



HAL
open science

Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et rubbonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssi*

Mélanie Lemor

► **To cite this version:**

Mélanie Lemor. Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et rubbonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssi*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT : 2017BRES0097 . tel-01735630

HAL Id: tel-01735630

<https://theses.hal.science/tel-01735630>

Submitted on 16 Mar 2018

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.



université de bretagne
occidentale

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Microbiologie

École Doctorale des sciences de la mer et du littoral

présentée par

Mélanie Lemor

Préparée à l'Unité Mixte de recherche (UMR 6197)
Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes (LM2E)

Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et ribonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssi*

Thèse soutenue le 17 novembre 2017

Devant le jury composé de :

CADORET Jean-Charles

Maître de conférences, Université Paris-Diderot (Institut J. Monod) /
Rapporteur

NADAL Marc

Professeur, Université Paris-Diderot (Institut J. Monod) / *Rapporteur*

PICHEREAU Vianney

Professeur, Université de Bretagne Occidentale (LEMAR) /
Examineur

HENNEKE Ghislaine

Chercheur, IFREMER (LM2E) / Directrice de thèse



Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E) situé à Ifremer Plouzané, et financée par la région Bretagne et l'Ifremer.

Je remercie les membres du jury, Jean-Charles Cadoret, Marc Nadal et Vianney Pichereau qui ont accepté d'évaluer mon travail. Merci également aux membres de mon comité de thèse, Béatrice Clouet d'Orval et Farida Akcha.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire LM2E pour leur accueil durant ces trois années et tout particulièrement l'équipe « répli ». Je suis certaine que toute personne qui débute dans le monde de la recherche, et dans cette aventure si particulière qu'est la thèse, souhaiterait appartenir à une équipe telle que celle là. Alors un grand merci à vous tous, Audrey, Aline, Didier, Etienne, Gaëlle, Raphaël, Rémi, Sébastien, Tom pour votre disponibilité, vos conseils, votre aide et tous ces moments partagés. Également membre de cette équipe, Yang, que je tiens à remercier tout particulièrement, pour tellement de choses mais surtout pour sa joie de vivre et son positivisme, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Enfin et surtout, un grand merci à Ghislaine, ma directrice de thèse. Merci pour ta grande disponibilité, tes précieux conseils, ton enthousiasme toujours présent et ton positivisme à toutes épreuves. Enfin un grand merci à tous les doctorants du LM2E avec qui j'ai passé de superbes moments et, plus spécifiquement, à mes acolytes Caro, Charlène et Yang qui au-delà d'être des collègues sont aujourd'hui des amies.

Je remercie également les personnes extérieures aux LM2E avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir et/ou de travailler. Tout d'abord Andreï Chabes et toute son équipe pour leur formidable accueil et leur aide incontournable dans la détermination du contenu en nucléotides, ainsi que Ludovic Sauguet et Pierre Raia pour le travail sur DP1.

Enfin cette thèse a débuté bien avant mon arrivée à Brest et je n'en serais pas là aujourd'hui sans le soutien de ma famille et de mes amis. Je remercie infiniment mes parents pour leur soutien moral et matériel, ainsi que leur confiance m'ayant permis un long parcours universitaire. Merci à mon frère Antoine, d'avoir toujours cru en moi et d'y croire encore, merci pour ton soutien indéfectible. Merci à tous ceux qui ont fait de cette aventure universitaire un de mes plus beaux souvenirs. Evidemment j'ai une pensée toute particulière pour Mike, avec qui j'ai passé 7 années sur les bancs de la fac de Clermont-Ferrand. Et j'ai une grosse pensée pour vous les copains de "la bande du fond", aujourd'hui, tous en thèse. Je remercie également mes copines, Elise, Jéro et Lu qui ont été des moteurs importants durant toutes ces années. Enfin un grand merci à Arnaud pour son attention, son soutien et ses encouragements durant ces trois années, merci de faire aujourd'hui partie de ma vie.

Je termine ces remerciements par une pensée émue pour toutes les personnes qui ne sont plus là aujourd'hui.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications

1-Influence of the ratio of dNTPs/rNTPs pool on ribonucleotides incorporation during archaeal DNA synthesis

(en cours de rédaction pour soumission dans les magazines « Molecular Cell » ou « Nucleic Acids Research » Fin 2017)

Mélanie Lemor^{a,b,c}, Ziqing Kong^d, Etienne Henry^{a,b,c}, Raphaël Brizard^{a,b,c}, Sebastien Laurent^{a,b,c}, Audrey Bosse^{a,b,c}, Andrei Chabes^d, Ghislaine Henneke^{a,b,c}

2-Calcium-driven DNA synthesis by a high fidelity DNA polymerase

(Nucleic Acids Research, accepté début octobre 2017)

Céline Ralec^{a,b,c}, Etienne Henry^{a,b,c}, **Mélanie Lemor**^{a,b,c}, Tom Killelea^{a,b,c}, Ghislaine Henneke^{a,b,c}

a, Ifremer, LM2E, ZI de la pointe du diable CS 10070, 29280, Plouzané-Fr..

b, CNRS, LM2E, UMR6197, Plouzané-Fr

c, UBO, LM2E, UMR6197, Plouzané-Fr

d, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå, Sweden

Participations à des congrès

Communication Orale: « Influence of the balance and ratio of dNTPs/rNTPs on the genome integrity in *Pyrococcus abyssi* »

12th French 3R (Replication-Repair-Recombination),
From Molecular Mechanisms to Clinical Applications Meeting,
May 2nd-5th 2017, Presqu'île de Giens – France.

Poster: « Influence of the balance and ratio of dNTPs/rNTPs on the genome integrity in *Pyrococcus abyssi* »

Keystone Symposia Conference,
DNA Replication and Recombination,
April 2th-6th 2017, Santa Fe – USA.

Poster: « Influence of the balance and ratio of dNTPs/rNTPs on the genome integrity in *Pyrococcus abyssi* »

3rd Archaea GdR Meeting,
May 25th-27th 2016, Grenoble – France.

Communications grand public

Communication orale: « Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et ribonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssi* »

Journées de l'EDSM,
Novembre 2016, Plouzané – France.

Participation à la nuit européenne des chercheurs : « Les abysses : Le petit monde des fausses idées »

Océanopolis,
Septembre 2016, Brest – France.

Communication orale : « Photocopier l'ADN en conditions extrêmes »

Journées portes ouvertes de l'Ifremer
Juin 2015, Plouzané – France.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
TABLE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
INTRODUCTION GENERALE.....	16
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
PREMIERE PARTIE : STABILITE GENOMIQUE.....	21
<i>I - Le contenu en nucléotides.....</i>	<i>21</i>
1.1. Structure chimique et biosynthèse des constituants de l'ADN et de l'ARN.....	21
1.1.1. Structure chimique des nucléotides.....	21
1.1.2. Biosynthèse des nucléotides.....	22
1.1.2.1. Biosynthèse des purines.....	22
1.1.2.2. Biosynthèse des pyrimidines.....	22
1.1.3. Synthèse et régulation du contenu en dNTPs.....	22
1.1.3.1. Synthèse <i>de novo</i> des dNTPs et sa régulation par les RNRs.....	23
1.1.3.2. Synthèse des dNTPs par voie de recyclage et sa régulation.....	25
1.2. Contenu cellulaire en nucléotides.....	26
1.2.1. La constitution du contenu en nucléotides dans les trois domaines du vivant.....	27
1.2.1.1. Une forte abondance des rNTPs.....	29
1.2.1.2. Le contenu en désoxyribonucléotides.....	29
1.2.3. Quantification des nucléotides.....	30
<i>II - Les ADN polymérases.....</i>	<i>32</i>
11.1. Les ADN polymérases dans les trois domaines du vivant.....	32
11.2. La fidélité des ADN polymérases.....	35
11.2.1. La sélection des nucléotides.....	35
11.2.2. L'activité de relecture des ADN polymérases.....	37
<i>III - Les systèmes de la maintenance génomique.....</i>	<i>37</i>
111.1. La réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant.....	38
111.2. La réparation de l'ADN dans les trois domaines du vivant.....	41
DEUXIEME PARTIE : LES RIBONUCLEOTIDES DANS L'ADN.....	43
<i>I - Pourquoi les ribonucléotides sont-ils présents dans l'ADN ?.....</i>	<i>43</i>
1.1. Mauvaise élimination des fragments d'Okazaki.....	43
1.2. Incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases.....	44
1.3. Impact du contenu en nucléotides de la cellule.....	45
1.4. Formation de ribonucléotides dans l'ADN.....	45
<i>II - Systèmes permettant l'élimination des ribonucléotides de l'ADN.....</i>	<i>46</i>
11.1. Réparation par excision de ribonucléotides (RER).....	46
11.1.1. Les ribonucléases (RNaseH).....	46
11.1.2. La voie RER amorcée par la RNase HII.....	46
11.2. Des systèmes secondaires.....	47
11.2.1. Réparation par excision de nucléotide (NER).....	47

II.2.2. La voie RER amorcée par la Topoisomérase I (Top 1)	48
III - Conséquences de la présence de rNMPs dans l'ADN	49
III.1. Impact sur l'intégrité de l'ADN	49
III.2. Impact sur la réplication de l'ADN.....	49
III.3. Impact sur la santé et maladies	50
III.4. Bénéfices.....	50
TROISIEME PARTIE : PRESENTATION DES OBJECTIFS, DU MODELE CELLULAIRE, ET DES ACTEURS	
MOLECULAIRES DE CETTE ETUDE	52
I - Présentation générale de l'étude.....	52
II - Les abysses, les Archées, <i>Pyrococcus abyssi</i>.....	52
II.1. La découverte de la vie dans les abysses	53
II.2. La vie en milieux extrêmes	53
II.3. Les Archées.....	54
II.3.1 La découverte des Archées et leur classification	54
II.3.2. Qu'est-ce qu'une archée ?	54
II.3.2.1. Structure cellulaire	55
II.3.2.2. Métabolisme	55
II.3.2.3. Génome	55
II.4. L'Archée hyperthermophile <i>Pyrococcus abyssi</i>	56
II.4.1. Caractéristiques du génome	57
II.4.2. Culture.....	57
II.4.3. Pourquoi <i>Pyrococcus abyssi</i> est-elle utilisée comme modèle d'étude ?	58
III - Les ADN polymérases de <i>Pyrococcus abyssi</i>.....	58
III.1. L'ADN polymérase B (PolB)	58
III.2. L'ADN polymérase D (PolD).....	60
III.3. Le complexe p41/p46	62
III.3. Importance biologique des trois ADN polymérases de <i>Pyrococcus abyssi</i>	63
CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE L'ADN CHEZ <i>PYROCOCCUS ABYSSI</i> : INFLUENCE DU CONTENU EN NUCLEOTIDES ET INCORPORATION DE RIBONUCLEOTIDES	67
PREMIERE PARTIE : PRESENTATION DE L'ETUDE	68
DEUXIEME PARTIE : ARTICLE EN COURS DE REDACTION.....	70
<i>Influence of the ratio of dNTPs/rNTPs pool on ribonucleotides incorporation during archaeal DNA synthesis</i>	70
Summary	70
Introduction.....	71
Experimental Procedures	74
Results	78
Discussion	85
Tables and Figures.....	90
Supplemental Data	95
TROISIEME PARTIE: RESULTATS/DISCUSSION SUPPLEMENTAIRES - PERSPECTIVES.....	102

<i>I - Les nucléotides</i>	102
I.1 Contenu cellulaire en dNTPs vs contenu génomique en dNMPs	102
I.2. Comparaison avec les trois domaines du vivant.....	102
I.3. Méthodes de quantification des nucléotides	104
I.3.1. Choix de la méthode de quantification des nucléotides de <i>Pyrococcus abyssi</i>	104
I.3.2. Comparaison des méthodes des méthodes de quantification	105
<i>II – L'exclusion des ribonucléotides par l'ADN polymérase PolB</i>	107
II.1. Matériels et Méthodes	107
II.1.1. Enzymes	107
II.1.2. PolBY410Gexo-	107
II.1.2.1. Clonage dans le vecteur d'expression pET28.....	107
II.1.2.2. Production et purification	108
II.1.3. Réaction d'extension d'amorce en présence de rNMPs.....	108
II.2. Résultats	108
II.2.1. Rôle du « stéric gate »	108
II.2.2. Rôle de la fonction exonucléasique.....	110
II.3. Conclusion.....	110
<i>III – Perspectives</i>	110

CHAPITRE III : ETUDE DE LA FONCTION EXONUCLEASIQUE DE LA PETITE SOUS-UNITE DE L'ADN POLYMERASE POLD : DP1	113
PREMIERE PARTIE : PRESENTATION DE L'ETUDE	114
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	116
<i>I - Enzymes utilisées</i>	116
<i>II - Oligonucléotides utilisés</i>	116
<i>III - Réaction de dégradation</i>	118
<i>IV – Visualisation des produits de dégradation</i>	118
TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	119
<i>I - Les enzymes et leurs conditions optimales d'utilisation</i>	119
<i>II - Comparaison des activités nucléases de DP1 avec le complexe Mre11-Rad50</i>	120
.....	122
<i>III - Etude de l'activité exonucléasique 3'→5'</i>	123
III.1. Comparaison de l'activité exonucléasique 3'→5' sur des matrices simple et double brins à extrémités dépassantes.....	123
III.2. Impact de la nature, des bases et des sucres des nucléotides, sur l'activité 3'→5' exonucléasique	123
.....	123
III.2.1. Influence de la nature de la base	123
III.2.2. Influence de la nature du sucre	127
III.2.2.1. Dégradation des matrices simple brin.....	127
III.2.2.2. Effet d'un mésappariement sur l'activité 3'→5' exonucléase	130
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION - PERSPECTIVES	134

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'ACTIVITE DE COUPURE DE L'ADN POLB DE <i>PYROCOCCUS</i>	
<i>ABYSSI</i> : ROLE DE L'ION DANS LA « T-CLEFT »	139
PREMIERE PARTIE : PRESENTATION DE L'ETUDE	140
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES.....	143
<i>I - Plasmide, enzymes et amorces utilisées</i>	<i>143</i>
I.1. Plasmide.....	143
I.2. Enzymes.....	143
I.2.1. Production et purification de PolB3Mexo+ et PolB3Mexo-	143
I.2.1.1. Expression	144
I.2.1.2. Extraction.....	144
I.2.1.3. Purification	144
I.2.1.3. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide et calcul de la concentration protéique	145
I.1.2. Amorces	145
I.3. Réaction PCR et visualisation	146
I.3.1. Réaction PCR	146
I.3.2. Visualisation des produits PCR	147
TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	148
<i>I - Linéarisation du plasmide PLRK19</i>	<i>148</i>
I.1. Résultats obtenus par l'équipe canadienne.....	148
I.2. Vérification de la reproductibilité de la linéarisation.....	149
<i>II - Rôle des triples mutants de l'ADN polymérase PolB de P. abyssi dans la linéarisation de PLRK19</i>	<i>150</i>
II.1. Rôle de l'ion dans la « T-cleft »	150
II.2. Rôle de l'activité exonucléase 3'→5'	153
<i>III - Rôle de la famille de l'ADN polymérase dans la linéarisation du plasmide</i>	<i>153</i>
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION - PERSPECTIVES	155
CONCLUSION GENERALE	157
ANNEXES	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	168

TABLE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

A

A : Adénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

C

C : cytosine

D

dNK : désoxyriboNucléoside Kinases

dNMP : désoxyriboNucléotide MonoPhosphate

dNTP : désoxyriboNucléotides TriPhosphate

d(A-T-U-C-G) : désoxy(Adénosine-Thymidine-Uridine-Cytidine-Guanosine) TriPhosphate
DTT: DiThioThréitol

E

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

Exo : exonucléase

G

G : guanine

H

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HILIC : chromatographie liquide d'interactions hydrophiles

HPLC : "High Performance Liquid Chromatography"

I

I : hypoxanthine

IMP : InosineMonoPhosphate

K

Kb : Kilobase

KDa : KiloDalton

L

LM2E : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

M

Mb : Mégabase

MS : "Masse Spectrometry"

MgCl₂ : chlorure de magnésium

N

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

O

ORF : "Open Reading Frame"

P

P. abyssi : *Pyrococcus abyssi*

PCR : "Polymerase Chain Reaction"

Pol: Polymérase

PolB : ADN polymérase B

PolD : ADN polymérase D

R

RER : Ribonucleotide Excision Repair

RNR: RiboNucleotideReductase

rNMP : riboNucléotides MonoPhosphate

rNTP : ribonucléotide TriPhosphate

r(A-U-C-G) : (Adenosine-Uridine-Cytidine-Guanosine) TriPhosphate

rpm : rotation par minute

S

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

S. solfataricus : *Sulfolobus solfataricus*

T

T : thymine

T-cleft : Template-cleft

Tris: trishydroxyméthylaminométhane

U

U : uracile

UV : Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant les Archées (A) et les trois domaines de la vie (B) 17

CHAPITRE I

Figure 2 : Schéma récapitulatif des premières étapes de la biosynthèse des nucléotides..... 22

Figure 3: Schémas de la biosynthèse des rNTPs et dNTPs d'après Torrents, 2014 (A) et Hofer *et al.*, 2012 (B). 23

Figure 4: Histogramme représentant le contenu intracellulaire des dNTPs chez *Escherichia coli*. 31

Figure 5: Structure 3D de l'ADN polymérase B de *Pyrococcus furiosus* (Cozens *et al.*, 2012). 36

Figure 6: Schémas de la voie de réparation par excision de monoribonucléotides dans les trois domaines du vivant issu de Heider *et al.*, 2017. (A) RER chez les eucaryotes, (B) RER chez les archées, (C) RER chez les bactéries. 47

Figure 7: *Pyrococcus abyssi*, (A) en microscopie électronique à balayage (Photo Ifremer) et (B) en bioréacteur « gas-lift » (Photo R. Brizard, LM2E). 57

Figure 8: Structure de l'ADN polymérase PolB de *Pyrococcus abyssi* (Gouge *et al.*, 2012). 60

Figure 9: Structure de la petite sous-unité DP1 (A) et de la grande sous-unité DP2 (B) de l'ADN polymérase PolD de *Pyrococcus abyssi*. 61

Figure 10: Structure de la sous unité p41 de la primase de *Pyrococcus horikoshii* (Ito *et al.*, 2003). . 63

CHAPITRE II

Figure 1. Influence of nucleotide pools on primer extension activities 91

Figure 2. Incorporation of rNMPs into the duplex DNA (short DNA primer-template)..... 92

Figure 3. Bypass of a single rNMP in a DNA Template 93

Figure 4. Single nucleotide incorporation opposite dCMP- or rCMP-containing template 94

Figure S1 related to Figure 1. Immunodetection of the three *Pyrococcus abyssi* DNA polymerases in cell-free extracts. 95

Figure S2 related to Figure 4. Primer extension and endonuclease activity on rNMP-containing primer-templates by *P. abyssi* cell-free extracts and all three DNA Pols. 96

Figure S3 related to Figure 5. Single nucleotide incorporation opposite dNMP- or rNMP-containing templates by *Pyrococcus abyssi* DNA polymerases. 97

Figure 11: Abondance des nucléotides chez les archées *Sulfolobus solfataricus* et *Pyrococcus abyssi*. 104

Figure 12: Comparaison de deux techniques de mesure des nucléotides chez *Pyrococcus abyssi*. 106

Figure 13: Réaction d'incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases PolB mutées pour le « stéric gate » (Y410G) et pour la fonction exonucléasique (exo-). 109

CHAPITRE III

Figure 14: Profils d'électrophorèses des enzymes utilisées pour l'étude (A) et de leurs activités de dégradation exonucléasique 3'→5' (B).	120
Figure 15: Activités exonucléasique et endonucléasique de DP1, DP1ΔN, PolD, PolB et du complexe Mre11-Rad50.....	122
Figure 16: Activités exonucléasiques 3'→5' sur des substrats simples brins de composition en bases variable.	126
Figure 17: Activités exonucléasiques 3'→5' en présence de substrats simple brins contenant des ribonucléotides.....	128
Figure 17(suite): Activités exonucléasiques 3'→5' en présence de substrats simple brin contenant des ribonucléotides.....	129
Figure 18: Effet d'un mésappariement ADN ou ARN sur l'activité exonucléasique 3'→5'.....	132
Figure 18 (suite): Effet d'un mésappariement ADN ou ARN sur l'activité exonucléasique 3'→5'.	133

CHAPITRE IV

Figure 19: Poche de reconnaissance de l'Uracile et «T-cleft » de l'ADN polymérase PolB de <i>P. abyssi</i> (Gouge <i>et al.</i> , 2012).....	141
Figure 20: Linéarisation du plasmide PLRK19 lors d'une réaction de PCR en présence de l'enzyme Phusion (A), Pfu Turbo CX et 9°N7exo- (B).	149
Figure 21: Linéarisation du plasmide PLRK19 en présence de l'ADN polymérase Q5.	150
Figure 22: Linéarisation du plasmide PLRK19 par les ADN polymérases B commerciales Isis (A-B), Pyra (E-F) et par PolB3Mexo+ (C-D) et PolB3Mexo- (G-H).....	152
Figure 23: Linéarisation du plasmide PLRK19 par les ADN polymérases <i>Pfu</i> (A) et <i>Taq</i> (B).	154
Figure 24: Schéma de la linéarisation du plasmide PLRK19 lors d'une réaction PCR proposé par l'équipe canadienne du Pr Linda Reha-Krantz.....	156

ANNEXE

Annexe 1 : Séquence peptidique de l'ADN polymérase PolB de <i>P. abyssi</i> (PAB 1128) et caractéristiques biochimiques.	162
Annexe 2: Méthode de production et de purification des ADN polymérases PolBY410Gexo-, PolB3Mexo+ et PolB3Mexo-.	163
Annexe 3 : Séquence du gène 43 codant l'ADN polymérase T4 (Spicer <i>et al.</i> , 1988).	164
Annexe 4 : Contrôle qualité des protéines PolB3Mexo+ (A) et PolB3Mexo- (B) après purification....	165

CHAPITRE I

Tableau I: Caractéristiques générales des trois classes de ribonucléotide réductase (Tableau inspiré de (Lundin <i>et al.</i> , 2010; Torrents, 2014)).....	24
Tableau II: Valeurs du contenu intracellulaire en dNTPs et rNTPs et de leurs ratios chez différents organismes des trois domaines du vivant.	28
Tableau III: Les ADN polymérases dans les trois domaines du vivant d'après Delagoutte, 2012.....	34
Tableau IV: Les caractéristiques de la réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant d'après Kelman & Kelman, 2014.....	40
Tableau V: Taille de génomes et nombre d'ORFs de différents organismes des trois domaines du vivant (Madigan <i>et al.</i> , 2014, p185/p191/p197).....	56
Tableau VI: Caractère essentiel ou non des ADN polymérases archéennes	64

CHAPITRE II

Tableau VII: Incorporation et retrait/exclusion des ribonucléotides par les ADN polymérases des trois domaines du vivant (Cerritelli and Crouch, 2016; Donigan et al., 2014; Heider et al., 2017; Schroeder et al., 2015; Williams et al., 2016).....	89
Table 1. Intracellular levels of nucleotides in <i>Pyrococcus abyssi</i>	90
Table S1. Oligodeoxynucleotides used in this study.....	100
Table S2 related to Figure 4. Examination of primer-extension stalling events in the presence of rNMP-containing templates.....	101
Tableau VIII: Abondance des dNTPs dans le cytosol et des dNMPs dans le génome de <i>Pyrococcus abyssi</i>	102
Tableau IX: Vue d'ensemble des ratios rNTPs:dNTPs dans les cellules des trois domaines du vivant.	103

CHAPITRE III

Tableau X: Oligonucléotides utilisés lors des réactions de dégradation.....	117
Tableau XI: Activités nucléasiques des sous-unités DP1 et DP1ΔN, PoID, PoIB et Mre11-Rad50. ..	135

CHAPITRE IV

Tableau XII: Caractéristiques des ADN polymérases utilisées pour l'étude sur la linéarisation du plasmide PLRK19.....	146
---	-----

INTRODUCTION GENERALE

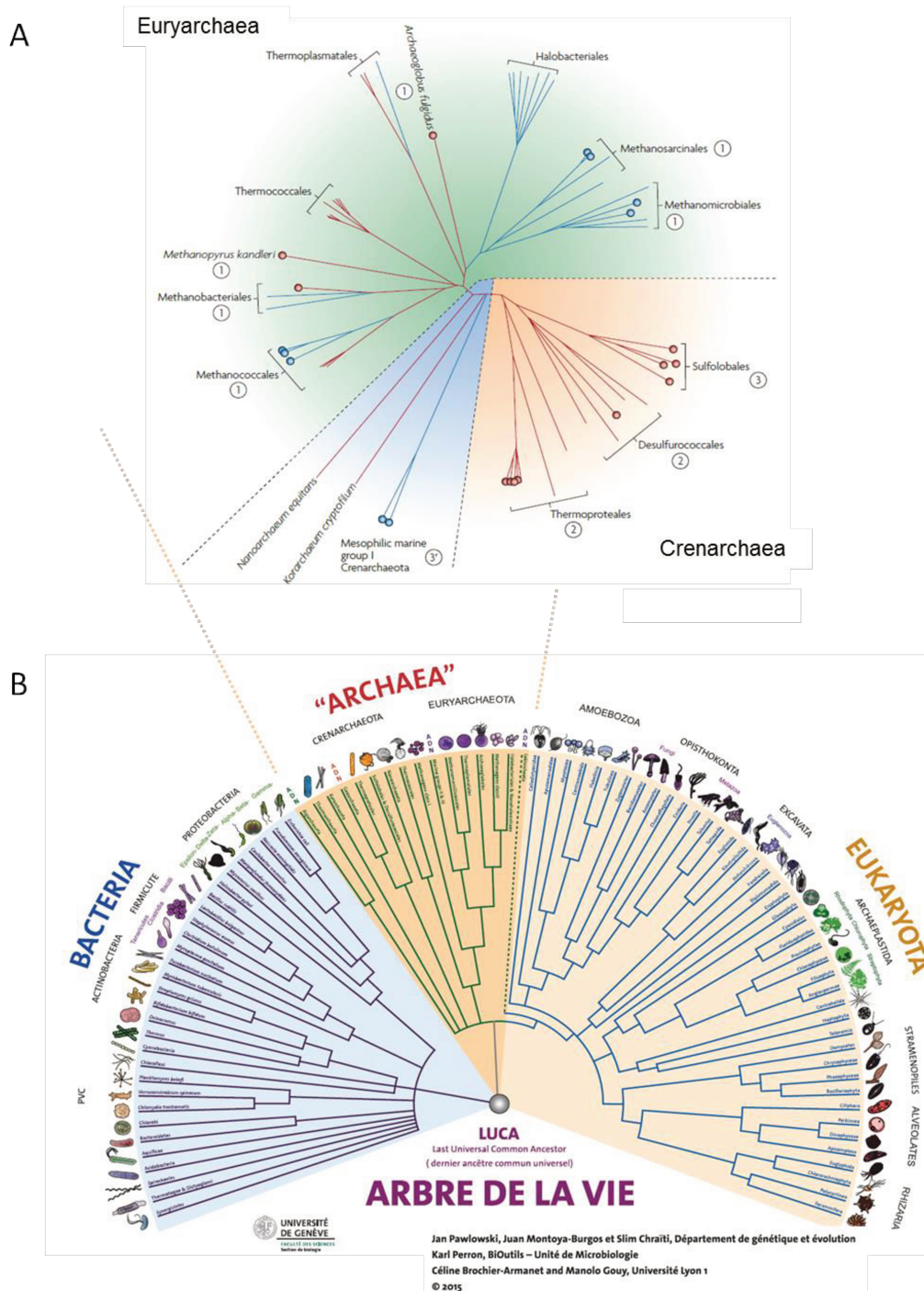


Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant les Archées (A) et les trois domaines de la vie (B)

(A) Arbre phylogénétique non enraciné basé sur l'analyse des sous-unités des ARN polymérase, de 3 facteurs de transcription, de 53 protéines ribosomales et de génomes de 59 espèces d'archées. Les nombres 1, 2, 3, 3' font référence à la présence de la voie réductrice de l'acétyl-CoA (1), cycle de dicarboxylate-hydroxybutyrate (2), cycle de hydroxypropionate-hydroxybutyrate (3) et un possible cycle modifié de hydroxypropionate-hydroxybutyrate (3'). Les branches rouges représentent les archées thermophiles et hyperthermophiles avec une température optimale de croissance supérieure ou égale à 65°C, les branches bleues représentent les archées avec une température optimale de croissance inférieure à 65°C (Berg *et al.*, 2010).

(B) Figure provenant de la plateforme de communication scientifique BiOutils, <https://www.bioutils.ch/materiel-pedagogique/arbre-du-vivant>, (Caine *et al.*, 2015).

Les caractéristiques et les origines de LUCA, le dernier ancêtre commun, fait l'objet de nombreux débats. Tous les scientifiques s'accordent sur le fait qu'à partir de lui la vie se divise en trois domaines ; Bactérie, Archée et Eucaryote (Figure 1B). Si les caractéristiques physiologique et moléculaire des organismes composant ces trois phylums sont bien différentes, il existe une molécule commune à tous : l'ADN. Support de l'information génétique de tout être vivant, elle fascine la société et est au cœur de nombreuses publications scientifiques. Appelée « molécule du vivant », elle renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'une cellule. Elle est transmise d'une génération à une autre, c'est le support de l'information génétique formant le génome. Celui-ci est soumis à d'important stress et agressions qui, notamment, prend une grande importance pour les organismes se développant dans des milieux dît extrêmes. Malgré cela les fonctions cellulaires doivent être maintenues, de nombreuses équipes s'attardent donc à définir les paramètres et systèmes permettant le maintien de l'intégrité génomique. Celle-ci, au-delà des mécanismes de réparation et de surveillance passe par une duplication fidèle de l'ADN lors de la réplication. La balance et le ratio de la concentration intracellulaire des constituants des acides nucléiques que sont, les désoxyribonucléotides (dNTPs) et ribonucléotides (rNTPs), sont des facteurs clefs de cette maintenance (Gon *et al.*, 2011; Mathews, 2006). De plus, une découverte a engendré un certain nombre de questions. Lors de la synthèse d'ADN, des ribonucléotides (molécules constituants l'ARN), sont introduits de façon importante dans le génome par les ADN polymérases, « bâtisseuses de l'ADN » (Bergoglio *et al.*, 2003; Heider *et al.*, 2017; Nick McElhinny *et al.*, 2010a). Seulement, comparé à l'ADN, l'ARN est moins résistant (Oivanen *et al.*, 1998). Ainsi, de nombreuses interrogations sur les conséquences génétiques, bénéfiques ou délétères à la survie cellulaire, se posent. Ce pan de la recherche est bien documenté chez les bactéries et les eucaryotes mais reste peu exploré dans le troisième domaine de la vie : les archées. Ancré dans cette thématique, le projet doctoral visait, dans un premier temps, à définir la concentration intracellulaire en dNTPs et rNTPs chez une archée. Il a été étudié dans un second temps si l'incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases eucaryote et bactérienne était également une propriété des ADN polymérases archéennes. Enfin, il a été mené une étude sur les différents mécanismes moléculaires permettant de faire face aux rNTPs dans l'ADN. Pour cela, le modèle utilisé est une archée issue des environnements extrêmes : *Pyrococcus abyssi* (Erauso *et al.*, 1993). Surnommée « la boule de feu des abysses », cette Euryarchaea hyperthermophile de l'ordre des thermococcales (Figure 1A) est dotée de molécules clefs de la maintenance génomique similaires à celles des eucaryotes (Cohen *et al.*, 2003; Myllykallio *et al.*, 2000). Elle est un modèle de choix pour travailler sur des questions de tolérance et de réparation des dommages à l'ADN.

CHAPITRE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : Stabilité génomique

Deuxième partie : Les ribonucléotides dans l'ADN

**Troisième partie : Présentation des objectifs, du
modèle cellulaire, et des acteurs moléculaires de
cette étude**

Première partie : Stabilité génomique

La stabilité du génome est essentielle pour la vie, elle est garantie par un ensemble de processus permettant une transmission fidèle de l'information génétique au cours des générations. La duplication fidèle et la préservation de l'intégrité du génome sont permises par l'existence de systèmes complexes, de réplication et de réparation de l'Acide DéoxyriboNucléique (ADN). Au cœur de ces systèmes deux paramètres sont essentiels ; les constituants de l'ADN que sont les déoxyribonucléotides (dNTPs) et l'enzyme permettant leur assemblage, l'ADN polymérase. Cette dernière est au centre de la réplication de l'ADN et peut également intervenir dans des mécanismes de recombinaison et de réparation. De nombreux rôles biologiques lui sont alloués, soulignant ainsi l'importance primordiale de cette enzyme.

I - Le contenu en nucléotides

Les nucléotides sont les unités de construction des acides nucléiques, les déoxyribonucléotides (dNTPs) sont les précurseurs de « la molécule du vivant », l'ADN, et les ribonucléotides (rNTPs) de l'ARN. Mais, les rNTPs sont également utilisés comme co-substrats dans de nombreuses voies métaboliques. Le rATP, le plus connu, est utilisé par de nombreuses enzymes. Leurs implications, pour les uns dans la structure de la molécule du vivant et pour les autres dans des voies nécessaires à la survie cellulaire, en font des molécules essentielles.

I.1. Structure chimique et biosynthèse des constituants de l'ADN et de l'ARN

I.1.1. Structure chimique des nucléotides

Les nucléotides, dNTPs ou rNTPs, sont constitués de trois composants de base l'acide phosphorique, un pentose et une base azotée (Figure 3A, page 22). L'acide phosphorique (H_3PO_4) est un triacide dont une des fonctions acide est libre, ce qui donne la charge négative de l'ADN. Les riboses, glucides cycliques à cinq atomes de carbone, sont sous deux formes. Le 2'désoxyribofuranose dans l'ADN et le 2'ribofuranose dans l'ARN. Les bases, sont également de deux types ; les bases pyrimidiques composées de la cytosine (C) et de la thymine (T) dans l'ADN et l'uracile (U) dans l'ARN et les bases puriques composées de la guanine (G), de l'adénine (A) et de l'hypoxanthine (I). L'association d'une base et d'un pentose par une liaison β -N-osidique est appelée un nucléoside. Cela donne donc l'adénosine, la guanosine, la cytidine, l'uridine, la thymidine et l'inosine. Le nucléotide va être

l'association de l'acide phosphorique et d'un nucléoside par une liaison phosphodiester en 5' du pentose.

I.1.2. Biosynthèse des nucléotides

Processus complexes faisant intervenir plus de soixante-dix enzymes, la biosynthèse des nucléotides avec une base pyrimidique ou une base purique va être différente. Mais toutes deux ont en commun l'utilisation d'un sucre, le 5-phospho- α -D-ribose 1-pyrophosphate ou 5-PRPP (Figure 2), (Biochimie (7^e Éd.), Berg *et al.*, 2013, p735).

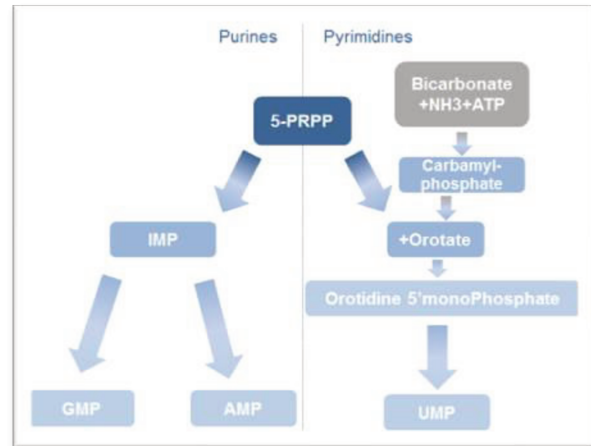


Figure 2 : Schéma récapitulatif des premières Etapes de la biosynthèse des nucléotides

I.1.2.1. Biosynthèse des purines

Le 5-PRPP donne l'InosineMonoPhosphate (IMP), celle-ci est converti en AMP par l'adénylosuccinatesynthétase et l'adénylosuccinate lyase ou en GMP par l'IMP déshydrogénase et la GMP synthase (Figure 2, Figure 3B page 22), (Biochimie (7^e Éd.), Berg *et al.*, 2013, p735).

I.1.2.2. Biosynthèse des pyrimidines

Dans un premier temps, le carbamyl-phosphate est synthétisé par la carbamyl-phosphate synthétase à partir de bicarbonate, de NH_3 et d'ATP. Cette molécule est le point de départ de la biosynthèse des pyrimidines. Après trois réactions successives elle donnera l'orotate qui combinée au 5-PRPP donnera l'orotidine 5'-monophosphate qui elle-même engendrera l'UMP puis l'UTP qui grâce à la CTP synthase aboutira au CTP (Figure 2, Figure 3B, page 22) (Biochimie (7^e Éd.), Berg *et al.*, 2013, p735).

I.1.3. Synthèse et régulation du contenu en dNTPs

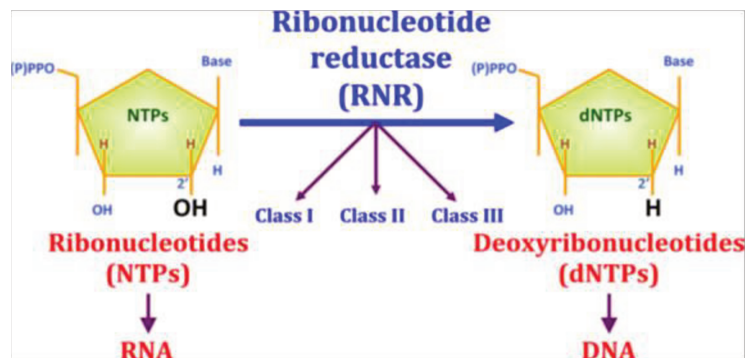
Les dNTPs peuvent être synthétisés, pour l'essentiel, *de novo* mais aussi par « recyclage » d'acides nucléiques dégradés ou puisés dans l'environnement. La première fait intervenir les ribonucléotides réductases (RNRs) et la seconde des désoxyribonucléoside kinases (dNKs).

Ces deux voies de synthèse sont finement régulées et confèrent un contenu en dNTPs ajusté au cours du cycle cellulaire afin de préserver l'intégrité du génome.

I.1.3.1. Synthèse *de novo* des dNTPs et sa régulation par les RNRs

Les ribonucléotides réductases (RNRs) substituent le groupement hydroxyle en 2' du ribose d'un ribonucléotide (rNTP) par un hydrogène et ainsi convertissent les quatre ribonucléotides en leurs quatre désoxyribonucléotides correspondants (Figure 3A).

A



B

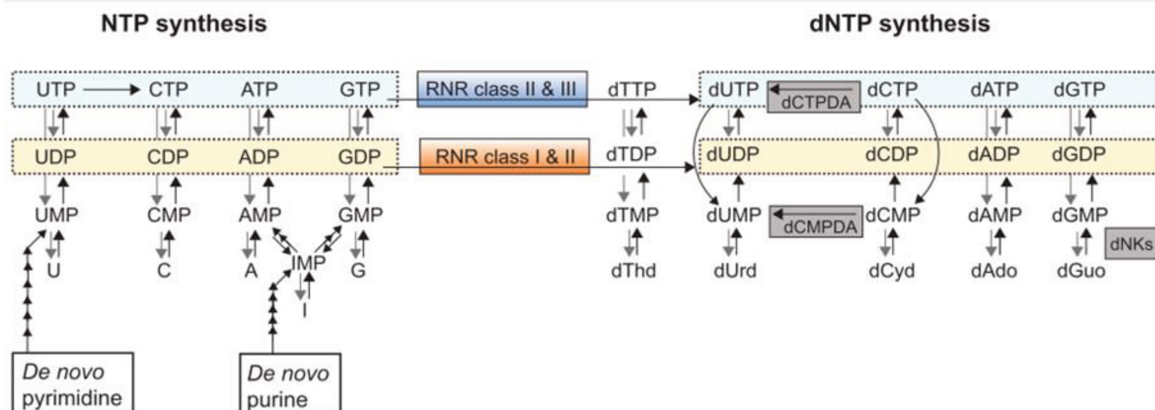


Figure 3: Schémas de la biosynthèse des rNTPs et dNTPs d'après Torrents, 2014 (A) et Hofer *et al*, 2012 (B).

La classe de RNR utilisée et la présence des dNKs (désoxynucleosides kinases) varient entre les espèces. Les abréviations d'une lettre dans la synthèse des NTPs (U, C, A, G et I) représentent à la fois la base et son ribonucléoside correspondant (I = hypoxanthine et inosine).

Les RNRs sont divisées en trois classes (I, II et III) n'ayant pas les mêmes caractéristiques et la même répartition dans les trois domaines du vivant (Figure 3B, Tableau I). Ces classes sont basées sur le mécanisme de génération du radical, essentiel pour la réaction. L'analyse

des génomes a montré que les trois classes de RNR étaient présentes chez les bactéries, les eucaryotes et les archées, la classe I étant tout de même que très rarement présente chez les archées.

	Classe I			Classe II	Classe III
	la	lb	lc		
Fonctionnement	Aérobie			Oxygène indépendant	Anaérobie
Structure	$\alpha_2\beta_2/ \alpha_6\beta_6$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	α ou α_2	$\alpha_2 + \beta_2$
Substrat	NDP			NDP/NTP	NTP
Distribution					
Bactérie	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Eucaryote	Oui	Non	Non	Distribution limitée	Oui
Archée	Distribution limitée (<i>Natromonas pharaonis</i>)	Non	Non	Oui (<i>Pyrococcus furiosus</i> ; <i>Sulfolobus islandicus</i> ; <i>Natromonas pharaonis</i>)	Oui (<i>Pyrococcus furiosus</i>)

Tableau I: Caractéristiques générales des trois classes de ribonucléotide réductase (Tableau inspiré de (Lundin *et al.*, 2010; Torrents, 2014)).

Les RNRs se différencient par leurs environnements de fonctionnement, leurs substrats, leurs formes actives comprenant deux protéines ($\alpha + \beta$) associées en dimère ou dans d'autres formes oligomériques de type $\alpha n \beta m$ (ou n peut valoir 2, 4 ou 6 et m 1, 2, 3 ou plus). D'autres caractéristiques peuvent les différencier comme le ou les gènes qui les codent, les cofacteurs métalliques qu'elles utilisent qui ne sont pas mentionnés ici.

Puisque la voie de synthèse *de novo* est la plus importante, une abondance correcte des dNTPs passe donc par une étroite régulation des RNRs. Cela inclut un contrôle allostérique de l'activité enzymatique et une régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire pour être fortement activée lors de la phase de synthèse (phase S) chez les eucaryotes ou durant la phase exponentielle chez les bactéries (Hofer *et al.*, 2012; Lundin *et al.*, 2010; Nordlund and Reichard, 2006; Reichard, 1988; Traut, 1994). La biosynthèse des dNTPs est ainsi dépendante du cycle cellulaire.

Il a été montré, en 1969, que la RNR chez *E. coli* se composait de différents sites dont, le site nommé « S-site » pour « Specificity site ». Ce dernier est impliqué dans la sélection du substrat qui sera réduit au site catalytique et intervient donc dans la régulation allostérique des RNRs empêchant l'augmentation trop importante de la concentration de chaque dNTPs (Brown and Reichard, 1969). A partir de là, le même modèle a pu être déterminé pour les autres classes de RNRs. Dans la globalité, cette régulation se passe de la façon suivante, lorsque le dTTP est présent à forte concentration, lié en partie à sa production par la voie de

recyclage (Bianchi *et al.*, 1986), il se lie au « S-site », ce qui permet la stimulation de la production de dGTP et par la suite de dATP qui aboutiront à la synthèse de dCTP et de dTTP. Cela conduit *in fine* à une synthèse séquentielle des dNTPs commençant par le dGTP suivi par le dATP puis le dCTP. Enfin un deuxième site, nommé « A-site » pour « Activity-site », également trouvé dans la RNR d'*E. coli*, peut lier l'ATP, qui s'avère être un activateur, ou un dATP qui lui est un inhibiteur et permet ainsi de mettre la ribonucléotide réductase en arrêt lorsque la concentration en dATP est trop élevée (Chabes *et al.*, 2003; Nordlund and Reichard, 2006; Rofougaran *et al.*, 2006).

Même si quelques différences existent entre les RNRs, le modèle de rétrocontrôle de son activité présenté ci-dessus reste très proche entre chaque classe avec comme point central, le contrôle de l'activité enzymatique par la liaison de l'ATP ou du dATP au « A-site ». Il a été montré, chez la souris et la levure, que si un acide aspartique du « A-site » est muté, une prolifération anarchique des dNTPs est alors observée, démontrant ainsi l'importance de ce site et donc de ce rétrocontrôle (Caras and Martin, 1988; Chabes *et al.*, 2003; Reichard *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la concentration en dNTPs est plus importante en phase de synthèse de l'ADN. Pour permettre cette variation de la concentration, les RNRs subissent une régulation dite transcriptionnelle dépendante de la classe du RNR ou de l'organisme. Chez les bactéries elle peut par exemple dépendre des conditions de croissance, de la présence de H₂O₂ ou du contenu en manganèse (Jordan *et al.*, 1996; Monje-Casas *et al.*, 2001; Willing *et al.*, 1988). Dans les cellules de mammifères des facteurs transcriptionnels rentrent en jeu comme le facteur E2F4 qui inhibe la transcription du gène de la RNR en phase G1. Il est également possible qu'une régulation par dégradation des RNRs se mette en place, une fois que les cellules entrent en phase de mitose (Chabes and Thelander, 2000; DeGregori *et al.*, 1995).

Les RNRs jouent ainsi un rôle très important dans la production correcte des quatre dNTPs grâce à de multiples niveaux de régulation et c'est l'interconnection entre tous ces niveaux qui va déterminer la taille et la variation du contenu en dNTPs. Cependant un second niveau de production et de régulation existe maintenu par un autre type d'enzymes : les désoxyribonucléoside kinases.

I.1.3.2. Synthèse des dNTPs par voie de recyclage et sa régulation

La synthèse de dNTPs par « recyclage » est effectuée à partir de désoxyribonucléosides issus de la nutrition ou directement à partir de désoxyribonucléotides monophosphates (dNMPs) issus de la dégradation cellulaire.

Les désoxyribonucléosides extracellulaires, une fois dans la cellule, sont pris en charge par des désoxyribonucléoside kinases (dNKs). Ces dernières vont phosphoryler les désoxyribonucléosides pour donner des désoxyribonucléotides monophosphates (Eriksson *et al.*, 2002). Dans les cellules humaines, ces enzymes sont au nombre de quatre, deux dans le cytosol, la thymidine kinase 1 et la désoxycytidine kinase et deux dans la mitochondrie, la thymidine kinase 2 et la guanosine kinase (Arnér and Eriksson, 1995). Alors que chez la bactérie *E. coli*, et chez la drosophile, une seule desoxyribonucleoside kinase serait capable de phosphoryler les quatre désoxyribonucleosides (Munch-Petersen *et al.*, 1998). L'expression de la thymidine kinase 1 des cellules humaines est régulée au cours du cycle cellulaire comme les ribonucléotides réductases. En effet, la synthèse de cette dernière tout comme celle des RNRs, augmente en phase S, rendant ainsi la formation de dNMPs dans cette voie également dépendante du cycle cellulaire (Littlefield, 1966). De façon plus générale, les désoxyribonucléoside kinases sont régulées par rétrocontrôle négatif des dNTPs (Kim and Ives, 1989; Knecht *et al.*, 2002; Park and Ives, 1995). Les dNMPs libérés suite à des dégradations intracellulaires ou synthétisés suite à l'action des désoxyribonucléoside kinases, vu ci-dessus, sont pris en charge par les dNMPs kinases. Cette phosphorylation des dNMPs est l'ultime étape de la synthèse de dNTPs par la voie de recyclage.

I.2. Contenu cellulaire en nucléotides

L'important système de régulation entourant le contenu en nucléotides est lié au fait que la concentration intracellulaire et le ratio dNTPs:rNTPs sont des facteurs clefs de la maintenance génomique, et que le taux de mutation augmente si la concentration des quatre dNTPs est trop élevée (Gon *et al.*, 2011; Mathews, 2006). Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été montré qu'une concentration en dNTPs trop élevée inhibe la progression du cycle cellulaire (Chabes and Stillman, 2007). Dans les cellules humaines, une déstabilisation du contenu en nucléotides peut contribuer au développement ou à l'accélération du cancer du côlon (Mertz *et al.*, 2015). Comme vu précédemment, le contenu en dNTPs fluctue au cours du cycle cellulaire, mais peut également être différent au sein d'un même organisme, d'un tissu à un autre, d'une cellule à une autre, et à l'intérieur même de la cellule. Par exemple chez les eucaryotes, deux contenus en dNTPs existent. Le principal, dans le cytosol permet la réplication et la réparation de l'ADN et le second, plus petit, dans la mitochondrie, pouvant représenter de 1% à 10% du pool de dNTPs total de la cellule, assure le maintien de l'intégrité de l'organite (Bestwick *et al.*, 1982; Rampazzo *et al.*, 2004). En effet la présence de dNTPs dans la mitochondrie est nécessaire à la réplication de l'ADN mitochondriale qui n'est pas coordonnée avec celle de l'ADN nucléaire de la cellule (Bogenghagen and Clayton,

1977). Le contenu en nucléotides de la mitochondrie est physiquement et métaboliquement distinct de celui du cytosol (Marcelino and Thilly, 1999). Cependant, les dNTPs mitochondriaux peuvent être synthétisés dans l'organite à partir de rNTPs ou dNMPs provenant du cytosol ou encore être directement importés à travers la membrane mitochondriale (Mathews *et al.*, 2006).

I.2.1. La constitution du contenu en nucléotides dans les trois domaines du vivant

Le tableau II ci-après, représente les concentrations de chaque dNTPs et rNTPs dans des cellules appartenant aux trois domaines du vivant. A partir de celles-ci, quand cela était possible, les ratios rNTPs:dNTPs ont pu être calculés. Les unités utilisées sont en pmol (picomoles) pour 10^8 cellules ou en μM (micromolaire), les auteurs ayant utilisé le volume moyen des cellules pour obtenir cette unité. Tous ces résultats permettent une vue d'ensemble par différentes méthodes de dosages des organismes dans lesquels ces quantifications ont été réalisées. Contrairement aux cellules bactériennes et archéennes où ces quantifications ont été faites dans seulement deux organismes, *E. coli* et *S. solfataricus*, les cellules eucaryotes sont largement représentées, ne figurant dans ce tableau que quelques exemples. *Sulfolobus solfataricus* qui représente le domaine des archées, est une Crenarchaea, hyperthermophile aérobie de l'ordre des sulfobales (Figure 1A, page 16). Elle a été découverte et isolée en 1980 du cratère de Solftara près de Naples (Zillig *et al.*, 1980).

	Bactérie			Eucaryote						Archée
Organisme	<i>Escherichia coli</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fibroblastes humains		Lymphocytes humains		<i>Sulfolobus solfataricus</i>	
Unité	pmol/10 ⁸ cellules	µM	µM	µM	pmol/10 ⁸ cellules	µM	pmol/10 ⁸ cellules	µM	pmol/10 ⁸ cellules	pmol/10 ⁸ cellules
dNTPs										
dA	40	175	181	16	35	3,6	4500	1,8	370	48
dT	120	77	256	30	87	39	10300	3,3	675	76
dC	250	55	184	14	43,5	20	4400	1,4	280	59
dG	30	122	92	12	17	6,4	1800	1,7	350	67
rNTPs										
rA	/	3000	3560	3000	/	/	1520000	1264	218333	12870
rU	/	824	667	1700	/	/	400000	499	103 800	2280
rC	/	515	325	500	/	/	165000	392	40 575	2000
rG	/	923	1660	700	/	/	260000	263	51 200	2570
rNTPs : dNTPs										
rA : dA	/	17 :1	19 :1	190 :1	/	/	338 :1	702 :1	590 :1	268 :1
rU : dT	/	11 :1	3 :1	57 :1	/	/	39 :1	151 :1	30 :1	30 :1
rC : dC	/	9 :1	8 :1	36 :1	/	/	38 :1	280 :1	34 :1	34 :1
rG : dG	/	8 :1	18 :1	58 :1	/	/	114 :1	158 :1	38 :1	38 :1
Méthodes	HPLC-UV	Chromatographie sur couche mince	HPLC-UV	HPLC-UV	HPLC-UV	Méthode enzymatique	Méthode enzymatique	Méthode enzymatique (dNTP) / HPLC-UV (rNTPs)		HPLC-UV
Références	(Gon et al., 2011)	(Bochner and Ames, 1982)	(Buckstein et al., 2008)	(Nick McElhinny et al., 2010)	(Kumar et al., 2010)	(North et al., 1980)	(Ferraro et al., 2010)	(Traut, 1994)		(Liew et al., 2016)

Tableau II: Valeurs du contenu intracellulaire en dNTPs et rNTPs et de leurs ratios chez différents organismes des trois domaines du vivant.

Les concentrations grisées représentent le nucléotide rNTP ou dNTP le plus abondant dans la cellule.

I.2.1.1. Une forte abondance des rNTPs

La première observation est que, quelles que soient les cellules, le contenu en rNTPs excède largement celui en dNTPs. Cette différence est liée au fait que les rNTPs sont d'une part les précurseurs des dNTPs (Figure 3, page 22), les constituants des acides ribonucléiques (ARN) mais également des sources d'énergies (rATP et rGTP) ou encore des cofacteurs enzymatiques (rATP).

Cependant il apparait d'importantes variations entre les trois domaines du vivant. Dans les lymphocytes humains, il y a en moyenne 250 fois plus de rNTPs que de dNTPs atteignant même un ratio de 702:1 pour le rATP:dATP. Alors que chez la bactérie *Escherichia coli* il y a en moyenne seulement dix fois plus de rNTPs que de dNTPs. Le contenu en ribonucléotides de l'archée *Sulfolobus solfataricus* est quant à lui en moyenne 85 fois supérieur à celui en dNTPs ce qui est proche de ce qui est retrouvé chez l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*. La différence d'abondance entre les rNTPs et les dNTPs est donc beaucoup plus importante dans les cellules eucaryotes que bactérienne et archéenne. Cependant, le ratio le plus élevé est toujours le rATP:dATP. En effet, au regard du contenu en ribonucléotides, quel que soit l'organisme ou le domaine auquel il appartient, le rATP est le plus abondant des rNTPs avec un minimum de 50% du contenu cellulaire global par rapport aux trois autres rNTPs. Une forte différence existe tout de même entre chaque cellule. En effet, la concentration en rATP s'échelonne de $1.10^3 \mu\text{M}$ à $3,56.10^3 \mu\text{M}$ pour les lymphocytes humains et *E. coli*. La différence la plus notable se situe avec les fibroblastes humains et l'archée *Sulfolobus solfataricus* ayant respectivement une concentration de $1,520.10^6 \text{ pmol}$ pour 10^8 cellules et $1,2.10^4 \text{ pmol}$ pour 10^8 cellules. Cette forte différence de concentration du rATP entre *Sulfolobus solfataricus* et les fibroblastes humains est également visible entre les trois autres ribonucléotides.

