sur l'utilisation d'une sonde chimique qui cible spécifiquement des protéines et permet leur extraction. Cette technique permet l'étude protéomique complète des cibles protéiques de composés thérapeutiques aussi bien que l'étude de ces cibles et des complexes associés. En effet, les protéines appartiennent à un réseau complexe d'interactions au sein de la cellule. Elles n'agissent pas seules mais de concert avec de nombreux partenaires cellulaires. Ce réseau d'interactions, « complexomique », est nécessaire pour la réalisation d'une fonction biologique par une protéine donnée à un moment donné dans la cellule. En 2007, Barglow *et al.* ont mis au point une approche de protéomique chimique, appelée ABPP (Activity Based Protein Profiling) qui tire profit de la spécificité de molécules chimiques pour cibler un type de protéine et ainsi obtenir des informations sur l'état fonctionnel de ces protéines au sein d'un système biologique complexe (Barglow and Cravatt, 2007). Les sondes de type ABPP ont été développées pour plusieurs classes d'enzymes, notamment les HDACs (Salisbury and Cravatt, 2007). En 2010, notre équipe, en collaboration avec le laboratoire d'Alain Wagner de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, a amélioré cette technique en adaptant le protocole expérimental pour le rendre compatible avec les conditions natives indispensables pour l'étude de complexes protéiques de grande taille, notamment en vue d'études structurales (Budin *et al.*, 2010). En effet les conditions d'élution de la protéine ciblée sont la plupart du temps dénaturantes conduisant à la perte des partenaires fonctionnels, des informations structurales et de la fonction de la protéine.

Un bras contenant le groupement HAZA (2-(4'-hydroxy-2'-alkoxy phenylazo) benzoic acid) a été conçu pour pouvoir être ajouté facilement aux molécules servant de sonde puis clivé en conditions natives. Ce bras permet la capture, l'enrichissement de protéines en conditions natives et donc l'étude de complexes fonctionnels. En pratique, le bras chimique utilisé possède à une extrémité un groupement permettant la fixation sur de nombreux groupements chimiques par réaction « Click » et une étiquette à l'autre extrémité, la biotine permettant l'enrichissement sur résine streptavidine (Budin *et al.*, 2010). L'expérience de protéomique chimique est réalisée en plusieurs étapes (Figure 65). 0-La sonde est synthétisée en fixant le bras sur une molécule d'intérêt thérapeutique. 1- La sonde est mise en présence d'un lysat cellulaire. 2-Les cibles et leurs protéines associées sont extraites du lysat cellulaire par une purification d'affinité. 3- Les protéines immobilisées sont libérées par une élution en condition native avec du dithionite de sodium. La protéine cible et ses partenaires sont séparés par SDS-PAGE et identifiés par spectrométrie de masse. L'éluât peut également être utilisé pour des études fonctionnelles ou structurales.

RÉSULTATS : Partie II

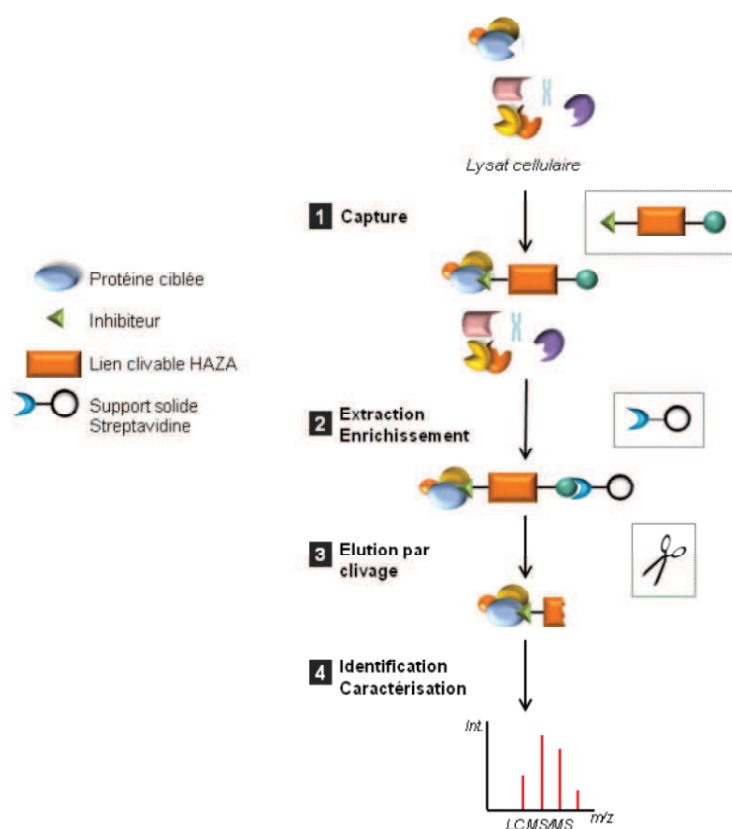


Figure 65 Principe de la protéomique chimique en 4 étapes. 1. La sonde capture les protéines et leurs complexes associés. 2. Les cibles sont extraites du lysat cellulaire. 3. L'ensemble sonde et complexes capturés est libéré par clivage non dénaturant. 4. Les cibles sont identifiées par spectrométrie de masse en tandem.

Le travail d'optimisation des sondes en condition non dénaturante a été réalisé sur la novobiocine qui a été utilisée comme sonde chimique pour capturer la famille des ADN gyrase et leurs protéines associées (Figure 66) (Budin et al., 2010). La novobiocine est un antibiotique qui a été abandonné par l'industrie pharmaceutique car peu spécifique et présentant des effets secondaires au niveau hépatique (services, 2011). Cette molécule vise le domaine ATPase de l'ADN gyrase et plus particulièrement le site de fixation de l'ATP dont le repliement 3D, nommé GHKL (DNA Gyrase, Chaperonne Hsp90, Histidine Kinase, Mut L) ou repliement de Bergerat non conventionnel, et commun à de nombreuses familles de protéines. La novobiocine était un candidat idéal pour la protéomique chimique car le site de fixation est accessible pour une sonde immobilisée sur un support solide (Figure 67).

RÉSULTATS : Partie II

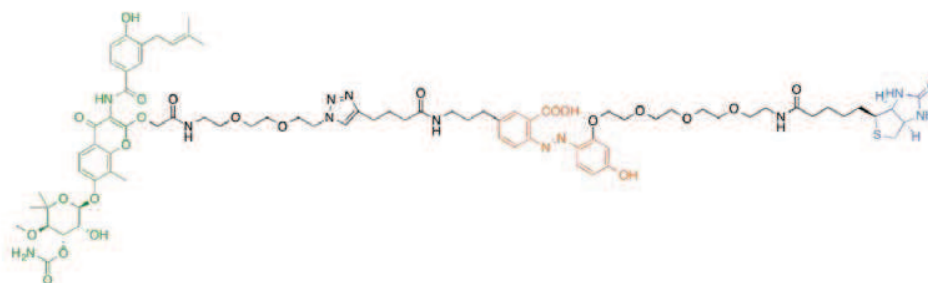


Figure 66 Sonde HAZA Biotine. En vert la molécule inhibitrice dérivée, ici la novobiocine. En orange le groupement HAZA. En bleu la biotine. Source thèse Marion Recher.

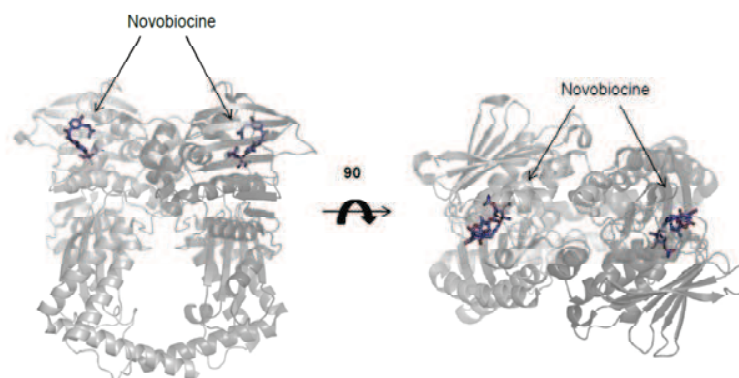


Figure 67 Structure du domaine ATP ase de l'ADN gyrase de *T.thermophilus* avec de la novobiocine [3] (PDBID : 1KIJ).

L'objectif de ce projet est de déterminer les cibles des molécules anti-cancéreuses visant les Top2, ainsi que les protéines associées des Top2 par protéomique chimique.

Les HsTop2 possèdent de nombreux partenaires cellulaires et sont impliquées à tous les niveaux du cycle cellulaire (Introduction) [12]. Elles sont des cibles majeures de molécules inhibitrices utilisées en chimiothérapie des cancers depuis des décennies, telles que l'étoposide, la doxorubicine, les Bisdioxopipérazines [13, 14]. Cependant une grande toxicité et des effets secondaires importants sont associés à leur utilisation, de plus les cibles secondaires de ces molécules thérapeutiques sont encore mal connues.

B. Premiers essais de synthèse. Les sondes dérivées des Bisdioxopipérazines.

Nous avons tout d'abord choisi de synthétiser une sonde à partir des dérivés bisdioxopipérazines car dans la première étude publiée par l'équipe, la novobiocine visant le site ATPase a été utilisée avec succès (Budin et al., 2010). Le domaine ATPase étant très accessible, nous avons fait l'hypothèse qu'une sonde dérivée d'ICRF-193 pourrait s'insérer dans le domaine ATPase, malgré les chaînes latérales de résidus tyrosines qui forment un « dôme » au dessus de l'inhibiteur (Figure 68 et Figure 69).

Cependant, malgré de nombreuses tentatives de nos collaborateurs chimistes, la dérivation chimique de cette molécule s'est avérée difficile vue la structure chimique de la bisdioxopipérazines. Nous avons donc conçu en parallèle des sondes de l'étoposide et de la doxorubicine, dont les points de dérivation ont déjà fait l'objet d'études dans le cadre d'optimisation de propriétés pharmacologiques (Hasinoff et al., 2001; Huang, 1978; Schellinger et al.; Sun et al., 2006; Vega et al., 2003; Xiao et al., 2004).

RÉSULTATS : Partie II

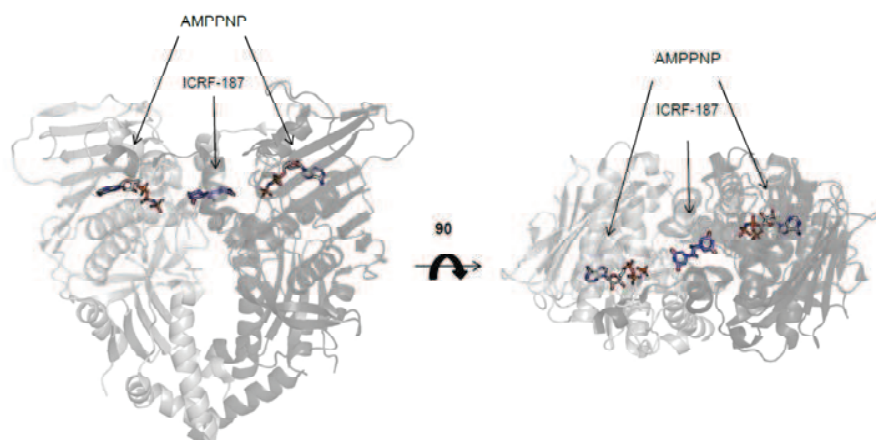


Figure 68 Structure du domaine ATPase de ScTpo2 avec ICRF-187. PDB : 1QZR. Une molécule d'ICRF-187 bloque les deux domaines ATPase en position fermée. Noter la position des deux molécules d'homologues non hydrolysables d'ATP (AMPNP) pouvant se fixer dans les domaines GHKL simultanément à l'ICRF193

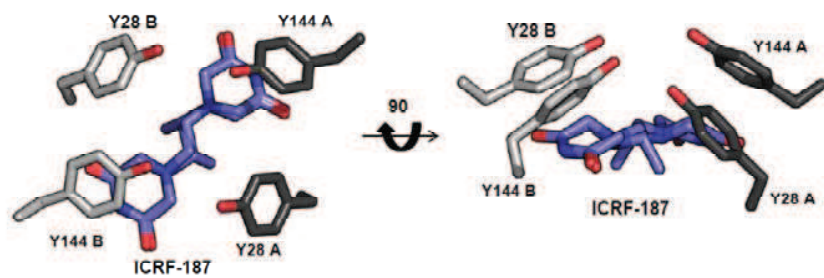


Figure 69 Dôme de tyrosine se refermant au dessus de l'ICRF187 à l'interface dimérique (Classen et al., 2003).

C. Mise au point des sondes dérivées de l'étoposide et leurs applications.

1. Dérivation chimique de l'étoposide et validation *in vitro* de la sonde et des intermédiaires de synthèse.

Pour la synthèse des sondes, nous avons collaboré avec la chimiste Marion Recher de l'équipe du Dr. Alain Wagner (« Laboratoire de conception et application de molécules bioactives » UMR 7199) de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

L'étoposide a été dérivé à partir du groupement C4 du cycle D de la podophyllotoxine (Figure 70a.). Malgré les contacts du glucopyranose avec les résidus M782 et Q778 (Figure 70b.), la dérivation en ce point a été utilisée pour synthétiser de nombreux analogues qui possèdent dans certains cas une activité inhibitrice supérieure à l'étoposide native (Duca et al., 2005; Terada et al., 1993; Zhu et al., 1999). Dans un premier temps nous avons testé la capacité d'une sonde intermédiaire de synthèse à inhiber la relaxation d'ADN plasmidique par la Top2 α recombinante (Figure 71). La sonde doit conserver son pouvoir inhibiteur signe de spécificité pour sa cible protéique lors des tests de pulldown. Cette sonde 267 inhibe l'activité de la Top2 α de manière équivalente à l'étoposide native. La podophyllotoxine avec le groupement amino benzyl se comporte *in vitro* comme l'étoposide. Cet intermédiaire a donc été utilisé pour synthétiser le deuxième intermédiaire, la sonde MR-297 (Figure 72 a.).

Nous avons vérifié par un test de relaxation l'impact de l'ajout d'un « bras » à la sonde intermédiaire MR-267 sur son pouvoir inhibiteur. Le test révèle que la sonde MR-297 a un pouvoir inhibiteur équivalent à l'étoposide : à 150 μ M les intermédiaires de relaxation sont équivalents. Enfin cette dernière sonde a été utilisée pour synthétiser la sonde finale MR-317. Le bras HAZA-Biotine a été ajouté sur la sonde intermédiaire MR-297 (Figure 73a.). Cette sonde inhibe la relaxation d'ADN plasmidique de manière équivalente à l'étoposide (Figure 73). Nous avons donc utilisé cette dernière sonde pour les tests de « pulldown » sur des extraits cellulaires.

RÉSULTATS : Partie II

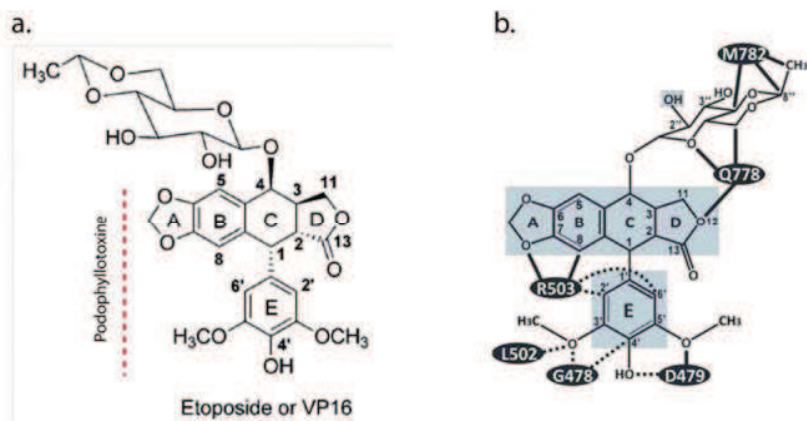


Figure 70. Structure chimique de l'étoposide VP16 et interaction avec HsTop2. a. Le groupement carbohydrate est fixé au carbone C4 du cycle C de la Podophyllotoxine (Tiret rouge). b. En noir les résidus de HsTop2 β qui interagissent avec VP16, en gris les contact avec l'ADN. D'après Wu et al 2011 (Wu et al., 2011).

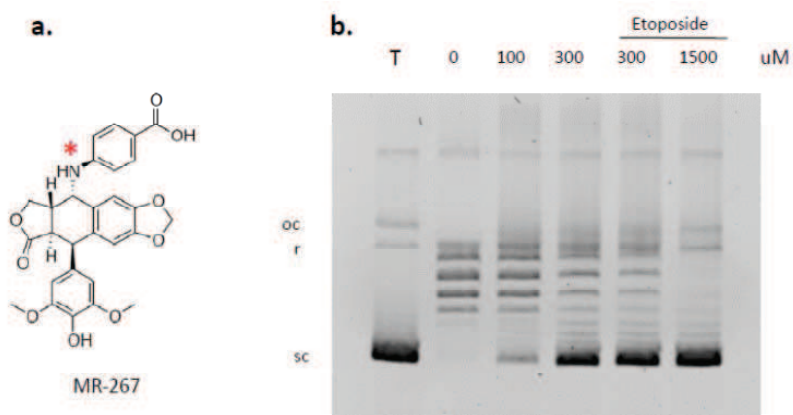


Figure 71. Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde intermédiaire MR-267. a. La structure chimique de la sonde intermédiaire MR-267. Astérisque rouge: groupement ajouté en C4 de la podophyllotoxine. b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-267. L'étoposide non modifié a été utilisé comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. oc = (ouvert circulaire) ADN avec une coupure simple brin, r = (relâché) ADN relâché, sc = (surenroulé) ADN surenroulé.

RÉSULTATS : Partie II

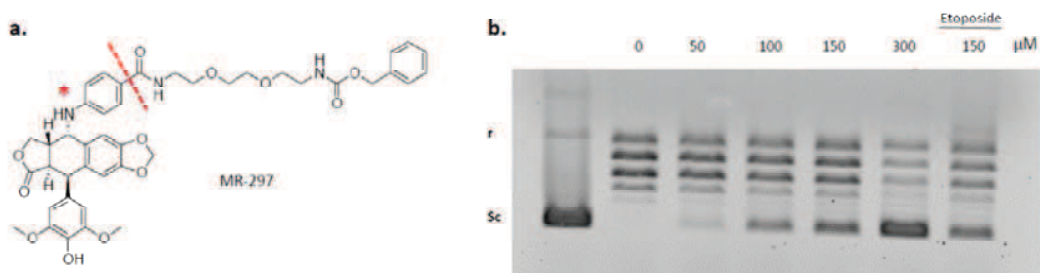


Figure 72. Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde intermédiaire MR-297. a. La structure chimique de la sonde intermédiaire MR-297. Astérisque rouge: groupement ajouté en C4 de la podophyllotoxine. Ligne rouge : le groupement ajouté à MR-297 b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-297. L'étoposide non modifié a été utilisé comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. oc = (open circular) ADN avec une coupure simple brin, r = (relaxed) ADN relâché, sc = (supercoiled) ADN surenroulé.

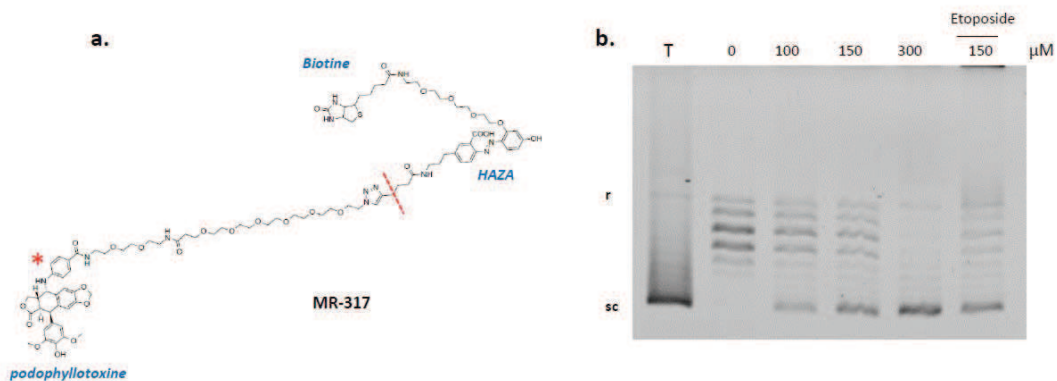


Figure 73. Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde finale MR-317. a. La structure chimique de la sonde finale MR-317. Astérisque rouge: groupement ajouté en C4 de la podophyllotoxine. Ligne rouge : le groupement HAZA-Biotine ajouté à MR-297 b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-317. L'étoposide non modifié a été utilisé comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. oc = (open circular) ADN avec une coupure simple brin, r = (relaxed) ADN relâché, sc = (supercoiled) ADN surenroulé.

2. Applications de la sonde étoposide : expériences de pulldown sur des lignées de cellules cancéreuses.

La mise au point et la réalisation des expériences de « Pull-Down » et l'analyse des résultats de spectrométrie de masse ont été conduites par le Dr. Claire Batisse, ingénieur d'étude de notre équipe.

Dans un premier temps le protocole mis en place pour l'étude des partenaires de l'ADN gyrase dans *E.coli* par l'équipe en 2010 a été adapté pour les cellules humaines. La sonde « novobiotine » créée et publiée en 2010, a été utilisée sur des extraits cellulaires humains des cellules du foie HepG2, la novobiocine étant connue pour être toxique pour le foie. Ceci a permis l'optimisation des étapes suivantes sur les cellules humaines : (i) la culture cellulaire et la quantité de cellules à utiliser pour les expériences. (ii) les conditions de lyse des cellules (iii) la préparation de l'échantillon pour la spectrométrie de masse. (iv) la procédure à suivre pour l'analyse par spectrométrie de masse: Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr. A. Van Dorsselaer à Strasbourg (sur un spectromètre de masse ion trap LTQ XL ETD) et la plateforme de protéomique de l'IGBMC (sur un spectromètre de masse LTQ Velos Pro orbitrap). Le spectromètre de masse Orbitrap permet une identification plus précise des protéines présentes en faible concentration dans l'éluât du pulldown comparé à des spectromètres plus classiques. Je ne commenterai pas les résultats obtenus avec cette sonde sur les cellules de HepG2 car ce projet ne fait pas partie de mon travail de thèse. Pour mon projet nous avons pu étendre ces procédures à d'autres lignées.

Nous avons réalisé des pulldown sur la lignée cellulaire RS4,11 (Stong et al., 1985) et Calu-1 (Fogh et al., 1977a; Fogh et al., 1977b). La lignée cellulaire RS4,11, provient de lymphoblastes de moelle osseuse d'une patiente de 32 ans qui ont subi un réarrangement chromosomique réciproque entre le chromosome 4 et 11. Ces cellules engendrent une leucémie lymphoblastique aiguë très fréquente parmi les leucémies infantiles (Jansen et al., 1992). Les cellules de la lignée Calu-1 ont été isolées d'un patient ayant un carcinome pulmonaire à petites cellules. Ce sont des cellules endothéliales cancéreuses métastatiques de la plèvre. Ces deux lignées sont issues de cellules tumorales sensibles à l'étoposide, fréquemment utilisées dans les protocoles thérapeutiques impliquant des cancers hématologiques ou métastasés.

RÉSULTATS : Partie II

Pour chaque pulldown nous avons effectué une expérience de contrôle qui consiste à faire passer le lysat cellulaire sur des billes non fonctionnalisées avec les sondes. Ceci permet de discriminer les fixations non spécifiques.

Les protéines identifiées ont été validées selon les 4 critères suivants :

- (i) Les protéines doivent être identifiées en spectrométrie de masse à partir d'au moins un peptide avec un seuil FDR (False Discovery Rate) inférieur à 1%.
- (ii) Les protéines doivent être présentes dans au moins deux expériences de "pulldown".
- (iii) Les protéines surreprésentées de par leur abondance cellulaire comme les protéines ribosomales et les kératines sont éliminées.
- (iv) Les protéines sont validées si le nombre de peptides trouvés dans l'échantillon avec la sonde est supérieur d'un facteur de 2/3 au nombre de peptides trouvés dans l'échantillon contrôle.

Lors des pulldown réalisés sur la lignée RS4, 11, 1808 protéines ont été détectées par spectrométrie de masse. Parmi celles-ci seulement 11 ont été validées selon nos critères de sélection. Sur la lignée Calu-1, 8 protéines ont été détectées en spectrométrie de masse et parmi celles-ci 6 ont été validées grâce à nos critères de validation des cibles. Parmi les protéines sélectionnées, seule la galectin-3-binding protein est commune aux deux lignées cellulaires (Tableau 12).

RÉSULTATS : Partie II

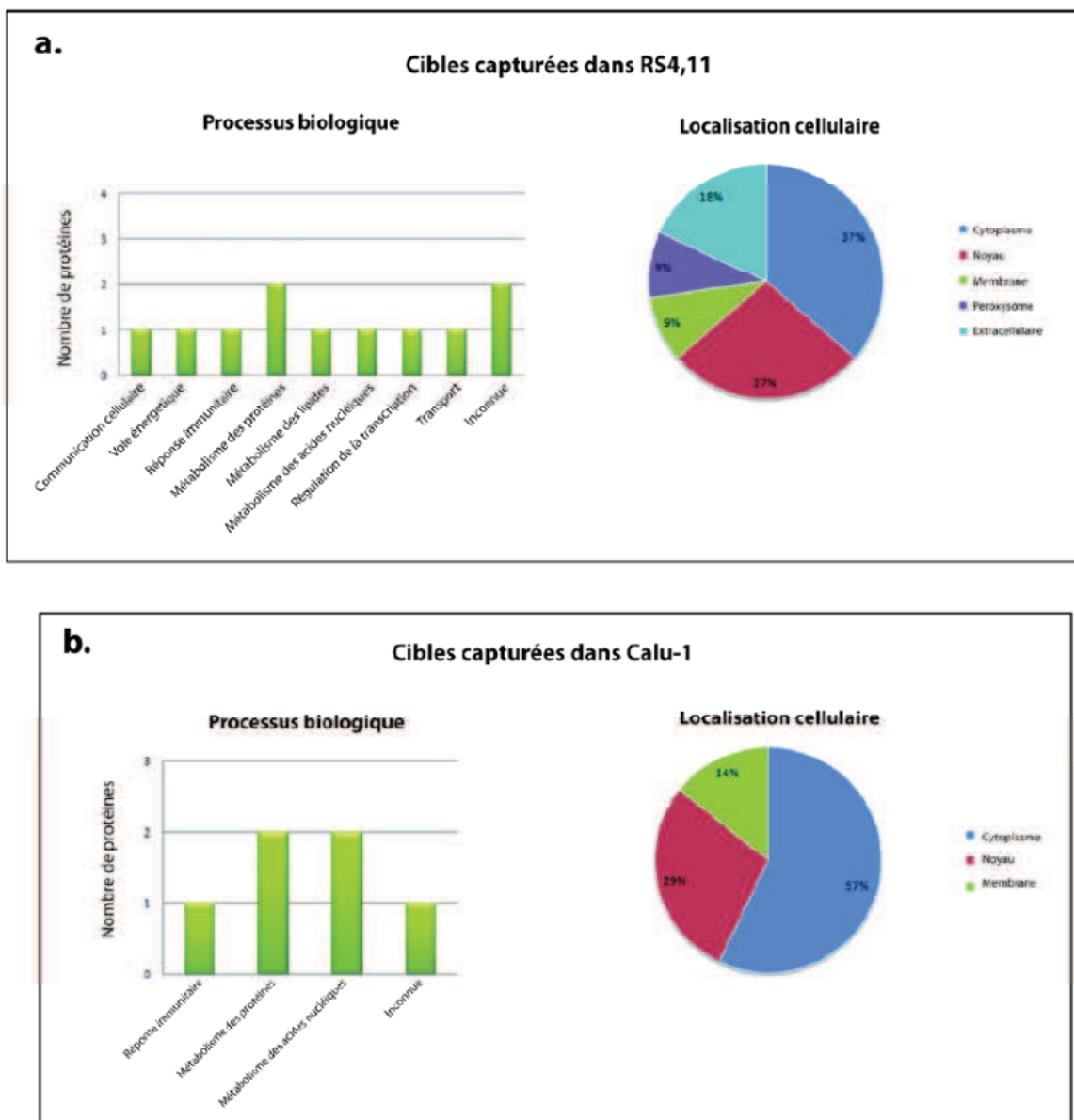


Figure 74 Processus biologiques et localisations cellulaires des protéines capturées dans les cellules RS4,11 et Calu-1.

RÉSULTATS : Partie II

Tableau 12 Protéines capturées lors des pulldown sur les lignées RS4,11 et Calu-1

<i>RS4,11</i>	<i>Calu-1</i>
Galectin-3-binding protein	
Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO*)	Signal recognition particle subunit SRP72
Teneurin-3	Polyubiquitin-C
Protein S100-P ROA3	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
hnRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
hnRNP A3	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
Ubiquitin-associated protein 2-like	
Serpin B12	

La sonde synthétisée à partir de l'étoposide conserve son activité inhibitrice contre les Top2. Cependant nous n'avons pas réussi à capturer les Top2 à partir d'un extrait cellulaire total. Ceci peut potentiellement s'expliquer par plusieurs raisons :

1) La formation du complexe ternaire ADN-Top2-étoposide nécessite la présence d'ADN et de l'enzyme pour être stabilisée. Il est possible que lors de la préparation de l'extrait cellulaire et malgré l'utilisation de DNase I, la Top2 soit en complexe avec des fragments d'ADN. Cependant, le complexe déjà formé et refermé sur les séquences cibles de l'étoposide ne serait plus en mesure d'être capturé par la sonde étoposide immobilisée sur les billes.

2) L'accessibilité du site actif est probablement limitée car le site de fixation de l'étoposide est situé dans le corps de l'enzyme qui est enfoui (Figure 75). Malgré les optimisations de la longueur du bras liant la biotine, cette sonde n'est peut-être pas encore optimale pour des expériences de pulldown visant à isoler cette protéine

3) L'IC₅₀ associée à l'inhibition de l'isoforme α est de l'ordre de $8 \pm 3 \mu\text{M}$ selon des expériences d'anisotropie de fluorescence (Mariani et al.) et le Kd (constante de dissociation) de $5\mu\text{M}$ déterminé sur ScTop2 (Kingma et al., 1999), ce qui est relativement faible pour la capture de cibles dans un mélange complexe.

RÉSULTATS : Partie II

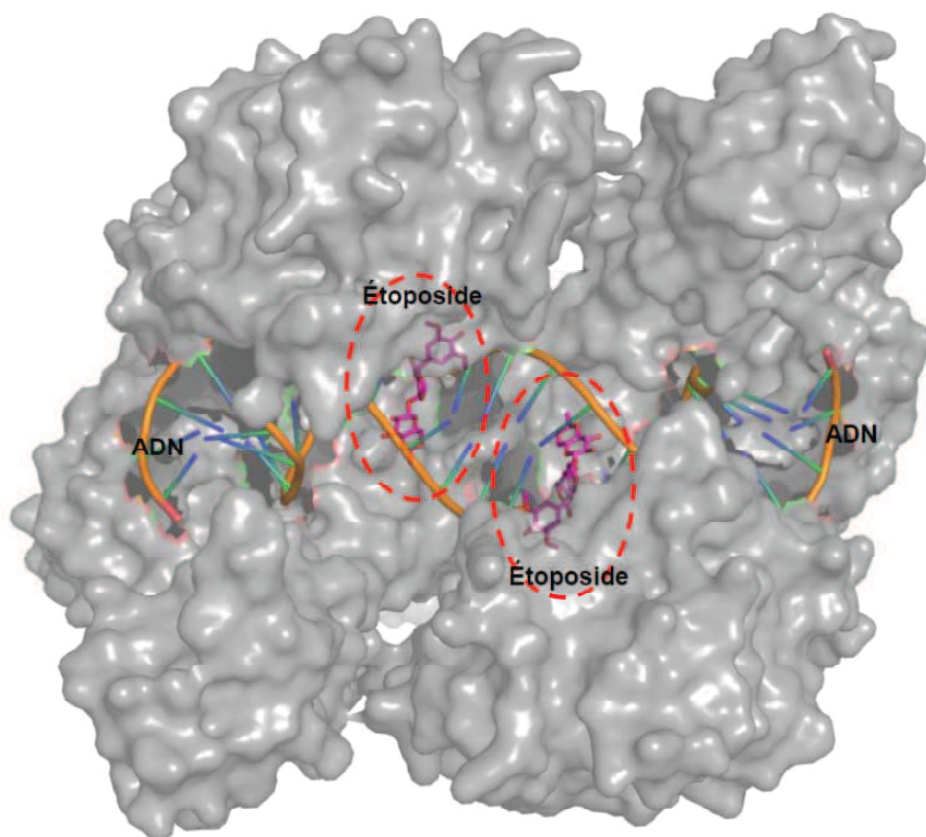


Figure 75 Structure cristallographique du corps de HsTop2 β co-cristallisé avec de l'ADN et de l'étoposide. Seule la structure du corps de l'enzyme isolé a été résolue PDB : 3QX3. Dans le contexte de l'enzyme entière, lorsque les domaines ATPase sont dimérisés, ils recouvrent l'ADN.

RÉSULTATS : Partie II

Malgré tout, ces expériences nous ont permis de capturer des cibles potentielles de l'étoposide jusqu'à présent non connues. La galectin 3 binding protein appartient à une famille de glycoprotéines qui lient les carbohydrates. C'est une glycoprotéine dont la concentration augmente dans le sérum de patients atteints de différents types de cancers et d'infections virales type VIH (Ullrich et al., 1994). De plus il semblerait que la galectine 3 binding protein se fixe à la surface des cellules cancéreuses métastatiques et participerait de cette manière à la formation d'agrégats de cellules et à l'installation de métastases dans l'organisme (Inohara et al., 1996; Ullrich et al., 1994). Il est donc envisageable que l'étoposide en ciblant la galectine 3 binding protein aide à prévenir la formation d'amas de cellules métastatiques.

La protéine NONO (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) est une protéine qui est impliquée dans de nombreux processus nucléaires. Elle serait notamment impliquée dans la modulation de l'activité des Top1 (Straub et al., 2000). Des études ont montré que cette protéine serait impliquée dans la machinerie de réparation de l'ADN, NHEJ (Non Homologue End Joining) par la stabilisation des brins d'ADN clivés. *In vitro* la protéine NONO interagit directement avec l'ADN et stimule la réparation de l'ADN en coopération avec le complexe Ku pour former un complexe de religation fonctionnel (Bladen et al., 2005). On peut donc émettre l'hypothèse qu'en ciblant la protéine NONO, l'étoposide entraverait le processus de réparation NHEJ dont on sait qu'il est déclenché lors de la réparation des lésions induites par l'exposition des cellules à cet inhibiteur (Elguero et al.; Schonn et al.). Une publication reprenant l'ensemble de ces résultats est en cours de rédaction.

D. La mise au point des sondes dérivées de la doxorubicine et leurs applications.

Contrairement à l'étoposide, il n'existe pas à ce jour de structure cristallographique du domaine catalytique d'une Top2 eucaryote en complexe avec la doxorubicine permettant de guider la dérivation de la molécule sur des bases structurales. Nous avons réalisé plusieurs essais de dérivation de la doxorubicine native. La première sonde a été synthétisée en utilisant la fonction amine libre du résidu sucré (Figure 76 et Figure 77). Au moment de l'intercalation de la doxorubicine, ce résidu se place dans le sillon mineur de l'ADN (Zunino et al., 2001). Il joue donc un rôle capital dans la toxicité de la doxorubicine et sa modification peut avoir un fort impact positif ou négatif sur la reconnaissance de ces cibles cellulaires. La dérivation sur cette amine a déjà été décrite mais a uniquement été testée sur des cellules et non *in vitro* sur l'enzyme purifiée (Vega et al., 2003).

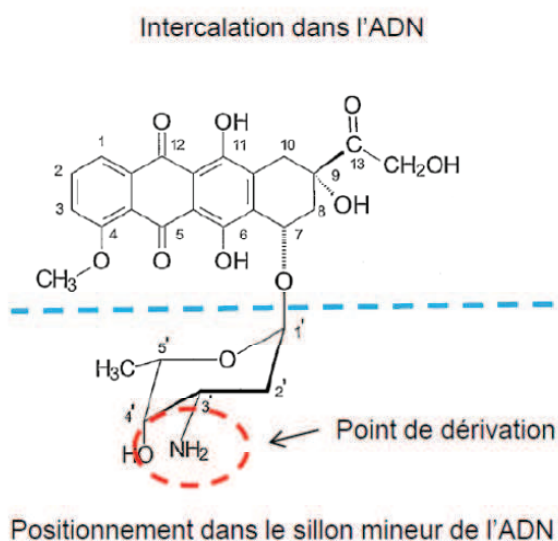


Figure 76 Structure chimique de la doxorubicine et le point de dérivation utilisé pour la synthèse des sondes.

RÉSULTATS : Partie II

Les tests de validation que nous utilisons sont basés sur la différence de mobilité électrophorétique d'isomères topologiques de l'ADN qui varie avec le taux de surenroulement de l'ADN. Or la doxorubicine est un intercalant de l'ADN qui induit 8° d'enroulement de la double hélice d'ADN pour chaque molécule intercalée (Alonso-Sarduy et al.). La doxorubicine interfère donc avec la relaxation de l'ADN par les Top2 rendant les tests de relaxation difficilement interprétables. Nous avons toutefois observé une inhibition de l'activité de relaxation *in vitro* par la sonde MR-0081 à partir de 200 μM alors que la doxorubicine inhibe dès 10 μM . En concertation avec la chimiste Marion Recher, nous avons décidé de changer de dérivation pour améliorer le pouvoir inhibiteur de la sonde (Recher, 2014). Pour cela, le groupement carboxyle qui suit le groupement amine sur le point de dérivation a été éliminé afin de conserver la basicité de ce dernier et de se rapprocher de la structure de la molécule native. (Figure 78) (Sun et al., 2006).

Deux intermédiaires de synthèse, MR-135 et MR-138, ont été testés *in vitro* avec des expériences de relaxation d'ADN. Cependant, comme avec la première sonde, l'intercalation de la molécule dans l'ADN rend les gels difficilement interprétables (Figure 79 et Figure 80). La sonde intermédiaire MR-138 a été utilisée pour la synthèse de la sonde finale MR-142. Cependant l'ajout du bras HAZA-Biotine a complètement éliminé la capacité d'inhibition de la doxorubicine (Figure 81), mais ne semble pas affecter sa capacité d'intercalation (Figure 82).

RÉSULTATS : Partie II

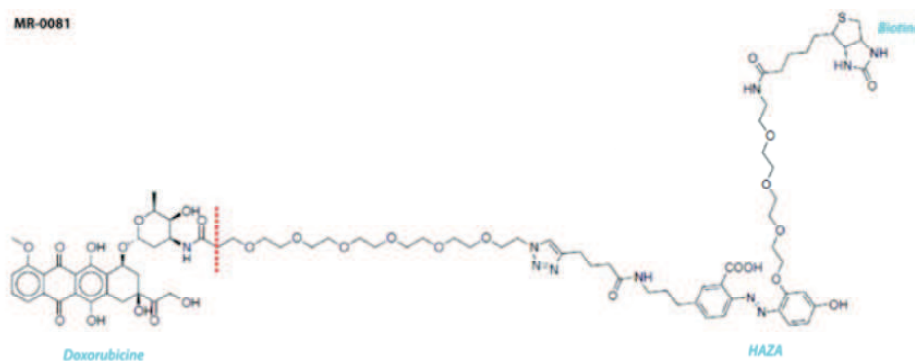


Figure 77 La première sonde doxorubicine synthétisée MR-0081. Le trait rouge marque le point de dérivation suivi du bras PEG, le groupement HAZA et la biotine.

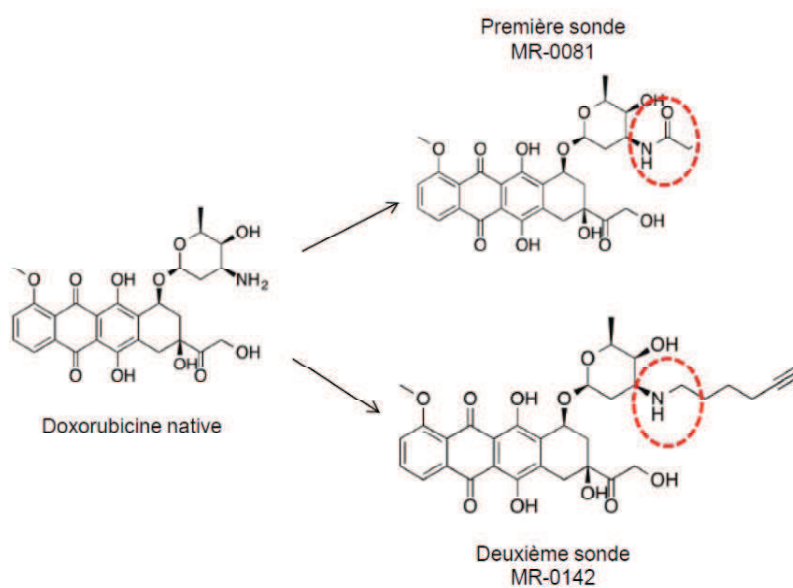


Figure 78 Les dérivations des deux sondes doxorubicine.

RÉSULTATS : Partie II

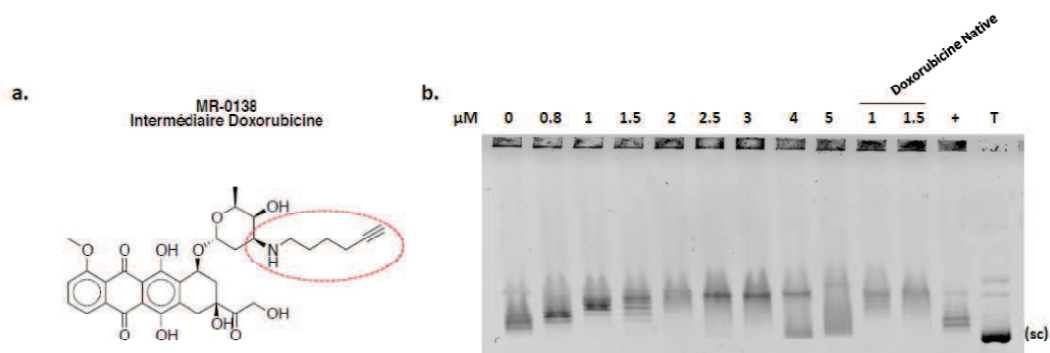


Figure 79 Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde doxorubicine intermédiaire MR-0135. a. La structure chimique de la sonde intermédiaire MR-0135. En rouge: groupement ajouté. b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-0135. La doxorubicine non dérivée a été utilisée comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. sc = (supercoiled) ADN surenroulé.

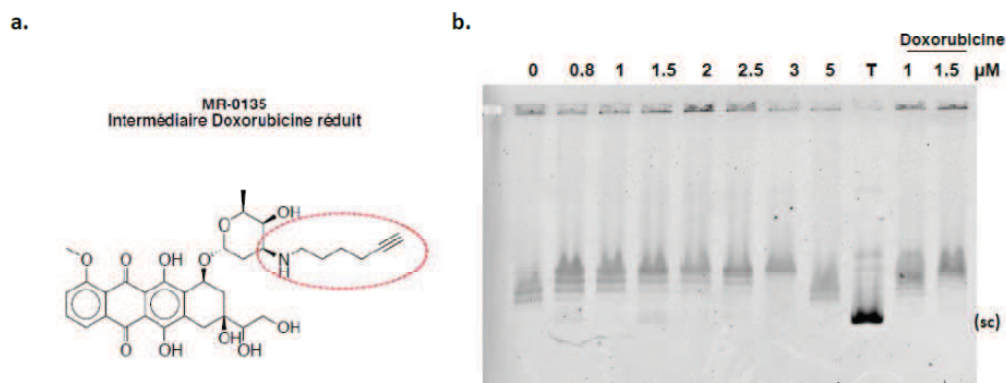


Figure 80 Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde doxorubicine intermédiaire MR-0138. a. La structure chimique de la sonde intermédiaire MR-0138. En rouge: groupement ajouté. b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-0138. La doxorubicine non dérivée a été utilisée comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. + = Relaxation sans DMSO sc = (supercoiled) ADN surenroulé.

RÉSULTATS : Partie II

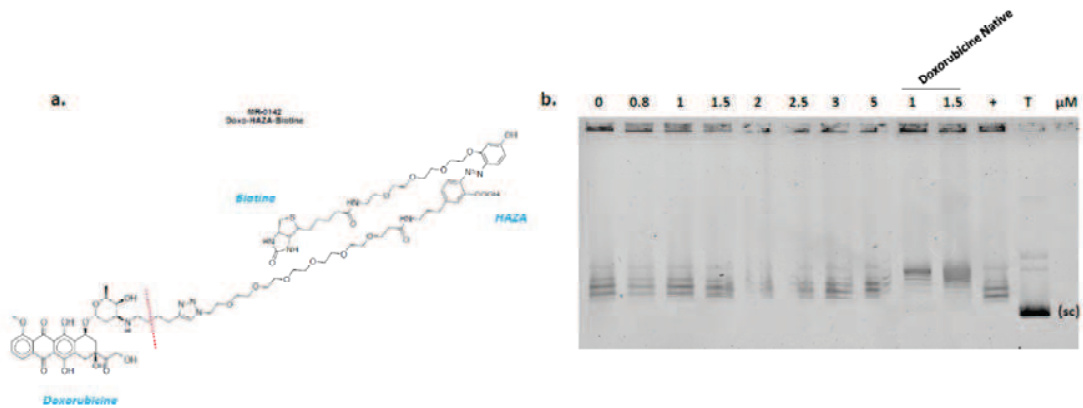


Figure 81 Test de relaxation d'un ADN plasmidique avec la sonde doxorubicine MR-0142. a. La structure chimique de la sonde MR-0142. En rouge: le bras PEG-HAZA-Biotine ajouté à MR-0138. b. Test de relaxation en présence de concentration croissante en MR-0142. La doxorubicine non dérivée a été utilisée comme témoin. T = témoin ADN surenroulé sans protéine. + = Relaxation sans DMSO. sc = (supercoiled) ADN surenroulé.

