

**Thèse de doctorat**

Ecole doctorale Gènes Génomes Cellules (n°426)

CEA Saclay/DSV/iBiTec-S/SBiGeM/Laboratoire Protéasome et ADN

Présentée par

**Julie MEURISSE**

Le 18 septembre 2012

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Spécialité Biologie moléculaire et biochimie

**Etudes fonctionnelles et biophysiques de Hug1 ; une protéine  
intrinsèquement désordonnée impliquée dans le métabolisme des  
nucléotides**

Membres du Jury :

Dr BOITEUX Serge

Rapporteur

Dr CHABOUTÉ Marie Édith

Rapporteur

Pr SOMMER Suzanne

Présidente du jury

Dr LEPOIVRE Michel

Examineur

Dr PEYROCHE Anne

Examinatrice, Directrice de thèse



Thèse effectuée au CEA de Saclay

Département des sciences du vivant (DSV)

Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTec-S)

Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (SBIGeM)

Laboratoire Protéasome et ADN (LPA)

Bâtiment 144 point courrier n°22

91191 GIF SUR YVETTE Cedex



## Résumé :

---

Face aux agressions constantes que subit l'ADN, les cellules ont développé des mécanismes de protection, nommés checkpoints pour maintenir l'intégrité de leur génome. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la kinase Rad53 joue un rôle central dans ces voies et son activation conduit à de nombreux effets cellulaires tels que le ralentissement du cycle cellulaire, le ralentissement de la réplication, l'activation de la transcription de certains gènes, l'activation de la réparation... Lors d'un crible transcriptomique, utilisant une souche exprimant une forme hyperactive de Rad53, nous avons identifié le gène *HUG1* comme l'un des gènes les plus transcrits suite à l'activation de la voie RAD53. Cependant les fonctions de Hug1 demeurent énigmatiques.

Pour mieux comprendre les fonctions de Hug1 dans la réponse aux dommages de l'ADN, nous avons recherché ses partenaires physiques et avons identifié les protéines Rnr2 et Rnr4, les deux composants de la petite sous-unité de la Ribonucléotide Réductase (RNR). La RNR est un complexe enzymatique qui catalyse l'étape limitante de synthèse des nucléotides. Nous avons alors cherché à caractériser cette interaction par diverses méthodes. Nous avons ainsi montré que Hug1 est une protéine intrinsèquement désordonnée capable d'interagir physiquement avec la petite sous-unité de la RNR et qu'au moins onze acides aminés de Hug1 sont impliqués dans son interaction avec la RNR. Lors de nos investigations, nous avons observé que le fait d'étiqueter Rnr2 en position C-terminale sensibilisait les souches aux stress génotoxiques et que cette sensibilité était supprimée si on abrogeait la fonction de *HUG1*, faisant de Hug1 un nouvel inhibiteur de la RNR. Ainsi nous sommes parvenus à proposer un modèle de régulation de la RNR par Hug1.

Mots clés : *HUG1*, Ribonucléotide réductase, Protéine intrinsèquement désordonnée, *Saccharomyces cerevisiae*, réponses aux dommages de l'ADN.

## ***Hug1, an intrinsically disordered protein involved in nucleotide metabolism ; functional and biophysical insights.***

### ***Abstract :***

---

To maintain genome integrity, cells have developed protection mechanisms, called checkpoints, in response to DNA damage insults. In *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 protein kinase is one of the major actors in these mechanisms, and its activation triggers several cellular responses such as cell cycle delay, replication delay, transcription modifications, activation of DNA repair pathways... Using an hyperactivative allele of *RAD53*, we identified *HUG1*, as one of the most induced gene in a transcriptomic analysis upon *RAD53* pathway activation. However Hug1's functions remains elusive.

To better understand Hug1's functions in DNA damage response, we searched for physical partners and identified Rnr2 and Rnr4 proteins, which are the two small subunits of Ribonucleotide Reductase (RNR). The RNR is an enzymatic complex that catalyses nucleotide reduction, a step limiting for dNTPs synthesis. We next experimentally tackled the Hug1-RNR interaction using various methods. We showed so that Hug1 is a small intrinsically disordered protein able to interact physically with the small RNR subunit and that at least eleven amino acids in Hug1 are involved in this interaction. During our investigations, we observed that C-terminal tagging of Rnr2 sensitizes strains to genotoxics stress and that this sensitivity was suppressed when *HUG1*'s function is abrogated. Hence, we showed that Hug1 is a negative RNR regulator and propose a model for Hug1's function.

Keywords : *HUG1*, Ribonucleotide Reductase, Intrinsically Disordered Protein, *Saccharomyces cerevisiae*, DNA damage response.