I.2.1.2. Le contenu en désoxyribonucléotides

L'abondance des dNTPs est variable d'une cellule à une autre mais, de façon globale chez les eucaryotes, le dTTP est le plus abondant des dNTPs, tout comme chez l'archée *S. solfataricus* avec une concentration de 76 pmol pour 10^8 cellules. Chez *E.coli*, cela reste plus ambigu. En effet, au regard des résultats de l'article de Buckstein (Buckstein *et al.*, 2008), le dNTP le plus abondant est le dTTP ($256\mu\text{M}$), comme observé chez les eucaryotes et l'archée. Cependant, d'autres données existantes définissent le dCTP (Gon *et al.*, 2011), ou le dATP (Buckstein *et al.*, 2008) comme dNTP le plus abondant. D'autre part, le dNTP minoritaire est le dGTP (pour cinq types cellulaires), le dCTP est le moins abondant pour seulement deux types cellulaires, *E.coli* et les lymphocytes humains (Tableau II, page 27).

Pour finir chez l'archée *S. solfataricus*, le dATP est le moins abondant avec une concentration de 48 pmol pour 10^8 cellules contre 76 pmol pour 10^8 cellules pour le dTTP, le plus abondant.

Historiquement, il avait été proposé, chez le bactériophage T4, que l'abondance relative entre chaque dNTPs pouvait refléter le contenu en GC du génome, cependant cela n'a pas été validé chez *E. coli* ni même dans les cellules de mammifères (Hendricks and Mathews, 1997).

I.2.3. Quantification des nucléotides

Les concentrations en nucléotides intracellulaires peuvent être mesurées par plusieurs méthodes faisant intervenir soit des techniques enzymatiques soit des techniques de chromatographie. La méthode enzymatique est basée sur l'incorporation de désoxyribonucléotides radioactifs (dATP ou dTTP), par des ADN polymérases, dans un oligonucléotide servant de brin matrice. Le plus souvent l'ADN polymérase utilisée est le fragment de Klenow. (Ferraro *et al.*, 2010; Sherman and Fyfe, 1989). La seconde technique utilise le dosage par chromatographie. Celui-ci peut être basé sur l'utilisation d'une chromatographie sur couche mince ou sur l'utilisation d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC), (Bochner and Ames, 1982; Garrett and Santi, 1979). Cette dernière peut être suivie d'une quantification aux UV ou d'une quantification, plus sensible, par détection en spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) (Chen *et al.*, 2009; Henneré *et al.*, 2003).

L'utilisation d'une méthode plutôt qu'une autre peut avoir un impact sur le contenu cellulaire obtenu et donc donner des résultats quelques peu différents même au sein d'une même espèce. Cette variation est d'autant plus visible pour les dNTPs puisqu'ils sont peu abondants dans les cellules par rapport aux rNTPs, et donc plus difficilement détectables. Cela est bien visible sur la figure 4 ci-après. En effet, celle-ci représente la proportion de chaque dNTP chez *E. coli* calculée à partir des concentrations répertoriées dans le tableau II, page 27. Il apparaît que pour chaque contenu calculé, le dNTP le plus abondant est différent. Dans les résultats parus dans la publication de Gon *et al.*, 2011, le dCTP (57%) en rose est largement plus abondant que les trois autres dNTPs alors que dans celle de Bochner and Ames, 1982, le dATP (41%) en jaune est le plus abondant, et enfin, c'est le dTTP (36%) en bleu, dans la publication de Buckstein *et al.*, 2008, qui est le plus abondant. Plusieurs différences peuvent expliquer cette variation. Tout d'abord les techniques de quantification des dNTPs sont différentes, utilisant la HPLC-UV pour les deux plus récentes publications, (Buckstein *et al.*, 2008; Gon *et al.*, 2011), et la méthode enzymatique pour la

publication de Bochner and Ames, 1982. Cette différence peut aussi être liée à l'utilisation de l'unité de concentration intracellulaire (μM). En effet, celle-ci fait intervenir un volume cellulaire moyen et donc peut potentiellement générer des erreurs dues à une variation du volume de ces cellules. S'ajoute à ces paramètres, la faible abondance des désoxyribonucléotides qui rend leur détection difficile.

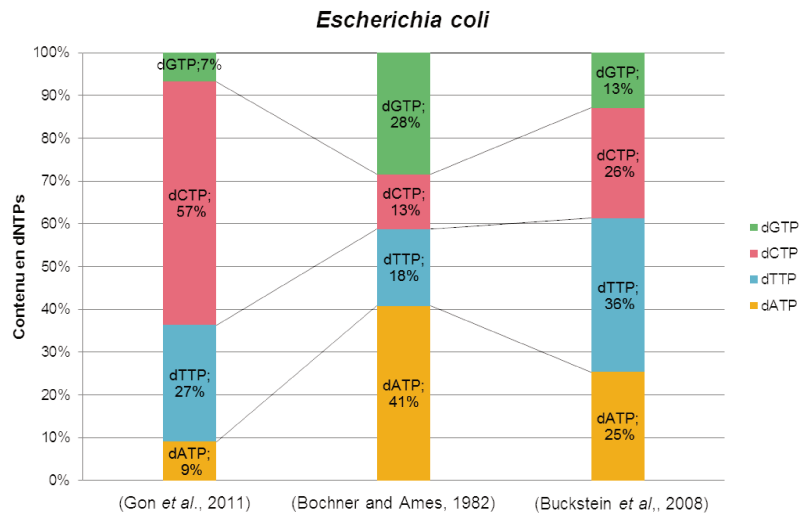


Figure 4: Histogramme représentant le contenu intracellulaire des dNTPs chez *Escherichia coli*.

En résumé, le contenu en rNTPs est largement supérieur à celui des dNTPs et le rATP est le ribonucléotide le plus abondant quel que soit le type cellulaire. Clairement, la différence entre les cellules s'observe sur les ratios des nucléotides (dNTPs et rNTPs) et les niveaux de concentration entre chaque dNTP ou rNTP.

Une fois synthétisés, ces dNTPs, dont la quantité a été finement régulée, comme vue ci-dessus, vont être utilisés comme précurseurs, pour former la molécule d'ADN. La quantité ainsi que la qualité des précurseurs nucléotidiques sont évidemment un gage d'une synthèse fidèle de l'ADN. Cependant un second groupe d'acteurs moléculaires tout aussi important et indispensable intervient, les ADN polymérases.

II - Les ADN polymérases

C'est en 1959, qu'Arthur Kornberg, obtient le prix Nobel de médecine, conjointement avec l'espagnol Severo Ochoa, pour la découverte du mécanisme biologique de la synthèse d'ADN et d'ARN. Ces travaux ont permis d'isoler et de purifier l'enzyme au cœur de la synthèse d'ADN : l'ADN polymérase (Kornberg *et al.*, 1956).

Au-delà de leur rôle physiologique dans le maintien de l'intégrité du génome durant la réplication et la réparation, les ADN polymérases sont très utilisées en biotechnologie dans des manipulations *in vitro*, de clonage, de séquençage et de mutagenèse.

II.1. Les ADN polymérases dans les trois domaines du vivant

L'ADN polymérase est ubiquitaire. Cependant il en existe différentes formes avec divers rôles. Elles sont classées en six familles (A, B, C, D, X et Y), à partir de leurs séquences en acides aminés (Braithwaite and Ito, 1993; Filée *et al.*, 2002) et de leurs structures en trois dimensions (Delarue *et al.*, 1990; Joyce, 1997). Chaque famille va contenir plusieurs ADN polymérases qui possèdent des fonctions distinctes dans la cellule. Pour chacune d'entre elles, la processivité, l'affinité pour le substrat, la fidélité et le taux d'extension est variable (Bebenek and Kunkel, 2004). Par ailleurs, des fonctions supplémentaires à celle de la synthèse de l'ADN leurs sont, pour certaines, allouées entre autres des activités exonucléases permettant la correction des erreurs, et donc leur conférant un rôle important dans la réparation du génome (Pavlov *et al.*, 2006).

Le tableau III, page 33, répertorie les ADN polymérases des trois domaines du vivant, leur place dans chaque famille et leurs fonctions principale et secondaire (Delagoutte, 2012).

Les ADN polymérases sont très diverses de par le nombre de familles, leur diversité de séquences en acides aminés, leurs rôles durant la réplication, la recombinaison ou la réparation (Tableau III), (Bebenek and Kunkel, 2004; Delagoutte, 2012). Malgré cette diversité, le mécanisme de synthèse d'ADN est conservé. En effet, l'incorporation de dNTPs se déroule de façon séquentielle et identique (Joyce and Steitz, 1994). La première étape sera la liaison de l'ADN polymérase à une structure particulière de l'ADN permettant de positionner le brin matrice et l'extrémité 3'OH du brin à étendre dans son site catalytique. La seconde, sera la sélection du dNTP complémentaire au nucléotide du brin matrice puis la formation de la liaison phosphodiester et le relargage de pyrophosphate (Yamtich and Sweasy, 2010). Dans ce processus, la sélection du « bon » nucléotide est une des conditions majeures de la fidélité de synthèse de l'ADN. La seconde étant l'excision des

mésappariements qui peut survenir, par l'activité 3'→5' exonucléase de certaines ADN polymérases, aussi appelée activité de relecture (Lo and Bessman, 1976). Ces deux caractéristiques sont sous l'influence de la concentration intracellulaire de chaque dNTP et donc de la régulation de leur biosynthèse comme vu au paragraphe précédent.

ADN polymérase	Famille	Fonction principale	Fonctions additionnelles
Bactérie			
Pol I	A	Maturation des fragments d'Okazaki NER : « Nucleotide Excision Repair »	5'→3' exonucléase 3'→5' exonucléase
Pol II	B	Translésion	3'→5' exonucléase
Pol III	C	Réplication	3'→5' exonucléase (sous unité ε)
Pol X	X	Gap filling	/
Pol IV	Y	Translésion	/
Pol V	Y	Translésion	/
Eucaryote			
Pol γ	A	Maintenance génomique de la mitochondrie	3'→5' exonucléase dRP lyase : deoxyribosephosphate lyase
Pol θ	A	Translésion BER : « Base Excision Repair »	dRP lyase : deoxyribosephosphate lyase Régulation du programme spatio-temporelle de la réplication
Pol v	A	Translésion	/
Pol α-primase	B	Activité primase	Synthèse d'ARN Synthèse ADN (réparation)
Pol δ	B	Réplication brin retardé NER : « Nucleotide Excision Repair » BER : « Base Excision Repair »	3'→5' exonucléase
Pol ε	B	Réplication du brin avancé	3'→5' exonucléase
Pol ζ	B	Translésion	/
Pol β	X	BER : « Base Excision Repair » Translésion Réparation cassure double brin	dRP/AP deoxyribosephosphate/ apurinic/apirimidinicylase
Pol λ	X	NHEJ : « nonhomologous end-joining » Excision Repair » V(D)J recombinaison	dRPLyase : deoxyribose phosphate lyase Terminal transférase Polynucléotide synthase
Pol μ	X	NHEJ : « nonhomologous end-joining » V(D)J recombinaison	Terminaltransférase
Pol σ	X	Cohésion des chromatidessoeurs	/
Pol η	Y	Translésion	/
Pol ι	Y	Translésion BER : « Base Excision Repair »	dRP lyase : deoxyribose phosphate lyase
Pol κ	Y	Translésion NER : « Nucleotide Excision Repair »	/
Pol REV1	Y	Translésion	/
Archée			
Pol B1	B	Réplication	3'→5' exonucléase
Pol B2	B	Réparation (Crenarchaea)	/
Pol B3	B	Réparation (Crenarchaea)	/
p41/p46		Activité primase Réparation ?	Synthèse ARN Synthèse ADN (réparation)
PolD	D	Réplication (Euryarchaea)	3'→5' exonucléase
Dpo4/Dbh	Y	Translésion (Crenarchaea)	/

Tableau III: Les ADN polymérases dans les trois domaines du vivant d'après Delagoutte, 2012.

II.2. La fidélité des ADN polymérases

II.2.1. La sélection des nucléotides

Les ADN polymérases ont une structure architecturale similaire composée de trois domaines nommé « doigts », « paume » et « pouce » (Joyce and Benkovic, 2004; Steitz, 1999). En réponse à l'arrivée et la liaison d'un dNTP, sélectionné selon les lois de complémentarité de bases Watson-Crick, un changement conformationnel s'opère. Ce changement affecte en majeure partie le domaine « doigts », qui va passer de sa forme dite « ouverte » à « fermé » seulement si le nucléotide sélectionné est correct.

Par ailleurs, comme vu précédemment, le contenu en rNTPs dans la cellule excède largement celui en dNTPs. La fidélité des ADN polymérases est donc mise à l'épreuve. Pour éviter l'incorporation erronée des ribonucléotides, les ADN polymérases ont évolué pour ne pas incorporer le nucléotide avec le mauvais sucre, c'est-à-dire avec un OH en position 2' du ribose (Joyce, 1997). Cette exclusion est permise grâce à la présence d'un déterminant structural, en général un acide aminé, communément appelé « steric gate », situé à l'entrée du site actif des ADN polymérases (Brown and Suo, 2011; Cavanaugh *et al.*, 2011; Cozens *et al.*, 2012; Donigan *et al.*, 2014; Nick McElhinny and Ramsden, 2003). Cet acide aminé est une glutamine pour les familles A (Astatke *et al.*, 1998; Patel and Loeb, 2000), une tyrosine ou une phénylalanine pour les familles B, X, Y et RT (Bonnin *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002). La figure 5 ci-après représente la structure 3D de l'ADN polymérase de la famille B de *Pyrococcus furiosus* où la tyrosine (409), en rouge, est majoritairement impliquée dans la discrimination du sucre des ribonucléotides.

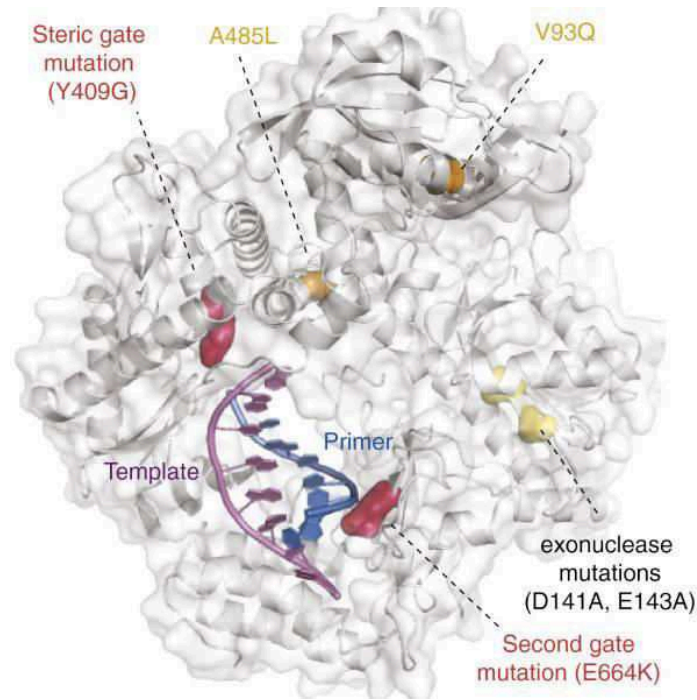


Figure 5: Structure 3D de l'ADN polymérase B de *Pyrococcus furiosus* (Cozens *et al.*, 2012).

Il a été prouvé que cette stratégie d'exclusion est très efficace puisque si l'acide aminé impliqué est muté, une forte diminution de celle-ci est observée (Nick McElhinny *et al.*, 2010b; Yang *et al.*, 2002).

Même si la présence de cet acide aminé est la stratégie de discrimination des ribonucléotides la plus répandue, toutes les ADN polymérases n'utilisent pas que celle-ci. Par exemple, pour l'ADN polymérase B de *Thermococcus gorgonarius*, c'est la combinaison de l'acide aminé impliqué dans le « stéricgate » (Y409) et d'un second présent dans le domaine appelé « pouce » (E664), qui permet d'éviter la synthèse ARN (Figure 5), (Cozens *et al.*, 2012). Chez les ADN pols de la famille X, comme la Pol λ , c'est un segment de quatre acides aminés (Y505-G508) qui jouerait le rôle de discrimination (Brown *et al.*, 2010; Pelletier *et al.*, 1994).

La maintenance de l'intégrité du génome dépend pour beaucoup de la fidélité des ADN polymérases. D'un autre côté, une plus faible fidélité des ADN polymérases est également un pré-requis pour certains processus de développement du système immunitaire (Friedberg *et al.*, 2002). Dans ces systèmes, ce sont les ADN pols de la famille Y, dites translesionnelles qui interviennent. Ces dernières ont en effet le taux de fidélité le moins élevé avec une erreur tous les 10^1 à 10^3 nucléotides incorporés, comparativement à des enzymes dites répliquatives comme les pols ϵ et δ qui en moyenne commettent une erreur d'incorporation seulement tous les 10^6 nucléotides (Cerritelli and Crouch, 2016). Cette forte

fidélité est en partie due à leur activité exonucléase 3'→5' (Kunkel, 2004; Morrison and Sugino, 1994; Morrison *et al.*, 1993).

II.2.2. L'activité de relecture des ADN polymérases

Lorsqu'une mauvaise insertion de dNTPs est détectée, les ADN polymérases possédant l'activité exonucléasique 3'→5', tableau III page 33, vont dégrader le brin nouvellement synthétisé par l'extrémité 3'-OH; c'est l'activité dite de « relecture » des ADN polymérases (Brutlag and Kornberg, 1972; Kunkel, 1988). Celle-ci peut permettre d'augmenter la fidélité des ADN polymérases. La Pol ϵ de la levure par exemple, en l'absence de l'activité exonucléasique 3'→5', se caractérise par une fidélité de synthèse diminuée de 10 à 100 fois (Shcherbakova *et al.*, 2003). Par ailleurs, les ADN polymérases sont complémentaires entre elles puisque une erreur faite par l'une peut être corrigée par une autre. C'est le cas, chez les eucaryotes avec la Pol δ qui corrige les erreurs d'incorporation faites par la Pol α ou encore celles de la Pol ϵ (Flood *et al.*, 2015; Pavlov *et al.*, 2006; Perrino *et al.*, 2005). De façon intéressante, la correction des erreurs de la Pol δ par la Pol ϵ n'a encore jamais été montrée.

III - Les systèmes de la maintenance génomique

Il vient d'être décrit les nucléotides, leurs synthèses, leurs abondances et leurs régulations. Puis les ADN polymérases, acteurs de la synthèse de l'ADN, ont été présentées. Etroitement liés, ces paramètres font partie de deux systèmes indispensables à la vie cellulaire que sont la réplication et la réparation de l'ADN.

La réplication est un système complexe, faisant intervenir de nombreux enzymes et facteurs, qui permettent la duplication correcte de l'information génétique. Ce système est hautement régulé et conservé dans toutes les formes de vie (O'Donnell *et al.*, 2013). Quel que soit le domaine, le processus répliatif est divisé en trois grandes étapes que sont : l'initiation, l'élongation et la maturation des fragments d'Okazaki, chaque domaine voire organisme ayant ses propres particularités.

L'ADN étant la molécule dite du vivant, elle ne doit pas seulement être correctement copiée mais aussi être maintenue stable tout au long du cycle cellulaire. Ainsi des mécanismes de surveillance et des points de transitions au cours du cycle permettent d'assurer le maintien de l'intégrité de l'ADN et la qualité de la réplication. Surtout bien décrit chez les eucaryotes, ces derniers permettent l'activation de mécanismes de réparation en maintenant la molécule

d'ADN intacte. Ainsi, les bactéries, les eucaryotes et les archées possèdent des enzymes assurant la réparation de l'ADN lors de l'apparition de dommages ou d'erreurs.

La réparation de l'ADN est comme la réplication un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs systèmes distincts mais pas complètement indépendants. Les voies de réparation vont différer selon le type de lésions et sont activées en fonction de la phase du cycle cellulaire (Morita *et al.*, 2010).

III.1. La réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant

La réplication est conservée dans les trois domaines du vivant. Cependant des différences existent et des études biochimiques, bio-informatiques, génétiques et structurales ont montré que le système répliatif des archées est plus proche d'un point de vue moléculaire de celui des eucaryotes que de celui des bactéries (Kelman and Kelman, 2014).

Les premières différences entre les trois domaines du vivant apparaissent dès le commencement puisque le processus débute à un endroit précis appelé origine de réplication. Unique chez les bactéries, celle-ci s'avère être multiple chez les eucaryotes. Les archées apparaissent comme des « hybrides » puisque selon les espèces, elle peut être unique ou multiple. Cette origine, chez les bactéries, les eucaryotes et les archées, est reconnue par des protéines ayant pour fonction le chargement des hélicases sur l'ADN permettant ainsi le déclenchement de la réplication (Tableau IV, page 39).

Chez les bactéries, c'est la protéine DnaA qui va reconnaître l'origine de réplication à laquelle va se fixer le complexe DnaB-DnaC enclenchant la pré-réplication (Davey *et al.*, 2002; Kaguni, 2011). Chez les eucaryotes, les origines sont reconnues par un complexe nommé ORC composé de six sous-unités, associé à la protéine Cdc6, puis l'hélicase MCM préalablement fixée à la protéine Cdt1 vont venir compléter le complexe de pré-réplication (Masai *et al.*, 2010; Stillman, 2005). Les archées quant à elles, ne possèdent pas de complexe ORC, mais des protéines dont les séquences sont très proches de ORC1 et Cdc6 et, selon les espèces, il peut y en avoir une ou plusieurs. Ces protéines vont permettre la reconnaissance de la ou des origines de réplication et le chargement de l'hélicase MCM (Felice *et al.*, 2004; Stillman, 2005).

A partir de cette étape, de façon spécifique aux eucaryotes et aux archées, les complexes de pré-réplication formés vont recruter les facteurs Cdc45 et les GINS afin de former le complexe de pré-initiation et permettre l'activation, chez les eucaryotes de l'hélicase (Onesti and MacNeill, 2013). En conséquence, l'ADN double brin est déroulé et les protéines SSB ou RPA, vont se fixer à l'ADN simple brin évitant ainsi le réappariement de la double hélice et

protégeant le simple brin des attaques enzymatique ou chimique (Dickey *et al.*, 2013). Ces protéines de protection et de stabilisation sont également présentes chez les bactéries (Tableau IV, page 39).

Une fois ces étapes de pré-réplication achevées et l'hélicase activée, l'ADN est prêt à être répliqué. La fourche de réplication est formée et les derniers composants formant ce qui est communément appelé, le replisome, sont recrutés permettant la synthèse des deux brins simultanément. Dans chaque cellule, il est composé de protéine SSB ou RPA, de primase et d'hélicase, du PCNA et de la protéine permettant son chargement ainsi que de l'enzyme au cœur de la synthèse d'ADN, l'ADN polymérase (Tableau IV).

Puisque les ADN polymérases répliquatives sont incapables de synthétiser une nouvelle chaîne d'ADN en l'absence d'une extrémité 3'-OH à partir d'un brin matrice, la réplication du génome commence par la synthèse de petites amorces ARN. Cette fonction est assurée par la DnaG chez les bactéries et le complexe p41/p46 chez les archées. La Pol α -primase, chez les eucaryotes, synthétise une amorce ARN-ADN, c'est l'étape d'initiation (Kuchta and Stengel, 2010; Le Breton *et al.*, 2007; McFadden and Denhardt, 1974). Il s'en suit alors l'étape d'élongation. Le brin dit, avancé, est répliqué de manière continue et le brin dit, retardé, de manière discontinue, en plusieurs fragments appelés fragments d'Okazaki. L'élongation est réalisée, chez les eucaryotes par les ADN polymérases de la famille B, Pol ϵ et Pol δ (Tableau III, page 33), allongeant les amorces ARN-ADN, respectivement, sur le brin avancé et retardé. Chez les bactéries c'est l'ADN polymérase Pol III qui réplique les deux brins ADN (O'Donnell *et al.*, 2013). Enfin, chez les archées, deux ADN polymérases différentes sont impliquées la PolB et la PolD chez les Euryarchées (Tableau III, page 33). Leurs différentes caractéristiques seront plus longuement explicitées dans la troisième partie de ce chapitre (page 57).

Les amorces ARN, au début de chaque fragment, nécessitent d'être enlevées et la brèche ainsi créée est comblée par de l'ADN puis liée au fragment le précédant. Cette dernière étape dite de maturation est accomplie par plusieurs enzymes : les ADN polymérases utilisent leur fonction de déplacement de brin pour déplacer le segment ARN et synthétisent la partie manquante en ADN. Puis l'amorce est coupée par la protéine Fen1 et enfin les extrémités des fragments d'Okazaki sont liées par une ADN ligase. Le PCNA intervient également dans cette étape en interagissant avec les différentes protéines permettant leur recrutement séquentiel (Balakrishnan and Bambara, 2013; Beattie and Bell, 2012; Henneke, 2012).

Le tableau IV ci-après répertorie les enzymes intervenant dans les différentes étapes de la réplication, décrites ci-dessus, dans les trois domaines du vivant.

Domaine	Bactérie	Eucaryote	Archée	
			Euryarchaea	Crenarchaea
Chromosome	Circulaire	Linéaire	Circulaire	Circulaire
Vitesse moyenne de réplication (kb/min)	20	0.5 - 5	20 (<i>P. abyssii</i>)	15 (<i>S. solfataricus</i>)
Pré-Réplication				
Origine de réplication	Unique	Multiple	Unique ou Multiple	Unique ou multiple
Reconnaissance de l'origine de réplication	Dna A	ORC (Origin Recognition Complex)	Cdc (Cell division cycle)6/ORC1	Cdc6 WhiP
Ouverture du double brin d'ADN : Hélicase	DnaB	MCM (MiniChromosome Maintenance)	MCM	MCM
Protéine chargeant l'hélicase sur l'ADN	DnaC	Cdc6 Cdt1 (Chromatin Licensing And DNA Replication Factor 1)	Cdc6	Cdc6
Pré-Initiation				
Cdc45	/	Cdc45	Cdc45-like	Cdc45-like
GINS	/	GINS (du japonais go-ichi-ni-san)	GINS	GINS
Protéine de protection de l'ADN simple brin	SSB (Single-Stranded Binding protein)	RPA (Replication Protein A)	RPA	SSB
Initiation/Elongation				
Taille des fragments d'Okazaki	1-2 kb (<i>E. coli</i>)	125 nt (<i>S. cerevisiae</i>)	120 nt (<i>P. abyssii</i>)	
Primase	DnaG	Pola/primase	Primase p41/p46	Primase p41/p46
Protéine d'encerclage de l'ADN	β -clamp	PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	PCNA	PCNA
Protéine chargeant le PCNA ou la « β -subunit » sur l'ADN	Gamma-complex	RFC (Replication Factor C)	RFC	RFC
ADN polymérase	PolIII (famille C)	PolB	PolB/PolD	PolB
Maturation des fragments d'Okazaki				
Suppression du primer ARN	RNase H (Poll)	Fen1 (Flap Endonucléase)	Fen1 (Flap Endonucléase)/(Dna2?)	Fen1 (Flap Endonucléase)/RNaseHII
Synthèse des dNTPs manquants	Poll (Famille A)	PolB	PolB/PolD	PolB
Liaison des fragments	ADN ligase NAD ⁺ -dépendante	ADN ligase ATP-dépendante	ADN ligase ATP-dépendante	ADN ligase ATP-dépendante

Tableau IV: Les caractéristiques de la réplication de l'ADN dans les trois domaines du vivant d'après Kelman & Kelman, 2014.

A la fin de la réplication complète du génome, il est nécessaire que le système s'arrête et que le replisome soit dissocié de l'ADN. Chez les Bactéries, il a été identifié sur le chromosome une région nommée « *ter* ». Cette séquence est reconnue par une protéine dite de terminaison (Tus) dont la fonction est de bloquer la progression de la fourche de réplication (Reyes-Lamothe *et al.*, 2012). Chez les eucaryotes, il a également été identifiés des régions dites de terminaison, jusqu'à 71 chez la levure (Fachinetti *et al.*, 2010). Les informations concernant cette étape sont plus limitées chez les Archées. Une étude a montré que chez *S. solfataricus*, ce serait l'entrée en collision de deux fourches de réplication qui serait le signe de la terminaison (Duggin *et al.*, 2011). Cela suggérerait donc que ce ne serait pas lié à un site spécifique sur le chromosome comme chez les bactéries et les eucaryotes.

III.2. La réparation de l'ADN dans les trois domaines du vivant

Avant, pendant ou après la réplication, l'ADN est continuellement soumis à des agents enzymatiques, chimiques ou physiques qui peuvent altérer son intégrité. Certains sont internes à la cellule comme par exemple le stress oxydatif venant de l'activité métabolique de la cellule ou encore les erreurs d'incorporation en nucléotides par les ADN polymérases. D'autres proviennent de l'environnement externe comme les UV, les radiations ionisantes ou certains agents chimiques génotoxiques (Morita *et al.*, 2010). Tous ces stress peuvent provoquer des lésions de l'ADN, des mutations, des dégradations, des cassures simple ou double brins. Pour permettre leur survie, les cellules prennent en charge ces lésions grâce à différentes voies de réparation (Bray and West, 2005). La voie choisie dépendra du type de lésion et de la phase du cycle cellulaire. Beaucoup de ces voies requièrent une synthèse d'ADN et donc l'utilisation d'ADN polymérases qui se retrouvent de nouveau au cœur d'un système de maintenance génomique : la réparation de l'ADN.

Ainsi les ADN polymérases vont évoluer dans des systèmes, de façon non exhaustive, de réparation par excision de nucléotide (NER), de réparation par excision de base (BER), de réparation de cassures double ou simple brins (DSBR et SSBR), de réparation des mésappariements (MMR) (Morita *et al.*, 2010).

Au-delà, les ADN polymérases vont également participer à des systèmes permettant la tolérance des lésions ADN que sont la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS) et le remplissage de brèche post-répliatif. Certaines ADN polymérases sont dédiées à cette activité de translésion, comme la Pol IV et la pol V chez *E. coli* (Fuchs *et al.*, 2004), ou la Pol η et la Pol κ chez l'eucaryote (Waters *et al.*, 2009) (Tableau III, page 33). Elles vont

remplacer les ADN polymérase répliquatives bloquées lors de la présence d'un dommage dans l'ADN et ainsi éviter l'arrêt de la fourche de répliquation.

Comme dit précédemment, de nombreux dommages peuvent survenir dans l'ADN, l'un d'entre eux intéressent depuis quelques années les chercheurs : les ribonucléotides. Ces derniers représentent le « dommage » le plus abondant de l'ADN (Wallace and Williams, 2014), expliquant l'intérêt croissant qui lui est porté ces dernières années (Nick McElhinny *et al.*, 2010a).

Deuxième partie : Les ribonucléotides dans l'ADN

Présents dans l'ADN à cause d'une mauvaise discrimination des ADN polymérases ou suite à un dommage oxydatifs provoquant leurs formation, les rNMPs pourtant précurseurs de l'ARN se retrouvent être abondants dans l'ADN. Cette présence pouvant être considérée comme anormale et donc potentiellement dangereuse pour le génome, à pousser le monde scientifique à s'y intéresser. Causes et conséquences mais aussi voies d'élimination ont alors été explorées. Dans cette partie un état des lieux de cet aspect de la maintenance génomique est dressé.

I - Pourquoi les ribonucléotides sont-ils présents dans l'ADN ?

L'existence des ribonucléotides au sein de l'ADN s'explique par des défaillances de certaines étapes de la machinerie réplivative, post-réplivative, de la réparation de l'ADN ou par l'impact du contenu en nucléotide dans la cellule. Il a été estimé que, chez la bactérie *E. coli*, cette incorporation serait de l'ordre de 2 000 rNMPs à chaque cycle répliatif dans un génome de 4.6Mb. Chez l'eucaryote *S. cerevisiae* 13 000 rNMPs seraient incorporés dans un génome de 12Mb (Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Rowen and Kornberg, 1978; Schroeder *et al.*, 2015).

I.1. Mauvaise élimination des fragments d'Okazaki

Il est depuis longtemps connu que la répliation du génome commence par la synthèse de petites amorces ARN servant à initier l'élongation des brins avancés et retardés par les ADN polymérases réplivatives. Cette fonction, comme vu page 37, est assurée par la DnaG chez les bactéries, la fonction primase du complexe Pol α -primase chez les eucaryotes et le complexe p41/p46 chez les Archées (Tableau IV, page 39). À chaque cycle répliatif, de nombreux fragments ribonucléotidiques sont donc incorporés, représentant une source d'incorporation majeure de ribonucléotides dans l'ADN génomique. Toutefois, ces amorces sont rapidement et efficacement retirées par différents systèmes enzymatiques mettant en jeu des nucléases comme Pol I et Fen1 (Tableau IV, page 39) (Balakrishnan and Bambara, 2013).

Cependant une défaillance dans le système enzymatique d'élimination des fragments ARN est possible et la présence de ribonucléotides dans l'ADN peut ainsi, être la conséquence d'une maturation incomplète des fragments d'Okazaki (Rumbaugh *et al.*, 1997). Il est montré

dans cet article de 1997, que l'ADN ligase I, des eucaryotes est capable de ligaturer une extrémité 5'-Phosphate monoribonucléotidique et une extrémité 3'-OH du brin d'ADN précédant et ceci malgré la présence de l'enzyme clef du processus d'excision, Fen1/Rth1. Ainsi, leurs travaux démontrent la forte possibilité de la présence de ribonucléotides dans l'ADN mais cet événement n'est pas l'unique.

I.2. Incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases

Comme montré dans la première partie de ce chapitre, la fidélité des ADN polymérases est mise à l'épreuve par la très forte abondance de rNTPs dans la cellule. Chez les bactéries et les eucaryotes, plusieurs études ont montré que malgré la présence sur les ADN polymérases d'un site d'exclusion stérique de rNMPs (ou « steric gate », page 34) permettant de pallier à leur incorporation dans l'ADN, cette discrimination n'est pas absolue (Bergoglio *et al.*, 2003; Heider *et al.*, 2017; Nick McElhinny *et al.*, 2010a).

En 1972, il était déjà prouvé qu'une ADN polymérase bactérienne pouvait incorporer des ribonucléotides. En effet, l'ADN polymérase Pol I, de la famille A, d'*Escherichia coli* est capable d'incorporer des rNMPs lors d'une synthèse ADN. De façon intéressante il a été remarqué que c'était en particulier le rCMP et le rGMP qui étaient incorporés, alors que le rAMP ne l'était que très faiblement et le rUMP pas du tout (Van de Sande *et al.*, 1972). Toujours chez *Escherichia coli*, plus récemment, il a été montré que l'ADN Pol III, de la famille C, incorpore également des rNMPs lors de la synthèse d'ADN et, contrairement à la Pol I, c'est le rAMP qui est le plus inséré, le rUMP étant toujours le moins incorporé. Toutefois, il a été décrit que la sélectivité d'un dNMP au site actif était fortement supérieure à celle d'un rNMP. Il est intéressant de noter que la sélectivité d'un dTMP contre un rUMP est 18 à 30 fois plus élevée que pour les autres dNMP et rNMP (Yao *et al.*, 2013).

Chez l'Eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*, il a été identifié que les ADN polymérases α , δ et ϵ pouvaient également incorporer des ribonucléotides lors de la synthèse ADN. Ici encore, la sélectivité d'un dNMP est plus importante que celle d'un rNMP et va varier selon l'ADN polymérase et la nature du rNMP. La sélectivité d'un dTMP contre un rUMP étant toujours la plus élevée (Nick McElhinny *et al.*, 2010a).

Très récemment il a été montré, cette fois chez une archée hyperthermophile, *Thermococcus* *ssp.* 9°N, que deux ADN polymérases, PolD et PolB (Tableau III, page 33), sont capables d'incorporer des ribonucléotides à une fréquence de 1 tous les, respectivement, 1500 à 2000 nucléotides (Heider *et al.*, 2017).

Par ailleurs, d'autres ADN polymérases, impliquées notamment dans la réparation, et ayant des spécificités de substrats moins importantes ne sont pas capables de discriminer les rNMPs. C'est le cas de l'ADN polymérase μ , de la famille X, qui incorpore de façon aussi efficace les dNMPs que les rNMPs. En effet, cette dernière possède une glycine là où la Pol β et la Pol λ de la même famille possède une tyrosine leur servant de « steric gate » (Ruiz *et al.*, 2003). La Pol μ a ainsi une abilité à exclure les ribonucléotides qui est diminuée de 1000 fois par rapport à la Pol β (Nick McElhinny and Ramsden, 2003).

Dans chacun des trois domaines du vivant les ADN polymérases ont été montrées comme étant capable d'insérer des ribonucléotides. Selon les familles, la nature du ribonucléotide, le rôle de l'ADN polymérase, la fréquence d'insertion va être plus ou moins élevée. Mais un paramètre reste commun à toutes ces enzymes : le contenu en nucléotides.

I.3. Impact du contenu en nucléotides de la cellule

Comme vu dans la première partie de ce chapitre, la concentration en ribonucléotides dans les cellules est bien supérieure à celle en désoxyribonucléotides (Tableau II, page 27) ce qui peut jouer un rôle important dans leur incorporation par les ADN polymérases. Par ailleurs, cette différence varie au cours du cycle cellulaire. En effet, la concentration en dNTPs en dehors de la phase de réplication de l'ADN est moins importante que celle en phase S, alors que la concentration en rNTPs reste constante au cours du cycle cellulaire (Hofer *et al.*, 2012; Lundin *et al.*, 2010; Nordlund and Reichard, 2006; Reichard, 1988; Traut, 1994). Cela suggère que l'incorporation des rNMPs pourrait être plus importante durant la réparation de l'ADN se déroulant hors de la phase réplivative puisque les ADN polymérases voient leur sélectivité mise plus fortement à l'épreuve.

I.4. Formation de ribonucléotides dans l'ADN

Il a pu être observé que des dommages oxydatifs sur l'ADN pouvaient conduire à la formation de rNMPs. *In vitro*, l'ADN soumis au Fe^{2+} et au H_2O_2 provoque une réaction permettant la création d'un groupement hydroxyle en 2' du ribose. *In vivo*, sur des reins de rat, une exposition au Ferricnitrilotriacetate (Fe-NTA) induirait la formation de rGMP dans l'ADN (Randerath *et al.*, 1992). Cette formation spontanée de ribonucléotides reste, certainement, la source la moins importante de la présence de ribonucléotides dans l'ADN.

II - Systèmes permettant l'élimination des ribonucléotides de l'ADN

Puisque la présence du 2'hydroxyle rend les acides nucléiques moins stables (Oivanen *et al.*, 1998), l'élimination correcte de ces derniers de l'ADN est essentielle pour le maintien de l'intégrité génomique. On distingue différents mécanismes de réparation faisant intervenir diverses enzymes : les ribonucléases (RNase H), des nucléases, des ADN polymérases ou encore des ADN ligases (Heider *et al.*, 2017; Sparks *et al.*, 2012; Vaisman *et al.*, 2014).

II.1. Réparation par excision de ribonucléotides (RER)

II.1.1. Les ribonucléases (RNaseH)

Les RNases H sont des enzymes coupant les ARN des hybrides ADN:ARN. Elles ont de nombreux rôles dans la réplication, la réparation et la transcription. Il en existe deux types. Le type 1, présente dans les trois domaines du vivant et le type 2 comprenant deux sous-groupes, la RNase HII chez les bactéries et les archées ou la RNase H2 chez les eucaryotes et la RNase HIII présente seulement chez les bactéries. Malgré des séquences différentes en acides aminés, ces deux types (1 et 2) possèdent des mécanismes enzymatiques similaires (Cerritelli and Crouch, 2009; Ohtani *et al.*, 2004; Tadokoro and Kanaya, 2009).

La RNase H de type 1 reconnaît et excise les hybrides ADN:ARN avec au moins quatre résidus ARN mais ne peut pas catalyser la suppression d'un seul rNMP dans l'ADN. Cette catalyse est assurée par la RNase H de type 2 qui coupe en 5' du rNMP amorçant ainsi le système de réparation RER, réparation par excision de ribonucléotides (Sparks *et al.*, 2012). La RNase H de type 1 est, entre autre, impliquée dans le retrait des « R-loop » (Hong *et al.*, 1995; Kogoma *et al.*, 1993). La RNase H de type 2 est impliquée en renfort ou en coopération dans le processus de maturation des fragments d'Okazaki (Bubeck *et al.*, 2011; Henneke, 2012).

II.1.2. La voie RER amorcée par la RNase HII

La voie RER, permettant d'enlever des monoribonucléotides de l'ADN et de les remplacer par des désoxyribonucléotides, fait intervenir plusieurs enzymes. Le mécanisme est conservé dans les trois domaines du vivant. La figure 6 ci-après, issue de l'article Heider *et al.*, 2017, les représente avec leurs différents acteurs. Cette voie débute par une coupure en 5'phosphate du rNMP, effectuée par la RNase H type 2. Cette dernière est une enzyme constituée de trois sous-unités chez les eucaryotes (Figure 6A) dont la sous-unité catalytique, RNaseH2A (Jeong *et al.*, 2004). Les RNases H archéennes et bactériennes sont

elles monomériques (Figure 6A,B) (Muroya *et al.*, 2001; Tadokoro and Kanaya, 2009). Suite à cette coupure, une extension et un déplacement de brin sont effectués par, une ADN polymérase. Chez les archées ce serait une ADN polymérase de la famille B qui permettrait cela tout comme chez les eucaryotes (Pol δ ou ϵ), alors que chez les bactéries c'est la Pol I de la famille A qui jouerait ce rôle (Heider *et al.*, 2017; Nick McElhinny *et al.*, 2010b; Vaisman *et al.*, 2014). Cette dernière est également impliquée dans l'étape suivante de clivage du brin déplacé alors que chez les eucaryotes et les archées c'est la Fen1 qui excise ce brin. Pour finir, l'intervention d'une ADN ligase est nécessaire afin de reconstituer un brin d'ADN intègre.

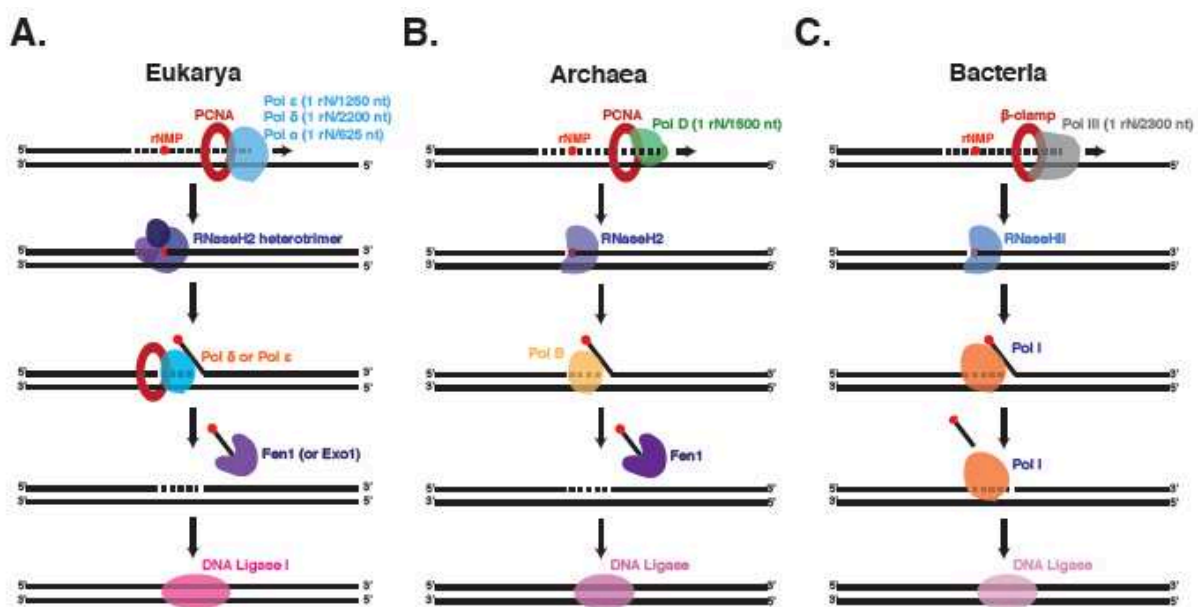


Figure 6: Schémas de la voie de réparation par excision de monoribonucléotides dans les trois domaines du vivant issu de Heider *et al.*, 2017. (A) RER chez les eucaryotes, (B) RER chez les archées, (C) RER chez les bactéries.

II.2. Des systèmes secondaires

La voie RER, décrite ci-dessus, est la voie principale permettant de retirer les monoribonucléotides de l'ADN double brin. Cependant, des mécanismes alternatifs sont également impliqués.

II.2.1. Réparation par excision de nucléotide (NER)

Comme brièvement évoqué dans la première partie de ce chapitre, de nombreuses voies de réparation existent. L'une d'entre elle est la réparation par excision de nucléotide ou NER. Chez les bactéries, il a été montré, *in vitro*, la contribution de ce système dans la

reconnaissance et l'excision par le complexe endonucléase UvrABC, de rNMPs dans l'ADN double brin. Plus précisément, UvrABC est capable d'exciser un, deux ou cinq rNMPs de l'ADN. Il semblerait également que l'une des protéines du complexe, UvrB, serait impliquée dans la reconnaissance du 2'hydroxyle. *In vivo*, l'étude montre que cette voie NER médiée par le complexe UvrABC servirait de renfort à la voie RER de la RNase HII (Cai *et al.*, 2014; Vaisman *et al.*, 2013). Chez les eucaryotes, sur des cellules humaines, il a été montré que les ribonucléotides n'étaient pas efficacement retirés de l'ADN par le système NER (Lindsey-Boltz *et al.*, 2015).

II.2.2. La voie RER amorcée par la Topoisomérase I (Top 1)

Chez les eucaryotes, la topoisomérase, Top1, est une enzyme connue pour contrôler la topologie de l'ADN. Mais au-delà de son activité principale de relâchement de l'hélice ADN, cette dernière est également capable de couper l'ADN en 3' d'un ribonucléotide et donc d'initier leur mécanisme d'élimination de l'ADN (Kim *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013). Lorsque la Top1 coupe le ribonucléotide, un cycle se forme entre le 2'-OH et le 3'phosphate créant une coupure. Une seconde excision de la Top1 apparaît alors en amont de la première créant une brèche. Celle-ci est prise en charge et comblée par un système mettant en jeu l'hélicase Srs2, la nucléase Exo1 et l'ADN polymérase δ . Cependant par un processus de réalignement, ce système peut aussi conduire à une délétion de 2 à 5 bases et donc induire une instabilité génomique. Ce système secondaire de réparation peut donc conduire à une réparation sans erreur ou mutagénique (Kim *et al.*, 2011).

II.2.3. Activité de relecture des ADN polymérases

Comme vu dans la partie I de ce chapitre, les ADN polymérases sont capables, si elles possèdent l'activité 3'→5' exonucléase, de retirer immédiatement après leur incorporation un dNMP mal apparié. Il a été montré que cette fonctionnalité des ADN pols pouvait également être utilisée pour corriger l'incorporation erronée d'un rNMP. En effet la Pol ϵ , est capable de retirer un ribonucléotide mésapparié (Williams *et al.*, 2012) même si cette activité de relecture a été démontrée moins efficace pour l'excision d'un rNMP que pour un dNMP. En effet, la Pol ϵ retire un tiers des rNMPs contre 92% des dNMPs mal incorporés (Shcherbakova *et al.*, 2003). Cependant, l'identité de la base sélectionnée semble également jouer un rôle important puisque le rUMP s'avère être plus efficacement éliminé que les trois autres ribonucléotides (Williams *et al.*, 2012).

Tous ces mécanismes enzymatiques montrent que les ribonucléotides sont pour la majorité efficacement retirés de l'ADN. Cela sous-entend que leur présence est potentiellement délétère pour la survie cellulaire. D'un autre côté leur fréquence d'incorporation élevée dans

l'ADN génomique peut aussi soulever la question d'un ou plusieurs possibles rôles bénéfiques de leur présence pour la cellule.

III - Conséquences de la présence de rNMPs dans l'ADN

Si les ribonucléotides ne sont pas retirés de l'ADN, quelles en sont les conséquences ? Cette présence « anormale » dans la molécule, dite du vivant, a poussé les scientifiques à se poser de nouvelles questions.

III.1. Impact sur l'intégrité de l'ADN

L'ARN, est plus sensible à l'hydrolyse que l'ADN. En effet, ce dernier, en raison de la présence d'un groupement hydroxyle en 2' de son ribose possède un fort potentiel d'attaque nucléophile. L'ARN est ainsi 100 000 fois plus susceptible d'être hydrolysé spontanément que l'ADN (Li and Breaker, 1999; Oivanen *et al.*, 1998). Si un rNMP est présent dans l'ADN cela peut donc, par hydrolyse, créer des cassures simple brin pouvant conduire à des cassures doubles brins létales pour la cellule.

D'autre part, un rNMP peut créer un changement de la structure hélicoïdale de l'ADN de la forme B vers la forme A. Même si cette variation est proportionnelle au nombre de ribonucléotides présents, elle reste limitée. En effet, il a été observé que 50% de rNMPs ne permettent pas la conversion de l'ADN en forme A (Ban *et al.*, 1994; DeRose *et al.*, 2012; Egli *et al.*, 1993). Leurs présences peuvent également altérer les propriétés élastiques de l'ADN (Chiu *et al.*, 2014).

Enfin, la formation de la chromatine peut aussi être altérée par la présence de ribonucléotides qui affecterait la formation des nucléosomes. 5% de rNMPs dans l'ADN suffirait à stopper leurs formations (Dunn and Griffith, 1980; Hovatter and Martinson, 1987).

Toutes ces modifications structurales peuvent donc avoir un impact sur des processus génétiques clefs telles que la transcription, la réparation ou encore la réplication de l'ADN.

III.2. Impact sur la réplication de l'ADN

Au-delà des modifications structurales de l'ADN, la présence des ribonucléotides peut également avoir des conséquences sur la réplication en gênant la progression des ADN polymérases. Il a été observé, *in vitro*, que les ADN polymérases Pol ϵ eucaryote et Pol III bactérienne, sont ralenties lors de la réplication d'une matrice ADN contenant un ribonucléotide G comparativement à la même matrice contenant un désoxyribonucléotide G

(Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Williams *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013). Ce ralentissement de la synthèse globale d'ADN par les ADN polymérases, causé par les ribonucléotides génomiques, pourrait ainsi avoir un impact sur la progression de la fourche de réplication. Cependant, les ADN polymérases sont tout de même capables de passer un ribonucléotide, la question de la fidélité d'incorporation nucléotidique se pose donc: est-ce que la complémentarité des bases est respectée ?

III.3. Impact sur la santé et maladies

Les rNMPs sont incorporés en nombre dans l'ADN, puis retirés de façon efficace par plusieurs systèmes enzymatiques dont le principal, le RER est initié par les RNases H de type 2 (Figure 6, page 46). Chez l'homme, une mutation dans un des gènes codant les sous-unités de cette enzyme provoque son inactivation. Cela induit une élimination insuffisante des ribonucléotides insérés, et donc leur accumulation dans l'ADN. Il s'en suit alors une réponse inflammatoire pouvant avoir de nombreux effets neurologiques et développementaux graves, c'est le syndrome d'Aicardi-Goutières ou AGS (Crow *et al.*, 2006; Pizzi *et al.*, 2015). Ce serait une maladie génétique héréditaire de type autosomique récessif, quelques cas nouveaux dominants ayant tout de même été détectés mais restant minoritaire (Crow *et al.*, 2016). Cette mutation a également été pointée comme pouvant être impliquée dans une maladie auto-immune multifactorielle, le lupus érythémateux systémique (SLE) (Günther *et al.*, 2015).

III.4. Bénéfices

La question se pose tout de même de savoir, si les ribonucléotides étaient si délétères pour la cellule. Est-ce que les ADN polymérases n'auraient pas évolué pour éviter toute incorporation dans le génome. La réalité est que cette insertion peut persister, ainsi la présence de ribonucléotides s'avère avoir une utilité dans certains processus cellulaires.

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, lors de la réplication de l'ADN, l'avancée de la fourche est bloquée par la présence de deux rNMPs au niveau du locus *mat1*. Issus de la maturation incomplète des fragments d'Okazaki du cycle cellulaire précédent, ils représentent un marquage spécifique d'une seule des deux chromatides répliquées. Ce mécanisme épigénétique, nommé en anglais « imprinting », servirait ainsi à différencier les deux chromatides sœurs (Sayrac *et al.*, 2011).

D'autre part, il a été remarqué que les précurseurs ribonucléotidiques pouvaient également être utilisés dans des voies de réparation et de translesion de l'ADN (Williams *et al.*, 2016). L'incorporation des rNMPs par l'ADN polymérases ϵ (Lujan *et al.*, 2013) a également été

proposée comme pouvant être un marquage du brin nouvellement synthétisé et, tout comme l'hémi-méthylation, servir de signal pour la voie de réparation des mésappariements (MMR) (Lujan *et al.*, 2013).

Pour finir, lors de la voie de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), l'ADN polymérase Pol μ des eucaryotes, impliquée dans ce mécanisme, incorpore des rNMPs. Comme vu précédemment cette dernière incorpore avec autant d'efficacité les rNMPs que les dNMPs. Il est suggéré que l'incorporation de rNMPs représenterait un marquage aux extrémités des sites de jonction (Martin *et al.*, 2013).

Troisième partie : Présentation des objectifs, du modèle cellulaire, et des acteurs moléculaires de cette étude

I - Présentation générale de l'étude

Comme exposé ci-dessus, les études récentes de ce nouvel aspect de la maintenance génomique concernant les causes et les conséquences de l'incorporation de rNMPs dans l'ADN ont été menées principalement chez l'eucaryote et la bactérie mais restent encore peu explorées dans le troisième domaine du vivant que sont les archées. Il semblait donc nécessaire de s'y intéresser. Pour cela de nombreuses questions se présentaient, comme celles de l'incorporation aux conséquences physiologiques, en passant par la réparation. Pour répondre à ces questions, le modèle d'étude archéen choisi est une souche hyperthermophile issue des environnements marins profonds, connue et étudiée depuis une vingtaine d'année au Laboratoire des Environnements Extrêmes (LM2E), *Pyrococcus abyssi*. Puisque peu de données existent sur le contenu en précurseurs nucléotidiques chez les archées, la première partie de cette thèse a été consacrée à leur quantification. Puis celui-ci a été utilisé pour étudier le comportement des trois ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi* durant la synthèse d'ADN. Enfin, au vue des récents résultats, il a été regardé si celles-ci étaient capables d'incorporer des rNMPs ainsi que de répliquer un brin matrice ADN contenant des ribonucléotides. Par ailleurs, au regard des possibilités d'activation de la fonction de relecture des ADN polymérases (familles B et D) une étude de la fonction exonucléasique de l'ADN PolD a été initiée. Cette étude s'implique dans un projet plus global de caractérisation de l'activité de la petite sous-unité faisant suite à la détermination récente de la structure cristallographique de l'ADN polymérase PolD (Sauguet *et al.*, 2016) .

Enfin, au cours de cette thèse j'ai répondu positivement à une sollicitation de caractérisation fonctionnelle de mutants ADN polymérases (famille B) en technique de PCR. Il est important de souligner que cette famille d'ADN pols thermostable, en particulier la PolB de *Pyrococcus abyssi*, représente un outil important de la biologie moléculaire (Dietrich *et al.*, 2002). Celle-ci est l'objet du chapitre IV de ce manuscrit.

II - Les abysses, les Archées, *Pyrococcus abyssi*

Représentant 80 % de la surface des océans, les abysses sont des endroits couverts de mystères. Définis comme les fonds océaniques de plus de 2 000 mètres de profondeur, ils

sont difficilement accessibles (Vinogradova, 1961). Les fonds océaniques abyssaux sont en grande partie formés par les plaines abyssales, de vastes étendues tapissées de sédiments mais il existe des dorsales et des failles qui viennent découper ce paysage lunaire. Le point le plus profond est la fosse des Mariannes dans l'océan pacifique avec des profondeurs allant à plus de 10 000 mètres. Dans ces environnements aux conditions de vie paraissant hostiles, où règnent une obscurité totale, la vie y est pourtant présente (Glud *et al.*, 2013).