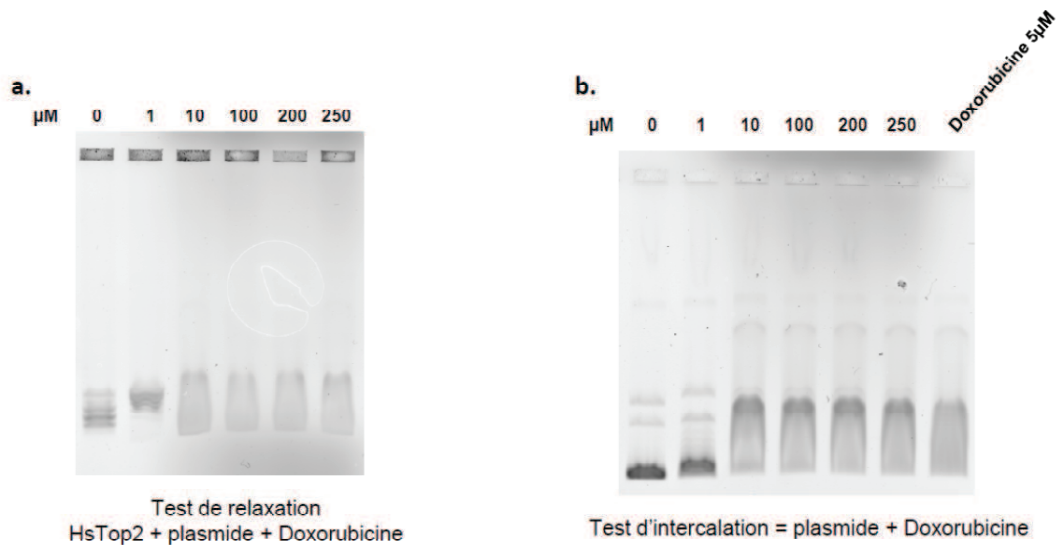


Figure 82 Test d'intercalation de la deuxième sonde MR-142. a. Test de relaxation classique en présence d'une concentration croissante de sonde. b. test d'intercalation ou l'ADN plasmidique est incubé avec la sonde en absence de HsTop2. La présence de « smears »/trainées sur le gel indique la présence d'un mélange de conformations topologiques différentes certainement dû à l'intercalation de la sonde.

1. Les expériences de pulldown sur les lignées cancéreuses *HeLa* et *RS4,11*.

Nous avons décidé de réaliser des expériences de pulldown surtout dans le but d'identifier de potentielles cibles cellulaires de la doxorubicine qui auraient des points de fixation sur la molécule différents des Top2, malgré les résultats mitigés obtenus lors des tests *in vitro*. Ceci afin de déconvoluer des autres cibles potentielles de la doxorubicine. Les pulldown ont été réalisés avec les sondes MR-0081 (Figure 77) et MR-0142 (Figure 81).

Tableau 13 Cibles protéiques capturées lors des pulldown avec les sondes MR-0081 et MR-0142.

MR-0081	MR-0142
Noyaux cellules HeLa	Cellules RS4, 11
Myeloperoxidase	XRCC5
Polymeric immunoglobulin receptor	XRCC6
Lysozyme C	PRKDC
Ig gamma-1 chain C region	TBA4A
Ig gamma-3 chain C region	
Arginase-1	
Zinc-alpha-2-glycoprotein	
Lactotransferrin	
Heat shock 70 kDa protein 1-like	

RÉSULTATS : Partie II

i. Expériences de « Pull Down » sur cellules HeLa avec la première sonde MR-0081.

Dans un premier temps une expérience a été réalisée sur un extrait total de cellules *HeLa* pour la mise au point de ces expériences. Parmi les 55 protéines capturées, seules 2 protéines, la Filaggrin-2 et la Glutathione S-transférase P ont été validées selon les conditions énoncées. Cependant vu la faible quantité de protéines nucléaires capturées, nous avons décidé de réaliser la même expérience mais sur un extrait enrichi en noyaux de cellules *HeLa*. Parmi les 121 protéines capturées, 9 ont été validées selon nos critères de protéomique (Tableau 13). 4 parmi elles interviennent dans la réponse immunitaire et 3 d'entre elles appartiennent à des voies métaboliques. Ceci est certainement dû à la préparation de l'extrait enrichi en noyaux mais débarrassé des membranes externes de manière incomplète (Figure 83).

Finalement nous avons conclu que les cellules *HeLa* n'était pas forcément le modèle d'étude le plus adapté pour nos expériences. Nous avons donc décidé de réaliser une expérience sur des cellules RS4, 11, probablement plus sensibles à la doxorubicine. Parmi les 12 protéines capturées, 2 ont été validées par nos critères, TBB4B (Tubulin β 4B Chain) et TBA3C (Tubulin α 3C/D chain).

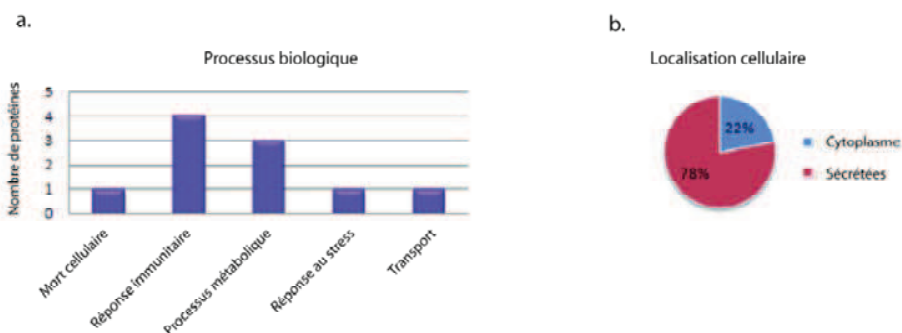


Figure 83 Cibles de la sonde MR-0081. a. Processus biologiques dans lesquels les cibles sont impliquées. b. Localisation cellulaire des cibles.

ii. Expériences de pulldown sur les cellules RS4,11 avec la 2^{ème} sonde améliorée MR-0142

Nous avons réalisé d'emblée une expérience sur des cellules RS4, 11. Parmi les 525 protéines identifiées, 4 protéines ont été validées selon nos critères. Les cibles sélectionnées sont différentes de celles capturées par la sonde MR-0081 (Tableau 13). Elles sont impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, la croissance cellulaire et la réponse cellulaire au stress. La majorité sont nucléaires ou cytoplasmiques (Figure 85 a. et b.).

Nous avons ensuite réalisé une expérience de compétition dans laquelle la doxorubicine native est ajoutée dans l'extrait cellulaire avant l'expérience de pulldown (0,2 mM). Dans cette expérience soustractive, les cibles spécifiques de la doxorubicine sont capturées par la doxorubicine libre et ne se fixent plus sur la colonne fonctionnalisée avec la sonde. En comparant les protéines capturées dans cette expérience avec celles capturées lors des pulldown classiques nous avons réalisé une validation croisée des protéines qui, si elles sont spécifiques de la doxorubicine, sont absentes du test de compétition (Figure 85 c.). Nous avons de cette manière éliminé de nombreuses protéines et validé 4 cibles de façon certaine (Tableau 13).

Parmi les complexes retenus par la sonde, nous avons identifié XRCC5 (Ku80), XRCC6 (Ku70) et la DNPK, trois protéines qui appartiennent au complexe de réparation de coupure double brin de l'ADN, composé de trois sous-unités au total. Le complexe Ku est très abondant dans la cellule (500 000 copies par cellule), il possède une grande affinité pour l'ADN. Il reconnaît et se lie aux extrémités d'ADN double brin libre, servant ainsi de protection des extrémités libres et de guide pour l'alignement des brins d'ADN pour la religation et pour finir de bases pour le recrutement du complexe de réparation de l'ADN (NHEJ = Non-homologous end joining) (Fell and Schild-Poulter; Walker et al., 2001). Ce complexe agit avec la kinase DNA-PK que nous avons également identifiée avec la sonde MR-0142, PRKDC (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit). Cette protéine kinase interagit avec le domaine C-terminal de Ku80. Son recrutement au niveau des cassures double brin génère une série de phosphorylations qui vont participer au recrutement de la machinerie NHEJ (Grundy et al.).

Les cellules cancéreuses de manière générale présentent une instabilité génomique et de nombreux événements de réparation/recombinaison peuvent avoir lieu. Ceci explique

RÉSULTATS : Partie II

l'abondance des complexes Ku (Ku70/Ku80/DNPK) et notre résultat de pulldown indique que la doxorubicine pourrait piéger ces complexes de façon massive.

Selon nos informations, et au moment de la rédaction de ce manuscrit, c'est la première fois qu'il est montré que la doxorubicine est capable de fixer le complexe Ku70/Ku80.

Ces expériences ne donnent cependant que peu d'informations sur les bases moléculaires de la fixation de la doxorubicine sur ce complexe. Est-ce une fixation sur la partie protéique du complexe ou cette interaction est-elle médiée par l'ADN ?

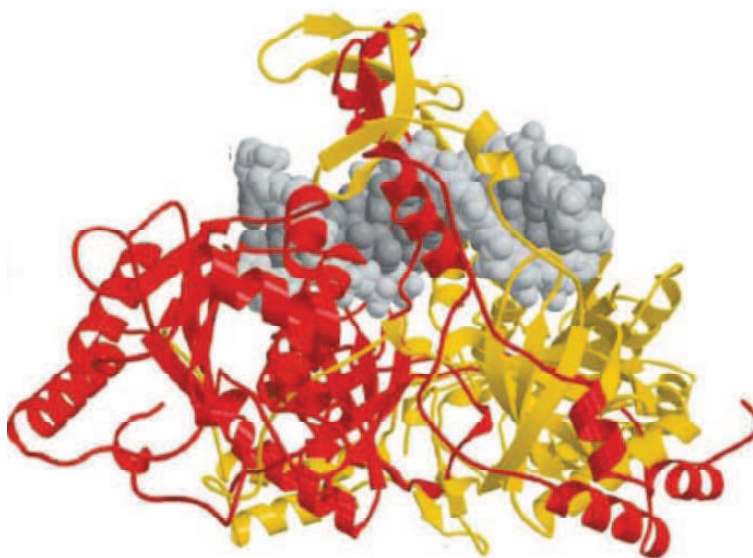


Figure 84 Structure cristallographique du complexe Ku70/Ku80-ADN. Les protéines Ku70 (Jaune) et Ku 80 (Rouge) qui encerclent l'ADN (Gris) adoptent une forme de « berceau ».

RÉSULTATS : Partie II

Au moment de la préparation du lysat cellulaire, des DNases ont été ajoutées au mélange pour libérer les complexes liés à l'ADN. Cependant il est possible que des fragments d'ADN soient restés protégés au sein du complexe. Lors du passage de l'extrait sur les billes fonctionnalisées avec la sonde, l'ADN présent dans le complexe Ku a pu être capturé par la doxorubicine. D'un point de vue structural, le dimère Ku70/80 forme un « berceau », il ne couvre donc pas totalement l'extrémité de l'ADN à laquelle il est fixé (Walker et al., 2001) (Figure 84). De plus, Schonn *et al.* ont émis l'hypothèse que les extrémités d'ADN avec des cassures doubles brins générées par la doxorubicine présentent une distorsion qui limiterait l'accès des complexes de réparation, mais qui semblerait être reconnue sans difficulté par le complexe Ku (Schonn et al., 2010). Selon ces éléments il semblerait que les complexes Ku soient capables de se fixer sur des cassures doubles brins en présence, et à proximité, de molécules de doxorubicine.

Afin de valider ces hypothèses et d'en élucider le mécanisme, nous avons entrepris l'étude *in vivo* du recrutement des complexes Ku sur les cassures induites par la doxorubicine sur des cellules cancéreuses en culture par immunofluorescence.

RÉSULTATS : Partie II

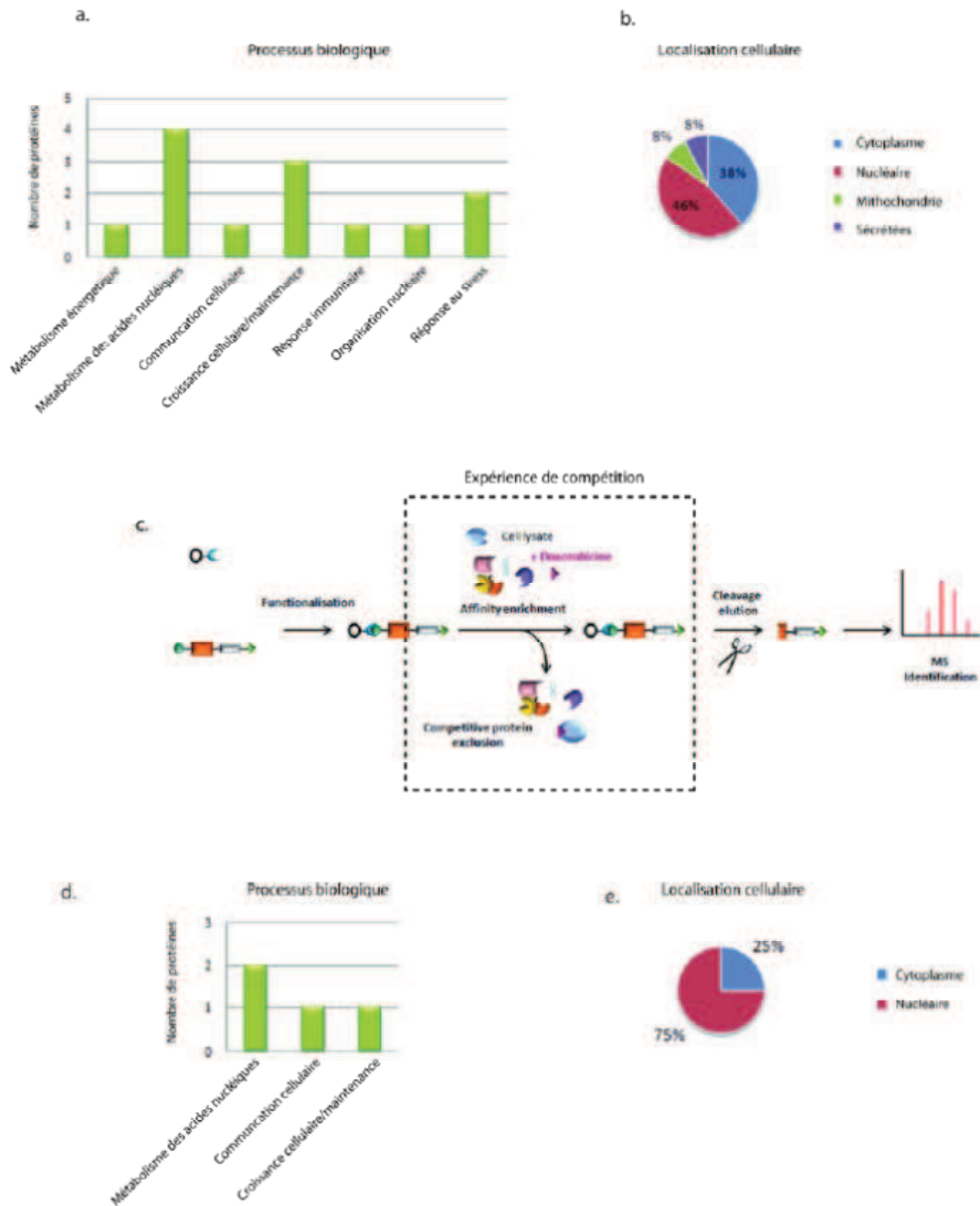


Figure 85 Expériences de pulldown réalisées avec la sonde MR-00142. a. Processus biologiques dans lesquels les cibles de la sonde MR-00142 sont impliquées. b. Localisation cellulaire des cibles protéiques. c. Principe de l'expérience de compétition réalisée avec la doxorubicine native. L'extrait cellulaire est mis en présence de la doxorubicine native puis de la sonde MR-00142. d. Processus biologiques dans lesquels les cibles sélectionnées après l'expérience de compétition sont impliquées. e. Localisation cellulaire des cibles de l'expérience de compétition.

2. Validation *in cellulo* de la cible Ku80 par immunohistochimie

Ces expériences ont été conduites par la plateforme de criblage phénotypique à haut débit de l'IGBMC.

Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus lors des pulldown avec la sonde MR-0142 par des expériences de co-localisation visualisées par immunofluorescence. L'objectif est de valider la localisation de Ku80 au niveau des cassures double brins induites par l'exposition des cellules à la doxorubicine. La protéine 53BP1 (p53 binding protein) a été utilisée comme marqueur des cassures double brins. De nombreuses études ont montré que cette protéine est rapidement recrutée au niveau des cassures d'ADN double brins et induit le recrutement des protéines de la machinerie de réparation de l'ADN au niveau du site de coupure (Panier and Boulton) .

Le principe de cette technique est d'exposer les cellules à la doxorubicine pendant un temps donné, afin de générer des cassures double brins. Dans un deuxième temps l'excès de doxorubicine est éliminé par incubation des cellules dans du milieu sans inhibiteur et la réparation de l'ADN a lieu pendant un temps défini par l'expérimentateur. Les cellules sont ensuite fixées et marquées avec un anticorps primaire dirigé contre les cibles d'intérêt, Ku80 et 53BP1, puis les anticorps primaires sont reconnus par des anticorps secondaires avec un fluorophore différent (mCherry et GFP dans notre cas). Les cellules ainsi marquées sont visualisées au microscope à fluorescence où l'on cherche à détecter des foci de réparation de l'ADN dans les noyaux coloré au DAPI. Si les foci correspondant aux deux fluorescences sont co-localisés, ils apparaissent (jaune/orangée dans notre cas) lorsque l'on superpose les images prises séparément sur les deux marqueurs.

Le premier essai en immunohistochimie a été réalisé dans la continuité des expériences de pulldown sur la lignée cellulaire RS4, 11. Un premier travail d'optimisation a été réalisé sur le temps d'exposition à la doxorubicine et de réparation des cellules avant l'immunofluorescence. Cependant la fluorescence pour 53BP1 et Ku80 est apparue diffuse dans le noyau (Figure 86). Britton *et al.* ont publié en 2013 une étude de l'optimisation des immunofluorescences des cassures d'ADN double brins par visualisation des protéines 53BP1 et Ku80 connues pour être recrutées sur les cassures double brins (Britton et al.). Les optimisations ultérieures se sont inspirées de cette publication. Dans un premier temps, l'utilisation du protocole publié n'était pas adaptée aux cellules RS4, 11 qui sont trop fragilisées lors du processus pour un immunomarquage. De plus les cellules RS4, 11

RÉSULTATS : Partie II

poussent en suspension ce qui pose un problème technique pour les marquages fluorescents. Cette contrainte technique n'a pu être corrigée malgré de nombreux tests d'adhésion.

Finalement au vu des nombreuses difficultés techniques rencontrées, la lignée RS4, 11 a été remplacée par la lignée U2OS (ostéosarcome humain) également utilisée dans la publication de Britton *et al.* Elle est un modèle cellulaire éprouvé pour les études de cassures double brins (Britton *et al.*). Après quelques optimisations portant notamment sur le choix des anticorps primaires de Ku80, des résultats interprétables ont été obtenus. Après exposition à la doxorubicine et immunomarquage fluorescent, plusieurs foci de réparation par noyau sont visibles dans les cellules marquées contre 53BP1 (Figure 87). Ces mêmes cellules présentent également plusieurs foci de réparation lors de la visualisation du marquage contre Ku80 (Figure 87). La superposition des images met en évidence une co-localisation des foci associés aux deux marquages.

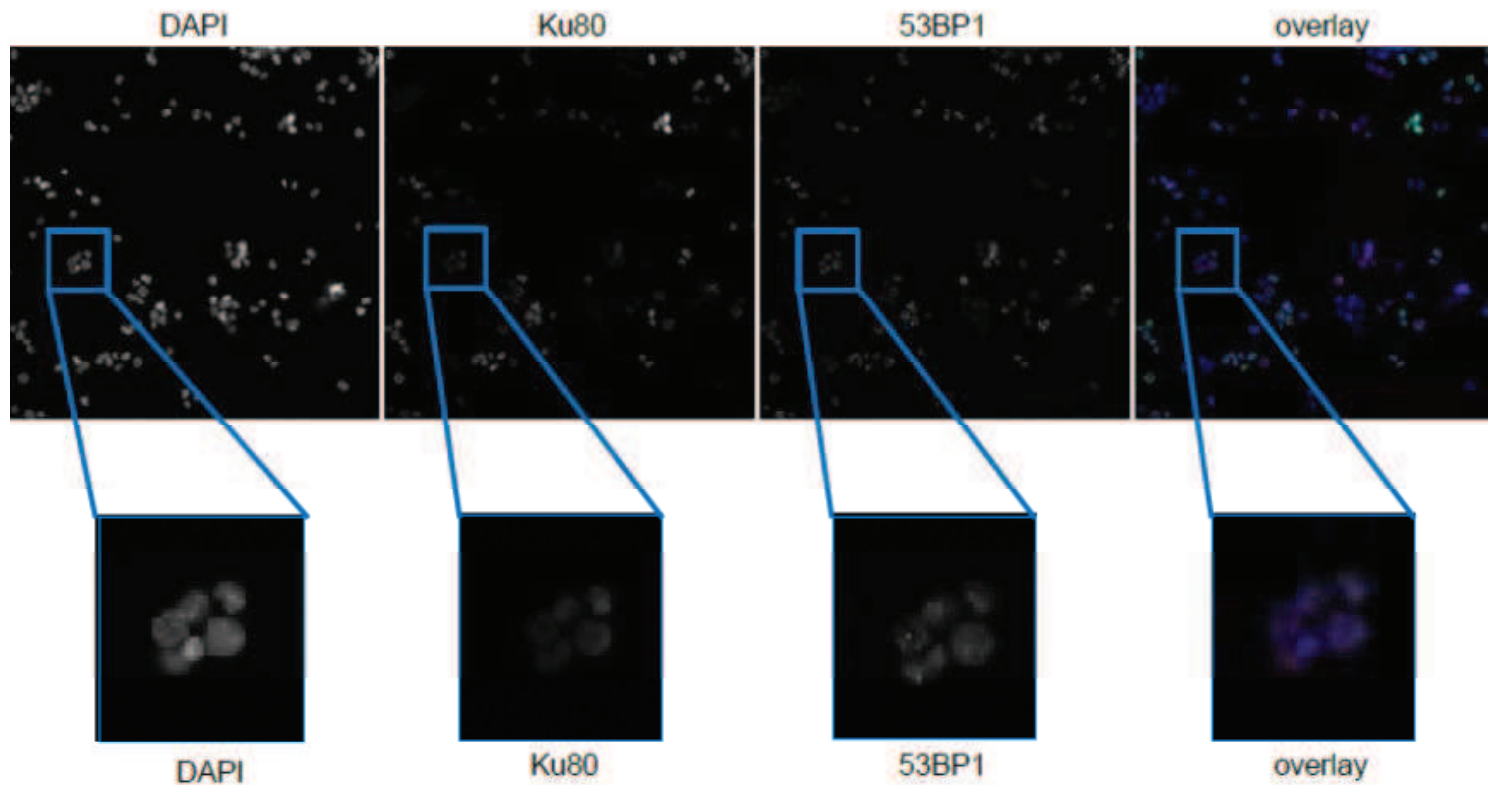


Figure 86 Co-localisation par immunomarquage dans les cellules RS4, 11. Les noyaux sont localisés grâce à la coloration au DAPI. Le marquage de Ku80 est diffus dans le noyau et quelques foci de 53BP1 sont visibles.

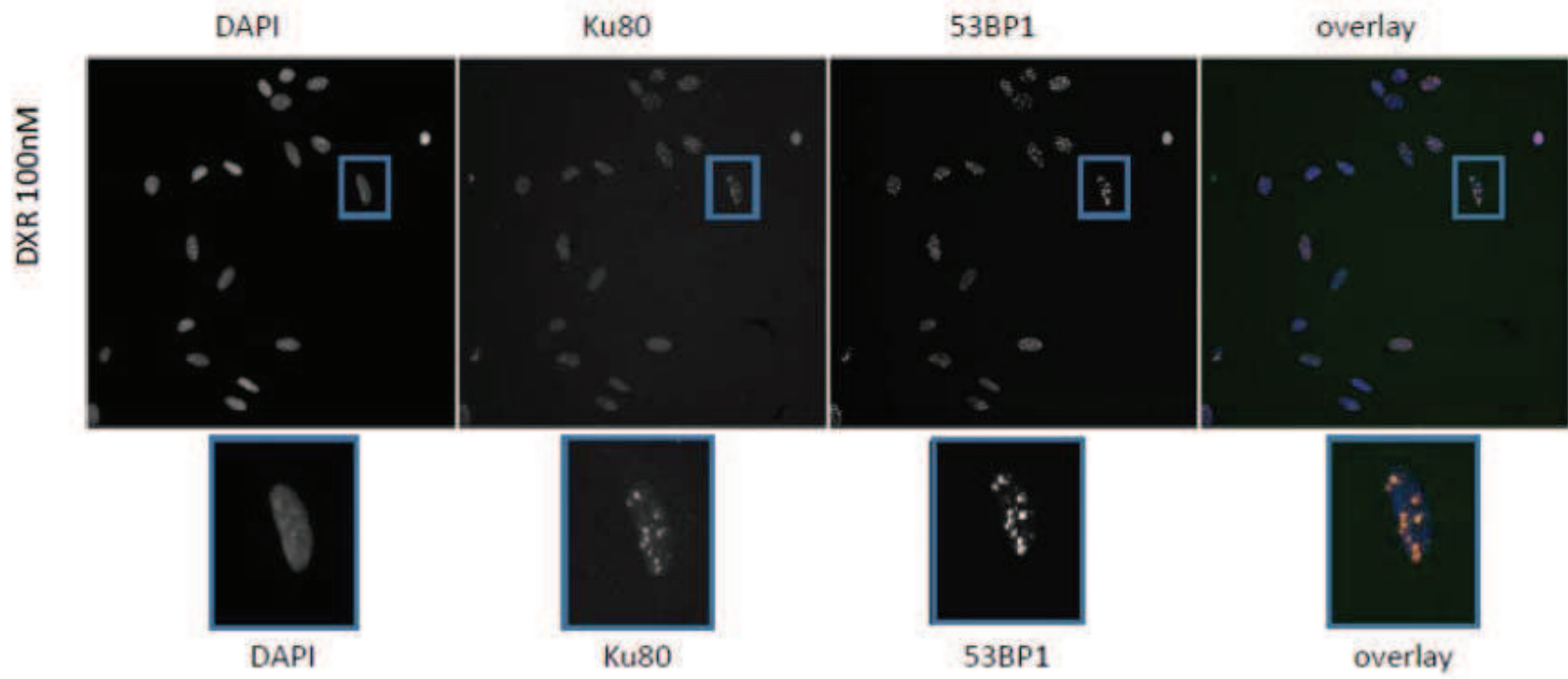


Figure 87 Immunofluorescence anti 53BP1 et Ku80 de cellules U2OS exposées 24 heures à 100 μ M de doxorubicine avec un temps de réparation de 30 minutes.

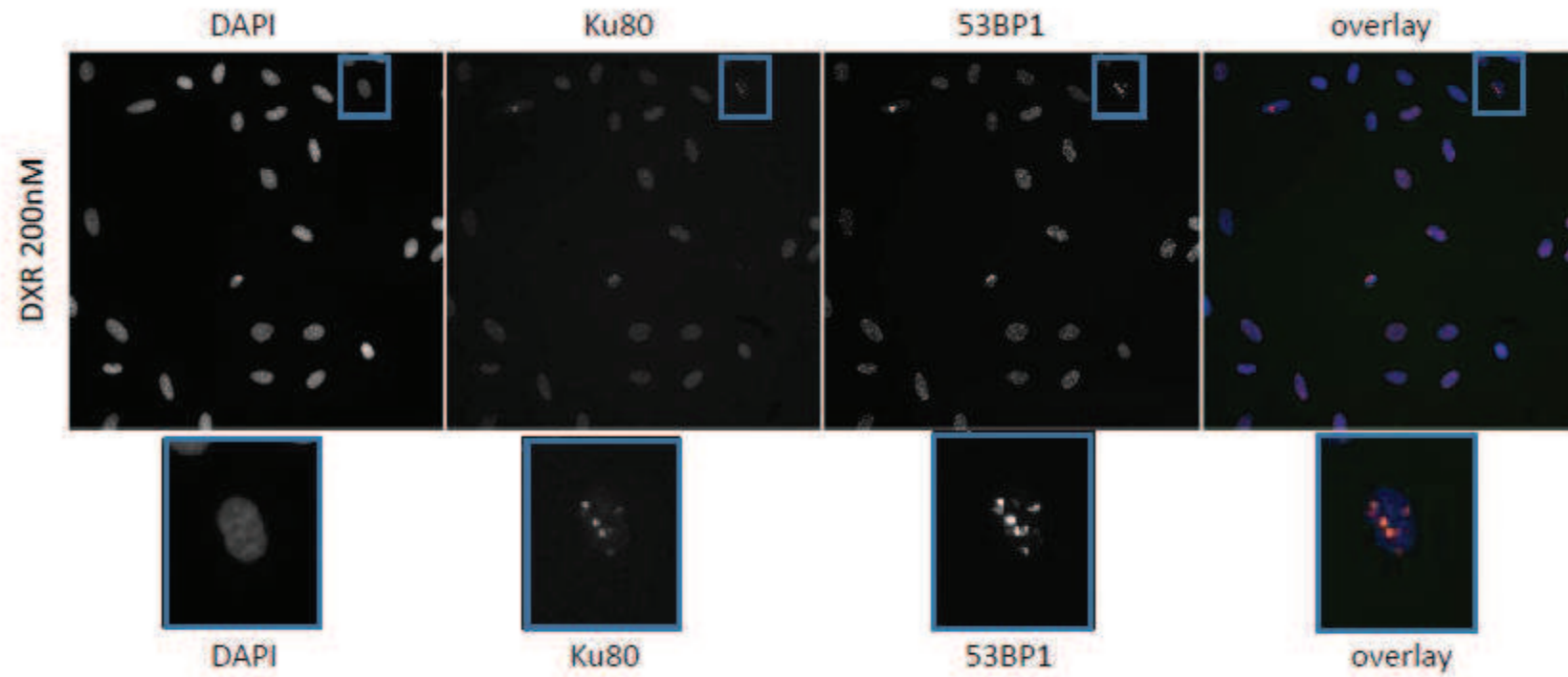


Figure 88 Immunofluorescence anti 53BP1 et Ku80 sur cellules U2OS exposées 24 heures à 200 μ M de doxorubicine avec un temps de réparation de 30 minutes.

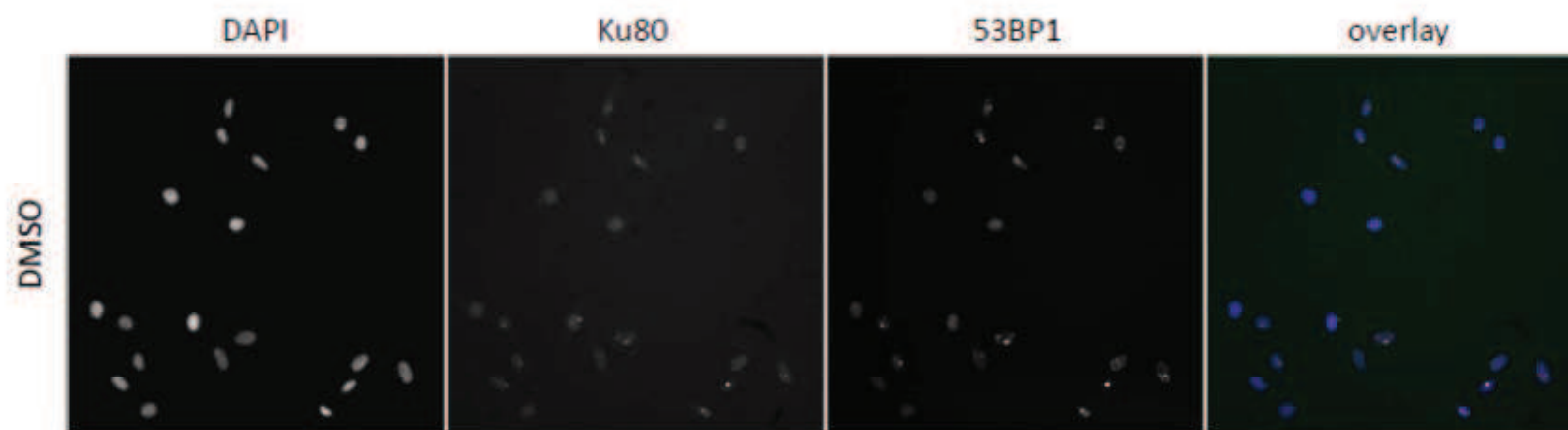


Figure 89 Contrôle immunofluorescence contre Ku80 et 53BP1 sans exposition à la doxorubicine.

Ces expériences *in cellulo* nous ont permis de mettre en évidence que la protéine Ku80 est recrutée au niveau des cassures double brins générées lors de l'exposition de cellule U2OS à la doxorubicine. Ce résultat concorde avec de nombreuses études qui montrent que la réparation des cassures double brins générées par la doxorubicine est majoritairement prise en charge par NHEJ au sein duquel le complexe Ku tient une place centrale (Ayene et al., 2005; Caldecott et al., 1990; Critchlow et al., 1997; Fell and Schild-Poulter, 2015; Grawunder et al., 1997; Jeggo et al., 1989; Mimori and Hardin, 1986).

Lors des expériences sur cellules, nous constatons donc que Ku80 est effectivement recruté sur les cassures double brins induites par la doxorubicine. Ces expériences de co-localisation de Ku80 avec les coupures ne permettent pas de comprendre si la doxorubicine est libérée avant la fixation du complexe Ku, ou si la doxorubicine est encore fixée au site de coupure lorsque le complexe Ku se fixe. Cela dit, Schonn *et al.* ont suggéré que la distorsion de l'ADN induite par la doxorubicine rend ce type de cassure difficilement réparable. Il est donc possible que le complexe Ku soit séquestré en présence de doxorubicine sur ces cassures chimio-induites, empêchant transitoirement leur réparation (Schonn et al., 2010).

Cette expérience sur cellules en culture est complémentaire des expériences de pulldown réalisées avec la sonde dérivée de la doxorubicine sur les extraits cellulaires. En effet, n'ayant pas exclu que le complexe Ku encore fixé à de l'ADN ait été capturé par la sonde doxorubicine dans les extraits, tous ces éléments semblent indiquer que la doxorubicine piège le complexe Ku sur l'ADN.

Cependant ces expériences ne nous indiquent pas comment le complexe Ku / ADN / doxorubicine est organisé d'un point de vue structural et quelles sont les interactions en jeu.

3. Perspectives : reconstitution du complexe *in vivo*

Des expériences de reconstitution in vitro du complexe Ku / ADN / Doxorubicine in vitro sont en cours pour répondre à ces questions.

Nous prévoyons d'étudier la fixation de la doxorubicine sur les complexes Ku70-80 et des ADN avec des protéines purifiées en collaboration avec le laboratoire de Jean-Baptiste Charbonnier (CEA, Saclay). Ce laboratoire produit les complexes Ku dans les cellules d'insecte (baculo virus) pour des études structurales et nous disposons dans ce contexte de protéines purifiées dans des quantités qui permettent de mener des études avec des techniques biophysiques et de retard sur gel. Ces expériences sont en cours au moment de l'écriture de ce manuscrit et seront mises en forme avec nos résultats de protéomique et cellulaires pour la publication d'un article.

RÉSULTATS : Partie II

III. Étude structurale de l'isoforme α par Cryo microscopie électronique.

L'objectif de l'étude structurale réalisée au cours de ma thèse s'est concentré sur la structure entière de l'isoforme α dans le but de déterminer l'architecture d'un complexe fonctionnel visé par l'étoposide. Nous avons commencé cette étude en appliquant la stratégie utilisée dans le laboratoire pour la reconstruction 3D par Cryo-EM de la structure entière de l'ADN gyrase de *T.thermophilus* en complexe avec un ADN de 155 paires de bases (ADN₁₅₅), publiée en 2013 (Papillon, 2012; Papillon et al., 2013). Les Top2 possèdent trois domaines fonctionnels. Ces trois domaines adoptent différentes positions relativement les uns aux autres au cours du cycle catalytique. Les Top2 même au sein d'un complexe fonctionnel peuvent adopter différentes conformations, limitant ainsi le choix des techniques structurales envisageables pour notre projet. La cryo-EM nous a semblé être la technique la plus appropriée pour l'étude de ce complexe. En effet, cette technique permet de visualiser les complexes purifiés dans leur état natif (hydraté) et elle offre également moins de contraintes quant à l'hétérogénéité conformationnelle de l'échantillon à la cristallographie aux rayons X.

Lors de l'étude structurale de la gyrase, la détermination de la structure de l'enzyme seule n'a été possible qu'après fixation chimique au glutaraldéhyde. Le domaine ATPase et le corps de l'enzyme ont pu être placés dans les densités au contraire des domaines C-terminaux flexibles. Ce n'est qu'en rajoutant un ADN et l'antibiotique ciprofloxacine qu'un ensemble restreint de conformations a pu être stabilisé permettant de reconstruire la structure de l'enzyme entière. Nous avons choisi d'appliquer la même stratégie afin d'étudier le complexe de l'isoforme Top2 α entier lié à un ADN et en présence d'un composé thérapeutique.

A. Formation du complexe HsTop2 α avec un ADN de 155 pb et l'étoposide

1. Choix du premier ADN utilisé pour l'étude structurale.

Les topoisomérases de manière générale n'ont qu'une spécificité de séquence limitée, elles sont surtout sensibles à la topologie de l'ADN. Différentes expériences ont montré que les Top2 se fixent sur des séquences d'ADN entre 18 et 28 paires de bases (Lee et al., 1989; Spitzner and Muller, 1988; Thomsen et al., 1990). Cependant cette couverture représente uniquement la fixation du corps de l'enzyme sur l'ADN. En effet, les structures cristallographiques du corps des HsTop2 lié à de l'ADN, montrent que le corps de l'enzyme à lui seul couvre environ 25 pb d'ADN et confirme donc que la taille observée lors des expériences de « DNA footprinting » ne prend pas en compte les contacts potentiels avec les domaines C-terminaux. Bien que ces domaines soient impliqués dans la reconnaissance de la chiralité des supertours d'ADN, leur mode de fixation à l'ADN n'est pas encore clairement élucidé. Nous avons utilisé initialement l'oligonucléotide de 155 paires de bases utilisé pour la reconstruction de l'ADN gyrase. Dans ce premier essai nous n'avons pas modifié l'oligonucléotide. L'addition d'étoposide lors de la formation du complexe nous semblait être suffisante pour stabiliser l'enzyme sur cet ADN.

L'ADN de 155 paires de bases a été cloné par Julie Papillon dans l'équipe (Papillon, 2012). Ce fragment d'ADN est issu du plasmide bactérien pBR322 (Figure 91). Sa taille avait été optimisée afin de stabiliser les domaines C-terminaux de la gyrase. Bien que les structures des domaines C-terminaux de l'isoforme α de la Top2 ne soient pas connues à l'heure actuelle, des études ont montré que ces domaines interviennent dans la reconnaissance de la chiralité des surenroulements de l'ADN (McClendon et al., 2005). Nous avons donc tiré avantage de cette séquence d'ADN de 155 pb dans l'optique de stabiliser les domaines C-terminaux de la Top2 humaine.

Les complexes isoforme α -ADN₁₅₅-étoposide ont été formés en incubant l'isoforme α purifiée avec de l'ADN₁₅₅ en respectant un ratio équimolaire, puis de l'étoposide a été ajouté en excès. Dans un deuxième temps, de l'AMPPNP a été ajouté en excès après que le complexe protéine/ADN/inhibiteur a été formé. L'ordre d'addition des différents éléments est potentiellement important car la fermeture des domaines ATPases par l'AMPPNP peut empêcher la fixation de l'ADN au corps de l'enzyme (Figure 90).

RÉSULTATS : Partie III

Les complexes ainsi formés ont été analysés par des expériences de retard sur gel d'électrophorèse en conditions natives. Après une double coloration du gel au bleu de coomassie pour les protéines (Figure 3a) et au bromure d'éthidium pour les ADN (Figure 3b), nous avons observé (i) une co-localisation de l'ADN et des protéines, (ii) un changement de la mobilité électrophorétique de la protéine en présence de l'oligonucléotide, (iii) pas de différence notable de mobilité lors de l'ajout de l'étoposide et de l'ADPNP au complexe Protéine/ADN, (iv) deux populations avec des mobilités électrophorétiques différentes en présence d'ADN.

Cette expérience permet de conclure que lors de la formation du complexe, la mobilité électrophorétique de l'enzyme est modifiée par l'ajout de l'ADN₁₅₅. Cependant, elle ne nous permet pas de caractériser plus finement cette fixation ni de tirer des conclusions sur la nature des deux populations observées.

Il est possible que vu la taille de l'ADN, deux populations de complexes soient formées. En effet, des études ont montré que le taux d'hydrolyse de l'ATP des Top2 est modifié en fonction de la taille des oligonucléotides présents dans le milieu réactionnel. En présence d'un ADN d'environ 150 paires de bases, l'activité ATPase augmente brusquement. Un ADN de taille inférieure ou supérieure n'a plus d'effet notable (Campbell and Maxwell, 2002). Deux hypothèses ont été avancées par les auteurs pour expliquer ces observations. Premièrement l'ADN sortant du corps de l'enzyme serait suffisamment long pour être capturé par les domaines ATPase au moment de leur dimérisation, mimant le passage d'un brin à travers l'enzyme comme lors de la relaxation de l'ADN. Deuxièmement deux enzymes peuvent s'être fixées sur un même oligonucléotide générant alors un effet coopératif qui augmenterait le taux d'hydrolyse d'ATP. Nos observations pourraient illustrer cette dernière hypothèse. Il est possible qu'une fraction des complexes soit composée de deux enzymes sur un même ADN₁₅₅ générant un encombrement stérique plus important et donc une migration plus lente sur gel d'électrophorèse. Cependant à ce stade des expériences complémentaires seraient nécessaires pour comprendre la nature exacte de ces deux populations.

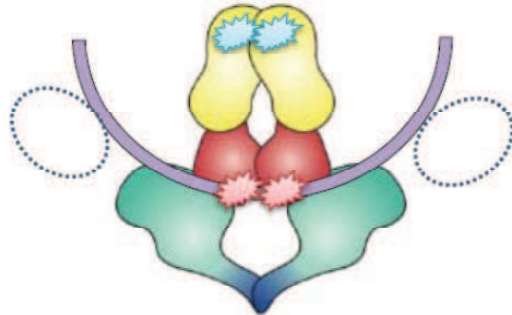


Figure 90 Complexe Top2-ADN-étoposide (étoiles rouges) avec les domaines ATPases (en jaune) fermés par de l'AMPPNP (étoiles bleues). Les domaines C-terminaux sont matérialisés par des cercles pointillés sous le brin d'ADN G (Violet).

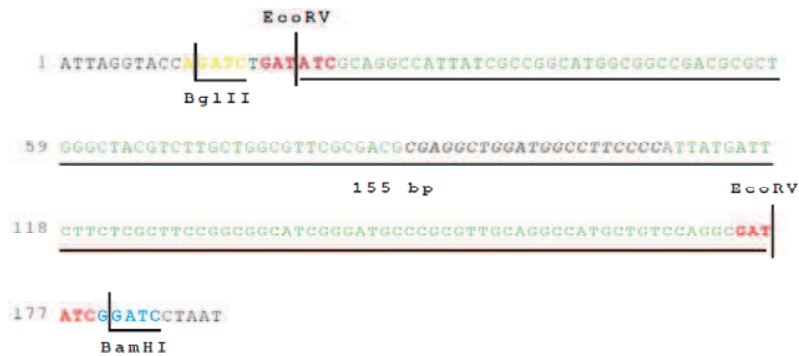


Figure 91 Séquence de l'oligonucléotide de 155 paires de bases (Papillon, 2012). Ce fragment provient du plasmide bactérien pBR322 (séquence en vert) centré sur une séquence sensible aux quinolones (séquence grise). 16 copies de ce fragment ont été insérées dans un plasmide bactérien standard pour permettre une production de l'oligonucléotide en grande quantité.

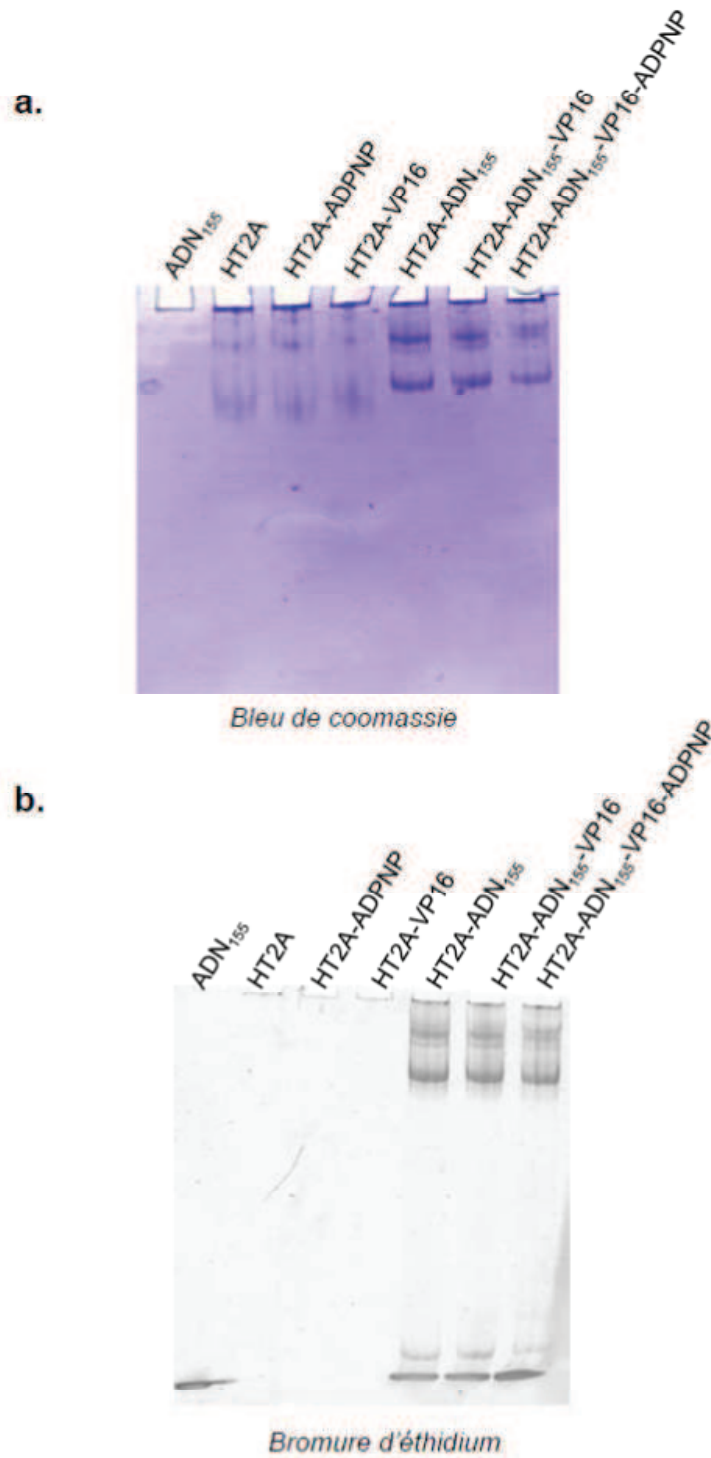


Figure 92 Expérience de retard sur gel des complexes HsTop2 α -ADN-étoposide. a. Coloration au bleu de coomassie b. Coloration au bromure d'éthidium.

B. Acquisition d'images en Cryo microscopie électronique (Cryo-EM), reconstruction 3D et analyse de la carte de densité électronique.

La reconstruction 3D de complexes protéiques par Cryo-EM comprend plusieurs étapes (Figure 93) :

1. Le conditionnement de la protéine. Il consiste à échanger le tampon de congélation de la protéine contre un tampon compatible à la fois avec la Cryo-EM et le complexe à former.
2. La formation des complexes *in vitro* avec les différentes séquences d'ADN et les ligands
3. La congélation de l'échantillon préalablement déposé sur une grille de cuivre.
4. L'acquisition des images au microscope électronique.
5. L'analyse des images et la sélection manuelle ou automatique des particules.
6. La reconstruction 3D et l'affinement de la densité électronique.
7. L'interprétation de la carte avec des données complémentaires de cristallographie ou biochimiques

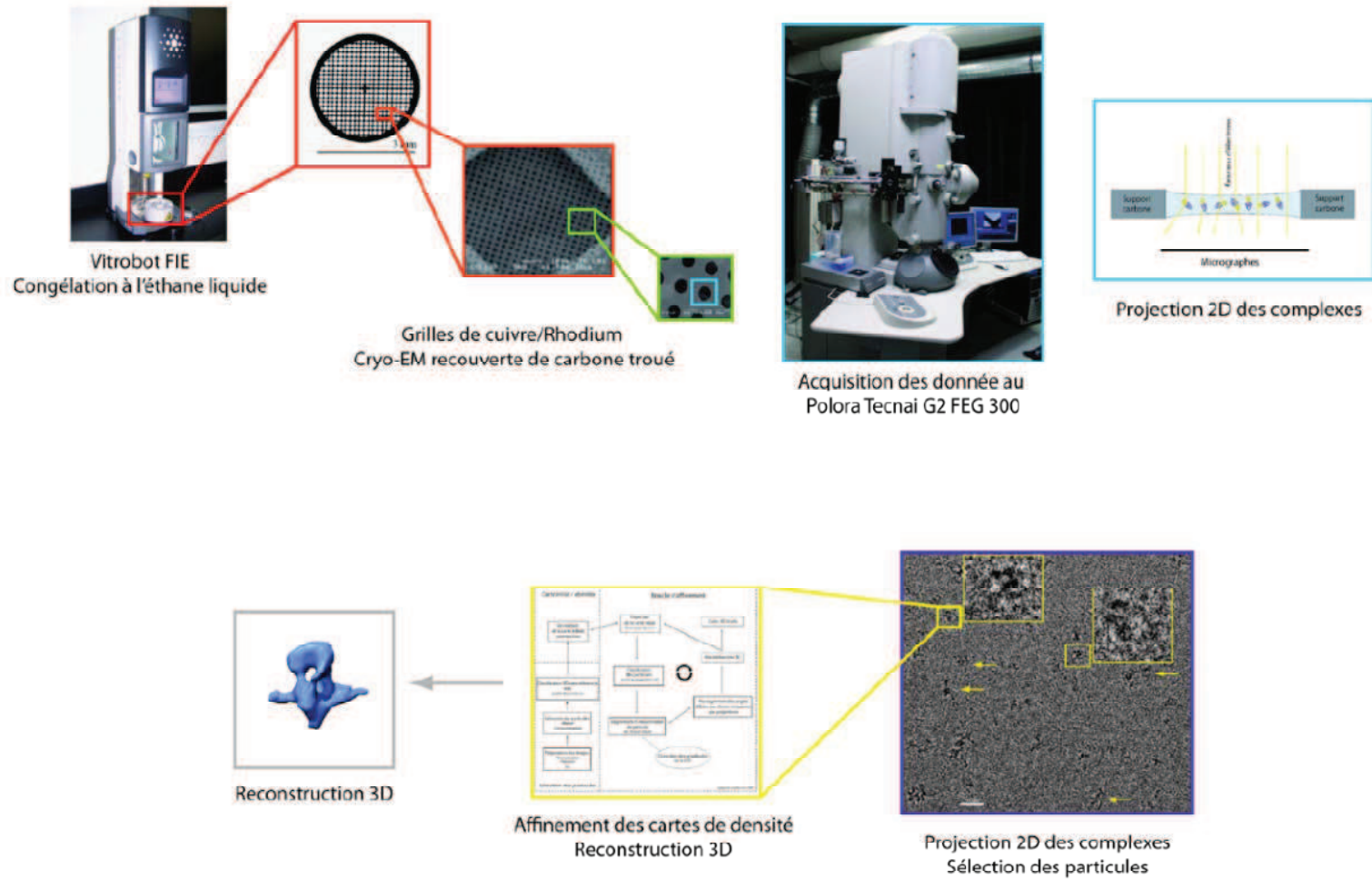


Figure 93 Les principales étapes de la Cryo-EM. Après formation du complexe, la congélation est réalisée dans une atmosphère contrôlée par le Vitrobot. Puis les grilles sont observées au Polara Tecnai G2 et les particules sont sélectionnées après acquisition des images puis utilisées pour la reconstruction 3D avec EMAN2.

1. Optimisation de la préparation de l'échantillon.

En Cryo-EM le contraste de l'image est formé grâce à la déviation des électrons par les atomes de l'échantillon. La composition du tampon doit être aussi inerte que possible afin de limiter les interférences avec le contraste de l'échantillon. Les sels, les ions métalliques et les composés organiques interagissent avec les électrons et donc augmentent le contraste du tampon qui finit par se fondre avec le contraste des particules. Un travail d'optimisation est nécessaire pour trouver un tampon compatible avec la Cryo-EM qui soit également compatible avec le complexe étudié. Des concentrations en sel inférieures ou égales à 200 mM avec de 0 à 5% de glycérol sont communément utilisées.

Les HsTop2 purifiées sont conservées dans un tampon contenant une concentration en NaCl (800mM) et en glycérol (10%) incompatibles avec le Cryo-EM (Matériels et méthodes). Avant la formation du complexe, nous avons diminué la concentration en NaCl et éliminé le glycérol par deux échanges de tampon successifs sur une colonne de dessalage diminuant le sel à 400mM. Cette procédure n'affecte pas l'intégrité des protéines, aucune trace de dégradation n'a été révélée sur gel SDS PAGE suite à ce protocole. Les composants du complexe sont mélangés dans le tampon à 400 mM NaCl. L'échantillon de complexes est ensuite dilué en cascade pour diminuer la concentration en sel à 200 mM ou moins et ajuster la concentration en complexes au moment de la congélation.

Lors de la congélation la glace doit être suffisamment fine, entre 10 et 20 nm d'épaisseur pour permettre le passage du faisceau d'électron avec un minimum de bruit de fond (Figure 94). Dans notre cas, la congélation est réalisée avec le VitRobot (FEI), dans une enceinte close qui permet de contrôler la température et l'humidité au moment du dépôt de l'échantillon sur la grille, puis la vitesse de congélation. Nous avons travaillé à basse température (10°C) pour augmenter la stabilité des complexes et avec 95% d'humidité pour éviter l'évaporation de l'échantillon au moment du dépôt sur la grille (3,5 µl). La concentration en complexe a également nécessité un ajustement afin que les particules soient réparties de manière homogène et sans confluence. Après plusieurs essais, les dilutions du complexe à 125ng/µl ont permis l'enregistrement d'images avec le plus grand nombre de particules utilisables.

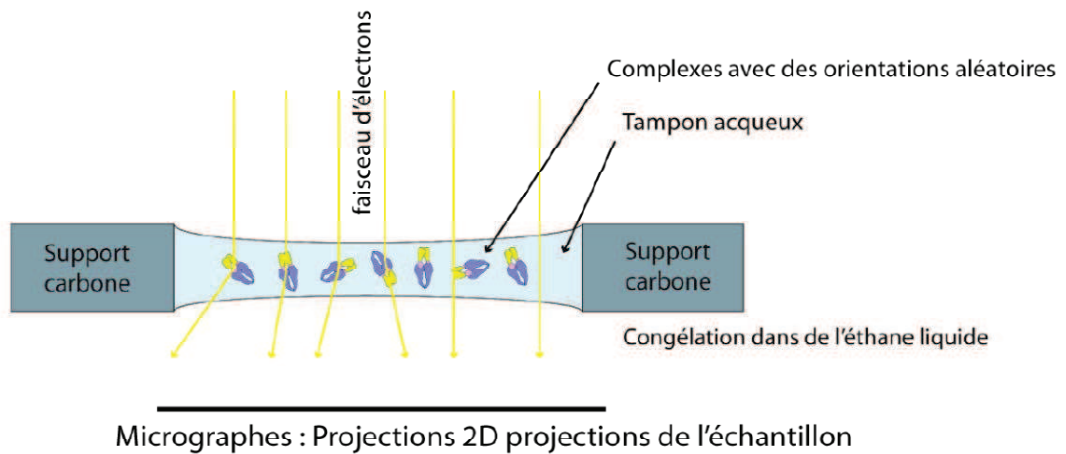


Figure 94 Principe de l'acquisition des images en Cryo-EM. Coupe transversale d'une grille de Cryo-EM après congélation de l'échantillon. L'échantillon se place dans les trous formés par le carbone. Après absorption de l'excès de liquide par du papier filtre, il ne reste qu'un ménisque d'échantillons hydratés contenant des complexes dans des orientations aléatoires. Dans un cas idéal, les électrons passent librement à travers le tampon et sont uniquement déviés par les complexes qui se trouvent sur leurs trajectoires incidentes.

2. Reconstruction 3D des complexes HsTop2a – ADN₁₅₅ – étoposide.

La reconstruction de la densité électronique d'un complexe est réalisée à partir d'image de molécules isolées ou particules. Au moment de la congélation, les particules sont orientées de manière aléatoire dans le tampon. Chaque projection 2D des complexes peut donc être assimilée à une vue différente d'un même objet 3D. Le processus de reconstitution tridimensionnelle consiste à trouver les angles qui lient les projections 2D entre elles et ainsi reconstruire la densité électronique en 3D (Figure 95). Il existe de nombreux logiciels dédiés à la reconstruction 3D en Cryo-EM. Nous avons choisi d'utiliser EMAN2 car il intègre tous les programmes permettant de réaliser une reconstruction 3D complète, évitant ainsi les problèmes de compatibilité entre logiciels dédiés aux différentes étapes de la reconstruction.

La reconstitution 3D avec EMAN2 est réalisée en 3 étapes (Figure 95). (i) Les particules sont sélectionnées à partir des images de manière semi-automatique ou manuellement. Elles sont ensuite extraites de l'image d'origine et regroupées par similarité dans des classes. Cette classification permet de moyenniser les images des particules qui présentent une même orientation et donc d'augmenter le ratio signal sur bruit. (ii) Quelques classes sont utilisées pour reconstruire une carte initiale. (iii) La carte de densité initiale est projetée en 2D selon un angle prédéfini. Ces images sont utilisées pour affiner la classification et l'alignement des particules dans les moyennes de classe. Ces nouvelles classes sont à leur tour utilisées pour reconstruire une densité électronique. Ce processus est itératif, les étapes de classification des particules et de reconstruction 3D sont répétées jusqu'à convergence des cartes de densité (Figure 95).

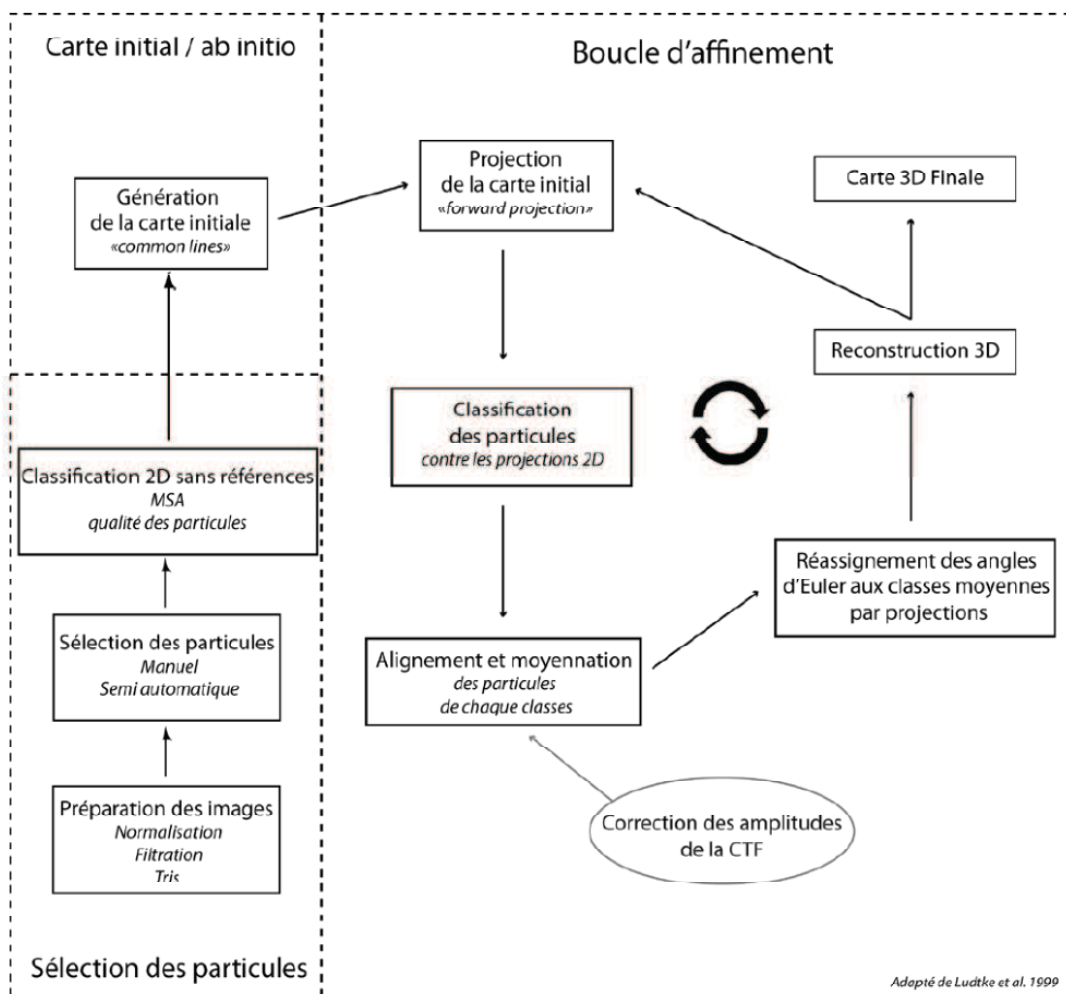


Figure 95 Processus de reconstruction 3D avec le logiciel EMAN2 en 3 étapes : la sélection des particules, la génération d'une carte initiale *Ab initio*, l'affinement contre les projections 2D de la carte initiale.

i. **Acquisition des images du complexe HsTop2 α - ADN₁₅₅-
étoposide.**

Les images du complexe ont été collectées sur le MET Tecnai Polara G2 avec une caméra Falcon muni de la technologie CMOS. 611 images du complexe ont été collectées à 100 kV avec un grossissement de 59 000 fois. Sur les images enregistrées, les particules sont visibles et elles présentent des dimensions attendues de l'ordre de 15 à 20 nm de long pour les plus allongées (Figure 96). Malgré quelques zones de confluences, la plupart des particules sont bien individualisées et donc utilisables pour la reconstruction 3D. Par ailleurs, de nombreux « points » noir sont également visibles sur les images mais il est difficile d'évaluer s'il s'agit de contaminants, de domaines isolés tronqués ou d'une vue particulière du complexe avec de plus petites dimensions.

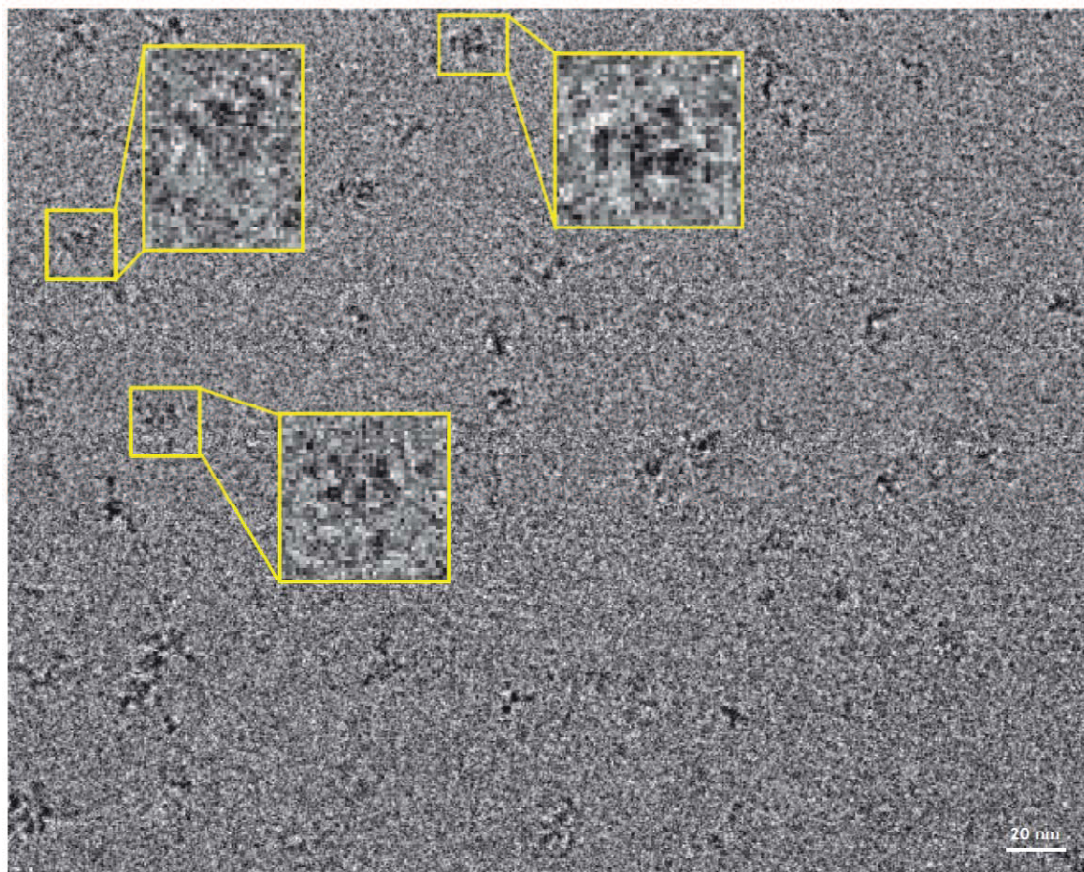


Figure 96 Images de Cryo-EM du complexe HsTop2 α ADN₁₅₅ étoposide. Les particules (encadré jaune) sont visibles dans différentes orientations.

RÉSULTATS : Partie III

À partir de ces images environ 63 000 particules ont été sélectionnées avec le logiciel e2boxer implanté dans EMAN2. 25% des particules ont été éliminées lors de la correction de la CTF (Contrast Transfert Function) réalisée avec le logiciel e2ctf d'EMAN2, constituant un set initial d'environ 48 000 particules. Afin d'estimer la qualité des particules nous avons réalisé des classifications 2D sans référence qui ont révélé une grande hétérogénéité au sein des particules. De nombreuses classes présentent cependant des vues reconnaissables du corps catalytique typiques des Top2 (Figure 97). Nous avons donc entamé le processus de reconstruction avec pour objectif premier d'isoler des sous populations homogènes du complexe. Pour cela nous avons utilisé deux stratégies de tri distinctes sur le jeu de données initial :

A : L'ensemble des particules a été soumis au logiciel EMAN2 **sans tri préalable**.

B : L'ensemble des particules a été **trié manuellement puis soumis** au logiciel EMAN2.

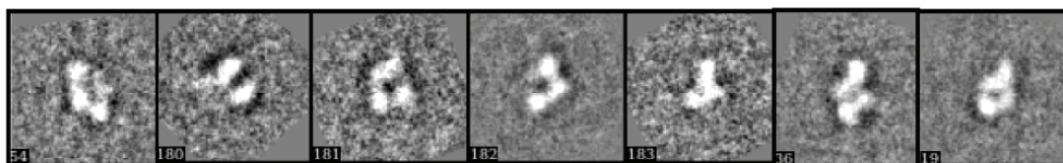


Figure 97 Quelques classes issues de la classification 2D des particules du complexe HsTop2 α ADN₁₅₅ étoposide.

ii. Reconstruction 3D du complexe à partir des particules initiales soumises sans tri préalable à EMAN2:

Objectifs : Réaliser une reconstruction 3D à partir d'une sous-population de particules homogènes isolées d'un set de particules hétérogènes.

Nous avons soumis le set particules initiales au logiciel EMAN2 sans tri préalable. Les premiers affinements ont été réalisés en utilisant la carte initiale de l'ADN gyrase de *T.thermophilus* en complexe avec de l'ADN déterminée dans le laboratoire (Papillon, 2012) (Figure 98a). Cependant, la gyrase possède des domaines C-terminaux propres à l'enzyme procaryote qui risquaient d'induire un biais et des problèmes d'alignement des particules de notre jeu hétérogène. Nous avons donc relancé un affinement avec la carte de la gyrase sans ADN dans laquelle les densités des domaines C-terminaux ne sont pas présentes. Cette carte comprend des densités correspondant au corps de l'enzyme (domaines de coupure et de religation de l'ADN) et aux domaines ATPase dimérisés, dont l'architecture globale est très conservée parmi les Top2 de différentes espèces (Figure 98b). Après plusieurs cycles d'affinement contre cette carte initiale, nous avons observé que la forme globale des densités électroniques reconstruites semblait s'éloigner de l'architecture 3D connue des Top2. Nous en avons déduit que la procédure d'affinement classique par le programme e2refine ne permettait pas une classification efficace des particules de notre set initial très hétérogène.

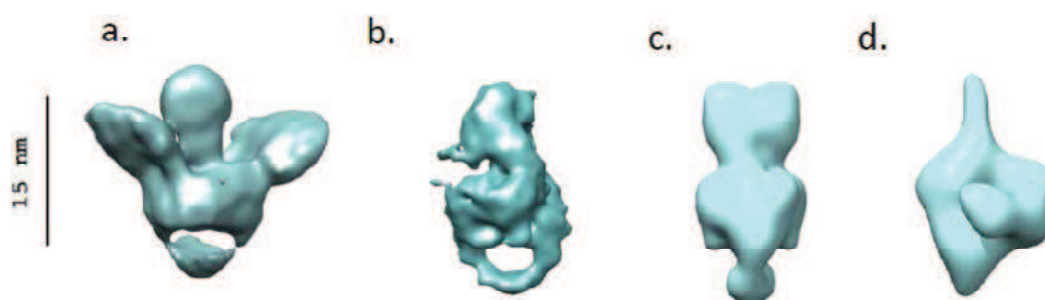


Figure 98 Les différentes cartes initiales utilisées lors des reconstructions 3D du complexe HsTop2 α ADN étoposide. a. l'ADN gyrase de *T.thermophilus* en complexe avec de l'ADN : carte non filtrée, b. L'ADN gyrase de *T.thermophilus* sans ADN et fixé à la glutaraldéhyde c. Structure cristallographique de la Top2 de *S.cerevisiae* (ScTop2) filtrée à 30 Å. d. Une des trois cartes *ab initio* du complexe construite à partir des données brutes.

Pour améliorer la classification des particules, nous avons décidé de réaliser un affinement multiple avec e2refinmulti (EMAN2). Ce programme permet de classer les particules en fonction de plusieurs cartes initiales. Chaque particule est attribuée à la carte initiale dont les projections 2D lui sont le plus proches. Comme le jeu de particules initiales était très hétérogène, nous avons décidé d'utiliser 4 cartes initiales. Trois cartes reconstruites *ab-initio* à partir des classes 2D des particules (Figure 98d.) et de l'ADN gyrase Apo (Figure 98b.). Les cartes *ab initio* ont été choisies pour regrouper les particules non représentatives du complexe qui sont soit des contaminants, soit des complexes altérés. La carte de la gyrase Apo a été utilisée pour regrouper les particules qui présentent une conformation utilisable pour la reconstruction 3D finale.

À la fin de l'affinement multiple, la carte *ab initio* 3 a regroupé le plus grand nombre de particules bien que sa structure 3D soit éloignée de celle des Top2 (Figure 98d). Ceci confirme que la majorité des particules de notre jeu de données initiales présente une hétérogénéité qui limite la qualité des reconstructions 3D réalisées précédemment. Environ 20 % des particules initiales ont été attribuées à la carte de référence Gyrase Apo (Figure 99). Nous avons extrait ce sous-groupe (6500 particules) du set de particules initiales et reconstruit une carte de densité.

Le nombre de particules avec lequel nous avons démarré la reconstruction est un nombre limite pour une reconstruction 3D en Cryo EM, même dans le cas de complexes très homogènes. De plus malgré l'affinement multiple une hétérogénéité conformationnelle des particules n'était pas à exclure. Le petit nombre de particules nous a donc poussés à optimiser l'affinement par le choix d'une carte initiale la plus proche possible du complexe que nous étudions. Nous avons utilisé la carte cristallographique de Sc Top2 comme carte initiale pour trois raisons. (i) La structure de ScTop2 a été résolue avec un oligonucléotide contrairement à la gyrase Apo qui ne contient pas d'ADN et qui pourrait entraîner un biais vers une conformation sans ADN. (ii) Les structures 3D du domaine ATPase et du corps des Top2 sont très proches. Le logiciel EMAN2 est conçu pour qu'une carte initiale proche du complexe à reconstruire permette lors des premiers cycles d'affinement de guider de manière robuste la classification des particules. Les derniers cycles d'affinements permettent quant à eux de s'émanciper de la carte initiale (Figure 98c.) (Schmidt et al.). (iii) Cette structure cristallographique a été publiée après les premiers tests de reconstructions 3D décrits précédemment.

RÉSULTATS : Partie III

L'affinement du sous-set de particules a permis la reconstruction 3D d'une carte de densité interprétable avec la contribution finale de 5089 particules. 11% des particules du jeu de données d'origine ont donc été utilisés. Ces particules représentent une sous population du complexe suffisamment homogène pour permettre une reconstruction 3D à une résolution estimée de 20Å. La carte présente des caractéristiques structurales propres aux Top2 avec des dimensions de 17x10x9 nm. Les densités correspondant aux domaines ATPase surmontent des densités en forme de cœur, caractéristiques du corps des Top2, avec une orientation relative entre elles de 70°. La structure de la Top2 de *S.cerevisiae* utilisée comme carte initiale pour la reconstruction 3D possède des dimensions de 15x9x7 nm et adopte un angle de 45° entre les deux domaines fonctionnels [7]. Ces différences contribuent à valider la reconstruction 3D obtenue et à confirmer que nous nous sommes bien émancipés de la carte initiale lors de l'affinement.

Les projections de la carte de densité obtenue ont été comparées aux classes 2D des particules utilisées pour la reconstruction 3D (Figure 100). Cette expérience a pour objectif de détecter la présence de densités artéfactuelles qui seraient présentes sur les projections 2D de la reconstruction et absentes des classes 2D correspondantes. Nous avons observé que toutes les densités présentes dans les reprojctions de la reconstruction 3D sont également visibles dans les classes 2D. Suite à ces contrôles nous avons décidé de conserver cette carte pour une interprétation plus élaborée de l'architecture du complexe HsTop2 α – ADN₁₅₅ – étoposide.

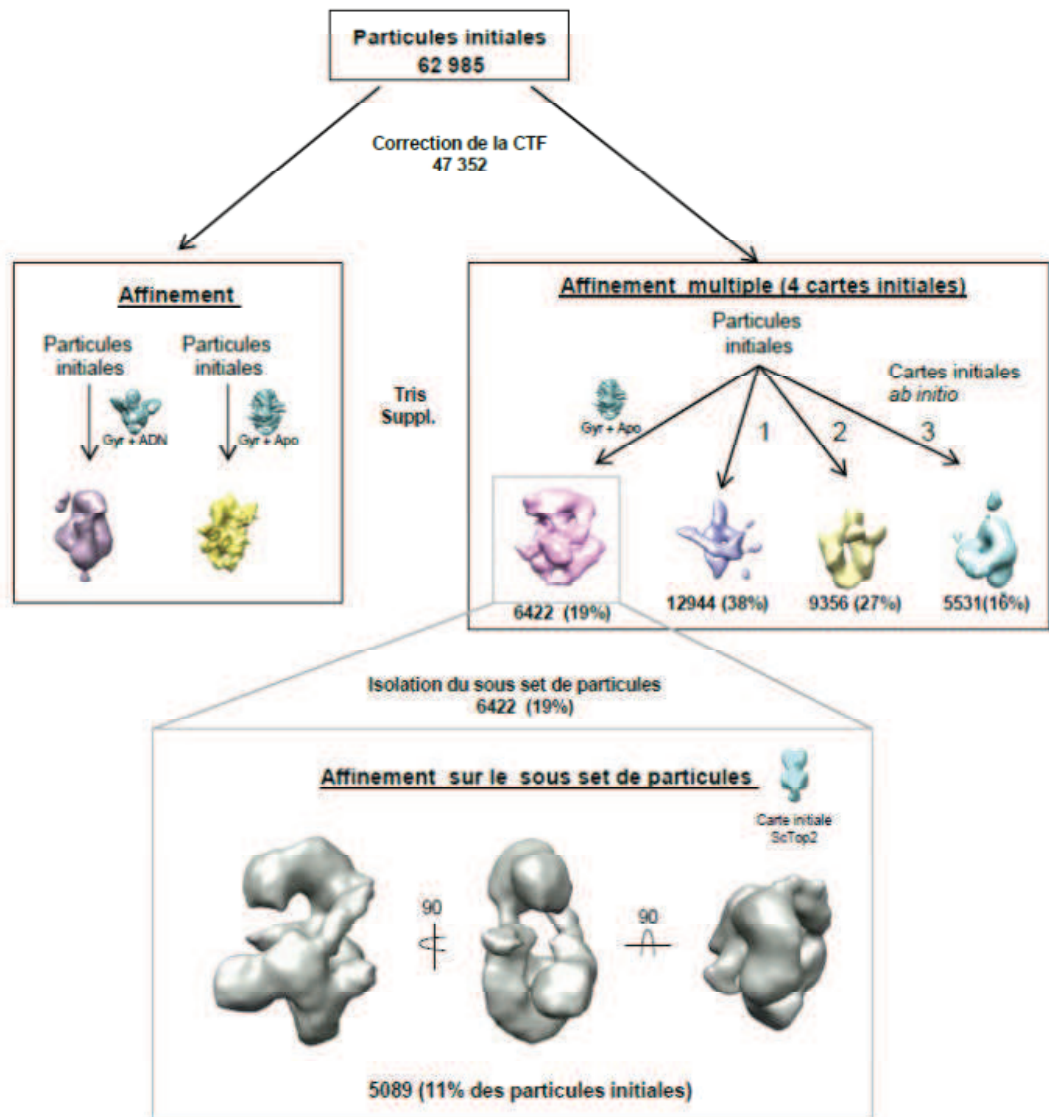


Figure 99 Stratégie d'affinement utilisée avec le set de particules initial du complexe HsTop2 α ADN₁₅₅ étoposide.

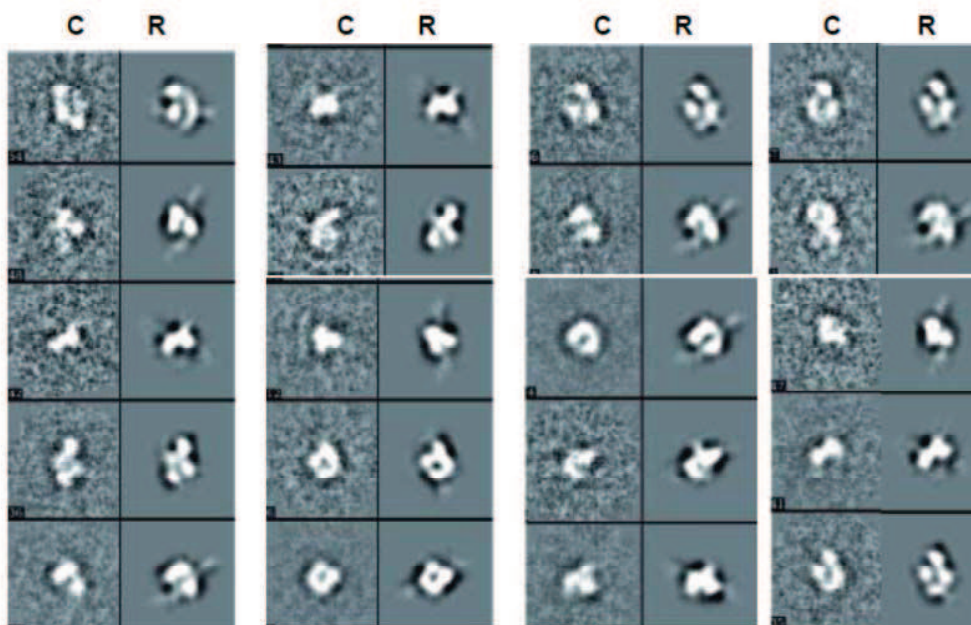


Figure 100 Reprojctions de la carte de densité HsTop2 α ADN étoposide (R) et comparaison avec les classes 2D qui ont été utilisées pour la reconstruction 3D (C).

iii. Reconstruction 3D à partir du jeu de particules préalablement trié.

L'objectif de cette reconstruction était de diminuer l'hétérogénéité du jeu de particules en amont de l'affinement 3D afin d'atteindre la résolution la plus haute possible pour ce jeu de données.

Nous avons décidé de trier le jeu de particules initial en éliminant tout ce qui pourrait affecter l'alignement des particules au moment de l'affinement, c'est-à-dire, les particules avec des dimensions trop grandes, les particules considérées comme des contaminants et les particules trop proches les unes des autres. Nous avons éliminé 28 000 particules constituant ainsi un jeu de données d'environ 19 000 particules avec lesquelles nous avons réalisé un affinement avec la carte ScTop2 comme référence.

Comme ce jeu de particules avait subi une étape de tri préalable, nous avons pensé qu'une partie de l'hétérogénéité du jeu aurait été éliminée. Cependant les cartes que nous avons obtenues ne présentaient pas d'amélioration de la résolution. Lors de la première reconstruction, nous avons utilisé 4 cartes initiales pour l'affinement multiple. Dans ce cas nous avons jugé que deux cartes initiales seraient suffisantes car le jeu de particules avait déjà subi une étape de tri. Nous avons donc décidé de réaliser un affinement multiple contre deux cartes de référence : la structure cristallographique de ScTop2 et une carte générée *ab initio* (Figure 101). Sur 18 000 particules initiales, 4850 particules ont été attribuées à la carte ScTop2. Ces particules ont été isolées et utilisées pour un affinement.

Lors de l'affinement sur le set de particules isolées, nous avons utilisé comme carte de référence la carte de densité reconstruite à partir de ScTop2 au moment de l'affinement multiple (Figure 101). Finalement, les reconstructions présentaient une diminution des densités correspondant au corps de l'enzyme et une augmentation des densités que nous n'avons pas pu attribuer avec certitude du fait de la faible résolution. Il semblerait donc que le tri manuel des particules ait introduit un biais visible lors de la reconstruction 3D.

Finalement, nous avons choisi d'utiliser la première carte de densité reconstruite à partir des particules n'ayant pas fait l'objet d'un 2^{ème} tri pour nos interprétations structurales.

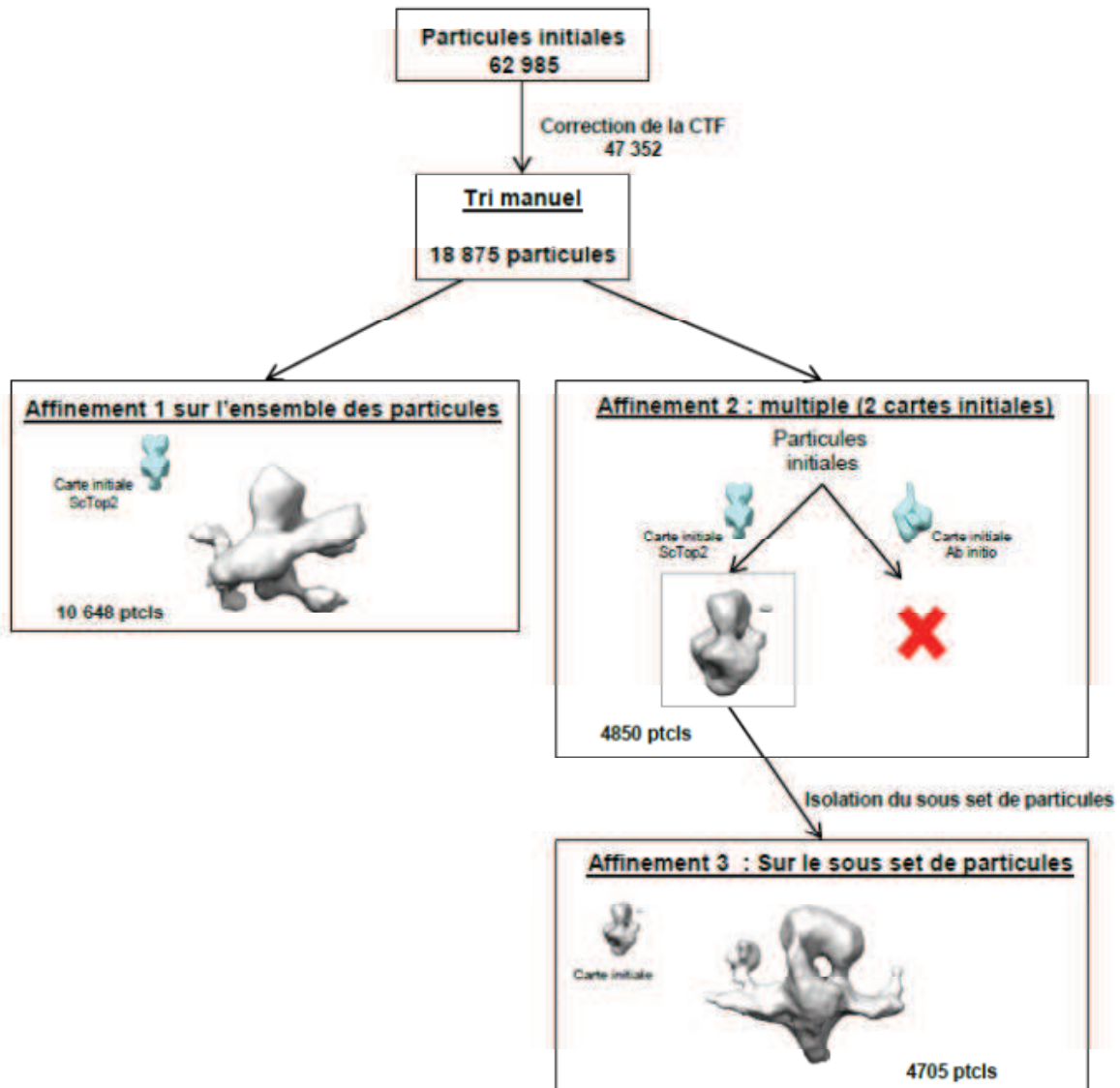


Figure 101 Reconstruction 3D du complexe HsTop2 α ADN étoposide avec le set de particule triées visuellement avant l'affinement.

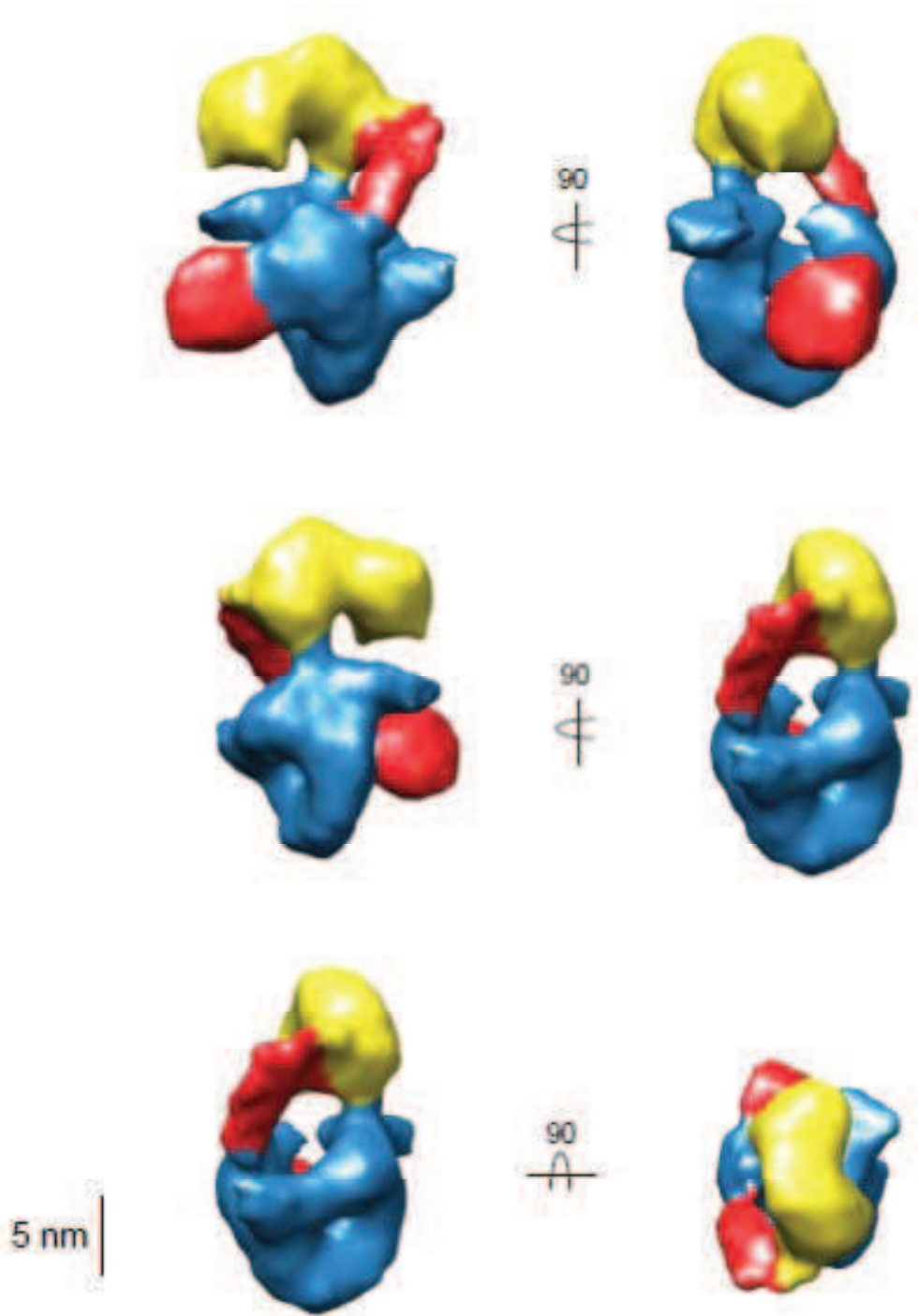


Figure 102 Différentes vues de la carte de densité électronique du complexe isoformes α ADN 155 pb étospace. En jaune les densités correspondantes aux domaines ATPase, en bleu le corps de coupure et de religation de l'ADN, en rouge les densités qui n'ont pas pu être assignées à ce stade de l'étude.

iv. **Interprétation de la carte de densité du complexe HsTop2 α
ADN₁₅₅ étoposide**

Afin d'approfondir l'analyse de cette première reconstruction nous avons placé dans la densité électronique, les structures cristallographiques des domaines ATPase et du corps de l'isoforme α (Figure 103) dans les limites de la précision qu'il est possible d'atteindre à une résolution supérieure à 15 Å. Les structures des domaines ont été positionnées sans difficulté dans les densités électroniques. Cependant, malgré nos tentatives d'interprétation, les densités supplémentaires qui sont apparues lors de l'affinement ne peuvent être interprétées sans ambiguïté du fait de la faible résolution de la carte. Ces densités pourraient correspondre aux domaines C-terminaux et/ou à l'ADN de 155 paires de bases. Cependant d'après le placement des modèles cristallographiques que nous avons réalisé, l'ADN de 30 pb présent dans la structure cristallographique du corps pointe vers l'extérieur de la densité sans continuité avec les densités non assignées.