II.1. La découverte de la vie dans les abysses

« Quelle est l'extrême limite pour la vie sous-marine ? » est la question sous-jacente à la découverte des abysses.

C'est au XIX^e siècle lors d'une campagne anglaise (de 1872 à 1876), sous la direction de Charles Wyville Thomson, qu'il a été remonté à la surface des animaux provenant de 5 500 mètres de profondeur, la plus grande profondeur jusqu'alors jamais atteinte. Ceci met un terme à la théorie de Edward Forbes qui avait décrit de façon théorique que la vie disparaissait à partir de 550 mètres de profondeur. À partir de là, les campagnes se sont poursuivies jusqu'à la seconde guerre mondiale avec par exemple le Prince Albert de Monaco qui ramène en 1901 des poissons et crustacés de 6 035 mètres de profondeur. Puis une campagne Danoise entre 1950 et 1952 à bord du navire *Galathea* permet d'affirmer qu'il y a de la vie au-delà de 6 000 mètres de profondeur. Mais cela ne suffit pas, les hommes veulent voir, observer de leurs propres yeux. Le premier à descendre sera donc, l'américain William Beebe, en 1934, allant à une profondeur de 908 mètres à bord de sa bathysphère. Puis le 23 janvier 1960, Jacques Piccard, fait une descente à 10 910 mètres dans la fosse des Mariannes. Tous observeront des organismes vivants.

Cependant malgré ces observations, les scientifiques restent persuadés que la vie est liée à la lumière du soleil. Il faudra attendre 1977, que le sous-marin Alvin, descende à 2 500 mètres de profondeur, le long de la dorsale des Galapagos, et permette la découverte d'une profusion de vie dans ses milieux si hostiles ! (Fox *et al.*, 1977).

II.2. La vie en milieux extrêmes

De par la profondeur, la pression dans les abysses est importante. C'est une des conditions extrêmes de la vie dans ces milieux, à cela s'ajoute l'obscurité, l'absence d'oxygène, des gradients de températures allant de 4°C à 400°C. Malgré tout, la vie y est présente et en particulier à proximité de cheminées crachant des fluides toxiques à plus de 350°C : les cheminées hydrothermales (Corliss *et al.*, 1979; Lutz and Kennish, 1993).

Tous ces organismes vivant dans des conditions environnementales différentes des standards, sont dits extrêmophiles et peuvent revêtir un, voire plusieurs caractères différents. Ils sont alors nommés piezophiles lorsqu'ils résistent à une forte pression, thermophiles à une haute température, halophiles à une forte salinité ou encore acidophiles à un pH acide. Parmi ces micro-organismes figurent les archées.

II.3. Les Archées

II.3.1 La découverte des Archées et leur classification

La première trace de la vie sur Terre remonte à 2.5/3.9 milliards d'années (Brasier *et al.*, 2002; Schopf and Packer, 1987) soit une « généalogie » de près de 4 milliards d'années à déterminer. Cette classification a changé de nombreuses fois au cours des siècles et évolue encore aujourd'hui. Durant des décennies la distinction entre les espèces s'est faite sur la présence ou non d'un noyau enfermant le matériel génétique dans la cellule. Celles en possédant un étant nommées eucaryotes et les autres procaryotes (Sapp, 2005). Mais les avancées technologiques ont permis en 1977, à Carl Woese et son équipe, par des approches de comparaison de séquences d'ARN16S, de déterminer non seulement que des microorganismes anaérobies strictes et producteurs de méthane, les méthanogènes, formaient un groupe phylogénétique cohérent mais également qu'ils se distinguaient du groupe des bactéries (Fox *et al.*, 1977). En 1990 un nouvel arbre avec trois domaines a été proposé intégrant ainsi le fait que, au sein des procaryotes, se trouvait en réalité deux domaines distincts : les bactéries et les archées (Woese *et al.*, 1990), (Figure 1 page 16). Aujourd'hui encore le positionnement des différents domaines sur l'arbre phylogénétique représentant le monde du vivant fait débat (Eme *et al.*, 2017). Les archées étant les organismes les plus récemment découverts, les études phylogénétiques ont permis de proposer deux phyla distincts les Crenarchaeota (e.g, *Sulfolobus solfataricus*, *Aeropyrum pernix*) et les Euryarchaeota (e.g, *Haloferrax volcanii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus kodakarensis*). Ce sont encore les deux phyla dont les organismes sont les plus connus et étudiés. Cependant les avancées technologiques de séquençage et de bioinformatique ont permis d'identifier de nouvelles lignées archéennes tendant à une reconsidération de l'arbre phylogénétique du vivant (Da Cunha *et al.*, 2017, Eme *et al.*, 2017).

II.3.2. Qu'est-ce qu'une archée ?

Sur un plan morphologique, les archées ne se distinguent pas des bactéries, ce sont des micro-organismes de petite taille sans noyau. Le matériel génétique est donc libre dans la cellule. Par contre, elles se différencient par la structure de leur enveloppe cellulaire et par l'existence de métabolismes particuliers (Madigan *et al.*, 2014, p517). Il est tout de même à

noter qu'aucune archée pathogène n'a encore été trouvée, cela les distinguant bien des autres domaines du vivant (Aminov, 2013; Cavicchioli *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2003). Il est même possible que les archées, en particulier les méthanogènes associées au tractus digestif humain, aient un rôle dans la physiologie et la stabilité de ce dernier (Gaci *et al.*, 2014).

II.3.2.1. Structure cellulaire

La taille et la forme des archées sont très diversifiées. En effet, elles peuvent mesurer de 0.1 à 15µm, et avoir la forme de coque, de grappe, de bâtonnet...(Madigan *et al.*, 2014, p517).

L'enveloppe cellulaire des archées est différente de celle des bactéries (Albers and Meyer, 2011). La paroi n'est pas constituée de peptidoglycanes mais d'une couche protéique appelée S-layer (Kandler *et al.*, 1998; Sára and Sleytr, 2000)

La membrane est également différente de celle des bactéries et des eucaryotes ce qui permettrait aux archées de résister et de se développer dans des conditions environnementales extrêmes (Koga, 2012). Il existe différentes caractéristiques qui distinguent les lipides membranaires archéennes de celles des bactéries et des eucaryotes. Tout d'abord, le squelette des phospholipides des archées est composé de G1P (glycérol-1-phosphate) alors que chez les bactéries et les eucaryotes, c'est le G3P (glycérol-3-phosphate) qui les constitue. La seconde concerne le type de liaisons reliant les chaînes d'hydrocarbure. Ether chez les archées, ce sont des liaisons ester chez les bactéries. Enfin les lipides bipolaires avec un noyau dit tétraéther sont présents en plus grand nombre dans les espèces d'Archées (De Rosa *et al.*, 1986; Koga and Morii, 2007).

Tout comme les bactéries, les archées peuvent utiliser un flagelle pour se déplacer. Cependant leurs structures sont différentes. Le flagelle d'archée aurait, entre autre, une structure plus proche du pili bactérien (Ghosh and Albers, 2011).

II.3.2.2. Métabolisme

Une très grande diversité de métabolismes existe chez les archées, la chimiotrophie, l'anaérobie, l'organotrophie et, à cela, s'ajoute la méthanogénèse et l'oxydation anaérobie du méthane spécifique aux archées (Ferry and Kestead, 2007; Thauer and Shima, 2006).

II.3.2.3. Génome

Tout comme pour les génomes bactériens, il existe pour les génomes archéens une corrélation forte entre le nombre de gènes codants potentiels (ORF, « Open Reading

Frame ») et la taille du génome (Konstantinidis and Tiedje, 2004), Tableau V ci-après. En effet, il est montré que lorsque que la taille du génome augmente, le nombre de gène augmente proportionnellement. Ce qui contraste avec les génomes eucaryotes où la fraction non codante de l'ADN serait la plus importante surtout pour les génomes de grandes tailles.

Organisme	Taille génome	ORFs
Bactérie		
<i>Thermotoga maritima</i>	1 860 725 (pb)	1 877
<i>Bacillus subtilis</i>	4 214 810 (pb)	4 100
<i>Escherichia coli K-12</i>	4 639 221 (pb)	4 288
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 264 403 (pb)	5 570
Eucaryote		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 (Mpb)	5 800
<i>Drosophila melanogaster</i>	180 (Mpb)	13 600
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125 (Mpb)	26 000
<i>Mus musculus</i>	2 500 (Mpb)	25 000
<i>Homo sapiens</i>	2 850 (Mpb)	25 000
Archée		
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1 765 118 (pb)	1 876
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1 738 505 (pb)	2 061
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2 992 245 (pb)	2 977
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	5 751 000 (pb)	4 252

Tableau V: Taille de génomes et nombre d'ORFs de différents organismes des trois domaines du vivant (Madigan *et al.*, 2014, p185/p191/p197)

II.4. L'Archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*

Le modèle d'étude que nous utilisons, *Pyrococcus abyssi*, figure 7A page 56, a été échantillonné dans l'eau de mer proche d'une source hydrothermale en 1989 (campagne à la mer Starmar) dans le bassin nord Fidjien. La souche GE5 a été caractérisée et cultivée, c'est une Euryarchaea hyperthermophile anaérobie de l'ordre des thermococcales, genre *pyrococcus*. Elle est en forme de coque possédant un flagelle, anaérobie stricte, chimiorganotrophe et réductrice de soufre (Erauso *et al.*, 1993). Ce microorganisme se développe à des températures dites extrêmes. Il est pourtant connu que l'ADN est sensible à la température. A 100°C, il subirait 3 000 fois plus de dommage que à 37°C (Lindahl, 1993). Couplé au fait que ce microorganisme peut également supporter des pressions allant jusqu'à

400 bars et survit à une exposition à des irradiations importantes, cela suggère l'implication de mécanismes de réparation performants (Jolivet *et al.*, 2003).

De nombreuses questions découlent de ces conditions de vie extrême et, en particulier, celles concernant la maintenance génomique.

II.4.1. Caractéristiques du génome

Pyrococcus abyssi (souche GE5) possède un génome, de forme circulaire, de 1.7Mb riche en GC (44.7%), séquencé en 1997 au Génoscope d'Evry (France) et complètement annoté (Cohen *et al.*, 2003; Gao and Wang, 2012). Elle possède également un plasmide nommé pGT5 de 3.4Kb utilisé comme vecteur navette (Erauso *et al.*, 1993; Lucas *et al.*, 2002). Il a été identifié 1 876 cadres de lectures codant pour des protéines régissant son fonctionnement.

II.4.2. Culture

Au laboratoire, *Pyrococcus abyssi* est cultivée en bioréacteur « gas-lift » (Godfroy *et al.*, 2000), Figure 7B. Cette technique permet de travailler sur de grands volumes et de contrôler de nombreux paramètres physico-chimiques qui régissent la culture. Cette dernière se fait à haute température, 90°C (température proche de l'optimal de croissance de *P. abyssi*, 96°C), et de manière continue c'est à dire qu'il y a un flux entrant de milieu frais équivalent au flux sortant. Dans ces conditions, les cellules de *P. abyssi* se trouvent majoritairement en phase exponentielle de croissance. Enfin, pour garder des conditions anaérobies, un balayage gazeux à l'azote est effectué. Ce balayage permet également d'homogénéiser la culture et d'évacuer l'hydrogène sulfuré produit par la souche.

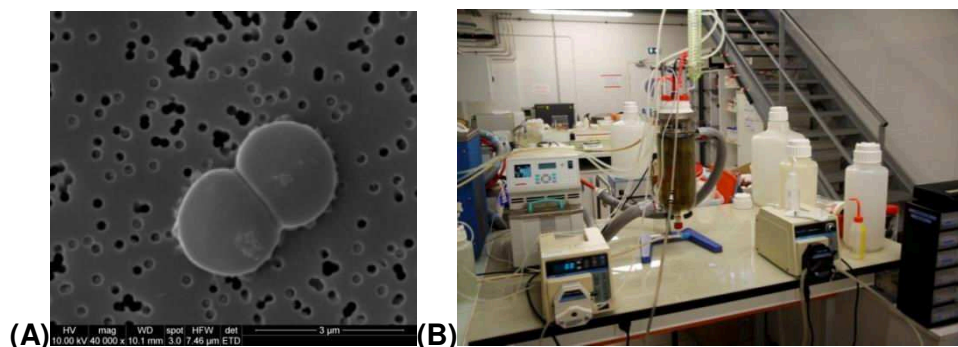


Figure 7: *Pyrococcusabyssi*, (A) en microscopie électronique à balayage (Photo Ifremer) et (B) en bioréacteur « gas-lift » (Photo R. Brizard, LM2E).

Le temps de génération de *P. abyssi* est de 90 minutes en phase exponentielle.

II.4.3. Pourquoi *Pyrococcus abyssi* est-elle utilisée comme modèle d'étude ?

Les organismes hyperthermophiles sont très étudiés au vu de l'intérêt porté à l'étude de la résistance à la température des protéines et des acides nucléiques. Dans le cas de *Pyrococcus abyssi* s'ajoute également l'adaptation à la pression.

Par ailleurs, le fait que son génome soit entièrement séquencé a permis la production et la purification de nombreuses protéines. Au laboratoire LM2E, la majorité des protéines caractérisées fonctionnellement et structurellement sont celles impliquées dans la stabilité du génome, c'est-à-dire dans les systèmes de réplication et de réparation.

De façon intéressante, chez ce modèle d'étude, un seul gène *rnh* existe, codant la RNase HIII, qui jouait un rôle dans l'élimination des amorces ARN lors de la réplication (Henneke *et al.* 2012) et dans l'initiation de la voie RER lors de la réparation (Laz *et al.*, 2010).

P. abyssi est ainsi un excellent modèle pour répondre aux questions portant sur la maintenance génomique à haute température d'autant plus qu'elle possède des protéines similaires à celles des eucaryotes. En effet, la machinerie protéique archéenne de la réplication, décrit dans la première partie, s'apparente étroitement à celles des eucaryotes (Cohen *et al.*, 2003; Myllykallio *et al.*, 2000). La simplicité des cellules d'archées comparativement à certaines cellules eucaryotes, en fait un modèle de choix pour répondre aux questions relative à la réplication de l'ADN.

III - Les ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi*

Toutes les archées possèdent des ADN polymérases de la famille B, plusieurs membres chez les Crenarchaea et un seul exemplaire chez les Euryarchaea (Kelman and Kelman, 2014). Chez *P. abyssi*, les ADN pols sont au nombre de trois. Une de la famille B, l'ADN polymérase PolB, une de la famille D, l'ADN polymérase PolD et le complexe p41/p46 (Gueguen *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2005; Le Breton *et al.*, 2007), (Tableau III, page 33).

III.1. L'ADN polymérase B (PolB)

Les ADN polymérases de la famille B ont, chez les Archées, été identifiées, purifiées et caractérisées (Ishino and Ishino, 2012; Makarova and Koonin, 2013; Perler *et al.*, 1996). C'est également le cas pour l'ADN polymérase monomérique de la famille B de *Pyrococcus abyssi*, PolB (Gouge *et al.*, 2012; Gueguen *et al.*, 2001). De plus, sa structure tridimensionnelle à également été élucidée et est représentée sur la figure 8 ci-après. Sa

configuration générale est celle d'une main où le domaine appelé « Palm » (paume, en orange) contient le site catalytique, le domaine appelé « Fingers » (doigts, en rose) sert à la reconnaissance des nucléotides, tandis que le domaine appelé Thumb (pouce, en rouge) sert à la liaison à l'ADN. En plus de son activité de synthèse de l'ADN et tout comme les réplicases eucaryotes Pol δ et ϵ (Morrison and Sugino, 1994; Morrison *et al.*, 1993), elle porte une activité 3'→5' exonucléase (Gueguen *et al.*, 2001). Le domaine porteur de cette activité exonucléase est représenté en bleu sur la figure 8.

L'ADN polymérase PolB a été décrite comme pouvant être l'enzyme réplivative (activité polymérasique 5'→3') de *Pyrococcus abyssi*, activité stimulée par le PCNA (Gueguen *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2005). En revanche, elle est incapable d'allonger un brin ARN, suggérant ainsi la présence d'une seconde ADN polymérase lors de la réplication, afin de permettre l'élongation des amorces ARN (Henneke *et al.*, 2005).

Il a été montré que l'ADN polymérase PolB de *Pyrococcus abyssi* aurait en position 410 une tyrosine pouvant jouer le rôle de « stéric gate » et ainsi permettre la discrimination des ribonucléotides lors de la synthèse ADN (Annexe 1, page 158).

De façon intéressante, l'ADN polymérase B des archées et donc de *P. abyssi*, possède *a contrario* de celles des eucaryotes une poche de reconnaissance structurale de l'uracile (Gouge *et al.*, 2012; Fogg *et al.*, 2002). Les conditions de vie de *P. abyssi* à haute température rendent probable une augmentation des réactions de désamination des cytosines qui, par hydrolyse du groupement amine donneront des bases uraciles. Cette poche de reconnaissance joue donc un rôle positif sur la stabilité génétique puisqu'elle permet d'éviter la création d'une mutation qui sera létale à la génération suivante. En effet, la structure chimique de l'uracile étant proche de celle de la thymine, une adénine peut s'y lier changeant ainsi le couple de dNMPs, de C/G en A/T. Cette poche induit un arrêt de la synthèse d'ADN quatre bases en amont de l'uracile permettant l'intervention de système de réparation (Wardle *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été déterminé chez la PolB de *Pyrococcus abyssi* une structure particulière dite en « T-cleft » (Template-cleft), composée de trois acides aminés, proche de la poche de reconnaissance de l'uracile, dans le domaine N-terminal (Gouge *et al.*, 2012). Cette triade d'acides aminés permet la chélation d'un ion métallique divalent par l'intermédiaire de six molécules d'eau et jouerait un rôle dans la reconnaissance de l'uracile.

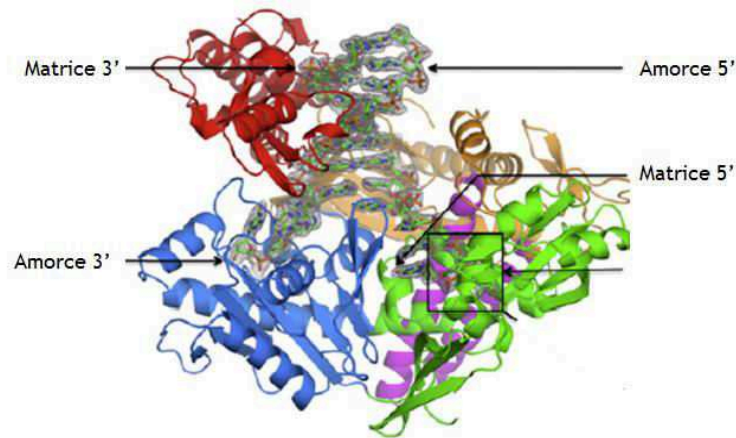


Figure 8: Structure de l'ADN polymérase PoIB de *Pyrococcus abyssi* (Gouge *et al.*, 2012).

Le domaine N-terminal est représenté en vert (acides aminés 1-130 et 327-369), le domaine exonucléase est représenté en bleu (acides aminés 131-326), le domaine « palm » est représenté en orange (acides aminés 369-449 et 500-569), le domaine « finger » est représenté en rose (acides aminés 450-499) et le domaine « thumb » est représenté en rouge (acides aminés 586-757).

La PoIB serait donc l'enzyme répliquative de *Pyrococcus abyssi* mais, comme souligné ci-dessus, elle agirait à la fourche de répllication en compagnie d'une autre polymérase, l'ADN polymérase PoID.

III.2. L'ADN polymérase D (PoID)

L'ADN polymérase PoID a été montrée comme étant nécessaire à la répllication. En effet, elle est capable d'initier la synthèse d'ADN quelle que soit la nature de l'amorce, ADN ou ARN. Cette caractéristique permettrait l'initiation de la synthèse d'ADN sur le brin retardé et sur le brin avancé. Par ailleurs, elle est capable de déplacer des brins ADN et ARN en présence de PCNA (Henneke *et al.*, 2005). Cette fonction s'opérerait lors de la maturation des amorces ARN, créant un brin flottant qui sera coupé par une endonucléase (Fen1), (Henneke, 2012). Cette capacité, également existante chez la Pol δ eucaryote intervenant dans la maturation des fragments d'Okazaki, appuie fortement cette théorie (Ayyagari *et al.*, 2003).

Contrairement à la PoIB, PoID est une ADN polymérase hétérodimérique composée d'une grande sous-unité, nommée DP2, porteuse de l'activité polymérase 5'→3' et d'une petite sous-unité, nommée DP1, responsable de l'activité exonucléase 3'→5' (Cann *et al.*, 1998; Gueguen *et al.*, 2001).

Récemment, les structures cristallographiques des sous-unités DP1 et DP2 de la PoID de *Pyrococcus abyssi* ont été décrites (Figure 9). Ceci a révélé une architecture différente des autres ADN polymérases (Sauguet *et al.*, 2016).

Tout d'abord, la sous-unité DP2, responsable de l'activité polymérisique de la PoID ne possède aucune similarité de structure avec les autres ADN polymérases et curieusement possède un site catalytique proche de la famille des ARN polymérases (Figure 9B).

La sous-unité DP1 quant à elle possède une structure proche de la famille des « calcineurine-like phosphoestérases ». Ces enzymes sont responsables de plusieurs activités de type nucléase, nucléotidase, phosphodiesterase de sphingomyeline (Koonin, 1994), mais seulement la sous-unité DP1 de la PoID est porteuse de l'activité de relecture engendrée par son activité exonucléase 3'→5'. Par ailleurs, des similarités de structure avec la protéine Mre11 (Meiotic-recombination 11) ont également été mises en exergue (Figure 9A). Cette dernière, également de la famille des phosphoestérases est une endonucléase et une exonucléase (Connelly *et al.*, 1999; Hopfner *et al.*, 2000; Hopkins and Paull, 2008).

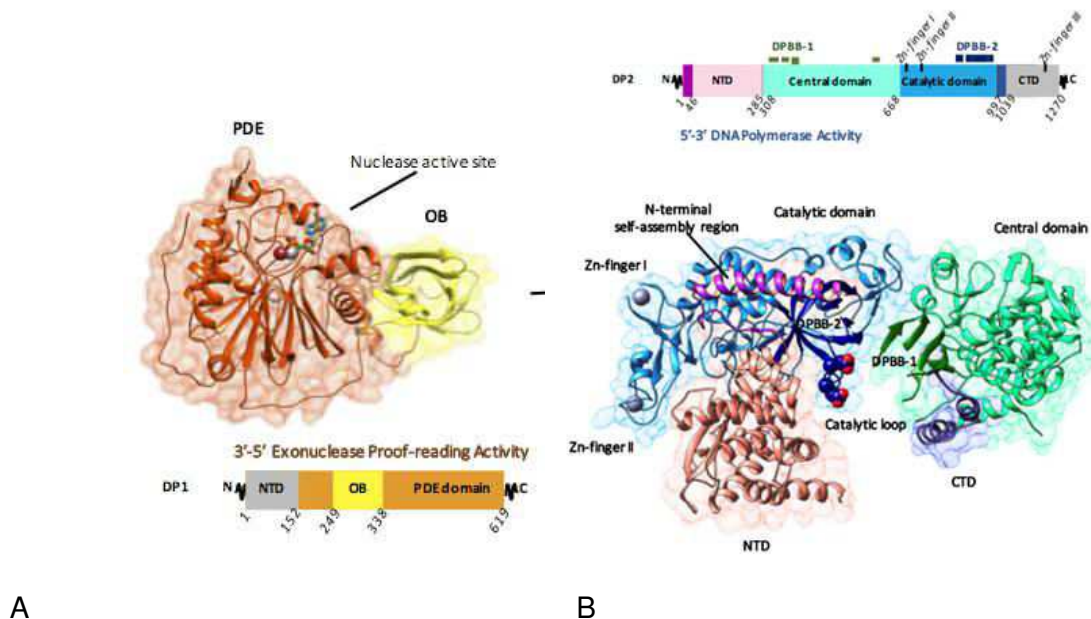


Figure 9: Structure de la petite sous-unité DP1 (A) et de la grande sous-unité DP2 (B) de l'ADN polymérase PoID de *Pyrococcus abyssi*.

(a) Structure de la petite sous-unité DP1 (2,5 Å) avec en orange le domaine catalytique exonucléase et en jaune le domaine OB (oligonucléotide-binding) pouvant lier les acides nucléiques. La région délétée dans la structure cristallisée est représentée en gris.

(b) Structure de la grande sous-unité DP2 (2,2 Å) avec en fuschia la représentation de la région auto-structurée N-terminale, en rose le domaine N-terminal (NTD), en vert le domaine central, en bleu le domaine portant l'activité polymérisique 5'-3' et en violet le domaine C-terminal (CTD). Les sphères en bleu foncé/rouge représentent le core catalytique DP2 conservé avec les ARN polymérases.

III.3. Le complexe p41/p46

La primase de *Pyrococcus abyssi* est un complexe nommé p41/p46. Celui-ci est composé de deux sous-unités, dont la plus petite (p41) porte l'activité de synthèse de l'ARN en présence de manganèse. La figure 10, ci-après, représente la structure de la petite sous-unité, p41, de la primase de *Pyrococcus horikoshii*, Euryarchaea hyperthermophile. Celle-ci, tout comme la petite sous-unité de *Pyrococcus furiosus*, également Euryarchaea hyperthermophile, possède deux domaines, un domaine hélicoïdal représenté en vert et un domaine catalytique représenté en bleu et rose (Augustin *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2003). Seule, cette petite sous-unité possède une activité de synthèse de longs brins d'ADN. Il a été montré chez *P. furiosus* et *P. horikoshii* que la présence de la grande sous-unité (p46) permet une stabilisation et une modulation de l'activité polymérisique de la petite sous-unité, p41. En sa présence, la taille des fragments ADN pouvant être synthétisés sont plus courts mais le taux d'incorporation des dNTPs est augmenté. Enfin, p46 confère au complexe la capacité de synthétiser de l'ARN (Ito *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2011). En effet, la petite sous-unité, p41, de *P. abyssi*, sans la grande sous-unité p46, ne possède pas d'activité de synthèse de l'ARN (Le Breton *et al.*, 2007). De façon intéressante, ces deux sous-unités ont des similarités avec p49 et p58 du complexe α -primase des eucaryotes (Lao-Sirieix and Bell, 2004). Chez les eucaryotes, la petite sous-unité p49 possède l'activité de synthèse d'ADN tout comme la sous-unité p41. La grande sous-unité p58 a également une activité équivalente à la sous-unité p46 des archées puisqu'elle module la stabilité et les capacités de synthèse du complexe. Cependant chez les eucaryotes, le complexe est associé à deux autres protéines pour former le complexe Pol α -primase.

Le complexe primase (p41/p46) de *P. abyssi* possède une activité d'ADN polymérase principalement en présence de magnésium. Non seulement p41/p46 est capable d'étendre une amorce ARN et ADN, mais aussi peut compléter une brèche ADN et faire du déplacement de brin. Toutes ces capacités sous-entendent fortement que ce complexe est non seulement impliqué dans l'initiation de la réplication de l'ADN mais également dans la réparation de l'ADN (Le Breton *et al.*, 2007). Par ces activités il se pourrait que le complexe p41/p46 puisse être affilié à la Prim-Pol eucaryote (Guilliam *et al.*, 2015).

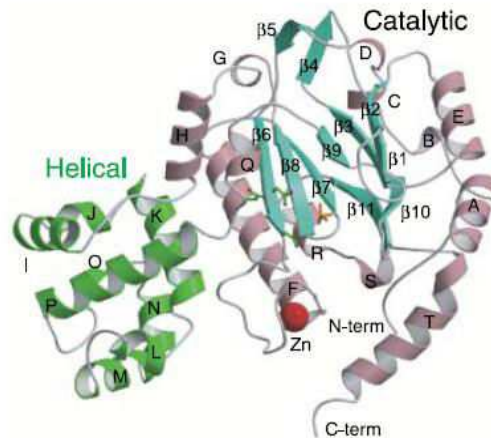


Figure 10: Structure de la sous-unité p41 de la primase de *Pyrococcus horikoshii* (Ito *et al.*, 2003).

Le domaine catalytique est représenté en bleu et rose.

III.3. Importance biologique des trois ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi*

Pour résumer, lors de la réplication de l'ADN chez *Pyrococcus abyssi* le complexe p41/p46 initierait la réplication en synthétisant des amorces ARN, qui seraient allongées par de courts fragments ADN synthétisés par l'ADN polymérase PolD sur les brins avancé et retardé. Puis l'ADN polymérase PolB allongerait le brin avancé tandis que la PolD synthétiserait le brin retardé. Enfin ces trois ADN polymérases, de par leurs propriétés fonctionnelles, peuvent être également impliquées dans des mécanismes de réparation de l'ADN. Par exemple, il a été montré que l'ADN polymérase PolB de *Thermococcus kodakarensis* serait impliquée dans les systèmes de réparation RER permettant l'élimination des ribonucléotides de l'ADN (Heider *et al.*, 2017). Tous ces paramètres mettent bien en avant l'importance de ces trois enzymes pour la vie cellulaire. Pour aller plus loin et pour justifier leur importance biologique, il a été regardé le caractère essentiel ou non de ces trois ADN polymérases chez trois Euryarchaea (Tableau VI, ci-après). Il a alors été montré que chez *Halobacterium sp.* NRC-1 les ADN polymérases PolD et PolB sont essentielles à la survie de cet organisme. Par contre chez *Methanococcus maripaludis* S2, l'ADN polymérase PolD et le complexe primase p41/p46 sont essentielles à la survie cellulaire alors que l'ADN polymérase PolB ne l'est pas. C'est également le cas chez *Thermococcus kodakarensis* où là encore PolB n'a pas été observée comme essentielle contrairement à PolD.

Polymérase	Organisme	Règne/ ordre	Essentielle/ Non essentielle	Référence
ADN polymérase PoIB	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Euryarchaea/ Thermococcales	Non essentielle	(Cubonová <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	Euryarchaea/ Halobactériales	Essentielle	(Berquist <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Methanococcus maripaludis S2</i>	Euryarchaea/ Methanococcale	Non essentielle	(Sarmiento <i>et al.</i> , 2013)
ADN polymérase PoID	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Euryarchaea/ Thermococcales	Essentielle	(Cubonová <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	Euryarchaea/ Halobactériales	Essentielle	(Berquist <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Methanococcus maripaludis S2</i>	Euryarchaea/ Methanococcale	Essentielle	(Sarmiento <i>et al.</i> , 2013)
Complexe primase p41/p46	<i>Haloferax volcanii</i>	Euryarchaea/ Halobactériales	Essentielle	(Le Breton <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Methanococcus maripaludis S2</i>	Euryarchaea/ Methanococcale	Essentielle	(Sarmiento <i>et al.</i> , 2013)

Tableau VI: Caractère essentiel ou non des ADN polymérase archéennes .

Au-delà de leur importance physiologique, indispensable à la survie de certains micro-organismes, les ADN polymérase sont aussi des outils moléculaires utilisés dans de nombreuses techniques d'amplification et de séquençage et, en particulier, les ADN polymérase thermostables de *P. abyssi* (Dietrich *et al.*, 2002; Killelea *et al.*, 2014). L'ensemble de ces informations souligne l'importance de l'étude et de la connaissance de ces enzymes tant pour un aspect de compréhension des mécanismes cellulaires régissant la stabilité génomique que pour un aspect biotechnologique.

Ce sont donc ces trois ADN polymérase qui sont au centre des chapitres suivants, tout d'abord dans un contexte de synthèse de l'ADN dans le chapitre II puis dans un contexte de dégradation post-synthèse dans le chapitre III, et enfin dans un contexte plus biotechnologique d'utilisation en PCR dans le chapitre IV.

CHAPITRE II :

SYNTHESE DE L'ADN CHEZ *PYROCOCCUS*

***ABYSSI* : INFLUENCE DU CONTENU EN**

NUCLEOTIDES ET INCORPORATION DE

RIBONUCLEOTIDES

Première partie : Présentation de l'étude

Deuxième partie : Article en cours de rédaction

Troisième partie : Résultats/Discussion

supplémentaires

Première partie : Présentation de l'étude

Les ribonucléotides représentent le nucléotide « endommagé » le plus abondant présent dans l'ADN (Nick McElhinny *et al.*, 2010b). Ainsi, des systèmes moléculaires permettant de reconnaître et d'enlever les rNMPs de l'ADN sont existants, le plus important étant le système « RER » (« Ribonucleotide Excision Repair »), (Figure 6, page 46), (Heider *et al.*, 2017). Il est maintenant admis que l'existence des rNMPs dans l'ADN est, en partie, due au fait que les ADN polymérase incorporent les rNMPs malgré la présence d'un « steric gate » les excluant du site actif (Bergoglio *et al.*, 2003; Nick McElhinny *et al.*, 2010a). Cette incorporation étant également liée au fait que le contenu en rNTPs dans une cellule est largement supérieur à celui en dNTPs mettant ainsi à l'épreuve la sélectivité de ces ADN pols (Tableau II, « Etude bibliographique », page 27).

Afin d'étudier la synthèse d'ADN chez une archée, de surcroît hyperthermophile et anaérobie, la première étape fut la quantification de son contenu en nucléotides. C'est au cours d'un séjour scientifique dans l'équipe du P^r Andrei Chabes à l'Université de Umeå en Suède (University of Umea, « Departement of Medical Biochemistry and Biophysics ») que la mesure de la quantité des nucléotides de *Pyrococcus abyssi* a été effectuée. Son équipe possède l'expertise nécessaire à la détection des dNTPs et rNTPs dans un micro-organisme où la méthode de chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV à 260 nm est utilisée depuis de nombreuses années (Kumar *et al.*, 2010). Toutefois, une méthode d'analyse récente et plus sensible (zicHILIC/MS/MS), reposant sur l'utilisation de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) couplée à une double détection en spectrométrie de masse a été préférée pour la quantification des dNTPs et rNTPs chez *P. abyssi*.

L'étude a ensuite porté sur les causes et les conséquences de la présence de rNMPs dans l'ADN chez *Pyrococcus abyssi*. Il était important de s'approcher au plus près des conditions physiologiques. Dans ce but, il a été comparé l'efficacité d'extension d'amorce des extraits cellulaires et des ADN polymérase de *P. abyssi* avec des nucléotides aux pourcentages équivalents à ceux retrouvés naturellement. De plus une étude a été menée sur la capacité de ces extraits cellulaires et de ces ADN polymérase à « passer » un ribonucléotide présent dans une matrice ADN lors d'une réaction d'extension d'amorce et le cas échéant à identifier le nucléotide incorporé.

Cette étude a donné lieu à un article en cours de rédaction, ci-après.

Il a été choisi de présenter l'introduction, les résultats et les figures comme elles le seront dans l'article. Suite à de nouveaux résultats, en cours de réalisation au moment de la rédaction, il a été préféré de présenter la discussion en français afin d'exposer un travail complet dans l'attente d'un article abouti.

Deuxième partie : Article en cours de rédaction

Influence of the ratio of dNTPs/rNTPs pool on ribonucleotides incorporation during archaeal DNA synthesis

Mélanie Lemor^{a,b,c}, Ziqing Kong^d, Etienne Henry^{a,b,c}, Raphaël Brizard^{a,b,c}, Sebastien Laurent^{a,b,c}, Audrey Bosse^{a,b,c}, Andrei Chabes^d, Ghislaine Henneke^{a,b,c}

a, Ifremer, LM2E, ZI de la pointe du diable CS 10070, 29280, Plouzané-Fr..

b,CNRS, LM2E, UMR6197, Plouzané-Fr

c,UBO, LM2E, UMR6197, Plouzané-Fr

d, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå, Sweden

KEY WORDS: nucleotide pool, Archaea, DNA polymerases, ribonucleotides

Summary

Consistent with the fact that ribonucleotides (rNTPs) are in excess over deoxyribonucleotides (dNTPs) *in vivo*, recent findings indicate that replicative DNA polymerases (DNA Pols) are able to insert ribonucleotides during DNA synthesis raising crucial questions about the fidelity of DNA replication in both *Bacteria* and *Eukarya*. Here, we report that the level of rNTPs is 20-fold higher than that of dNTPs in *P. abyssi* cells. In reactions containing the physiological nucleotide levels, rNMPs incorporation occurs during DNA synthesis, with the family-D DNA Pol having the highest propensity compared to the family-B and the p41/p46 complex. Moreover, all three DNA Pols incorporate rNTPs in a template specific manner. Depending on the identity of the base and the sequence context, bypass of rNMP-containing DNA templates by DNA Pols occurs with variable efficiency and accuracy. Evolutionary scenario regards to ribonucleotide incorporation into DNA and genome stability is thus discussed.

Introduction

Maintaining the integrity of genome is essential for life and faithful DNA replication and repair are the guarantees. One of the first important parameters related to accurate DNA synthesis is the regulation of the optimal concentration of the four 5'-deoxyribonucleoside-triphosphates (dNTPs) by ribonucleotide reductase (RNR), (Kunz *et al.*, 1994). RNR, which reduces the 5'-ribonucleoside-triphosphates (rNTPs) to the corresponding dNTPs, also maintains the ratio of rNTPs/dNTPs at different levels throughout the cell-cycle (Mathews, 2015; Nordlund and Reichard, 2006). Moreover, the relative abundance of nucleotides is dependent on tissues, organelles and cell types, with rNTPs content largely exceeding that of dNTPs (Buckstein *et al.*, 2008; Chabes and Stillman, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Ferraro *et al.*, 2010; Neuhard and Nygaard, 1987; Nick McElhinny *et al.*, 2010b; Nordlund and Reichard, 2006; Traut, 1994). For these reasons, high- and low-fidelity DNA polymerases (DNA Pols) are challenged with selecting the correct dNTPs over the most abundant rNTPs during the normal processes of DNA replication and repair. While cellular concentrations of nucleotides in *Eukarya* or *Bacteria* are largely documented, it remains poorly unexplored in *Archaea* (Liew *et al.*, 2016).

Other important parameters such as DNA polymerase selectivity, proofreading 3'→5' exonuclease activity and mismatch repair (MMR) contribute to improve the fidelity of DNA synthesis (Kunkel, 2009; Schaaper, 1993). Regards to ribonucleotide incorporation, high- and low-fidelity DNA Pols evolved structural features for blocking rNTPs entry into the DNA Pols active site. A steric gate residue or a protein backbone segment is believed to generate a clash with the 2'-hydroxyl group of the ribose of the incoming rNTP (Brown and Suo, 2011; Cerritelli and Crouch, 2016). This prevention mechanism is of particular importance for the proofreading function of high-fidelity (HiFi) DNA polymerases since it is rather proficient in the excision of incorrect dNMPs than rNMPs from extending primers (Clausen *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2012). MMR is a repair pathway which functions to correct replication errors in newly synthesized DNA. Targeting base mispaired and not the sugar, it is proposed to act in the removal of RNA-DNA mismatches in the genomes of *Bacteria* and *Eukarya* (Clark *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012). As a post-replicative system, MMR also performs the correction of leading-strand DNA-DNA mismatches with single embedded rNMPs acting as strand-discrimination signals (Ghodgaonkar *et al.*, 2013; Lujan *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013).

Recent data indicate that ribonucleotides are the main non-canonical nucleotides present into DNA (Nick McElhinny *et al.*, 2010b) and that they are incorporated by DNA Pols with surprisingly high frequency (Heider *et al.*, 2017; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Yao *et al.*, 2013). Ribonucleotides incorporation may also arise from imperfect processing of Okazaki fragments (Rumbaugh *et al.*, 1997). The biological evidence of embedded ribonucleotides

into the DNA relies on *in vivo* studies showing increased load of genomic rNMPs and genetic instability in RNase H-defective cells as well as DNA Pols permissive for rNMP incorporation in RNase H2-defective cells (Heider *et al.*, 2017; McDonald *et al.*, 2012; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Vaisman *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2015). Because of the reactive 2'-hydroxyl group on the ribose ring, rNMPs in the chromosome make the DNA strand susceptible to spontaneous and enzymatic hydrolytic cleavage. They can also modify the helical structure in DNA that possibly interferes with cellular DNA transactions (Chiu *et al.*, 2014; Evich *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2015). To prevent persistent ribonucleotide accumulation, cells evolved pathways for recognizing and removing aberrant rNMPs into DNA strands. In ribonucleotide excision repair (RER), robust primary (RNase H-dependent RER) (Heider *et al.*, 2017; Sparks *et al.*, 2012; Vaisman *et al.*, 2014) and alternative pathways (*e.g.*, Top1-mediated RER or Nucleotide Excision Repair (NER) (Huang *et al.*, 2017; Pommier *et al.*, 2015; Vaisman *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2013) seem to proceed via a similar mechanism among prokaryotes and eukaryotes, while requiring different molecular players.

Here, we sought to analyse whether ribonucleotide incorporation into DNA is a conserved property of DNA synthesis in *Archaea*. Up to now, only four DNA Pol families, (B, D, X and Y) and the p41/p46 primase-polymerase are encoding in the genomes of 251 archaeal species (<https://gold.jgi.doe.gov/>). *In vitro* activities of the family-B, -D, -Y and the p41/p46 complex of archaeal DNA polymerases have been demonstrated but never enounced for the X-family (Ishino and Ishino, 2012; Kelman and Kelman, 2014; Sarmiento *et al.*, 2014). Which polymerases are responsible for duplicating the archaeal genome is not currently known with the same degree of certainty as for *Bacteria* or *Eukarya*. All *Archaea* contains a family-B DNA Pol usually present as several members in the Crenarchaea and as a single exemplar in the Euryarchaea (Ishino and Ishino, 2012; Kelman and Kelman, 2014; Sarmiento *et al.*, 2014). With the exception of the Crenarchaea, a HiFi family-D DNA Pol is found in *Archaea* which is unique to this domain. *Archaea* also possess a p41/p46 primase-polymerase complex with p41 belonging to archaeo-eukaryotic primase (AEP) family (Guilliam *et al.*, 2015). At the replication fork in the Crenarchaea, it is believed that the p41/p46 complex initiate DNA replication by synthesizing a RNA primer, followed by leading and lagging strand DNA synthesis using HiFi family-B DNA Pols (Beattie and Bell, 2012; Choi *et al.*, 2011; Lao-Sirieix *et al.*, 2005). While it is clear that p41/p46 is involved in the initiation process in the Euryarchaea, the role of HiFi PolB and/or PolD acting selectively on opposite DNA strands at the replication fork remains inconclusive because of biochemical and genetic divergences (Berquist *et al.*, 2007; Cann *et al.*, 1999; Čuboňová *et al.*, 2013; Greenough *et al.*, 2015; Henneke, 2012; Henneke *et al.*, 2005; Sarmiento *et al.*, 2013). Similar to the DNA repair family-Y DNA Pol (Boudsocq *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010), it is not

excluded that the p41/p46 complex like families B and D DNA Pols might operate in other archaeal DNA transactions (repair, damage tolerance, damage signalling, etc) (Abellón-Ruiz *et al.*, 2016; Connolly, 2009; Greenough *et al.*, 2015; Guillian *et al.*, 2015; Heider *et al.*, 2017; Lao-Sirieix *et al.*, 2005; Le Breton *et al.*, 2007; Palud *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2013).

In the present work, we question whether ribonucleotide incorporation is an evolutionarily conserved property of DNA synthesis in *Archaea*. For this purpose, we used the best characterized hyperthermophilic anaerobe *Pyrococcus abyssi* GE5 (Cohen *et al.*, 2003; Erauso *et al.*, 1993). This strain duplicates its genome as fast as *Bacteria* supported by eukaryotic-like replication proteins (Myllykallio *et al.*, 2000). A role of RNA priming by the p41/p46 complex (Le Breton *et al.*, 2007), followed by leading and lagging strands DNA synthesis, respectively, by PolB and PolD is proposed (Castrec *et al.*, 2009; Henneke *et al.*, 2005; Rouillon *et al.*, 2007). Maturation of Okazaki fragments (Matsunaga *et al.*, 2003) likely involves PolD, but precludes any contribution of PolB in the absence of RNase HIII (Henneke, 2012). Beyond these crucial roles in DNA replication, all three DNA polymerising enzymes seem to work in DNA transactions such as repair, damage signalling or tolerance (Gouge *et al.*, 2012; Le Breton *et al.*, 2007; Palud *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2013). Here, we further analyse whether ribonucleotide incorporation by PolB, PolD and the p41/p46 complex is conserved during DNA synthesis. At the physiological dNTPs and rNTPs levels, we demonstrate that PolD is the main DNA Pol inserting rNMPs with high accuracy into DNA. Additionally, we report that all three DNA Pols can bypass single embedded rNMPs with efficient and faithful DNA synthesis depending on the DNA Pol, the nature of the base and the sequence context. These results suggest that ribonucleotide incorporation into DNA represents a conserved feature of archaeal DNA Pols, which may have various consequences on their genome integrity.

Experimental Procedures

Culture conditions

Pyrococcus abyssi GE5 cells were grown in a gas-lift bioreactor under anaerobic conditions at 90°C as previously described (Godfroy *et al.*, 2000, 2006). Exponentially growing cells were collected, centrifuged and stored at -80°C under strict anaerobia.

Determination of dNTP and rNTP Pools

At density from 2.4×10^8 to 8.75×10^9 cells/mL, 1.26×10^{12} cells were harvested by centrifugation $15\,000 \times g$ for 60 min at 4°C. Cell pellets were immersed in 700 μ L of ice-cold TCA/MgCl₂ solution (12% w/v trichloroacetic acid and 15 mM MgCl₂). The following steps were carried out at 4 °C. 700 μ L of supernatants were collected after centrifugation at 14 000 rpm for 2 min, and added to 700 μ L of ice-cold Freon-trioctylamine mixture consisting of 10 mL of Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane, Aldrich, Sigma-Aldrich Sweden AB >99%) and 2.8 mL of trioctylamine (Fluka, Sigma-Aldrich Sweden AB, >99%). The samples were vortexed and centrifuged for 2 min at 14 000 rpm. The aqueous phase was collected and added to 700 μ L of ice-cold freon-trioctylamine mixture. The aqueous phase was treated by SPE with an Oasis WAX 3 cc VacCartridge column. The released solution was evaporated in speed-vac during 3 hours 30 min at 37°C. Pellet was mixed with acetonitrile (60%)/ammonium acetate (10%)/H₂O (30%) solution. The nucleotides were separated on a SeQuant®ZIC®-cHILIC (Millipore) column and quantified using 6490 Triple Quad LC/MS/MS (Agilent Technology).

dNTPs and rNTPs levels (pmol/cells) in Table 1 (page 86) were used to define two cellular concentrations (ratios 1 and 2). 200 μ M of dTTP is the reference for adjusting the balance with the seven remaining nucleotides in Ratio 1. 200 μ M of ATP is the reference for adjusting the balance with the seven remaining nucleotides in Ratio 2.

Enzymes and cell-free extracts

All DNA Pols used in this study were cloned, overexpressed and purified as previously described in the following articles, PolB (Gouge *et al.*, 2012), PolD (Palud *et al.*, 2008) and the p41/p46 complex (Le Breton *et al.*, 2007). *P. abyssi* cell-free extracts were prepared by suspended cell pellets in lysis buffer (0.42 M NaCl, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1 mM DTT, 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 25% (v/v) glycerol) followed by cell disruption by sonication (on ice). Cell debris was pelleted by centrifugation 10 000 g for 1 hour at 4°C and protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976).

Nucleic acids

Premium quality unlabeled dNTPs and rNTPs were purchased from Jena Bioscience. sscM13mp18 (single-stranded circular M13mp18 DNA) were purchased from New England BioLabs (NEB). Oligonucleotides used in primer extension assays were purchased and purified by RP-HPLC from Eurogentec (Seraing, Belgium) with the exception of the 87-mer oligonucleotides, which were purified by PAGE. Their sequences are listed in Table S1 (page 96). Annealing of two complementary oligonucleotides was performed at equimolar concentrations in 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl. The mixture was heated at 95°C for 5 min and slowly cooled down to room temperature. Annealing of sscM13mp18 to the complementary primers were carried out at 1:3 molar ratio in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 50 mM NaCl, by heating at 75 °C for 15 min followed by cooling to room temperature.

Primer extension reactions

Extension of the fluorescent-labelled primer annealed to the oligodeoxynucleotide DNA template (50 nM) was carried out in reactions mixtures (20 µL) of 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and only the four dNTPs (200 µM or at the indicated cellular concentrations), only the four rNTPs (200 µM or at the indicated cellular concentrations), or all eight nucleotides at the indicated cellular concentrations. 100 nM of *PabPolD*, 100nM of the p41/p46 complex, 6.25 nM of *PabPolB* and 10 µg of cell-free extracts were used, and the incubations were at 55°C for 30 min. For single nucleotide incorporation, only one nucleotide is added at 200 µM (final concentration). Reactions with *PabPolD*, *PabPolB* and p41/p46 were stopped on ice by adding 20 µL of stop buffer [(98% deionized formamide, 10 mM NaOH, 10 mM EDTA pH 8, 1 µM of “oligonucleotide competitor” (the exact complement of the template strand under study)]. Reactions with cell-free extracts were stopped on ice by adding 10 µL of stop solution (Proteinase K 500 µg/mL, 5 mM EDTA, 0.5% SDS) followed by incubation at 37°C for 30 min. The DNA products were purified through ethanol precipitation followed by resuspension in stop buffer (90% deionized formamide and 20 mM EDTA). In all instances, samples were heated at 95°C for 5 min, before being loaded onto 18 % denaturing polyacrylamide gels. Labeled fragments were detected with Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) and quantified with Image Quant TL 8.1 (GE Healthcare). The quantification methods are as follows: Extension of the primers (%), intensity of primers as a percentage of total lane intensity; Full length 87-nt (%), intensity of 87-nt bands as a percentage of total lane intensity. Stall (%), intensity of identified stall band as a percentage of total lane intensity.

Immunodetection of DNA polymerases in exponentially growing cells

P. abyssi cells were cultivated and collected as described above. The cell pellet was suspended in PBS supplemented with tablets of a protease inhibitor cocktail (Complete, EDTA-free, Roche) and the cells were lysed by sonication. The cellular debris was pelleted by centrifugation two times (10 000 g for 1 hour at 4°C). The protein concentration in the supernatant was measured by the Bradford method (Bradford, 1976). For *PabPoID* detection, immunoprecipitation experiments were carried out as follows: 8 µg of the rabbit polyclonal anti-*PabDP1* or anti-*PabDP2* were immobilized onto 1.5 mg of protein A Dynabeads™ (Invitrogen). After three washing steps with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) Buffer and one with PBS, antibodies were covalently anchored with 0.28 mg of BS3 crosslinker (Thermo Scientific) in PBS for 30 min. Unreacted BS3 is quenched by incubating for 15 min at room temperature with Tris-HCL (1M) pH 7.5 (70 mM final concentrations) and washed off three times with PBS-T. Cell-free extracts (4 mg) were then added to the beads, followed by overnight incubation at 4°C. After two washes with PBS, beads were suspended in SDS-PAGE loading buffer [50mMTris-HCl, pH 6.8, 2mM EDTA, 1% (w/v) β-mercaptoethanol, 8% (v/v) glycerol, and 0.025% (w/v) bromophenol blue]. For immunodetection of PolB and the p41/p46 complex, cell-free extracts (at the indicated amounts) were suspended in SDS-PAGE loading buffer. In all cases, samples were heated at 95°C for 5 min. Proteins were separated on SDS-PAGE 4-20% gels (Pierce), transferred to nitrocellulose membranes and probed with either rabbit anti-*Pabp46* or anti-*Pabp41*, rabbit anti-*PabPoIB*, and either rabbit anti-*PabDP1* or anti-*PabDP2* for *PabPoID*, respectively, followed by goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase and use of an enhanced chemiluminescence system (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate).

Results

dNTP and rNTP Pools in *Pyrococcus abyssi*

We initially measured the levels of dNTPs and rNTPs in exponentially growing *Pyrococcus abyssi* cells (Table 1, page 86). The results demonstrate that rNTPs content is 20-fold higher than that of dNTPs and corroborate previous data showing that rNTPs concentrations are 10- to 80-fold higher than that of dNTPs, respectively, in *E. coli* and *S. cerevisiae* cells (Buckstein *et al.*, 2008; Nick McElhinny *et al.*, 2010a). Thus, rNTPs content in our hyperthermophilic anaerobe archaeal cells significantly exceed that of dNTPs, and values range from 280 pmol/10⁸ cells for rATP to 2.8 pmol/10⁸ cells for dCTP (Table 1, page 86). The rNTP/dNTP ratios vary from 35/1 for adenine and 9/1 for thymidine. Moreover, the physiologically normal range of dNTPs (dT>dG>dA>dC) differs to the balance between individual rNTPs (rA>rG>rU>rC).

Influence of nucleotide pools on primer extension activities

To study the effect of rNTP and dNTP levels on DNA synthesis, primer extension reactions were carried out in the presence of individual DNA Pols (PolD, PolB and the p41/p46 complex) or cell-free extracts from *P. abyssi*. Two cellular concentrations (ratios 1 and 2) have been used according to the physiological values of nucleotides (Table 1, page 86): 200 µM of dTTP is the basal reference for calculating the concentration of the seven remaining nucleotides in ratio 1. 200 µM of ATP is the rNTP reference for calculating the balance with the seven remaining nucleotides in ratio 2. 200 µM of either dNTPs or rNTPs are working concentrations commonly used for *Pab*DNA Pols (Henneke *et al.*, 2005; Le Breton *et al.*, 2007) and more generally for DNA Pols.

As a prerequisite, we examined whether PolD, PolB and the p41/p46 complex were observable in cell-free extracts (Figure S1, page 96). While the detection of both the large (DP2) and the small subunits (DP1) of the heterodimeric PolD required co-immunoprecipitation experiments (Figure S1B), PolB and the p41/p46 complex were directly detectable (Figure S1A). These data suggest that PolD might be an unstable native protein or in lower abundance compared to PolB and the p41/46 complex in exponentially growing *P. abyssi* cells. The results also demonstrate that the native PolD forms a heterodimeric stable complex and confirm the interaction between the p41/p46 subunits as previously published (Le Breton *et al.*, 2007).

Primer extension reactions with 200 µM of the four dNTPs were then examined in the presence of cell-free extracts or individual DNA Pols (Figure 1B-E, lane 3, page 87). The

results showed that extension of the DNA primer was highly efficient for the two HiFi DNA Pols (PolD and PolB) and cell-free extracts (more than 90% extension), while the p41/p46 complex displayed reduced DNA synthesis (Figure 1E). Inspection of full-length extension products indicated that the p41/p46 (grey) complex was not very proficient in DNA synthesis of long DNA fragments as compared with PolB (orange), PolD (green) and cell-free extracts (blue), (Figure 1G, lane 3). As such, the two HiFi DNA Pols were more active (by a factor of ~5) than cell-free extracts, with PolB exhibiting the highest propensity. When dNTPs were used at the physiological ratios, almost identical profiles of polymerization were observed with PolD and PolB (Figure 1C-D, lanes 3-5). In general, extension of the DNA primer was comparable to that of 200 μ M dNTPs (Figure 1F, lanes 3-5, orange and green) and a slight reduction of full-length product was observed (Figure 1G, lanes 3-5, orange and green). In contrast, cell-free extracts like the p41/p46 complex were much more sensitive to the balance and concentration of dNTPs (Figure 1B and 1E, lane 3 compared with lanes 4-5). Increasing dNTPs physiological concentrations (from ratios 1 to 2) resulted in the synthesis of shorter and longer DNA fragments by cell-free extracts (Figure 1B and 1G, lanes 4-5, blue) and by the p41/p46 complex (Figure 1E and 1G, lanes 4-5, grey), respectively. Taken together the results show that the balance and concentration of dNTPs affect more strongly DNA synthesis by the p41/p46 complex than to the two HiFi DNA Pols.