Il semble important de préciser à ce stade que les interprétations qui vont suivre portent sur l'architecture globale des domaines. Elles ne sont en aucun cas une analyse fine des éléments de structures secondaires ou atomiques des cartes placées dans la densité. Le placement des structures cristallographiques reste une proposition que nous pensons être la plus juste possible (Figure 103).

La carte de densité suggère que nous sommes en présence d'une conformation ouverte de l'enzyme. La densité correspondant au corps de l'enzyme possède une cavité centrale caractéristique d'une ouverture du « DNA gate », déjà observée dans des structures cristallographiques du domaine isolé sans ADN (Berger et al., 1996; Fass et al., 1999). De plus cette carte suggère un entrecroisement partiel des domaines ATPase, probablement lié à la conformation ouverte du « DNA gate ». La structure cristallographique de la Top2 de *S.cerevisiae*, qui comprend les domaines ATPase et le corps de l'enzyme, montre un entrecroisement complet des deux monomères ATPase.

Le modèle 3D du complexe HsTop2a ADN étoposide a été comparé à la structure de *S.cerevisiae* qui est dans une conformation « fermée » au niveau des deux domaines catalytiques (Figure 104 a. b.). On peut observer trois différences. Premièrement, l'angle entre le domaine ATPase et le corps de l'enzyme est différent entre les deux cartes, soit 45° pour le modèle de *S.cerevisiae* et 70° pour le complexe humain. Deuxièmement les domaines ATPase des deux modèles sont dans des conformations différentes. Chez *S.cerevisiae* les monomères sont complètement entrecroisés, contrairement au modèle que nous avons reconstruit où les domaines sont dimérisés mais ne sont pas entrecroisés.

Troisièmement le corps de l'enzyme est en position fermée chez *S.cerevisiae* alors qu'il est ouvert dans le complexe humain.

Ces trois observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que ces deux structures représentent différents états conformationnels du cycle catalytique de la Top2. Dans le modèle de cycle catalytique accepté à l'heure actuelle, les Top2 fixent un premier brin d'ADN, le brin d'ADN G (Gate), puis la fixation d'ATP entraîne la dimérisation du domaine ATPase avec ou sans capture d'un second brin d'ADN, ADN T (Transported). La séquence des étapes suivantes n'est pas encore complètement élucidée, mais il semblerait que l'hydrolyse d'un premier ATP soit corrélée à la coupure double brins de l'ADN G et entraîne l'ouverture du corps de l'enzyme. Le passage du brin d'ADN T à travers le corps de l'enzyme serait stimulé par l'entrecroisement du domaine ATPase au-dessus du croisement brin G-brin T. L'hydrolyse du second ATP entraînerait un recyclage de l'enzyme (Figure 105).

La structure de *S.cerevisiae* semblerait donc représenter une conformation correspondant soit au moment où le brin d'ADN T vient de passer à travers l'enzyme, les domaines ATPase étant toujours entrecroisés soit après la fixation du brin d'ADN G avec les domaines ATPase fermés par l'AMPPNP utilisé dans les conditions de cristallisation. Le modèle que nous avons reconstruit pourrait être assimilé à une étape, avant ou au moment du passage du brin d'ADN T (Figure 104 et Figure 105).

Pour finir, le modèle que nous avons reconstruit présente une asymétrie dans l'ouverture du corps de l'enzyme (Figure 106). L'hydrolyse d'une molécule d'ATP déclencherait une cascade de changements conformationnels pouvant entraîner le décalage d'un des monomères du corps de l'enzyme. Ce mécanisme d'ouverture asymétrique pourrait être la conséquence d'une hydrolyse séquentielle des molécules d'ATP, l'ouverture complète de l'enzyme se faisant après l'hydrolyse du second ATP (Baird et al., 2001; Baird et al., 1999; Harkins et al., 1998; Harkins and Lindsley, 1998).

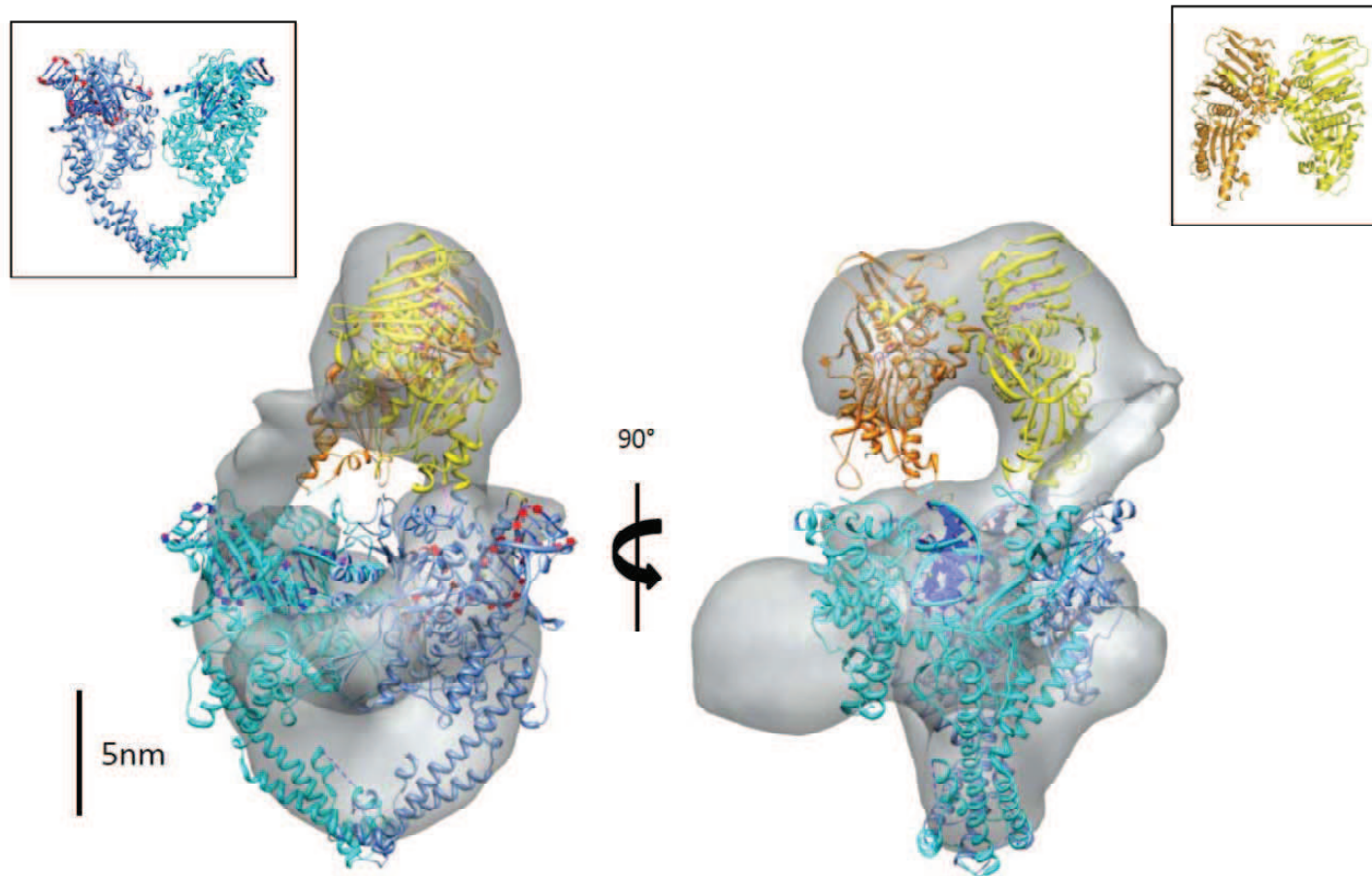


Figure 103 Structures cristallographiques placées dans la densité électronique du complexe HsTop2 α ADN étoposide. Les structures du corps de l'enzyme (encadré en haut à gauche) PDB 4FM9 et du domaine ATPase (encadré en haut à droite) PDB 1ZXM sont sous forme de dimères dans les structures déposées à la PDB. Afin de les placer dans la densité électronique les monomères ont dus être séparés et l'orientation les uns par rapport aux autres légèrement modifiée.

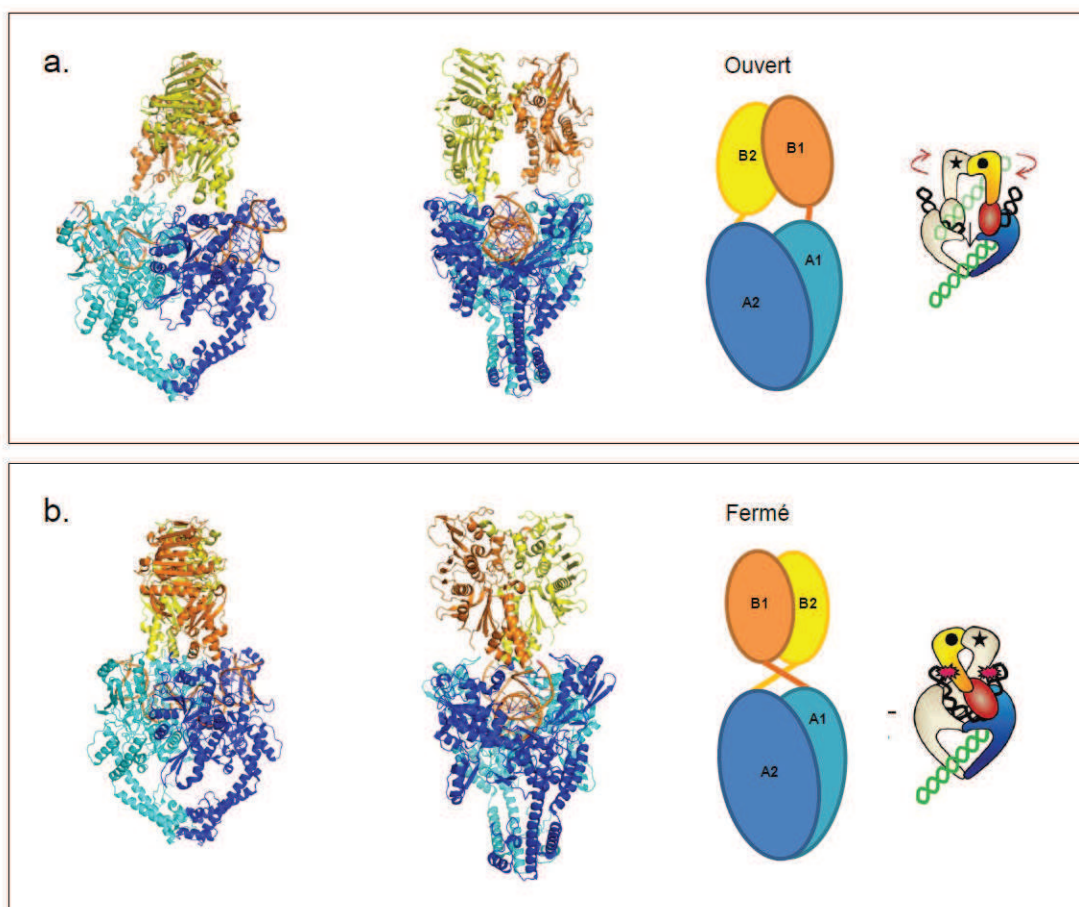


Figure 104 Modèle 3D du complexe HsTop2 α – ADN – étoposide comparé à la structure cristallographique de ScTop2. a. Le modèle 3D du complexe de l'isoforme α présente une conformation ouverte du corps de l'enzyme (A1 et A2 Bleu) et les domaines ATPase (B1 et B2 Orange Jaune) ne sont pas entrecroisés. Cette conformation pourrait représenter l'étape de passage de brin T à travers le corps de l'enzyme et le brin G clivé. b. Le modèle 3D du complexe ScTop2 PDB : 4GFH présente une conformation fermée du corps de l'enzyme (A1 et A2 Bleu) et les domaines ATPase (B1 et B2 Orange Jaune) sont entrecroisés. Cette conformation pourrait représenter l'étape de religation du brin G le passage de brin T à travers le corps de l'enzyme ou l'étape de fixation du brin d'ADN G avec la dimérisation des domaines ATPase par l'ajout d'AMPPNP dans les conditions de cristallisation.

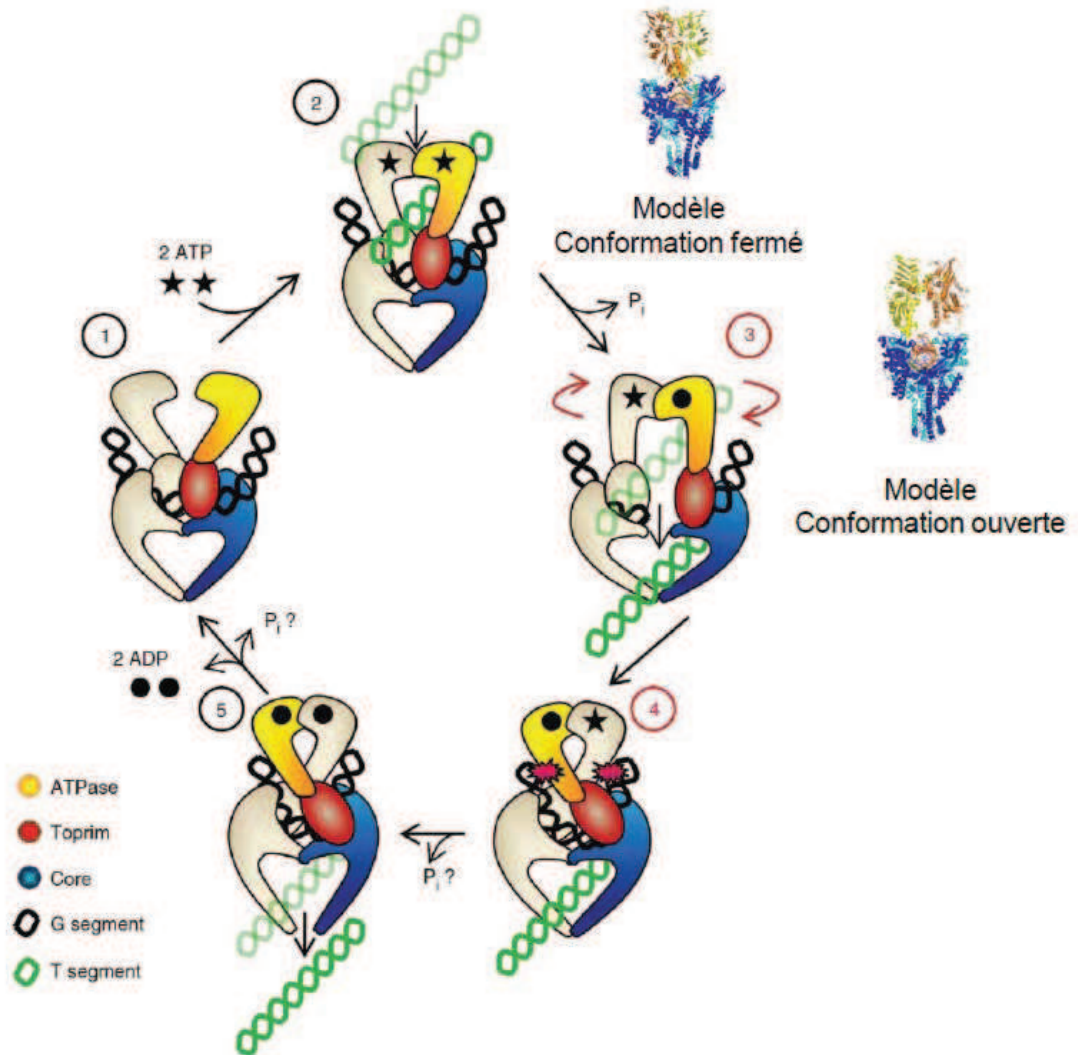


Figure 105 Cycle catalytique des Top2 en 5 étapes. 1. La fixation du brin d'ADN G, 2. La capture du brin d'ADN T via la dimérisation des domaines ATPase la carte cristallographique de ScTop2 pourrait représenter cette étape. 3. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP suivit de l'ouverture du corps de l'enzyme et le passage du brin T. Notre carte de densité présente une conformation proche de cette étape. 4. La fermeture du corps de l'enzyme et la religation du brin G avec les domaines ATPase entrecroisés. Cette étape pourrait également correspondre à une la conformation de la carte de la ScTop2. 5. La libération du brin T par l'ouverture de la porte C et hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP permettant le recyclage de l'enzyme.

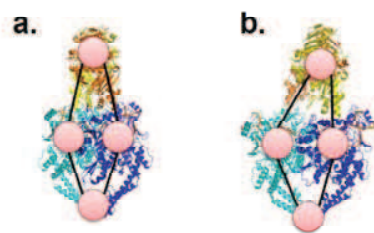


Figure 106 Asymétrie du corps de l'enzyme. a. La carte de ScTop2 présente une conformation fermée. b. La carte de densité HsTop2 ouverte avec une asymétrie. Les ronds rouges sont placés sur les monomères des domaines ATPase et du corps de l'enzyme. Leur disposition met en évidence l'asymétrie de l'ouverture entre forme fermée et ouverte.

v. Conclusion de cette première reconstruction.

Nous avons réalisé deux reconstructions 3D de HsTop2 α en complexe avec de l'ADN₁₅₅ et de l'étoposide à partir d'un jeu initial d'environ 60 000 particules. La première reconstruction a été réalisée avec une sous-population de particules représentant environ 11% du jeu de données initial. Nous avons pu placer les structures cristallographiques des domaines ATPase et du corps de l'enzyme dans la carte obtenue et ainsi reconstruire un modèle 3D. Nous avons ensuite comparé ce modèle à la structure cristallographique équivalente résolue pour ScTop2 en complexe avec de l'ADN et nous en avons déduit que nous avons capturé une sous-population de particules qui présente une conformation ouverte. Cette conformation pourrait être considérée comme une étape ponctuelle du cycle catalytique situé juste après le passage du brin d'ADN T à travers le corps de l'enzyme.

Les densités des domaines C-terminaux et l'ADN₁₅₅ n'ont pas pu être attribuées sans ambiguïté. En parallèle nous avons trié le jeu de particules initial avant l'affinement 3D. Cependant après plusieurs essais d'affinement nous avons constaté que la carte de densité reconstruite présentait un enrichissement des densités que nous n'avons pas pu attribuer. Il est possible que l'ADN que nous avons utilisé ne soit pas parfaitement adapté pour l'étude du complexe HsTop2 α ADN étoposide que nous avons entamé. Selon les expériences de « DNA footprinting » trouvées dans la littérature le corps de l'enzyme ne couvre qu'une trentaine de paires de bases. En ajoutant les domaines C-terminaux, l'ADN devrait être presque entièrement recouvert et même permettre une capture d'une extrémité par les domaines ATPase. Lors des études structurales sur les enzymes de cette famille en

RÉSULTATS : Partie III

complexe avec de l'ADN, des séquences d'ADN dites « sensibles » à des composés thérapeutiques sont utilisées pour stabiliser les Top2 sur un site spécifique (Wu et al., 2011) . Notre séquence d'ADN initiale ne contient pas de région sensible à l'étoposide qui permettrait de fixer les protéines sur un seul site, il est donc envisageable que les enzymes se soient fixées sur différents sites de l'ADN. Dans ce cas même si les domaines ATPase et le corps de l'enzyme sont stabilisés, les extrémités d'ADN sortantes ainsi que les domaines C-terminaux seraient dans diverses conformations limitant les possibilités de reconstruction 3D dans ces zones. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons conçu des oligonucléotides plus courts contenant une séquence sensible à l'étoposide, dont un de 85 paires de bases qui a été utilisé pour reconstruire une nouvelle carte de densité électronique.

3. Conception d'un oligonucléotide de 55 et 85 paires de bases avec une séquence sensible à l'étoposide.

Lors de la reconstruction du complexe avec l'oligonucléotide de 155 paires de bases nous avons observé que les particules étaient très hétérogènes en conformation, D'autre part des densités supplémentaires que nous n'avons pas pu attribuer sont apparues par rapport aux densités attendues. Nous avons donc décidé de concevoir des oligonucléotides plus courts centrés sur une région sensible à l'étoposide.

Dans un premier temps il nous a semblé plus juste de diminuer la taille de l'oligonucléotide pour limiter l'apparition d'extrémités « flottantes » qui ajouteraient de l'hétérogénéité de conformation. Potentiellement, cela permettrait également de prévenir la fixation de deux enzymes sur un seul brin d'ADN ou encore de limiter l'effet de glissement de l'enzyme sur l'ADN. La structure du corps de l'isoforme β en présence d'ADN cristallisé par Wu *et al.* en 2011 nous a servi de base pour la création des oligonucléotides (Wu *et al.*). Nous avons utilisé la même séquence sensible à l'étoposide, qui est en fait une séquence consensus déduite de 6 séquences d'oligonucléotides utilisés dans des études publiées (Figure 107).

Le choix de la taille des séquences est primordial. Comme précisé dans le paragraphe précédent, un oligonucléotide de 155 paires de bases a été utilisé pour résoudre la structure de l'ADN gyrase. La taille de cet ADN a été calculé pour permettre un enroulement autour des domaines C-terminaux de cette dernière. Dans le cas des Top2 humaines, des expériences de « DNA footprinting » ont montré que la séquence couverte par l'enzyme varie de 18 à 30 paires de bases (Lee *et al.*, 1989; Thomsen *et al.*, 1990). Les structures co-cristallisées en présence d'oligonucléotide ont respecté cette taille minimum en utilisant un ADN de 30 paires de bases. Cependant pour l'enzyme entière, nous pensons que la taille de cet oligonucléotide n'est pas suffisante pour stabiliser les domaines C-terminaux. Ces domaines n'apparaissent pas comme fermement fixés à l'ADN car les expériences de « DNA footprinting » n'incluent pas de couverture de séquence pour ces domaines. Il est cependant possible qu'ils agissent comme des senseurs des croisements d'ADN pour positionner de manière optimale l'enzyme sur l'ADN. En effet ces domaines sont à l'origine de la discrimination de la chiralité des croisements l'ADN (McClendon *et al.*, 2005). Afin d'allonger notre oligonucléotide et tenter de stabiliser ces domaines, nous sommes partis de

RÉSULTATS : Partie III

la séquence consensus utilisée par Wu *et al.*. Nous avons introduit cette séquence consensus dans le gène c-myc humain au niveau du site de coupure à l'étoposide 2880 (Strumberg *et al.*, 1999). Nous avons ainsi généré des oligonucléotides de 55 et de 85 paires de bases par élévation de la séquence d'ADN c-myc de part et d'autre de la séquence consensus (Figure 108 et Figure 109).



Figure 107 Composition de la séquence consensus sensible à l'étoposide.

RÉSULTATS : Partie III

A. 5'GGATTTTTTTCGGGTAGTAGCCGAGC//TGCAGCTCGGCTAAGTCCACTTGCCTTTTAAT 3'

B.5'TGCCGCATCCACGAAACTTTGCCCATAGCAGCGGGCGGGCACTTTGCACTGGAACCTACAACACCCGAGCAAGG
ACGCGACTCTCCCGACGCGGGGAGGCTATTCTGCCCATTTGGGGACACTTCCCGCCGCTGCCAGGACCCGCTTCTCTGAAAG
GCTCTCCTTGCAGCTGCTTAGACGCTGGATTTTTTTCGGGTAGTAGCCGAGC//TGCAGCTCGGCTAAGTCCACTTGCCTTTTA
ATTATTTTTTTATCACTTTAATGCTGAGATGAGTCGAATGCC⁺¹⁽²⁹⁵³⁾TAAATAGGGTGTCTTTCTCC⁺¹⁽²⁹⁷⁴⁾CATTCCTGCGCT
ATTGACACTTTTCTCAGAGTAGTTA⁺¹⁽³⁰¹¹⁾TGGTAACTGGGGTGGGGTGGGGGTAATCCAGAAGTGGATCGGGGTAAAGTG
ACTTGTCAA3'

Figure 108 A. Oligonucléotide de 55bp. B Oligonucléotide de 55 paires de bases (Jaune) dans le gène c-myc humaine avec le site consensus sensible à l'étoposide (Bleu) inséré à la position 2880. En rouge des sites adjacents, sensibles à l'étoposide.

A. 5'CTTGACAGCTGCTTAGACGCTGGATTTTTTTCGGGTAGTAGCCGAGC//TGCAGCTCGGCTAAGTCCACTTGCCT
TTTAATTTATTTTTTTATCACTTTAA 3 '

B. 5'TGCCGCATCCACGAAACTTTGCCCATAGCAGCGGGCGGGCACTTTGCACTGGAACCTACAACACCCGAGCAAG
GACGCGACTCTCCCGACGCGGGGAGGCTATTCTGCCCATTTGGGGACACTTCCCGCCGCTGCCAGGACCCGCT
TCTCTGAAAGGCTCTCTTGACAGCTGCTTAGACGCTGGATTTTTTTCGGGTAGTAGCCGAGC//TGCAGCTCGG
AAGTCCACTTGCCTTTTAATTTATTTTTTTATCACTTTAA⁺¹⁽²⁹⁵³⁾TGCTGAGATGAGTCGAATGCC⁺¹⁽²⁹⁷⁴⁾TAAATAGGG
TGCTTTTCTCC⁺¹⁽²⁹⁷⁴⁾CATTCCTGCGCTATTGACACTTTTCTCAGAGTAGTTA⁺¹⁽³⁰¹¹⁾TGGTAACTGGGGTGGGG
TGGGGGTAATCCAGAAGTGGATCGGGGTAAAGTGACTTGTCAA3'

Figure 109 A. Oligonucléotide de 85bp B: Oligonucléotide de 85 paires de bases (Vert) dans le gène c-myc humaine avec le site consensus sensible à l'étoposide (Bleu) à la position 2880. En rouge des sites adjacents, sensibles à l'étoposide.

RÉSULTATS : Partie III

Les complexes ont été formés de la même manière que précédemment avec l'oligonucléotide de 155 paires de bases. Nous avons également réalisé des expériences de retard sur gel d'électrophorèse en conditions natives. Les ADN de 85 et 55 paires de bases ont un profil de migration équivalent (Figure 110). Lorsque l'enzyme est incubée avec les oligonucléotides de 85 et 55 paires de bases, la mobilité électrophorétique de l'ADN et des protéines co-localisent et deux bandes discrètes apparaissent. Aucune différence n'est notée lors de l'ajout d'étoposide et de l'ADPNP. Comme lors de l'expérience similaire réalisée avec l'ADN de 155 paires de bases deux populations apparaissent. De plus on peut voir que la migration du complexe en présence de l'oligonucléotide de 155 paires de bases est légèrement différente de celle des deux autres oligonucléotides. La bande discrète la plus élevée est enrichie. Cette différence pourrait être due à la différence de taille des oligonucléotides. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur la nature de ces populations et de la différence observée avec l'ADN de 155 paires de bases. Cependant comme la mobilité électrophorétique des protéines est modifiée par l'ajout d'ADN et qu'ils co-localisent, il est vraisemblable de supposer que les complexes sont formés *in vitro*.

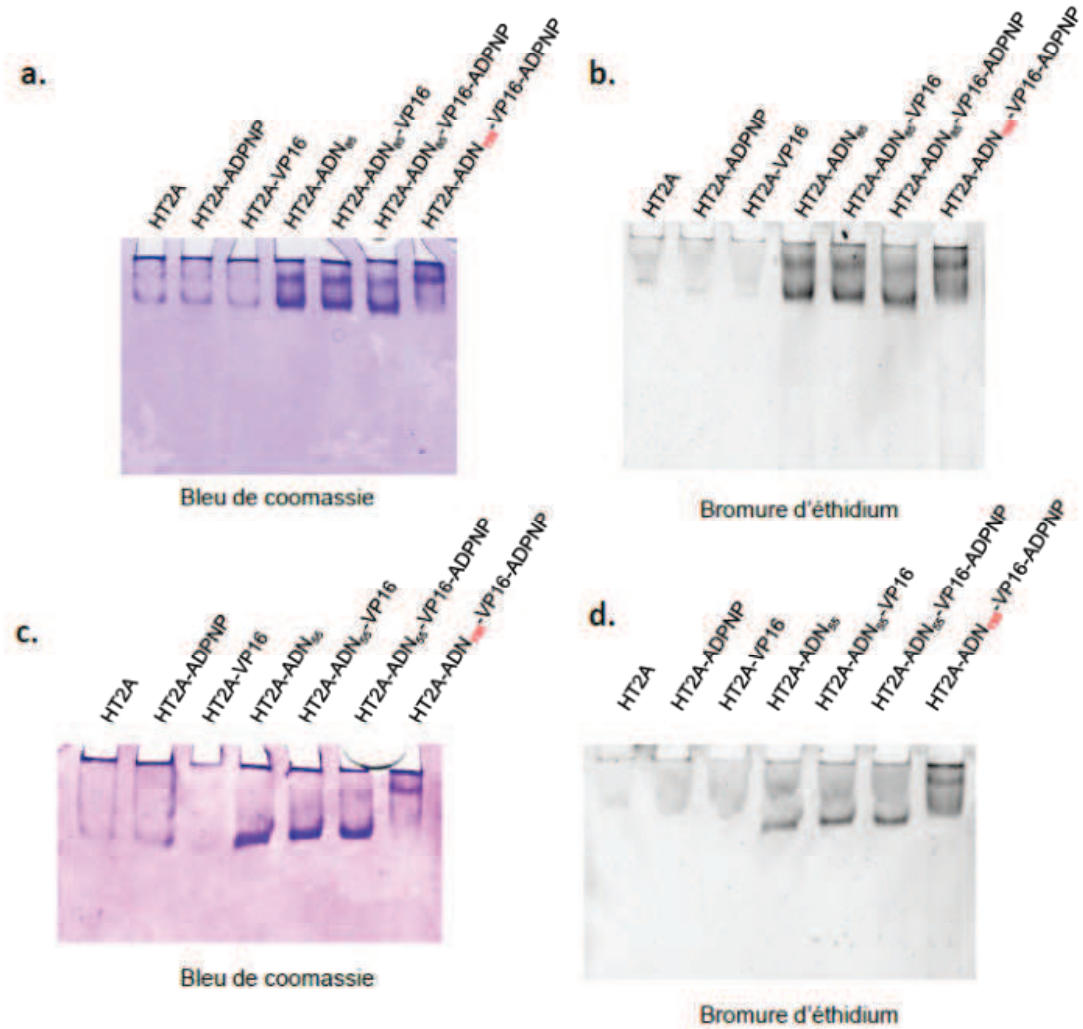


Figure 110 Expériences de retard sur gel avec les oligonucléotides 55 et 85 paires de bases. Les gels ont été colorés au bromure d'éthidium pour révéler les acides nucléiques (b., d.) puis au bleu de coomassie pour révéler les protéines (a., c). L'ADN de 155 paires de bases a été utilisé comme contrôle.

4. Les complexes isoformes α ADN 58 et 85 pb et étoposide

Nous avons enregistré 3194 images du complexe avec l'ADN de 85 paires de bases du MET Tecnai Polara G2 avec la caméra Falcon muni de la technologie CMOS. À partir des images, 68 725 particules ont été sélectionnées manuellement avec le logiciel e2boxer implémenté dans EMAN2. Après correction de la CTF (Contrast transfert fonction) sur l'ensemble des particules, un set de 40 219 particules a été utilisé comme point de départ pour les affinements 3D (Figure 111).

Toutes les étapes de reconstruction 3D ont été réalisées avec EMAN2. Dans un premier temps, le jeu de particules a été affiné avec la structure cristallographique de ScTop2 filtrée à une résolution de 30 Å. Après convergence des courbes FSC (Fourrier Shell Correlation), on peut reconnaître dans la carte de densité obtenue les densités correspondant au domaine ATPase dimérisé et au corps de l'enzyme ainsi que des densités supplémentaires qui pourraient correspondre à l'ADN et aux domaines C-terminaux. L'affinement de cette carte a convergé vers une résolution estimée à environ 20 Å.

Cette faible résolution est en partie due à l'hétérogénéité des particules. Nous les avons donc triées de manière visuelle en éliminant toute particule dont les dimensions seraient supérieures à celles attendues, ou qui ne serait pas isolée. Ce nouveau jeu contenait 22 665 particules. L'affinement de ce jeu a été réalisé contre la carte de ScTop2. Malgré ce tri manuel supplémentaire, la résolution n'a pas augmenté par rapport à la carte générée avec le premier set de particules, toujours estimée à plus de 20Å. L'hétérogénéité de l'échantillon reste la cause la plus probable de la limitation de la résolution. Nous avons alors changé de méthode de tri en utilisant un affinement contre deux cartes initiales, la structure cristallographique de ScTop2 et un modèle généré *ab-initio* comme pour le complexe avec de l'ADN 155 paires de bases décrit précédemment. 11 335 particules ont été attribuées à la carte de ScTop2. Ces particules ont été isolées et affinées contre la carte générée dans l'étape précédente. Après plusieurs cycles d'affinement, la résolution de la carte obtenue à nouveau été estimée à plus de 20 Å, ce qui semble être la limite de ce jeu de données.

RÉSULTATS : Partie III

Les domaines ATPase et le corps de l'enzyme sont reconnaissables dans la densité reconstruite (Figure 111) et les densités supplémentaires ont été très largement réduites par rapport au complexe avec de l'ADN de 155 paires de bases et les premiers essais d'affinement. De plus, lors des cycles d'affinement des cartes du complexe 155 paires de bases, nous avons observé une amplification de la densité non attribuée. Lors de l'affinement du complexe avec l'ADN 85 paires de bases nous avons observé que les densités correspondant aux domaines ATPase et le corps de l'enzyme restaient stable au cours des cycles et que les densités non attribuées avaient tendance à diminuer. Nous avons émis l'hypothèse que lors de l'affinement de ce complexe, c'est la forme associée à la protéine qui guide l'affinement. La séquence d'ADN contient une séquence sensible à l'étoposide, donc lors de la formation des complexes en présence d'étoposide les protéines se sont sûrement principalement centrées sur la séquence consensus, rendant l'ensemble des complexes plus homogène.

Cependant la disparition des densités non attribuées et l'absence de densité pouvant correspondre aux domaines C-terminaux laisse supposer que la séquence d'ADN est trop courte pour permettre la stabilisation et résolution tri dimensionnelle de ces domaines. C'est pourquoi nous avons allongé la séquence d'ADN à 150 paires de bases en gardant la séquence d'origine de 85 paires de bases. Cet oligonucléotide est en cours de production. De nouvelles acquisitions du complexe formé avec ce nouvel oligonucléotide au MET Titan Kryos sont prévus dans la suite de ce projet.

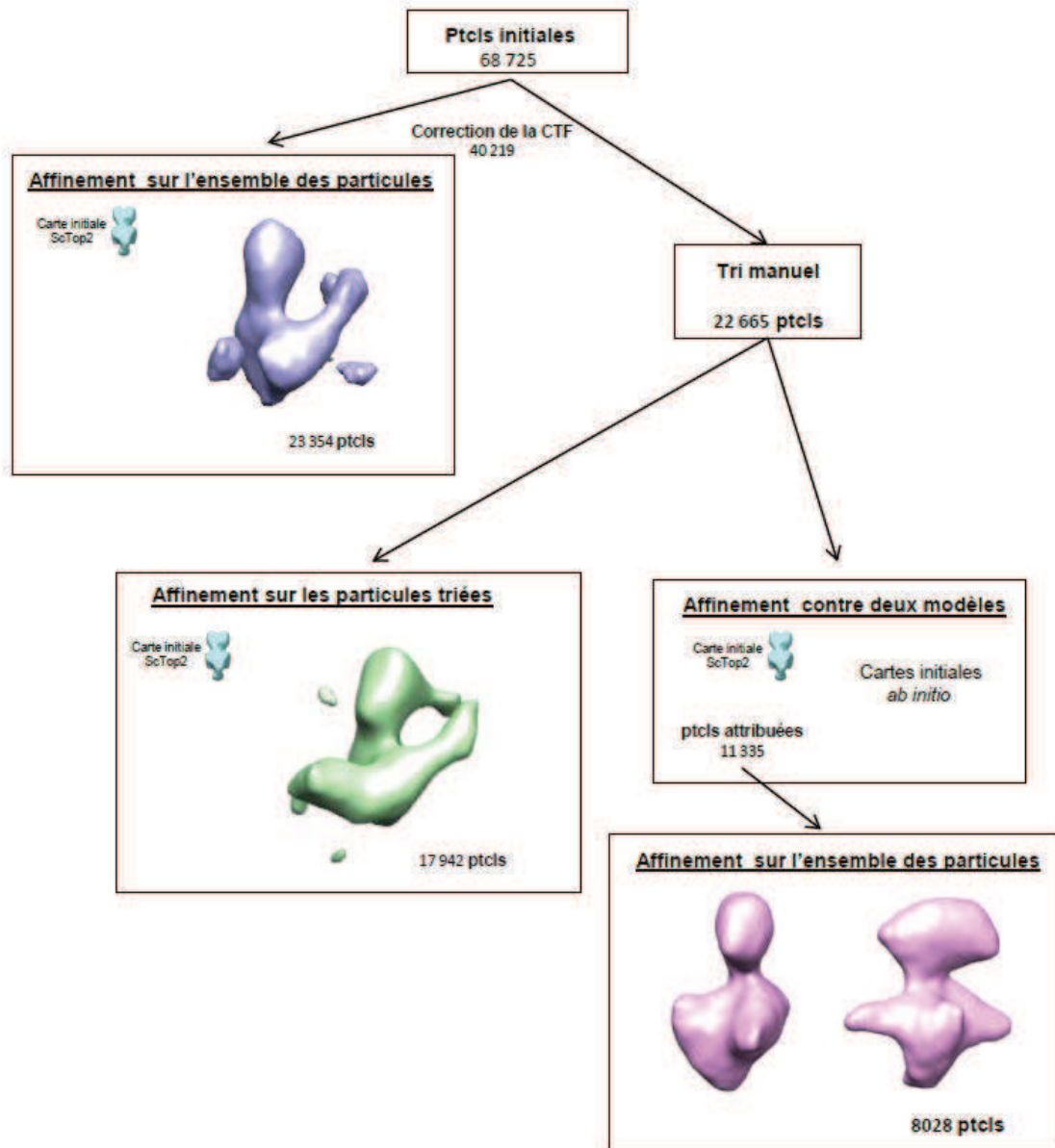


Figure 111 Stratégie d'affinement utilisée pour la reconstruction de la densité électronique du complexe HsTop2 α ADN₈₅ étoposide.

IV. Études structurales complémentaires : Étude structurale sur le domaine C-terminal de l'isoforme β (CTD β).

Le but de cette étude a été de produire le domaine CTD de l'isoforme β , afin de déterminer la structure tridimensionnelle de ce domaine seul par cristallographie aux rayons X et d'étudier les interactions potentielles de ce domaine avec des partenaires cellulaires des Top2.

A. Alignement de séquences des domaines C-terminaux des deux isoformes.

Dans un premier temps nous avons choisi de nous concentrer sur l'isoforme β car elle est impliquée dans la régulation fine de processus cellulaires tels que l'expression des gènes et interagit avec de nombreux partenaires protéiques (voir Introduction) (Austin and Marsh, 1998).

Les isoformes α et β diffèrent principalement par la composition en acides aminés et la taille de leurs domaines C-terminaux. En effet elles partagent 68% d'identité de séquence sur les enzymes entières, 80% sur le domaine ATPase et le corps alors que les domaines C-terminaux ne partagent que 34% d'identité de séquence. Dans un premier temps nous avons réalisé un alignement de séquences des domaines C-terminaux de 31 séquences peptidiques d'isoformes α , β et de Top2 eucaryotes (Figure 112). Les séquences des domaines C-terminaux des deux isoformes sont clairement différentes entre les deux types isoformes et très proches au sein de chaque type. Les séquences des domaines C-terminaux des Top2 eucaryotes des non mammifères avec une seule Top2 sans isoforme, divergent fortement des séquences des deux isoformes et ont une faible identité de séquences entre elles. Les CTD des isoformes β possèdent de nombreuses répétitions de résidus chargés négativement (patch négatif). Les CTD des isoformes α sont composés de nombreuses répétitions de résidus chargés positivement et hydrophiles (patch positif). Ces caractéristiques visibles sur l'alignement de séquences sont illustrées par les paramètres physico-chimiques des domaines isolés (Tableau 14).

RÉSULTATS : Partie III

Tableau 14 paramètres physicochimiques théoriques des domaines C-terminaux des isoformes α et β calculés sur le serveur ProtParam Expasy. (CTD = Domaine C-terminal)

Construction	Taille	Pi théorique	AA acides	AA basiques
Top2 α	1531	8.8	14%	16%
Top2 β	1621	8.2	15%	15%
CTD α	250	9	18%	20%
CTD β	350	5	22%	18%

Les prédictions de structures secondaires sur HHpred n'ont pas mis en évidence de zone ordonnée, nous avons donc cherché à savoir dans quelle mesure ce domaine est désordonné avec le logiciel MeDor (MEtaserVer DisORder) (Lieutaud et al., 2008) qui est un méta serveur de prédiction des zones désordonnées dans une protéine. Il permet de soumettre une séquence sur plusieurs serveurs de prédictions et de regrouper tous les résultats obtenus pour les analyser de manière simultanée. MeDor fournit les résultats sous forme graphique avec les prédictions des différents serveurs alignés sur la séquence soumise. L'ensemble du domaine a été prédit comme désordonné par tous les serveurs de prédictions utilisés (Figure 113). Enfin, nous avons utilisé l'alignement pour déterminer les bornes des domaines du CTD de l'isoforme β comprenant les résidus 1204 à 1626 pour une taille totale de 422 résidus. Ce domaine comprend la fin du repliement « coiled-coil », qui termine le corps catalytique et l'ensemble de la région non conservée, propre à l'isoforme β .

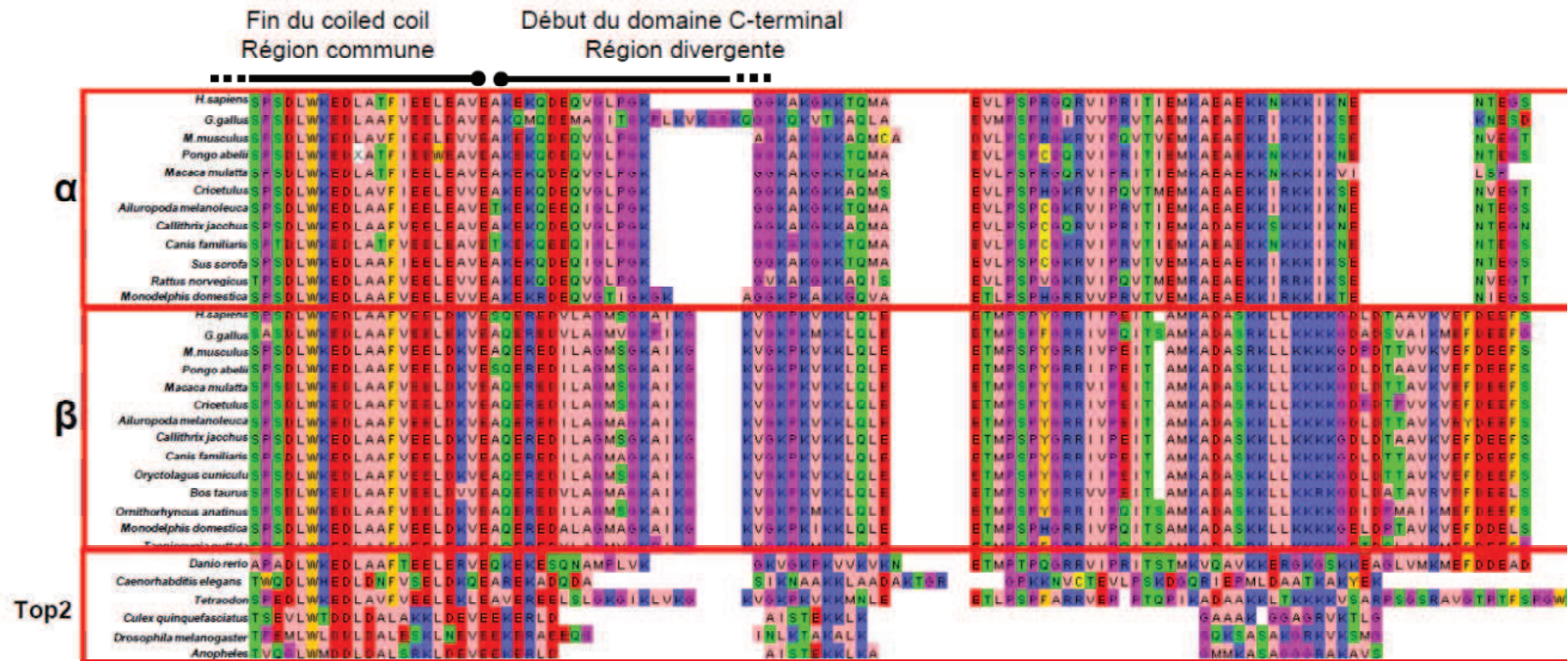


Figure 112 Alignement multiple de 31 séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β pour la zone résidus S1162 à S1247 dans la séquence humaine. Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines.

RÉSULTATS : Partie III

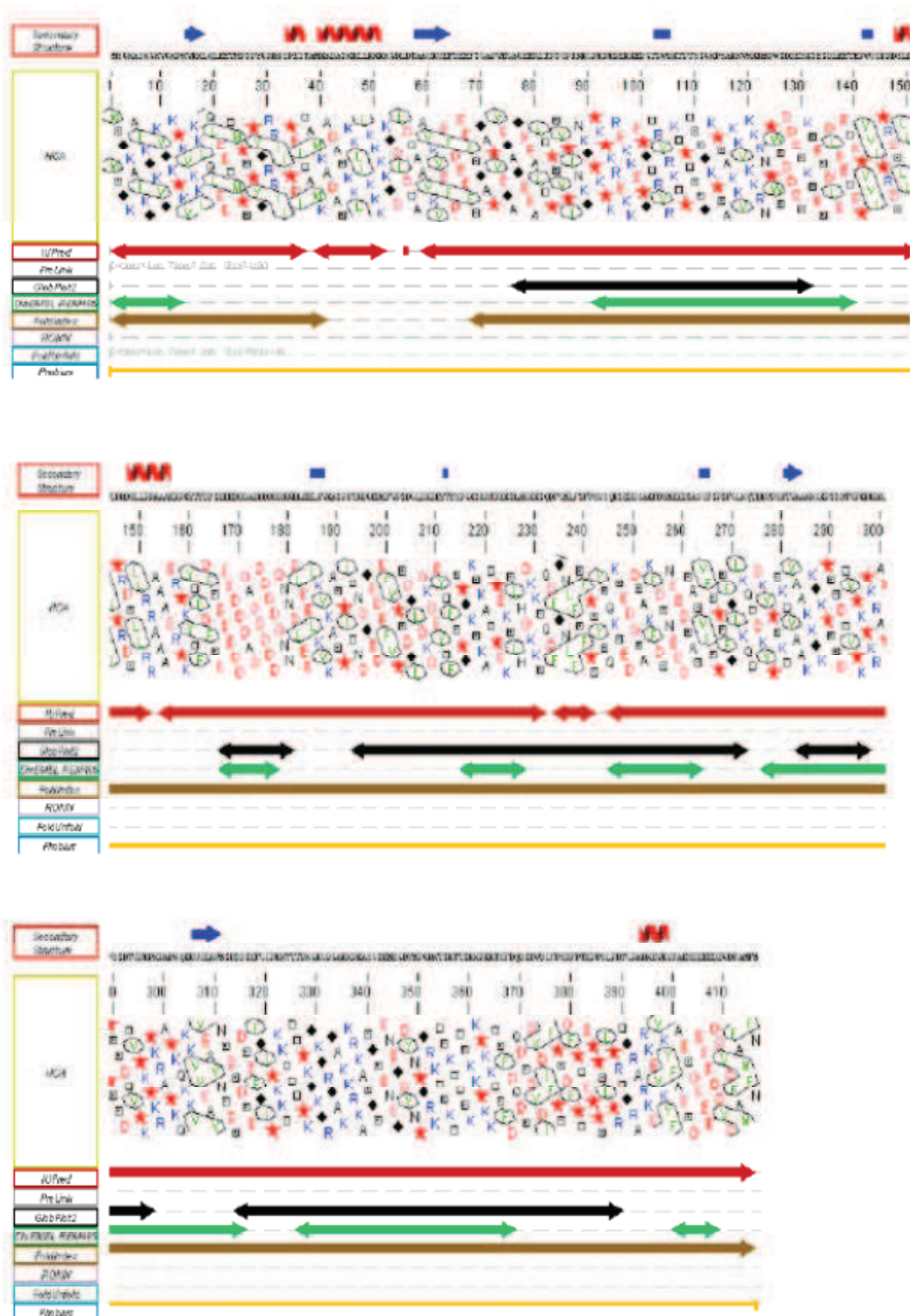


Figure 113 Prédiction par MeDor. Pre Link (Gris) (Prediction of linker) prédit les régions « linker » qui sont souvent désordonnées en se basant sur la composition acides aminés et le faible taux d'hydrophobicité. GlobPlot2 (Noir) permet de prédire les régions désordonnées et celles à tendance linéaire. DisEMBL-REM465 (Vert) utilise une base de données des régions manquantes dans les structures cristallographique de la PDB.

B. Clonage et production du domaine C-terminal de l'isoforme β .

Nous avons essayé de produire le domaine CTD de l'isoforme β , dans le but (i) d'utiliser ce domaine pour des tests d'interactions in vitro avec des partenaires cellulaires, (ii) de déterminer la structure tridimensionnelle de ce domaine seul ou en complexe avec des partenaires protéiques par cristallographie aux rayons X.

Dans un premier temps nous avons choisi de nous concentrer sur l'isoforme β car elle est impliquée dans la régulation fine de processus cellulaires tels que l'expression des gènes. McNamara *et al.* ont montré que cette isoforme interagit directement avec le récepteur RAR α dont elle régule négativement l'activité. Le département de biologie structurale de l'IGBMC, auquel notre équipe est rattachée possède une bonne expertise dans ce domaine (McNamara *et al.*, 2008). Le fragment de gène contenant le domaine CTD a été cloné dans le plasmide d'expression bactérien pSKB2 avec une étiquette 10 histidines et un site de coupure à la PPX (PreScission protease). Les premiers tests d'expression ont été réalisés dans les souches BL21 d'E.coli et BL21 supplémentées avec le plasmide pRARE codant pour des codons rares. Trois conditions de surexpression différentes ont été testées, une induction à 30°C et à 18°C dans des BL21 et une induction à 30°C dans des cellules BL21 pRARE (Figure 114a.).

Nous attendions une bande aux alentours de 46 KDa sur les gels SDS PAGE (masse théorique calculée sur le serveur ProtParam). Cependant dans aucun des cas tests nous n'avons noté de production du domaine (Figure 114). L'expression de la protéine n'a pu être confirmée par western blot.

RÉSULTATS : Partie III

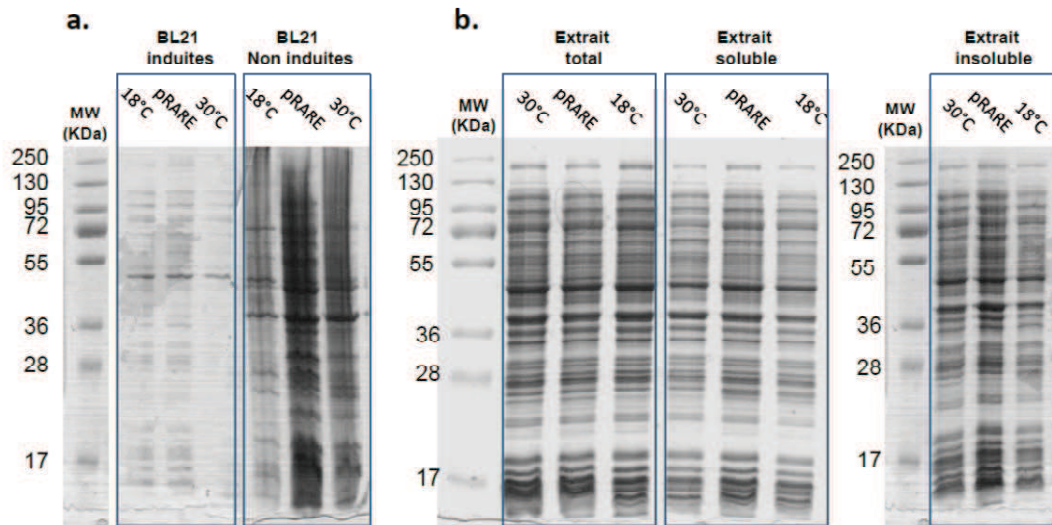


Figure 114 Test d'expression du domaine C-terminal en BL21. a. Protéines totales avant induction et après induction dans les trois conditions tests. b. Fraction totale, fraction soluble et fraction insoluble dans les trois conditions tests.

À travers les analyses préliminaires que nous avons réalisées sur le CTD β il ressort que ce domaine possède une signature de séquence particulière avec de nombreux patchs de résidus négatifs. De plus il est soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui pourraient participer à son repliement 3D. Les essais de production que nous avons réalisés nécessitent des ajustements, comme l'ajout d'une étiquette MBP (Maltose Binding Protein) permettant la stabilisation et la solubilisation de ce domaine, ou bien son expression dans des systèmes eucaryotes comme les cellules d'insectes ou la levure qui seraient probablement plus adaptées.

Conclusion et perspectives générales

Mon travail de thèse a couvert plusieurs aspects de l'étude des Top2 humaines. De nombreuses bases ont été posées, qui ouvrent la voie pour de nouveaux champs d'études que ce soit pour l'obtention d'enzymes compatibles avec des études biochimiques ou des analyses biochimiques plus poussées sur le rôle des modifications et des domaines C-terminaux. Ce travail a également permis d'initier l'étude structurale de ces enzymes et de ses complexes associés par microscopie électronique.

Les procédures de production et de purification de l'isoforme α dans *S.cerevisiae* ont été optimisées permettant d'atteindre un rendement et une pureté d'échantillon compatible avec des études fonctionnelles et structurales. L'isoforme β quant à elle s'est révélée plus délicate à manipuler lors de sa surexpression en levure. Nous avons surexprimé les deux isoformes en cellule de mammifère et avons obtenu une expression équivalente pour l'isoforme α et améliorée pour l'isoforme β .

Nous en avons déduit qu'à terme et en particulier pour continuer l'étude de l'isoforme β nous devrions envisager d'utiliser un système d'expression en cellules de mammifère plus proche de leur système d'origine car elles sont sensibles au système d'expression utilisé. Les caractérisations fonctionnelles de l'isoforme α ont mis en évidence que cette enzyme conserve une activité similaire dans les deux systèmes d'expressions. La prochaine étape sera de réaliser une caractérisation fonctionnelle sur l'isoforme β produite en cellules de mammifère.

Par ailleurs, il serait intéressant de remplacer les 5 premiers acides aminés de levure par les résidus humains qui avaient été substitués par ceux de l'enzyme de levure pour des raisons de commodité de clonage, afin de reconstituer le gène des isoformes entiers. Même si aucune étude n'indique que les extrémités N-terminales sont impliquées dans la fonction catalytique de ces enzymes, il existe un site de phosphorylation répertorié dans la littérature et dans les banques de données des phosphoprotéomes, S29, qui pourrait indiquer une implication de cette zone dans les fonctions cellulaires de ces enzymes. Les alignements de séquences montrent une nette différence dans cette zone entre les isoformes humains α et β et les autres Top2 (Annexe III). Pour finir les gènes des deux isoformes peuvent être soumis à des épissages alternatifs, dont les variants protéiques ont des insertions de 5 à 10 résidus dans le domaine ATPase de l'enzyme. La fonction des différents variants n'est pas encore connue. Il se pourrait que ces formes présentent des caractéristiques propres qui les rendent

RÉSULTATS : Perspectives générales

plus stables lors des expériences *in vitro* et utilisables pour la production d'enzyme à des fins d'études structurales.

Les analyses comparatives des phosphorylations et des acétylations sur l'isoforme α exprimée dans *S.cerevisiae* et BHK21, nous ont révélées que ces deux systèmes sont équivalents en termes de modifications apportées. On peut donc en déduire que les mécanismes cellulaires ainsi que les kinases aboutissant à l'état de phosphorylation que nous avons observé sont globalement conservés chez les eucaryotes. Ces observations ont été réalisées sur des enzymes surexprimées, il serait donc nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires sur les enzymes endogènes pour conclure sur le rôle de ces modifications *in vivo*. Cependant parmi les nombreux sites que nous avons mis en évidence, quelques-uns ont fait l'objet d'études ciblées sur les enzymes dans leur contexte cellulaire. On peut donc émettre l'hypothèse que les positions que nous avons décrites peuvent témoigner d'un état de modification de la Top2 α qui peut être retrouvé à un moment précis dans la cellule. Vu le fort taux de phosphorylation du domaine C-terminal, il semblerait qu'il faille prendre en compte tout particulièrement l'implication de ce domaine dans les activités cellulaires de ces enzymes. Il serait nécessaire de poursuivre cette première analyse par une caractérisation du rôle de chaque modification, mais également de la possibilité d'effet synergique entre elles, dans un premier temps par mutagenèse dirigée, afin de comprendre l'effet global des phosphorylations sur la fixation de l'ADN et le recrutement de partenaires cellulaires.

Une analyse des modifications des HsTop2 sur différentes lignées de cellules cancéreuses pourrait compléter notre connaissance sur la régulation des Top2 dans différents cancers. Cette caractérisation pourrait être réalisée par la création de lignées cellulaires cancéreuses produisant la Top2 avec une étiquette de type « Flag tag » permettant par la suite une purification des protéines endogènes puis une analyse des modifications par spectrométrie de masse. De plus cette méthode permettrait aussi de capturer les complexes associés par une approche de protéomique classique, et ainsi de corrélérer la formation des complexes avec l'état de modification des Top2. Pour finir, les Top2 ayant un rôle majeur dans les traitements anti-cancéreux, il serait intéressant d'analyser si l'exposition des cellules aux inhibiteurs tels que l'étoposide et la doxorubicine a un impact sur les modifications des Top2. Ces informations pourraient compléter nos connaissances sur les mécanismes moléculaires des inhibiteurs anti-topos.

RÉSULTATS : Perspectives générales

L'étude des cibles moléculaires de la doxorubicine nous a permis de mettre en évidence un lien direct entre la doxorubicine et le complexe Ku (Ku 80/Ku70/DNAPK) appartenant à la machinerie de réparation de l'ADN. Les études de colocalisation par immunofluorescence sur culture cellulaire ont corroborées les expériences de pulldown en mettant en évidence une localisation du complexe au niveau des cassures de l'ADN générées par la doxorubicine. De nombreuses études montrent que les réparations de l'ADN induites par une exposition des cellules à la doxorubicine font intervenir le complexe Ku. Cependant le mécanisme moléculaire sous-jacent reste à élucider et en particulier les étapes de formation du complexe doxorubicine/ complexe Ku que nous avons mis en évidence. Nous ne savons pas comment le complexe Ku se positionne à proximité des cassures doubles brins en présence de doxorubicine. Pour cela nous prévoyons d'étudier la formation du complexe Ku avec un ADN et la doxorubicine *in vitro* en utilisant des expériences de retard sur gel et des techniques biophysiques comme l'ITC (isothermal calorimetry).

Nous avons reconstruit la densité électronique d'une sous-opulation de complexe Top2 α /ADN/étoposide. Malgré la faible résolution de la carte obtenue, nous avons pu établir un pseudo-modèle atomique en utilisant les coordonnées des structures cristallographiques des domaines de l'enzyme, suggérant une conformation ouverte inédite, potentiellement représentative d'une étape du cycle catalytique de l'enzyme. Malgré les nombreux tests d'affinement que nous avons réalisés, nous n'avons pas pu nous émanciper totalement de l'hétérogénéité de l'échantillon. Nous en avons conclu que les optimisations que nous avons réalisées sur la production et la purification de l'isoforme α nécessitaient des ajustements supplémentaires pour pouvoir être utilisés en microscopie électronique afin de reconstruire des cartes atteignant une meilleure résolution. La prochaine étape sera d'utiliser les protéines produites en cellules de mammifère pour réaliser un travail équivalent. Par ailleurs des expériences de phosphorylation / déphosphorylation pourrait être envisagées afin de tenter d'améliorer l'homogénéité des enzymes. De nombreux partenaires cellulaires ont été décrits dans la littérature. Il est possible que le domaine C-terminal adopte un repliement qui ne soit stabilisé qu'en présence de ses partenaires protéiques. Des expériences de co-expression de la Top2 α / β et de leur partenaires pourrait être envisagées.

Le développement d'inhibiteurs isoforme-spécifiques est devenu un enjeu majeur afin de réduire les effets secondaires des traitements. Des études suggèrent que l'inhibition des partenaires cellulaires des Top2 pourrait améliorer les traitements et réduire l'échappement tumoral. Dans cette perspective, mon travail de thèse a posé les bases des études futures qui permettront de poursuivre l'identification des partenaires cellulaires des HsTop2 ciblés par des molécules thérapeutiques, ainsi que l'étude structurale et fonctionnelle des

RÉSULTATS : Perspectives générales

isoformes des Top2 dans leurs contextes cellulaires et chromatinien en complexe avec des composés thérapeutiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Production, purification et analyses fonctionnelles des isoformes de la topoisomerase humaine

A. Clonage et Production

1. Clonage dans le vecteur d'expression pYES2.1

Les gènes entiers des isoformes ont été amplifiés par l'ADN polymérase HiFi (Expand Hight Fidelity PCR system commercialisé par Roche) à partir des plasmides pWOB6 pour l'isoforme α et du plasmide pTRX-hTop2 β pour l'isoforme β . Les amorces utilisées sont les mêmes pour HsTop2 α et pour HsTop2 β , celles-ci possédant les mêmes codons en 5' (codons de levure) et en 3' (étiquette histidine). Après amplification, les produits PCR ont été purifiés avec le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel). La réaction de ligation a été réalisée dans le vecteur pYES2.1 selon les instructions du kit « pYES2.1 TOPO TA Yeast expression kit » (Lifetechnologies).

2. Transformation des levures *S.cerevisiae*

i. A partir de la souche d'origine :

La souche de levure d'origine, Jel1 Δ Top1 ou BCY123 (Voir phénotype dans les Annexes), est stockée à -80°C. Elle est étalée sur boîte de milieu YPD (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose) et incubée 3 jours à 30°C. Une vingtaine de colonies sont ensuite inoculées dans 50 ml de YPAD (YPD additionné de 0.003% d'adénine), et incubées sous agitation à 180 rpm 12H à 30°C. Cette préculture est diluée à une densité optique à 600nm (DO_{600nm}) de 0.2 (2×10^6 cellules.ml⁻¹) dans 50 ml de YPAD puis incubée jusqu'à une DO_{600nm} proche de 0.9. Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées dans 25 ml de Tris HCl 10 mM pH 7.5 puis rendues compétentes en présence de 0.1M de solution LiT (100mM LiAc, 10mM Tris HCl pH 7.5) et 10 mM DTT pendant 40 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite mises en présence de 10 mM LiT, 0.1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé, environ 1 μ g d'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt et une solution de PEG 4000/LiT (50 % (M/V) et 50 mM LiT). Le mélange, d'un volume final de 500 μ l, est incubé 10 minutes à température ambiante. Le choc thermique est réalisé pendant 20 minutes à 42°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et

MATÉRIELS ET MÉTHODES

resuspendues dans 2 ml de YPAD et incubées sous agitation à 180 rpm 1 heure à 30°C. 50µl de cellules centrifugées sont resuspendues dans 100 µl de Tris HCl pH 7.5 10 mM et étalées sur boîte de pétri CSM-ura (Csm-ura : 13,4g/l YNB sans acides aminés, 0,8g/l CSM-ura) et incubées pendant 3 jours à 30°C.

ii. A partir de cellules compétentes :

Le protocole de préparation du stock de cellules compétentes est identique à celui décrit ci-dessus jusqu'à l'étape de la préculture dans 50 ml de YPAD. Après la préculture, les cellules sont lavées deux fois avec 25 ml puis 500 µl d'eau ultra pure stérile et resuspendues dans 750 µl de solution FCC (Frozen Competent Cell : glycérol 5%, DMSO 10%). Les cellules sont ensuite aliquotées par 100 µl et stockées directement à -80°C. Le protocole de transformation à partir du stock de cellules compétentes est le même, à partir de l'étape d'incubation des cellules en présence du mélange de transformation (ci-dessus). Les cellules compétentes sont stockées par aliquot de 1 ml à -80°C avec 25% de glycérol final.

3. Culture en milieu lactate/glycérol

Les souches transformées sont étalées sur boîte de pétri CSM-ura, glucose 2% et incubées 3 jours à 30°C. Une à deux colonies sont inoculées dans 20 ml de CSM-ura glucose 2% et incubées sous agitation pendant 24H. Cette préculture est ensuite inoculée dans 100 ml de CSM-ura glucose 2% et incubée sous agitation (180 rpm) pendant 24H à 30°C. Cette deuxième préculture est diluée dans 2L de milieu CSM-ura Lac/Gly (YNB 6.7g/l, CSM-ura 0.77g/l, Na₂HPO₄ 25 mM, KH₂PO₄ 40 mM, Lactate pH5.5 2%, Glycérol 2%, Glucose 0.05%) à une DO_{600nm} initiale d'environ 0.03. La culture est incubée sous agitation (180 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} de 3, et induit avec 2% de galactose final pendant 16 Heures. Les cellules sont ensuite centrifugées, les culots congelés dans l'azote liquide sont conservés à -80°C.

4. Culture en milieu raffinose

Les souches transformées sont étalées sur boîte de pétri CSM-ura, glucose 2%, et incubées 3 jours à 30°C. Plusieurs colonies sont inoculées dans 4 X 200 ml de milieu CSM-ura glucose 2%, puis incubées sous agitation (180rpm) à 30°C pendant 24 heures. Les cellules sont centrifugées, les culots resuspendus dans du milieu CSM-ura 2% galactose 2% raffinose et ensuite utilisés pour inoculer 2L de culture à une DO_{600nm} finale de 0,7 -0,8. Les cellules ainsi induites sont incubées sous agitation à 180 rpm et 30°C pendant 20 à 24

heures. Les cellules sont ensuite centrifugées et les culots congelés dans l'azote liquide sont conservés à -80°C.

5. Expression des isoformes dans les cellules BHK21 infectées par MVA

i. Clonage des gènes, création des vecteurs pVOTE VV HsTop2

✓ Clonage dans le vecteur pENTR

Les deux gènes ont été traités de la même manière. La séquence amplifiée par PCR est intégrée dans le plasmide pENTR par LIC (Ligation Independent Cloning). Cette technique permet de s'émanciper de l'étape de ligation de l'insert. Les extrémités du plasmide et l'insert sont digérées par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase T4, ce qui crée des extrémités sortantes complémentaires. La machinerie de réparation de la bactérie ligue l'insert et le plasmide après transformation (Aslanidis and de Jong, 1990). Environ 2 µg de vecteur est linéarisé par digestion avec l'enzyme de restriction Sspl (NEB). En parallèle les gènes complets des isoformes sont amplifiés à partir du vecteur pYES2.1-HsTop2 par PCR (voir carte en Annexes). Le produit PCR est débarrassé du plasmide mère (pYES2.1) par digestion avec DpnI et purifié avec le kit PCR clean up (Macherey-Nagel). Le vecteur linéarisé est déposé sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml et purifié avec le kit NucleoSpin® Gel (Macherey-Nagel). Les deux produits sont ensuite préparés pour la réaction de LIC. Le vecteur (130ng) et l'insert (100ng) sont incubés individuellement dans le tampon NEB2 1X (50mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT (Dithiothréitol)), 1.2U T4 ADN polymérase (NEB : M0203S) et 2,5 mM dGTP pour le vecteur ou dCTP pour l'insert. Les réactions sont incubées à 22°C pendant 30 minutes puis la T4 ADN polymérase est inactivée à 75°C pendant 20 minutes. L'hybridation est réalisée en mélangeant une 3 µl de chaque échantillon) à température ambiante pendant 10 minutes. Puis l'ensemble est transformé dans des cellules compétentes XL1 Blue.

✓ Clonage dans le vecteur pVOTE-VV par le système Gateway®

Les deux isoformes ont été traités de la même manière. Le kit Gateway® (Invitrogen) a été utilisé pour ce clonage. Selon les instructions du kit, entre 50 et 100 ng de pENTR sont mélangés à 100 ng de pVOTØGW avec du tampon BP clonase reaction buffer 1X (composition propriété du fabricant) et de la LR clonase. La réaction est incubée 4 heures à température ambiante. Après digestion avec 1,2 µg protéinase K pendant 30 minutes à 37°C, la réaction entière est transformée dans des cellules compétentes Top10.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ii. Test d'expression transitoire des deux isoformes

Les cellules BHK21 sont étalées à environ 10^7 cellules par boîte de petri contenant 20 ml de G-MEM medium avec 10% sérum, 2mg/ml bacto tryptose phosphate broth et 40 µg/ml de gentamycine et incubées à 37°C jusqu'à confluence. Les cellules sont infectées avec du virus MVA -T7 à environ 2 PFU (Plaque forming unit) par cellule et incubées une heure à 37°C pour permettre l'adsorption du virus. Le mélange de transfection est préparé comme décrit ci-dessus. Après lavage, 12 ml de milieu Opti-MEM avec 1mM d'IPTG sont ajoutés aux cellules infectées ainsi que 3ml de mélange de transfection, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 2000 g puis lavées dans un tampon phosphate classique, centrifugées 5 minutes à 2000g et directement utilisées pour la purification de la protéine d'intérêt ou congelées à -80°C.

iii. Intégration stable des gènes des isoformes dans le génome du virus MVA et sélection des virus recombinants

Le principe est illustré Figure 115. L'isolement et la purification des virus MVA recombinants sont réalisés en deux étapes : tout d'abord une sélection par l'acide mycophénolique et dans un deuxième temps une sélection par la coumermycine. Les cellules BHK21 sont maintenues par une dilution 20X tous les 3 jours dans du G-MEM contenant du bactotryptose, de la gentamycine et 10% de sérum de veau fœtal. Les infections sont réalisées dans le même milieu contenant 2% de sérum. Le stock de virus MVA-Koom, code pour l'ARN polymérase du bactériophage T7, le represseur lac (lacI) de l'opéron lactose, la protéine fluorescente verte GFP (green fluorescent protein), une protéine de fusion entre la gyrase et la protéine kinase ARN dépendante (gyr-pkr) et la protéine fluorescente rouge mCherry.

Transfection des cellules avec le plasmide recombinant et infection par le virus non modifié : Environ 10^6 cellules BHK21 sont mises en culture à 37°C dans un incubateur à CO₂ dans des boîtes 6 puits avec un milieu de culture contenant une dilution de sérum à 10%. Les cellules sont laissées en culture jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Elles sont ensuite infectées avec 1 ml de virus à environ 0.1 PFU par cellule et incubées 1 heure à 37°C. L'excès de virus est éliminé par lavage des cellules avec 1 ml d'OptiMEM (Serum free Medium Life Technologies), 0.8 ml sont laissés sur les cellules. Pour la transfection, 1 µg d'ADN dissous dans 100µl d'OptiMEM et 5µl de lipofectamine (Invitrogene) dans 100µl d'OptiMEM sont préparés séparément. Les deux solutions mélangées sont laissées à

MATÉRIELS ET MÉTHODES

température ambiante pendant 15 minutes. 200 µl de mélange de transfection sont ajoutés dans chaque puits, l'ensemble est incubé à 37°C sur une nuit. L'infection est validée par observation au microscope des cellules infectées qui doivent présenter un aspect cytopathogène sur toute la culture.

Sélection des virus résistants à l'acide mycophénolique : Les cellules sont lysées par 2 à 3 cycles de congélation/décongélation à -20°C. 1 ml d'extrait de lysat cellulaire dilué (10X, 100X et 1000X) est utilisé pour infecter des cellules BHK21 fraîchement mises en culture dans un milieu contenant 2% de sérum. Après 1 heure à 37°C, 1 ml de milieu contenant 2% de sérum, xanthine 1/20 (stock à 10 mg/ml dans 0.1 M NaOH), acide mycophenolique 1/200 (stock à 10 mg/ml dans 0.1 M NaOH), hypoxanthine 1/50 (stock à 1,5 mg/ml dans de l'eau), est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont mises à incuber 2 jours à 37°C. Les puits les plus concentrés contenant de la fluorescence pour la mCherry sont sélectionnés et congelés à -20°C.

Sélection des virus résistants à la coumermycine : Les cellules positives pour la mCherry sont lysées par deux cycles de congélation-décongélation à -20°C, ce qui permet de libérer les particules virales qui seront diluées (10X, 100X et 1000X) et utilisées le lendemain pour infecter des cellules BHK21 fraîchement mises en culture à 37°C dans du milieu contenant du sérum 10% additionné de 100 ng/ml de coumermycine. Après 1 heure d'infection à 37°C, 1 ml de milieu de culture contenant 2% de sérum et 200ng/ml de coumermycine (concentration finale 100 ng/ml, stock à 5mg/ml dans du DiMethylSulfOxyde, avec un stock intermédiaire à 50µg/ml dans de l'OptiMEM) est ajouté dans les puits et l'ensemble est mise à incuber 2 jours à 37°C. L'observation de la fluorescence GFP des plages de lyse dans les puits permet la sélection du puits le plus fluorescent. L'étape de la sélection par la coumermycine est répétée jusqu'à ce qu'il ne reste plus de trace de la mCherry. On considère alors que le stock de particules virales est pur.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

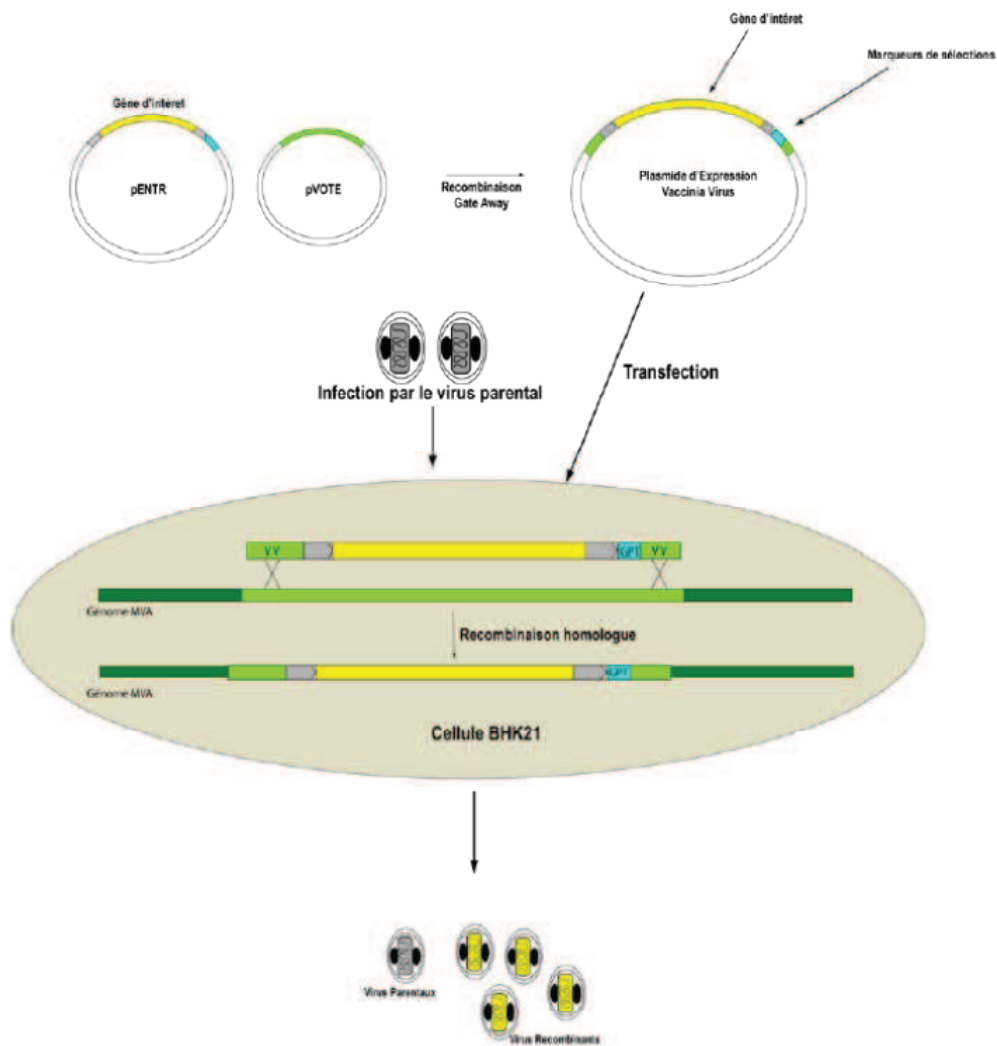


Figure 115 Intégration du gène d'intérêt dans le virus MVA. Le plasmide d'expression est construit par recombinaison Gateway. Il contient les séquences d'intégration par recombinaison homologue dans le génome de MVA (VV/HA) en vert et le gène de la résistance à l'acide mycophénolique (GPT) en bleu. Après recombinaison dans le génome de MVA via l'infection de cellule BHK21, la population de virus est hétérogène, composée de virus parentaux (non recombinés) et de virus recombinants. Les virus parentaux seront éliminés grâce à la sélection à l'acide mycophénolique, et les virus recombinants seront préservés après sélection sous microscope des populations de virus exprimant majoritairement la GFP.

iv. Surexpression des isoformes de Top2

Les cellules BHK21 sont cultivées dans un milieu G-MEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1,5 g/L bacto tryptose phosphate and 40 mg/L gentamicine. 600 ml de culture cellulaire (10^6 cellules/ml) sont infectés avec le MVA-topo à raison d'environ 0,1 PFU/cellule et incubés sous agitation rotative à 37°C et sous 5% CO₂ pendant 48 heures. La culture infectée est mélangée avec 6 litres de culture cellulaire non infectée (environ 10^6 cellules /ml) additionnée d'1mM d'IPTG final, puis incubées sous agitation rotative à 37°C et 5% CO₂. Après 24 heures les cellules sont centrifugées à 2000 g pendant 20 minutes. Chaque culot cellulaire est repris dans 50 ml de PBS (Phosphate buffered saline : 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂ HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) et centrifugées de nouveau à 2000 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont congelés à -80° jusqu'au moment de la purification.

B. Purification des isoformes α et β

1. Purification des isoformes produits dans la levure

S.cerevisiae

Toutes les étapes sauf indications contraires sont réalisées à 4°C.

i. La lyse des levures

Lyse cellulaire avec l'Emulsiflex C3: Le culot de cellules décongelées est resuspendu dans le tampon de lyse : 50 mM Hepes pH 8.0, 1M NaCl, 10% glycérol, 0.1 mM MgCl₂, 2mM β -mercaptoethanol, 1mM de fluorure de phenylmethylsulfonyl (PMSF) et une tablette de cocktail d'inhibiteur anti protéase complet (PIC). Le ratio de resuspension des cellules est de 3 ml de tampon de lyse pour 1 ml de culot. Les cellules sont cassées par un homogénéisateur haute pression Emulsiflex C3 avec 4 passages à une pression d'environ 1500 psi (~10,4 MPa, 1psi = 6894 Pa). Après chaque passage l'extrait totale est récupéré dans un récipient Falcon 50ml maintenu dans de la glace pour diminuer la chaleur générée par la pression. L'extrait cellulaire est ensuite clarifié par centrifugation 1 heure à 50 000 g.

Lyse cellulaire avec le système Fast Prep® 24 (MP Biomedicals) : Le tampon de lyse, les procédures de resuspension du culot et de traitement de l'extrait cellulaire sont les mêmes que décrits ci-dessus. Nous avons utilisé des billes de verres de 0,5 mm de diamètre dans un ratio de 1 volume de billes pour 1 volume de culot et 3 volumes de tampon de lyse. Le mélange est réparti dans des tubes de 50 ml afin qu'un minimum des 2/3 tiers des ceux-ci

MATÉRIELS ET MÉTHODES

soit plein. Puis les tubes sont disposés dans le rotor BigPrep™ 2X50 ml préalablement refroidi à 4°C, avec de la glace carbonique. 4 à 5 cycles de 30 secondes à une vitesse de 4 m.s⁻¹ sont réalisés avec des pauses de 1 minute sur glace pour diminuer la température.

Lyse cellulaire avec des billes de verres : Le culot est resuspendu dans du tampon de lyse et additionné de billes de verre dans des tubes de 50 ml comme décrit ci-dessus. 10 cycles d'agitation vigoureuse d'1 minute au vortex à 4°C sont réalisés et entrecoupés d'1 minute de pause sur glace pour diminuer la température.

ii. Les étapes de chromatographie.

Chromatographie d'affinité aux ions nickel : *Les enzymes recombinantes ont une étiquette 10 histidines en C-terminal afin de faciliter la première étape de purification.* Le surnageant est débarrassé de sa couche de lipides par capillarité avec l'utilisation d'une pipette pasteur en verre. La colonne d'affinité Hitrap Chelating HP 5ml (GE Healthcare) est chargée au nickel avec du NiSO₄ 0,2 M puis équilibrée avec du tampon de lyse. L'extrait soluble est chargé et la résine est lavée par du tampon de lyse additionné de 20 mM, 35 mM et 60 mM imidazole pour éliminer les protéines fixées de manière aspécifique. L'élution est réalisée par passage de tampon de lyse avec 250 mM imidazole. Les fractions correspondantes au pic d'élution sont mélangées (environ 10 ml).

Dialyse et coupure de l'étiquette C-terminale : L'éluât est dialysé, dans une membrane de dialyse (cut-off de 12-14 KDa) pendant 12 heures dans 2 litres de solution de dialyse, 50 mM Hepes pH 8,0, 10% Glycérol, 400mM NaCl, 2mM β-mercaptoethanol pour diminuer la concentration en NaCl et éliminer l'imidazole. Pendant la dialyse, l'étiquette 10 histidines est éliminée par coupure à la protéase preScission (PPX) qui est ajoutée dans l'éluât avec un ratio protéine recombinante: protéase 1:40 mg.

Chromatographie d'affinité héparine : *Cette étape est utilisée pour éliminer la PPX, l'imidazole et concentrer la protéine.* La résine de la colonne est composée d'héparine-Sepharose qui mime les charges présentes sur un ADN double brin. L'échantillon dialysé est chargé sur une colonne Hitrap Heparin HP 1 ml (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon de dialyse (ci-dessus). Après la charge, la résine est lavée avec 5 ml de tampon de dialyse. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl de 400mM à 1,5 M. Les protéines sont éluées aux alentours de 800 mM NaCl. Les fractions correspondantes au pic d'élution sont déposées sur gel SDS-PAGE et les plus concentrées sont congelées dans l'azote liquide (-196°C) et conservées à -80°C.

2. Purification à partir des cellules de mammifère BHK21

Toutes les étapes sauf indications contraires sont réalisées à 4°C. La seule différence avec la purification décrite pour les enzymes produites dans la levure *S.cerevisiae* est l'étape de la lyse des cellules. Lyse cellulaire : Le culot de cellules décongelées est resuspendu dans le tampon de lyse : 50 mM Hepes pH 8.0, 1M NaCl, 10% glycérol, 0.1 mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol, 1mM de fluorure de phenylmethylsulfonyl (PMSF). Le ratio de resuspension des cellules est de 3 ml de tampon de lyse pour 1 ml de culot. Les cellules sont cassées par sonication pendant 10 minutes, avec une séquence 2 secondes "on / 2 secondes off. L'extrait cellulaire est maintenu dans de la glace additionnée de sel pour compenser le dégagement de chaleur générée par les ultrasons de la sonde du sonicateur. L'extrait cellulaire est ensuite centrifugé 1 heure à 50 000 g.

3. Détection de l'isoforme α produite en BHK21 par MALDI CovalX

L'isoforme α est en solution dans 50mM HEPES pH8, 800mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0,1mM DTT, 10% glycérol. Ce tampon a été échangé avec une colonne d'exclusion de taille, Biospin® P30 (BIORAD) selon le protocole fourni par le fabricant, une première fois contre 50mM HEPES pH 8, 800mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0,1mM DTT (Dithiothréitol) et une deuxième fois contre 50mM HEPES pH 8, 400mM NaCl. Le mélange est ensuite dilué 5x avec de l'eau Milli-Q® et 0,1%TFA (Acide tétrafluoroacétique).

C. Analyses fonctionnelles des isoformes

1. Test de mobilité électrophorétique d'isomères topologiques d'ADN

i. Tests de relaxation d'un ADN plasmidique surenroulé

Lors de la relaxation d'un ADN plasmidique, les Top2 génèrent des isomères topologiques dont la mobilité électrophorétique est différente en fonction de leurs Lk (Linking number = nombre de fois que les brins d'ADN se croisent). Plus l'isomère est surenroulé plus il migre loin dans le gel d'agarose et inversement plus le plasmide est relâché plus il migre lentement (Figure 116).

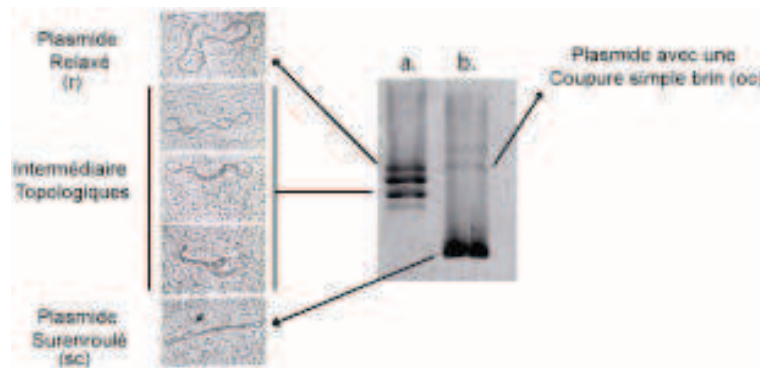


Figure 116 Principe du test de relaxation d'ADN plasmidique. r= relaxed, sc = supercoiled, oc = open circular. a. Migration et séparation, sur gel d'agarose, des intermédiaires topologiques en fonction de leur degré de surenroulement. b. Migration sur gel d'agarose d'un plasmide surenroulé.

5,6nM de pUC19 (100ng) sont mis en présence de concentrations variables de Top2 ou de concentrations variables en molécules inhibitrices dans 10 μ l de milieu réactionnel composé de 50 mM de Acétate de potassium, 20 mM de Tris Acétate pH 7,9, 10 mM d'acétate de magnésium et 1 mM de DTT, et 1 μ g de BSA. Les réactions sont démarrées par l'ajout de 1 mM d'ATP dans les mélanges réactionnels. Après 30 minutes à 37°C, les réactions sont arrêtées par l'ajout de bleu de charge. La migration est réalisée sur gel d'agarose 1% (TBE 1X, Tris-Borate-EDTA), 3 heures à 9V/cm. Le gel est ensuite coloré 15 minutes dans un bain de BrEth TBE 1X (Bromure d'éthidium 0,5 μ g/ml final). Le résultat est visualisé par exposition aux UV dans le scanner Typhoon 8600.

ii. Test de Clivage

Ce test permet de mettre en évidence la coupure de l'ADN générée par les Top2 lorsqu'elles forment un complexe ternaire Top2-ADN-inhibiteur par exemple en présence d'étoposide). On utilise une variante des conditions expérimentales utilisées pour les tests de relaxation. Les mélanges réactionnels sont les mêmes que pour les tests de relaxation auxquels sont ajoutés 5mM d'étoposide. Les réactions sont arrêtées après 5 minutes d'incubation par l'ajout de 0,2% de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et 2µg de protéinase K. Les gels sont ensuite traités comme décrit ci-dessus.

iii. Test de décaténation

Les Top2 sont mises en présence d'un réseau d'ADN kinétoplasmiqum, des réseaux d'ADN en minicecles caténés de 2.5 Kilo bases (ADNk), qu'elles vont résoudre en produisant des ADN minicercle de 2,5 Kilo bases. Le réseau d'ADNk est trop dense pour rentrer dans le gel d'agarose 1% lors de la migration électrophorétique, il va rester dans le puits, on va donc visualiser la décaténation d'ADNk par l'apparition d'une bande à 2,5 K paire de bases. Les milieux réactionnels contiennent 0,1 µg d'ADNk, 50 mM de Tris HCl pH 8, 120 mM Chlorure de Potassium, 10 mM de Chlorure de magnésium, 0,5 mM de dithiothreitol, 30 µg/ml de BSA, 1 mM d'ATP et des concentrations variables en Top2. Les réactions sont incubées 15 minutes à 37°C et terminées par 5% de sarkozyl, 0,025% de bleu de bromophénol et 5% glycérol. Les réactions sont ensuite migrées sur gel d'agarose 1% (TBE 1X, Tris Borate EDTA) en présence de Bromure d'éthidium. Les bandes sont révélées aux rayonnements UV avec le scanner Typhoon 8600.