When primer extension reactions were carried out with 200 μ M of the four rNTPs in the presence of cell-free extracts or individual DNA Pols, the highest incorporation efficiency was observable with PolD (60% extension) (Figure 1F, lane 6, green), extending from DNA primers as short as 4 ribonucleotides (rNMPs) (Figure 1B-E, lane 6). About 2-fold reduction of rNMPs incorporation was obtained for the p41/p46 complex, while showing addition of at least 5 rNMPs from the DNA primer (Figure 1E-F, lane 6, grey). Comparatively, cell-free extracts retained significant DNA primer extension by adding one rNMPs (Figure 1B-F, lane 6, blue), which was almost negligible for PolB (Figure 1D-F, lane 6, orange). When rNTPs were used at the physiological ratios, almost identical profiles of polymerization were observed, with PolD, the p41/p46 complex and cell-free extracts the most proficient in rNMPs incorporation (Figure 1B-C and 1E-F, lanes 6-8). Both the balance and concentration of rNTPs affected polymerization activity by the p41/p46 complex and cell-free extracts (Figure 1B-E). In particular, a stimulation and a reduction of rNMPs incorporation are observed upon increasing cellular concentrations, respectively, for the p41/p46 complex and cell-free extracts (Figure 1F, lanes 7-8), while no major changes were seen with PolD (Figure 1D and 1F, lanes 7-8, green). Inhibition of polymerization by PolB is obtained upon varying of the balance (Figure 1D, lanes 6-7) and increasing rNTPs concentration from ratio 1 to 2 (Figure 1D, lanes 7-8). Taken together the results show that PolD polymerase activity is much less

affected by the balance and concentration of rNTPs compared to that of PolB and the p41/p46 complex.

When primer extension reactions were carried out with all eight nucleotides at physiological concentrations (ratios 1 and 2) in the presence of cell-free extracts or individual DNA Pols, the efficiency of primer extension was as high as with all four dNTPs (~82% extension) (Figure 1F, lanes 3-5 compared with lanes 9-10). Moreover, the profiles of polymerization were almost comparable for all three DNA Pols and cell-free extracts in the presence of cellular concentrations (ratios 1 and 2) of the four dNTPs or all eight nucleotides (Figure 1B-E, lanes 4-5 compared with lanes 9-10). Although leading to longer and shorter extension products by the p41-p46 complex and cell-free extracts, respectively, (Figure 1B and 1E), increasing physiological concentrations of all eight nucleotides from ratio 1 to 2 did not significantly affect polymerization by the two HiFi DNA Pols. Only a 2-fold reduction of full-length product synthesis is observed with PolD, while expanding slightly with PolB (Figure 1G, lanes 9-10). Overall, these results clearly show that the ratios of dNTPs/rNTPs likely dictate the frequency of rNMPs incorporation by *P. abyssi* DNA Pols.

Incorporation of rNMPs into the duplex DNA (short DNA primer-template)

Because cell-free extracts and the three DNA pols were able to add rNMPs (Figure 1B-F, lanes 6-8, page 87) to the DNA primer and that polymerisation occurred at physiological ratios 1 and 2 (Figure 1B-F, lanes 9-10), we next evaluated the level of rNMPs incorporation into the duplex DNA. Extension products obtained from the 17-mer DNA primer annealed to the 87-mer template at physiological ratios 1 and 2 were treated with 0.25 M NaCl (control) or with 0.25 M NaOH to hydrolyze the DNA backbone at locations where rNMPs are present (Figure 2, page 88). The results show that only the extension products generated by *Pab*PolD were sensitive to NaOH treatment (Figure 2B) in comparison with cell-free extracts (Figure 2A), PolB (Figure 2C) and the p41/46 complex (Figure 2D). In this case, the 5'-labeled alkaline hydrolysis products resulted in the appearance of shorter fragments which mainly corresponded to the +1, +2 and +3 rNMP additions from the DNA primers (Figure 2B, intensity distribution traces). Therefore, we conclude that PolD is prone to embed rNMPs into a short stretch of the duplex DNA at physiological nucleotide pools, precluding any rNMPs insertion steps by PolB and the p41/p46 complex under these condition reactions.

Bypass of a single rNMP in a DNA Template

In the above experiments, we demonstrated that *P. abyssi* DNA PolD is prone to efficiently incorporate rNTPs into the DNA at physiological nucleotide levels. If left unrepaired, as recently shown in the genome of thermococcale cells defective in RNase HII (Heider *et al.*,

2017), rNMPs persist in the template strand used for the next round of DNA replication. Therefore, we examined the ability of cell-free extracts and all three DNA Pols to bypass a single embedded rU, rA, rG or rC located at the same position in the primer-template (i.e. 16 bases ahead of the 17/87 primer-template junction), corresponding to dT, dA, dG or dC in the control template (Figure 3A, page 89). In general, cell-free extracts or DNA Pols were able to bypass each of the four different rNMPs (Figure 3B-E), albeit at reduced efficiencies compared to the dNMP-containing templates (Figure 3F). rUMP was the highest inhibitory to primer-extension (<20% compared to ~87% with the dTMP control), followed by rC (<40% compared to ~87% with the dCMP control), then rAMP and rGMP (<75% compared to ~87% with the dAMP and dGMP controls, respectively). Examination of the patterns of replication products indicated that DNA Pols or cell-free extracts stalled during primer-extension, with a noticeable arrest one nucleotide upstream of the rNMP (32-nt position) (Figure 3B-E). Compared to PolD, PolB or cell-free extracts, stalling is particularly significant for the p41/p46 complex (Table S2, page 97), a difference that reflects abortive full-length DNA synthesis (Figure 3E).

The gels shown in Figure 3B-E indicate that rNMP-containing templates reduce DNA synthesis by DNA Pols and cell-free extracts. The inhibition could plausibly arise because RNA-dependent degradation of the template reduces the amount of available primer-templates. To address this possibility, 6-carboxyfluorescein-labelled templates containing each of the four rNMP and annealed to the DNA primer were incubated without or with DNA Pols or cell-free extracts (Figure S2, page 97). In all cases, neither DNA Pols nor cell-free extracts did cut rNMPs-containing templates, precluding any hydrolysis of the phosphodiester bond in an endonucleolytic manner. Moreover, strand cleavage caused by the presence of the 2'-OH of the ribose ring and accelerated at increased temperature (Ginoza *et al.*, 1964), was never generated under our experimental conditions (Figure S2, control without enzymes). Therefore, template degradation cannot account for the inhibition of polymerization seen in the presence of rNMP.

Single nucleotide incorporation opposite dNMP- or rNMP-containing templates by archaeal DNA polymerases

To estimate the physiological relevance of rNTPs on the overall fidelity of DNA synthesis, we analyze their incorporation opposite dNMP-containing templates. A series of 26-mer/34-mer primer-templates in which the first template base was varied (dCMP, dAMP, dTMP, or dGMP) have been incubated with each of the four rNTPs and DNA Pols so that the DNA primer would be extended by only one rNMP. Figure 4A (page 90) shows the results obtained with dCMP at the first template position. In this context, all three DNA polymerases

displayed significant dGMP incorporation (>90% incorporation), as expected, although erroneous incorporation was also detectable. In the presence of a single rNTP, all three DNA Pols provided accurate rGMP incorporation but the efficiency was reduced compared to dGMP. PolD shows a moderate decrease in incorporation levels with 23% and 95% for rGMP and dCMP, respectively (Figure 4A). PolB and the p41/p46 complex suffer from a marked decrease in incorporation levels with 16% and 90% for rGMP and dCMP, respectively, for PolB, compared to 3% and 98% for rGMP and dCMP, respectively, for the p41/p46 complex. In general, the ribonucleotide incorporation levels were reduced for all three DNA Pols and influenced by the dNMP template base (Figure 4A and Figure S3A, C, E). In agreement with the results in Figures 1-2, PolD was the most proficient for rNMP incorporation compared to PolB and the p41/p46 complex.

To further analyze the ribonucleotide incorporation capability by all three DNA Pols, single rNTP additions at the first template position were performed with rNMP-containing templates. In the control experiments, all three DNA Pols significantly incorporated dGMP opposite the rCMP template base (>60% incorporation) and showed minor misinsertion events (Figure 4B). Generally, all three DNA Pols exhibited accurate dNMP insertion opposite the canonical rNMP-containing template. PolB and PolD retained comparable levels of dTMP or dCMP incorporation at the adenine or guanosine template base, independently of the identity of the sugar (Figure S3 A-B and E-F, page 93 and 95). On the other hand, the level of dTMP incorporation remains stable opposite dAMP/rAMP-containing templates (~99 / 92% incorporation, respectively) for the p41/p46 complex, while a decrease in dCMP incorporation efficiency (~1.5-fold reduction in incorporation) due to the sugar variation was observed. When the experiments were performed with dCMP/rCMP- or dTMP/rUMP-containing templates, a reduction of dGMP or dAMP incorporation efficiency was noticeable for all three DNA Pols but this effect was more pronounced for the p41/p46 complex. Overall, these results are consistent with the bypass properties of DNA Pols observed in Figure 3 (page 89), demonstrating that the gradual reduction of dNMP incorporation is governed by both the identity of the sugar and the template base. Thus, the priority order for dNMP insertion opposite the rNMP-containing template is rGMP=rAMP>rCMP>rUMP.

When the reactions were carried out with each of the four rNTPs and the rNMP-containing templates, neither PolB nor the p41/p46 complex were able to extend the DNA primer. Besides, the exonuclease activity of PolB was particularly enhanced with rAMP- and rUMP-containing templates (Figure 4B and Figure S3B, D, F). Conversely, PolD correctly base-paired a single ribonucleotide opposite rNMP-containing templates but this insertion only occurred at the cytosine and guanine template bases (Figure 4 and Figure S3F). In this case, the incorporation efficiency was higher at rC compared with rG (75% and 47% incorporation,

respectively). Interestingly, when all four rNTPs were simultaneously added, PoID could generate similar amounts of extension products opposite the cytosine and guanine template bases (75% and 34% incorporation, respectively), while showing a different extension behavior. The enzyme was able to insert and extend the DNA primer from multiple consecutive ribonucleotides (up to six rNMP additions), and the distribution of longer products was more pronounced in the presence of rCMP-containing templates (Figure 4 and Figure S3F). Taken together these results clearly demonstrate that PoID has the highest propensity to extend faithfully a DNA primer from one to multiple consecutive rNMPs on dNMP-containing templates. Although unexpected, PoID also displays rNMP incorporation on rNMP-containing templates, occurring with high accuracy and specificity.

Discussion

Le contrôle de la synthèse des dNTPs par les ribonucléotides réductases permettant de maintenir une concentration cellulaire non délétère pour la cellule est un des premiers paramètres nécessaire à la maintenance génomique (Buckland *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2010; Mathews, 2014). Le second serait la sélectivité exercée par les ADN polymérases couplée à leur activité de relecture permettant une duplication fidèle de l'ADN. Ces deux paramètres fortement liés ont été au cœur de cette étude. En effet, il a été exploré, chez l'Euryarchaea hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*, l'influence du contenu cellulaire en nucléotides sur la synthèse de l'ADN ainsi que la sélectivité des ADN polymérases pour les plus abondants des nucléotides, les rNTPs. Puis l'impact de la présence de rNMP dans l'ADN sur l'efficacité de polymérisation des ADNs polis a été étudié.

Abondance physiologique des nucléotides

La mesure de la quantité intracellulaire des dNTPs et des rNTPs chez *P. abyssi* a donc constitué la première partie de cette étude. Celle-ci, réalisée en phase exponentielle de croissance, a permis de déterminer les abondances physiologiques des dNTPs (dT>dG≥dA>dC) ainsi que celle des rNTPs (rA>rG≥rU>rC), (Table 1, page 86). De plus il a été constaté que la quantité de ribonucléotides est largement supérieure, ici de 20 fois, à celle en désoxyribonucléotides, ce qui est globalement le cas pour toutes les cellules des trois domaines du vivant (Buckstein *et al.*, 2008; Ferraro *et al.*, 2010; Gon *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2016; Nick McElhinny and Ramsden, 2003; Traut, 1994) (Tableau II, page 27).

Influence du contenu en nucléotides sur la synthèse d'ADN

La concentration des dNTPs dans la cellule varie au cours du cycle cellulaire (Chapitre I, page 28). La production des dNTPs augmente durant la phase de synthèse (phase S) alors que le contenu en rNTPs est relativement constant ce qui implique que hors de cette phase, le ratio rNTPs/dNTPs est plus élevé. Puisque la sélectivité des ADN polymérases est mise à l'épreuve par cette différence de la proportion intracellulaire entre les deux catégories de nucléotides, celle-ci est d'autant plus élevée hors de la phase S.

Dans un premier temps, il a été examiné l'effet de la variation du ratio et de la concentration en dNTPs sur la synthèse ADN (Figure 1, page 87). Globalement les résultats montrent que la variation du ratio et la concentration en dNTPs affectent plus fortement la synthèse d'ADN par le complexe p41/p46 que par les ADN polymérases PolB et PolD. Le complexe primase synthétise des fragments plus longs lorsque les concentrations en dNTPs sont plus faibles (ratio 2). Il pourrait être supposé que puisque le complexe p41/p46 n'est pas une ADN

polymérase répliquative mais plutôt réparative, elle serait plus à même de réaliser la synthèse d'ADN en présence de plus faibles concentrations de désoxyribonucléotides, c'est-à-dire hors de la phase S comme le suggère les résultats (Figure 1, page 87).

Incorporation de ribonucléotides

Puisque plusieurs études ont démontré l'incorporation de rNMPs dans l'ADN par les ADN pols (Heider *et al.*, 2017; Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Van de Sande *et al.*, 1972) (Tableau VII, page 85), il a été vérifié si les ADN polymérases de *P. abyssi* (PolB, PolD, complexe p41/p46 et extrait cellulaire) étaient également capables d'incorporer des rNTPs dans un contexte d'extension d'amorce ADN en présence d'une matrice ADN. Il s'avère que toutes les trois le réalisent (Figure 1, page 87 et Figure 4 page 90). Cependant l'ADN polymérase PolD a une capacité d'extension plus importante que les autres ADN polymérases. En effet, lors d'une extension d'amorce ADN en présence de rNTPs uniquement, sa capacité à allonger l'amorce ADN par des rNMPs est plus importante que celle des autres ADN polymérases (Figure 1F, ligne 6-7-8, page 87). Cet effet est confirmé en figures 4 et S3 où la Pol D s'avère être l'ADN polymérase la plus efficace dans l'incorporation des ribonucléotides.

Afin de s'approcher des conditions physiologiques, l'impact de la présence des rNTPs sur la polymérisation a été étudié. En présence de dNTPs et de rNTPs, les ADN polymérases répliquatives PolD et PolB utilisent l'amorce ADN et forment des brins de tailles équivalentes identiquement à une synthèse en présence seulement de dNTPs et d'une amorce/matrice ADN de petite taille (17/87) (Figure 1, page 87). Une diminution de la longueur des brins synthétisés par le complexe p41/p46 et une augmentation de ceux synthétisés par les extraits cellulaires est cependant observé. Afin de déterminer quels étaient les nucléotides incorporés dans ces conditions, les capacités de polymérisation des trois ADN Pols en présence des huit nucléotides (ratio 2) ont été étudiées afin de déterminer la nature des nucléotides incorporés (Figure 2, page 88). Dans les conditions expérimentales utilisées, il s'est révélé que seule l'ADN polymérase PolD est capable d'incorporer des ribonucléotides contrairement à PolB, au complexe p41/p46 ou encore aux extraits cellulaires. De façon comparative aux récents résultats obtenus chez *Thermococcus kodakarensis* où l'ADN polymérase de la famille B est identifiée comme incorporant des rNMPs en présence des huit nucléotides (Heider *et al.*, 2017) (Tableau VII, page 85), l'ADN polymérase PolB de *Pyrococcus abyssi* n'a pas démontré une activité d'incorporation de rNMPs en présence d'une amorce/matrice de courte longueur. Toutefois, ces résultats sont à examiner avec précaution car d'une part, les concentrations en nucléotides utilisés dans l'étude de *T. kodakarensis* sont ceux décrits chez les eucaryotes et, d'autre part, l'amorce/matrice est de

plus grande taille. Ces observations amènent ainsi à procéder à une expérimentation supplémentaire (Figure 2, page 88). Dans ce cas, une élongation d'amorce en présence de rNTPs/dNTPs au ratio physiologique et d'une matrice plus longue (M13mp18) est en cours de réalisation. Cette dernière acquisition ouvrira la discussion sur les capacités des trois ADN pols de *P. abyssi* à incorporer (ou non) les rNMPs dans l'ADN dans un contexte de vie cellulaire .

Impact de la présence de rNMP dans l'ADN sur l'efficacité de polymérisation par les ADN polymérases

Sachant que l'ADN polymérase PolD est capable d'incorporer des rNMPs, il a été regardé la capacité des ADN polymérases de *P. abyssi* à « passer » un ribonucléotide présent dans une matrice ADN lors d'une réaction d'élongation d'amorce (Figure 3, page 89) (Tableau VII, page 85). De façon globale, les extraits cellulaires et les trois ADN polymérases sont capables de « passer » un rNMP avec tout de même une diminution de l'efficacité d'élongation comparativement à une matrice contenant seulement des dNMPs. Cette diminution de la synthèse de l'ADN engendrée par la présence d'un ribonucléotide a déjà été observée avec les ADN polymérases eucaryote et bactérienne (Pol ϵ et Pol III), (Nick McElhinny *et al.*, 2010a; Williams *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013). De façon universelle, la présence de rNMPs semble donc avoir des conséquences sur la réplication de l'ADN. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en avant une différence entre les ADN polymérases qui est plus ou moins influencée par la nature de la base. En effet, une pause dans la synthèse de l'ADN est observée une base en amont du rNMP et ceci de façon très importante en présence du complexe p41/p46. Par ailleurs, la présence de rU et de rC dans la matrice inhibe de façon plus forte la synthèse de l'ADN que le rA ou le rG (Figure 3, page 89).

Fidélités des ADN polymérases

Puisque les ADN polymérases sont capables de « passer » un rNMP, la nature du nucléotide incorporé en face de chacun des quatre dNMPs ainsi que des quatre rNMPs a été examinée avec les trois ADN polymérases (Figure 4, page 90 et Figure S3 page 93). De façon intéressante les ADN polymérases incorporent les rNTPs en respectant la complémentarité des bases en face des dNMPs. Egalement, elles incorporent le dNTP de façon complémentaire au rNMP, et ainsi préservent l'intégrité des appariements des bases. Cependant la capacité à allonger une amorce/matrice ADN avec des ribonucléotides semble être une fonction propre à l'ADN polymérase PolD qui, également, est capable d'insérer un rNMP en face d'un autre rNMP. La PolD est donc l'ADN polymérase qui incorpore le plus

facilement des rNMPs dans l'ADN parmi les trois ADN pols. Un ordre d'incorporation préférentielle a même pu être établi (rGMP=rAMP>rCMP>rUMP).

Ensemble, ces résultats consolident le fait que le contenu en nucléotides est un facteur clef de la stabilité génomique. Une faible concentration en désoxyribonucléotides augmente les capacités de synthèse de l'ADN du complexe p41/p46 confortant l'hypothèse de son implication en temps qu'ADN polymérase lors de mécanismes de réparation de l'ADN (Le Breton *et al.*, 2007). Les ADN polymérases répliquatives PolB et PolD sont quant à elles peu sensibles à une fluctuation de la concentration en dNTPs. Cependant la présence de rNTPs conjointement aux dNTPs au cours de la synthèse de l'ADN a pu démontrer l'incorporation de ribonucléotides par l'ADN polymérase PolD. Si la présence de ces derniers dans l'ADN est conservée au cours du cycle suivant, il s'avère que les ADN polymérases répliquatives, PolB et PolD ainsi que l'ADN polymérase p41/p46, sont capables de synthétiser un brin d'ADN de façon complémentaire au brin matrice ADN contenant un rNMP, tout en respectant les règles d'appariement des bases. Ces résultats suggèrent que la fidélité de synthèse par les ADN polymérases dans ce contexte est préservée. Les conséquences sur la transmission de l'information génétique semble ainsi peu dramatiques pour la survie cellulaire. Cependant le fait que l'ARN soit plus sensible à l'hydrolyse (Oivanen *et al.*, 1998) et qu'une modification de la structure hélicoïdale de l'ADN soit provoquée par la présence de rNMP (Chiu *et al.*, 2014; Evich *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2015) peut compromettre la stabilité de la molécule ADN. Ainsi la présence de mécanismes de réparation permettant l'élimination des ribonucléotides de l'ADN est nécessaire. Dans le cas de *P. abyssi*, le premier rempart aux rNMPs dans l'ADN semble être la présence d'un « stéric gate » (Annexe 1, page 158) efficace de l'ADN polymérase PolB puisque aucune incorporation de ribonucléotides ne peut, dans les conditions testées, lui être allouée. Même si, dans une moindre mesure, elle incorporerait des rNMPs, ce « stéric gate » semble limiter cette erreur. La seconde protection pourrait être attribuée aux activités de relecture des ADN polymérases PolB et PolD (Gueguen *et al.*, 2001) comme cela a déjà été montré chez les ADN polymérase répliquatives des eucaryotes (Williams *et al.*, 2012) (Tableau VII, page 85). Enfin le mécanisme d'élimination par le système RER, déjà décrit chez *T. kodakarensis*, (Heider *et al.*, 2017) paraît être la dernière défense la plus probable puisque *P. abyssi* dispose des équivalents moléculaires (Henneke, 2012).

Le tableau VII, ci-après, est un état des lieux des connaissances sur l'incorporation et le retrait/exclusion des ribonucléotides par les ADN polymérases. Cette mise à jour fait suite à l'acquisition des données présentée ci-dessus ainsi que celles présentées page 103 et chapitre III (page 109).

Caractéristiques	Eucaryote	Bactérie	Archée
Incorporation de ribonucléotides			
Réplication	Pol α , Pol ϵ , Pol δ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Homo sapiens</i>)	Pol I, Pol III (<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i>)	Pol B, Pol D (<i>Thermococcus kodakarensis</i> , <i>Pyrococcus abyssi</i>)
Réparation	Pol η , Pol ζ , Pol μ , Pol β , Pol ι , Pol λ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Homo sapiens</i>)	Pol I, Pol IV (<i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i>)	Complexe p41/p46 (<i>Pyrococcus abyssi</i>)
Réplacatio/Réparation ADN mitochondriale	Pol γ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>)	/	/
« passage » d'un rNMP	Pol α , Pol ϵ , Pol δ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Pol III (<i>Escherichia coli</i>)	Pol D, Pol B, complexe p41/p46 (<i>Pyrococcus abyssi</i>)
Retrait/Exclusion des ribonucléotides			
Activité de relecture (3'-5' exonucléasique)	Pol ϵ , Pol δ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Homo sapiens</i>)	/	Pol D, Pol B? (<i>Pyrococcus abyssi</i>), (Chapitre III)
« steric gate »	Pol η , Pol κ , Pol ι , Pol REV1, Pol α , Pol δ , Pol ϵ , Pol ζ , Pol β , Pol λ , Pol μ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Homo sapiens</i>)	Pol I, Pol IV, Pol V (<i>Escherichia coli</i>)	Pol B, Dpo4 (<i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Pyrococcus abyssi</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i>)

Tableau VII: Incorporation et retrait/exclusion des ribonucléotides par les ADN polymérases des trois domaines du vivant (Cerritelli and Crouch, 2016; Donigan et al., 2014; Heider et al., 2017; Schroeder et al., 2015; Williams et al., 2016)

Tables and Figures

dNTPs	Concentration (pmol/10 ⁸ cells)	rNTPs	Concentration (pmol/10 ⁸ cells)
dA	8.1 ± 3.8	rA	288.0 ± 93.1
dC	2.8 ± 1.5	rC	84.1 ± 25.6
dG	8.8 ± 4.2	rG	185.0 ± 41.7
dT	17.1 ± 7.2	rU	162.0 ± 46.0

Table 1. Intracellular levels of nucleotides in *Pyrococcus abyssi*.

The levels of dNTPs and rNTPs were evaluated from exponentially growing cells. The nucleotides pool represents the average of 14 and 15 replicate experiments from three biological samples and error bars correspond to standard deviations.

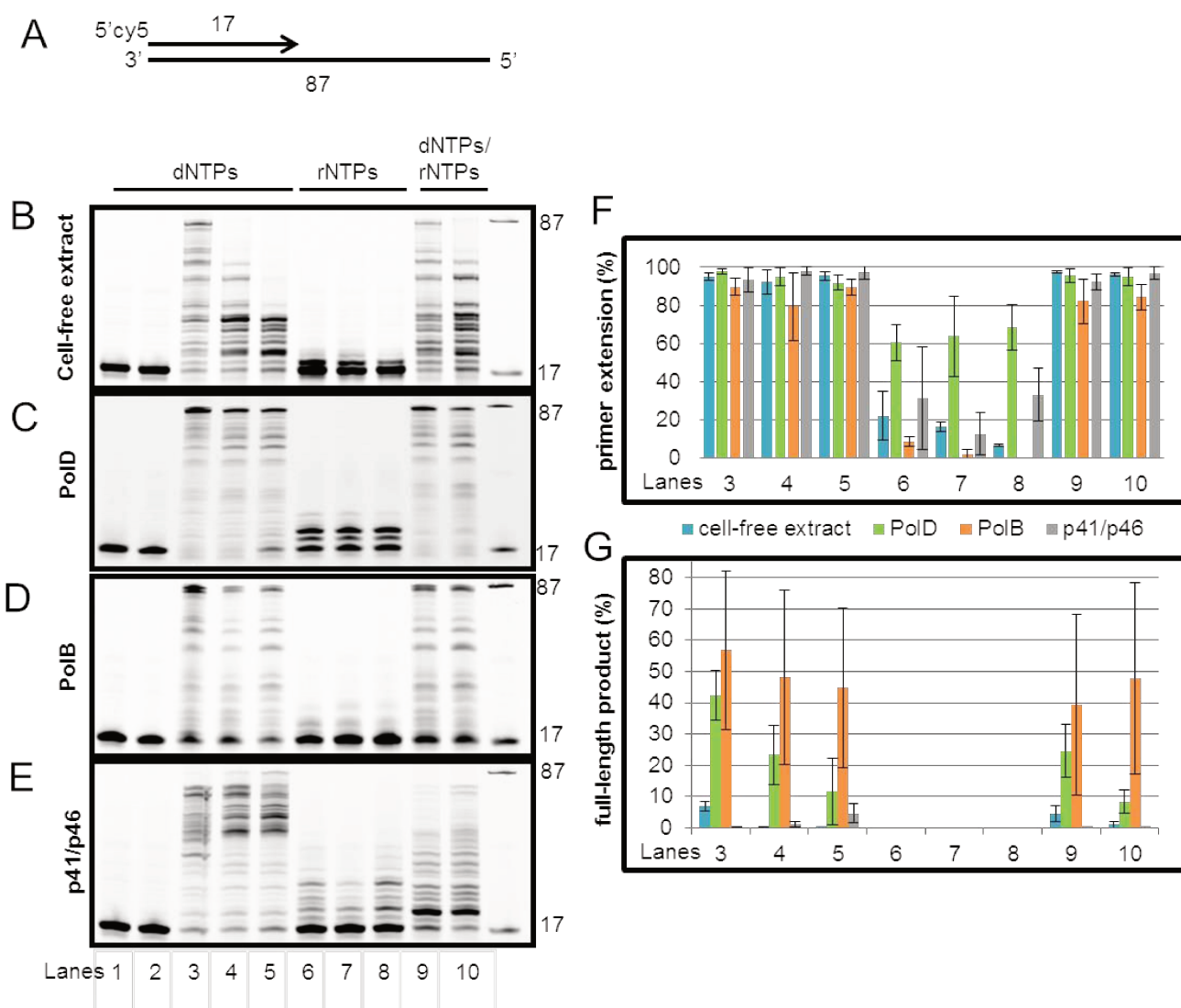


Figure 1. Influence of nucleotide pools on primer extension activities

Primer-template extension reaction of the 5'-Cy5-labelled 17/87 primer-template. (A) Structure of the primer-template mimic (for full sequences, see Table S1). (B-E) Extensions using cell-free extracts (B), PolD (C), PolB (D) and the p41/p46 complex (E) from *P. abyssi* during a 30 minute reaction containing: lane 1, control p/t without enzyme; lane 2, control without incubation; lane 3, all four dNTPs at 200 μ M each; lane 4, ratio 1 with all four dNTPs at 95 μ M dATP, 103 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 33 μ M dCTP; lane 5, ratio 2 with all four dNTPs at 5.6 μ M dATP, 6.1 μ M dGTP, 11.9 μ M dTTP, 2 μ M dCTP; lane 6, all four rNTPs at 200 μ M each; lane 7, ratio 1 with all four rNTPs at 3359 μ M rATP, 2157 μ M rGTP, 1889 μ M rUTP, 981 μ M of rCTP; lane 8, ratio 2 with all four rNTPs at 200 μ M rATP, 128.4 μ M rGTP, 112.4 μ M rUTP, 58.4 μ M rCTP; lane 9, ratio 1 with all four dNTPs and rNTPs; lane 10, ratio 2 with all four dNTPs and rNTPs. Reference oligodeoxynucleotides of 87 and 17 bases are indicated on the right of each panel. Gel images of reaction products shown in Figures 1B-E were quantified as described in "Experimental procedures". Bar graph of extension and full-length products are summarized in Figures 1F-G, respectively. Error bars are the averages (\pm standard deviation) from at least three independent experiments.

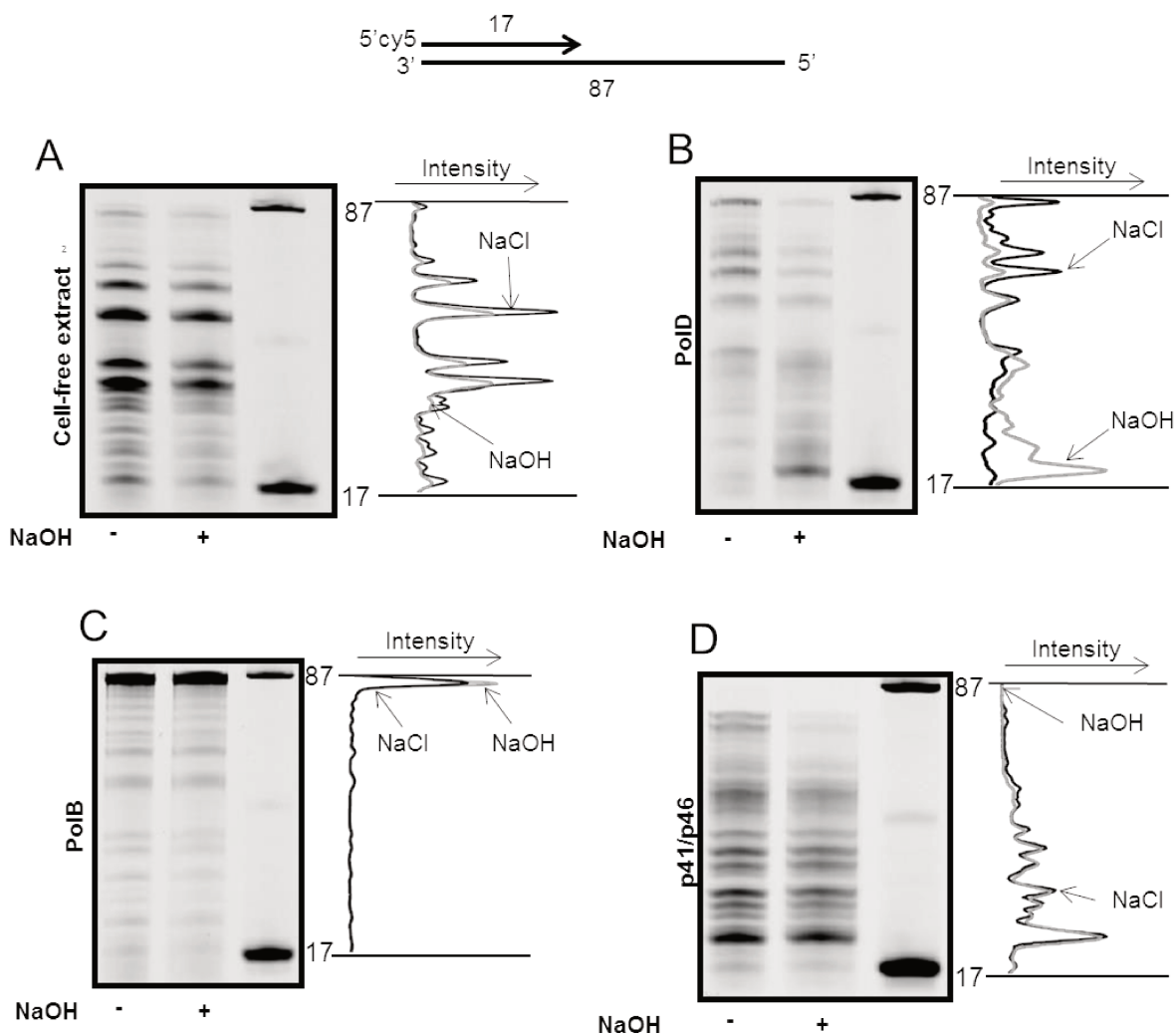


Figure 2. Incorporation of rNMPs into the duplex DNA (short DNA primer-template)

Primer-template extension reaction of the 5'-Cy5-labelled 17/87 primer-template. The structure of the primer-template is represented at the top (for full sequences, see Table S1). (A-D) Extensions using cell-free extracts (A), PoID (B), PolB (C) and the p41/p46 complex (D) from *P. abyssi* during a 30 minute reaction containing all four dNTPs at 5.6 μ M dATP, 6.1 μ M dGTP, 11.9 μ M dTTP, 2 μ M dCTP and all four rNTPs at 200 μ M rATP, 128.4 μ M rGTP, 112.4 μ M rUTP, 58.4 μ M rCTP (ratio 2). Reactions were carried out as described under "Experimental Procedures". Reactions were performed at 55°C and quenched on ice by adding an equal volume of 20 mM EDTA. Half of the reaction mixture (20 μ L) were incubated at 55°C for 2 hours with either 0.25 M NaCl (-) or 0.25 M NaOH (+), and products were resolved on 18% denaturing polyacrylamide gels. Reference oligodeoxynucleotides of 87 and 17 bases are indicated on the right of each panel. Densitometry traces of the NaCl (dark) and NaOH (grey) lanes, plotted using Image Quant TL 8.1 software, are shown on right of each gel images (A-D).

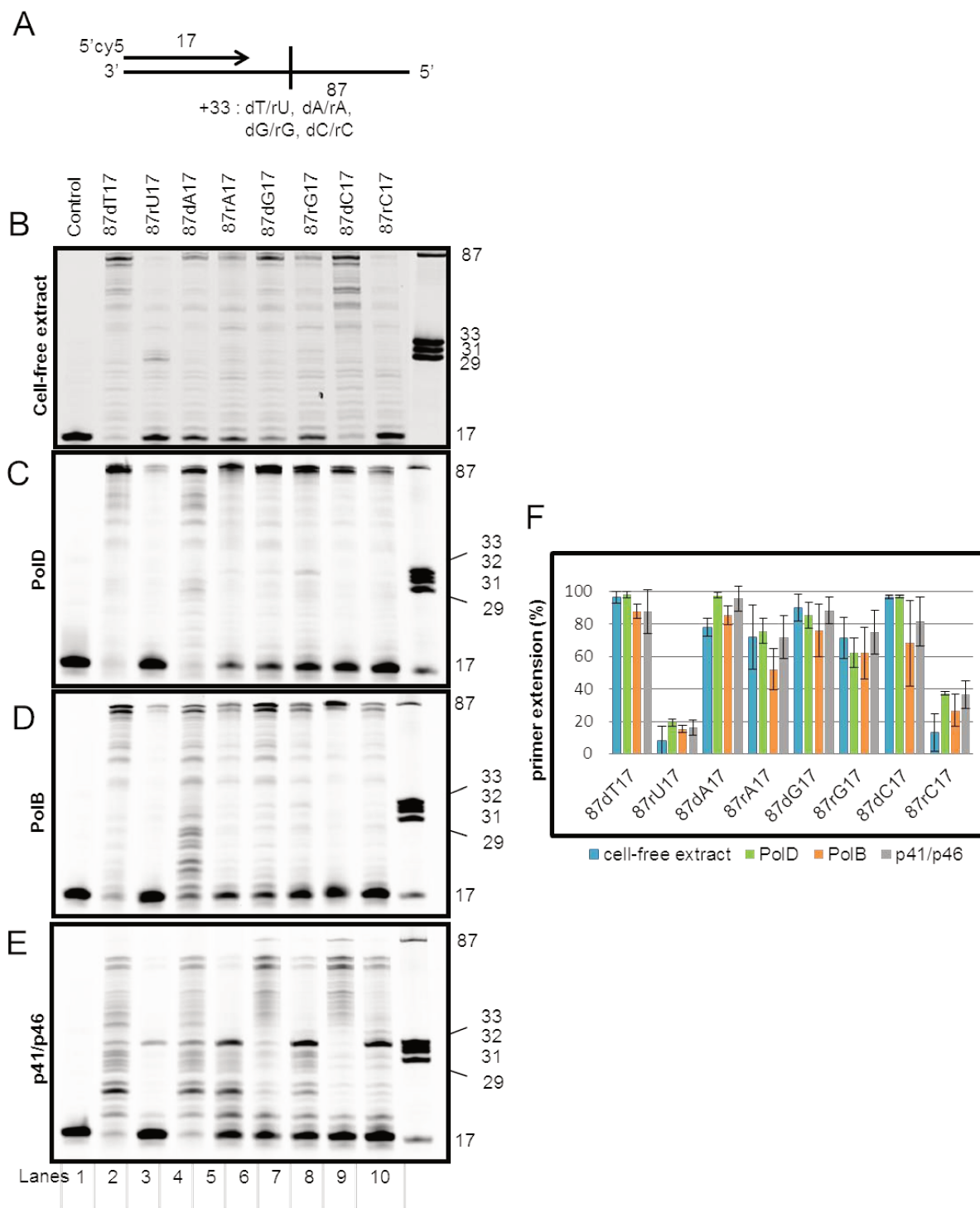


Figure 3. Bypass of a single rNMP in a DNA Template

Primer-template extension reaction of the 5'-Cy5-labelled 17/87 primer-templates that locate either dNMP or rNMP 16 bases ahead of the primer-template junction. (A) Structure of the primer-templates (for full sequences, see Table S1). (B-E) Extensions using cell-free extracts (B), PolD (C), PolB (D) and the p41/p46 complex (E) from *P. abyssi* during a 30 minute reaction containing all four dNTPs. "Control" denotes the absence of dNTPs and MgCl₂. Reference oligodeoxynucleotides of 87, 33, 31, 29, and 17 bases are indicated on the right of each panel. Gel images of reaction products shown in Figures 4B-E were quantified as described in "Experimental procedures". Bar graph of extension products are summarized in Figure 4F. Error bars are the averages (\pm standard deviation) from at least three independent experiments.

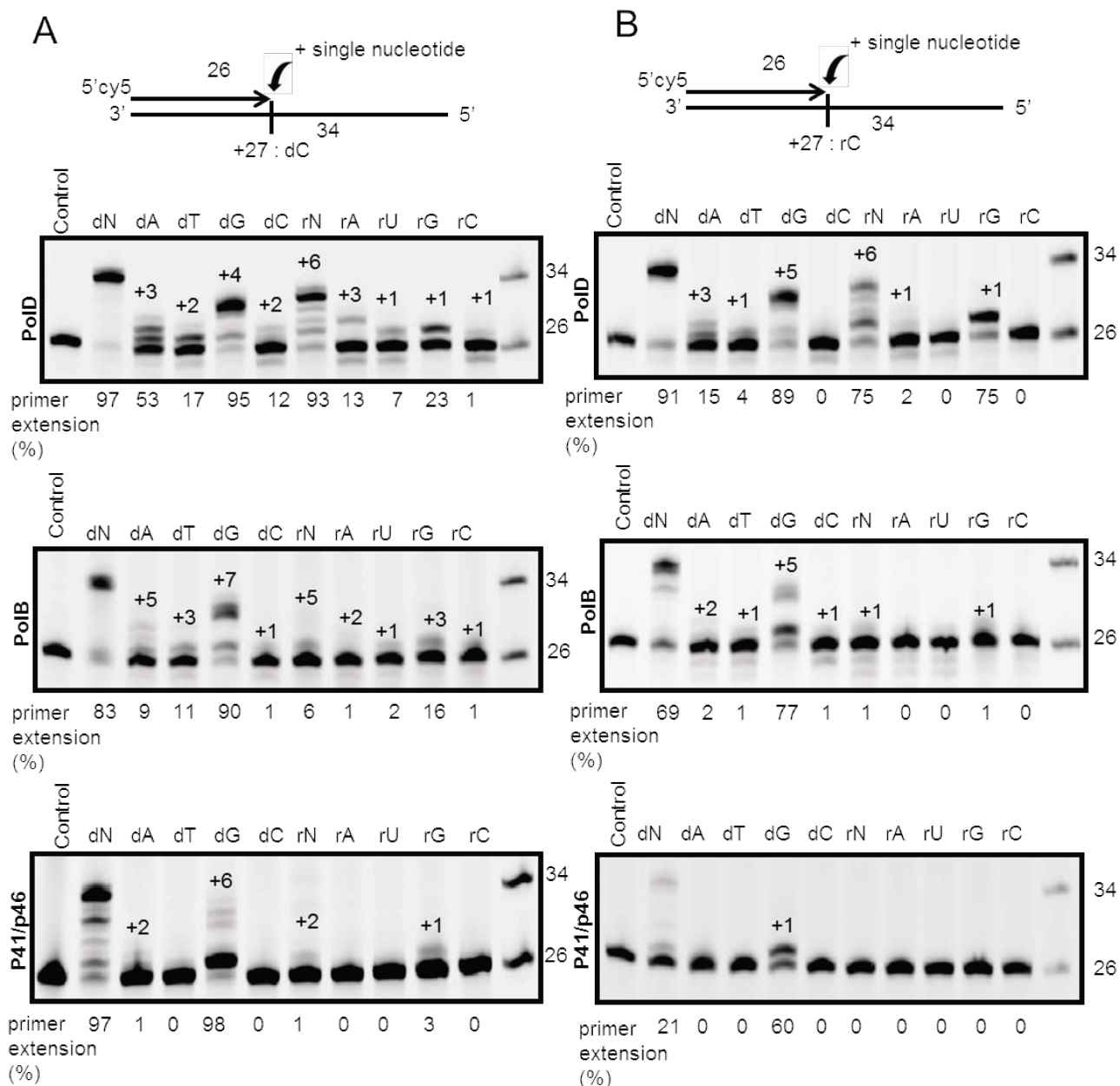


Figure 4. Single nucleotide incorporation opposite dCMP- or rCMP-containing template

DNA primer extension reaction of the 5'Cy5-labelled 26/34 primer-templates that locates dCMP or rCMP one base ahead of the primer-template junction. The structure of the primer-templates is represented at the top of each panel (for full sequences, see Table S1). (A) Base incorporation opposite template strand dCMP by PolD, PolB and the p41/p46 complex (B) Base incorporation opposite template strand rCMP by PolD, PolB and the p41/p46 complex. Each reaction shows a 30-min time point. "Control" = no enzyme added; dN = all four dNTPs added; dA, dT, dG and dC = only dATP or dTTP or dGTP or dCTP added, respectively; rN = all four rNTPs added; rA, rU, rG and rC = only rATP or rUTP or rGTP or rCTP added, respectively; +1, +2, +3, +4, +5 and +6 represent final products. The extension (%) for selected lanes is shown under the gels. Reference oligodeoxynucleotides of 34 and 26 bases are indicated on the right of each panel.

Supplemental Data

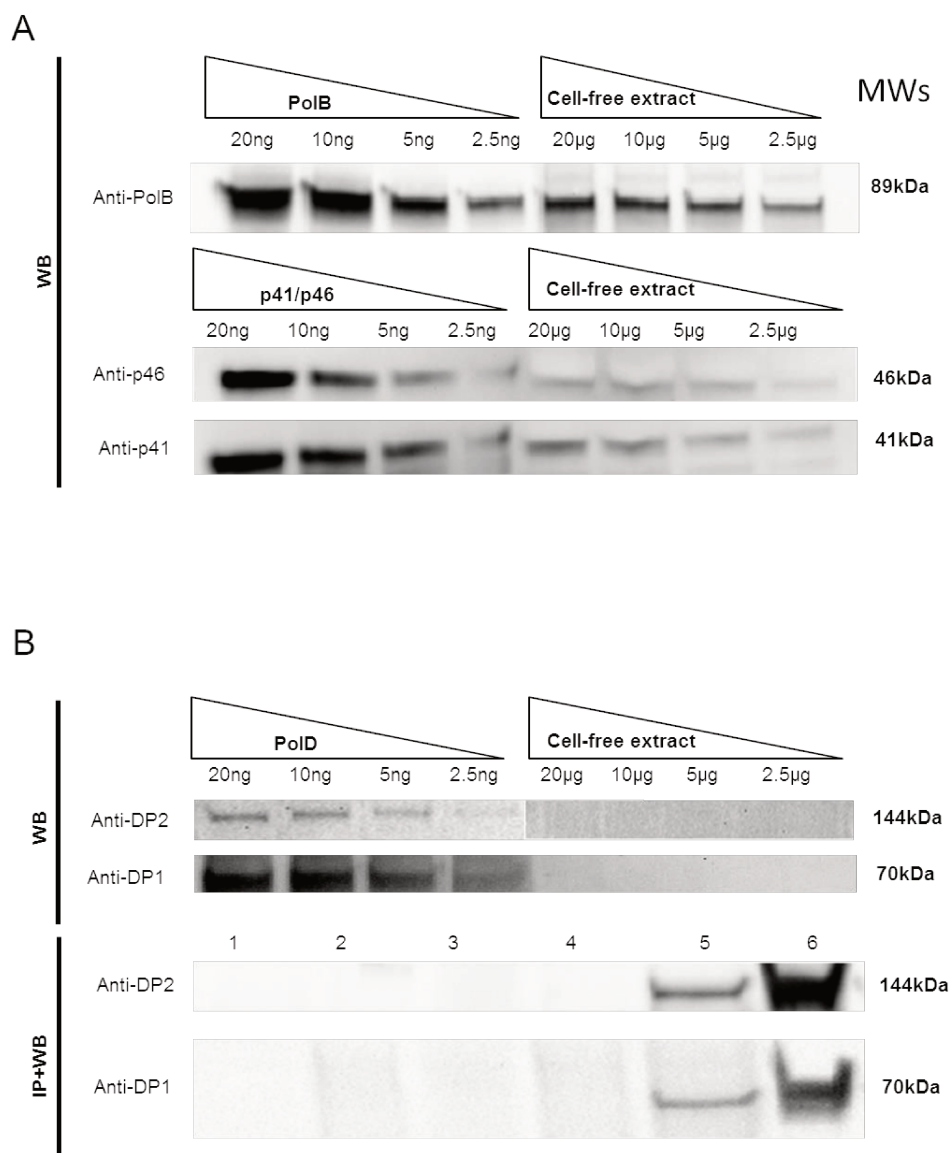


Figure S1 related to Figure 1. Immunodetection of the three *Pyrococcus abyssi* DNA polymerases in cell-free extracts.

(A) Immunoblot analyses of PolB and the p41/p46 complex from exponentially growing cells. Increased amounts of recombinant PolB and the p41/p46 complex along with cell-free extracts were separated by SDS-PAGE 4-20% gradient gels. Proteins were probed with polyclonal antibodies specific for PolB (90 kDa) and each of the two subunits of the p41/p46 complex (41 and 46 kDa), respectively. The antisera are given on the left side. (B) Immunodetection analyses of PolD from exponentially growing cells. (B1), increased amounts of the recombinant PolD and cell free-extracts were separated by SDS-PAGE 4-20% gradient gels. The heterodimeric PolD complex was probed with polyclonal antibodies specific for the large subunit (anti-DP2)(144 kDa) and the small subunit (anti-DP1)(70 kDa). (B2), interaction of the large and the small subunits of PolD in cell-free extracts. PolD was immunoprecipitated with either anti-DP1 (lane 3) or anti-DP2 (lane 5), and the precipitates were detected using the antisera given on the left side. Cell-free extracts without immunoprecipitate (lane 1), anti-DP1 bound to the beads without cell-free extracts (lane 2), anti-DP2 bound to the beads without cell-free extracts (lane 4), and the recombinant PolD complex (20 ng) (lane 6) were loaded as controls.

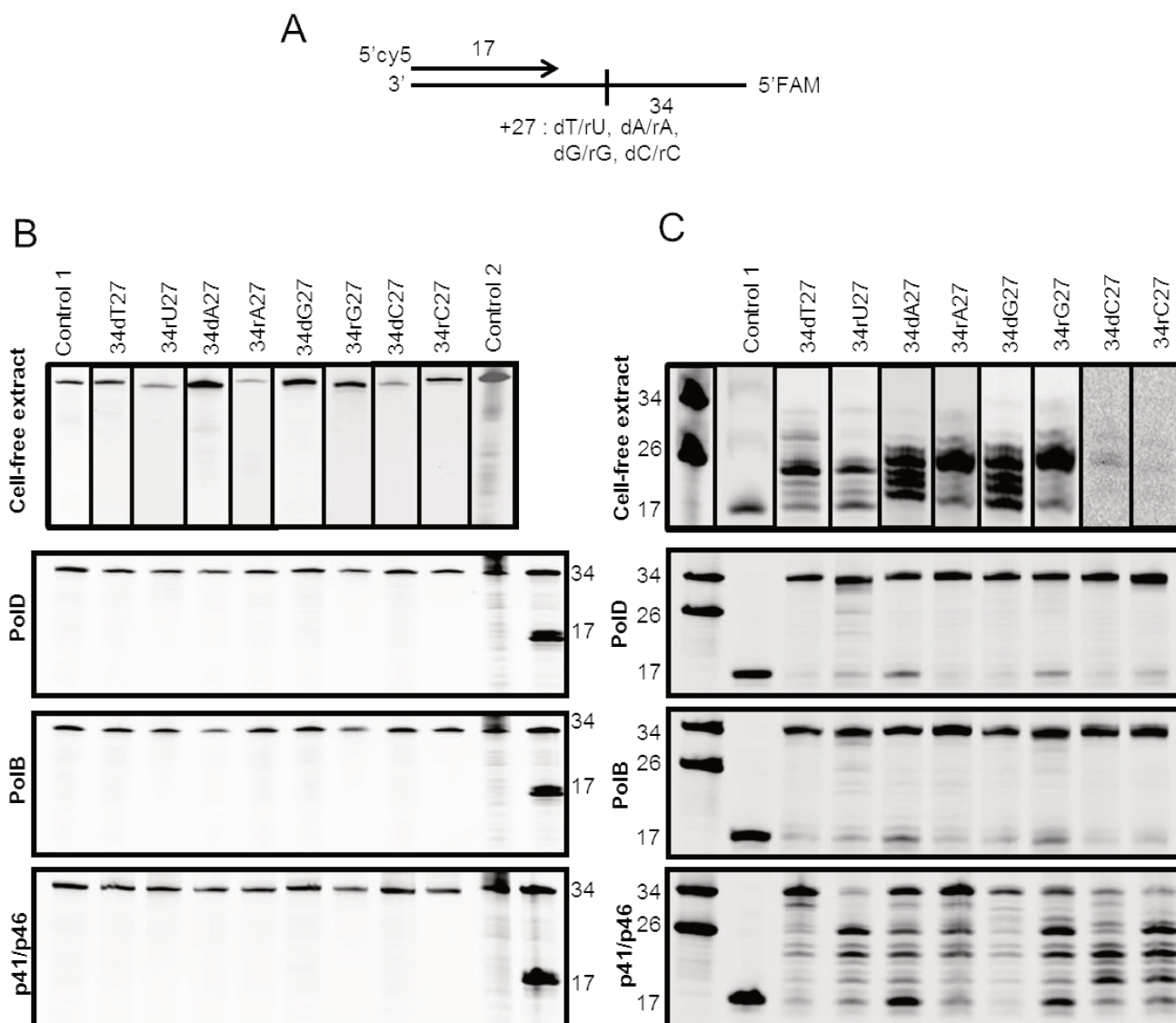


Figure S2 related to Figure 4. Primer extension and endonuclease activity on rNMP-containing primer-templates by *P. abyssi* cell-free extracts and all three DNA Pols.

The structure of the Cy5 and FAM dual labelled 17/34 primer-template is represented at the top (for full sequences, see Table S1). Primer-template extension reactions of the 17/34 primer-templates that places either rNMP or dNMP 10 bases ahead of the primer-template junction. (A) Gel imaged at 532 nm to observe the effects of cell-free extracts and DNA Pols on the FAM labelled template strand. Control 1 = no enzyme added; Control 2 = oligodeoxynucleotide 34dT17 in stop buffer with competitor oligonucleotide RC34, an exact complement of the template strand under study. Reference oligodeoxynucleotides of 34 and 17 bases are indicated on the right of each panel. (B) Gel imaged at 633 nm to observe the extension of the Cy5 labelled primer. Reference oligodeoxynucleotides of 34, 26 and 17 bases are indicated on the left of each panel. Black lines separate lanes which were not adjacent in the original gel.

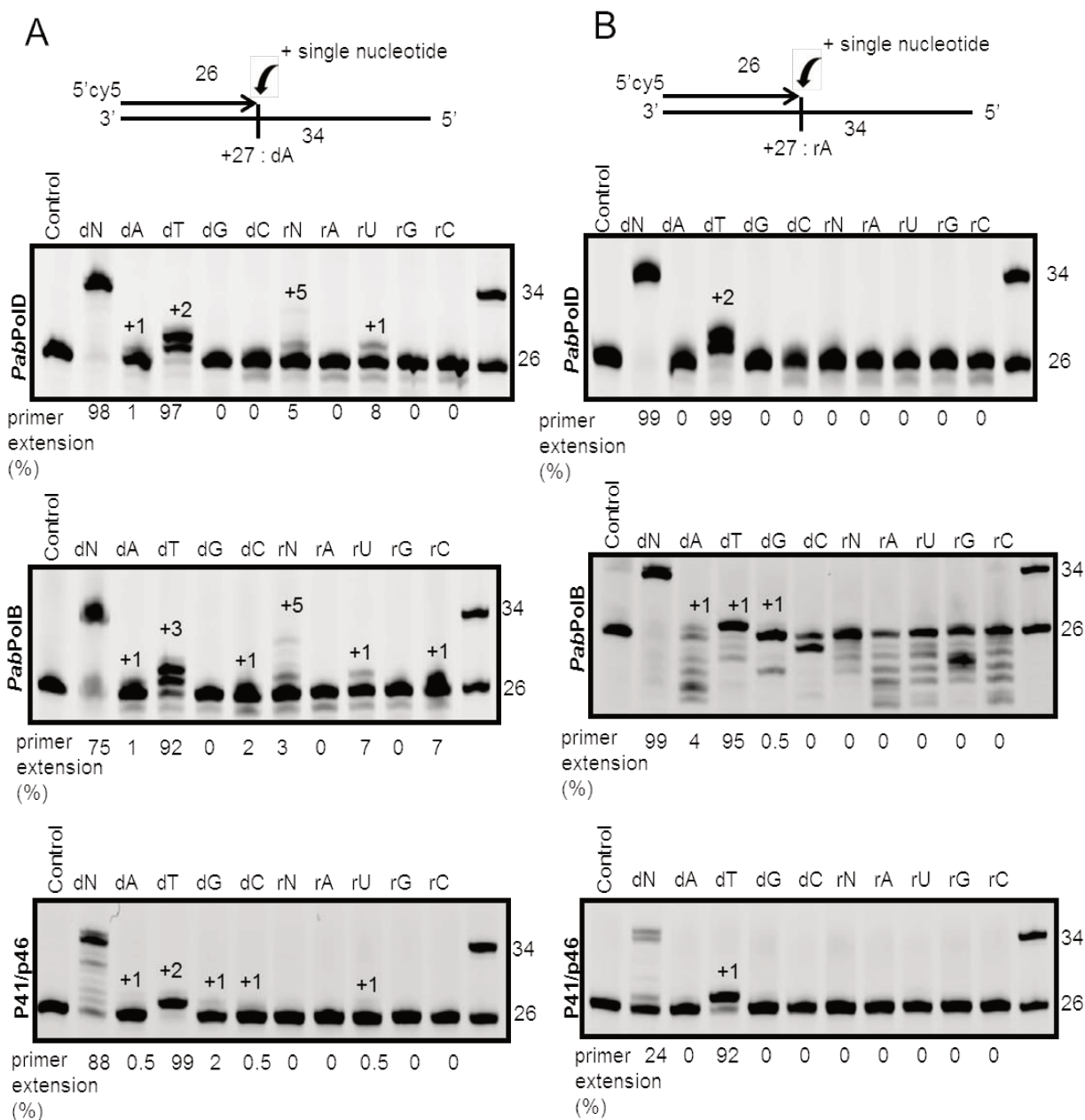


Figure S3 related to Figure 5. Single nucleotide incorporation opposite dNMP- or rNMP-containing templates by *Pyrococcus abyssi* DNA polymerases.