2. Caractérisation des constantes catalytiques par mesure de l'hydrolyse d'ATP

Ce test a pour but de mesurer l'activité ATPase des HsTop2 afin de déterminer les constantes cinétiques (K_m , K_{cat}). Ce test peut être réalisé en présence ou en absence d'inhibiteur.

i. Principe du test

Lors de ces tests enzymatiques, l'hydrolyse de l'ATP est couplée à l'oxydation du NADH en NAD⁺. On mesure donc une diminution de l'absorbance à 340 nm due à la disparition du NADH dans le milieu réactionnel (Figure 117). Nous avons effectué les mesures sur le spectrophotomètre Shimadzu 1700 sur 15 minutes dans une chambre avec 6 pistes de lecture en parallèle et une température contrôlée à 37°C. Les activités ont été calculées sur les 200 premières secondes. Chaque réaction contient 75 nM d'isoforme α avec un tampon réactionnel standard (50 mM Tris HCl pH7,5, 150mM d'acétate de potassium, 8mM d'acétate de magnésium, 7mM β -mercaptoéthanol, 100 μ g/ml de BSA) auquel est ajouté 21 nM d'ADN plasmidique (pUC19), 4U/5U de PK/LDH (Pyruvate Kinase/ Lactate Déshydrogénase) (Sigma-Aldrich) , 2 mM de PEP (Phospho Enole pyruvate) (Sigma-Aldrich) et 0,2 mM de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide) (Sigma-Aldrich). Le point de référence est réalisé sans NADH. L'ajout de l'ATP marque le début de la réaction. L'ATP est ajouté de 0 mM à 1mM final pour les gammes complètes de mesures cinétiques (K_m) ou à 1mM final pour les mesures des constantes catalytiques (K_{cat}). Pour les cinétiques enzymatiques, l'absorbance de chaque réaction a été lue toute les 10 secondes. Les valeurs sont reportées sur un graphique en mAbsorbance en fonction du temps et les pentes des droites obtenues nous donnent l'activité en mAbsorbance par minute. Ces activités sont converties en μ M.minutes⁻¹ grâce à la loi de Beer-Lambert et au coefficient d'extinction molaire du NADH (équation 1 ci-dessous). A partir des activités il est possible de calculer les constantes K_{cat} et K_m .

MATÉRIELS ET MÉTHODES

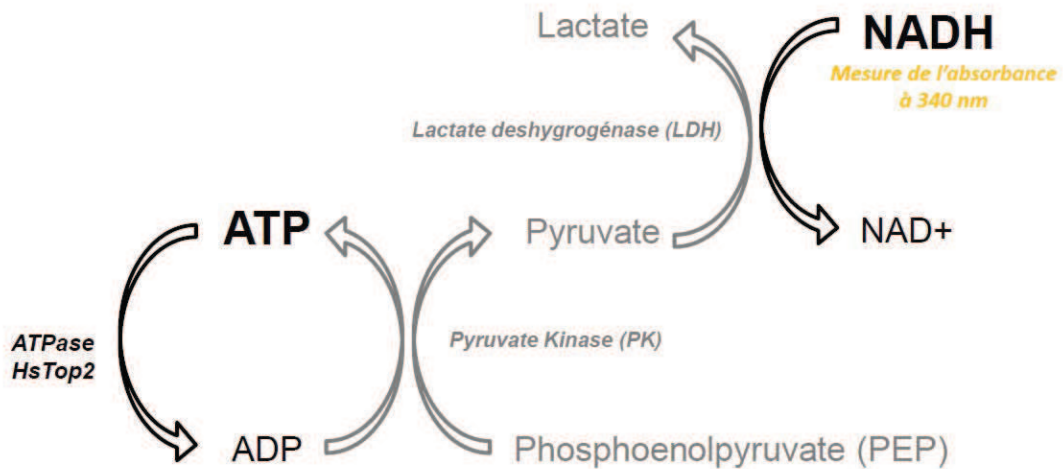


Figure 117 Mesure de l'hydrolyse d'ATP couplée à l'oxydation du NADH. Le NADH absorbe à 340nm. L'ADP est régénéré en ATP par la pyruvate kinase qui utilise le PEP comme co-facteur et génère du pyruvate. Le pyruvate est transformé en Lactate par la LDH qui utilise le NADH comme co-facteur. Cette cascade enzymatique appartient au cycle de la glycolyse. L'ATP est présent en concentration constante, sa consommation est corrélée à la diminution en NADH dans le milieu réactionnel.

ii. Détermination des constantes K_{cat} et K_m :

K_{cat} est déterminé avec la formule suivante : Equation1

$$K_{cat} = V_{max}/[E_t]$$

V_{max} : est la vitesse maximale d'hydrolyse du substrat pour une concentration donnée d'enzyme.

Nous mesurons les activités en mAbsorbance/minute, qu'il est possible de convertir en $\mu\text{M}/\text{min}^{-1}$ grâce à la loi de Beer-Lambert et du coefficient d'extinction molaire du NADH : Equation2

$$\text{ATPase rate } [\text{ATP} \times \text{min}^{-1}] = -\frac{dA_{340}}{dt} [\text{OD}/\text{min}] \times K_{path}^{-1} \times \text{moles}^{-1} \text{ ATPase}$$

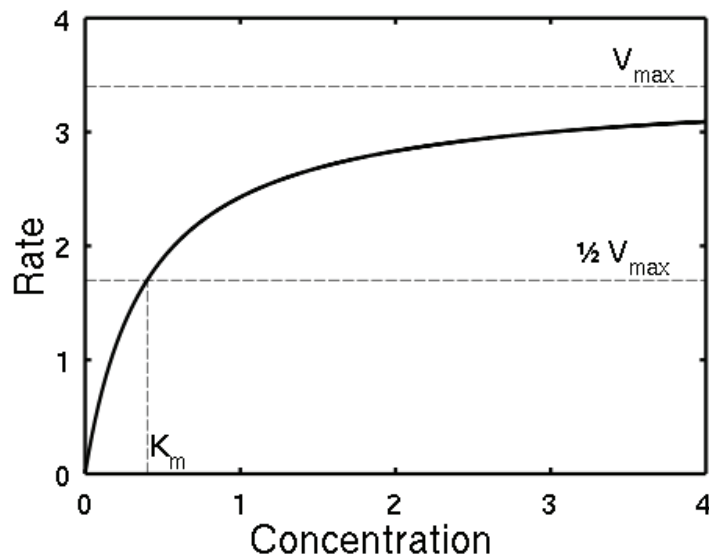
MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ou K^{-1} représente le coefficient d'extinction molaire du NADH, ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La constante de Michealis K_m peut être déterminée avec l'équation de Michealis et Menten : Equation 3

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

ou de manière graphique : Le K_m est la valeurs en substrat pour laquelle l'enzyme est à la moitié de sa vitesse maximale.



3. Analyse de séquences par spectrométrie de masse Orbitrap

Les phosphorylations sont enrichies par IMAC (IMmobilized Affinity Chromatography), TiO_2 (Titanium Dioxyde) ou anticorps ; les acétylations et ubiquitination par des anticorps et les glycosylations par la lectine. Cet enrichissement est souvent indispensable pour l'analyse des phosphorylations car elles sont très labiles et hétérogènes. Une phosphorylation sur une même position peut être perdue sur certains peptides et donc peu ou pas détectée. Les peptides sont séparés par LC (Liquid Chromatography) qui est directement relié au spectromètre. Les peptides sont ensuite ionisés par ESI (ElectroSpray Ionisation) ou MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), puis plus ou moins fragmentés par collision avec un gaz inerte (argon ou azote) et enfin les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge (m/z). Cette séparation et analyse de la masse moléculaire peuvent être réalisées par différents appareils en fonction du but de l'analyse. Dans le spectromètre avec analyseur de temps de vol (TOF = Time of flight) qui est en général combiné au MALDI, les ions sont séparés en fonction de leurs temps de vol qui dépend de leur masse (en MALDI les ions ne portent qu'une charge). L'analyseur quadripôle est en général combiné à l'ESI, va filtrer les masses et laisser passer les peptides par variation de ses champs électriques. Les ions passant à travers seront enregistrés sur un détecteur. Ce spectrophotomètre peut détecter jusqu'à 0.1 -1 Da et il est en général utilisé pour le séquençage peptidique.

Les « Ion Trap » ou analyseurs par transformée de Fourier, capturent les ions dans un champ électrique et libèrent les ions de masse choisie qui sont ensuite détectés à la sortie. L'Orbitrap appartient à cette dernière catégorie. C'est un nouveau type d'analyseur. Ils possèdent les caractéristiques du FT-ICR (Fourier Transform-ion cyclotron resonance) qui a représenté une avancée majeure dans le domaine de la spectrométrie de masse dû à ses hautes performances en terme de résolution et de sensibilité. Pour le séquençage peptidique, l'analyse en tandem est nécessaire. Elle est en général réalisée sur des triples quadripôles (Q-Q-Q) ou des quadripôles « ion Trap » (Q-Q-LIT), ceci permet un fractionnement multiple des peptides. Le premier fractionnement permet l'enregistrement de la masse du peptide et le deuxième fractionnement permet d'enregistrer les masses des acides aminés qui composent ce peptide.

i. Préparation des échantillons

Migration sur gel polyacrylamide : Entre 3 et 4 µg de protéine sont déposés sur gel gradient 4-12% NuPAGE® Novex® Bis-Tris (Life technologies NP0322BOX). Après 1 heure de migration dans une cuve NuPAGE® à 180 V en tampon NuPAGE® MES Running Buffer 1X (Life technologies) additionné de NuPAGE® antioxydant (Life technologie NP 0005), le gel est coloré 1 heure avec la solution simplyBlue™ SafeStain (Life technologie LC6060), puis décoloré 1 heure à l'eau déminéralisé. Découpage et décoloration des bandes : les bandes d'intérêt sont découpées au scalpel et décolorées par 2 à 5 lavages successifs au Bicarbonate d'ammonium (BA) 25mM. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante (TA) avec 100µl d'acétonitrile (ACN) 100%, le gel est séché environ 10 minutes au speedVac. Le gel est ensuite mis en présence d'une solution d'alkylation (Iodoacétamide 55 mM dans du bicarbonate d'ammonium 100 mM) pendant 1 heure à 56°C, puis d'une solution de réduction (DTT 10 mM dans du bicarbonate d'ammonium 100 mM) pendant 1 heure dans l'obscurité à TA. Les solutions en excès sont enlevées à la pipette après chaque étape. Après 3 lavages avec 200 µl de BA 25mM, puis une incubation de 10 minutes à température ambiante puis de 10 min d'incubation dans du ACN 100% à température ambiante, le gel est à nouveau séché 15 minutes au SpeedVac.

Digestion à la Trypsine : Une solution de trypsine à 12.5 ng/µl (Trypsin Porcine, 5x20 µg, Promega Réf. : V5111) est ajoutée de manière à hydrater complètement le gel (20 à 70 µl). La digestion est réalisée 1 heure sur glace. L'excès de solution est enlevé puis le gel est recouvert par 50 mM de BA et laissé environ 12Heures sous incubation à 37°C.

Extraction des peptides : Le surnageant est prélevé et 50 µl de solution ACN 45%, Acide acétique 10% (V/V) sont ajoutés. L'ensemble est mis à incuber sous agitation 15 à 30 minutes à température ambiante. Après centrifugation (5 min à 10 000g), deux extractions successives sont réalisées dans ces mêmes conditions. Lors de la dernière extraction, de l'ACN 95% et de l'acide acétique 5% sont utilisés. Puis le surnageant est complètement évaporé au SpeedVac. Les tubes sont conservés à – 20°C jusqu'à son utilisation.

ii. Digestion par d'autres enzymes : La chymotrypsine

Toutes les étapes non évoquées sont les mêmes que dans le protocole pour la digestion à la trypsine ci-dessus. Digestion à la Chymotrypsine : Une solution de chymotrypsine à 12.5 ng/μl (Promega 1 x 25 μg réf : V106A) dans du bicarbonate d'ammonium (BA) à 50 mM est ajouté de manière à hydrater complètement le gel (20 à 70 μl). La digestion est réalisée 1 heure sur glace. Puis l'excès de solution est enlevé et un volume de BA 50 mM suffisant pour recouvrir le gel est laissé environ 12 heures sous incubation à 37°C.

4. Mutation ponctuelle K168A et K278A dans le domaine ATPase de l'isoforme α

i. Introduction des mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles ont été introduites avec le kit Quick Change (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant (pour les amorces utilisées voir tableau dans les annexes).

ii. Clonage de domaine ATPase sauvage et du mutant K168A

- ✓ Intégration de HT2ATP168 dans le plasmide pSKB2-10His :

La séquence amplifiée à partir du vecteur pYES2.1-K168A a été intégrée dans le plasmide pSKB2-10His par restriction/ligation dans les sites NdeI/BamHI (pour les amorces utilisées voir tableau dans les annexes).

- ✓ Intégration de HT2ATP168 dans le plasmide pET-TEV-MBP-6His :

La séquence amplifiée a été intégrée au plasmide par LIC (Ligation Independent Cloning). En parallèle la séquence HT2ATP168 est amplifiée à partir du vecteur pYES2.1-K168A par PCR. Le vecteur linéarisé et le produit PCR débarrassé du plasmide pYES2.1 par digestion avec DpnI, ont été purifiés sur gel d'agarose 1% BrEth (Bromure d'éthidium 0,5 μg/ml final) avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel). Les deux produits sont ensuite préparés pour le LIC (Paragraphe 5i).

Élimination des résidus excédentaires en N-terminal de HT2ATP168 par mutation ponctuelle : les amorces ont été synthétisées (Sigma-Aldrich) et utilisées avec le kit Quick Change.

iii. Surexpression du domaine ATPase - mutant K168A

Les plasmides ont été transformés dans les cellules LOBSTR (Low Background STRain) (Andersen et al.). Ces dernières sont des BL21(DE3) modifiées conçues pour limiter la contamination des colonnes d'affinité au nickel et au cobalt par des protéines bactériennes *ArnA* et *SlyD* riches en histidine. 6 X 1 litres de culture additionnées de Kanamycine (100 µg/ml finale), sont inoculées à une OD_{600nm} de 0.1 et incubées sous agitation vigoureuse à 180 rpm) à 37°C. Lorsque l'OD_{600nm} atteint 0,6 la température est diminuée à 30°C et à OD_{600nm} 0,8, les culture sont induites par ajout d'IPTG (Isopropyl β D Thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 1mM. Après 10 heures de culture les cellules sont centrifugées pendant 20 minutes à 4000 g et les culots conservés à -80°C.

iv. Purification des domaines ATPase

Le protocole détaillé de la purification nous a été fourni par Gregory Verdine (*Erving Professor of Chemistry in the Department of Stem Cell and Regenerative Biology Harvard university*). Les culots de cellules sont décongelés et resuspendus dans 10 ml de tampon de lyse (50 mM HEPES pH8, 500 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail) pour 1 ml de culot. Les cellules resuspendues sont ensuite lysées par l'homogénéisateur Emulsiflex C3® par 4 passages à 1500psi, l'extrait total est centrifugé 20 minutes à 20 000g. L'extrait soluble est chargé sur une colonne Nickel (HiTrap Chelating HP 5ml GE-Healthcare) préalablement équilibré avec le tampon de lyse. Après lavage par 25 ml de tampon de lyse, l'élution est réalisée par passage de 10 ml de tampon d'élution (25 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazole, 5mM β-mercaptoéthanol). Les fractions contenant la protéine recombinante sont mélangées et diluées 2 fois dans de l'eau milliQ et chargées sur colonne Héparine 5ml (Hitrap Heparin HP GE-Healthcare) préalablement équilibrée avec 20 mM HEPES pH8, 150mM NaCl, 5mM β-mercaptoéthanol. La protéine est éluée par un gradient de 150 à 1M de NaCl (20mM Tris pH 8, 5mM β-mercaptéthanol) à environ 40% (490 mM NaCl). Les fractions sont mélangées et le mélange est concentré à 1ml (Vivaspin® centrifugal concentrator) puis dilué 2 fois dans de l'eau. De la TEV à un ratio de 1mg pour 20mg de protéine à cliver est ajoutée pendant 12 heures à 4°C. La MBP et HT2ATP168 sont séparées par une colonne soustractive, le mélange clivé par la TEV est chargé sur une colonne Q sepharose (Hitrap Q HP 5ml) équilibrée avec 20mM HEPES pH 7,4, 5mM β mercapthoéthanol et 20% de solution à 20 mM HEPES pH 7,4, 1M NaCl, 5mM β - mercapthoéthanol. La protéine HT2ATP168 passe au travers de la colonne et la MBP reste fixée. HT2ATP168 est ensuite concentrés à 2 ml et injectée sur une Gel Filtration HiLoad

MATÉRIELS ET MÉTHODES

16/60 Superdex 75 column (Amersham Biosciences) équilibrée avec 20 mM Tris pH 7,5, 400 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol. La protéine sort aux alentours de 65 ml. Les fractions sont mélangées et concentrées (Vivaspin® centrifugal concentrator) jusqu'à obtenir une concentration entre 8 et 10mg/ml.

v. Cristallisations

Les essais de cristallisations ont été réalisés comme décrit dans l'article de Wei *et al.* (Wei et al., 2005). La protéine est concentrée jusqu'à 8 à 10 mg/ml puis dialysée contre 20 mM Tris pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT (Dithiothréitol). Puis 1 mM d'AMPPNP est ajouté. La cristallisation est réalisée à 4°C, en goutte suspendue. 2 μ l de protéine sont mélangés avec 2 μ l de la solution du puits (4 à 8% PEG 6000, 10 mM β -mercaptoéthanol.). L'essai de cristallisation en présence d'ADP est réalisé en ajoutant 5 mM d'ADP à la protéine dialysée dans les mêmes conditions que l'AMPPNP. La cristallisation est réalisée à 20°C en gouttes suspendues. 2 μ l de protéine sont mélangés à 2 μ l de solution du puits (21% de PEG 1500, 35 mM de sulfate d'ammonium, 100 mM Tris pH 8.0).

II. Chemoprotéomique

1. Test de relaxation d'ADN plasmidique en présence des sondes dérivée de l'étoposide et de la doxorubicine.

Les tests de relaxation en présence des sondes ont été réalisés comme indiqué dans le paragraphe C.1.i., en ajoutant une concentration croissante de sonde pour une concentration constante de 250 ng de HsTop2 α par réaction.

2. Test d'intercalation des sondes

56 pmol d'ADN surenroulé négativement sont incubés en présence d'une concentration croissante en sonde ou molécules inhibitrices, 20 minutes à 37°C dans 20 mM Tris-acétate pH7.9, 50 mM potassium acétate, 10 mM magnésium acétate, 1mM DTT, 3% DMSO, BSA 100 μ g/ml. Les échantillons sont traités avec 0.2% SDS avant électrophorèse. La migration est réalisée sur gel d'agarose 0.8%, 1X TBE à 9V/cm pendant 1 heure. Le gel est ensuite coloré dans un bain à 0.5mg/ml bromure d'éthidium (EtBr) dans 1X TBE pendant 30minutes, suivit par une décoloration dans de l'eau Milli-Q [®], puis révélé avec le scanner Typhoon 8600.

3. Culture cellulaire utilisée pour les expériences de pulldown

Les cellules *HeLa* proviennent de l' « European Collection of Cell Culture ». Les cellules sont cultivées dans du milieu Eagle additionné en 10% FCS et 40 μ g/ml Gentamicine. Les cellules sont cultivées jusqu'à maximum 1.05×10^6 cellules/ml, puis centrifugées 20 min à 215 g.

Les cellules RS4;11 nous ont été fournies par le Dr. Preudhomme (Laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI1640 pH7.25 additionné de 10% FCS, 40 μ g/ml Gentamicine, 0.21 % Pénicilline, 0.1% Streptomycine and 2 % bicarbonate. Les cellules sont cultivées jusqu'à 8.8×10^5 cellules/ml. Les cellules sont centrifugées 20 min à 215 g.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les cellules Calu-1 nous ont été fournies par le Dr. W.E.C Bradley (Institut du Cancer de Montréal). Les cellules sont cultivées dans du milieu MEM α (Invitrogen) additionné de 10% FCS et 40 μ g/ml Gentamicine. Les cellules sont cultivées jusqu'à 7.8×10^5 cellules/ml (80% de confluence) et sont ensuite centrifugées 10 minutes à 210g après « raclage » des boîtes.

4. Préparation des extraits cellulaires totaux.

Les cellules congelées sont homogénéisées dans le tampon de purification (20 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) avec 20 mM Fluorure de sodium et 1 mM Orthovanadate de sodium. Une tablette de EDTA-free protease inhibitor (Roche) pour 25 ml, 100 U de DNase I et 100 μ g de RNase A par gramme de cellules ont été ajoutés. Les cellules sont lysées par sonication (Biorblock scientific vibracell 72412, petite sonde, 35% d'amplitude, 3 fois 45s, 0.5s marche/0.5s arrêt) et laissées sur glace 25 min à 4°C. L'extrait total est centrifugé 1 heure à 100 000 g à 4°C. La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford (BioRad).

5. Les expériences de pulldown

200 μ l de billes magnétiques Pierce Streptavidin (ThermoFisher n°E364K5) sont fonctionnalisées dans le tampon de purification (20 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) avec 20 nmol de sonde Doxo-HAZA-biotine (10 mM) par incubation à température ambiante pendant 1 à 2 heures.

5 mg d'extrait cellulaire est appliqué sur les billes et incubé 1 heure à 4°C. Après plusieurs lavages avec le tampon de purification, les protéines sont éluées par ajout de 100 μ l de Dithionite de sodium 5mM dans du tampon de purification sans Tween 20, pH 7.2.

Pour les analyses par spectrométrie de masse, l'éluât est concentré par SpeedVac et resuspendu dans du tampon 125 mM Tris-HCl pH6.8, 4.6% SDS, 20% glycérol, 0.1% bleu de bromophénol, 100 mM DTT.

III. Etude structurale de l'isoforme α

A. Préparation des oligonucléotides

1. Oligonucléotide de 155 paires de bases

La procédure pour produire un oligonucléotide de 155 paires de bases a été mise au point au paravent dans le laboratoire par Julie Papillon.

2. Oligonucléotides de 55 et 85 paires de bases

Les oligonucléotides ont été synthétisés et purifiés sous forme simple brin par SIGMA-ALDRICH puis envoyé au laboratoire sous forme lyophilisée. Ils ont ensuite été resuspendus dans de l'eau stérile à une concentration finale de 1 mM. Puis chaque oligonucléotide simple brin a été mélangé avec un ratio équimolaire à son ADN complémentaire simple brin puis dénaturé 5 minutes à 95°C et hybridé en laissant la réaction refroidir à température ambiante permettant une diminution graduelle de la température de 95°C à 20°C.

3. Expérience de retard sur gel

6 pmoles d'enzyme ont été mélangées à 6pmoles d'ADN et les inhibiteurs ajoutés en excès en fonction de l'expérience. Les complexes ont été mélangés à du bleu de charge natif (50 % glycerol, 25% Tris CAPS1X, 0.01% Bromophenol Blue) et déposés sur Gel d'Acryl Tris CAPS 5%. L'ensemble est migré à 4°C dans du tampon Tris CAPS 1X pendant 70 minutes à 150V. Le gel est ensuite coloré au BrEth (Bromure d'éthidium 0,5 µg/ml final) pour visualiser l'ADN puis au bleu de coomassie pour visualiser les protéines.

4. Formation du complexe avant la congélation

Environ 50 µl d'enzyme décongelée sur glace est passé sur une colonne de déssalage Biospin® P30 (BIORAD) selon le protocole fourni par le fabricant pour changer le tampon contre un premier tampon intermédiaire contenant NaCl 400 mM, MgCl₂ 5 mM, Hepes pH8.0 20 mM, DTT (Dithiothréitol) 1mM. Cet échange de tampon est réalisé deux fois. La protéine est ensuite mélangée avec une quantité équimolaire d'ADN et 1mM d'étoposide. Ce mélange est laissé incubé 5 minutes à 37°C. Puis l'AMPPNP est ajouté à une concentration de 1 mM. L'ensemble est ensuite dilué deux fois avec un tampon sans NaCl (Hepes pH 8.0

20 mM, DTT 1mM). Différentes dilutions de ce stock sont utilisées pour la préparation des grilles de cryo-EM.

B. La microscopie électronique à transmission (MET) appliquée à la biologie structurale

La biologie structurale a pour objet l'étude des macromolécules par la résolution de leurs structures tridimensionnelles. Jusqu'à récemment la technique la plus répandue était la cristallographie aux rayons X, qui permet, sous réserve de trouver les conditions de cristallisation et de résoudre le problème des phases, d'atteindre une résolution atomique sans limitation de taille du complexe. La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) vient compléter les informations structurales en apportant des données sur les interactions et la dynamique des macromoléculaires, mais cette technique reste limitée aux molécules de petites tailles (40 à 50 KDa). Pour finir ces deux techniques nécessitent des quantités importantes (plusieurs mg) de protéines très pures (> 99%). La Cryo-microscopie électronique est moins exigeante quant à la pureté de l'échantillon et nécessite une quantité moindre d'échantillons (moins de $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$), ce qui en fait une technique de choix pour l'étude de nombreux complexes délicats à produire et à purifier. De plus la cryo-EM, contrairement à la cristallographie aux rayons X est moins contraignante quant à l'hétérogénéité conformationnelle et/ou stéréochimiques des complexes étudiés. Ce qui en fait à l'heure actuelle une technique de choix pour l'étude de gros complexes protéiques de plus en plus difficiles à produire et à stabiliser. Les dix dernières années ont vu se développer de nombreuses avancées techniques sur le microscope électronique à transmission dédié à l'étude des complexes macromoléculaires. Il est aujourd'hui possible d'atteindre une résolution atomique pour des complexes très stables avec ou sans symétrie pour aider l'alignement lors du traitement des images .

i. Principe de la MET, fonctionnement du microscope :

La microscopie électronique à transmission (MET) consiste à faire passer un faisceau d'électron à haute énergie 60 à 400 kV à travers un échantillon de 50 à 150 nm d'épaisseur afin de former des images. Les MET quels que soient leurs domaines d'application, sont organisés selon le même schéma (Figure 118). En suivant le chemin des électrons dans le MET, on retrouve le canon à électron, la colonne soumise à un vide poussé qui contient l'ensemble du système optique permettant la focalisation des électrons sur l'échantillon. Et

MATÉRIELS ET MÉTHODES

pour finir, les images de l'échantillon sont agrandies et visualisées directement sur un écran phosphorescent ou enregistrées sur un détecteur (Film photographique, camera CCD : Charged Coupled Device, Camera CMOS : détection direct des électrons) (Figure 119).

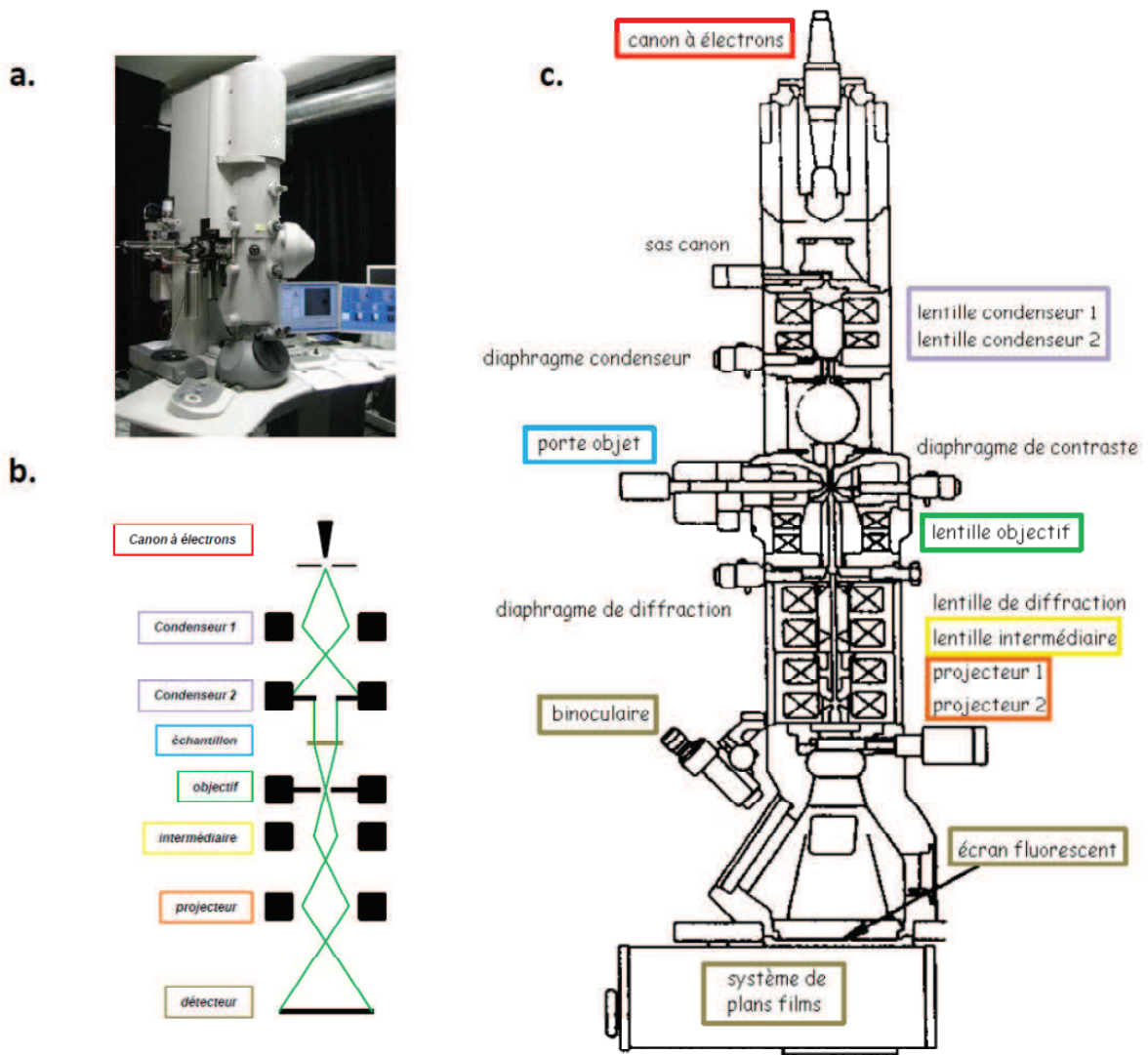


Figure 118 Principe du microscope électronique à transmission. a. FEI Tecnai G2 Polara. b. Chemin du faisceau d'électrons dans le TEM. La focalisation et la diffraction du faisceau d'électrons est comparable au faisceau lumineux dans un microscope photonique. c. Représentation schématique de l'organisation d'un TEM.

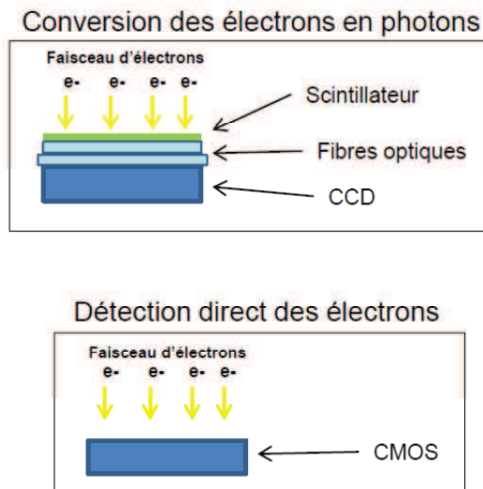


Figure 119 Principes des détecteurs utilisés avec la microscopie électronique à transmission. Dans la caméra CCD (Charged Coupled Device), les électrons sont transformés en photons qui sont détectés par le dispositif CCD. Grâce à la technologie CMOS, la conversion en photons n'est pas nécessaire, les électrons sont directement enregistrés limitant la génération de signal secondaire à la conversion des électrons en photons.

ii. Génération du faisceau d'électrons, le canon à électrons.

Le rôle du canon à électrons est de produire un faisceau d'électron. Il existe deux familles de canon à électron. Les canons thermoïoniques et les canons par effet de champs (FEG). Les premiers utilisent de l'énergie thermique, en chauffant un filament de tungstène, pour extraire les électrons qui sont ensuite accélérés sous vide par des champs magnétiques. Les FEG sont constitués d'une pointe métallique très fine. Les électrons sont extraits par l'application d'une forte tension électrique à l'extrémité de cette pointe. Les FEG permettent d'obtenir un faisceau d'électron très cohérent et stable.

iii. La formation de l'image et le système optique.

Les électrons extraits du canon sont accélérés dans la colonne du microscope qui contient le système optique sous vide très poussé car les molécules présentes dans l'atmosphère et les impuretés peuvent dévier les électrons.

Les lentilles électromagnétiques constituent le système optique du MET. Elles obéissent aux lois géométriques de l'optique photonique, une source lumineuse constituée de rayons cohérents et parallèles qui passent à travers l'échantillon. Les électrons incidents sont déviés lorsqu'ils rencontrent les atomes qui constituent l'échantillon. Ils se focalisent sous l'action d'une lentille au niveau d'un plan focal et une image se forme au niveau du plan image. Le niveau de focalisation peut être modifié en faisant varier le voltage dans les lentilles électromagnétiques.

Les lentilles condenseurs : Focalisent le faisceau d'électrons sur l'échantillon. Elles permettent également de contrôler la taille du faisceau.

Les lentilles objectives : Elles permettent de focaliser les électrons après qu'ils aient traversés l'échantillon. Sous l'action de ces lentilles, les électrons convergent au niveau du plan focal. Ce plan focal peut être visualisé directement au microscope. Il permet de voir la diffraction des électrons par l'échantillon et donc d'estimer la qualité du signal. Le diaphragme objectif est utilisé régler l'illumination de l'échantillon et sélectionner les électrons qui contribueront au contraste de l'image.

Les lentilles projecteurs : Après focalisation, le faisceau est agrandi par les lentilles projecteur et les images sont visualisées sur un écran phosphorescent ou directement enregistrées sur un détecteur CCD ou CMOS.

iv. La résolution en Cryo-EM

Les défauts et aberrations des lentilles en optique photonique sont retrouvés sur les lentilles électromagnétiques limitant la résolution des images produites. La résolution désigne la possibilité de distinguer deux points rapprochés comme des objets distincts. La limite de résolution est la plus petite distance entre deux points qui permet encore de les distinguer comme deux objets séparés. Dans un système optique parfait, un point serait représenté sur une image comme un point. Dans les microscopes avec des lentilles contenant des défauts optiques, un point est transformé en une tache d'Airy sous l'effet de la

diffraction des rayons après le passage à travers un trou (diaphragme). Le diamètre de cette tache est calculé par la relation suivante :

$$D = \frac{1,22\lambda}{n \sin \alpha}$$

où λ est la longueur d'onde du rayon incident, n l'indice de réfringence et α le demi angle d'ouverture du diaphragme de la lentille objectif.

Le pouvoir séparateur d'un microscope désigne la distance minimale qui permet de discerner deux tâches d'Airy adjacentes. En théorie le pouvoir séparateur en MET devrait permettre d'atteindre des résolutions atomiques. Cependant les défauts des lentilles électromagnétiques limitent la résolution réelle qu'il est possible d'atteindre.

Les défauts des lentilles

- L'aberration sphérique : Cette aberration provient de la différence de convergence entre les faisceaux périphériques et centraux par rapport à l'axe de la lentille. Cette aberration est caractérisée par un coefficient d'aberration sphérique (C_s) dont la valeur est différente suivant le type de microscope. Le dernier microscope disponible actuellement, le Titan Kryos, possède des correcteurs C_s qui permettent de diminuer les tâches d'airy repoussant les limites de résolution atteignables pour les reconstructions 3D.
- L'aberration chromatique : Cette aberration est dû au fait que les électrons du faisceau incident n'ont pas tous les mêmes vitesses. Ceci peut être dû à des vitesses initiales différentes, des fluctuations de la tension ou encore à une perte d'énergie lors de la traversé de l'échantillon. Donc les électrons vont avoir une énergie différente est se comporter de manière indépendante à différents niveau du microscope. L'utilisation du FEG, canon à électron par effet de champs, diminue cette aberration qui n'est par ailleurs pas directement lié aux lentilles mais qui peut être amplifiée par ces dernières.
- L'astigmatisme : c'est un défaut majeur à corriger au moment de l'acquisition des images grâce aux stigmatiseurs. Cette aberration provient d'un défaut de convergence des électrons par les lentilles. Sans correction, l'image d'un point devient une ellipse qui est inutilisable pour les reconstructions 3D.

v. Formation du contraste et formation de l'image.

- Diffusion des électrons dans la matière.

Il existe deux types de contraste. Le contraste de phase qui est généré par un décalage de phase dans la composante ondulatoire du faisceau d'électron et un contraste d'amplitude qui est généré par l'interaction du faisceau d'électron avec la matière. En MET les différentes trajectoires adoptées par les électrons à la sortie de l'échantillon vont se combiner et former une image avec plus ou moins de contraste. Le contraste de phase est le principal contributeur à l'image formée. Il est possible d'augmenter le contraste d'une image en créant de manière intentionnelle un décalage de phase dans les électrons par défocalisation du faisceau d'électron. Les aberrations des lentilles, notamment l'aberration, sphérique contribue également à augmenter le contraste de phase.

- La fonction de transfert du contraste (CTF)

La CTF décrit la proportion de contraste d'amplitude et de contraste de phase qui interviennent dans le contraste final de l'image, elle est également un indicateur de la qualité de l'image. Cette fonction mathématique prend en compte les défauts du microscope ainsi que la valeur de la défocalisation appliquée sur chaque image. Par ailleurs, le faisceau d'électron n'est jamais parfaitement parallèle et monochromatique, ces paramètres sont pris en compte dans la fonction d'enveloppe qui est une représentation de divers phénomènes tels que les vibrations, l'instabilité de la source d'électrons, l'aberration chromatique. Cette fonction d'enveloppe a pour effet de diminuer la CTF de manière exponentielle. Les microscopes électroniques à transmission quel qu'ils soient, ne génèrent jamais de projections 2D parfaites des spécimens observés. Il est donc indispensable de corriger les effets de la CTF et la fonction d'enveloppe pour pouvoir réaliser une reconstruction 3D avec un minimum d'artefacts. Les méthodes informatiques développées pour cette correction reposent sur une connaissance précise des paramètres qui définissent la CTF. De plus les différentes valeurs de défocalisation utilisées lors de l'acquisition permettent de combler les informations manquantes de certaines fréquences spatiales induites par la nature oscillatoire de la CTF.

1. Congélation de l'échantillon sur les grilles de microscopie électronique.

La cryo-microscopie électronique permet d'obtenir des informations structurales sur des spécimens hydratés. Ce fût une avancée majeure dans le développement de la MET appliquée à la biologie structurale. En effet la congélation permet de s'émanciper du problème d'évaporation de l'échantillon sous l'effet du vide dans la colonne du microscope et permet une protection, dans une certaine mesure, de l'échantillon contre les effets irradiants du faisceau.

Pour la préparation des échantillons nous avons utilisé des grilles commerciales en cuivre (Quantifoil ® R2/R2). Elles sont recouvertes d'une couche de carbone avec des trous d'un diamètre et d'un espacement similaire (2µm et 2µm). Cette régularité est indispensable pour pouvoir utiliser le logiciel d'acquisition automatique des images au microscope (Logiciel EPU de FEI). Les grilles peuvent être chargées négativement sous vide afin de rendre hydrophile la couche de carbone (Glow Discharge). Ce procédé permet d'obtenir une couche de liquide fine et homogène au moment de la congélation. Cependant cette procédure n'a pas pu être utilisée car le complexe HsTop2 α ADN étoposide se désintègre au moment du dépôt sur des grilles chargées.

Les échantillons ont été congelés selon la procédure habituelle en Cryo-EM. Le point critique dans la congélation est d'obtenir de la glace vitreuse qui permet le passage des électrons sans interférence. Pour obtenir cette glace, le liquide doit être congelé très rapidement sans passer par la phase cristalline de la glace. La grille sur laquelle a été déposé l'échantillon est plongée très rapidement dans de l'éthane liquide (entre -89°C et -183°C) grâce à un plongeur, puis conservée dans de l'azote liquide (entre -120°C et -210°C) jusqu'à observation au microscope. La rapidité de cette procédure est primordiale pour obtenir de la glace vitreuse. La congélation est réalisée avec un Vitrobot (FIE) qui permet d'automatiser l'ensemble de la procédure. 3,5 µl d'échantillon à différentes concentrations est déposé sur une grille maintenue par une pince à l'intérieur d'une enceinte close à 10°C et 95% d'humidité. L'excès d'échantillon est enlevé par l'application de papier filtre pendant 1 seconde (« Blot force » 5 et « Blotting time » 1). Puis la grille contenant l'échantillon est plongée très rapidement dans un contenant rempli d'éthane liquide lui-même plongé dans de l'azote liquide. La grille est ensuite conservée dans l'azote liquide jusqu'au montage dans le microscope et l'acquisition des images. Le transfert des grilles dans le microscope est une étape délicate qui nécessite d'être réalisée avec une faible variation de température pour éviter que la glace vitreuse ne passe en phase cristalline. De plus il faut éviter tout contact

des grilles avec l'air contenant des molécules d'eau qui pourrait se déposer sur la glace et la contaminer.

2. Acquisition des images et reconstruction 3D.

i. L'acquisition des images au polara Tecnai G2

Les acquisitions ont été réalisées en mode « Low-dose », faible exposition, qui permet de limiter l'effet des radiations du faisceau d'électrons sur l'échantillon. Les observations et les enregistrements d'images ont été réalisées à environs $10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$, avec des valeurs de défocalisation allant de $-2 \text{ }\mu\text{m}$ à $-5 \text{ }\mu\text{m}$ par rapport au plan focal et avec une taille de pixel de $1,8 \text{ Å}$ par pixel².

En admettant que l'échantillon soit pur et homogène, les images enregistrées représentent les projections 2D des complexes (particules) en solution qui peuvent être assimilées à un objet unique avec des orientations aléatoires. La projection 2D d'une particule contient l'ensemble des informations contenues dans toute l'épaisseur de spécimen traversé par le faisceau d'électron. Donc la reconstruction 3D est rendue possible en combinant les informations des différentes vues dans l'espace de fourrier. Selon le théorème des sections centrales qui nous dit que les projections 2D d'un objet 3D se croissent dans l'espace réciproque. Un objet 3D peut donc être reconstitué à partir de ces projections 2D si on arrive à les placer correctement les unes par rapport aux autres en déterminant les angles qui les relient (Théorème de lignes communes, reprojexion d'un modèle initial et « projection matching », symétrie de l'objet). La structure 3D est ensuite recalculée dans l'espace réel par une transformée de fourrier inverse.

ii. Reconstruction 3D avec le logiciel EMAN2

Pour la reconstruction 3D nous avons utilisé la méthode de « Projection matching » qui consiste à aligner les particules contre des projections de références. Le logiciel EMAN2 a été utilisé pour l'ensemble des étapes de reconstruction. Ce logiciel permet de réaliser toutes les étapes de la reconstruction : la sélection des particules (e2boxer), la correction de la CTF (e2ctf), la classification, l'alignement des particules et la reconstruction 3D (e2refine2D, e2refine3D). Pour finir, nos particules ne possédant pas de symétrie, nous n'avons pas appliqué de procédure particulière lors de la recherche des angles d'Euler.

- La sélection des particules :

Les particules ont été sélectionnées manuellement avec le logiciel e2boxer d'EMAN2. Chaque particule a été isolée dans un carré de 196x196x196 pixels (« box ») soit plus de 1,5X la taille de la vue la plus grande d'une particule, valeur recommandée pour conserver un bruit de fond qui permette de distinguer correctement le signal de la particule de celui du tampon. Nous n'avons pas utilisé la sélection en semi-automatique car les particules étaient trop hétérogènes pour être sélectionnées de manière optimale par le logiciel.

- La détermination des paramètres de la CTF :

Nous avons utilisé le logiciel e2ctf, implémenté dans EMAN2. Il permet de déterminer les valeurs qui constituent le CTF comme la longueur d'onde du faisceau, la défocalisation, la valeur d'astigmatisme, la valeur de la fonction d'enveloppe pour chaque image. Un facteur de structure déterminé à partir d'image avec un fort ratio signal/bruit a été utilisé pour corriger le contraste d'amplitude. Ces paramètres sont utilisés pour corriger la CTF lors de la classification 2D et le contraste d'amplitude lors de la reconstruction 3D.