DNA primer extension reaction of the 5'Cy5-labelled 26/34 primer-templates that locates dNMP or rNMP one base ahead of the primer-template junction. The structure of the primer-templates is represented at the top of each panel (for full sequences, see Table S1). (A) Base incorporation opposite template strand dAMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex (B) Base incorporation opposite template strand rAMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex. (C) Base incorporation opposite template strand dTMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex (D) Base incorporation opposite template strand rUMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex. (E) Base incorporation opposite template strand dAMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex (C) Base incorporation opposite template strand rAMP by PoID, PoIB and the p41/p46 complex. Each reaction shows a 30-min time point. "Control" = no enzyme added; dN = all four dNTPs added; dA, dT, dG and dC = only dATP or dTTP or dGTP or dCTP added, respectively; rN = all four rNTPs added; rA, rU, rG and rC = only rATP or rUTP or rGTP or rCTP added, respectively; +1, +2, +3, +4, +5 and +6 represent final products. The extension (%) for selected lanes is shown under the gels. Reference oligodeoxynucleotides of 34 and 26 bases are indicated on the right of each panel.

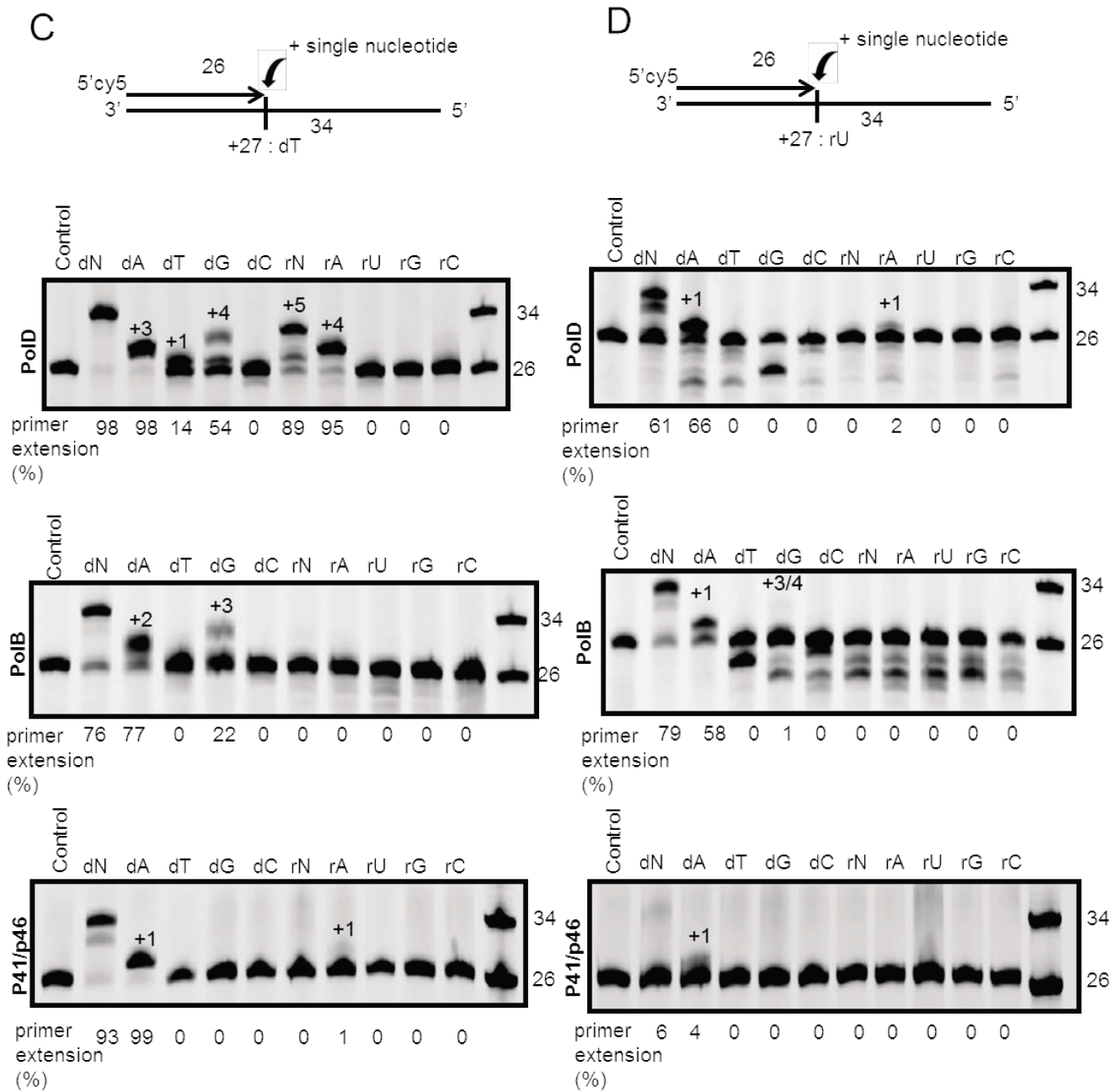


Figure S3.

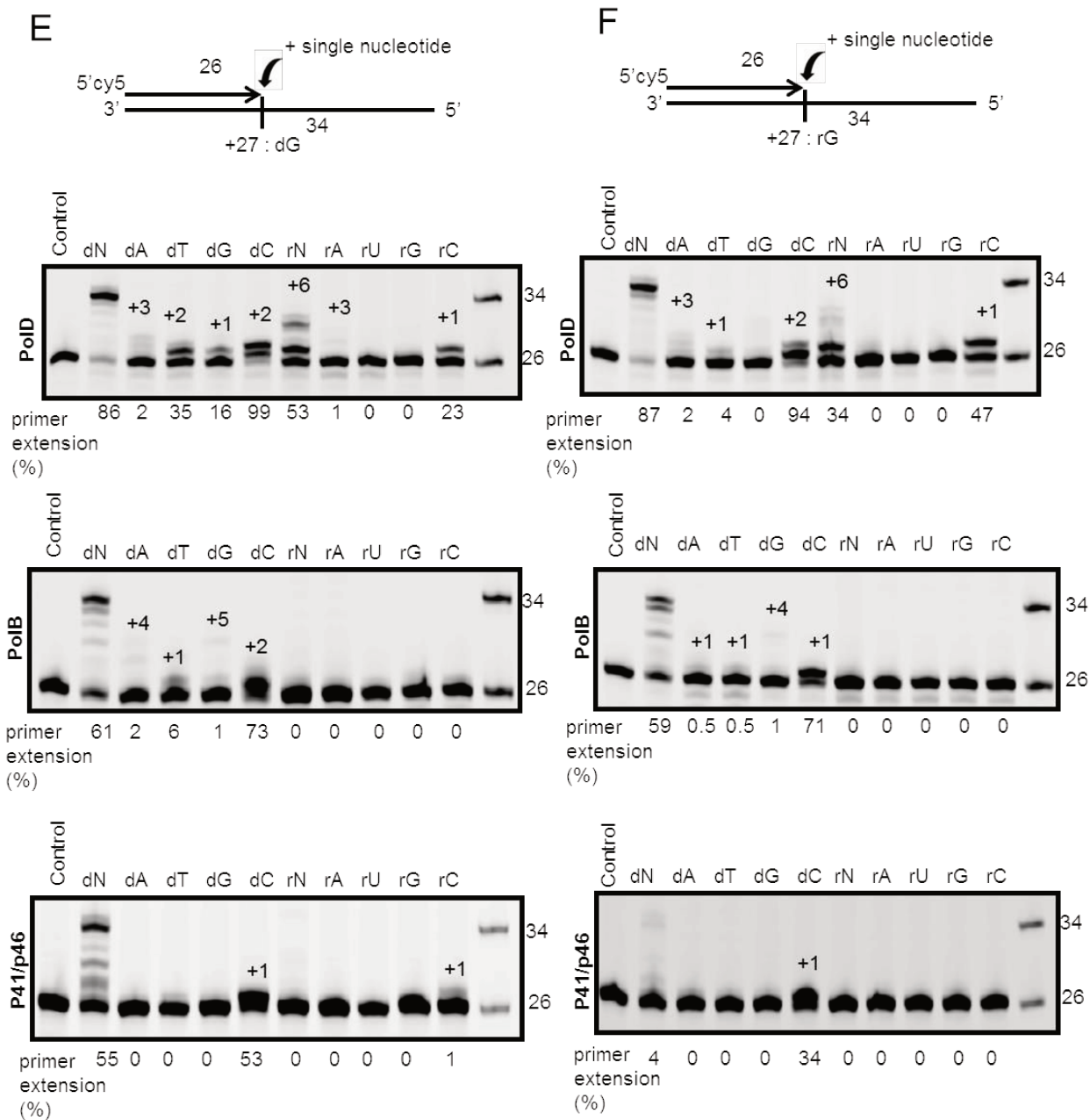


Figure S3.

Oligodeoxynucléotides	Length (bases)	Sequences (5' to 3')	fluorescent-label
Primer	17	TGCCAAGCTTGCATGCC	5'Cy5
Primer	26	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG	5'Cy5
Primer	30	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC	5'Cy5
87dT33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCTTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87rU33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCTr U TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87dA33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCT A TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87rA33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCTr A TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87dC33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCT C TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87rC33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCTr C TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87dG33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCT G TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
87rG33	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT CCTr G TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	/
34dT27	34	GGATCCTTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34rU27	34	GGATCCTr U CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34dA27	34	GGATCCT A CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34rA27	34	GGATCCTr A CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34dC27	34	GGATCCT C CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34rC27	34	GGATCCTr C CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34dG27	34	GGATCCT G CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
34rG27	34	GGATCCTr G CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5' FAM
RC87	87	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCC CCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTG TTTCTG	
RC34	34	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAGGATCC	
ladder	17	TGCCAAGCTTGCATGCC	5'FAM

Table S1. Oligodeoxynucleotides used in this study

The varying nucleotide in the template strand is denoted in bold.

Stalling products (32nt)	87dT17	87rU17	87dA17	87rA17	87dG17	87rG17	87dC17	87rC17
Cell-free extract	0,2%	0,8%	0,1%	0,5%	0,5%	0,7%	0,1%	0,2%
PoID	0,1%	0,2%	0,3%	0,5%	0,6%	2,1%	0,1%	0,4%
PoIB	0,2%	0,3%	0,2%	0,5%	0,5%	1,2%	0,3%	0,3%
p41/p46	2%	4,9%	7,3%	33,9%	3,5%	29,8%	0,4%	10,6%

Table S2 related to Figure 4. Examination of primer-extension stalling events in the presence of rNMP-containing templates.

Primer-extension stalling on 17/87 primer-templates. The varying base in the template strand is located at the +33 position. Quantification of stalling one nucleotide upstream the rNMP template base (32-nt). Stall (%), intensity of the major stall band (32-nt) as a percentage of total lane intensity.

Troisième partie: Résultats/Discussion supplémentaires - Perspectives

I - Les nucléotides

Par la méthode de chromatographie liquide à haute performance couplée à une double détection en spectrométrie de masse (zicHILIC/MS/MS) il a pu être déterminée chez *Pyrococcus abyssi* la gamme physiologique des dNTPs (dT>dG>dA>dC) ainsi que celle des rNTPs (rA>rG>rU>rC), page 86.

I.1 Contenu cellulaire en dNTPs vs contenu génomique en dNMPs

Si l'on compare les quantités relatives des quatre dNTPs avec leurs proportions respectives dans le génome de *Pyrococcus abyssi* (Tableau VIII), il en ressort une corrélation. En effet le couple T/A est toujours présent plus fortement que le couple G/C. Il est à noter tout de même une différence d'abondance puisque le couple T/A est présent à 68% dans le cytosol contre 55,3% dans le génome de *P. abyssi*.

Abondance des nucléotides	dT	dA	dG	dC
Contenu cellulaire (dNTPs)	46%	22%	24%	8%
	68%		32%	
Contenu génomique (sb) (dNMPs)	27,7%	27,6%	22,3%	22,4%
	55,3%		44,7%	

Tableau VIII: Abondance des dNTPs dans le cytosol et des dNMPs dans le génome de *Pyrococcus abyssi*

I.2. Comparaison avec les trois domaines du vivant

Comme vu dans le chapitre I, page 28 ainsi que dans le Tableau II page 27, le dNTP le plus représenté dans les trois domaines du vivant est le dTTP, ce qui est également le cas chez *P.abyssi*. Le fait que ce soit le dNTPs le plus présent, pourrait venir de son métabolisme au cours de la voie de synthèse *de novo* mais également lors de la voie de recyclage, de façon abondante (Chapitre I, page 21). Par ailleurs lors de la voie de sythèse *de novo*, c'est le

dNTPs déclenchant la synthèse séquentielle des autres désoxyribonucléotides. L'ensemble pourrait donc expliquer sa forte abondance comparativement aux trois autres dNTPs.

Le rATP est le rNMPs le plus abondant des différents types cellulaires. Cette forte abondance pourrait être corrélée au fait que le rATP est une source d'énergie importante pour la cellule mais également un co-facteur utilisé par de nombreuses enzymes.

Le ratio rATP/dATP, répertorié dans le tableau IX ci-après, est le plus élevée des quatre ratios avec des variations fortement dépendantes du type de cellules examinées dans les trois domaines du vivant. En effet, le ratio rATP:dATP de *P. abyssi*, d'une valeur de 35:1 est, avec ceux calculés pour *E. coli*, l'un des moins élevés. A contrario, les cellules eucaryotes ont un ratio rATP:dATP bien plus élevé et, de façon intéressante, c'est également le cas pour l'archée *Sulfolobus solfataricus* qui a un ratio d'une valeur de 268:1. De façon globale, le ratio de chaque rNTP:dNTP est plus élevé dans les cellules eucaryotes que dans les cellules bactériennes et archéennes.

	Bactérie		Eucaryote				Archée	
Organismes	<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>	Fibroblaste humain	<i>Lymphocyte humain</i>		<i>S. solfataricus</i>	<i>P. abyssi</i>
rATP:dATP	17:1	19 :1	190:1	338:1	702 :1	590 :1	268 :1	35:1
rUTP:dTTP	11 :1	3 :1	57:1	39:1	151 :1	154 :1	30 :1	9:1
rCTP:dCTP	9 :1	8 :1	36:1	38:1	280 :1	145 :1	34 :1	30:1
rGTP:dGTP	8 :1	18 :1	58:1	144:1	158 :1	146 :1	38 :1	21:1
Références	(Bochner and Ames, 1982) (Buckstein et al., 2008)		Nick McElhinny et al., 2010)	(Ferraro et al., 2010)	(Traut, 1994)		(Liew et al., 2016)	—

Tableau IX: Vue d'ensemble des ratios rNTPs:dNTPs dans les cellules des trois domaines du vivant.

Les ratios sont calculés en fonction des valeurs répertoriées dans le Tableau II, Chapitre I, page 27, auxquels ont été ajoutés les ratios rNTPs:dNTPs de *Pyrococcus abyssi* calculées à partir des valeurs du Table 1, Chapitre II, page 86.

Il apparait ainsi dans ce tableau, une différence du contenu en nucléotides entre les deux cellules d'archées, *S. solfataricus* et *P. abyssi*. Cette dernière est bien visible sur la représentation en anneau de l'abondance de chaque nucléotide au sein des deux cellules

sur la Figure 11, ci-après. En effet, les dNTPs ne représente que 1,3% (anneau gauche) des nucléotides chez *S. Solfataricus* alors que celui-ci est de presque 5% chez *P. abyssi* (anneau droit). L'importance du ratio rATP:dATP mise en abîme dans le tableau IX ci-dessus est ici expliqué par le fait que l'ATP chez *S. solfataricus* représente 64% (en orange) des nucléotides totaux ce qui est quasiment deux fois plus élevé que chez *P. abyssi* ou celui-ci ne représente que 37% des nucléotides totaux.

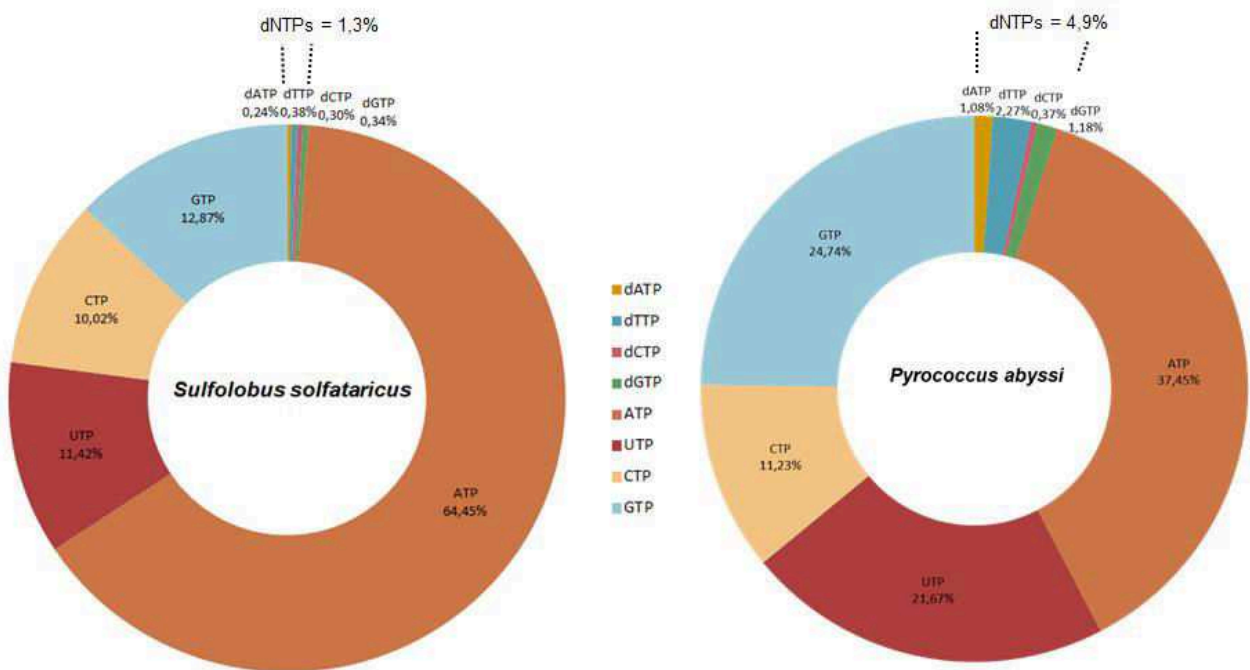


Figure 11: Abondance des nucléotides chez les archées *Sulfolobus solfataricus* et *Pyrococcus abyssi*.

Histogrammes représentant la répartition en pourcentage des nucléotides. Ceux-ci ont été calculés avec les valeurs du Table 1 page 86 pour *Pyrococcus abyssi* et celle du Tableau II page 27 pour *Sulfolobus solfataricus* (données issues de Liew *et al.*, 2016).

I.3. Méthodes de quantification des nucléotides

I.3.1. Choix de la méthode de quantification des nucléotides de *Pyrococcus abyssi*

Il a été choisi pour *P. abyssi*, une quantification basée sur une chromatographie liquide à haute performance couplée à une double détection en spectrométrie de masse (zicHILIC/MS/MS). Ce choix fait suite à de nombreuses mises au point débutées lors d'une thèse précédente (Céline Ralec « ADN polymérases et acides nucléiques endommagés chez les *Archaea*: Maintenance génomique et Biotechnologies », thèse de doctorat en

Biochimie-Microbiologie 2013, sous la direction de G.Henneke, UMR 6197, LM2E, 2013) et poursuivies lors de ce projet doctoral. Cela avait pu mettre en évidence que la détection des dNTPs de *P. abyssi* utilisant la méthode de chromatographie liquide à haute performance couplé à une détection aux UV était peu efficace et difficilement reproductible. C'est pourquoi il a été choisi une double détection par spectrométrie de masse permettant une détection plus sensible des dNTPs.

I.3.2. Comparaison des méthodes des méthodes de quantification

Comme souligné dans le chapitre I, page 29, la concentration en nucléotides dans une cellule peut être mesurée par différentes techniques. Ici les concentrations ayant permis la réalisation de ces représentations en anneau de l'abondance des nucléotides des deux cellules archéennes proviennent de deux techniques de dosages différentes. Pour les deux, la chromatographie liquide à haute performance a été utilisée. La différence se fait sur la quantification puisque pour *S. solfataricus* celle-ci a été faite aux ultra-violets alors que pour *P. abyssi* elle a été réalisée par spectrométrie de masse. Les questions sous-jacentes sont celles liées à l'exactitude des valeurs : Est-ce que les différentes méthodes utilisées sont à l'origine des différences d'abondance nucléotidique observées entre les deux cellules ? Ou bien est-ce que les pourcentages affichés sont le reflet de l'abondance exacte entre les nucléotides ? Ces questions sont légitimes puisqu'au sein d'une même population cellulaire des variations du contenu en nucléotides ont été observées selon la technique de mesure utilisée, comme montré chez la bactérie *E. coli* en figure 4 (Chapitre I, page 30).

Ces remarques s'appliquent également chez *P. abyssi*. Lors de la thèse de Celine Ralec, des résultats préliminaires avaient été obtenus sur le contenu en nucléotides chez *P. abyssi*. Ces premières valeurs, recueillies par HPLC-UV ont également été obtenues au sein de l'équipe du P^r Andrei Chabes. La figure 12 ci-après, est une comparaison de ces résultats obtenus par HPLC-UV chez *P. abyssi* avec ceux obtenus plus récemment par HPLC-MS-MS (zicHILIC-MS-MS).

Le dNTP le plus abondant quelle que soit la méthode d'acquisition est le dTTP (bleu), figure 12A, avec des pourcentages, relativement proche de l'ordre de 44% pour la méthode HPLC-UV et 46% pour la méthode HPLC-MS-MS parmi les quatre désoxyribonucléotides. Le dCTP (rose) est le dNTP le moins représenté lors de la mesure par HPLC-MS-MS (8%) alors que c'est le dGTP (11%) qui est minoritaire après mesure par HPLC-UV. Ainsi il apparaît qu'entre les deux techniques le contenu physiologique en dNTPs obtenu est peu variable.

La différence entre les deux méthodes est plus fortement visible au regard des concentrations trouvées en pmol pour 10⁸ cellules (Figure 12B). En effet par la méthode

HPLC-MS-MS la concentration en dTTP obtenue est 2.7 fois plus élevée que celle obtenue par HPLC-UV (bleu). Cette différence de concentration est vraie pour les quatre dNTPs variant de 5.5 fois plus pour le dGTP à 1.1 fois plus pour le dCTP. Pour les ribonucléotides, elle est d'autant plus importante puisque les concentrations en CTP (rose) et GTP (vert) obtenues par HPLC-MS-MS sont six fois plus importantes que celles obtenues par HPLC-UV (Figure 12D). Ici encore le rNTP le plus abondant reste dans les deux cas le rATP (jaune) avec tout de même une différence de répartition puisque celui-ci représente 47% des ribonucléotides par la méthode HPLC-UV et seulement 39% par la méthode HPLC-MS-MS (Figure 12C). Enfin dans les deux cas les ribonucléotides sont beaucoup plus abondants que les désoxyribonucléotides mais avec une légère différence puisque leur concentration est 20 fois supérieure dans le cas d'une mesure par HPLC-MS-MS et seulement 13 fois dans celui d'une mesure par HPLC-UV.

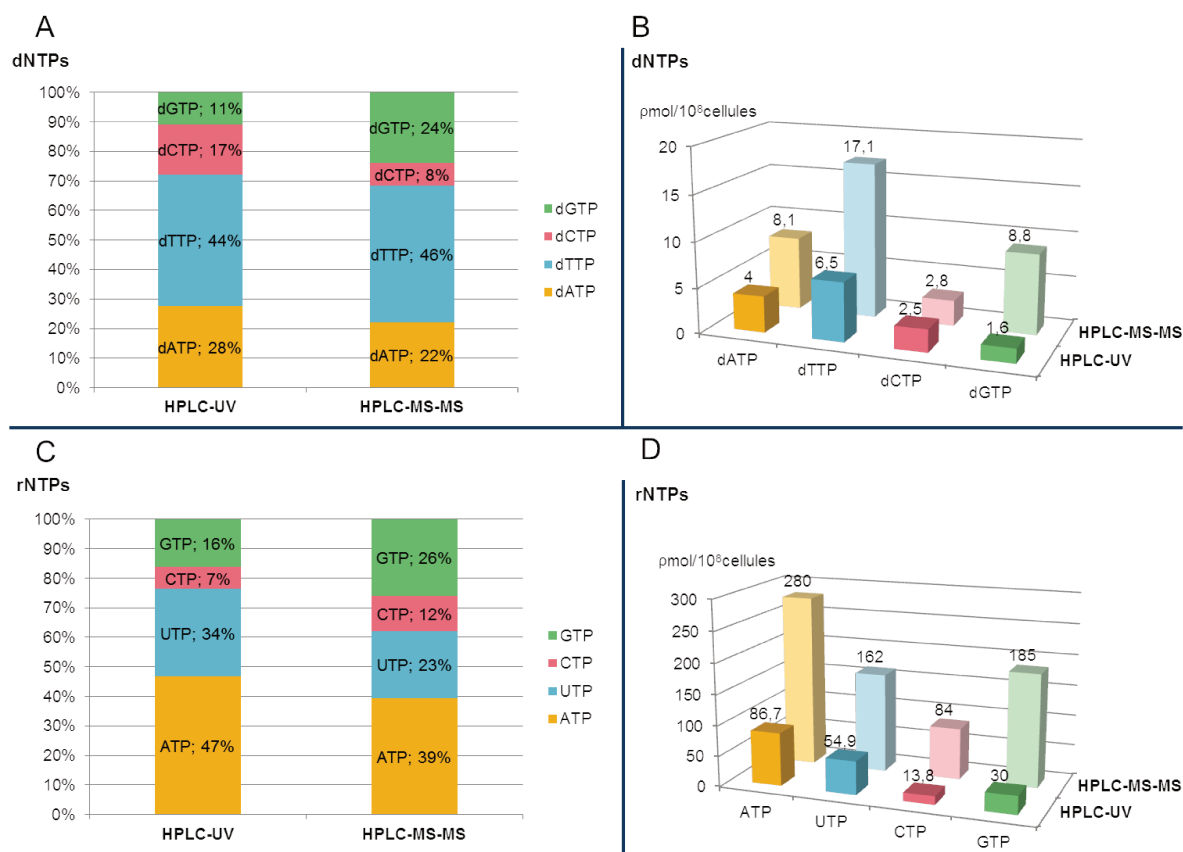


Figure 12: Comparaison de deux techniques de mesure des nucléotides, chez *Pyrococcus abyssi*.

Les histogrammes représentent l'abondance, en pourcentage (A-C) et en pmol pour 10^9 cellules (B-D), de chaque dNTP (A-B) ou rNTP (C-D) calculées à partir des valeurs déterminées par HPLC-UV, d'après la thèse de Céline Ralec « ADN polymérases et acides nucléiques endommagés chez les *Archaea*: Maintenance génomique et Biotechnologies », thèse de doctorat en Biochimie-Microbiologie 2013, sous la direction de G.Henneke, UMR 6197, LM2E, 2013 ; et par HPLC-MS-MS (Table 1, page 86).

Ces résultats montrent la difficulté d'obtention d'un contenu en nucléotides le plus proche possible de la réalité physiologique. Ici l'utilisation de la technique HPLC-MS-MS, plus sensible que celle utilisant la détection par ultra-violet, laisse présumer que le contenu nucléotidique obtenu par celle-ci serait la plus tangible. Par ailleurs l'acquisition de ces résultats a été réalisée à partir d'échantillons provenant de trois cultures différentes. Cela paraît effectivement important à souligner puisque comme le contenu en dNTPs n'est pas une entité fixe dans la cellule, celui-ci peut par exemple varier en fonction du moment de prélèvement en début ou fin de phase exponentielle ou encore en fonction de la qualité de la culture. Ainsi le fait d'avoir une concentration moyenne en nucléotides provenant de différentes cultures permet d'avoir une qualité de résultats sans doute plus proche de la réalité physiologique.

II – L'exclusion des ribonucléotides par l'ADN polymérase PoIB

II.1. Matériels et Méthodes

II.1.1. Enzymes

Trois versions de PoIB sont utilisées, la PoIB identique à celle utilisée pour l'article ci-dessus, une version délétée de la fonction exonucléase notée PoIBexo- ou l'acide aspartique en position 215 a été substitué par une alanine et, la version nommée PoIBY410Gexo-. Celle-ci est l'ADN polymérase de type B de *P. abyssi* portant une substitution sur sa séquence protéique au niveau de l'acide aminé 410 qui se trouve être une glycine en lieu et place d'une tyrosine (Annexe 1, page 158). De plus cette enzyme ne porte pas d'activité exonucléase (exo-) contrairement à son homologue naturel.

II.1.2. PoIBY410Gexo-

Le gène codant la séquence en acides aminés de l'ADN polymérase a été commandé dans le vecteur d'expression pET26 chez Genscript. Pour faciliter la purification, une étiquette Histidine (ou His-tag) en position N-terminale a été insérée par clonage du gène d'intérêt dans le plasmide pET28.

II.1.2.1. Clonage dans le vecteur d'expression pET28

Afin d'obtenir une grande quantité de construction plasmidique (pET26_PoIBY410Gexo-), une transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 α par choc thermique a été effectuée.

Pour récupérer le gène codant l'ADN polymérase, l'ouverture du vecteur d'expression pET26 a été effectuée par hydrolyse de séquences spécifiques reconnues par des endonucléases de restriction au niveau du multi-site de clonage NdeI et BamHI. L'ADN plasmidique a été ensuite purifié avec un kit commercial Midiprep (Qiagen). La séquence d'ADN codant pour l'ADN polymérase, digérée et purifiée sur gel d'agarose, a été insérée dans le plasmide pET28 disponible en forme ouverte NdeI et BamHI. La nouvelle construction plasmidique (pET28_PolBY410Gexo-) est finalement obtenue par ligation au ratio 1 :1 (vecteur : insert) en présence de la T4DNA ligase (Invitrogen) utilisée à 0.5U/μL à 16°C pendant 18 heures.

II.1.2.2. Production et purification

Les étapes de production, de purification et de conservation de l'enzyme PolBY410Gexo- sont identiques à celles détaillées dans le paragraphe matériels et méthodes du Chapitre IV, page 139. Un schéma permettant une visualisation complète de la stratégie de production et de purification des enzymes est proposé en Annexe 2, page 159.

II.1.3. Réaction d'extension d'amorce en présence de rNMPs

Les réactions, le mode de migration et la visualisation sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la Figure S3 de l'article (page 93), (Matériels et Méthodes, page 72). Les trois ADN polymérases ont été utilisées à 12,5 nM chacune.

II.2. Résultats

II.2.1. Rôle du « stéric gate »

L'ADN polymérase PolB possède en position 410 une tyrosine, Annexe 1 page 158, pouvant être apparentée à son « stéric gate ». Afin de vérifier le rôle de celui-ci sur l'entrée des ribonucléotides dans le site actif polymérase, une réaction d'extension d'amorce a été réalisée en présence d'un hybride ADN/ADN composé d'une amorce de 26 nucléotides hybridée à une matrice de 34 nucléotides. L'efficacité d'extension d'amorce en présence des quatre rNMPs (rA, rU, rG et rC) des trois versions proposées de PolB a été mesurée (Figure 13, page 105). L'ADN polymérase mutée pour le « stéric gate », PolBY410Gexo- s'avère avoir une capacité d'incorporation de rNMPs à partir de l'extrémité 3'-OH de l'amorce ADN supérieure aux versions PolBexo- et PolB. En effet l'extension, en présence des quatre rNTPs (piste rN), est de 62% pour PolBY410Gexo- et de respectivement 19% et 5% pour PolBexo- et PolB. De plus la longueur du fragment ARN synthétisé est également bien supérieure pour PolBY410Gexo- puisque celle-ci incorpore jusqu'à huit ribonucléotides alors que PolBexo- et PolB en incorporent que deux au maximum.

Par ailleurs, la nature de la base incorporée du rNMP a été examinée, permettant ainsi de visualiser si la complémentarité des bases était préservée. Ainsi les trois ADN polymérases incorporent de façon spécifique le rA en face du dT avec des pourcentages d'incorporation allant de 62% pour PolBY410Gexo- à 3% pour PolB. Cette dernière n'incorpore par ailleurs que le rA en face du dT. De façon intéressante PolBexo- et PolBY410Gexo- sont capables d'incorporer les trois autres rNTPs. PolBY410Gexo- incorpore le rA de façon préférentielle (79%) mais possède des taux d'incorporation encore élevés en présence de rU (65%), rG (63%) et rC (61%).

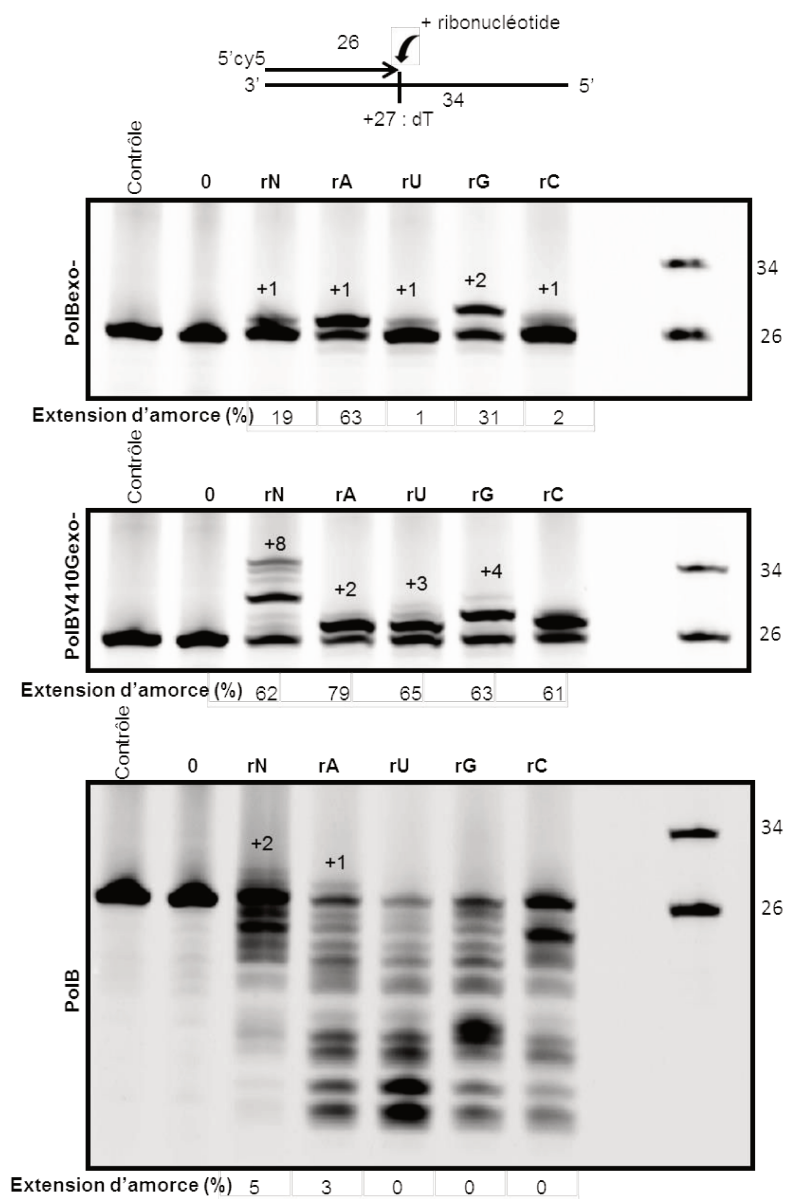


Figure 13: Réaction d'incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases PolB mutées pour le « stéric gate » (Y410G) et pour la fonction exonucléase (exo-).

Profils d'électrophorèses en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. L'incorporation de ribonucléotides en face d'un dT par les ADN polymérases PolBexo-, PolBY410Gexo- et PolB est réalisée à 55°C durant 30 minutes. La structure de l'hybride est représentée en haut de la figure (Table S1, page 96). Contrôle = réaction sans enzyme ; 0 = aucuns rNTPs ; rN : présence des quatres rNTPs ; rA, rU, rG, rC = présence de seulement rATP, rUTP, rGTP, ou rCTP respectivement. +1, +2, +3, +4, +8 représente le nombre de rNTP incorporé. Le pourcentage d'extension de l'amorce est quantifié à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1 en faisant le rapport amorce étendue/non étendue.

II.2.2. Rôle de la fonction exonucléasique

Au-delà de l'importance du « stéric gate » dans l'insertion des ribonucléotides par l'ADN polymérase B, la figure 13 permet également de mettre en avant le rôle de la fonction exonucléase dans celle-ci. En effet, si une comparaison est faite entre la PolB et la PolBexo- il s'avère qu'en l'absence de la fonction de correction des erreurs l'ADN polymérase incorpore plus efficacement les rNTPs avec une efficacité d'extension de 5% pour la PolB contre 19% pour la PolBexo-. Par ailleurs la PolB exo- incorpore de façon préférentielle le rA (63%) en face du dT, son efficacité d'incorporation étant largement diminuée en présence de rU (1%), rG (31%) et rC (2%).

II.3. Conclusion

Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent que la tyrosine 410 de l'ADN polymérase PolB de *Pyrococcus abyssi* est impliquée dans le contrôle de l'incorporation des rNMPs dans une matrice ADN (Tableau VII, page 85). Par ailleurs, la présence ou l'absence de la fonction exonucléasique s'avère avoir également une forte influence sur l'incorporation de rNMPs et notamment sur la nature de la base à appairer.

III – Perspectives

Chez *P. abyssi* et comme dans n'importe quelle cellule du monde du vivant, les rNTPs sont largement majoritaires par rapport aux dNTPs et ici de 20 fois (Table 1, page 86). Ces mesures ont été réalisées à partir de cultures de *P. abyssi* en phase exponentielle de croissance. Il serait donc intéressant de compléter ces résultats par des mesures de ce contenu cellulaire en début, milieu et fin de phase exponentielle afin de déterminer si une variation du ratio rNTPs/dNTPs est détectable. De la même façon, ces quantifications pourraient s'appliquer à des cellules en phase stationnaire.

Une étude plus approfondie des stress subis par *P. abyssi* dans ses conditions de vie environnementales pourrait être envisagée. Débutée lors de la thèse de Celine Ralec (« ADN polymérases et acides nucléiques endommagés chez les Archaea: Maintenance

génomique et Biotechnologies », thèse de doctorat en Biochimie-Microbiologie 2013), il a été montré qu'un abaissement du pH (de 2 unités) provoquerait un fort déclin cellulaire (un Log et demi pendant 1 heure après application du stress) puis une lente reprise est observée sous entendant la présence de mécanisme d'adaptation au stress acide chez *P. abyssi*. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la variation du contenu intracellulaire en nucléotides suite à cette variation de pH. Cela permettrait de se rapprocher au plus près des conditions environnementales rencontrées par *P. abyssi* au voisinage des cheminées hydrothermales (Chapitre I, page 55) et notamment de refléter ses mécanismes d'adaptation.

Une comparaison fonctionnelle plus approfondie des ADN polymérases PolB, PolB_{exo}- et PolBY410G permettrait de définir les caractéristiques essentielles du « steric gate » et de la fonction exonucléasique dans l'exclusion (ou la sélection) des rNTPs lors de la polymérisation par PolB de *P. abyssi*. Ainsi, une étude de la variation du ratio rNTPs/dNTPs sur leur propriétés d'incorporation nucléotidique, comme proposée dans l'article précédent, permettrait d'évaluer la sélectivité et la fidélité de ces trois ADN polymérases. Cela confirmerait si en absence de la tyrosine en position 410, dans des conditions proche de la réalité physiologique, des rNMPs sont incorporés dans l'ADN. Ces résultats permettraient de donner une première explication au fait que PolB incorpore moins de rNMPs que PolD et ainsi d'appuyer les résultats déjà obtenus. Enfin au-delà de l'incorporation, l'efficacité de polymérisation de PolBY410G d'une matrice ADN contenant un rNMP pourrait être comparée à celle de PolB et PolB_{exo}-. Pour aller plus loin, il serait intéressant de regarder si la présence du « steric gate » et l'activité exonucléasique gouvernent, de la même façon que les rNMPs de l'ADN, la fidélité et sélectivité de ces ADN polymérases en présence d'autre lésions de l'ADN comme la 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG), la 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyadenosine (8-oxo-dA) ou encore le deoxyuracil (dU).

Par ailleurs une étude de l'affinité des ADN polymérases de *P. abyssi* pour des substrats ADN contenant un rNMP comparativement à un dNMP serait intéressante à entreprendre. En effet, cela pourrait, dans un premier temps, expliquer la pause dans la synthèse d'ADN de PolD, PolB et du complexe p41/p46 en présence d'un rNMPs dans la matrice (Figure 3, page 89). Ces mesures, réalisables par anisotropie de fluorescence au LM2E, devraient pour s'approcher au plus près des réalités physiologiques être réalisées en présence des ratios intracellulaires des nucléotides. De plus, une variation du contenu en nucléotides pourrait s'appliquer afin de constater une stimulation ou inhibition de synthèse de l'ADN, appuyant ainsi les résultats déjà obtenus.

CHAPITRE III :

**ETUDE DE LA FONCTION EXONUCLEASIQUE
DE LA PETITE SOUS-UNITE DE L'ADN
POLYMERASE PoID : DP1**

Première partie : Présentation de l'étude

Deuxième partie : Matériels et méthodes

Troisième partie : Résultats

Quatrième partie : Discussion

Première partie : Présentation de l'étude

Comme vu dans la première partie du chapitre I, page 36, la stabilité du génome est garantie par l'existence de systèmes complexes de réplication et de réparation de l'ADN. Au cœur de ces systèmes deux paramètres sont essentiels : les constituants de l'ADN que sont les désoxyribonucléotides (dNTPs) et l'ADN polymérase. Développé dans le chapitre précédent, le mécanisme de synthèse de l'ADN en présence du contenu intracellulaire en nucléotides et des ADN polymérases de *Pyrococcus abyssi* a été étudié et les résultats interprétés en terme de stabilité génomique. Il a alors été montré que PoID insert des rNMPs dans l'ADN (Tableau VII, page 85). Les conséquences que cela pouvait avoir sur l'activité polymérasique par les trois ADN polymérases de *P. abyssi* ont été étudiées, permettant de montrer que l'efficacité de polymérisation était affectée par la présence de rNMP dans l'ADN. Etant donné que les ADN polymérases, PoID et PoIB, sont pourvues d'une activité exonucléase 3'→5' (Figure 8 et 9, page 56 et 59), il était donc intéressant de connaître l'implication de cette fonction dans l'excision des rNMPs, comme déjà montré pour les ADN polymérases répliquatives Pol ϵ et Pol δ (Clausen *et al.* 2013; Shcherbakova *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2012).

Comme souligné dans le Chapitre I, la structure cristallographique des deux sous-unités de la PoID de *Pyrococcus abyssi* a récemment été élucidée (Figure 9, page 60). Les ADN polymérases de la famille D constituent un groupe spécifique du domaine des archées (Chapitre I, Tableau III, page 33). Elles sont constituées d'une petite sous-unité (DP1), porteuse de l'activité exonucléase 3'→5' et d'une grande sous-unité (DP2) responsable de la synthèse d'ADN (Cann *et al.*, 1998; Jokela *et al.*, 2004; Sauguet *et al.*, 2016). Il a été montré que la petite sous-unité, DP1, a une similarité de structure avec l'enzyme Mre11 impliquée dans les systèmes de réparation de cassures double brins (Sauguet *et al.*, 2016; White, 2011). Celle-ci est une nucléase possédant plusieurs activités de coupure. Elle porte une activité de coupure endonucléase sur des substrats ADN simple brin et double brin alors que son activité exonucléase 3'→5' ne s'exerce que sur des substrats ADN double brin à bouts francs ou cohésifs (Connelly *et al.*, 1999; Hopfner *et al.*, 2000; Hopkins and Paull, 2008).

Suite à ces observations structurales, une caractérisation de l'activité de la petite sous-unité DP1, en collaboration avec Ludovic Sauguet *et Pierre Raïa* (Institut Pasteur, Unité de Dynamique structurale des macromolécules-CNRS UMR 3528) a débuté. En premier lieu, il semblait intéressant de vérifier si celle-ci était porteuse des mêmes activités nucléases que la protéine Mre11. Cette dernière, chez *P. furiosus*, est disponible et en cours de caractérisation au laboratoire LM2E.

Puis l'activité exonucléase 3'→5' de la sous-unité seule DP1 a plus longuement été étudiée, en présence de substrats simples et double brin de composition nucléotidique variable. Cette petite sous-unité, confère à l'ADN polymérase PolD son activité dite de relecture et de correction des erreurs. Au regard des derniers résultats sur l'incorporation par celle-ci lors de la synthèse d'ADN de ribonucléotides (Chapitre II), la question de l'utilité de l'activité exonucléase de la sous-unité DP1 dans la réparation des rNMPs s'est donc posée. La caractérisation de l'activité exonucléase 3'→5' a alors été axée sur l'efficacité de dégradation de différents substrats oligonucléotidiques contenant des rNMPs. Dans un but comparatif, le complexe PolD a été utilisé afin d'observer l'influence éventuelle de la sous-unité DP2 sur l'activité exonucléasique de DP1.

Même si l'incorporation de rNMPs dans l'ADN par l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi* reste peu significative, son activité exonucléasique semble être stimulée par la présence de rNTPs (Figure 13). Par ailleurs, comme déjà proposé, les ADN polymérases peuvent être complémentaires entre elles, une erreur faite par l'une peut être corrigée par l'autre. C'est le cas, chez les eucaryotes avec la Pol δ qui corrige les erreurs d'incorporation faites par la Pol α ou encore celles de la Pol ϵ (Flood *et al.*, 2015; Pavlov *et al.*, 2006; Perrino *et al.*, 2005). Il convenait donc d'approfondir et de mener en parallèle l'étude de la fonction exonucléasique des deux réplicases PolD et PolB en présence de substrats contenant des rNMPs.

Deuxième partie : Matériels et méthodes

I - Enzymes utilisées

Dans cette étude cinq enzymes ont été utilisées. Quatre d'entre elles sont des protéines de *Pyrococcus abyssi* : la sous-unité DP1, la même sous-unité dépourvue de 203 acides aminés en N-terminal nommée DP1ΔN, l'ADN polymérase PoID et l'ADN polymérase PoIB. L'ADN polymérase PoIB a été clonée, exprimée et purifiée au laboratoire LM2E et est conservée à -20°C dans un tampon composé de 30mM de Tris-HCl pH 7.5, de 0,6 mM de DTT, de 60 mM de NaCl et de 40% de glycérol. Les sous-unités DP1, DP1ΔN et l'ADN polymérase PoID ont, quant à elles, été produites et purifiées à l'Unité de dynamique structurale des macromolécules de l'Institut Pasteur. Ces enzymes sont conservées à -80°C dans un tampon composé de 20 mM de Tris-HCl pH 8 et 200 mM de NaCl. La cinquième est le complexe Mre11-Rad50 de *Pyrococcus furiosus*, produit et purifié au laboratoire LM2E. Il est conservé à -20°C dans un tampon composé de 20 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 1 mM de DTT et 20% de glycérol.

II - Oligonucléotides utilisés

Les oligonucléotides utilisés sont produits par synthèse chimique et purifiés soit par HPLC (oligonucléotides courts \leq 34 bases et possédant ou non un marquage à l'extrémité 5' ou 3') soit par PAGE (oligonucléotides longs $>$ 34 bases). Ils sont fabriqués par Eurogentec.

Les oligonucléotides utilisés ont été hybridés en conditions équimolaires dans tampon composé de 10 mM de Tris-HCl pH 8 et 50 mM de NaCl. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 5 minutes à 95°C suivi d'un gradient décroissant de température. La solution d'ADN obtenue est à la concentration de 1 μ M.

Le tableau X ci-après regroupe les différents oligonucléotides utilisés pour cette étude, leur séquence, leur taille et leur marquage y sont répertoriés.

Oligonucléotide	Taille (nt)	Séquence (5' vers 3')	Marquage
5Cy5_L32	32	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA	5'Cy5
L87	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	Aucun
5Cy5_L87S	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG ACCTGCAGGCATGCAAGCT*T*G*C*A	5'Cy5
RCL87S	87	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGT AATCATGGTCATAGCTGTT*T*C*T*G	Aucun
RCL87	87	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGT AATCATGGTCATAGCTGTTTCTG	Aucun
5Cy5_L87	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
L87dG54	87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTGTAGAGTCG ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	Aucun
3Cy5_L50S	50	CTGCAGGGTTTTTGTCCAGTCTGTAGCACTGTGTAAGACAGGCCA*-A*G*A*T*G*	3'Cy5
Poly dA	34	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	5'Cy5
Poly dT	34	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	5'Cy5
Poly dC	34	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	5'Cy5
Poly dG	34	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	5'Cy5
5Cy5_L34dT8	34	GGATCCTTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34dU8	34	GGATCCTUCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34rU8	34	GGATCCTrUCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34dA8	34	GGATCCTACGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34rA8	34	GGATCCTrACGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34dC8	34	GGATCCTCCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34rC8	34	GGATCCTrCCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34dG8	34	GGATCCTGCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L34rG8	34	GGATCCTrGCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	5'Cy5
5Cy5_L33dTM	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAT	5'Cy5
5Cy5_L33rU33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTArU	5'Cy5
5Cy5_L33dA33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAA	5'Cy5
5Cy5_L33rA33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTArA	5'Cy5
5Cy5_L33dG33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG	5'Cy5
5Cy5_L33rG33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTArG	5'Cy5
5Cy5_L33dC33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAC	5'Cy5
5Cy5_L33rC33	33	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTArC	5'Cy5

Tableau X: Oligonucléotides utilisés lors des réactions de dégradation.

Le nom des oligonucléotides est composé de la façon suivante : la présence du préfixe 5'Cy5 ou 3'Cy5 donne l'emplacement du fluorochrome sur le brin respectivement à l'extrémité 5' ou 3'. Le chiffre succédant le L correspond à la taille de l'oligonucléotide, le chiffre succédant un dX ou un rX indique sa place dans

l'oligonucléotide à partir de l'extrémité 5. Le S indique la présence de liaisons phosphorothioates annotées par des étoiles dans les séquences. Les bases variables sont notées en vert pour les désoxyribonucléotides et en orange pour les ribonucléotides.

III - Réaction de dégradation

Les réactions de dégradation par les différentes enzymes sont réalisées dans un tampon composé de 10 mM de Tris HCl pH 9, 50 mM de KCl, et 10 mM de MgCl₂, pour les sous-unités DP1, DP1ΔN et PolD et de 5 mM de Tris HCl pH 8,8, 1 mM de DTT, 1 mM de KCl et 2 mM de MgCl₂ pour PolB. Les hybrides sont utilisés à une concentration finale de 67 nM et les simples brins à une concentration finale de 60 nM. Lors des réactions, les sous-unités DP1 et DP1ΔN sont utilisées à 10 μM, PolD à 100 nM et PolB à 1,5 nM. L'incubation est réalisée à 55°C pendant 180 minutes. Les réactions sont stoppées sur glace après ajout d'un tampon « stop » composé, dans le cas d'utilisation d'un hybride, de 86% de formamide déionisé, 10 mM d'EDTA pH 8, 0.01 M de NaOH et de 1 μM d'oligonucléotide compétiteur (séquence reverse complémentaire du brin non marqué). En cas d'utilisation de matrice ADN simple brin, le tampon utilisé pour stopper la réaction est composé de 98% de formamide et de 10 mM EDTA pH 8. Pour le complexe Mre11-Rad50 la réaction est réalisée dans les mêmes conditions de température, de durée et d'arrêt d'incubation que pour les autres enzymes. Cependant, il est utilisé à une concentration finale de 67 nM dans un tampon composé de 5 mM de MgCl₂, 5 mM de MnCl₂, 1 mM d'ATP, 25 mM d'HEPES pH 7, 80 mM de NaCl, 1 mM de DTT et de 0,1 mM de BSA.

IV – Visualisation des produits de dégradation

Les produits de dégradation ont été séparés par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide (18%) 19 :1 ultra-pure Accugel™, urée (7 M), dans un tampon TBE (90 mM Tris, 90 mM acide borique, 2 mM EDTA) sous l'influence d'un champ électrique à 4 Watts constant pendant 5 heures. Les produits de dégradation marqués (Cy5, indocarbocyanin) sont révélés grâce au Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare), avec le laser 633 nm Cy5 et quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1. Le pourcentage de dégradation correspond au ratio de l'intensité des fragments dégradés sur l'intensité de la totalité des fragments.

Troisième partie : Résultats

I - Les enzymes et leurs conditions optimales d'utilisation

Les quatre enzymes utilisées pour l'étude ont été déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide présenté en figure 14A ci-après. Avant de débiter l'étude approfondie de la fonction exonucléase de DP1 et afin de pouvoir comparer les activités de dégradation des quatre enzymes entre elles, il a été nécessaire de déterminer leurs conditions optimales d'utilisation. Pour cela des gammes de concentration et des cinétiques de réaction de chacune d'entre elles ont été réalisées utilisant le brin 5Cy5_L32 hybridé au brin L87 (Tableau X page 113, schéma Figure 14B, page 116). A la suite de celles-ci, il a été déterminé, et ce pour toutes les réactions, que les sous unités DP1 et DP1 Δ N seraient utilisées à 10 μ M, PoID à 100 nM et PoIB à 1,5 nM et que le temps d'incubation serait de 180 minutes. Le profil d'électrophorèse présenté en Figure 14B, ci-après, regroupe ces différentes conditions de réaction déterminées pour les quatre enzymes. Les deux sous-unités DP1 et DP1 Δ N ont des profils de dégradation sur le brin 5Cy5_L32 similaires avec un fort pourcentage de dégradation, respectivement, 78% et 73% (pistes 1 et 2). L'ADN polymérase PoID, piste 3, a un profil quelque peu différent des petites sous-unités, la dégradation étant légèrement moins étendue, tout comme celle de l'ADN polymérase PoIB, piste 4. De façon plus globale, c'est PoID qui a l'efficacité de dégradation la moins importante sur ce type de matrice, en moyenne entre 40 et 50% (histogramme vert). PoIB a une efficacité de dégradation supérieure à celle de PoID avec une moyenne supérieure à 60% (histogramme orange). Les sous-unités DP1 et DP1 Δ N ont, quant à elles, une efficacité de dégradation proche de 70% (histogrammes respectivement bleu et jaune).