- Alignement et classification 2D :

La classification 2D est réalisée sans référence par une analyse statistique multivariée (MSA). Cette classification génère des classes moyennes représentant différentes orientations des particules. Les images des particules qui composent une même classe sont moyennées, ce augmente le signal des particules et diminue le bruit généré par le tampon. Plus une classe est enrichie en particules homogènes possédant une orientation similaire, plus l'image de la moyenne de classe fournira des détails visuels. Finalement cette classification est utilisée pour se faire une première idée des projections ou vues du spécimen avant la reconstruction 3D. Elle permet également de se faire une première idée

MATÉRIELS ET MÉTHODES

de l'homogénéité de l'échantillon ;Elle permet ensuite la construction d'un modèle initial et pour finir elle permet de trier les particules en sélectionnant les meilleures classes pour la reconstruction 3D. Les classifications 2D sans référence ont été réalisées avec le logiciel e2refine2d d'EMAN2.

- Génération des cartes Ab-initio :

Comme mentionné précédemment EMAN2 utilise la méthode de « Projection matching » pour les reconstructions 3D. Ce logiciel se base sur les projections 2D d'un modèle de référence pour trouver les angles relatifs entre les différentes projections 2D des particules. À partir de quelques classes 2D présentant différentes orientations des particules, un modèle initial est reconstruit sans référence grâce à la méthode des lignes communes « Common lines ».

- Reconstruction 3D par la méthode de « Projection matching » :

Le principe de cette technique est de retrouver les angles d'Euler liant les différentes orientations des particules en les comparant à des images de références dont les angles sont déjà connus. Ces images de références sont les projections 2D du modèle initial. Les particules sont assignées aux projections avec lesquels elles ont la plus grande similarité et sont ensuite moyennées. Une fois les angles assignés, les classes moyennées sont projetées en 3D. Ce processus de tri des particules est itératif. La carte de densité reconstruite lors du cycle précédent est reprojétée en 2D et toutes les particules sélectionnées précédemment sont à nouveau triées en fonction de leurs similarités avec les projections de la carte du cycle précédent. De cette manière on obtient une assignation des particules à leurs projections de référence de plus en plus précise. Plus les particules sont assignées de manière précise pour chaque moyenne de classe, plus la densité finale peut atteindre une résolution élevée. Cette boucle d'affinement se termine lorsque les cartes de densité ne changent plus entre deux cycles et lorsque la résolution ne diminue plus.

- Affinement avec plusieurs cartes initiales ou affinement multiple :

Nous avons utilisé le programme e2multirefine qui permet d'affiner du jeu de donnée contre plusieurs cartes initiales. Toutes les cartes initiales ont été filtrées à une résolution de 30Å. Nous avons utilisé la méthode de corrélation croisée (Cross corrélation coefficient) qui permet un alignement rapide mais peu précis pour regrouper les particules en fonction des reprojétions des modèles, avec un angle incrémenté (pas angulaire) de 8° à chaque itération. À la fin de l'affinement multiple, les particules qui ont été assignées à une carte

MATÉRIELS ET MÉTHODES

initiale issue d'une reconstruction 3D robuste (structure cristallographique de ScTop2 ou densité électronique affinée de la Gyrase de *T.thermophilus*) sont isolées et utilisées comme un nouveau jeu de particules pour un affinement simple.

L'affinement multiple pour les deux complexes a été réalisé avec les mêmes paramètres. Une incrémentation angulaire initiale de 8° puis 6°, 4° et 2° lors des cycles suivants. La proportion de particules conservées pour la reconstruction a été ajustée avec les paramètres « class keep » de 80% et le « M3D keep » de 80%. Le comparateur ccc (cross correlation coefficient) a été utilisé tout au long de l'affinement.

- *Affinement simple:*

L'affinement simple pour les deux complexes a été réalisé avec les mêmes paramètres. Une incrémentation angulaire initiale de 8° puis 6°, 4° et 2° lors des cycles suivants. La proportion de particules conservées pour la reconstruction a été ajustée avec les paramètres « class keep » de 80% et le M3D keep de 80%. Le comparateur ccc (cross correlation coefficient) a été utilisé tout au long de l'affinement sauf pour le dernier cycle réalisé avec le frc (fourier ring correlation coefficient).

- *Le placement des structures cristallographiques dans la densité ou « fitting » :*

Les structures cristallographiques ont été chargées à partir du site de la PDB (Protein Data Bank) puis placées dans la densité électronique avec l'aide du logiciel « Fit in map » d'UCSF Chimera.

ANNEXES

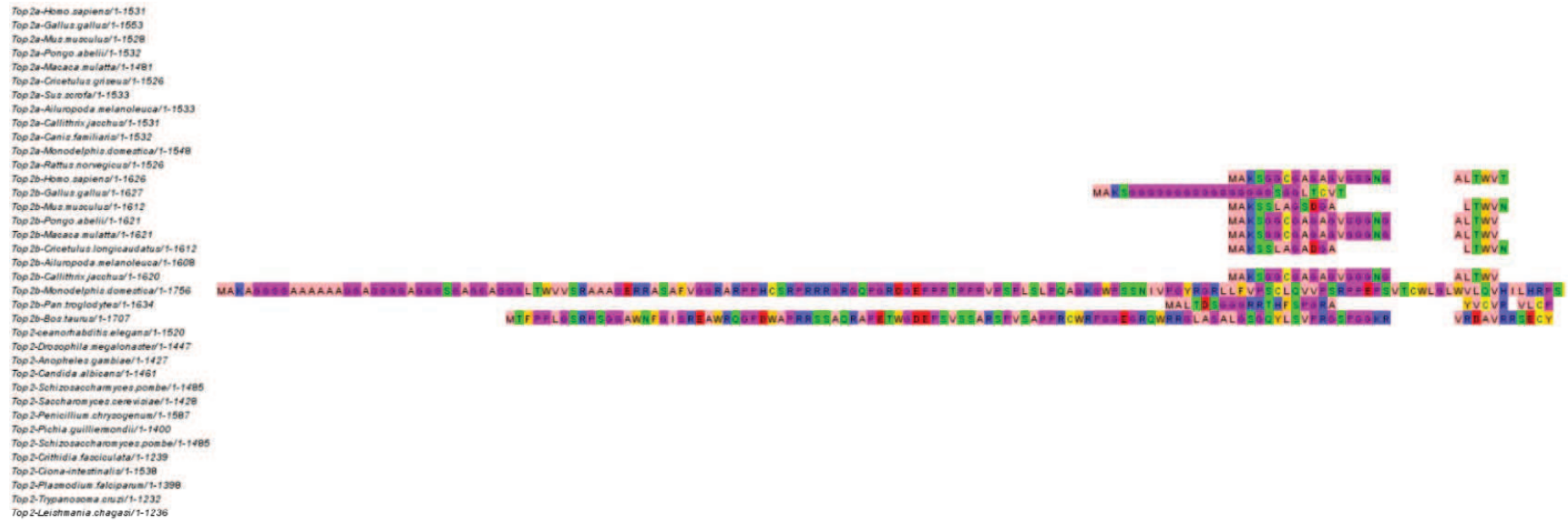
Annexe I : La liste et géotypes des souches de *S.cerevisiae* et *E.coli* utilisées :

<i>E.coli</i>	TOP10 one shot® (Invitrogen)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
	BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>gal</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)
	XLI-Blue (Stratagene)	<i>endA1 gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'</i> :: <i>Tn10 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i>] <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)
<i>S.cerevisiae</i>	Jel1Δ <i>Top1</i>	<i>MAT</i> α <i>leu2 trp1 ura3-52 prb1-122 pep4-3 Δhis3</i> :: <i>PGAL10-GAL4 Top1</i> :: <i>URA3</i> :: <i>ura3</i> Δ
	BCY123	<i>MAT</i> α, <i>Can1, ade2, trp1, Ura3-52, his3, leu2-3, 112, pep4</i> :: <i>his</i> ⁺ , <i>prb1</i> :: <i>leu2</i> ⁺ , <i>bar1</i> :: <i>HisG</i> ⁺ , <i>lys2</i> :: <i>pGAL1/10-GAL4</i> ⁺

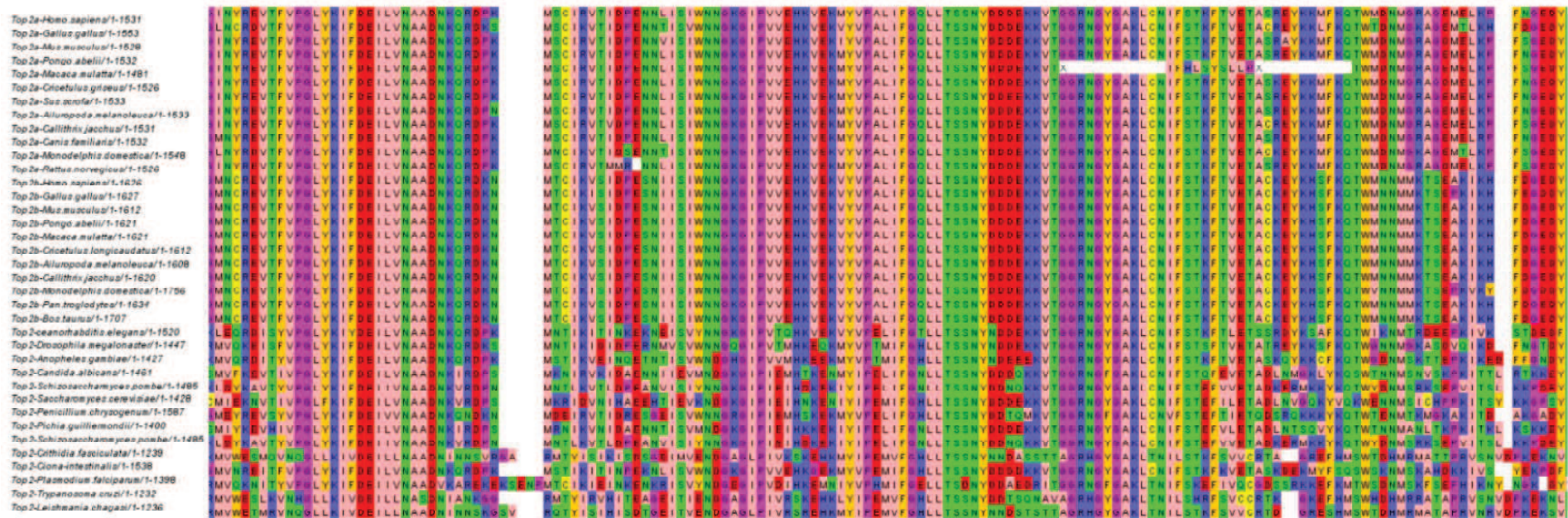
Annexe II : La liste des amorces utilisées :

Plasmide d'origine	Produit finale	Sens	Antisens
Changement de vecteurs des gènes entiers			
pWOB6-HsTop2 α	pYES 2.1 HsTop2 α	ATGTCAACTGAACCGGTATCTG	TTAATGGTGATGGTGATGATG
pTRX-HsTop2 β	pYES 2.1HsTop2 β	ATGTCAACTGAACCGGTAG	CGAGGTCGAGTTAATGGTGATG
Vecteur d'expression dans BHK21			
pYES2.1 HsTop2 α	pVote VV HsTop2 α	CTTTCAGGGACCCCATATGTCAACTGAACCGGTATCTGTTG	GCTGGTCGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGATGGTG
pYES2.1 HsTop2 β	pVote VV HsTop2 β	CTTTCAGGGACCCCATATGTCAACTGAACCGGTATCTGTTG	GCTGGTCGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGATGGTG
Vecteur d'expression du mutant K168A de l'isoforme α			
pYES2.1 HsTop2 α	pYES2.1-K168A	GTAAGTGAATATGTTACACAATGCGGCTCCATAGCCATTTTCGACC	GTCGAAATGGCTATGGAGCCGCATTGTGTAACATATTCAGTAC
Vecteurs d'expression du domaine ATP ase mutant K168A de l'isoforme α			
pYES2.1-K168A	pET-TEV-MBP-6His	TACTTCCAATCCAATGCAGTTGAAAGAATCTATCAAAGAAAAC	TTATCCACTTCCAATGTTATTATGAACACTTCTTGTTAACTGGAC
pET-TEV-MBP-6His	pET-TEV-blunt-MBP-6His	GGAAAACCTGTACTTCCAATCCGTTGAAAGAATCTATCCAAAAGA	TCTTTTGATAGATTCTTCAACGGATTGGAAGTACAGTTTTCC
pYES2.1-K168A	pSKB2-10HIS	CCGCCGAATTCGTTGAAAGAATCTATCAAAGAAAAC	CCGCCGAGCTCTTATTATGAACACTTCTTGTTAACTGGAC

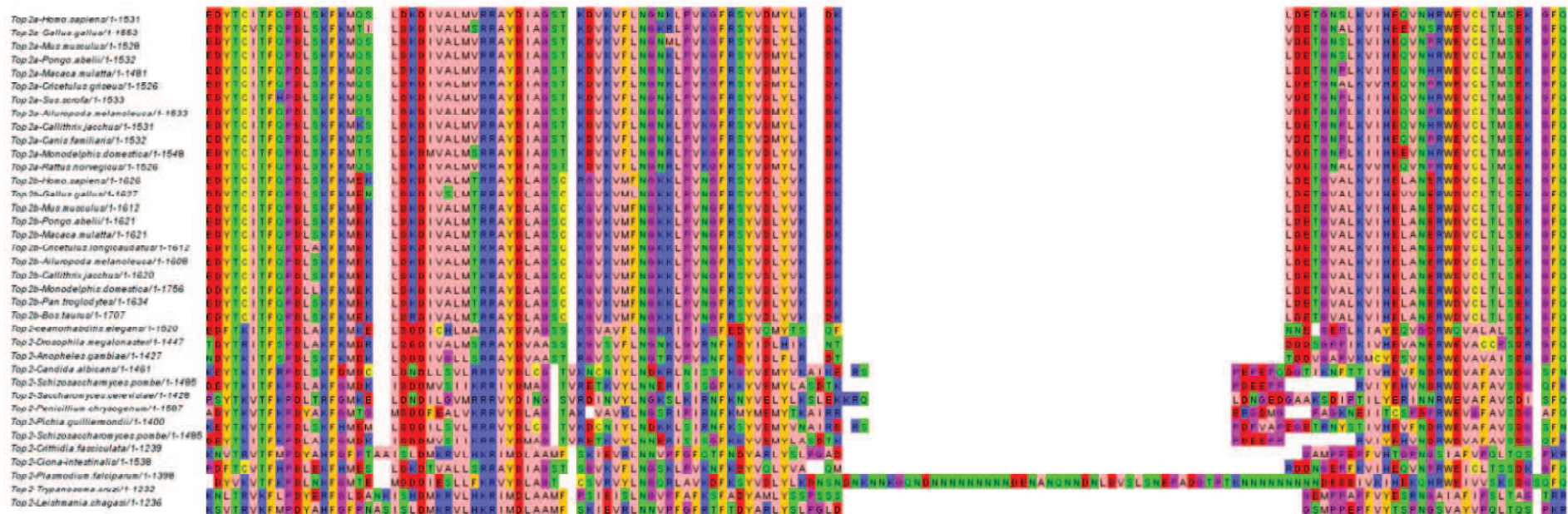
Annexe III : Alignements de séquences multiples des Top2 eucaryotes.



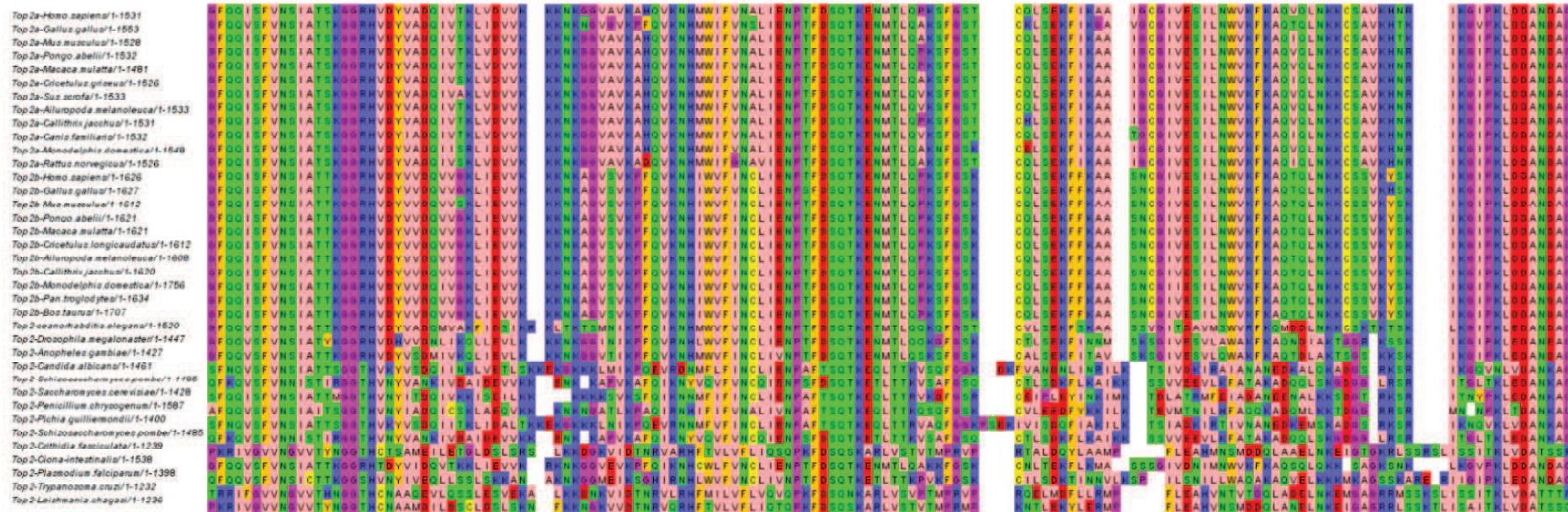
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 0 à 24 de la séquence de HsTop2 β



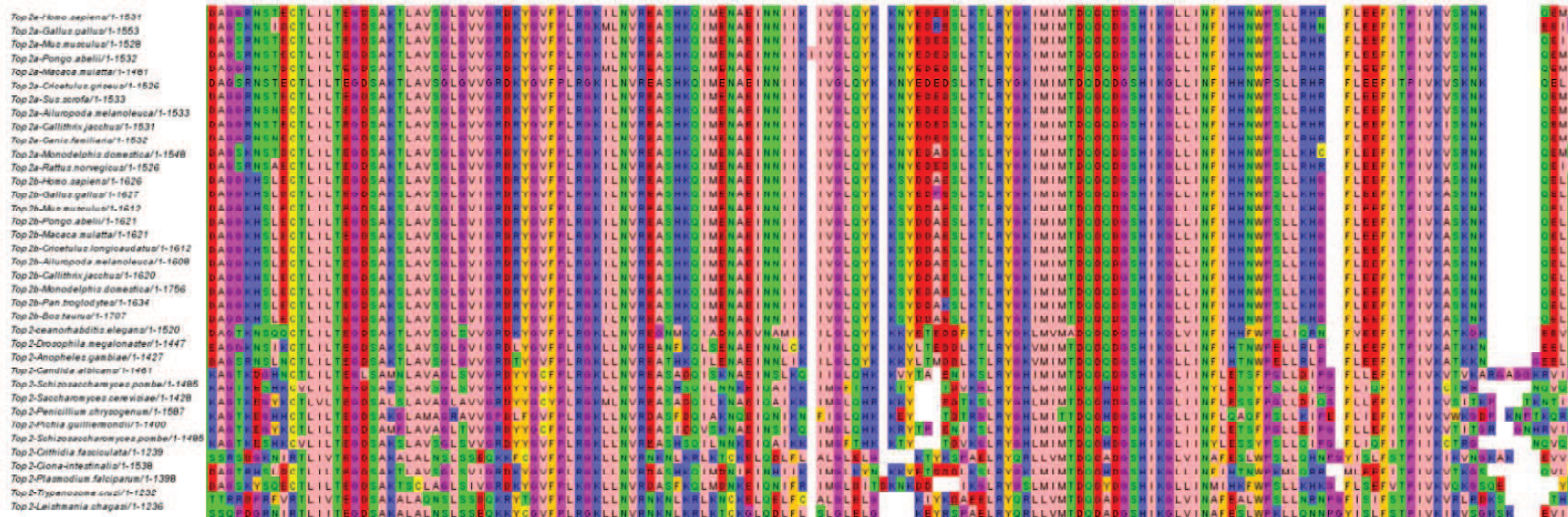
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 72 à 215 de la séquence de HsTop2 α



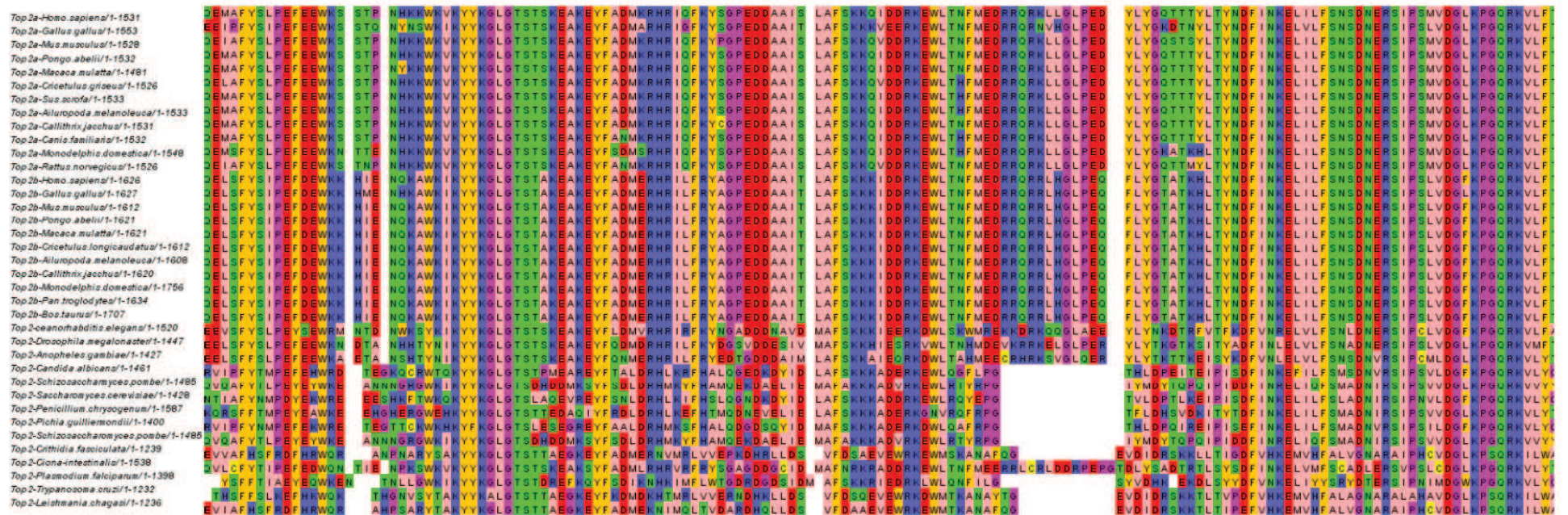
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 215 à 309 de la séquence de HsTop2 α



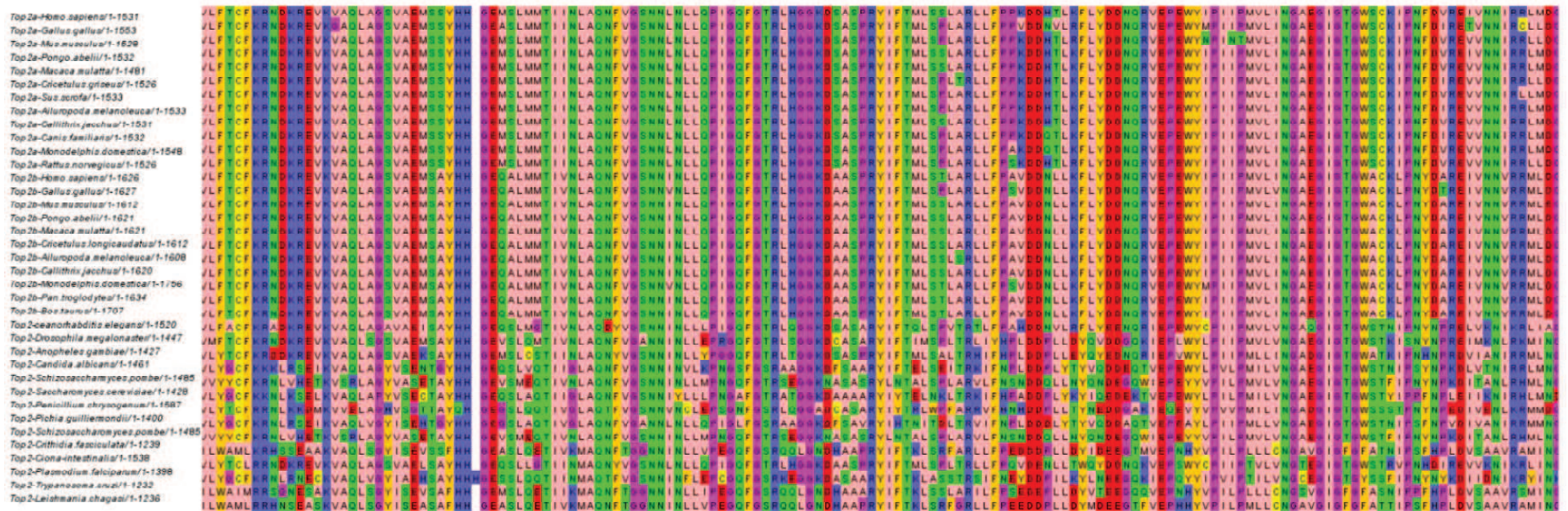
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 309 à 447 de la séquence de HsTop2 α



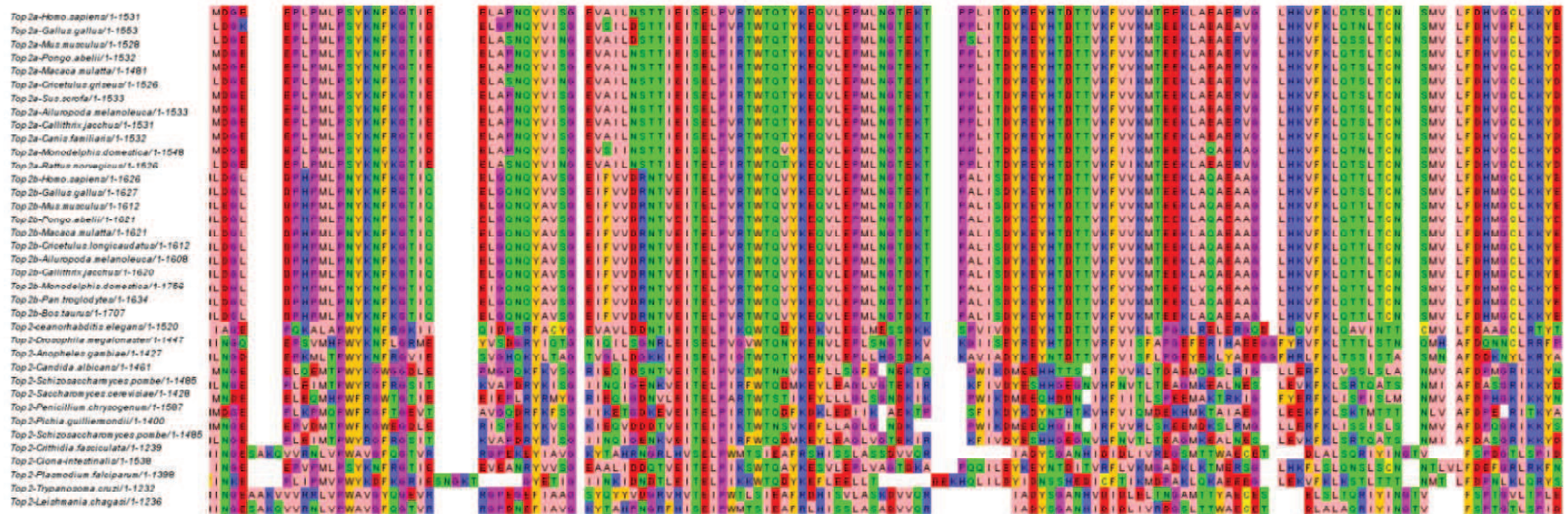
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 447 à 587 de la séquence de HsTop2 α



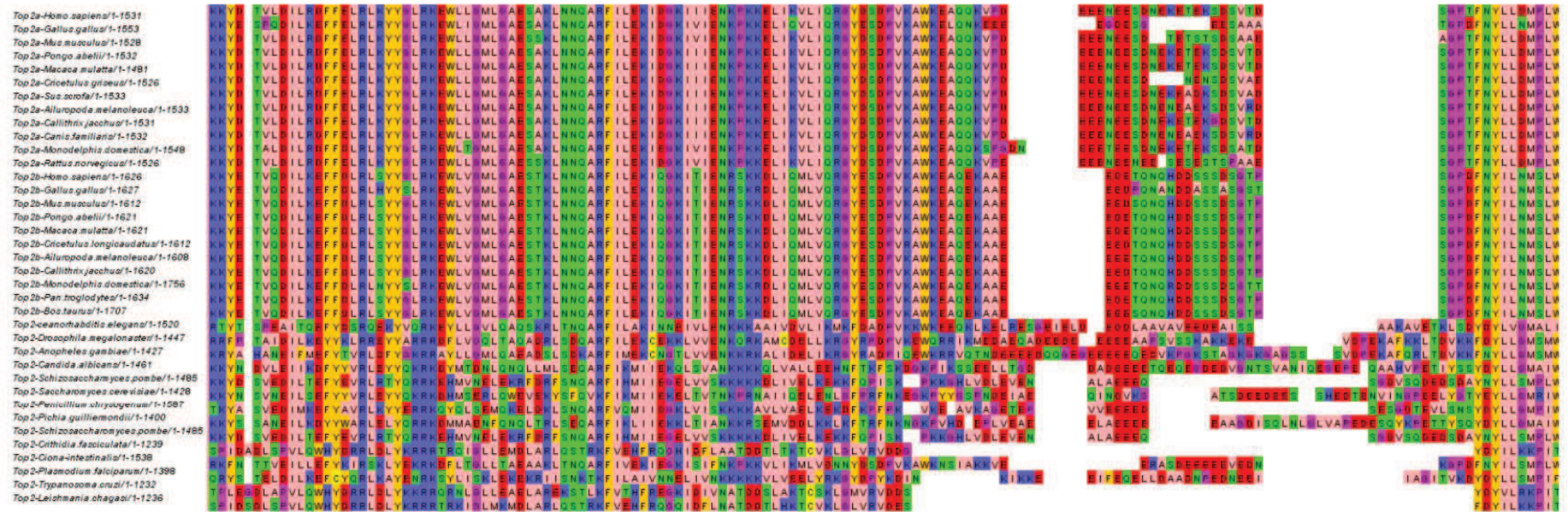
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 587 à 732 de la séquence de HsTop2 α



Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 732 à 881 de la séquence de HsTop2 α

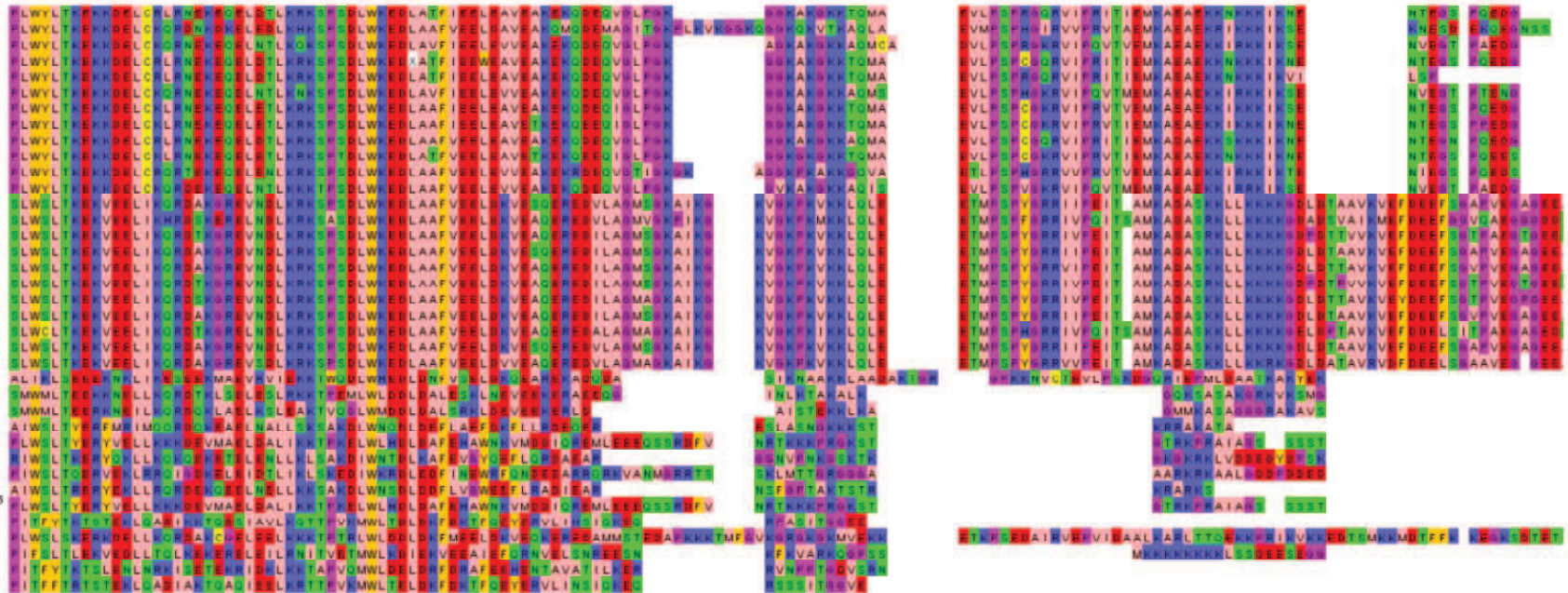


Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 881 à 1013 de la séquence de HsTop2 α

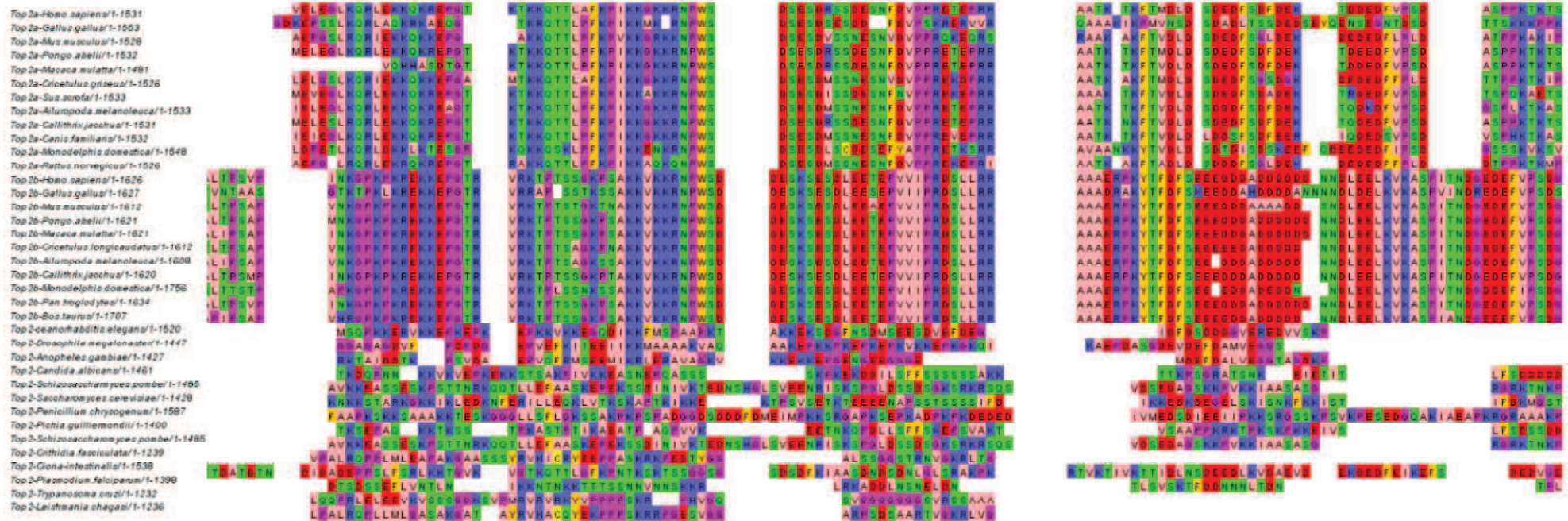


Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 1013 à 1134 de la séquence de HsTop2 α

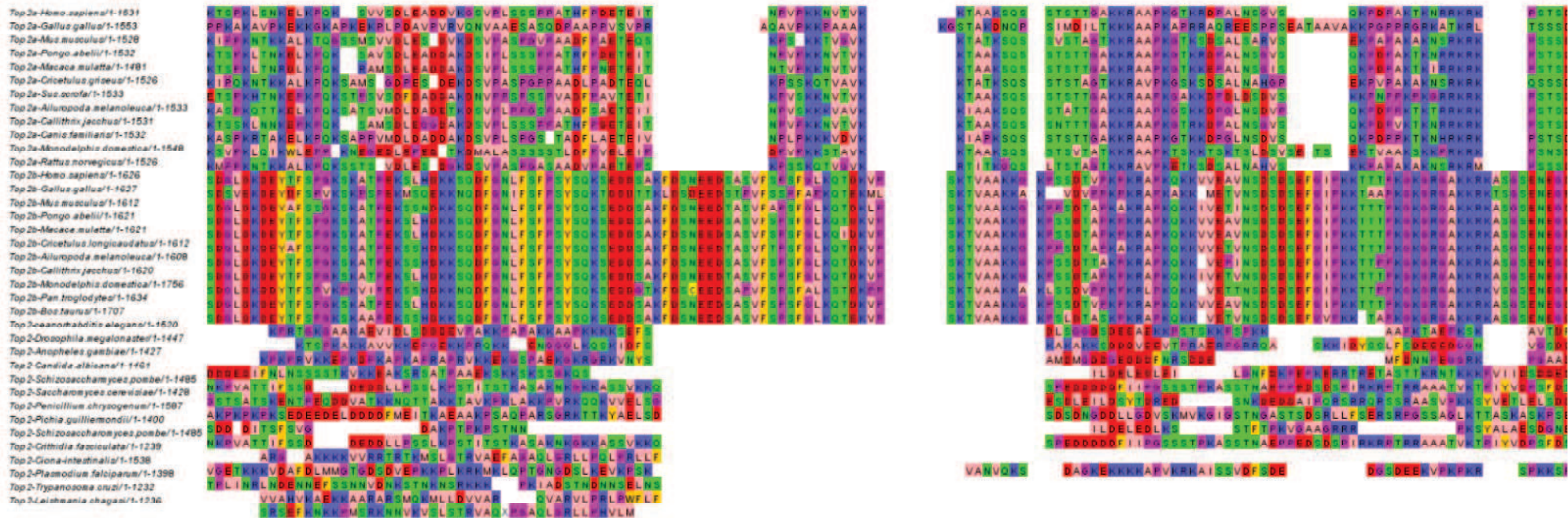
Top 2a-Homo sapiens/1-1531
 Top 2a-Gallus gallus/1-1553
 Top 2a-Mus musculus/1-1526
 Top 2a-Pongo abelii/1-1832
 Top 2a-Macaca mulatta/1-1481
 Top 2a-Cricetus griseus/1-1526
 Top 2a-Sus scrofa/1-1533
 Top 2a-Allutopoda melanoleuca/1-1533
 Top 2a-Gallithis jacchus/1-1531
 Top 2a-Genis familiaris/1-1532
 Top 2a-Monodelphis domestica/1-1548
 Top 2a-Rattus norvegicus/1-1526
 Top 2b-Homo sapiens/1-1626
 Top 2b-Gallus gallus/1-1627
 Top 2b-Mus musculus/1-1612
 Top 2b-Pongo abelii/1-1621
 Top 2b-Macaca mulatta/1-1621
 Top 2b-Cicholus longicaudatus/1-1613
 Top 2b-Allutopoda melanoleuca/1-1608
 Top 2b-Gallithis jacchus/1-1620
 Top 2b-Monodelphis domestica/1-1756
 Top 2b-Pan troglodytes/1-1634
 Top 2b-Bos taurus/1-1707
 Top 2-Oenochobdita elegans/1-1520
 Top 2-Citrospila megalonasteri/1-1447
 Top 2-Anopheles gambiae/1-1427
 Top 2-Candida albicans/1-1461
 Top 2-Schizosaccharomyces pombe/1-1485
 Top 2-Saccharomyces cerevisiae/1-1426
 Top 2-Penicillium chrysogenum/1-1067
 Top 2-Pichia guilliermondii/1-1400
 Top 2-Schizosaccharomyces pombe/1-1485
 Top 2-Citridia fasciculata/1-1239
 Top 2-Gonia-intestinalis/1-1538
 Top 2-Plasmodium falciparum/1-1398
 Top 2-Typanosoma cruzi/1-1232
 Top 2-Leishmania chagasi/1-1236



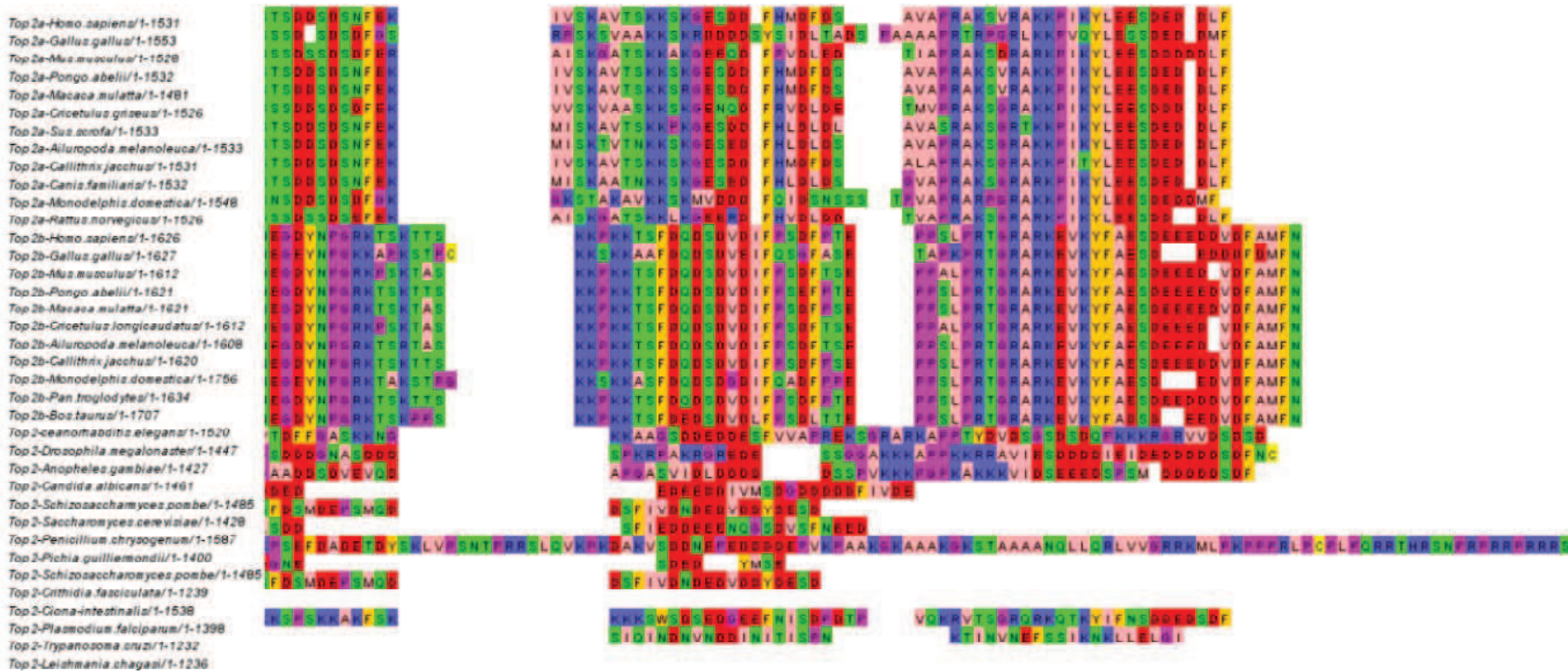
Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 1134 à 1252 de la séquence de HsTop2 α



Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 1252 à 1362 de la séquence de HsTop2 α



Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 1362 à 1472 de la séquence de HsTop2 α



Alignement de séquences peptidiques de Top2 eucaryote et d'isoforme α et β Rose : résidus aliphatiques/Hydrophobes. Orange : résidus aromatiques. Bleu : résidus chargés positivement. Rouge : résidus chargés négativement. Vert : résidus hydrophiles. Violet : Prolines et glycines. Jaune : Cystéines. Bloc de séquences correspondant aux positions 1472 à 1531 de la séquence de HsTop2 α

BIBLIOGRAPHIE

Ackerman, P., Glover, C.V., and Osheroff, N. (1985). Phosphorylation of DNA topoisomerase II by casein kinase II: modulation of eukaryotic topoisomerase II activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3164-3168.