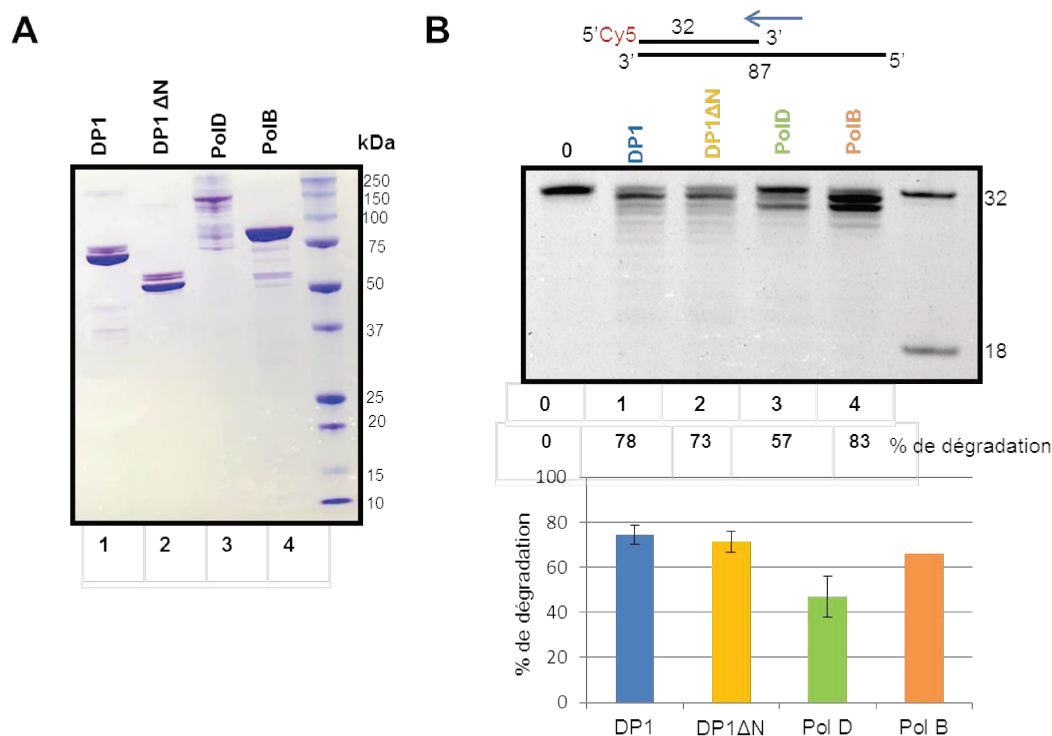


Figure 14: Profils d'électrophorèses, des enzymes utilisées pour l'étude (A) et de leurs activités de dégradation exonucléasique 3'→5' (B).

(A) Visualisation des protéines sur gel Criterion XT (SDS PAGE) à 12% Bis-Tris dans un tampon MOPS (12,5 mM Tris base ; 12,5 mM MOPS ; 7,6 mM EDTA ; 25,2 mM SDS). 5µg de chaque enzyme ont été déposés. La migration s'effectue sous l'influence d'un courant électrique à 140 Volts. La coloration des protéines sur le gel se fait dans un bain de Bleu de Coomassie pendant 2 heures suivie par une décoloration de 2 heures dans un tampon composé de 30% d'éthanol et de 10% d'acide acétique. La piste 1 correspond à la sous-unité DP1 (70kDa), la piste 2 à DP1ΔN (60kDa), la piste 3 à l'ADN polymérase PolD (144kDa pour DP2 +70kDa pour DP1) et la piste 4 à l'ADN polymérase Pol B (90kDa).

(B) Profil de dégradation de l'amorce ADN 5Cy5_L32, hybridée à une matrice ADN de 87 nucléotides (L87), par électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. Les réactions sont réalisées à 55°C pendant 180 minutes et à des concentrations enzymatiques de : 10µM pour les sous unités DP1 et DP1ΔN, 100nM pour PolD et 1,5nM pour PolB. La piste 0, correspond au témoin négatif sans enzyme. Les produits de dégradation sont quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1, l'histogramme représente la dégradation du brin ADN 5Cy5_L32, hybridée à une matrice ADN de 87 nucléotides pour n≥3 pour DP1, DP1ΔN et Pol D, pour Pol B n=2.

II - Comparaison des activités nucléases de DP1 avec le complexe Mre11-Rad50

La première étape de cette étude a été de décrire, les activités nucléases qui pouvaient être imputées à la sous-unité DP1. Comme souligné précédemment, la structure de DP1 possède des similarités avec celle de la protéine Mre11. Cette dernière, en complexe avec la protéine Rad50 a des activités endonucléases sur des substrats ADN double et simple brins ainsi que des activités exonucléases 3'→5' sur bout franc. Il apparaissait intéressant de vérifier la présence ou l'absence de telles activités par DP1. Pour compléter, une vérification de l'absence d'activité exonucléase 5'→3' pour toutes les enzymes a également été réalisée.

Les activités de DP1 et du complexe Mre11-Rad50 sont donc comparées à celles de DP1 Δ N, PolD et PolB, dans les conditions initialement établies (Figure 14). Ces résultats sont présentés dans la figure 15, ci-après.

Le profil d'électrophorèse présenté en figure 15A, permet de déceler une faible activité endonucléase, sur un substrat ADN simple brin, 2%, par le complexe Mre11-Rad50 (piste 5), activité qui n'est pas détectée avec PolD et PolB (pistes 3 et 4). En ce qui concerne les activités des sous-unités DP1, pistes 1 et 2, deux très faibles bandes sont observées. Est-ce suffisant pour en déduire une activité endonucléase ou alors est-ce un artéfact de la manipulation ? Par ailleurs, les deux sous-unité DP1, comme la PolD, ont une forte activité exonucléase 3'→5' qui, sans la présence de phosphorothiate en amont du Cy5, retirerait les fluorochromes. En effet, l'élimination du groupement Cy5 est visible en bas du gel sur la figure 15B (pistes 1-2-3). L'activité exonucléase 5'→3' sur simple brin n'est quant à elle décelable chez aucune des cinq enzymes (Figure 15A).

Le profil électrophorétique de la figure 15C, permet dans un premier temps, de déceler l'activité exonucléasique 3'→5' d'oligonucléotides double brin à bouts francs, celle-ci étant observable uniquement en présence du complexe Mre11-Rad50 (piste 5). Une activité endonucléase est également détectée pour ce complexe, en position 17 (4%), site préférentiel de coupure endonucléasique de Mre11-Rad50 ainsi qu'en position 23 (1%) second site de coupure (spécificité de coupure par *Pfu*Mre11-rad50 étudiée au laboratoire LM2E). Ces résultats s'observent également en Figure 15D où un substrat double brin à bouts francs bloqué au niveau des extrémités 3' permet de mettre en exergue l'activité endonucléase de Mre11-Rad50 et donc l'existence des deux sites préférentiels de coupure en position 17 (8%) et 23 (1,6%). En revanche, il apparait que les sous-unités DP1 et DP1 Δ N (pistes 1 et 2), ainsi que les ADN polymérases Pol D et Pol B (pistes 3 et 4) soient dépourvues de l'activité endonucléasique (Figure 15C-D).

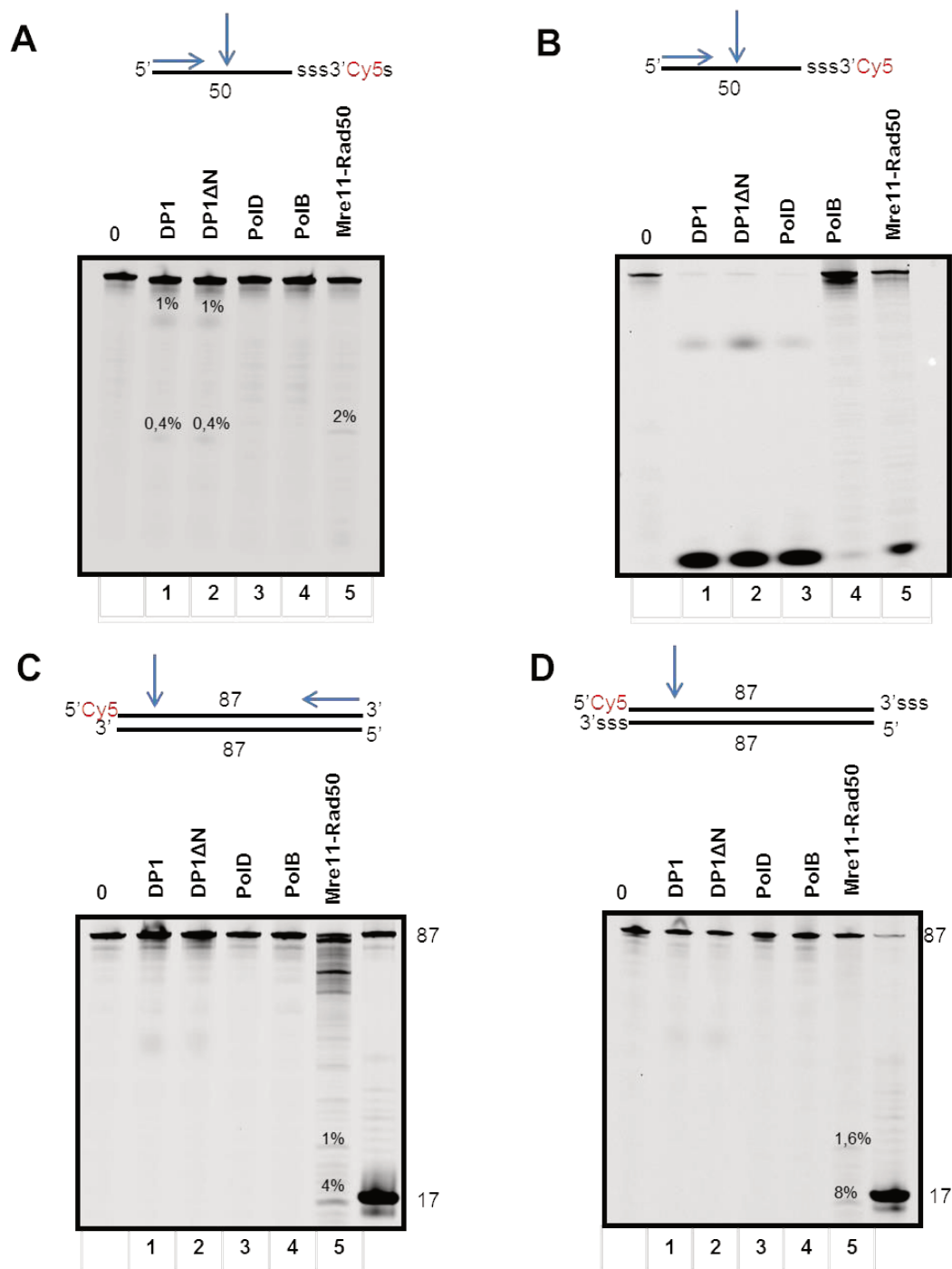


Figure 15: Activités exonucléasique et endonucléase de DP1, DP1ΔN, PoID, PoIB et du complexe Mre11-Rad50.

Profils d'électrophorèses en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. Les réactions sont effectuées à 55°C durant 180 minutes. Les flèches bleues représentent les activités de dégradation étudiées : activité exonucléase 5'→3' et endonucléase sur simple brin (A-B), activité exonucléase sur bouts francs et endonucléase sur double brin (C), activité endonucléase sur matrice double brin (D). L'annotation « sss » en 3' ou 5' des brins représente les liaisons phosphorothioates entre les six derniers nucléotides permettant le blocage de l'activité exonucléase 3' → 5' (A-B-D). L'extrémité 3' de la matrice utilisée en A comporte un phosphorothioate supplémentaire en amont du fluorochrome Cy5 pour bloquer son excision ou élimination par les enzymes lors de la réaction (B). Les pistes 0 correspondent aux témoins négatifs sans enzymes. Les produits sont quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1.

D'après ces premiers résultats, aucun doute ne peut être émis sur le fait que l'activité nucléase principale de DP1 ainsi que de DP1ΔN, PoID et PoIB est l'activité exonucléase 3'→5'. Les résultats présentés ci-dessous porteront donc sur les caractéristiques de celle-ci.

III - Etude de l'activité exonucléasique 3'→5'

Afin de décrire au mieux l'activité exonucléase 3'→5' de la sous unité DP1, elle a été testée en présence de différentes matrices, simple ou double brins, avec des séquences variables permettant de mettre en évidence l'impact de la nature des bases ou encore des sucres des nucléotides. Cette activité sera de surcroît toujours comparée à celle de la sous-unité DP1ΔN, de l'ADN polymérase PoID et de l'ADN polymérase PoIB.

III.1. Comparaison de l'activité exonucléasique 3'→5' sur des matrices simple et double brins à extrêmités dépassantes

La figure 16A (page 122), ci-après, met en évidence que l'efficacité de l'activité exonucléase 3'→5' de DP1 et DP1ΔN, pistes 1 et 2, est fortement amplifiée en présence d'un substrat simple brin. En effet, 100% de dégradation du substrat initial (5Cy5_L34dT) est atteinte comparativement à un substrat double brin à extrêmités dépassantes où cette dégradation est en moyenne de 74% pour DP1 et 72% pour DP1ΔN (Figure 14B, page 116). D'ailleurs, les profils d'électrophorèses démontrent l'obtention de nombreux fragments de petites tailles en présence du simple brin comparativement au double brin. Cette activité de dégradation n'est cependant que très peu visible avec l'ADN polymérase PoID (piste 3). Le profil de dégradation obtenu en présence d'un simple brin est plus étendu (Figure 16A) qu'avec le brin 5Cy5_L32 hybridé au brin L87 (Figure 14B). L'ADN polymérase PoIB a un comportement inverse puisque son efficacité de dégradation, entre un substrat simple brin ou double brin à extrêmités dépassantes diminue de 66% en moyenne sur le brin 5Cy5_L32 hybridé au brin L87 (Figure 14B, histogramme), à 38% sur le simple brin 5Cy5_L34dT (Figure 16A, piste 4). Cependant le profil de dégradation semble, comme pour les autres enzymes, être plus étendu sur un simple brin, générant des fragments de plus petites tailles.

III.2. Impact de la nature, des bases et des sucres des nucléotides, sur l'activité 3'→5' exonucléasique

III.2.1. Influence de la nature de la base

Puisque l'efficacité de dégradation sur des matrices simple brin est plus élevée pour les sous-unités DP1 et DP1ΔN, le rôle de la nature de la base sur la dégradation a, dans un

premier temps, été étudié sur des matrices simple brin. Ces dernières toutes constituées de 34 nucléotides, sont composées des quatre bases (dA, dT, dC, dG) pour 5Cy5_L34dT8 (Figure 16A), des quatre bases (dA, dT, dC, dG) et du dU en position 8 pour 5Cy5_L34dU8 (Figure 16B) ou d'une seule base répétées 34 fois, poly-dA (Figure 16C), poly-dT (Figure 16D), poly-dC (Figure 16E) et poly-dG (Figure 16F) (Tableau X, page 113).

Il apparaît que l'efficacité de dégradation des sous-unités DP1 et DP1 Δ N sont toujours proche de 100%, à l'exception de la matrice poly-dG où DP1 Δ N ne dégrade qu'à 77% le substrat initial (Figure 16F, piste 5). Par ailleurs, selon la nature de la base ou des bases composant le simple brin, le profil de dégradation par DP1 et DP1 Δ N est différent (Figure 16, pistes 1 et 2). En effet, la majorité des fragments présents lors d'une dégradation de poly-dT ont une taille plus petite (Figure 16D) que ceux issus de la dégradation de poly-dA (Figure 17C). La dégradation de l'oligonucléotide composé de poly-dC est quand a elle plus régulière (Figure 17C). Enfin, il peut être observé une dégradation très particulière de l'oligonucléotide composé de poly-dG avec des pauses très importantes lors de la dégradation (Figure 17D). La dégradation par l'ADN polymérase PolD, aux pistes 3, donne également des profils différents selon la nature des bases. La dégradation de poly-dG est de nouveau très particulière avec des pauses importantes (Figure 16F). Contrairement aux sous-unités DP1 seules, PolD ne dégradent pas l'oligonucléotide poly-dT en aussi petits fragments (Figure 16D). Cependant, il est à noter que PolD contrairement aux sous-unités DP1 et DP1 Δ N ne dégradent pas la séquence poly-dA (Figure 16C). PolB a quant à elle un comportement unique, puisqu'elle dégrade, avec plus ou moins d'efficacité, les simples brins composés des quatre nucléotides (Figure 16A-B, pistes 4), mais ne dégrade aucun des substrats mononucléotidiques (Figure 16C-F, pistes 4).

De façon intéressante, en présence d'un dU (Figure 16B) à la place d'un dT en position 8, le comportement des enzymes semble se modifier. Un léger changement de profil de dégradation apparaît pour les sous-unités DP1 et DP1 Δ N, profils bleus et jaunes, où l'on peut observer que la taille du brin le plus abondant est modifiée en présence du dU (27 nucléotides). Une diminution de l'efficacité de dégradation est également soulignée, puisqu'elle se retrouve être inférieure à 100% : 89% pour DP1 et 95% pour DP1 Δ N (pistes 1 et 2). L'ADN polymérase PolD a un comportement différent, puisqu'une forte augmentation de son efficacité de dégradation en présence d'un dU dans la matrice peut être observée, passant de 64% à 96% (Figure 16A-B, pistes 3). Par ailleurs, le profil électrophorétique de dégradation est également modifié, plus étendu, avec une accumulation de fragments de plus petites tailles. L'activité de dégradation de PolD devient ainsi comparable à celle de DP1 et DP1 Δ N en présence d'un dU où une bande majoritaire correspondant à des fragments d'environ 27 nucléotides de long apparaît (Figure 16B, profil vert). De façon

intéressante, les produits de dégradation prédominants en présence de la matrice 5Cy5_L34dT8 dépourvue de l'uracile se caractérisent par une taille de 30 nucléotides (Figure 16A, profil vert). Egalement, le profil de dégradation, obtenu avec PolB et la matrice contenant un dU, démontre la présence de fragments de tailles plus courtes comparativement à la matrice contrôle 5Cy5_L34dT. De plus, son activité 3'→5' exonucléolytique est fortement inhibée par le dU (réduction de 38% à 3%) par rapport au contrôle simple brin sain (Figure 16A-B, pistes 4). Clairement, la présence du dU inhibe l'activité de dégradation de PolB contrairement à l'ADN polymérase PolD qui semble stimulée (Figure 16 A-B, pistes 3-4).

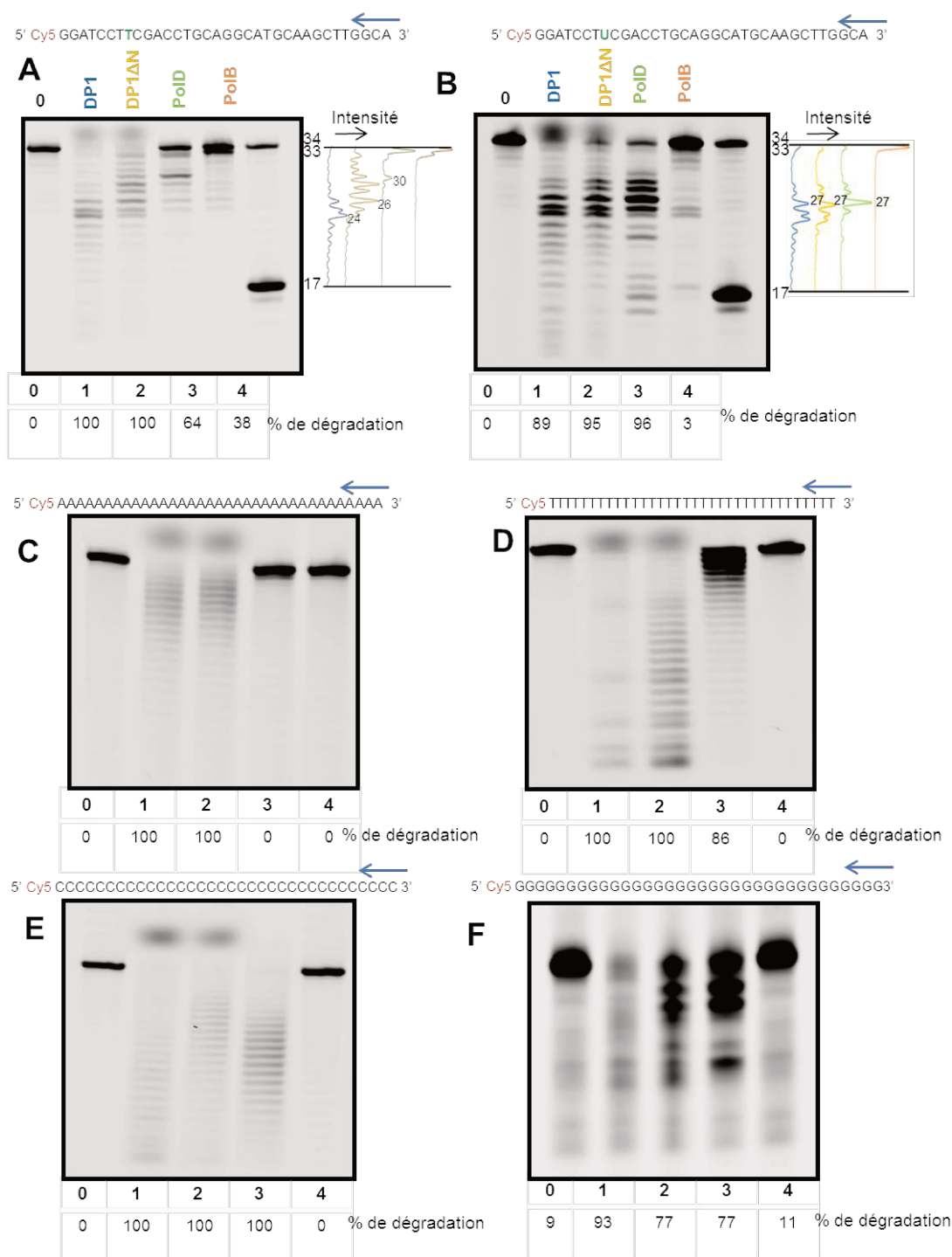


Figure 16: Activités exonucléasiques 3'→5' sur des substrats simples brins de composition en bases variable.

Profils d'électrophorèses, en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. Les réactions sont effectuées à 55°C durant 180 minutes. Les flèches bleues représentent le sens de dégradation des substrats simples brins (3'→5'): 5Cy5_L34dT8 (A), 5Cy5_L34dU8 (B), poly-dA (C), poly-dT (D), poly-dC (E) et poly-dG (F). Pour les simples brins 5Cy5_L34dT et 5Cy5_L34dU la base variable est notée en vert. Pour chaque substrat les profils de dégradation de DP1 (piste 1), de DP1ΔN (piste 2), de PoID (piste 3) et de PoIB (piste 4) sont comparés. Les pistes 0 correspondent aux témoins négatifs sans enzymes. Les produits de dégradation ont été quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1.

Les résultats présentés montrent une différence de comportement des enzymes en présence de compositions de séquences en dNMPs variables. De façon plus approfondie, la suite de l'étude a porté sur l'efficacité de l'activité exonucléasique 3'→5' sur des substrats ADN dont les séquences comportent un rNMP. D'une part, il a été examiné si l'activité de relecture de PolD pouvait avoir un rôle dans la correction de ses erreurs d'incorporation de ribonucléotides (Chapitre II) et, d'autre part, si PolB pouvait par la même activité corriger celles-ci.

III.2.2. Influence de la nature du sucre

II.2.2.1. Dégradation des matrices simple brin

Dans un premier temps et toujours parce que l'efficacité de dégradation des simples brins des sous-unités DP1 et DP1ΔN est plus efficace, les conséquences de la présence d'un rNMP sur l'activité exonucléase 3'→5' des substrats simples brins ont été étudiées (Figure 17, page 124 et 125). Pour réaliser cette étude, une matrice de 34 nucléotides marquée en 5' par le fluorochrome Cy5 et comportant une base variable en position 8 est utilisée. L'effet du sucre pour chacune des bases sur l'activité exonucléasique 3'→5' des sous-unités DP1, PolD et PolB sera ainsi examiné.

De nouveau, les sous-unités DP1 et DP1ΔN ont une forte activité de dégradation, comprise entre 90% et 100%, indépendante de la nature de la base azotée et du sucre (Figure 17, pistes 1 et 2, histogrammes bleus et jaunes). D'autre part, une différence du profil de dégradation se produit lorsque le simple brin contient un rNMP ou un dNMP. En effet, une pause apparaît deux bases en amont du rNMP, soit en position 10 (Figure 17B-D-F-H, pistes 1 et 2, profils bleus et jaunes).

Les ADN polymérases PolD et PolB, respectivement en pistes 3 et 4, ont quant à elles une activité de dégradation augmentée en présence d'un rNMP dans la matrice, et ceci quelle que soit la base ribonucléotidique (histogrammes verts et oranges, Figure 17I, page 125). Les profils de dégradation sont identiques en présence ou non d'un ribonucléotide. Des fragments majoritaires d'une taille de 30 et 33 nucléotides apparaissent respectivement en présence de PolD (profils verts) et PolB (profils oranges). Une différence n'est visible qu'en présence du rUMP (Figure 17B, page 124) ou un changement de profil apparaît avec, d'une part, l'accumulation de fragments majoritaires d'une taille de 27 nucléotides pour PolD (vert) et, d'autre part, celle de fragments d'une taille de 26 nucléotides pour PolB (orange), comparativement aux profils de dégradation du brin 5Cy5_L34dT8 (Figure 17A). Cependant, au regard des efficacités de dégradation, il apparaît que celles-ci sont supérieures en présence d'un rNMP dans le brin (histogrammes verts et oranges, Figure 17I, page 125).

Cette augmentation du pourcentage de dégradation du brin semble d'autant plus importante lorsque le rNMP présent est un rUMP. En effet, pour la PoID, celui-ci dépasse les 90% en présence d'un rU alors que le pourcentage de dégradation de la matrice comportant un dT ne dépasse pas les 30% (Figure 17I, histogramme vert). L'efficacité de dégradation de l'ADN polymérase PoIB est quasiment multipliée par 4 entre un brin avec un dT et celui avec un rU (Figure 17I, histogramme orange). Cette forte différence entre dNMP et rNMP est également visible pour PoID entre le dG et le rG et pour PoIB entre le dC et le rC.

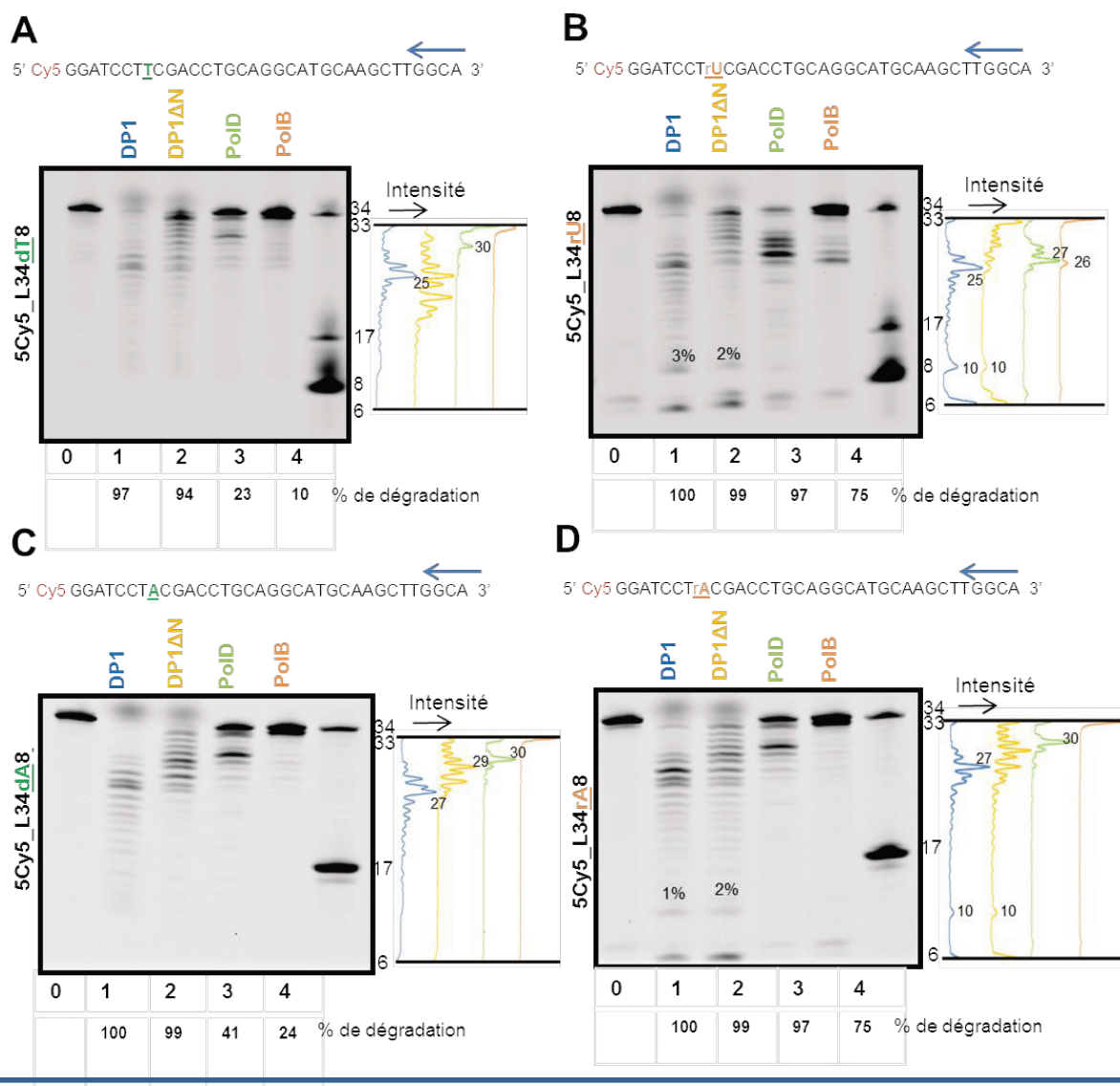


Figure 17: Activités exonucléasiques 3'→ 5' en présence des substrats simple brins contenant des ribonucléotides.

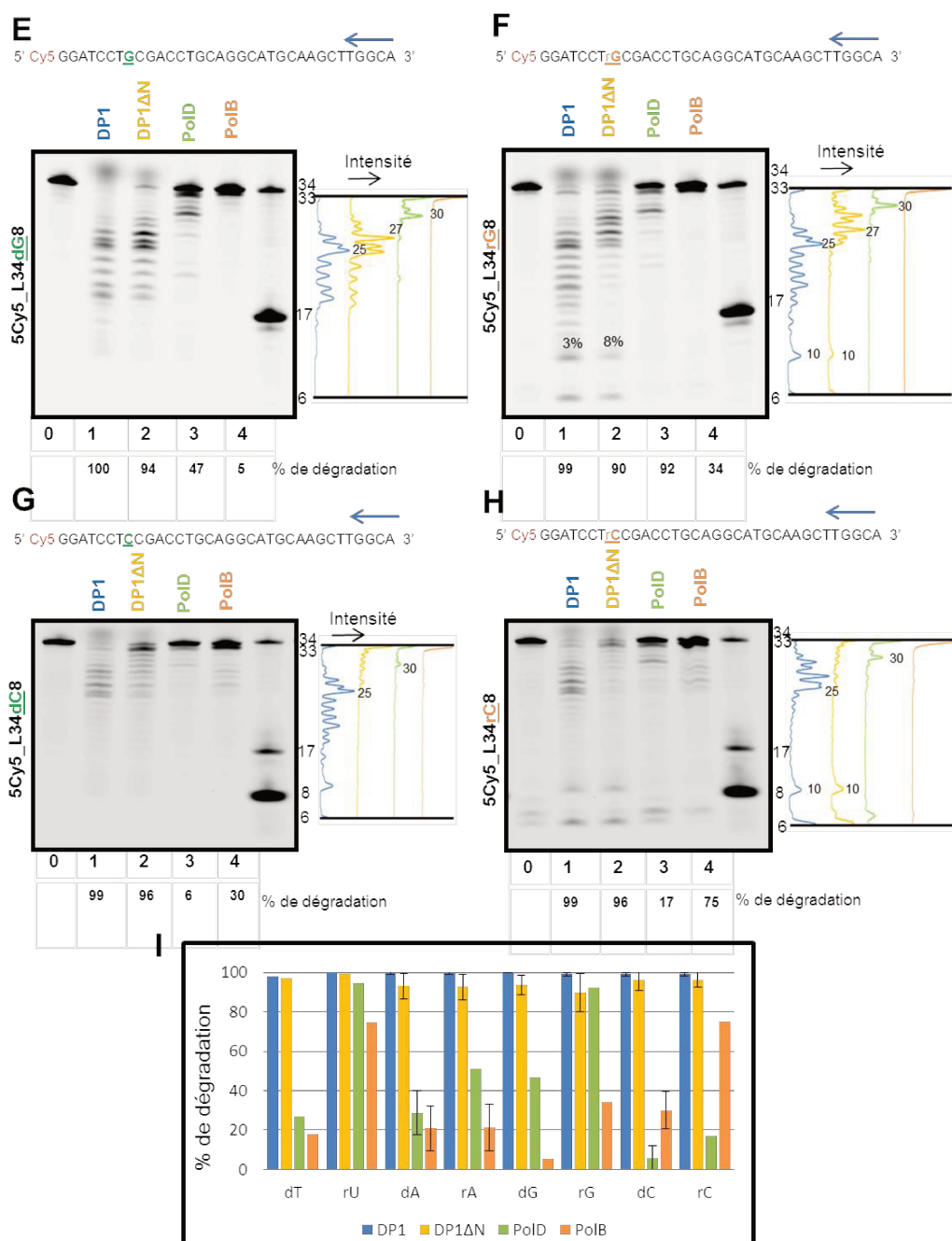


Figure 17(suite): Activités exonucléasiques 3'→5' en présence de substrats simple brin contenant des ribonucléotides.

Profils d'électrophorèses, en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. Les réactions sont effectuées à 55°C durant 180 minutes. Les flèches bleues représentent le sens de dégradation des substrats simples brins (3'→5'): 5Cy5_L34dT8 (A), 5Cy5_L34rU8 (B), 5Cy5_L34dA8 (C), 5Cy5_L34rA8 (D), 5Cy5_L34dG8 (E), 5Cy5_L34rG8 (F), 5Cy5_L34dC8 (G) et 5Cy5_L34rC8 (H). Les bases variables sont notées en vert pour les dNMPs et en orange pour les rNMPs. Pour chaque substrat les profils de dégradation de DP1 (piste 1), de DP1ΔN (piste 2), de PoID (piste 3) et de PoIB (piste 4) sont comparés. Les pistes 0 correspondent aux témoins négatifs sans enzymes. Les produits de dégradation sont quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1. L'historgramme (I) représente les moyennes des produits de dégradation de DP1 en bleu, DP1ΔN en jaune, PoID en vert et PoIB en orange, pour chaque substrat; 5Cy5_L34dT (dT), 5Cy5_L34rU (rU), 5Cy5_L34dA (dA), 5Cy5_L34rA (rA), 5Cy5_L34dG (dG), 5Cy5_L34rG (rG), 5Cy5_L34dC (dC) et 5Cy5_L34rC (rC). Les écarts types ont été calculés pour n=3, en leur absence n=2.

Afin de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques, l'étude de l'activité exonucléasique 3'→5' des matrices double brins à extrémités dépassantes contenant un rNMP a été poursuivie. Dans un premier temps, l'influence d'un mésappariement (ou non) d'une base de nature désoxyribonucléotidique ou ribonucléotidique a été étudiée, puis étendue à la comparaison des huit mésappariements de base désoxyribonucléotidique *versus* ribonucléotidique.

II.2.2.2. Effet d'un mésappariement sur l'activité 3'→5' exonucléase

Pour cette étude de l'effet d'un mésappariement sur l'activité exonucléase 3'→5', c'est la base G qui a été employée. Deux brins de 33 nucléotides de long, marqué en 5' par le fluorochrome Cy5, et contenant en 3', un dG ou un rG ont été utilisés comme amorces. Ces dernières ont été hybridées à une matrice ADN composée de 87 nucléotides dont la base en position 54 est complémentaire (ou non) de la base G de l'extrémité 3'-OH de l'amorce, créant (ou non) un mésappariement (Figure 18A-E, page 128 et 129). Si l'on compare, dans un premier temps, les profils de dégradation des substrats complètement hybridés entre eux, il apparaît que la présence d'un rNMP à l'extrémité 3'-OH de l'amorce, figure 18 A et C, augmente l'efficacité de dégradation des sous-unités DP1 et DP1ΔN, pistes 1 et 2, ainsi que très légèrement celle de l'ADN polymérase PolD, pistes 3. En revanche, la présence d'un rNMP à l'extrémité 3'-OH semble diminuer l'efficacité de dégradation de l'ADN polymérase PolB (Figure 18A et C, pistes 4). Cette observation s'applique également lorsque le rNMP est non apparié à la jonction de l'amorce avec la matrice (Figure 18B et 18D, pistes 4). Clairement, la présence d'un rNMP à l'extrémité 3'-OH de l'amorce augmente l'efficacité de dégradation des sous-unités DP1 et DP1ΔN, ainsi que celle de l'ADN polymérase PolD alors qu'elle réduit celle de l'ADN polymérase PolB. D'autre part, lorsque la comparaison porte sur la différence d'efficacité de dégradation en présence ou non d'un mésappariement de base (Figure 18Avs18B, et 18Cvs18D), il apparaît, de façon générale, que celui-ci affecte peu la dégradation par les quatre enzymes.

De façon plus approfondie, l'influence de la nature du sucre et de la base d'un mésappariement nucléotidique a été étudiée pour les trois autres mésappariements possibles (dC/rC, dT/rU et dA/rA) en présence de DP1, DP1ΔN, PolD et PolB (Figure 18 B-J). Les résultats mettent en évidence qu'en présence des mésappariements rNMP (rG, rA et rC) les efficacités de dégradation des sous-unités DP1 et DP1ΔN (pistes 1 et 2), ainsi que celle de l'ADN polymérase PolD sont augmentées (pistes 3), comparativement aux mésappariements dNMP correspondants (dG, dA et dC). L'ADN polymérase PolB (pistes 4), quant à elle, face à un mésappariement rNMP, a une efficacité qui diminue en présence d'un rG (Figure 18D) ou bien qui reste stable en présence d'un rA et d'un rC (Figure 18H et 18J).

De nouveau, des comportements différents entre les enzymes PoID et PoIB sont observés en présence d'un rU. A l'inverse de la figure 17, le ribonucléotide rU se trouve à une extrémité 3'-OH et non pas à l'intérieur de la séquence nucléotidique (Figure 18B). En effet, alors que les trois autres mésappariements de rNMPs (rA, rG et rC) stimulent l'efficacité de dégradation de l'ADN polymérase PoID, la présence d'un rU en 3'-OH de l'amorce la diminue, (figure 18F et 18E, pistes 3) (respectivement 99% et 85% de dégradation pour le mésappariement dT et rU). A l'inverse, l'ADN polymérase PoIB a une efficacité de dégradation augmentée en présence d'un mésappariement rU en 3'-OH de l'amorce (respectivement de 58% et 70% pour un mésappariement dT et rU) (Figure 18E-F, pistes 4). Les sous-unités DP1 et DP1 Δ N ont, quant à elles, une activité 3'→5' exonucléase augmentée par la présence d'un mésappariement rNMPs qui est indépendante de la nature de la base (Figure 18, pistes 1 et 2).

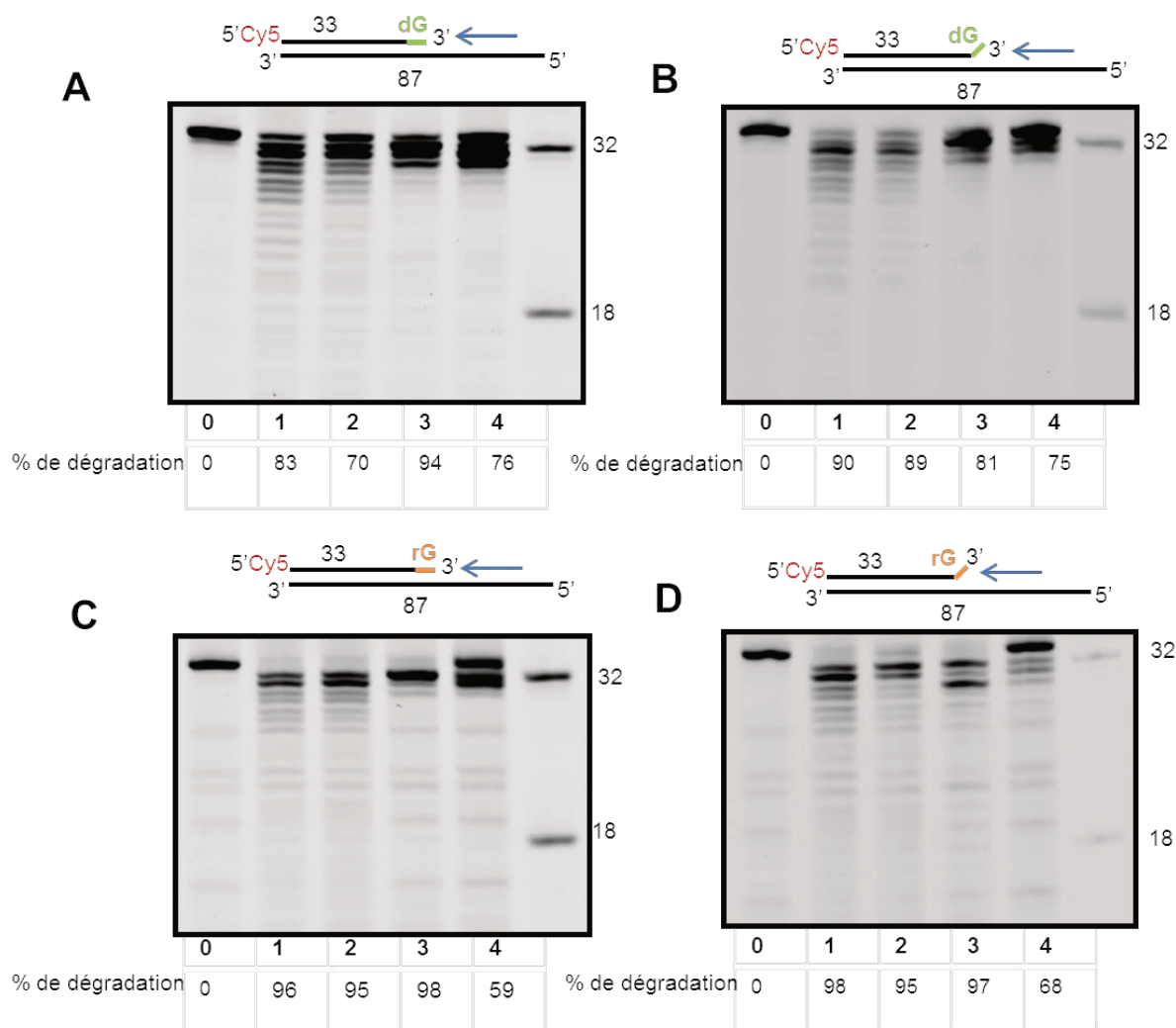


Figure 18: Effet d'un mésappariement ADN ou ARN sur l'activité exonucléasique 3'→5'.

Profils d'électrophorèses, en gel dénaturant de polyacrylamide 18%. Les réactions sont effectuées à 55°C durant 180 minutes. Les flèches bleues représentent le sens de dégradation des amorces : 5Cy5_L33dG33 (A-B) et 5Cy5_L33rG33 (C-D). Les amorces sont hybridées à des matrices ADN de 87 nucléotides, L87, ne créant aucun mésappariement en 3' de l'amorce, et sur une matrice, 5Cy5_L87dG54, permettant de créer les mésappariements dG (B) et rG (D) en 3' (Tableau X, page 113). Le dernier nucléotide de l'amorce est noté en orange pour les dNMPs et en vert pour les rNMPs. Pour chaque substrat les profils de dégradation de DP1 (piste 1), de DP1ΔN (piste 2), de PolD (piste 3) et de PolB (piste 4) sont comparés. Les pistes 0 correspondent aux témoins négatifs sans enzymes. Les produits de dégradation sont quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant TL 8.1.

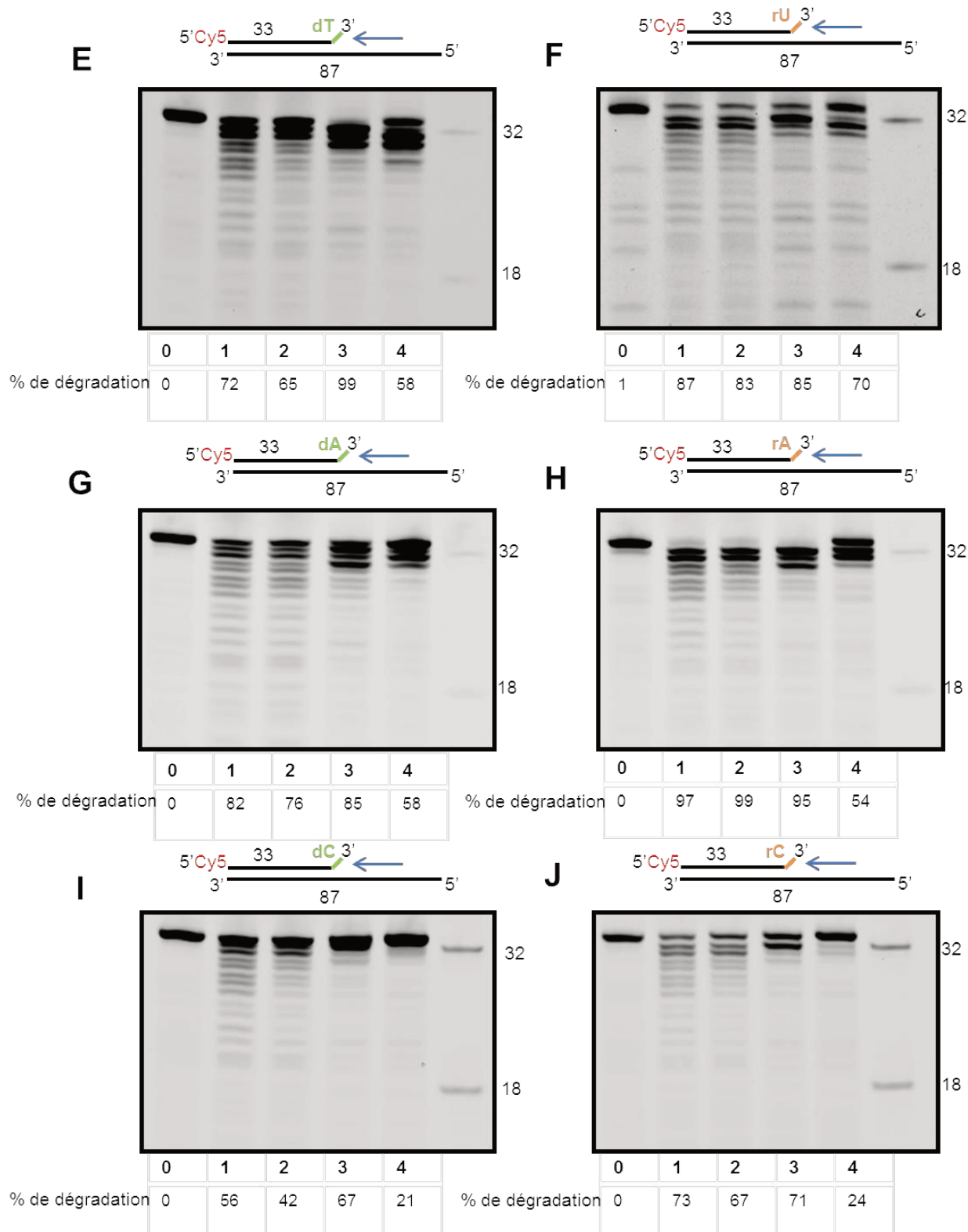


Figure 18 (suite): Effet d'un mésappariement ADN ou ARN sur l'activité exonucléasique 3'→5'.

Quatrième partie : Discussion - Perspectives

Cette étude a, dans un premier temps, permis de mettre en évidence que, malgré le fait que la petite sous-unité DP1 de l'ADN polymérase PoID de *Pyrococcus abyssi* soit structurellement proche de la protéine Mre11, elle ne possédait pas les mêmes activités nucléasiques (Tableau XI, page 131). En effet, aucune activité endonucléasique en présence de double ou simple brin ADN n'a été détectée pour la sous-unité DP1, alors que celle-ci a été confirmée pour la protéine Mre11 en complexe avec Rad50. De la même façon, aucune activité de dégradation exonucléasique 3'→5' d'un double brin ADN à bouts francs n'a été observée avec DP1 contrairement à Mre11-Rad50. Enfin, aucune des deux enzymes ne possède d'activité exonucléasique 5'→3' (Figure 14, page 116).

La comparaison de DP1 et Mre11-Rad50 a permis de mettre en exergue le rôle potentiel régulateur de la grande sous-unité DP2 sur l'activité nucléasique de la sous-unité DP1. En effet, les résultats montrent comme pour DP1 une absence d'activité endonucléasique de l'ADN et exonucléasique des extrémités 5' de l'ADN par le complexe PoID. Ces activités sont également inexistantes chez PoIB. Enfin, le fait que la partie N-terminale de DP1 soit déletée de 203 acides aminés n'affecte pas la présence ou l'absence d'une activité nucléase par DP1 (Tableau XI, page 131).

Le tableau XI ci-après est un récapitulatif des activités nucléasiques portées par les sous-unités DP1 et DP1 Δ N, les deux ADN polymérases PoID et PoIB ainsi que le complexe Mre11-Rad50.

	DP1	DP1ΔN	PoID	PoIB	Mre11-Rad50
Activités endonucléases					
Simple brin	Non ?	Non ?	Non	Non	Oui
Double brin	Non	Non	Non	Non	Oui
Activités exonucléases					
5'→3' (simple brin)	Non	Non	Non	Non	Non
3'→5' :					
-Simple brin ADN	Oui (+++) dU Oui (+++)	Oui (+++) dU Oui (+++)	Oui (++) dU Oui (+++)	Oui (+) dU Oui (+/-)	Non (Paull and Gellert, 1998)
-Simple brin ADN + 1 rNMP	Oui (++++)	Oui (++++)	Oui (++++)	Oui (++)	/
-Double brin :					
▪ Cohésif	Oui (++)	Oui (++)	Oui (++)	Oui (+++)	Oui (Paull and Gellert, 1998)
▪ Cohésif + rNMP (3')	Oui (+++)	Oui (+++)	Oui (+++)	Oui (++)	/
▪ Cohésif + messapariement dNMP (3')	Oui (++)	Oui (++)	Oui (++)	Oui (+++)	/
▪ Cohésif + messapariement rNMP (3')	Oui (++++) rU Oui (++++)	Oui (++++) rU Oui (++++)	Oui (++++) rU Oui (++++)	Oui (++) rU Oui (++)	/
▪ Bout franc	Non	Non	Non	Non	Oui

Tableau XI: Activités nucléasiques des sous-unités DP1 et DP1ΔN, PoID, PoIB et Mre11-Rad50.

Les (+) représentent le degré d'activité nucléasique des enzymes selon les substrats, du plus actif (++++) au très peu actif (+/-). Les cases grisées correspondent au cas particulier de la présence de la base U pour les simples brins en position 8 à partir de l'extrémité 5' d'une séquence composée de 34 nucléotides (Tableau X, Matériels et Méthodes, page 113),

Au regard de ces résultats et des connaissances sur l'activité exonucléasique des sous-unités DP1 de la famille D des ADN polymérases, la poursuite de l'étude s'est donc faite sur l'activité exonucléase 3'→5'. Dans un premier temps, la comparaison de la capacité de DP1 à dégrader un substrat ADN double brin à extrémités dépassantes ou simple brin a permis de démontrer que, les sous-unités DP1 et DP1ΔN dégradaient de façon plus efficace les substrats ADN simple brin que double brin (à extrémités dépassantes). Ainsi, l'influence de la composition et de la nature des bases sur l'activité d'hydrolyse de substrats simples brins par DP1 a mis en avant leur importance. En particulier, les différences d'activité exonucléolytique sont très visibles en présence de substrats mononucléotidiques. Dans ce cas, il est soupçonné que des conformations inattendues adoptées par ces simples brins ou des différences d'affinité de l'ADN Pol pour l'ADN simple brin en soient les causes. Par

exemple, il est connu que les régions riches en guanines peuvent former des structures de topologies variables, souvent trouvées au niveau des télomères, appelées G-quadruplex ou G-quartet (Brooks *et al.*, 2010; Mirkin, 2008; Patel *et al.*, 2007). Ces structures potentiellement formées par les simples brins poly-dG pourraient donc avoir une incidence sur l'activité exonucléasique (Figure 16, page 122).

L'étude a ensuite porté sur la dégradation de substrats simple brin possédant un ribonucléotide, comparée à celle d'un substrat possédant à la même position le désoxyribonucléotide correspondant (Figure 17, page 125 et 126). Il a alors pu être observé que la présence du groupement 2'-OH du ribose des rNMPs modifiait le profil de dégradation des deux sous-unités DP1 et DP1ΔN. En effet, celles-ci réalisent une pause deux bases en amont d'un ribonucléotide quelle que soit la nature de la base azotée. Cette variation d'activité est également observée en présence des matrices ADN double brin quand les rNMPs sont situés à l'extrémité 3'-OH de l'amorce (Figure 18, page 128 et 129). En général, leurs présences engendrent une augmentation de l'efficacité de dégradation du brin ADN par les sous-unités DP1. Enfin, au regard de toutes les observations faites avec les différents substrats, aucune différence d'activité ne semble exister entre la sous-unité DP1 et DP1ΔN suggérant que la partie N-terminale délétée ne possède aucun rôle régulateur sur la fonction exonucléasique 3'→5' dans les conditions testées.

Au-delà de la caractérisation de l'activité intrinsèque exonucléasique de la petite sous-unité DP1, cette étude a également permis de mettre en avant le rôle potentiel régulateur de la grande sous-unité DP2 dans la fonction exonucléasique de cette ADN polymérase. Une des premières différences alors observée entre le complexe PolD et la sous-unité DP1 a concerné l'efficacité de dégradation des substrats ADN simple et double brins à extrémités dépassantes. En effet, alors que l'activité de dégradation exonucléasique 3'→5' reste constante pour le complexe PolD entre les deux substrats, des variations s'observent en présence de DP1 (Tableau XI). D'autre part, l'activité exonucléasique 3'→5' de la PolD est indétectable en présence d'un substrat simple brin constitué uniquement de dA (poly-dA), alors qu'elle est activée et très robuste avec la sous-unité DP1 (Figure 16, page 122). Cependant, leur comportement est équivalent avec les rNMPs puisque toutes les deux (DP1 et le complexe PolD) ont leur efficacité de dégradation qui augmente et ceci quel que soit le type de substrat (Figure 17 et 18, Tableau XI).