Adamcik, J., Valle, F., Witz, G., Rechendorff, K., and Dietler, G. (2008). The promotion of secondary structures in single-stranded DNA by drugs that bind to duplex DNA: an atomic force microscopy study. *Nanotechnology* 19, 384016.

Ahn, B.H., Kim, T.H., and Bae, Y.S. (2001). Mapping of the interaction domain of the protein kinase CKII beta subunit with target proteins. *Mol Cells* 12, 158-163.

Alexander, W.A., Moss, B., and Fuerst, T.R. (1992). Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the Escherichia coli lac repressor. *J Virol* 66, 2934-2942.

Alonso-Sarduy, L., Longo, G., Dietler, G., and Kasas, S. Time-lapse AFM imaging of DNA conformational changes induced by daunorubicin. *Nano Lett* 13, 5679-5684.

Andersen, K.R., Leksa, N.C., and Schwartz, T.U. Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins* 81, 1857-1861.

Andoh, T., and Ishida, R. (1998). Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400, 155-171.

Aoyama, M., Grabowski, D.R., Dubyak, G.R., Constantinou, A.I., Rybicki, L.A., Bukowski, R.M., Ganapathi, M.K., Hickson, I.D., and Ganapathi, R. (1998). Attenuation of drug-stimulated topoisomerase II-DNA cleavable complex formation in wild-type HL-60 cells treated with an intracellular calcium buffer is correlated with decreased cytotoxicity and site-specific hypophosphorylation of topoisomerase IIalpha. *Biochem J* 336 (Pt 3), 727-733.

Aslanidis, C., and de Jong, P.J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18, 6069-6074.

Austin, C.A., and Fisher, L.M. (1990). Isolation and characterization of a human cDNA clone encoding a novel DNA topoisomerase II homologue from HeLa cells. *FEBS Lett* 266, 115-117.

Austin, C.A., and Marsh, K.L. (1998). Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* 20, 215-226.

Austin, C.A., Marsh, K.L., Wasserman, R.A., Willmore, E., Sayer, P.J., Wang, J.C., and Fisher, L.M. (1995). Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II beta. *J Biol Chem* 270, 15739-15746.

Ayene, I.S., Ford, L.P., and Koch, C.J. (2005). Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and gamma radiation. *Mol Cancer Ther* 4, 529-536.

Azarova, A.M., Lyu, Y.L., Lin, C.P., Tsai, Y.C., Lau, J.Y., Wang, J.C., and Liu, L.F. (2007). Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11014-11019.

Azuma, Y., Arnautov, A., Anan, T., and Dasso, M. (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J* 24, 2172-2182.

Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., and Elledge, S.J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* 9, 1169-1182.

Bailly, C. Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. *Chem Rev* 112, 3611-3640.

Baird, C.L., Gordon, M.S., Andrenyak, D.M., Marecek, J.F., and Lindsley, J.E. (2001). The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II. Slow rates of ATP resynthesis and P(i) release. *J Biol Chem* 276, 27893-27898.

Baird, C.L., Harkins, T.T., Morris, S.K., and Lindsley, J.E. (1999). Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13685-13690.

Baker, N.M., Weigand, S., Maar-Mathias, S., and Mondragon, A. Solution structures of DNA-bound gyrase. *Nucleic Acids Res* 39, 755-766.

Baldi, M.I., Benedetti, P., Mattoccia, E., and Tocchini-Valentini, G.P. (1980). In vitro catenation and decatenation of DNA and a novel eucaryotic ATP-dependent topoisomerase. *Cell* 20, 461-467.

Barglow, K.T., and Cravatt, B.F. (2007). Activity-based protein profiling for the functional annotation of enzymes. *Nat Methods* 4, 822-827.

Barthelmes, H.U., Grue, P., Feineis, S., Straub, T., and Boege, F. (2000). Active DNA topoisomerase IIalpha is a component of the salt-stable centrosome core. *J Biol Chem* 275, 38823-38830.

Bauman, M.E., Holden, J.A., Brown, K.A., Harker, W.G., and Perkins, S.L. (1997). Differential immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II alpha and beta in human tissues and for DNA topoisomerase II beta in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 10, 168-175.

Baxter, J., and Diffley, J.F. (2008). Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Mol Cell* 30, 790-802.

Benarroch, D., Claverie, J.M., Raoult, D., and Shuman, S. (2006). Characterization of mimivirus DNA topoisomerase IB suggests horizontal gene transfer between eukaryal viruses and bacteria. *J Virol* 80, 314-321.

Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379, 225-232.

Bergman, L.W. (2001). Growth and maintenance of yeast. *Methods Mol Biol* 177, 9-14.

Bermejo, R., Doksani, Y., Capra, T., Katou, Y.M., Tanaka, H., Shirahige, K., and Foiani, M. (2007). Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev* 21, 1921-1936.

Bhat, M.A., Philp, A.V., Glover, D.M., and Bellen, H.J. (1996). Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* 87, 1103-1114.

Bjergbaek, L., Jensen, S., Westergaard, O., and Andersen, A.H. (1999). Using a biochemical approach to identify the primary dimerization regions in human DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* 274, 26529-26536.

Bladen, C.L., Udayakumar, D., Takeda, Y., and Dynan, W.S. (2005). Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor. *J Biol Chem* 280, 5205-5210.

Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., and Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326, 414-416.

Britton, S., Coates, J., and Jackson, S.P. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol* 202, 579-595.

Bromberg, K.D., Burgin, A.B., and Osheroff, N. (2003). A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* 278, 7406-7412.

Budin, G., Moune-Dimala, M., Leriche, G., Saliou, J.M., Papillon, J., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaer, A., Lamour, V., Brino, L., and Wagner, A. (2010). Nondenaturing chemical proteomics for protein complex isolation and identification. *Chembiochem* 11, 2359-2361.

Burden, D.A., and Sullivan, D.M. (1994). Phosphorylation of the alpha- and beta-isoforms of DNA topoisomerase II is qualitatively different in interphase and mitosis in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 33, 14651-14655.

Caldecott, K., Banks, G., and Jeggo, P. (1990). DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res* 50, 5778-5783.

Campbell, S., and Maxwell, A. (2002). The ATP-operated clamp of human DNA topoisomerase IIalpha: hyperstimulation of ATPase by "piggy-back" binding. *J Mol Biol* 320, 171-188.

Capranico, G., and Binaschi, M. (1998). DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta* 1400, 185-194.

Capranico, G., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1990). Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acids Res* 18, 6611-6619.

Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C.A., Fisher, M.L., and Zunino, F. (1992). Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta* 1132, 43-48.

Cardenas, M.E., Dang, Q., Glover, C.V., and Gasser, S.M. (1992). Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J* 11, 1785-1796.

Cardenas, M.E., and Gasser, S.M. (1993). Regulation of topoisomerase II by phosphorylation: a role for casein kinase II. *J Cell Sci* 104 (Pt 2), 219-225.

Carpenter, A.J., and Porter, A.C. (2004). Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell* 15, 5700-5711.

Carroll, M.W., and Moss, B. (1997). Poxviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8, 573-577.

Chee, G.L., Yalowich, J.C., Bodner, A., Wu, X., and Hasinoff, B.B. A diazirine-based photoaffinity etoposide probe for labeling topoisomerase II. *Bioorg Med Chem* 18, 830-838.

Chikamori, K., Grabowski, D.R., Kinter, M., Willard, B.B., Yadav, S., Aebbersold, R.H., Bukowski, R.M., Hickson, I.D., Andersen, A.H., Ganapathi, R., *et al.* (2003). Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem* 278, 12696-12702.

Christensen, M.O., Larsen, M.K., Barthelmes, H.U., Hock, R., Andersen, C.L., Kjeldsen, E., Knudsen, B.R., Westergaard, O., Boege, F., and Mielke, C. (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* 157, 31-44.

Chung, T.D., Drake, F.H., Tan, K.B., Per, S.R., Crooke, S.T., and Mirabelli, C.K. (1989). Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 9431-9435.

Classen, S., Olland, S., and Berger, J.M. (2003). Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10629-10634.

Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., Carmo, A.M., Moutinho-Pereira, S., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2008). Dual role of topoisomerase II in centromere resolution and aurora B activity. *PLoS Biol* *6*, e207.

Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., and Sunkel, C.E. (2003). Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J Cell Sci* *116*, 4763-4776.

Constantinou, A., Henning-Chubb, C., and Huberman, E. (1989). Novobiocin- and phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation of human leukemia cells associated with a reduction in topoisomerase II activity. *Cancer Res* *49*, 1110-1117.

Corbett, A.H., DeVore, R.F., and Osheroff, N. (1992). Effect of casein kinase II-mediated phosphorylation on the catalytic cycle of topoisomerase II. Regulation of enzyme activity by enhancement of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* *267*, 20513-20518.

Corbett, K.D., Schoeffler, A.J., Thomsen, N.D., and Berger, J.M. (2005). The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol* *351*, 545-561.

Corbett, K.D., Shultzaberger, R.K., and Berger, J.M. (2004). The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 7293-7298.

Cortes Ledesma, F., El Khamisy, S.F., Zuma, M.C., Osborn, K., and Caldecott, K.W. (2009). A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* *461*, 674-678.

Costenaro, L., Grossmann, J.G., Ebel, C., and Maxwell, A. (2005). Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of the full-length DNA gyrase a subunit. *Structure* *13*, 287-296.

Costenaro, L., Grossmann, J.G., Ebel, C., and Maxwell, A. (2007). Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure* *15*, 329-339.

Cowell, I.G., Okorokov, A.L., Cutts, S.A., Padget, K., Bell, M., Milner, J., and Austin, C.A. (2000). Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res* *255*, 86-94.

Creighton, A.M., Hellmann, K., and Whitecross, S. (1969). Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature* *222*, 384-385.

Critchlow, S.E., Bowater, R.P., and Jackson, S.P. (1997). Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* *7*, 588-598.

Cuvier, O., Stanojic, S., Lemaitre, J.M., and Mechali, M. (2008). A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition. *Genes Dev* *22*, 860-865.

Dang, Q., Alghisi, G.C., and Gasser, S.M. (1994). Phosphorylation of the C-terminal domain of yeast topoisomerase II by casein kinase II affects DNA-protein interaction. *J Mol Biol* *243*, 10-24.

Dawlaty, M.M., Malureanu, L., Jeganathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., and van Deursen, J.M. (2008). Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* *133*, 103-115.

Dereuddre, S., Delaporte, C., and Jacquemin-Sablon, A. (1997). Role of topoisomerase II beta in the resistance of 9-OH-ellipticine-resistant Chinese hamster fibroblasts to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* *57*, 4301-4308.

DeVore, R.F., Corbett, A.H., and Osheroff, N. (1992). Phosphorylation of topoisomerase II by casein kinase II and protein kinase C: effects on enzyme-mediated DNA cleavage/religation and sensitivity to the antineoplastic drugs etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methane-sulfon-m-anisidide. *Cancer Res* *52*, 2156-2161.

Deweese, J.E., Osheroff, M.A., and Osheroff, N. (2008). DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject. *Biochem Mol Biol Educ* *37*, 2-10.

Deweese, J.E., and Osheroff, N. (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* *37*, 738-748.

Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Azuma, Y., Guacci, V., Gimenez-Martin, G., Lanier, L.M., and Clarke, D.J. (2006). PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS One* *1*, e53.

Domon, B., and Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* *312*, 212-217.

Dong, K.C., and Berger, J.M. (2007). Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature* *450*, 1201-1205.

Duca, M., Guianvarc'h, D., Meresse, P., Bertounesque, E., Dauzonne, D., Kraus-Berthier, L., Thirot, S., Leonce, S., Pierre, A., Pfeiffer, B., *et al.* (2005). Synthesis and biological study of a new series of 4'-demethylepipodophyllotoxin derivatives. *J Med Chem* 48, 593-603.

Durban, E., Mills, J.S., Roll, D., and Busch, H. (1983). Phosphorylation of purified Novikoff hepatoma topoisomerase I. *Biochem Biophys Res Commun* 111, 897-905.

Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25, 24-28.

Elguero, M.E., de Campos-Nebel, M., and Gonzalez-Cid, M. DNA-PKcs-dependent NHEJ pathway supports the progression of topoisomerase II poison-induced chromosome aberrant cells. *Environ Mol Mutagen* 53, 608-618.

Escargueil, A.E., Plisov, S.Y., Filhol, O., Cochet, C., and Larsen, A.K. (2000). Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphopeptide on Ser-1469. *J Biol Chem* 275, 34710-34718.

Fass, D., Bogden, C.E., and Berger, J.M. (1999). Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat Struct Biol* 6, 322-326.

Felix, C.A., Kolaris, C.P., and Osheroff, N. (2006). Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5, 1093-1108.

Fell, V.L., and Schild-Poulter, C. (2015). The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res* 763, 15-29.

Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T. (1977a). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.

Fogh, J., Wright, W.C., and Loveless, J.D. (1977b). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.

Fortune, J.M., and Osheroff, N. (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64, 221-253.

Gadelle, D., Filee, J., Buhler, C., and Forterre, P. (2003). Phylogenomics of type II DNA topoisomerases. *Bioessays* 25, 232-242.

Ganapathi, R., Constantinou, A., Kamath, N., Dubyak, G., Grabowski, D., and Krivacic, K. (1996). Resistance to etoposide in human leukemia HL-60 cells: reduction in drug-induced DNA cleavage associated with hypophosphorylation of topoisomerase II phosphopeptides. *Mol Pharmacol* 50, 243-248.

Gartenberg, M.R., and Wang, J.C. (1992). Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11461-11465.

Giaever, G.N., Snyder, L., and Wang, J.C. (1988). DNA supercoiling in vivo. *Biophys Chem* 29, 7-15.

Goto, T., and Wang, J.C. (1984). Yeast DNA topoisomerase II is encoded by a single-copy, essential gene. *Cell* 36, 1073-1080.

Goto, T., and Wang, J.C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7178-7182.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495.

Grozav, A.G., Chikamori, K., Kozuki, T., Grabowski, D.R., Bukowski, R.M., Willard, B., Kinter, M., Andersen, A.H., Ganapathi, R., and Ganapathi, M.K. (2009). Casein kinase I delta/epsilon phosphorylates topoisomerase IIalpha at serine-1106 and modulates DNA cleavage activity. *Nucleic Acids Res* 37, 382-392.

Grue, P., Grasser, A., Sehested, M., Jensen, P.B., Uhse, A., Straub, T., Ness, W., and Boege, F. (1998). Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *J Biol Chem* 273, 33660-33666.

Grundy, G.J., Moulding, H.A., Caldecott, K.W., and Rulten, S.L. One ring to bring them all--the role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 17, 30-38.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17, 994-999.

Halligan, B.D., Edwards, K.A., and Liu, L.F. (1985). Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus. *J Biol Chem* 260, 2475-2482.

Hammonds, T.R., and Maxwell, A. (1997). The DNA dependence of the ATPase activity of human DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* 272, 32696-32703.

Hande, K.R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 34, 1514-1521.

Hande, K.R. (2003). Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 21, 103-125.

Harkins, T.T., Lewis, T.J., and Lindsley, J.E. (1998). Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry* 37, 7299-7312.

Harkins, T.T., and Lindsley, J.E. (1998). Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 1. A DNA-dependent burst in ATP hydrolysis. *Biochemistry* 37, 7292-7298.

Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.

Hasinoff, B.B., Chee, G.L., Day, B.W., Avor, K.S., Barnabe, N., Thampatty, P., and Yalowich, J.C. (2001). Synthesis and biological activity of a photoaffinity etoposide probe. *Bioorg Med Chem* 9, 1765-1771.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.

Hebben, M., Brants, J., Birck, C., Samama, J.P., Wasylyk, B., Spohner, D., Pradeau, K., Domi, A., Moss, B., Schultz, P., *et al.* (2007). High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expr Purif* 56, 269-278.

Heck, M.M., and Earnshaw, W.C. (1986). Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 103, 2569-2581.

Heck, M.M., Hittelman, W.N., and Earnshaw, W.C. (1989). In vivo phosphorylation of the 170-kDa form of eukaryotic DNA topoisomerase II. Cell cycle analysis. *J Biol Chem* 264, 15161-15164.

Hellmann, K., Newton, K.A., Whitmore, D.N., Hanham, I.W., and Bond, J.V. (1969). Preliminary clinical assessment of I.C.R.F. 159 in acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J* 1, 822-824.

Herman, E.H., Witiak, D.T., Hellmann, K., and Waravdekar, V.S. (1982). Biological properties of ICRF-159 and related bis(dioxopiperazine) compounds. *Adv Pharmacol Chemother* 19, 249-290.

Holden, J.A., Rolfson, D.H., and Wittwer, C.T. (1992). The distribution of immunoreactive topoisomerase II Protein in human tissues and neoplasms. *Oncol Res* 4, 157-166.

Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., and Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.

Holmes, V.F., and Cozzarelli, N.R. (2000). Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1322-1324.

Hsiang, Y.H., Wu, H.Y., and Liu, L.F. (1988). Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res* 48, 3230-3235.

Hsieh, T., and Brutlag, D. (1980). ATP-dependent DNA topoisomerase from *D. melanogaster* reversibly catenates duplex DNA rings. *Cell* 21, 115-125.

Hsieh, T.J., Farh, L., Huang, W.M., and Chan, N.L. (2004). Structure of the topoisomerase IV C-terminal domain: a broken beta-propeller implies a role as geometry facilitator in catalysis. *J Biol Chem* 279, 55587-55593.

Huang, S.I. (1978). Oxidation of Long-chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl Sulfoxide "Activated" by Oxalyl Chloride. *J Org Chem* 43, 3.

Iida, M., Matsuda, M., and Komatani, H. (2008). Plk3 phosphorylates topoisomerase IIalpha at Thr(1342), a site that is not recognized by Plk1. *Biochem J* 411, 27-32.

Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K., and Raz, A. (1996). Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res* 56, 4530-4534.

Isaacs, R.J., Davies, S.L., Sandri, M.I., Redwood, C., Wells, N.J., and Hickson, I.D. (1998). Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400, 121-137.

Ishida, R., Iwai, M., Marsh, K.L., Austin, C.A., Yano, T., Shibata, M., Nozaki, N., and Hara, A. (1996). Threonine 1342 in human topoisomerase IIalpha is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem* 271, 30077-30082.

Ishida, R., Miki, T., Narita, T., Yui, R., Sato, M., Utsumi, K.R., Tanabe, K., and Andoh, T. (1991). Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavable complex-forming type inhibitors. *Cancer Res* 51, 4909-4916.

Ishida, R., Takashima, R., Koujin, T., Shibata, M., Nozaki, N., Seto, M., Mori, H., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2001). Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase IIalpha. *Cell Struct Funct* 26, 215-226.

Jansen, B., Uckun, F.M., Jaszcz, W.B., and Kersey, J.H. (1992). Establishment of a human t(4;11) leukemia in severe combined immunodeficient mice and successful treatment using anti-CD19 (B43)-pokeweed antiviral protein immunotoxin. *Cancer Res* 52, 406-412.

Jeggo, P.A., Caldecott, K., Pidsley, S., and Banks, G.R. (1989). Sensitivity of Chinese hamster ovary mutants defective in DNA double strand break repair to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 49, 7057-7063.

Johnson, L.N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 37, 627-641.

Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312, 1798-1802.

Ju, B.G., and Rosenfeld, M.G. (2006). A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle* 5, 2557-2560.

Juenke, J.M., and Holden, J.A. (1993). The distribution of DNA topoisomerase II isoforms in differentiated adult mouse tissues. *Biochim Biophys Acta* 1216, 191-196.

Kapust, R.B., and Waugh, D.S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8, 1668-1674.

Katzen, F. (2007). Gateway((R)) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov* 2, 571-589.

Kim, R.A., and Wang, J.C. (1989). Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 208, 257-267.

Kimura, K., Nozaki, N., Saijo, M., Kikuchi, A., Ui, M., and Enomoto, T. (1994). Identification of the nature of modification that causes the shift of DNA topoisomerase II beta to apparent higher molecular weight forms in the M phase. *J Biol Chem* 269, 24523-24526.

Kingma, P.S., Burden, D.A., and Osheroff, N. (1999). Binding of etoposide to topoisomerase II in the absence of DNA: decreased affinity as a mechanism of drug resistance. *Biochemistry* 38, 3457-3461.

Kirchhausen, T., Wang, J.C., and Harrison, S.C. (1985). DNA gyrase and its complexes with DNA: direct observation by electron microscopy. *Cell* 41, 933-943.

Knab, A.M., Fertala, J., and Bjornsti, M.A. (1993). Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J Biol Chem* 268, 22322-22330.

Krogh, B.O., and Shuman, S. (2002). A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1853-1858.

Kurz, E.U., Leader, K.B., Kroll, D.J., Clark, M., and Gieseler, F. (2000). Modulation of human DNA topoisomerase IIalpha function by interaction with 14-3-3epsilon. *J Biol Chem* 275, 13948-13954.

Laponogov, I., Veselkov, D.A., Crevel, I.M., Pan, X.S., Fisher, L.M., and Sanderson, M.R. Structure of an 'open' clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport. *Nucleic Acids Res* 41, 9911-9923.

Lee, C.G., Hague, L.K., Li, H., and Donnelly, R. (2004). Identification of toposome, a novel multisubunit complex containing topoisomerase IIalpha. *Cell Cycle* 3, 638-647.

Lee, M.P., Sander, M., and Hsieh, T. (1989). Nuclease protection by *Drosophila* DNA topoisomerase II. Enzyme/DNA contacts at the strong topoisomerase II cleavage sites. *J Biol Chem* 264, 21779-21787.

Leroy, D., Kajava, A.V., Frei, C., and Gasser, S.M. (2001). Analysis of etoposide binding to subdomains of human DNA topoisomerase II alpha in the absence of DNA. *Biochemistry* 40, 1624-1634.

Li, H., Wang, Y., and Liu, X. (2008). Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase IIalpha in cell cycle progression. *J Biol Chem* 283, 6209-6221.

Lieutaud, P., Canard, B., and Longhi, S. (2008). MeDor: a metaserver for predicting protein disorder. *BMC Genomics* 9 Suppl 2, S25.

Lindsley, J.E., and Wang, J.C. (1991). Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10485-10489.

Lindsley, J.E., and Wang, J.C. (1993). On the coupling between ATP usage and DNA transport by yeast DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 268, 8096-8104.

Linka, R.M., Porter, A.C., Volkov, A., Mielke, C., Boege, F., and Christensen, M.O. (2007). C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res* 35, 3810-3822.

Liu, L.F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58, 351-375.

Liu, L.F., Liu, C.C., and Alberts, B.M. (1979). T4 DNA topoisomerase: a new ATP-dependent enzyme essential for initiation of T4 bacteriophage DNA replication. *Nature* 281, 456-461.

Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7024-7027.

Lottspeich, F. (1999). Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 38, 2476-2492.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., and Chen, J. (2005). BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 589-593.

Lovett, B.D., Strumberg, D., Blair, I.A., Pang, S., Burden, D.A., Megonigal, M.D., Rappaport, E.F., Rebbeck, T.R., Osheroff, N., Pommier, Y.G., *et al.* (2001). Etoposide metabolites enhance DNA topoisomerase II cleavage near leukemia-associated MLL translocation breakpoints. *Biochemistry* 40, 1159-1170.

Low, R.L., Orton, S., and Friedman, D.B. (2003). A truncated form of DNA topoisomerase IIbeta associates with the mtDNA genome in mammalian mitochondria. *Eur J Biochem* 270, 4173-4186.

Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. (2001). Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J* 20, 6509-6519.

Luo, K., Yuan, J., Chen, J., and Lou, Z. (2009). Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* 11, 204-210.

Lyu, Y.L., Lin, C.P., Azarova, A.M., Cai, L., Wang, J.C., and Liu, L.F. (2006). Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol* 26, 7929-7941.

Lyu, Y.L., and Wang, J.C. (2003). Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7123-7128.

Mann, M., Hendrickson, R.C., and Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70, 437-473.

Mao, Y., Desai, S.D., and Liu, L.F. (2000). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275, 26066-26073.

Mao, Y., Desai, S.D., Ting, C.Y., Hwang, J., and Liu, L.F. (2001). 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* 276, 40652-40658.

Mariani, A., Bartoli, A., Atwal, M., Lee, K.C., Austin, C.A., and Rodriguez, R. Differential Targeting of Human Topoisomerase II Isoforms with Small Molecules. *J Med Chem* 58, 4851-4856.

Masson, ed. (2001). *Chimiothérapie anticancéreuse*.

McClendon, A.K., Dickey, J.S., and Osheroff, N. (2006). Ability of viral topoisomerase II to discern the handedness of supercoiled DNA: bimodal recognition of DNA geometry by type II enzymes. *Biochemistry* 45, 11674-11680.

McClendon, A.K., and Osheroff, N. (2006). The geometry of DNA supercoils modulates topoisomerase-mediated DNA cleavage and enzyme response to anticancer drugs. *Biochemistry* 45, 3040-3050.

McClendon, A.K., and Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 623, 83-97.

McClendon, A.K., Rodriguez, A.C., and Osheroff, N. (2005). Human topoisomerase IIalpha rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. *J Biol Chem* 280, 39337-39345.

McNamara, S., Wang, H., Hanna, N., and Miller, W.H., Jr. (2008). Topoisomerase IIbeta negatively modulates retinoic acid receptor alpha function: a novel mechanism of retinoic acid resistance. *Mol Cell Biol* 28, 2066-2077.

Miller, K.G., Liu, L.F., and Englund, P.T. (1981). A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 256, 9334-9339.

Mimori, T., and Hardin, J.A. (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 261, 10375-10379.

Mirski, S.E., Bielawski, J.C., and Cole, S.P. (2003). Identification of functional nuclear export sequences in human topoisomerase IIalpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 905-911.

Mirski, S.E., Gerlach, J.H., Cummings, H.J., Zirngibl, R., Greer, P.A., and Cole, S.P. (1997). Bipartite nuclear localization signals in the C terminus of human topoisomerase II alpha. *Exp Cell Res* 237, 452-455.

Mirski, S.E., Sparks, K.E., Friedrich, B., Kohler, M., Mo, Y.Y., Beck, W.T., and Cole, S.P. (2007). Topoisomerase II binds importin alpha isoforms and exportin/CRM1 but does not shuttle between the nucleus and cytoplasm in proliferating cells. *Exp Cell Res* 313, 627-637.

Mondal, N., and Parvin, J.D. (2001). DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413, 435-438.

Mondal, N., Zhang, Y., Jonsson, Z., Dhar, S.K., Kannapiran, M., and Parvin, J.D. (2003). Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Res* 31, 5016-5024.

Morais Cabral, J.H., Jackson, A.P., Smith, C.V., Shikotra, N., Maxwell, A., and Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* 388, 903-906.

Murray, A.W., and Szostak, J.W. (1985). Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Biol* 1, 289-315.

Nallamsetty, S., and Waugh, D.S. (2007). A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag. *Nat Protoc* 2, 383-391.

Niimi, A., Suka, N., Harata, M., Kikuchi, A., and Mizuno, S. (2001). Co-localization of chicken DNA topoisomerase II α , but not β , with sites of DNA replication and possible involvement of a C-terminal region of α through its binding to PCNA. *Chromosoma* 110, 102-114.

Nitiss, J.L. (2009a). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* 9, 327-337.

Nitiss, J.L. (2009b). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9, 338-350.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.

Panier, S., and Boulton, S.J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 7-18.

Papillon, J. (2012). Etude structurale et fonctionnelle des complexes de l'ADN gyrase, une ADN topoisomérase bactérienne de type 2. In *Biologie Structurale* (Illkirch, Université de Strasbourg).

Papillon, J., Menetret, J.F., Batisse, C., Helye, R., Schultz, P., Potier, N., and Lamour, V. (2013). Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic Acids Res* 41, 7815-7827.

Patterson, S.D. (2003). Proteomics: evolution of the technology. *Biotechniques* 35, 440-444.

Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J., and Cozzarelli, N.R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819-827.

Pommier, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol* 8, 82-95.

Pommier, Y., Capranico, G., Orr, A., and Kohn, K.W. (1991a). Distribution of topoisomerase II cleavage sites in simian virus 40 DNA and the effects of drugs. *J Mol Biol* 222, 909-924.

Pommier, Y., Capranico, G., Orr, A., and Kohn, K.W. (1991b). Local base sequence preferences for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of amsacrine or teniposide. *Nucleic Acids Res* 19, 5973-5980.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., and Marchand, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17, 421-433.

Pommier, Y., and Marchand, C. (2005). Interfacial inhibitors of protein-nucleic acid interactions. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5, 421-429.

Pommier, Y., Schwartz, R.E., Kohn, K.W., and Zwelling, L.A. (1984). Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double-strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. *Biochemistry* 23, 3194-3201.

Pommier, Y., Schwartz, R.E., Zwelling, L.A., and Kohn, K.W. (1985). Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. *Biochemistry* 24, 6406-6410.

Porter, A.C., and Farr, C.J. (2004). Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere. *Chromosome Res* 12, 569-583.

Postow, L., Crisona, N.J., Peter, B.J., Hardy, C.D., and Cozzarelli, N.R. (2001). Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8219-8226.

Quigley, G.J., Wang, A.H., Ughetto, G., van der Marel, G., van Boom, J.H., and Rich, A. (1980). Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7204-7208.

Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., and Claverie, J.M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 306, 1344-1350.

Rattner, J.B., Hendzel, M.J., Furbee, C.S., Muller, M.T., and Bazett-Jones, D.P. (1996). Topoisomerase II α is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol* 134, 1097-1107.

Recher, M. (2014). Développements en chimie bioorthogonale pour des applications en protéomique chimique et en pharmacocinétique. In *UMR 7199 - Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives* (Strasbourg, Université de Strasbourg), pp. 177.

Redwood, C., Davies, S.L., Wells, N.J., Fry, A.M., and Hickson, I.D. (1998). Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II α in a phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* 273, 3635-3642.

Ritke, M.K., Murray, N.R., Allan, W.P., Fields, A.P., and Yalowich, J.C. (1995). Hypophosphorylation of topoisomerase II in etoposide (VP-16)-resistant human leukemia K562 cells associated with reduced levels of beta II protein kinase C. *Mol Pharmacol* 48, 798-805.

Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4057-4062.

Roca, J., Ishida, R., Berger, J.M., Andoh, T., and Wang, J.C. (1994). Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1781-1785.

Roca, J., and Wang, J.C. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 71, 833-840.

Ross, W.E., Glaubiger, D.L., and Kohn, K.W. (1978). Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine. *Biochim Biophys Acta* 519, 23-30.

Roth, W., Sustmann, C., Kieslinger, M., Gilmozzi, A., Irmer, D., Kremmer, E., Turck, C., and Grosschedl, R. (2004). PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol* 173, 6189-6199.

Ruthenburg, A.J., Graybosch, D.M., Huetsch, J.C., and Verdine, G.L. (2005). A superhelical spiral in the Escherichia coli DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J Biol Chem* 280, 26177-26184.

Ryu, H., Furuta, M., Kirkpatrick, D., Gygi, S.P., and Azuma, Y. (2010). PIASy-dependent SUMOylation regulates DNA topoisomerase IIalpha activity. *J Cell Biol* 191, 783-794.

Salisbury, C.M., and Cravatt, B.F. (2007). Activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1171-1176.

Sander, M., Nolan, J.M., and Hsieh, T. (1984). A protein kinase activity tightly associated with Drosophila type II DNA topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6938-6942.

Schellinger, J.G., Danan-Leon, L.M., Hoch, J.A., Kassa, A., Srivastava, I., Davis, D., and Gervay-Hague, J. Synthesis of a trimeric gp120 epitope mimic conjugated to a T-helper peptide to improve antigenicity. *J Am Chem Soc* 133, 3230-3233.

Schmidt, B.H., Burgin, A.B., Deweese, J.E., Osheroff, N., and Berger, J.M. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature* 465, 641-644.

Schmidt, B.H., Osheroff, N., and Berger, J.M. (2012). Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1147-1154.

Schoeffler, A.J., and Berger, J.M. (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* 41, 41-101.

Schonn, I., Hennesen, J., and Dartsch, D.C. (2010). Ku70 and Rad51 vary in their importance for the repair of doxorubicin- versus etoposide-induced DNA damage. *Apoptosis* 16, 359-369.

Schultz, M.C., Brill, S.J., Ju, Q., Sternglanz, R., and Reeder, R.H. (1992). Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev* 6, 1332-1341.

Schwab, M.S., and Dreyer, C. (1997). Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *Eur J Cell Biol* 73, 287-297.

services, D.o.h.a.h. (2011). Determination That ALBAMYCIN (Novobiocin Sodium) Capsule, 250Milligrams, Was Withdrawn From Sale for Reasons of Safety or Effectiveness.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3-41.

Slesarev, A.I., Stetter, K.O., Lake, J.A., Gellert, M., Krah, R., and Kozyavkin, S.A. (1993). DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature* 364, 735-737.

Spitzner, J.R., and Muller, M.T. (1988). A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 16, 5533-5556.

Stong, R.C., Korsmeyer, S.J., Parkin, J.L., Arthur, D.C., and Kersey, J.H. (1985). Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood* 65, 21-31.

Straub, T., Knudsen, B.R., and Boege, F. (2000). PSF/p54(nrb) stimulates "jumping" of DNA topoisomerase I between separate DNA helices. *Biochemistry* 39, 7552-7558.

Stros, M., Bacikova, A., Polanska, E., Stokrova, J., and Strauss, F. (2007). HMGB1 interacts with human topoisomerase IIalpha and stimulates its catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 35, 5001-5013.

Strumberg, D., Nitiss, J.L., Dong, J., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1999). Molecular analysis of yeast and human type II topoisomerases. Enzyme-DNA and drug interactions. *J Biol Chem* 274, 28246-28255.

Sun, C., Aspland, S.E., Ballatore, C., Castillo, R., Smith, A.B., 3rd, and Castellino, A.J. (2006). The design, synthesis, and evaluation of two universal doxorubicin-linkers: preparation of conjugates that retain topoisomerase II activity. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 104-107.

Takano, H., Kohno, K., Ono, M., Uchida, Y., and Kuwano, M. (1991). Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res* 51, 3951-3957.

Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R., and Andoh, T. (1991). Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res* 51, 4903-4908.

Taneja, B., Schnurr, B., Slesarev, A., Marko, J.F., and Mondragon, A. (2007). Topoisomerase V relaxes supercoiled DNA by a constrained swiveling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14670-14675.

Terada, T., Fujimoto, K., Nomura, M., Yamashita, J., Wierzba, K., Yamazaki, R., Shibata, J., Sugimoto, Y., Yamada, Y., Kobunai, T., *et al.* (1993). Antitumor agents. 3. Synthesis and biological activity of 4 beta-alkyl derivatives containing hydroxy, amino, and amido groups of 4'-O-demethyl-4-desoxy podophyllotoxin as antitumor agents. *J Med Chem* 36, 1689-1699.

Tewey, K.M., Chen, G.L., Nelson, E.M., and Liu, L.F. (1984a). Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259, 9182-9187.

Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D., and Liu, L.F. (1984b). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226, 466-468.

Thomsen, B., Bendixen, C., Lund, K., Andersen, A.H., Sorensen, B.S., and Westergaard, O. (1990). Characterization of the interaction between topoisomerase II and DNA by transcriptional footprinting. *J Mol Biol* 215, 237-244.

Tsai-Pflugfelder, M., Liu, L.F., Liu, A.A., Tewey, K.M., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Huebner, K., Croce, C.M., and Wang, J.C. (1988). Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7177-7181.

Tsai, S.C., Valkov, N., Yang, W.M., Gump, J., Sullivan, D., and Seto, E. (2000). Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet* 26, 349-353.

Turner, J.G., Engel, R., Derderian, J.A., Jove, R., and Sullivan, D.M. (2004). Human topoisomerase IIalpha nuclear export is mediated by two CRM-1-dependent nuclear export signals. *J Cell Sci* 117, 3061-3071.

Ullrich, A., Sures, I., D'Egidio, M., Jallal, B., Powell, T.J., Herbst, R., Dreps, A., Azam, M., Rubinstein, M., Natoli, C., *et al.* (1994). The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *J Biol Chem* 269, 18401-18407.

Varga-Weisz, P.D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P.B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388, 598-602.

Vassetzky, Y.S., Dang, Q., Benedetti, P., and Gasser, S.M. (1994). Topoisomerase II forms multimers in vitro: effects of metals, beta-glycerophosphate, and phosphorylation of its C-terminal domain. *Mol Cell Biol* 14, 6962-6974.

Vega, J., Ke, S., Fan, Z., Wallace, S., Charsangavej, C., and Li, C. (2003). Targeting doxorubicin to epidermal growth factor receptors by site-specific conjugation of C225 to poly(L-glutamic acid) through a polyethylene glycol spacer. *Pharm Res* 20, 826-832.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vos, S.M., Tretter, E.M., Schmidt, B.H., and Berger, J.M. (2011). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 827-841.

Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607-614.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430-440.

Wang, J.C., and Kirkegaard, K. (1981). DNA topoisomerases. *Gene Amplif Anal* 2, 455-473.

Wang, Y., Azuma, Y., Moore, D., Osheroff, N., and Neufeld, K.L. (2008). Interaction between tumor suppressor adenomatous polyposis coli and topoisomerase IIalpha: implication for the G2/M transition. *Mol Biol Cell* 19, 4076-4085.

Ward, G.A., Stover, C.K., Moss, B., and Fuerst, T.R. (1995). Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6773-6777.

Wasserman, R.A., Austin, C.A., Fisher, L.M., and Wang, J.C. (1993). Use of yeast in the study of anticancer drugs targeting DNA topoisomerases: expression of a functional recombinant human DNA topoisomerase II alpha in yeast. *Cancer Res* 53, 3591-3596.

Watanabe, M., Tsutsui, K., and Inoue, Y. (1994). Differential expressions of the topoisomerase II alpha and II beta mRNAs in developing rat brain. *Neurosci Res* 19, 51-57.

Wei, H., Ruthenburg, A.J., Bechis, S.K., and Verdine, G.L. (2005). Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 280, 37041-37047.

Wells, N.J., Addison, C.M., Fry, A.M., Ganapathi, R., and Hickson, I.D. (1994). Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alpha protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro. *J Biol Chem* 269, 29746-29751.

Wells, N.J., Fry, A.M., Guano, F., Norbury, C., and Hickson, I.D. (1995). Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. *J Biol Chem* 270, 28357-28363.

Wells, N.J., and Hickson, I.D. (1995). Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem* 231, 491-497.

Wendorff, T.J., Schmidt, B.H., Heslop, P., Austin, C.A., and Berger, J.M. (2012). The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J Mol Biol* 424, 109-124.

West, K.L., Turnbull, R.M., Willmore, E., Lakey, J.H., and Austin, C.A. (2002). Characterisation of the DNA-dependent ATPase activity of human DNA topoisomerase IIbeta: mutation of Ser165 in the ATPase domain reduces the ATPase activity and abolishes the in vivo complementation ability. *Nucleic Acids Res* 30, 5416-5424.

White, S.D., Conwell, K., Langland, J.O., and Jacobs, B.L. Use of a negative selectable marker for rapid selection of recombinant vaccinia virus. *Biotechniques* 50, 303-309.

Wilstermann, A.M., Bender, R.P., Godfrey, M., Choi, S., Anklin, C., Berkowitz, D.B., Osheroff, N., and Graves, D.E. (2007). Topoisomerase II - drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry* 46, 8217-8225.

Woessner, R.D., Mattern, M.R., Mirabelli, C.K., Johnson, R.K., and Drake, F.H. (1991). Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* 2, 209-214.

Wong, K.A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G., and Wu, H. (2004). Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol* 24, 5577-5586.

Worland, S.T., and Wang, J.C. (1989). Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264, 4412-4416.

Wu, C.C., Li, T.K., Farh, L., Lin, L.Y., Lin, T.S., Yu, Y.J., Yen, T.J., Chiang, C.W., and Chan, N.L. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 333, 459-462.

Wu, C.C., Li, T.K., Farh, L., Lin, L.Y., Lin, T.S., Yu, Y.J., Yen, T.J., Chiang, C.W., and Chan, N.L. (2011). Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 333, 459-462.

Xiao, Z., Bastow, K.F., Vance, J.R., and Lee, K.H. (2004). Antitumor agents. Part 227: Studies on novel 4'-O-demethyl-epipodophyllotoxins as antitumor agents targeting topoisomerase II. *Bioorg Med Chem* 12, 3339-3344.

Yamane, K., Kawabata, M., and Tsuruo, T. (1997). A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* 250, 794-799.

Yamane, K., Wu, X., and Chen, J. (2002). A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 555-566.

Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J., and Wang, J.C. (2000). DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science* 287, 131-134.

Yun, J., Tomida, A., Andoh, T., and Tsuruo, T. (2004). Interaction between glucose-regulated destruction domain of DNA topoisomerase IIalpha and MPN domain of Jab1/CSN5. *J Biol Chem* 279, 31296-31303.

Zandvliet, D.W., Hanby, A.M., Austin, C.A., Marsh, K.L., Clark, I.B., Wright, N.A., and Poulos, R. (1996). Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Biochim Biophys Acta* 1307, 239-247.

Zhang, A., Lyu, Y.L., Lin, C.P., Zhou, N., Azarova, A.M., Wood, L.M., and Liu, L.F. (2006). A protease pathway for the repair of topoisomerase II-DNA covalent complexes. *J Biol Chem* 281, 35997-36003.

Zhang, H., Barcelo, J.M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Pommier, Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10608-10613.

Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalife, T., Lu, L.S., Lyu, Y.L., Liu, L.F., and Yeh, E.T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 18, 1639-1642.

Zhou, M.Y., and Gomez-Sanchez, C.E. (2000). Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* 2, 1-7.

Zhu, X.K., Guan, J., Tachibana, Y., Bastow, K.F., Cho, S.J., Cheng, H.H., Cheng, Y.C., Gurwith, M., and Lee, K.H. (1999). Antitumor agents. 194. Synthesis and biological evaluations of 4-beta-mono-, -di-, and -trisubstituted aniline-4'-O-demethyl-podophyllotoxin and related compounds with improved pharmacological profiles. *J Med Chem* 42, 2441-2446.

Zunino, F., Pratesi, G., and Perego, P. (2001). Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem Pharmacol* 61, 933-938.

PUBLICATIONS PRÉVUES

“Expression of the human Top2 enzymes and analysis of post-translational modifications for structural studies.”

Bedez C. Batisse C, Simoni A., Papillon J, Drillien R., Pradeau K, Ruff M, Lamour V, **in preparation**

“Target deconvolution of anti-Top2 drugs VP 16 and Doxorubicin in human cancer cell lines.”

Batisse C.*, **Bedez C.*** Recher M, Wagner A, Lamour V, (* co-first author) **in preparation**

Résumé

Les ADN topoisomérases de type 2 (Top2) sont des protéines universelles et essentielles à la vie cellulaire. Elles ont pour fonction de réguler de manière fine l'équilibre topologique de l'ADN. Chez l'homme, les Top2 (HsTop2) sont des cibles thérapeutiques de première importance en oncologie. Des molécules telles que l'étoposide et la doxorubicine font partie des traitements anticancéreux les plus utilisés en clinique à l'heure actuelle, elles agissent en stabilisant les complexes Top2/ADN/inhibiteurs qui sont transformés en lésions permanentes dont l'accumulation entraîne la mort cellulaire. Mon travail de thèse porte sur la caractérisation fonctionnelle et structurale des isoformes des HsTop2 entières en complexe avec des composés thérapeutiques. Mon projet de thèse comporte trois axes principaux et complémentaires : (i) La production et la caractérisation fonctionnelle *in vitro* des isoformes recombinantes. Nous avons optimisé et simplifié les protocoles de surexpression des deux isoformes dans la levure et avons également mis au point leur expression dans les cellules de mammifère. (ii) une étude structurale par cryo-microscopie électronique sur les HsTop2 entières en complexe avec des composés thérapeutiques et des oligonucléotides. Ces premiers travaux ont permis l'obtention d'une carte tridimensionnelle de l'enzyme entière qui servira de base pour l'étude de l'architecture des HsTop2 au sein de complexes protéiques de plus grande taille. (iii) des expériences de protéomique chimique permettant de mettre à jour les cibles secondaires potentielles de l'étoposide et de la doxorubicine dans des extraits cellulaires de lignées cancéreuses.

Summary

The type 2 DNA topoisomerases are universal proteins essential for cell survival. These enzyme fine tune the topological equilibrium of the DNA in cells. The human proteins are major targets of therapeutics drugs used in oncology. Molecules like etoposide and doxorubicin are among the most effective anticancer drugs used in chemotherapy treatments; they form stable Top2/DNA/drugs complexes which are then transformed in permanent DNA damages. This thesis project focuses on the functional and structural characterization of these complexes using 3 main strategies: (i) the production and the *in vitro* functional characterization of the recombinant isoforms. We optimized and simplified the production and purification procedures and overexpressed both isoforms in mammalian cells. (ii) a structural study by cryo-electron microscopy on the full enzyme complex with DNA and therapeutic drugs. We obtained a 3D density map that will be used for further studies on the architecture of large HsTop2 associated complexes. (iii) ChemoProteomic experiments on cancer cell lines to highlight the potential etoposide and doxorubicin secondary targets.