Enfin, puisque qu'il a été émis l'hypothèse que l'ADN polymérase PolB pourrait par son activité de relecture corriger les erreurs d'incorporation de rNMP de l'ADN polymérase PolD, son activité exonucléasique 3'→5' a été étudiée. Les résultats montrent un comportement différent de PolB comparativement à la PolD. En effet, celle-ci a une activité exonucléasique

3'→5' réduite en présence d'un simple brin à la différence de la PolD. De surcroît, elle est incapable de dégrader un simple brin mononucléotidique quelle que soit la base (Figure 16). La présence d'un rNMP dans les substrats va, quant à elle, provoquer des comportements plus ou moins inattendus chez la PolB. En effet, son activité de dégradation va augmenter lorsqu'un rNMP est présent dans un substrat simple brin (Figure 17). Au contraire, cette présence à l'extrémité 3'-OH d'un brin à extrémités dépassantes n'engendre pas de changement comparativement à un dNMP, voire engendre une diminution d'efficacité. Ces derniers résultats pourraient sous-entendre que l'activité de relecture de l'ADN pol répliquatives PolB de *Pyrococcus abyssi* ne serait pas efficace face à une incorporation de ribonucléotide contrairement à l'ADN polymérase PolD (Tableau VII, page 85). Puisque PolB incorpore pas ou peu de ribonucléotides, ces résultats semblent cohérents et suggèrent que la PolB n'interviendrait pas ou peu dans la correction des erreurs d'incorporation de rNMPs par PolD.

Pour aller plus loin et afin d'appuyer ces nouvelles données fonctionnelles, des expériences de détermination structurale sont en cours d'analyse. En effet, l'obtention de la structure de DP1 en présence d'un rNMP en lieu et place d'un dNMP dans le site actif permettra de comparer et d'expliquer le mode d'interactions physiques mises en jeu lors de l'hydrolyse des ribonucléotides ou des désoxyribonucléotides. Un mécanisme chimique d'hydrolyse pourra être proposé.

Enfin cette étude a permis de mettre en évidence le comportement quelque peu particulier que peuvent adopter les différentes enzymes face à la base uracile. Il a alors pu être observé que sur un simple brin possédant en position 8 un dU, 5Cy5_L34dU8 (Figure 16B, page 122), les nucléases avaient des comportements modifiés comparativement à leur activité de coupure d'un brin comportant un dT (5Cy5_L34dT8). En effet, la sous-unité DP1 a une activité exonucléase 3'→5' peu modifiée par cette présence alors que l'activité de la PolD augmente fortement, générant des fragments de tailles plus petites. A contrario, l'activité exonucléase 3'→5' de l'ADN polymérase PolB est très fortement diminuée mais possède un profil de dégradation également modifié puisque des fragments de tailles plus petites sont obtenus. De façon intéressante, en présence du simple brin contenant le rU (5Cy5_L34rU8), une augmentation de l'activité de dégradation des ADN polymérases PolD et PolB est observée comparativement au brin possédant un dT. Cette augmentation s'applique également pour les trois autres couples de rNMPs/dNMPs (dA/rA, dG/rG et dC/rG) (Figure 17, page 124). De plus, leur profil de dégradation est modifié par le rUMP puisque la taille du brin majoritaire obtenu diminue (de 30 à 27 nucléotides pour la Pol D et de 33 à 26 nucléotides pour la PolB). Pour finir, la présence d'un rUMP mésapparié à la

jonction de l'amorce avec la matrice semble fortement inhiber et stimuler respectivement l'excision du ribonucléotide par PoID et PoIB (Figure 18F, page 129).

L'ensemble de ces résultats démontrent un différentiel des activités nucléasiques par les ADN polymérases PoID et PoIB de *Pyrococcus abyssi* induit par la base uracile (Tableau XI, page 131). De façon intéressante, il a été démontré chez les ADN polymérases de la famille B des archées qu'une poche de reconnaissance spécifique de l'uracile, et dans une moindre mesure des quatre bases canoniques, existait dans le domaine N-terminal exonucléase (Connolly, 2009; Gill *et al.*, 2007; Gouge *et al.*, 2012; Wardle *et al.*, 2008). Il est donc soupçonné que cette poche de reconnaissance influencerait l'efficacité d'hydrolyse des bases, notamment l'uracile, par PoIB. Récemment, il a également été montré que la présence d'un dU dans une matrice ADN diminuerait l'efficacité de synthèse de la PoID (Abellón-Ruiz *et al.*, 2016; Richardson *et al.*, 2013). De plus, l'interaction physique de PoID avec un simple brin ADN est augmentée de deux fois en présence de l'uracile (Richardson *et al.*, 2013). Ces informations, ajoutées aux nouveaux résultats concernant l'activité de dégradation de PoID en présence d'un rU ou d'un dU, sembleraient appuyer un mécanisme de reconnaissance spécifique de la base uracile par l'ADN polymérase PoID. Quels déterminants moléculaires sont à l'origine de cette reconnaissance reste un point à élucider. L'obtention de la structure de DP1 ou de PoID en présence d'un dUMP voire d'un rUMP pourrait permettre de compléter l'étude des mécanismes de l'hydrolyse des ribonucléotides et des désoxyribonucléotides en mettant en avant les interactions physiques avec la base uracile.

Pour conclure, cette étude a documenté de façon préliminaire la compréhension des mécanismes de réparation liés à l'incorporation de ribonucléotides par les ADN polymérases de *P. abyssi* (Tableau VII, page 85). La répétition et l'approfondissement de ces résultats couplés aux expériences de détermination structurale de DP1 en présence d'un rNMP permettrait d'aboutir à des hypothèses fonctionnelles concernant le rôle de l'activité de relecture des ADN polymérases PoID et PoIB dans l'excision des rNMPs de l'ADN.

CHAPITRE IV :

**ETUDE DE L'ACTIVITE DE COUPURE DE
L'ADN POLB DE *PYROCOCCUS ABYSSI* :**

ROLE DE L'ION DANS LA « T-CLEFT »

Première partie : Présentation de l'étude

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

Troisième partie : Résultats

Quatrième partie : Discussion

Première partie : Présentation de l'étude

Un des outils fondamentaux d'analyses moléculaire et génétique est la technique permettant l'amplification *in vitro* d'un fragment d'acide nucléique nommée PCR (Polymerase Chain Réaction) (Mullis *et al.*, 1986). Celle-ci consiste à amplifier un fragment d'ADN cible par des cycles successifs d'extension d'amorce afin d'en obtenir une quantité importante. Les ADN polymérases thermostables sont les molécules clefs de la réaction de polymérisation en chaîne. Résistantes aux températures élevées lors de la phase de dénaturation, elle sont ajoutées au début de la réaction et fonctionne jusqu'à la fin du processus d'amplification. En 1993, Kary Mullis obtient le prix Nobel de chimie, pour son développement de la méthode PCR, conjointement avec Michael Smith concernant sa contribution à l'établissement de la mutagenèse dirigée. Cette technique, qui permet d'obtenir simplement, rapidement et en grande quantité des ADN mutés est une des nombreuses applications utilisant la PCR (Smith, 1985).

C'est lors de la mise en place d'une PCR, au cours d'un processus de mutagenèse dirigée que l'équipe du professeur Linda Reha-Krantz de l'université d'Alberta au Canada, a observé que le plasmide PLRK19, utilisé comme support d'amplification, était anormalement linéarisé. L'ADN polymérase utilisée était alors une ADN polymérase de la famille B, la Pol Phusion (NEB, PfuPol modifiée en son site de liaison à l'ADN). Des réactions supplémentaires de PCR, réalisées avec les ADN polymérases Pfu turbo (Agilent, PfuPol supplémentée d'un composant thermostable permettant de synthétiser de l'ADN sur une plus grande longueur) et 9°N-7 (NEB, *Thermococcus* sp. 9°N-7), ont abouti à la même observation: le plasmide PLRK19 se linéarise.

L'apparition de la forme linéaire lors des réactions PCR leur a fait supposer que les ADN polymérases utilisées pourraient avoir une activité endonucléase générant cette forme plasmidique ouverte. Plus particulièrement, leur démarche scientifique a porté sur l'identification d'un site catalytique additionnel, dans la famille B des ADN polymérases d'archées thermostables, responsable de cette activité nucléasique. Leur recherche a permis d'incriminer le rôle potentiel d'un ion métallique divalent dans le domaine exonucléase de l'ADN polymérase B de *P. abyssi*. Leur choix a donc porté sur la caractérisation fonctionnelle du triple mutant de PolB de *P. abyssi* déféctueux dans la chélation de cet ion métallique, le mutant PolB3M (Gouge et al 2012).

Ce dernier, étudié au laboratoire LM2E, est muté pour une structure dite en « T-cleft » impliquant trois acides aminés, les acides aspartiques 4 et 343, ainsi que l'acide glutamique 251. Ces trois acides aminés chélatent un ion métallique divalent par l'intermédiaire de six

molécules d'eau. Cette structure, située au sein du domaine N-terminal de l'ADN polymérase B de *Pyrococcus abyssi*, a été mise en évidence lors de l'étude de la poche de reconnaissance de la base uracile de l'ADN polymérase PolB (Figure 19). L'hypothèse alors émise est que cette structure aurait un rôle dans la liaison de l'ADN et la reconnaissance de dommage. La présence de l'ion aurait quand à lui un rôle de guide de l'ADN au travers de la structure en « T-cleft » et/ou de reconnaissance de l'uracile engendrant une pause par l'ADN polymérase PolB sur sa matrice (Gouge *et al.*, 2012). Si ces acides aminés sont absents, l'ion métallique est absent de la « T-cleft ».

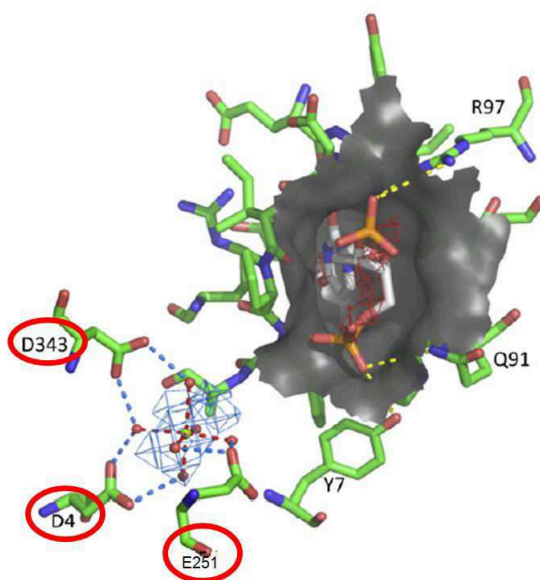


Figure 19: Poche de reconnaissance de l'Uracile et « T-cleft » de l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi* (Gouge *et al.*, 2012).

La poche de reconnaissance de l'uracile est représentée en gris foncé, juste en dessous se situe l'ion métallique entièrement hydraté attaché à l'ADN polymérase par cinq des six molécules d'eau. Les acides aminés responsables de la chélation de l'ion métallique divalent par l'intermédiaire des six molécules d'eau sont encerclés en rouge.

Produite et purifiée en grande quantité au laboratoire LM2E, l'ADN polymérase B mutée pour ces trois acides aminés (PolB3M) a donc fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle en collaboration avec l'équipe du Pr Reha-Krantz. L'objectif scientifique a été d'observer la linéarisation ou non du plasmide PLRK19 lors de réaction PCR en présence de PolB sauvage et PolB3M.

L'implication de l'ion divalent dans la linéarisation du plasmide PLRK19 a ainsi été examinée. Pour cela une comparaison de cette activité de coupure a été réalisée avec différentes ADN polymérases de la famille B, sauvage (PolB), triples mutante (PolB3M), et possédant une activité exonucléase (exo+) ou en étant dépourvue (exo-). L'ADN polymérase de la famille A de type bactérien, la Taq polymérase, a également été insérée au projet afin d'observer si

l'activité de coupure endonucléolytique était spécifique des ADN polymérase B des archées.

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

I - Plasmide, enzymes et amorces utilisées

I.1. Plasmide

Le plasmide utilisé, nommé PLRK19, est un plasmide d'expression (pET-like) portant un gène de résistance à l'ampicilline, l'origine pBR322 ori et le gène codant l'ADN polymérase T4 (gp43) (Lin *et al.*, 1987).

I.2. Enzymes

Pour cette étude six ADN polymérases de la famille B ont été utilisées, quatre commerciales et deux produites au laboratoire LM2E. Isis (MP-biomedicals) et Pyra (QBiogène) sont issues de *Pyrococcus abyssi*, Pyra étant dépourvue de la fonction exonucléase 3'→5' (Dietrich *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2001). Pfu (Promega) également de la famille B a été isolée de *Pyrococcus furiosus*. Les enzymes PolB3Mexo+ et PolB3Mexo- ne sont pas commerciales mais ont été produites et purifiées au laboratoire LM2E. Ce sont deux triples mutants de l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi*, mutés toutes deux pour trois acides aminés, l'acide aspartique 4, l'acide aspartique 343 et l'acide glutamique 251 qui ont, tous trois été remplacés par l'alanine. L'une d'entre elle est porteuse de l'activité exonucléase 3'→5', annotée « exo+ » et l'autre en étant dépourvue par mutation de l'acide aspartique 215 en alanine, annotée « exo- », (Annexe 1, page 158). Enfin, une ADN polymérase de la famille A a également été utilisée, la Taq polymérase (MP-biomedicals) isolée de *Thermus aquaticus*, elle est également dépourvue de l'activité exonucléase 3'→5' (Tableau XII, page 142).

I.2.1. Production et purification de PolB3Mexo+ et PolB3Mexo-

La stratégie générale de production et de purification des ADN pols PolB3Mexo+ et PolB3Mexo- est présentée dans le schéma en annexe 2, page 159.

Le gène codant PolB3Mexo+ a été synthétisé chez Genscript. Ce gène a été cloné dans le vecteur d'expression pET28 (Novagen), permettant l'insertion en N-terminale de la protéine d'une étiquette histidine. Le gène codant la protéine PolB3Mexo-, non synthétique, a également été cloné dans le vecteur d'expression pET28 (Gouge *et al.*, 2012). Ces étapes ont donné deux constructions plasmidiques nommées pET28_PolB3Mexo+ et pET28_PolB3Mexo-.

I.2.1.1. Expression

Le système bactérien de clonage utilisé est une souche nommée Rosetta2 (DE3). Cette dernière est une *Escherichia coli* modifiée, nommée BL21, qui contient un inhibiteur T7 ARN polymérase, modifiée en pLysS et supplémentée avec sept codons rares. L'introduction de la construction plasmidique pET28_PolB3Mexo+ ou pET28_PolB3Mexo- a été effectuée dans la souche Rosetta2 par transformation par choc thermique, d'une durée de 15 minutes à 37°C.

Les cellules Rosetta2 (DE3) transformées ont été cultivées dans un milieu de culture liquide LB (Luria-Bertani) pendant 1 heure à 37 °C avant d'être étalées sur boîtes en présence de kanamycine (0,015 mg/mL finale) et de chloramphénicol (0,035 mg/mL finale). Les colonies obtenues, vérifiées en PCR ont permis alors le lancement d'une culture d'un grand volume (3 litres de LB+Kan 0,015 mg/mL). Lorsque la mesure de densité optique à 600 nm de la culture bactérienne atteint 0.6, l'induction de la production intracellulaire de protéines a été initiée en ajoutant 1 mM d'IPTG (concentration finale). Puis, les protéines ont été produites pendant une nuit à 30°C sous agitation à 150 rpm et centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le culot bactérien obtenu a été conservé à – 20 °C.

I.2.1.2. Extraction

Le culot bactérien est repris dans 50 mL d'une solution de broyage (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 1 pastille inhibiteur de protéase (Complete EDTA-free, Protease inhibitor cocktail, Roche). Puis les cellules sont cassées grâce à un broyeur mécanique cellulaire (1.8 Kbar). Après une centrifugation à 8000 g pendant 40 minutes à 4°C, le surnageant est traité à la DNase 1 (1 U/mL) pendant 2 heures à 37°C. Un choc thermique à 75°C pendant 20 minutes est réalisé afin de précipiter les protéines d'*Escherichia coli* et de désactiver la DNase. L'échantillon est alors centrifugé à 8000 g pendant 40 minutes à 10°C et le surnageant est filtré (0,45 µm = diamètre des pores) afin d'éliminer les débris cellulaires.

I.2.1.3. Purification

L'extrait obtenu est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (HisPrep FF 16/10, Amersham), permettant la reconnaissance des étiquettes histidines. Après équilibrage de la colonne par le tampon d'équilibration (50 mM TrisHCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazole), la protéine d'intérêt a été éluée par un gradient linéaire de concentration croissante d'imidazole vers le tampon d'éluion (50 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazole). L'éluât obtenu contenant la protéine cible, détectable par SDS-PAGE, est

alors dialysé contre une solution de 100 mM de sodium phosphate (NaP) pH 6 et 0.5 mM de DTT durant une nuit à 4°C.

L'extrait protéique obtenu est soumis à une deuxième purification sur une colonne Hi Prep Phenyl low sub (GE-Healthcare) qui reconnaît les groupements hydrophobes des protéines. Ces derniers ayant été mis en abîme par l'ajout dans l'extrait protéique de sulfate d'ammonium (1,2 M). La colonne est équilibrée avec le tampon d'équilibration (100 mM NaP pH 6, 1,2 M (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM DTT). La protéine d'intérêt a été éluée grâce au gradient linéaire de concentration décroissante de (NH₄)₂SO₄ vers le tampon d'éluion (100 mM NaP pH 6, 0.5mM DTT). L'éluât obtenu est dialysé contre 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl.

Le suivi de la purification a été effectué par électrophorèse en SDS-PAGE.

I.2.1.3. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide et calcul de la concentration protéique

Les échantillons de protéines sont dénaturés pendant 5 minutes à 95°C après ajout à 1X final d'un tampon de charge commercial (XT Sample *Buffer*, Biorad). Les protéines sont séparées par électrophorèse en condition dénaturante sur un gel Criterion™ XT gels (Biorad). La migration est effectuée en tampon MOPS-SDS (40 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 3 mM SDS, 0.5 mM EDTA, pH 8) sous l'influence d'un champ électrique de 100 Volts pendant 1 heure. La révélation des protéines est réalisée par coloration pendant 24 heures dans une solution de bleu de Coomassie (25% éthanol, 1% acide acétique, 1 g/L bleu) suivie d'une décoloration par des bains successifs composés d'acide acétique (10%) et d'éthanol (30%), (Annexe 4, page 161).

La quantification des protéines est réalisée par spectrophotométrie grâce à l'utilisation du Nanodrop ND1000-8129.

Les protéines sont conservées à -20°C dans un tampon final : 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 50% glycérol.

I.1.2. Amorces

Pour les réactions de coupure du plasmide PLRK19 deux amorces synthétiques différentes, envoyées par l'équipe du Pr Reha-Krantz sont utilisées :

- L'amorce V475W : 5'- GTATGATAAACATCAAGAAGGTATCATTCCAAAGGAAATCGC TAAATGGTTTTTCCAGCG-3'
- L'amorce G82D : 5'-P-GCGAGTTTAAAATCGTTCATATCGAGAGCTTCGAGAGCC

L'amorce V475W chevauche une structure en épingle à cheveux (Annexe 3, page 160).

I.3. Réaction PCR et visualisation

I.3.1. Réaction PCR

Les réactions PCR sont effectuées dans un thermocycleur (AB Applied Biosystems, Gene AMP PCR Sytem 9700) dans un mélange réactionnel contenant le tampon de l'enzyme utilisée (Tableau XII) à 1X final, des dNTPs à 188 μ M final, le plasmide PLRK19 à 1,1 nM final et l'amorce V475W ou G82D à 1 μ M final. Les ADN polymérases sont ajoutées, à la concentration souhaitée pour chacune d'entre elles, après une phase de préchauffage de 2 minutes à 95°C. Le programme PCR utilisé est composé de 20 cycles se décomposant de la façon suivante : dénaturation de 1 minute à 95°C, hybridation de 1 minute à 55°C et élongation de 12 minutes à 65°C.

ADN Pol's	Isis	PoIB3Mex o+	Pyra	PoIB3Mex o-	Q5	Pfu	Taq
Famille	B	B	B	B	B	B	A
Microorganisme d'origine	<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Thermococcus sp.9°N7+</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>Pyrococcus furius</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Activité exonucléase	3'→5'	3'→5'	/	/	3'→5'	3'→5'	5'→3'
Tampon de réaction (1X)	20mM Tris-HCl pH(25°C)9, 25mM KCl, 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.5mM MgSO ₄ , 0.1% Tween20, 0.1mg/ml BSA (Bovine serum albumin)		10mM Tris-Hcl pH (25°C)9, 50mM Kcl, 3mM MgSO ₄ , 0.1% Tween20		20mM Tris-HCl 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10mM KCl 2mM MgSO ₄ 0.1% Triton® X-100 pH 8.8 à 25°C	10mM Tris-HCl pH (25°C)9, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂ , 0.2mg/mL BSA	20mM Tris-HCl pH(25°C)8.8 ; 10mM KCl ; 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 2mM MgSO ₄ ; 1mg/ml nuclease- free BSA; 0.1% Triton X-100

Tableau XII: Caractéristiques des ADN polymérases utilisées pour l'étude sur la linéarisation du plasmide PLRK19.

I.3.2. Visualisation des produits PCR

Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% contenant du bromure d'éthidium (0.5 µg/mL) dans un tampon de migration TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA pH 8) sous l'influence d'un champ électrique constant à 80 volts pendant 40 minutes. Avant le dépôt sur gel, les échantillons sont mélangés à une solution de dépôt (20 mM Trizma base pH 8, 1,25 mM EDTA, 50% de glycérol, 0,04% de bleu de bromophénol). Ils sont ensuite visualisés par transillumination sous UV (302 nm) avec l'imager BioRad.

Troisième partie : Résultats

I - Linéarisation du plasmide PLRK19

I.1. Résultats obtenus par l'équipe canadienne

Lors d'une réaction de mutagénèse dirigée, le plasmide PLRK19 est linéarisé. La figure 20, ci-après, représente les résultats de l'équipe de Linda Reha-Krantz obtenus pour trois enzymes différentes dans les conditions PCR décrites en Matériels Méthodes, page 142. Cette figure montre que, quelle que soit l'amorce utilisée, G82D ou V475W, la linéarisation du plasmide se produit. Cet état du plasmide n'est pas lié aux étapes propres de la PCR puisque, sur la piste 3 de la figure 20A, où le plasmide est soumis à un programme PCR en présence de l'enzyme mais en absence d'amorce, ne sont présents que les états super enroulé et circulaire de celui-ci. En effet, cet état linéaire n'apparaît qu'en présence d'une enzyme répliquative de la famille B et des amorces G82D ou V475W soumis au programme PCR. Par ailleurs une digestion des produits PCR par l'enzyme de restriction DpnI, montre que le produit linéaire observé n'est pas digéré par celle-ci. DpnI reconnaissant spécifiquement la méthylation de brins parentaux des plasmides extraits d'*E. coli*, cela permet de montrer que la linéarisation de PLRK19 se produit pendant la synthèse du nouveau brin. Ainsi, les produits de dégradation après la digestion avec DpnI sont donc identiques qu'il y ait eu ou non réaction PCR (Figure 20A, pistes 4, 6 et 8) et quelles que soient l'enzyme ou l'amorce utilisées.

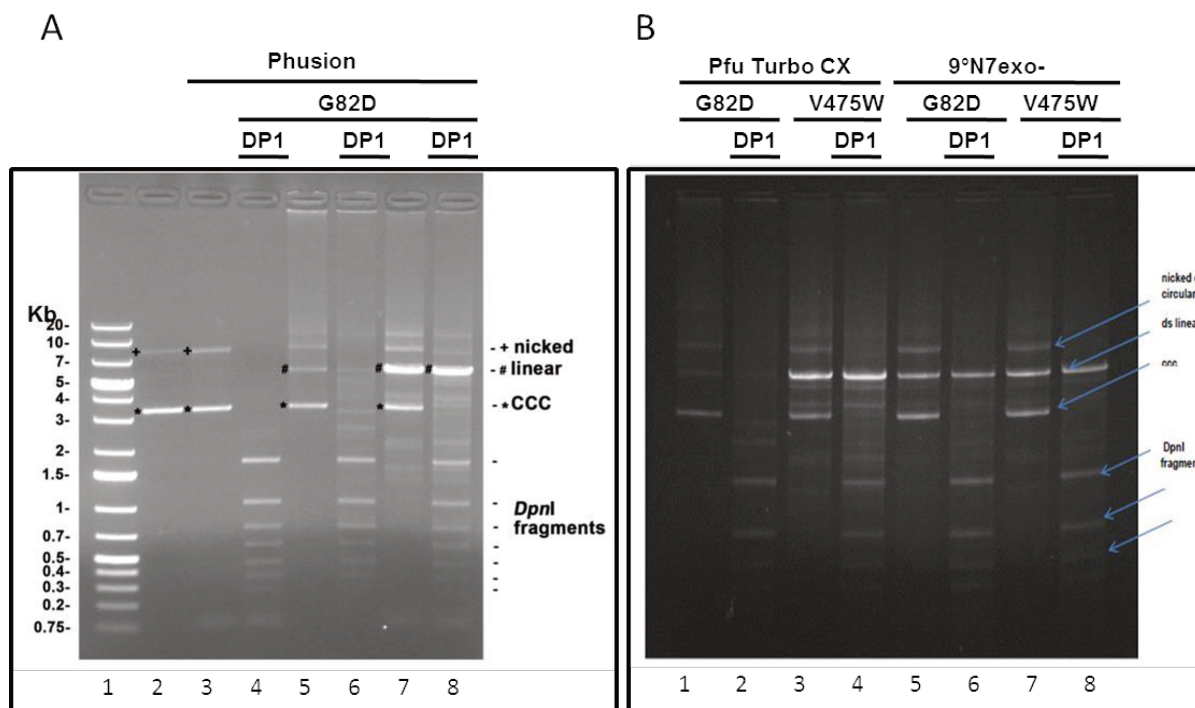


Figure 20: Linéarisation du plasmide PLRK19 lors d'une réaction de PCR, en présence de l'enzyme Phusion (A), Pfu Turbo CX et 9°N7exo- (B).

Profils d'électrophorèses sur gel d'agarose du plasmide PLRK19 dans différentes conditions. Sur la figure A, la piste 1 représente le marqueur de taille. Les pistes 2, 3 et 4 sont des contrôles de non linéarisation. La piste 2 représente le plasmide PLRK19 sous la forme super enroulée (ccc : covalently closed circular) et circulaire (nicked), la piste 3 le même plasmide dans des conditions de PCR en présence de l'ADN polymérase Phusion mais sans amorce et la piste 4 représente les produits de réaction de la piste 3 digérée par l'enzyme de restriction DpnI. Les pistes 5, 6, 7 et 8 représentent les réactions PCR en présence de l'amorce G82D, comme décrit en matériels et méthodes, avec 20 cycles PCR pour les pistes 5 et 6 et 40 cycles pour les pistes 7 et 8. Les produits PCR ont été digérés par l'enzyme de restriction DpnI, piste 6 et 8. Sur la figure B, les profils d'électrophorèses représentent les produits PCR obtenus après 20 cycles, comme décrit en matériels et méthodes, en présence de l'amorce G82D pour les pistes 1, 2, 5 et 6 et V475W pour les pistes 3, 4, 7 et 8. La Pfu Turbo est utilisée comme enzyme répliquative pour les pistes 1 à 4 et la 9°N7exo- pour les pistes 5 à 8. Les pistes 2, 4, 6 et 8 représentent la digestion des produits PCR de la piste la précédant, par l'enzyme DpnI.

I.2. Vérification de la reproductibilité de la linéarisation

Dans un premier temps, une réaction de répétabilité de l'activité de coupure a été effectuée avec l'ADN polymérase Q5 (9°N7 exo+), afin de voir si nous obtenions des résultats identiques à ceux de l'équipe du Pr Linda Reha-Krantz. La figure 21, représentant les résultats obtenus pour l'ADN polymérase Q5 (Tableau XII, page 142), confirment ceux visibles sur la figure 20, ci-avant. En présence de l'ADN polymérase, il y a une augmentation de la linéarisation du plasmide PLRK19, pistes 2 à 5. De plus cette augmentation est proportionnelle aux quantités croissantes de l'enzyme. Cependant, contrairement aux résultats précédents, une linéarisation est observée en présence d'enzyme mais en absence d'amorce, piste 5.

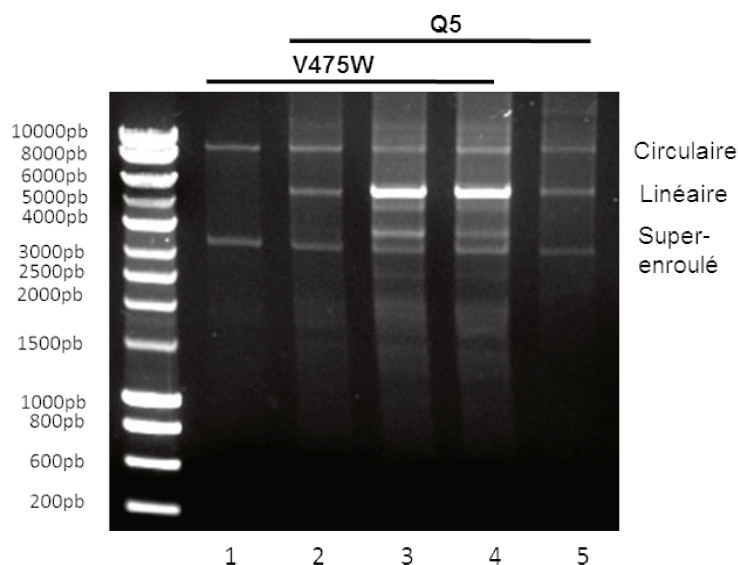


Figure 21: Linéarisation du plasmide PLRK19 en présence de l'ADN polymérase Q5.

Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, du plasmide PLRK19 dans les conditions PCR, décrites en matériels et méthodes, en présence de l'amorce V475W, excepté piste 5 et sans enzyme, piste 1, en présence de 1 unité d'enzyme Q5, piste 2, de 2 unités d'enzyme Q5 pistes 3 et 5, et de 3 unités d'enzyme Q5 piste 4.

II - Rôle des triples mutants de l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi* dans la linéarisation de PLRK19

Comme souligné dans la présentation de cette étude, l'ion dans la « T-cleft » de l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi* a été soupçonné de pouvoir jouer un rôle dans la linéarisation du plasmide PLRK19 lors d'une réaction PCR. Afin de déterminer si c'était le cas, des réactions PCR dans les mêmes conditions ont été réalisées avec les deux triples mutants PolB3Mexo+ et PolB3Mexo-. Puisque non commerciales, produites et purifiées au LM2E, une optimisation de leur condition réactionnelle en PCR a été menée au préalable. Des gammes de concentrations des triples mutants ont été réalisées afin de connaître leur équivalence en unité d'activité enzymatique pour ensuite les comparer aux ADN polymérases commerciales (Isis et Pyra). Pour cela différentes PCR ont été réalisées en présence de matrice de type génomique (ADN génomique de *P.abyssi*) ou encore sur un plasmide pET26 comportant un gène codant pour l'ADN polymérase PolBY410Gexo- (Résultats non présentés).

II.1. Rôle de l'ion dans la « T-cleft »

Les activités des ADN polymérases PolB triples mutantes, PolB3Mexo+ et PolB3Mexo-, ont été comparées à celles des enzymes commerciales, Isis et Pyra, qui sont les équivalents des formes sauvage PolBexo+ et PolBexo- de l'ADN polymérase PolB, respectivement

(Tableau XII, page 142). Les réactions PCR ont été réalisées avec les deux amorces, V475W et G82D dans les conditions décrites en Matériels et Méthodes et sont représentées sur la figure 22 ci-après.

Dans un premier temps, il peut être noté que sur les deux contrôles négatifs de PCR, pistes 1 et 6 de chacun des gels (absence d'enzyme ou d'amorce), la forme linéaire du plasmide PLRK19 n'est pas présente. De plus la forme super-enroulée est plus fortement présente lorsque le plasmide n'a pas subi de traitement PCR, pistes 6, que lorsqu'il a été soumis aux 20 cycles, pistes 1. La linéarisation du plasmide PLRK19 survient lors de la réaction PCR, pistes 2 à 4, et celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme utilisée. En effet, plus la concentration en enzyme est importante, pistes 4, plus la forme linéaire est abondante. Par ailleurs, ces résultats ne semblent pas mettre en évidence une différence d'activité entre les ADN polymérases commerciales (Figure 22A-B-E-F) et les ADN polymérases triples mutantes (Figure 22C-D-G-H). De nouveau, une linéarisation est observée en absence d'amorce, pistes 5. Enfin, l'intensité de la forme linéaire du plasmide PLRK19 paraît, de façon globale, plus forte lorsque la réaction PCR est effectuée avec l'amorce V475W (Figure 22A-C-E-G) plutôt qu'avec l'amorce G82D (Figure 22B-D-F-H).

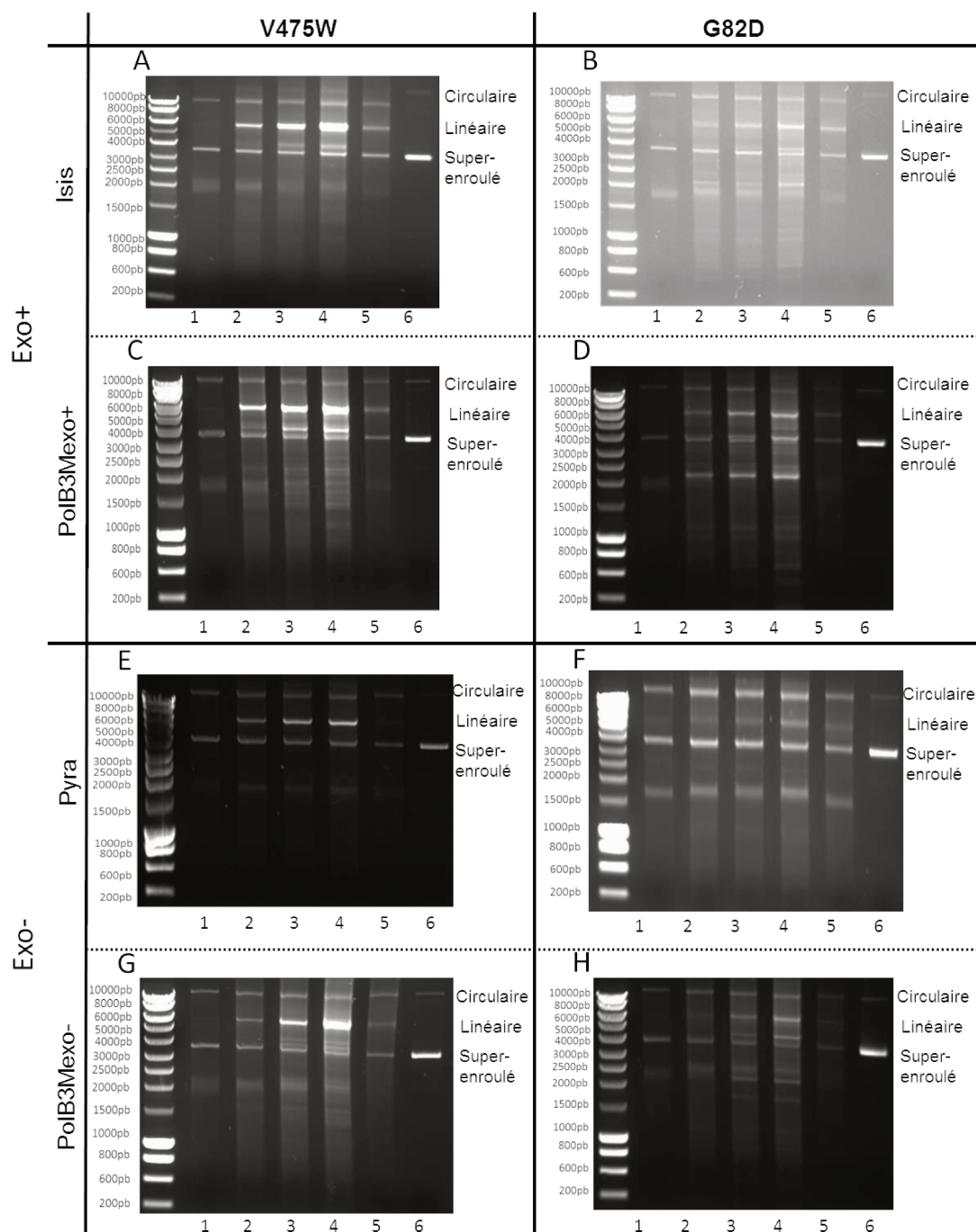


Figure 22: Linéarisation du plasmide PLRK19 par les ADN polymérase B commerciales Isis (A-B), Pyra (E-F) et par PoIB3Mexo+ (C-D) et PoIB3Mexo- (G-H).

Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, du plasmide PLRK19 dans des conditions PCR, décrites en matériels et méthodes, en présence de l'amorce V475W (A, C, E, G) ou G82D (B, D, F, H). Pour chacun d'entre eux la piste 1 représente la réaction PCR sans enzymes et la piste 5 en absence d'amorce. La piste 6 représente le plasmide PLRK19 n'ayant subi aucun traitement PCR. Les réactions PCR ont été réalisées pour des concentrations croissantes d'enzyme de la piste 2 à 4. Pyra et Isis ont été utilisées à 1 unité piste 2, 2 unités pistes 3 et 5, et 3 unités piste 4. Les ADN polymérase PoIB3Mexo+ et PoIB3Mexo- ont été utilisées à 30 nM piste 2, 60 nM pistes 3 et 5, et 90 nM piste 4.

II.2. Rôle de l'activité exonucléase 3'→5'

Afin de voir si l'activité exonucléase 3'→5' portée par l'ADN polymérase B avait un rôle dans la linéarisation du plasmide PLRK19, les réactions PCR ont été réalisées avec l'ADN polymérase triple mutant ne portant pas l'activité exonucléase, PolB3Mexo- (Figure 22G-H) ainsi qu'avec l'enzyme commerciale, Pyra, ne portant pas la triple mutation (Figure 22E-F). Les résultats obtenus sont comparables à ceux des ADN polymérases porteuses de l'activité exonucléase (Figure 22A-B-C-D). En effet, la linéarisation du plasmide apparaît en présence de l'ADN polymérase quelle qu'en soit sa nature, porteuse de la triple mutation (Figure 22C-D, pistes 2 à 5) ou sauvage (Figure 22A-B, pistes 2 à 5). De nouveau, une linéarisation apparaît en présence d'enzyme mais en absence d'amorce, visible sur la piste 5 de chacun des gels.

III - Rôle de la famille de l'ADN polymérase dans la linéarisation du plasmide

Afin d'observer si la linéarisation du plasmide PLRK19 était spécifique ou non de la famille B des ADN polymérases thermostables, des réactions PCR avec une autre famille B d'archée, PolB de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) mais aussi en présence de la famille A de la bactérie *Thermus aquaticus* (*Taq*) ont été menées.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 23 ci-après. Dans un premier temps, la forme linéaire du plasmide ne peut être observée dans les contrôles négatifs (absence d'enzyme ou d'amorce) de PCR sur les pistes 1 et 6 de chacun des gels. De nouveau, la forme super-enroulée est plus fortement présente lorsque le plasmide n'a subi aucun traitement PCR (pistes 6) comparativement au plasmide ayant été soumis aux 20 cycles (pistes 1). Tout comme les ADN polymérases B utilisées en figures 21 et 22, la présence de *Pfu* (Figure 23A) lors d'une PCR sur le plasmide PLRK19 avec l'amorce V475W engendre l'apparition de la forme linéaire du plasmide PLRK19. De façon intéressante, si cette même PCR est réalisée avec l'ADN polymérase de la famille A, *Taq*, cette linéarisation ne semble pas se produire (Figure 23B).

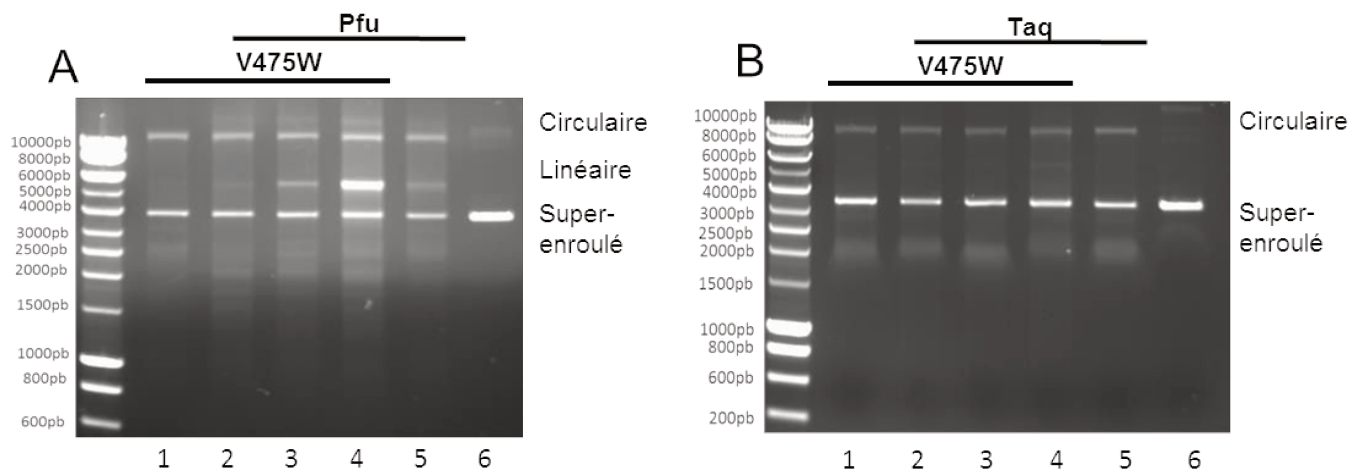


Figure 23: Linéarisation du plasmide PLRK19 par les ADN polymérases *Pfu* (A) et *Taq* (B).

Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, du plasmide PLRK19 dans des conditions PCR, décrites en matériels et méthodes, en présence de l'amorce V475W. Pour chacun d'entre eux la piste 1 représente la réaction PCR sans enzyme et la piste 5 en absence d'amorce. La piste 6 représente le plasmide PLRK19 n'ayant subi aucun traitement PCR. Les réactions PCR ont été réalisées pour des concentrations croissantes d'enzyme de la piste 2 à 4. Les enzymes sont utilisées à 1 unité piste 2, 2 unités pistes 3 et 5, et 3 unités piste 4.

Quatrième partie : Discussion - Perspectives

Les résultats présentés montrent que la structure en «T-cleft », impliquant trois acides aminés (les acides aspartiques 4 et 343 et l'acide glutamique 251) et chélatant un ion divalent, n'est pas responsable de la linéarisation du plasmide PLRK19. En effet, les triples mutants (PolB3M) mutés pour ces trois acides aminés possèdent la même activité que leurs homologues non mutés (Figure 22, page 148). Il semblerait également que l'activité exonucléase portée par les ADN polymérasés n'ait également aucun rôle dans cette activité.

Par ailleurs, il a pu être remarqué une linéarisation du plasmide plus importante lorsque l'amorce utilisée pour la PCR était celle notée V475W. Puisque cette amorce chevauche une structure en épingle à cheveux (Annexe 3, page 160), le plus fort taux de coupure en sa présence en comparaison avec l'amorce G82D laisse sous-entendre l'implication de cette structure particulière de l'ADN. De nouvelles réactions en PCR avec une matrice ADN comportant cette structure en épingle à cheveux mais avec un environnement nucléotidique différent permettrait de voir si cette activité est dépendante de la séquence en nucléotides.

Par ailleurs, une étude plus approfondie pourrait également porter sur la position du site de coupure dans la séquence du plasmide. En effet, l'équipe canadienne a fait séquencer plusieurs plasmides qui avaient été linéarisés après réaction PCR en présence de l'amorce V475W et de l'ADN polymérase PolB 9°N-7.

Le séquençage des ADN linéaires a, tout d'abord, permis de mettre en évidence la présence d'ADN double brin par la détermination de séquences complémentaires. De plus, la partie gauche du double brin linéaire (représentée sur le schéma, Figure 24 (4) ci-après), est dérivée de l'amorce et possède la mutation, représentée par le triangle noir, ainsi que le brin opposé (5). L'extrémité opposée est quant à elle quelque peu variable. Cela montre, que lors des réactions PCR, l'amplification du plasmide commence à l'amorce (1) puis continue jusqu'au début de celle-ci (2); ensuite un déplacement de l'amorce se produit suivi d'évènements de coupure, semble-t-il à deux endroits distincts, représentés par les flèches sur le schéma (3); cela aboutit à la linéarisation du plasmide (4). Puis, l'extrémité 5' cohésive est répliquée pour donner le double brin d'ADN (5).

Il apparaîtrait que la position du site de coupure fluctue à chaque réaction PCR faisant varier sa distance par rapport à la structure en épingle à cheveux.

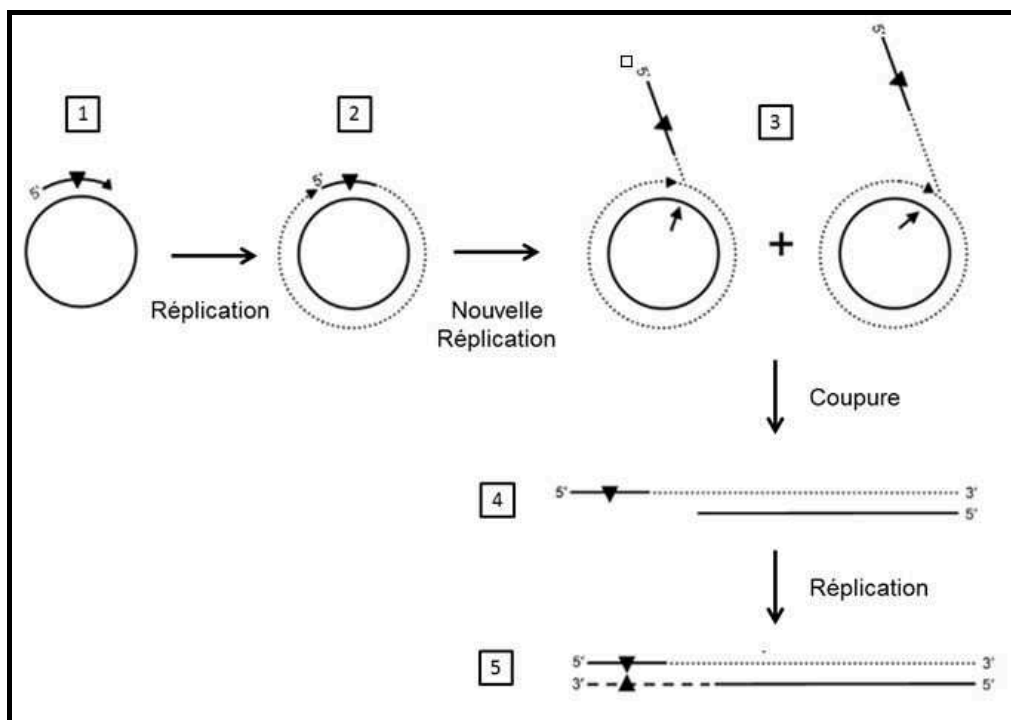


Figure 24: Schéma de la linéarisation du plasmide PLRK19 lors d'une réaction PCR, proposé par l'équipe canadienne du Pr Linda Reha-Krantz.

Le triangle noir représente la mutation. Les flèches désignent deux sites possibles où la matrice est clivée.

De nombreuses questions restent donc en suspens dans ce projet. La coupure est-elle due à la structure en épingle à cheveux et/ou à la séquence nucléotidique? Cela peut-il se produire sur une matrice autre que le plasmide PLRK19? Pourquoi cette activité n'est-elle pas visible avec l'ADN polymérase Taq? Ou encore quelle région structurale des enzymes est responsable de cette activité enzymatique?

CONCLUSION GENERALE

Les archées, identifiées comme troisième domaine du vivant depuis une cinquantaine d'années sont souvent mal connues et bien moins étudiées que les eucaryotes et les bactéries. Pourtant, leurs études présentent un intérêt certain puisque ce sont des microorganismes combinant des caractéristiques bactériennes et eucaryotes. Les archées colonisent des milieux très diversifiés mais certaines sont qualifiées d'extrêmes par leurs conditions physico-chimiques environnementales. Des microorganismes hyperthermophiles comme *Pyrococcus abyssi*, sont devenus des modèles d'étude permettant l'exploration des mécanismes de la stabilité génomique nécessaires à la survie en milieux extrêmes. C'est le cas de l'équipe « Maintenance génomique » du Laboratoire des Environnements Extrêmes (LM2E), dont les travaux sont axés sur la caractérisation d'un des systèmes majeurs de la stabilité génomique : la réplication de l'ADN. L'un de ces centres de recherche est donc orienté sur les ADN polymérases de *P.abyssi*.

Etudiées depuis de nombreuses années, les ADN polymérases PolB, PolD et p41/p46 ont été au cœur des différents projets menés au cours de cette thèse, pour certains en collaboration avec d'autres laboratoires. Leurs comportements ont été analysés dans des mécanismes de réplication et de dégradation de l'ADN, pour des approches fondamentales mais aussi biotechnologiques, en réaction d'amplification de l'ADN. Dans le contexte scientifique actuel de la maintenance génomique, de nombreuses études s'intéressent à la présence de ribonucléotides dans l'ADN. Dans ce domaine de recherche, de multiples productions scientifiques existent chez les bactéries et les eucaryotes mais très peu chez les archées. Ainsi le projet doctoral a été composé en grande partie autour de cette thématique et avait pour objectif d'étudier l'influence du contenu en désoxyribonucléotides et ribonucléotides sur la stabilité génomique chez l'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*. Diverses interrogations ont ainsi jalonné la réflexion et plusieurs approches méthodologiques ont permis d'y répondre.

Est-ce que le contenu en nucléotides d'une archée hyperthermophile est identique à celui des autres cellules du monde du vivant ?

La quantification de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et ribonucléotides de *P. abyssi* a été l'un des premiers objectifs à atteindre au cours de ce projet. Celui-ci a fait l'objet d'une première collaboration avec une équipe dont l'expertise dans la quantification des nucléotides couplée au savoir-faire culturelle du laboratoire LM2E ont permis l'obtention de résultats solides. Ainsi les gammes physiologiques de nucléotides chez *Pyrococcus abyssi* déterminées sont, pour les dNTPs : dT>dG≥dA>dC et, pour les rNTPs : rA>rG≥rU>rC. Malgré des différences, il s'avère que comme chez de nombreux

organismes le désoxyribonucléotide le plus abondant est le dTTP et le ribonucléotide le plus abondant est le rATP.

*Est-ce que la proportion largement supérieure de rNTPs met les ADN polymérases de *P. abyssi* fortement à l'épreuve ?*

Une fois le contenu en nucléotide déterminé, celui-ci a été utilisé pour en étudier les conséquences sur la synthèse d'ADN par des méthodes d'extension d'amorce réalisées par les ADN polymérases de *P. abyssi*. Ainsi, les trois ADN polymérases, PoID, PoIB et le complexe p41/p46, produites et purifiées au laboratoire LM2E ont été utilisées. Afin d'être au plus proche de la réalité physiologique, il a également été ajouté à l'étude les extraits cellulaires de *P. abyssi*. Il a alors pu être mis en évidence qu'une variation de la concentration de dNTPs et rNTPs affectait plus fortement la synthèse d'ADN par le complexe p41/p46 que par PoID et PoIB. Mais cela a surtout permis de mettre en exergue que comme chez les eucaryotes et les bactéries, des ribonucléotides pouvaient être insérés lors de la synthèse d'ADN et particulièrement par l'ADN polymérase PoID (Tableau VII, page 85).

*Comment la présence de rNMPs dans l'ADN est-elle perçue par les ADN polymérases de *P. abyssi*?*

Puisque les rNMPs sont présents dans l'ADN, une étude a été menée sur la capacité des ADN pols et des extraits cellulaires de *P. abyssi* à franchir des ribonucléotides lors de la synthèse d'ADN. De façon globale, toutes sont capables de synthétiser un brin d'ADN à partir d'une matrice comportant un ribonucléotide (Tableau VII, page 85). Ces résultats peuvent sous-entendre que la présence des rNMPs, sous forme monoribonucléotidique, dans l'ADN peut être tolérée. Cependant une diminution de l'efficacité de synthèse est visible et, de manière plus importante, lorsque la base du rNMP est l'uracile.

Est-ce que la stabilité génomique est fortement perturbée lors de la synthèse d'ADN en face d'un rNMP?

L'étude de l'incorporation préférentielle des ADN polymérases a montré qu'elles incorporaient le dNTP « correct » en face d'un rNMP, ne changeant donc pas la séquence en nucléotides de la nouvelle chaîne synthétisée. A l'inverse, c'est également le rNTP « correct » qui est incorporé en face d'un dNMP. Il a même pu être déterminé un ordre d'incorporation préférentielle des ribonucléotides allant du rGMP le plus facilement incorporé au rUMP le moins facilement incorporé. La complémentarité des bases est donc respectée.

*Est-ce que les ADN polymérases de *P. abyssi* possèdent des mécanismes de réparation permettant de limiter l'incorporation de rNMP ?*

Pour PolB la présence d'une tyrosine en position 410 semble être une barrière physique à l'incorporation de rNMPs lors de la synthèse ADN (Tableau VII, page 85). De plus, la fonction dite de relecture et des corrections des erreurs des ADN polymérases PolD et PolB a été étudiée en présence de rNMPs. Cette étude est ancrée dans un projet plus global de caractérisation fonctionnelle de la petite sous-unité DP1 de l'ADN polymérase PolD. Elle a été entreprise suite à la description de la structure cristallographique de DP1 et DP2, DP2 présentant un site actif « polymérase » proche de celui des ARN Pols (Sauguet *et al.*, 2016). Elle est menée en collaboration avec une équipe dont l'expertise structurale permet d'appuyer les résultats biochimiques obtenus au laboratoire LM2E. Il a alors pu être établi que l'ADN polymérase PolD était capable, avec des efficacités variables selon la nature de la base et sa position dans la séquence, de dégrader par son activité exonucléasique 3'→5' des ribonucléotides contenus dans un brin ADN (Tableau VII, page 85). Ces résultats suggèrent que cette activité de dégradation pourrait limiter l'incorporation de rNMPs dans l'ADN. Par ailleurs, ils démontrent une reconnaissance de l'uracile par l'ADN polymérase PolD et corroborent ainsi les hypothèses précédentes (Richardson 2013, Abellon-Ruiz 2016).

Toutes ces questions ont pu trouver dans ce projet une partie de leurs réponses complétant ainsi les connaissances en matière de stabilité génomique liées aux ribonucléotides dans l'ADN chez les Archées. Il est ainsi à noter que leur présence, certes, diminue l'efficacité de synthèse par les ADN polymérases mais n'est pas inhibitrice. Par ailleurs, le respect de la complémentarité des bases dans le cas d'une insertion de rNMP semble montrer que leur présence dans l'ADN n'est pas mutagène.

Au-delà de l'aspect fondamental, cette thèse a également permis d'entreprendre une approche plus appliquée basée sur l'étude des ADN polymérases thermostables en réaction d'amplification de l'ADN, la PCR. Bien que n'ayant pas proposé de solutions au problème posé cela a permis de soulever de nombreuses questions et peut-être de poser l'hypothèse d'une fonction nouvelle aux ADN polymérases de la famille B d'archées. En effet, le dernier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'étude d'une activité endonucléasique potentielle des ADN polymérases activées lors d'une réaction PCR. Cependant les résultats sont très préliminaires et aucune explication scientifique à ces observations n'a pu être explicitée pour le moment. Il faudrait donc approfondir ces données en pratiquant des manipulations à l'interface des approches fondamentales (réactions d'extension d'amorces) et biotechnologiques (PCR)

ANNEXES

Annexe 1 : Séquence peptidique de l'ADN polymérase PolB de *P. abyssi* (PAB 1128) et caractéristiques biochimiques.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMIID/AADYITEDGKPIIRIFKKEKGEFKVEYDRTFRPYIYA
 LLKDDSAIDEVKKITAERHGKIVRITEVEKVQKKFLGRPIEVWKLYLEHPQDVPAIREKIRE
 HPAVVDIFEYDIPFAKRYLIDKGLTPMEGNEELTFLAVDIETLYHEGEEFGKGPIMISYAD
 EEGAKVITWKSIDLPHYVEVSSSEREMIKRLVKVIREKDPDVIITYNGDNFA/D**FPYLLKRAE**
 KLGIKLPLGRDNSEPKMQRMGDSLAVE/AIKGRIHFDFPVIIRRTINLPTYTLEAVYEAIFG
 KSKEKVYAHEIAEAWETGKGLERVAKYSMEDAKVTFELGKEFFPMEAQLARLVGQPVD/AV
 SRSSTGNLVEWFLLRKAYERNE LAPNKPDEREYERRLRESYEGGYVKEPEKGLWEGIVSLDF
 RSLG/YPSIIITHNVSPDTLNRENCKEYDVAPQVGHRFCKDFPGFIPSLIGNLLEERQKIKK
 RMKESKDPVEKKLLDYRQRAIKILANSYGYGYAKARWYCKECAESVTAWGRQYIDLVRRE
 LESRGFKVLYIDTDGLYATIPGAKHEEIKEKALKFVEYINSKLPGLLELEYEGFYARGFFVT
 KKKYALIDEEGKIVTRGLEIVRRDWSEIAKETQAKVLEAILKHGNVDEAVKIVKEVTEKLSK
 YEIPPEKLVIIYEQITRPLSEYKAIGPHVAVAKRLAAKGVKVKPGMVIGYIVLRGDGPI SKRA
 IAIEEFDPKKHKYDAEYYIENQVLPVERILRAFgyrkEDLKYQKTKQVGLGAWLKF

Les acides aminés en vert représentent l'étiquette contenant les histidines (His-Tag) N-terminal provenant du plasmide pET28.

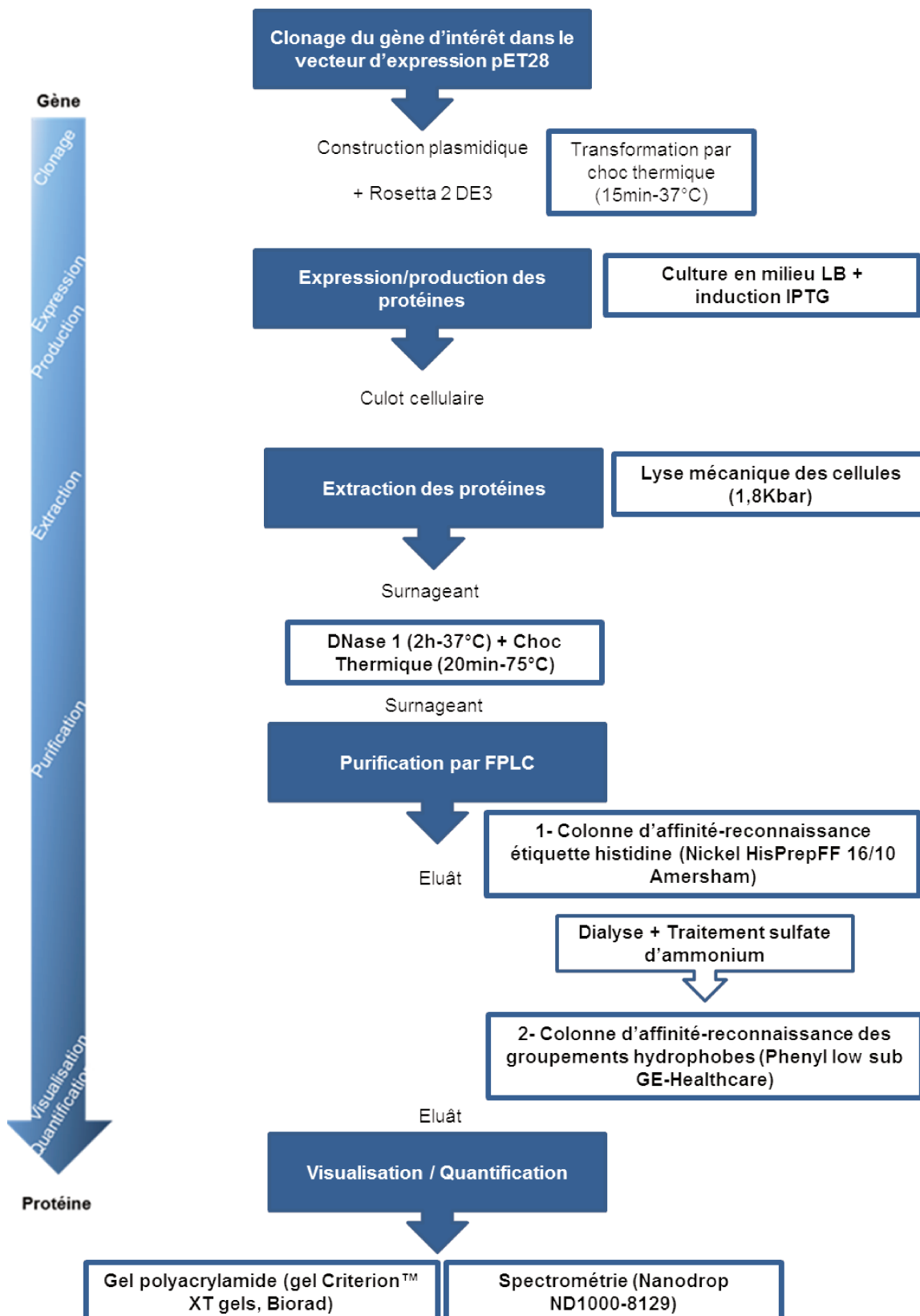
Les acides aminés en rouge à la position 215 sont : l'acide aspartique (D) présent dans la version sauvage de l'ADN polymérase PolB de *P.abyssi* (PolBexo+) et l'alanine (A) qui est l'acide aminé de substitution permettant une version de PolB dépourvue de l'activité exonucléasique (PolBexo-).

Les acides aminés en bleu à la position 410 sont : la tyrosine (Y) présente dans la version sauvage de l'ADN polymérase PolB de *P.abyssi* lui permettant l'exclusion des rNMPs (« stéric gate ») et la glycine (G) qui est l'acide aminé de substitution donnant une PolB dépourvue de son « stéric gate » (PolBY410Gexo-).

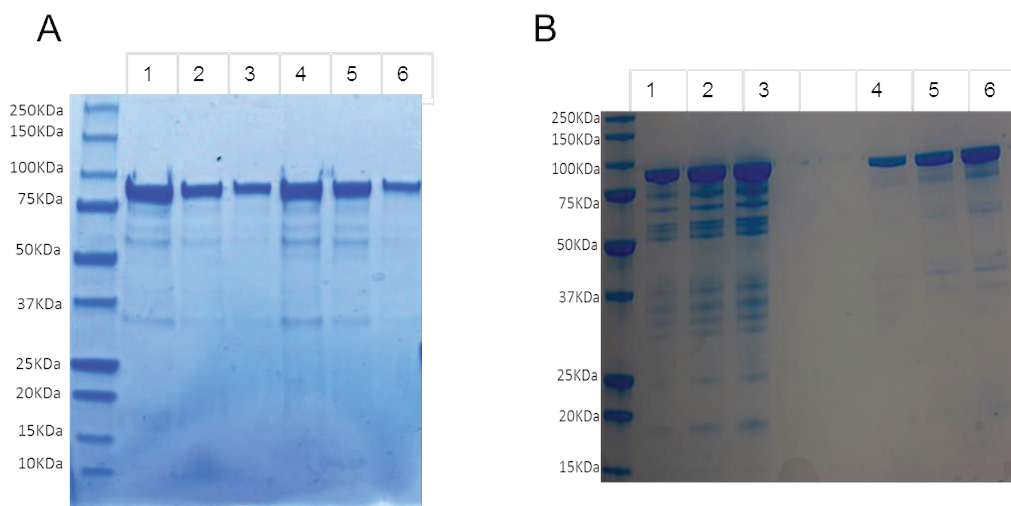
Les acides aminés en orange sont : un acide aspartique (D) en position 4, un acide glutamique (E) en position 251 et un acide aspartique (D) en position 343 présents dans la version sauvage de l'ADN polymérase B de *P.abyssi*. Ils sont remplacés par trois alanines dans le triple mutant : PolB3M

	PolBexo+	PolBexo-	PolB3Mexo+	PolB3Mexo-	PolBY410Gexo-
Nombre d'acides aminés	791	791	791	791	791
Poid moléculaire (Dalton)	91553.64	91509.63	91513.7	91469.7	91615.75
pI théorique (point Isoélectrique)	8.52	8.61	8.74	8.80	8.60
Coefficient d'extinction molaire (M ⁻¹ cm ⁻¹)	120810	120810	122300	122050	122300

Annexe 2: Méthode de production et de purification des ADN polymérase PoIBY410Gexo-, PoIB3Mexo+ et PoIB3Mexo-.



Annexe 4 : Contrôle qualité des protéines PolB3Mexo+ (A) et PolB3Mexo- (B) après purification.



Profil d'électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide des protéines :

(A) PolB3Mexo+

Piste 1 à 3 la protéine est dans le tampon 20 mM NaP pH 6, 0,5 mM DTT, 100 mM NaCl

Piste 4 à 6 la protéine est dans le tampon 50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl

Piste 1 et 4 : 5 µg ; Piste 2 et 5 : 2,5 µg ; Piste 3 et 6 : 1,25 µg

(B) PolB3Mexo-

Piste 1 à 3 la protéine est dans le tampon 50 mM Tris HCl pH 7,5 ; 1 mM DTT ; 100 mM NaCl

Piste 4 à 6 la protéine est dans le tampon 20 mM NaP pH 6 ; 0,5 mM DTT ; 100 mM NaCl

Piste 1 : 2 µg ; Piste 2 : 4 µg ; Piste 3 : 6 µg ; Piste 4 : 0,9 µg ; Piste 5 : 1,9 µg ; Piste 6 : 2,7µg

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abellón-Ruiz, J., Waldron, K.J., and Connolly, B.A. (2016). *Archaeoglobus Fulgidus* DNA Polymerase D: A Zinc-Binding Protein Inhibited by Hypoxanthine and Uracil. *J. Mol. Biol.* *428*, 2805–2813.
- Aminov, R.I. (2013). Role of archaea in human disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *3*.
- Arnér, E.S., and Eriksson, S. (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* *67*, 155–186.
- Astatke, M., Ng, K., Grindley, N.D., and Joyce, C.M. (1998). A single side chain prevents *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) from incorporating ribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3402–3407.
- Augustin, M.A., Huber, R., and Kaiser, J.T. (2001). Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nat. Struct. Mol. Biol.* *8*, 57–61.
- Ayyagari, R., Gomes, X.V., Gordenin, D.A., and Burgers, P.M.J. (2003). Okazaki Fragment Maturation in Yeast I. Distribution of fonctions between FEN1 and DNA2. *J. Biol. Chem.* *278*, 1618–1625.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A. (2013). Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Ban, C., Ramakrishnan, B., and Sundaralingam, M. (1994). A Single 2'-Hydroxyl Group Converts B-DNA to A-DNA. *J. Mol. Biol.* *236*, 275–285.
- Beattie, T.R., and Bell, S.D. (2012). Coordination of multiple enzyme activities by a single PCNA in archaeal Okazaki fragment maturation. *EMBO J.* *31*, 1556–1567.
- Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* *69*, 137–165.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B.E., and Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 447–460.
- Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2013). *Biochimie (7^e Éd.)* (Lavoisier).
- Bergoglio, V., Ferrari, E., Hübscher, U., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2003). DNA Polymerase β can Incorporate Ribonucleotides during DNA Synthesis of Undamaged and CPD-damaged DNA. *J. Mol. Biol.* *331*, 1017–1023.
- Berquist, B.R., DasSarma, P., and DasSarma, S. (2007). Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *BMC Genet.* *8*, 31.
- Bestwick, R.K., Moffett, G.L., and Mathews, C.K. (1982). Selective expansion of mitochondrial nucleoside triphosphate pools in antimetabolite-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* *257*, 9300–9304.
- Bianchi, V., Pontis, E., and Reichard, P. (1986). Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* *261*, 16037–16042.
- Bochner, B.R., and Ames, B.N. (1982). Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J. Biol. Chem.* *257*, 9759–9769.
- Bogenhagen, D., and Clayton, D.A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* *11*, 719–727.
- Bonnin, A., Lázaro, J.M., Blanco, L., and Salas, M. (1999). A single tyrosine prevents insertion of ribonucleotides in the eukaryotic-type phi29 DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* *290*, 241–251.
- Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R. (2001). *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA

- polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol η . *Nucleic Acids Res.* **29**, 4607–4616.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Braithwaite, D.K., and Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **21**, 787–802.
- Brasier, M.D., Green, O.R., Jephcoat, A.P., Kleppe, A.K., Van Kranendonk, M.J., Lindsay, J.F., Steele, A., and Grassineau, N.V. (2002). Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* **416**, 76–81.
- Bray, C.M., and West, C.E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol.* **168**, 511–528.
- Brooks, T.A., Kendrick, S., and Hurley, L. (2010). Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *FEBS J.* **277**, 3459–3469.
- Brown, J.A., and Suo, Z. (2011). Unlocking the sugar “steric gate” of DNA polymerases. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 1135–1142.
- Brown, N.C., and Reichard, P. (1969). Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J. Mol. Biol.* **46**, 39–55.
- Brown, J.A., Fiala, K.A., Fowler, J.D., Sherrer, S.M., Newmister, S.A., Duym, W.W., and Suo, Z. (2010). A Novel Mechanism of Sugar Selection Utilized by a Human X-Family DNA Polymerase. *J. Mol. Biol.* **395**, 282–290.
- Brutlag, D., and Kornberg, A. (1972). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* **247**, 241–248.
- Bubeck, D., Reijns, M.A.M., Graham, S.C., Astell, K.R., Jones, E.Y., and Jackson, A.P. (2011). PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3652–3666
- Buckland, R.J., Watt, D.L., Chittoor, B., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., and Chabes, A. (2014). Increased and Imbalanced dNTP Pools Symmetrically Promote Both Leading and Lagging Strand Replication Infidelity. *PLoS Genet.* **10**, e1004846
- Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008). Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 718–726.
- Cai, Y., Geacintov, N.E., and Broyde, S. (2014). Ribonucleotides as nucleotide excision repair substrates. *DNA Repair* **13**, 55–60.
- Caine, M., Zuchuat, S., Weber, A., Ducret, V., Linder, P., and Perron, K. (2015). BiOutils: an interface to connect university laboratories with microbiology classes in schools. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**.
- Cann, I.K.O., Komori, K., Toh, H., Kanai, S., and Ishino, Y. (1998). A heterodimeric DNA polymerase: Evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14250–14255.
- Cann, I.K.O., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. (1999). Functional Interactions of a Homolog of Proliferating Cell Nuclear Antigen with DNA Polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 6591–6599.
- Caras, I.W., and Martin, D.W. (1988). Molecular cloning of the cDNA for a mutant mouse ribonucleotide reductase M1 that produces a dominant mutator phenotype in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2698–2704.
- Castrec, B., Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2009). Binding to PCNA in

- Euryarchaeal DNA Replication requires two PIP motifs for DNA polymerase D and one PIP motif for DNA polymerase B. *J. Mol. Biol.* **394**, 209–218.
- Cavanaugh, N.A., Beard, W.A., Batra, V.K., Perera, L., Pedersen, L.G., and Wilson, S.H. (2011). Molecular insights into DNA polymerase deterrents for ribonucleotide insertion. *J. Biol. Chem.* **286**, 31650–31660.
- Cavicchioli, R., Curmi, P.M.G., Saunders, N., and Thomas, T. (2003). Pathogenic archaea: do they exist? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **25**, 1119–1128.
- Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.* **276**, 1494–1505.
- Cerritelli, S.M., and Crouch, R.J. (2016). The Balancing Act of Ribonucleotides in DNA. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 434–445.
- Chabes, A., and Stillman, B. (2007). Constitutively high dNTP concentration inhibits cell cycle progression and the DNA damage checkpoint in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1183–1188.
- Chabes, A., and Thelander, L. (2000). Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J. Biol. Chem.* **275**, 17747–17753.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., and Thelander, L. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**, 391–401.
- Chen, P., Liu, Z., Liu, S., Xie, Z., Aimiwu, J., Pang, J., Klisovic, R., Blum, W., Grever, M.R., Marcucci, G., *et al.* (2009). A LC-MS/MS Method for the Analysis of Intracellular Nucleoside Triphosphate Levels. *Pharm. Res.* **26**, 1504–1515.
- Chiu, H.-C., Koh, K.D., Evich, M., Lesiak, A.L., Germann, M.W., Bongiorno, A., Riedo, E., and Storici, F. (2014). RNA intrusions change DNA elastic properties and structure. *Nanoscale* **6**, 10009–10017.
- Choi, J.-Y., Eoff, R.L., Pence, M.G., Wang, J., Martin, M.V., Kim, E.-J., Folkmann, L.M., and Guengerich, F.P. (2011). Roles of the four DNA polymerases of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* and accessory proteins in DNA replication. *J. Biol. Chem.* **286**, 31180–31193.
- Clark, A.B., Lujan, S.A., Kissling, G.E., and Kunkel, T.A. (2011). Mismatch repair-independent tandem repeat sequence instability resulting from ribonucleotide incorporation by DNA polymerase ϵ . *DNA Repair* **10**, 476–482.
- Clausen, A.R., Zhang, S., Burgers, P.M., Lee, M.Y., and Kunkel, T.A. (2013). Ribonucleotide incorporation, proofreading and bypass by human DNA polymerase δ . *DNA Repair* **12**, 121–127.
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Quérellou, J., Ripp, R., *et al.* (2003). An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* **47**, 1495–1512.
- Cohen, S., Megherbi, M., Jordheim, L.P., Lefebvre, I., Perigaud, C., Dumontet, C., and Guillon, J. (2009). Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **877**, 3831–3840.
- Connelly, J.C., de Leau, E.S., and Leach, D.R. (1999). DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1039–1046.
- Connolly, B.A. (2009). Recognition of deaminated bases by archaeal family-B DNA polymerases. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 65–68.

- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., *et al.* (1979). Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science* *203*, 1073–1083.
- Cozens, C., Pinheiro, V.B., Vaisman, A., Woodgate, R., and Holliger, P. (2012). A short adaptive path from DNA to RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8067–8072.
- Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., *et al.* (2006). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* *38*, 910–916.
- Čuboňová, L., Richardson, T., Burkhart, B.W., Kelman, Z., Connolly, B.A., Reeve, J.N., and Santangelo, T.J. (2013). Archaeal DNA Polymerase D but Not DNA Polymerase B Is Required for Genome Replication in *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* *195*, 2322–2328.
- Da Cunha, V., Gaia, M., Gadelle, D., Nasir, A., and Forterre, P. (2017). Lokiarchaea are close relatives of Euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Genet.* *13*, e1006810.
- Davey, M.J., Fang, L., McInerney, P., Georgescu, R.E., and O'Donnell, M. (2002). The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO J.* *21*, 3148–3159.
- DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4215.
- Delagoutte, E. (2012). DNA polymerases: mechanistic insight from biochemical and biophysical studies. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *17*, 509–544.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* *3*, 461–467.
- DeRose, E.F., Perera, L., Murray, M.S., Kunkel, T.A., and London, R.E. (2012). Solution structure of the Dickerson DNA dodecamer containing a single ribonucleotide. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 2407–2416.
- Dickey, T.H., Altschuler, S.E., and Wuttke, D.S. (2013). Single-Stranded DNA-Binding Proteins: Multiple Domains for Multiple Functions. *Struct. Lond. Engl.* *21*.
- Dietrich, J., Schmitt, P., Zieger, M., Preve, B., Rolland, J.-L., Chaabihi, H., and Gueguen, Y. (2002). PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS Microbiol. Lett.* *217*, 89–94.
- Donigan, K.A., McLenigan, M.P., Yang, W., Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2014). The steric gate of DNA polymerase ϵ regulates ribonucleotide incorporation and deoxyribonucleotide fidelity. *J. Biol. Chem.* *289*, 9136–9145.
- Duggin, I.G., Dubarry, N., and Bell, S.D. (2011). Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO J.* *30*, 145–153.
- Dunn, K., and Griffith, J.D. (1980). The presence of RNA in a double helix inhibits its interaction with histone protein. *Nucleic Acids Res.* *8*, 555–566.
- Eckburg, P.B., Lepp, P.W., and Relman, D.A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* *71*, 591–596.
- Egli, M., Usman, N., and Rich, A. (1993). Conformational influence of the ribose 2'-hydroxyl group: crystal structures of DNA-RNA chimeric duplexes. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 3221–3237.
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C.W., and Ettema, T.J.G. (2017). Archaea

- and the origin of eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 711–723.
- Erauso, G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B., Partensky, F., Baross, J.A., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N.R., *et al.* (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* *160*, 338–349.
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., and Eklund, H. (2002). Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 1327–1346.
- Evich, M., Spring-Connell, A.M., Storici, F., and Germann, M.W. (2016). Structural Impact of Single Ribonucleotide Residues in DNA. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *17*, 1968–1977.
- Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Minardi, S., Katou, Y., Kanoh, Y., Shirahige, K., Azvolinsky, A., Zakian, V.A., and Foiani, M. (2010). Replication Termination at Eukaryotic Chromosomes Is Mediated by Top2 and Occurs at Genomic Loci Containing Pausing Elements. *Mol. Cell* *39*, 595–605.
- Felice, M.D., Esposito, L., Pucci, B., Falco, M.D., Rossi, M., and Pisani, F.M. (2004). A CDC6-like Factor from the Archaea *Sulfolobus solfataricus* Promotes Binding of the Mini-chromosome Maintenance Complex to DNA. *J. Biol. Chem.* *279*, 43008–43012.
- Ferraro, P., Franzolin, E., Pontarin, G., Reichard, P., and Bianchi, V. (2010). Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* *38*, e85.
- Ferry, J.G., and Kestead, K.A. (2007). Methanogenesis. 288–314.
- Filée, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., and Laurent, J. (2002). Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J. Mol. Evol.* *54*, 763–773.
- Flood, C.L., Rodriguez, G.P., Bao, G., Shockley, A.H., Kow, Y.W., and Crouse, G.F. (2015). Replicative DNA polymerase δ but not ϵ proofreads errors in Cis and in Trans. *PLoS Genet.* *11*, e1005049.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., and Woese, C.R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 4537–4541.
- Friedberg, E.C., Wagner, R., and Radman, M. (2002). Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* *296*, 1627–1630.
- Fuchs, R.P., Fujii, S., and Wagner, J. (2004). Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv. Protein Chem.* *69*, 229–264.
- Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P.W., and Brugère, J.-F. (2014). Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J. Gastroenterol.* *20*, 16062–16078.
- Gao, J., and Wang, J. (2012). Re-annotation of two hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* GE5 and *Pyrococcus furiosus* DSM 3638. *Curr. Microbiol.* *64*, 118–129.
- Garrett, C., and Santi, D.V. (1979). A rapid and sensitive high pressure liquid chromatography assay for deoxyribonucleoside triphosphates in cell extracts. *Anal. Biochem.* *99*, 268–273.
- Ghodgaonkar, M.M., Lazzaro, F., Olivera-Pimentel, M., Artola-Borán, M., Cejka, P., Reijns, M.A., Jackson, A.P., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., and Jiricny, J. (2013). Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair. *Mol. Cell* *50*, 323–332.
- Gill, S., O'Neill, R., Lewis, R.J., and Connolly, B.A. (2007). Interaction of the family-B DNA polymerase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* with deaminated bases. *J. Mol. Biol.* *372*, 855–863.

- Ginoza, W., Hoelle, C.J., Vessey, K.B., and Carmack, C. (1964). Mechanisms of inactivation of single-stranded virus nucleic acids by heat. *Nature* *203*, 606–609.
- Glud, R.N., Wenzhöfer, F., Middelboe, M., Oguri, K., Turnewitsch, R., Canfield, D.E., and Kitazato, H. (2013). High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nat. Geosci.* *6*, 284–288.
- Godfroy, A., Raven, N.D., and Sharp, R.J. (2000). Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol. Lett.* *186*, 127–132.
- Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N. (2006). Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. *Methods Microbiol. Extrem.* *35*, 93–108.
- Gon, S., Napolitano, R., Rocha, W., Coulon, S., and Fuchs, R.P. (2011). Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19311–19316.
- Gouge, J., Ralec, C., Henneke, G., and Delarue, M. (2012). Molecular recognition of canonical and deaminated bases by *P. abyssi* family B DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* *423*, 315–336.
- Greenough, L., Kelman, Z., and Gardner, A.F. (2015). The Roles of Family B and D DNA Polymerases in *Thermococcus* *Species* 9°N Okazaki Fragment Maturation. *J. Biol. Chem.* *290*, 12514–12522.
- Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J.P., and Dietrich, J. (2001). Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 5961–5969.
- Guilliam, T.A., Keen, B.A., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2015). Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* *43*, 6651–6664.
- Günther, C., Kind, B., Reijns, M., Berndt, N., Martinez-Bueno, M., Wolf, C., Tüngler, V., Chara, O., Lee, Y., Hübner, N., *et al.* (2015). Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* *13*, O86.
- Heider, M.R., Burkhart, B.W., Santangelo, T.J., and Gardner, A.F. (2017). Defining the RNaseH2 enzyme-initiated Ribonucleotide Excision Repair Pathway in Archaea. *J. Biol. Chem.* *292*, 8835–8845.
- Hendricks, S.P., and Mathews, C.K. (1997). Regulation of T4 Phage Aerobic Ribonucleotide Reductase simultaneous assay of the four activities. *J. Biol. Chem.* *272*, 2861–2865.
- Henneke, G. (2012). In vitro reconstitution of RNA primer removal in *Archaea* reveals the existence of two pathways. *Biochem. J.* *447*, 271–280.
- Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2005). The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J. Mol. Biol.* *350*, 53–64.
- Henneré, G., Becher, F., Pruvost, A., Goujard, C., Grassi, J., and Benech, H. (2003). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assays for intracellular deoxyribonucleotide triphosphate competitors of nucleoside antiretrovirals. *J. Chromatogr. B* *789*, 273–281.
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T., and Sjöberg, B.-M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *47*, 50–63.
- Hong, X., Cadwell, G.W., and Kogoma, T. (1995). *Escherichia coli* RecG and RecA

- proteins in R-loop formation. *EMBO J.* *14*, 2385–2392.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D., Fairley, C., Tainer, J.A., and Carney, J.P. (2000). Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *J. Bacteriol.* *182*, 6036–6041.
- Hopkins, B.B., and Paull, T.T. (2008). The *P. furiosus* Mre11/Rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell* *135*, 250–260.
- Hovatter, K.R., and Martinson, H.G. (1987). Ribonucleotide-induced helical alteration in DNA prevents nucleosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1162–1166.
- Huang, S.N., Williams, J.S., Arana, M.E., Kunkel, T.A., and Pommier, Y. (2017). Topoisomerase I-mediated cleavage at unrepaired ribonucleotides generates DNA double-strand breaks. *EMBO J.* *36*, 361–373.
- Ishino, Y., and Ishino, S. (2012). Rapid progress of DNA replication studies in *Archaea*, the third domain of life. *Sci. China Life Sci.* *55*, 386–403.
- Ito, N., Nureki, O., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Hanaoka, F. (2003). Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis. *Genes Cells.* *8*, 913–923.
- Jeong, H.-S., Backlund, P.S., Chen, H.-C., Karavanov, A.A., and Crouch, R.J. (2004). RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins. *Nucleic Acids Res.* *32*, 407–414.
- Jin, Y.H., Garg, P., Stith, C.M.W., Al-Refai, H., Sterling, J.F., Murray, L.J.W., Kunkel, T.A., Resnick, M.A., Burgers, P.M., and Gordenin, D.A. (2005). The multiple biological roles of the 3'→5' exonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta require switching between the polymerase and exonuclease domains. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 461–471.
- Jokela, M., Eskelinen, A., Pospiech, H., Rouvinen, J., and Syväoja, J.E. (2004). Characterization of the 3' exonuclease subunit DP1 of *Methanococcus jannaschii* replicative DNA polymerase D. *Nucleic Acids Res.* *32*, 2430–2440.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I., and Barbé, J. (1996). Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* nrdEF operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* *19*, 777–790.
- Joyce, C.M. (1997). Choosing the right sugar: How polymerases select a nucleotide substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1619–1622.
- Joyce, C.M., and Benkovic, S.J. (2004). DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 14317–14324.
- Joyce, C.M., and Steitz, T.A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 777–822.
- Kaguni, J.M. (2011). Replication initiation at the *Escherichia coli* chromosomal origin. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *15*, 606–613.
- Kelman, L.M., and Kelman, Z. (2014). Archaeal DNA replication. *Annu. Rev. Genet.* *48*, 71–97.
- Killelea, T., Ralec, C., Bossé, A., and Henneke, G. (2014). PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase. *Front. Microbiol.* *5*, 195.
- Kim, M.Y., and Ives, D.H. (1989). Human deoxycytidine kinase: kinetic mechanism and end product regulation. *Biochemistry (Mosc.)* *28*, 9043–9047.
- Kim, N., Huang, S.N., Williams, J.S., Li, Y.C., Clark, A.B., Cho, J.-E., Kunkel, T.A., Pommier, Y., and Jinks-Robertson, S. (2011). Mutagenic processing of

- ribonucleotides in DNA by yeast topoisomerase I. *Science* 332, 1561–1564.
- Knecht, W., Petersen, G.E., Munch-Petersen, B., and Piskur, J. (2002). Deoxyribonucleoside kinases belonging to the thymidine kinase 2 (TK2)-like group vary significantly in substrate specificity, kinetics and feed-back regulation. *J. Mol. Biol.* 315, 529–540.
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G.W., Barnard, K.G., and Asai, T. (1993). Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* 75, 89–99.
- Koh, K.D., Balachander, S., Hesselberth, J.R., and Storici, F. (2015). Ribose-seq: global mapping of ribonucleotides embedded in genomic DNA. *Nat. Methods* 12, 251–257.
- Koonin, E.V. (1994). Conserved sequence pattern in a wide variety of phosphoesterases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 3, 356–358.
- Kornberg, A., Kornberg, S.R., and Simms, E.S. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 215–227.
- Kuchta, R.D., and Stengel, G. (2010). Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1180–1189.
- Kumar, D., Viberg, J., Nilsson, A.K., and Chabes, A. (2010). Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 38, 3975–3983.
- Kunkel, T.A. (1988). Exonucleolytic proofreading. *Cell* 53, 837–840.
- Kunkel, T.A. (2004). DNA Replication Fidelity. *J. Biol. Chem.* 279, 16895–16898.
- Kunkel, T.A. (2009). Evolving Views of DNA Replication (In)Fidelity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 91–101.
- Kunz, B.A., Kohalmi, S.E., Kunkel, T.A., Mathews, C.K., McIntosh, E.M., and Reidy, J.A. (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* 318, 1–64.
- Lao-Sirieix, S., and Bell, S.D. (2004). The heterodimeric primase of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* possesses DNA and RNA primase, polymerase and 3'-terminal nucleotidyl transferase activities. *J. Mol. Biol.* 344, 1251–1263.
- Lao-Sirieix, S.-H., Pellegrini, L., and Bell, S.D. (2005). The promiscuous primase. *Trends Genet. TIG* 21, 568–572.
- Laz, S.L., Goaziou, A.L., and Henneke, G. (2010). Structure-Specific Nuclease Activities of *Pyrococcus abyssi* RNase HII. *J. Bacteriol.* 192, 3689–3698.
- Le Breton, M., Henneke, G., Norais, C., Flament, D., Myllykallio, H., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2007). The Heterodimeric Primase from the Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*: A Multifunctional Enzyme for Initiation and Repair? *J. Mol. Biol.* 374, 1172–1185.
- Li, Y., and Breaker, R.R. (1999). Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5364–5372.
- Liew, L.P., Lim, Z.Y., Cohen, M., Kong, Z., Marjavaara, L., Chabes, A., and Bell, S.D. (2016). Hydroxyurea-Mediated Cytotoxicity Without Inhibition of Ribonucleotide Reductase. *Cell Rep.* 17, 1657–1670.
- Lin, L.-J., Yoshinaga, A., Lin, Y., Guzman, C., Chen, Y.-H., Mei, S., Lagunas, A.M., Koike, S., Iwai, S., Spies, M.A., *et al.* (2010). Molecular Analyses of an Unusual

- Translesion DNA Polymerase from *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J. Mol. Biol.* **397**, 13–30.
- Lin, T.C., Rush, J., Spicer, E.K., and Konigsberg, W.H. (1987). Cloning and expression of T4 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7000–7004.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–715.
- Lindsey-Boltz, L.A., Kemp, M.G., Hu, J., and Sancar, A. (2015). Analysis of Ribonucleotide Removal from DNA by Human Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.* **290**, 29801–29807.
- Littlefield, J.W. (1966). The periodic synthesis of thymidine kinase in mouse fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 398–403.
- Liu, L., Komori, K., Ishino, S., Bocquier, A.A., Cann, I.K., Kohda, D., and Ishino, Y. (2001). The archaeal DNA primase: biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **276**, 45484–45490.
- Lo, K.Y., and Bessman, M.J. (1976). An antimutator deoxyribonucleic acid polymerase. II. In vitro and in vivo studies of its temperature sensitivity. *J. Biol. Chem.* **251**, 2480–2486.
- Lucas, S., Toffin, L., Zivanovic, Y., Charlier, D., Moussard, H., Forterre, P., Prieur, D., and Erauso, G. (2002). Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5528–5536.
- Lujan, S.A., Williams, J.S., Clausen, A.R., Clark, A.B., and Kunkel, T.A. (2013). Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors. *Mol. Cell* **50**, 437–443.
- Lundin, D., Gribaldo, S., Torrents, E., Sjöberg, B.-M., and Poole, A.M. (2010). Ribonucleotide reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol. Biol.* **10**, 383.
- Lutz, R.A., and Kennish, M.J. (1993). Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: A review. *Rev. Geophys.* **31**, 211–242.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., and Brock, T. (2014). *Brock Biology of Microorganisms* (Boston: Pearson).
- Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2013). Archaeology of eukaryotic DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012963.
- Marcelino, L.A., and Thilly, W.G. (1999). Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat. Res.* **434**, 177–203.
- Martin, M.J., Garcia-Ortiz, M.V., Esteban, V., and Blanco, L. (2013). Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Pol μ . *Nucleic Acids Res.* **41**, 2428–2436.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010). Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 89–130.
- Mathews, C.K. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1300–1314.
- Mathews, C.K. (2014). Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 3832–3840.
- Mathews, C.K. (2015). Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 528–539.
- Matsui, I., Urushibata, Y., Shen, Y., Matsui, E., and Yokoyama, H. (2011). Novel structure of an N-terminal domain that is crucial for the dimeric assembly and DNA-binding of an archaeal DNA

- polymerase D large subunit from *Pyrococcus horikoshii*. FEBS Lett. 585, 452–458.
- Matsunaga, F., Norais, C., Forterre, P., and Myllykallio, H. (2003). Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. EMBO Rep. 4, 154–158.
- McDonald, J.P., Vaisman, A., Kuban, W., Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2012). Mechanisms Employed by *Escherichia coli* to Prevent Ribonucleotide Incorporation into Genomic DNA by Pol V. PLOS Genet. 8, e1003030.
- McFadden, G., and Denhardt, D.T. (1974). Mechanism of Replication of ϕ X174 Single-Stranded DNA IX. Requirement for the *Escherichia coli* dnaG Protein. J. Virol. 14, 1070–1075.
- Mertz, T.M., Sharma, S., Chabes, A., and Shcherbakova, P.V. (2015). Colon cancer-associated mutator DNA polymerase δ variant causes expansion of dNTP pools increasing its own infidelity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, E2467-2476.
- Mirkin, S.M. (2008). Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979-1989). Front. Biosci. J. Virtual Libr. 13, 1064–1071.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Holmgren, A., and Pueyo, C. (2001). Expression Analysis of the nrdHIEF Operon from *Escherichia coli* conditions that trigger the transcript level in vivo. J. Biol. Chem. 276, 18031–18037.
- Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S. (2010). Molecular Mechanisms of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems. J. Nucleic Acids 2010.
- Morrison, A., and Sugino, A. (1994). The 3' \rightarrow 5' exonucleases of both DNA polymerases δ and ϵ participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. MGG 242, 289–296.
- Morrison, A., Johnson, A.L., Johnston, L.H., and Sugino, A. (1993). Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 12, 1467–1473.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1, 263–273.
- Munch-Petersen, B., Piskur, J., and Sondergaard, L. (1998). Four deoxynucleoside kinase activities from *Drosophila melanogaster* are contained within a single monomeric enzyme, a new multifunctional deoxynucleoside kinase. J. Biol. Chem. 273, 3926–3931.
- Muroya, A., Tsuchiya, D., Ishikawa, M., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S., and Morikawa, K. (2001). Catalytic center of an archaeal type 2 ribonuclease H as revealed by X-ray crystallographic and mutational analyses. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 10, 707–714.
- Myllykallio, H., Lopez, P., López-García, P., Heilig, R., Saurin, W., Zivanovic, Y., Philippe, H., and Forterre, P. (2000). Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. Science 288, 2212–2215.
- Neuhard, J., and Nygaard, P. (1987). Purines and pyrimidines. *Escherichia Coli Salmonella Typhimurium* Cell. Mol. Biol. Am. Soc. Microbiol. Wash. DC 445–473.
- Nick McElhinny, S.A., and Ramsden, D.A. (2003). Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. Mol. Cell. Biol. 23, 2309–2315.
- Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Kumar, D., Watt, D.L., Lundström, E.-B., Burgers, P.M.J., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2010a). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by

- yeast replicative polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4949–4954.
- Nick McElhinny, S.A., Kumar, D., Clark, A.B., Watt, D.L., Watts, B.E., Lundström, E.-B., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2010b). Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 774–781.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 681–706.
- North, T.W., Bestwick, R.K., and Mathews, C.K. (1980). Detection of activities that interfere with the enzymatic assay of deoxyribonucleoside 5'-triphosphates. *J. Biol. Chem.* *255*, 6640–6645.
- O'Donnell, M., Langston, L., and Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Ohtani, N., Yanagawa, H., Tomita, M., and Itaya, M. (2004). Identification of the first archaeal Type 1 RNase H gene from *Halobacterium* sp. NRC-1: archaeal RNase HI can cleave an RNA-DNA junction. *Biochem. J.* *381*, 795–802.
- Oivanen, M., Kuusela, S., and Lönnberg, H. (1998). Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases. *Chem. Rev.* *98*, 961–990.
- Onesti, S., and MacNeill, S.A. (2013). Structure and evolutionary origins of the CMG complex. *Chromosoma* *122*, 47–53.
- Palud, A., Villani, G., L'Haridon, S., Querellou, J., Raffin, J.-P., and Henneke, G. (2008). Intrinsic properties of the two replicative DNA polymerases of *Pyrococcus abyssi* in replicating abasic sites: possible role in DNA damage tolerance? *Mol. Microbiol.* *70*, 746–761.
- Park, I., and Ives, D.H. (1995). Kinetic mechanism and end-product regulation of deoxyguanosine kinase from beef liver mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* *117*, 1058–1061.
- Patel, P.H., and Loeb, L.A. (2000). Multiple amino acid substitutions allow DNA polymerases to synthesize RNA. *J. Biol. Chem.* *275*, 40266–40272.
- Patel, D.J., Phan, A.T., and Kuryavyi, V. (2007). Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7429–7455.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* *1*, 969–979.
- Pavlov, Y.I., Frahm, C., Nick McElhinny, S.A., Niimi, A., Suzuki, M., and Kunkel, T.A. (2006). Evidence that errors made by DNA polymerase alpha are corrected by DNA polymerase delta. *Curr. Biol. CB* *16*, 202–207.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H., and Kraut, J. (1994). Structures of Ternary Complexes of Rat DNA Polymerase β , a DNA Template-Primer, and ddCTP. *Science* *264*, 1891–1903.
- Perler, F.B., Kumar, S., and Kong, H. (1996). Thermostable DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* *48*, 377–435.
- Perrino, F.W., Harvey, S., Blans, P., Gelhaus, S., Lacourse, W.R., and Fishbein, J.C. (2005). Polymerization past the N2-isopropylguanine and the N6-isopropyladenine DNA lesions with the translesion synthesis DNA polymerases eta and iota and the replicative DNA polymerase alpha. *Chem. Res. Toxicol.* *18*, 1451–1461.
- Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A.P., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 649–658.

- Pommier, Y., Huang, S.-Y., Williams, J., and Kunkel, T. (2015). Topoisomerase-Induced DNA Cleavage at Ribonucleotide Misincorporation Sites. *FASEB J.* *29*, 371.3.
- Rampazzo, C., Ferraro, P., Pontarin, G., Fabris, S., Reichard, P., and Bianchi, V. (2004). Mitochondrial Deoxyribonucleotides, Pool Sizes, Synthesis, and Regulation. *J. Biol. Chem.* *279*, 17019–17026.
- Randerath, K., Reddy, R., Danna, T.F., Watson, W.P., Crane, A.E., and Randerath, E. (1992). Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ³²P-postlabeling. *Mutat. Res.* *275*, 355–366.
- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* *57*, 349–374.
- Reichard, P., Eliasson, R., Ingemarson, R., and Thelander, L. (2000). Cross-talk between the Allosteric Effector-binding Sites in Mouse Ribonucleotide Reductase. *J. Biol. Chem.* *275*, 33021–33026.
- Reyes-Lamothe, R., Nicolas, E., and Sherratt, D.J. (2012). Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 121–143.
- Richardson, T.T., Gilroy, L., Ishino, Y., Connolly, B.A., and Henneke, G. (2013). Novel inhibition of archaeal family-D DNA polymerase by uracil. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4207–4218.
- Rofougaran, R., Vodnala, M., and Hofer, A. (2006). Enzymatically Active Mammalian Ribonucleotide Reductase Exists Primarily as an $\alpha 6\beta 2$ Octamer. *J. Biol. Chem.* *281*, 27705–27711.
- Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2007). DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J. Mol. Biol.* *369*, 343–355.
- Rowen, L., and Kornberg, A. (1978). Primase, the dnaG protein of *Escherichia coli*. An enzyme which starts DNA chains. *J. Biol. Chem.* *253*, 758–764.
- Ruiz, J.F., Juárez, R., García-Díaz, M., Terrados, G., Picher, A.J., González-Barrera, S., Fernández de Henestrosa, A.R., and Blanco, L. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res.* *31*, 4441–4449.
- Rumbaugh, J.A., Murante, R.S., Shi, S., and Bambara, R.A. (1997). Creation and removal of embedded ribonucleotides in chromosomal DNA during mammalian Okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* *272*, 22591–22599.
- Sapp, J. (2005). The Prokaryote-Eukaryote Dichotomy: Meanings and Mythology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 292–305.
- Sarmiento, F., Mrázek, J., and Whitman, W.B. (2013). Genome-scale analysis of gene function in the hydrogenotrophic methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4726–4731.
- Sarmiento, F., Long, F., Cann, I., and Whitman, W.B. (2014). Diversity of the DNA Replication System in the Archaea Domain Archaea. 675946.
- Sauguet, L., Raia, P., Henneke, G., and Delarue, M. (2016). Shared active site architecture between archaeal PolD and multi-subunit RNA polymerases revealed by X-ray crystallography. *Nat. Commun.* *7*, 12227.
- Sayrac, S., Vengrova, S., Godfrey, E.L., and Dalgaard, J.Z. (2011). Identification of a Novel Type of Spacer Element Required for Imprinting in Fission Yeast. *PLoS Genet.* *7*, e1001328.
- Schaaper, R.M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *268*, 23762–23765.

- Schopf, J.W., and Packer, B.M. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70–73.
- Schroeder, J.W., Randall, J.R., Matthews, L.A., and Simmons, L.A. (2015). Ribonucleotides in bacterial DNA. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50, 181–193.
- Shcherbakova, P.V., Pavlov, Y.I., Chilkova, O., Rogozin, I.B., Johansson, E., and Kunkel, T.A. (2003). Unique error signature of the four-subunit yeast DNA polymerase epsilon. *J. Biol. Chem.* 278, 43770–43780.
- Shen, Y., Koh, K.D., Weiss, B., and Storici, F. (2012). Mismatched rNMPs in DNA are mutagenic and are targets of mismatch repair and RNases H. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 98–104.
- Sherman, P.A., and Fyfe, J.A. (1989). Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal. Biochem.* 180, 222–226.
- Smith, M. (1985). In Vitro Mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* 19, 423–462.
- Sparks, J.L., Chon, H., Cerritelli, S.M., Kunkel, T.A., Johansson, E., Crouch, R.J., and Burgers, P.M. (2012). RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair. *Mol. Cell* 47, 980–986.
- Spicer, E.K., Rush, J., Fung, C., Reha-Krantz, L.J., Karam, J.D., and Konigsberg, W.H. (1988). Primary structure of T4 DNA polymerase. Evolutionary relatedness to eucaryotic and other procaryotic DNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 263, 7478–7486.
- Steitz, T.A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 17395–17398.
- Stillman, B. (2005). Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Lett.* 579, 877–884.
- Tadokoro, T., and Kanaya, S. (2009). Ribonuclease H: molecular diversities, substrate binding domains, and catalytic mechanism of the prokaryotic enzymes. *FEBS J.* 276, 1482–1493.
- Thauer, R.K., and Shima, S. (2006). Biogeochemistry: methane and microbes. *Nature* 440, 878–879.
- Torrents, E. (2014). Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Traut, T.W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* 140, 1–22.
- Vaisman, A., Kuban, W., McDonald, J.P., Karata, K., Yang, W., Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2012). Critical amino acids in *Escherichia coli* UmuC responsible for sugar discrimination and base-substitution fidelity. *Nucleic Acids Res.* 40, 6144–6157.
- Vaisman, A., McDonald, J.P., Huston, D., Kuban, W., Liu, L., Van Houten, B., and Woodgate, R. (2013). Removal of misincorporated ribonucleotides from prokaryotic genomes: an unexpected role for nucleotide excision repair. *PLoS Genet.* 9, e1003878.
- Vaisman, A., McDonald, J.P., Noll, S., Huston, D., Loeb, G., Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2014). Investigating the mechanisms of ribonucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 761, 21–33.
- Van de Sande, J.H., Loewen, P.C., and Khorana, H.G. (1972). Studies on polynucleotides. 118. A further study of ribonucleotide incorporation into deoxyribonucleic acid chains by deoxyribonucleic acid polymerase I of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247, 6140–6148.
- Vinogradova, N.G. (1961). Vertical zonation in the distribution of deep-sea benthic fauna in the ocean. *Deep Sea Res.* 1953 8, 245–250.

- Wallace, B.D., and Williams, R.S. (2014). Ribonucleotide triggered DNA damage and RNA-DNA damage responses. *RNA Biol.* *11*, 1340–1346.
- Wardle, J., Burgers, P.M.J., Cann, I.K.O., Darley, K., Heslop, P., Johansson, E., Lin, L.-J., McGlynn, P., Sanvoisin, J., Stith, C.M., *et al.* (2008). Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the *Archaea*, not occurring with *Bacteria* and *Eukarya*. *Nucleic Acids Res.* *36*, 705–711.
- Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltrout, M.E., D'Souza, S., Woodruff, R.V., and Walker, G.C. (2009). Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *73*, 134–154.
- White, M.F. (2011). Homologous recombination in the *Archaea*: the means justify the ends. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 15–19.
- Williams, J.S., Clausen, A.R., Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Johansson, E., and Kunkel, T.A. (2012). Proofreading of ribonucleotides inserted into DNA by yeast DNA polymerase ϵ . *DNA Repair* *11*, 649–656.
- Williams, J.S., Smith, D.J., Marjavaara, L., Lujan, S.A., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2013). Topoisomerase 1-mediated removal of ribonucleotides from nascent leading-strand DNA. *Mol. Cell* *49*, 1010–1015.
- Williams, J.S., Clausen, A.R., Lujan, S.A., Marjavaara, L., Clark, A.B., Burgers, P.M., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2015). Evidence that processing of ribonucleotides in DNA by topoisomerase 1 is leading-strand specific. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 291–297.
- Williams, J.S., Lujan, S.A., and Kunkel, T.A. (2016). Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 350–363.
- Willing, A., Follmann, H., and Auling, G. (1988). Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. *Eur. J. Biochem.* *170*, 603–611.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4576–4579.
- Yamtich, J., and Sweasy, J.B. (2010). DNA Polymerase Family X: Function, Structure, and Cellular Roles. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 1136–1150.
- Yang, G., Franklin, M., Li, J., Lin, T.-C., and Konigsberg, W. (2002). A conserved Tyr residue is required for sugar selectivity in a Pol alpha DNA polymerase. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 10256–10261.
- Yao, N.Y., Schroeder, J.W., Yurieva, O., Simmons, L.A., and O'Donnell, M.E. (2013). Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12942–12947.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H., and Scholz, I. (1980). The *Sulfolobus* “*Caldariella*” group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch. Microbiol.* *125*, 259–269.
- Biochimie (7^o Éd.) Berg Jeremy, Tymoczko John, Stryer Lubert.

Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et ribonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssi*

Dans les trois domaines du vivant, que constituent les bactéries, les eucaryotes et les archées, une molécule a la capacité souveraine de gouverner la vie, la mère à l'origine de tous les mécanismes biologiques, l'ADN. S'il est évident de dire que le maintien de l'intégrité des génomes est essentiel à la vie, il existe deux systèmes qui le permettent, la réplication et la réparation de l'ADN. La fidélité de ces derniers est finement influencée par la disponibilité (ratio et balance) des précurseurs nucléotidiques désoxyribonucléotides (dNTPs) et ribonucléotides (rNTPs) au cours du cycle cellulaire. Même si la concentration intracellulaire en nucléotides est largement documentée chez les eucaryotes et les bactéries, ça n'est malheureusement pas le cas chez les archées. En ce qui concerne l'étude de la maintenance génomique, un groupe d'archées a intéressé les chercheurs de par leurs capacités à survivre dans des milieux dits extrêmes. *Pyrococcus abyssi* est l'une d'entre elles qui depuis de nombreuses années sert de modèle biologique pour répondre aux questions de la stabilité de l'ADN à haute température. Cette étude est centrée sur cette thématique et particulièrement sur les caractéristiques fonctionnelles des ADN polymérases: PolD, PolB et le complexe p41/p46. Initialement, le contenu en nucléotides a été évalué dans des cellules en phase exponentielle de croissance par la technique de chromatographie couplée à une double détection en spectrométrie de masse (zichILIC-MS-MS). Les résultats montrent que le contenu en rNTPs est de 20 fois supérieur à celui en dNTPs. Pour cette raison, la discrimination sélective des dNTPs par les ADN polymérases est mise à l'épreuve. Même si, des mécanismes permettent d'exclure les rNMPs durant la synthèse de l'ADN, de récentes études ont montrées que des rNMPs étaient incorporés par des ADN pols. Ainsi, le ratio en nucléotides obtenu a été utilisé pour l'analyse de son effet sur la synthèse d'ADN par les ADN Pols et les extraits cellulaires de *P. abyssi*. Les résultats démontrent clairement que les rNMPs sont incorporés par l'ADN polymérase PolD. Puis, les conséquences de la présence des rNMPs dans l'ADN sur la réplication ont été étudiées et ont mis en évidence que les extraits cellulaires, tout comme les ADN Pols de *P. abyssi* étaient capables de « passer » un rNMP présent dans l'ADN. Pour finir, une étude de l'incorporation préférentielle de chaque dNMP et rNMP a été menée démontrant que la complémentarité des bases était respectée même lors de l'incorporation de rNMPs. Enfin, la caractérisation de la petite sous-unité, DP1, de PolD a permis de montrer sa capacité à retirer des rNMPs grâce à son activité de relecture, suggérant un premier repart à la présence de rNMPs dans l'ADN. Pour conclure, ces résultats montrent que la présence de rNMPs dans l'ADN est un phénomène conservé dans les trois domaines du vivant.

Mots clefs: contenu en nucléotides, Archée, ADN polymérases, ribonucléotide, maintenance génomique

Influence of desoxyribonucleotides and ribonucleotides concentrations on the genome integrity in *Pyrococcus abyssi*

In the three domains of life that include *Bacteria*, *Eukarya* and *Archaea*, one molecule has the sovereign ability to govern life, and not the least one, the mother of all biological mechanisms, DNA. Maintaining the integrity of genomes is obviously essential for life, and faithful DNA replication and repair are the guarantees. The fidelity of these two processes may vary depending on the availability and levels (balance and ratio) of deoxyribonucleotides (dNTPs) and ribonucleotides (rNTPs) during the cell-cycle. Even if intracellular concentration of nucleotides is largely documented in *Eukarya* and *Bacteria*, it remains limited in *Archaea*. From many years one group of *Archaea* is of great interest for studying genomic maintenance, because of its ability to survive in extremes environments. *Pyrococcus abyssi* is one of them that is used as biological model for deciphering the stability of DNA at elevated temperature in LM2E. The present work focuses on genomic integrity and particularly on the functional characterization of the three DNA polymerases: PolD, PolB and the p41/p46 complex. Initially, the nucleotide pool has been evaluated in exponentially growing cells using the highly sensitive method that combined chromatography and mass spectrometry (zichILIC-MS-MS). The results show that rNTPs content is 20-fold higher than dNTPs. For that reason, fidelities of DNA polymerases are challenged to select the correct dNTP over the most abundant rNTP during DNA synthesis. Despite the fact that some mechanisms allow the exclusion of rNTPs from entry to the Pol active site, recent findings indicate that ribonucleotides are incorporated by different DNA Pols with surprisingly high frequency. In this work, the obtained intracellular balance and ratio of rNTPs and dNTP have been used to analyze their effect on DNA synthesis by *P. abyssi* DNA Pols and cell-free extracts. Our results clearly demonstrate that rNTP incorporation is detectable with distinct efficiencies among DNA pols. Secondly, the consequences of the presence of rNMPs in a DNA template on DNA polymerisation has been examined and highlights that cell-free extracts are able to bypass a single rNMP as well as replicative DNA polymerases. To strengthen that study, single nucleotide incorporation opposite rNMP or dNMP has been carried out and the results demonstrate that replicative *Pyrococcus abyssi* DNA Pols can base-pair the complementary rNTPs opposite dNMPs, and vice-versa, the complementary dNTPs opposite rNMPs. Furthermore, the preliminary results obtained about the nucleolysis activities of the PolD small subunit, DP1, show that the DNA polymerase D is able to remove rNMPs from a DNA strand, suggesting a first level of protection against ribonucleotide contamination of DNA. Definitely, these data indicate that the presence of transient embedded rNMPs in genomic DNA represents a universally conserved phenomenon across *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*.

Key words: nucleotide pool, Archaea, DNA polymerases, ribonucleotide, genomic maintenance