*A mes Grands Pères*



## Abréviations

---

3-AT :	3-Amino-1,2,4-Triazole
4NQO :	4-Nitroquinoline 1-oxide
AcLi :	Acétate de Lithium
AD :	Activating Domain
ADN :	Acide DeoxiriboNucléique
AmpR :	Ampicilline Résistant
ARN :	Acide RiboNucléique
ATM :	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR :	ATM and Rad3 Related
BER :	Base Excision Repair
BSA :	Bovine Serum Albumine
CDK :	Cycline Dependant Kinase
CDKI :	CDK inhibitor
Ct :	Cycle Treshold
Da :	Dalton
DBD :	DNA Binding Domain
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
dNTP :	DéoxyriboNucléotide Triphosphate
DO :	Densité Optique
DTT :	Dithiothreitol
EDC :	1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA :	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
FACS :	Fluorescence Activated Cell Sorting
FHA :	Forkhead-Associated
G1/G2 :	Gap 1/2
GFP :	Green Fluorescent Protein
GSH :	Glutathione
GST :	Glutathione S-Transferase
HDAC :	Histone DeACetylase
HR :	Homologous Recombination
HRP :	Horseradish Peroxidase
HSQC :	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HT :	High Tension
HU :	HydroxyUrée
IDP :	Intrinsically Disordered Protein
IPTG :	Isopropyl –D-1-thiogalactopyranoside
KanR :	Kanamycine Résistant
Kav :	Coefficient de partage
Kd :	Constante de dissociation
M :	Mitosis
MES :	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MMR :	Mismatch Repair
MMS :	Methyl Methanesulfonate
MWCO :	Molecular Weight Cut Off

NaAc :	Sodium Acétate
NDP :	Ribonucléotide Diphosphate
NER :	Nucleotide Excision Repair
NHEJ :	Non Homologous End Joining
NHS :	N-hydroxysuccinimide
Ni-NTA :	Nikel NitriloTriacetic Acid
NO :	Monoxyde d'azote
NOESY :	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NORF :	Nonannotated Open Reading Frame
NTP :	Ribonucléotide Triphosphate
ORF :	Open Reading Frame
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCI :	Phenol Chloroform Isoamyl
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEG :	Polyethylen Glycol
PI :	Propidium Iodide
PM :	Poids Moléculaire
qPCR :	quantitative PCR
RAD53-DL :	RAD53-Dominant Létal
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RNR :	Ribonucleotide Reductase
RPA :	Replication Protein A
RT :	Reverse Transcriptase
RU :	Response Unit
S :	Synthesis
SPR :	Surface Plasmonique de Résonance
TCA :	TriChloroacetic acid
TE :	Tris-EDTA
tetO :	tetracycline operator
TEV :	Tobacco Etch Virus
TOCSY :	Total Correlation Spectroscopy
UAS :	Upstream Activating Sequence
uDO :	unités de Densité Optique
URS :	Upstream Repressing Sequence
UV :	Ultraviolet
WT :	Wild Type



## **Table des matières**

---

<b>RESUME :</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT :</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>21</b>
<b>PARTIE 1 : PRELUDE</b>	<b>23</b>
<b>1. L'ADN : SUPPORT DE L'INFORMATION GENETIQUE</b>	<b>23</b>
<b>2. LE CYCLE CELLULAIRE</b>	<b>24</b>
<b>PARTIE 2 : LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>26</b>
<b>1. LE POINT DE DEPART : LES DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>27</b>
<b>2. UNE VOIE DE TRANSDUCTION DU SIGNAL...</b>	<b>29</b>
2.1. LA RECONNAISSANCE DU DOMMAGE	30
2.2. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL	33
2.3. LES KINASES EFFECTRICES	34
2.4. RAD53 UNE KINASE CLE	35
<b>3. ... AUX MULTIPLES EFFETS</b>	<b>38</b>
3.1. LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE	38
3.2. LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DE CERTAINS GENES	40
3.3. L'ACTIVATION DE LA REPARATION	42
3.4. LA MORT CELLULAIRE	42
<b>4. L'INACTIVATION DES CHECKPOINTS</b>	<b>43</b>
<b>5. LES PATHOLOGIES LIEES A UN DEFAUT DE LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>45</b>
<b>PARTIE 3 : LA REGULATION DU POOL DE NUCLEOTIDES</b>	<b>48</b>
<b>1. UNE REGULATION CRITIQUE</b>	<b>48</b>
<b>2. LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE</b>	<b>49</b>
2.1. UN COMPLEXE CONSERVE AU COURS DE L'EVOLUTION	50
2.2. TROIS CLASSES DE RNR	51
2.2.1. UN MODE DE FONCTIONNEMENT COMMUN	51
2.2.2. LEURS PARTICULARITES	51
2.2.3. APARTE SUR LES RNRs DE CLASSE I	52
<b>3. LE CAS PARTICULIER DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE</b>	<b>54</b>
<b>4. UNE ENZYME HYPER REGULEE</b>	<b>55</b>
4.1. ALLOSTERIQUEMENT	55
4.2. TRANSCRIPTIONNELLEMENT	58

4.2.1. AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE	58
4.2.2. EN REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN	58
<b>4.3. ET AUTREMENT</b>	<b>61</b>
4.3.1. REGULATION DE LA STABILITE DES SOUS-UNITES	61
4.3.2. REGULATION DE LA COMPARTIMENTATION SUB-CELLULAIRE DES SOUS-UNITES	62
4.3.3. INHIBITION PAR DES INHIBITEURS PROTEIQUES	62
4.3.4. INHIBITION PAR DES INHIBITEURS NON PROTEIQUES	64
<b>PARTIE 4 : LES PROTEINES INTRINSEQUEMENT DESORDONNEES</b>	<b>64</b>
<b>1. LE PARADIGME STRUCTURE-FONCTION</b>	<b>65</b>
<b>2. LA DECOUVERTE DES IDPS</b>	<b>66</b>
2.1. LES PREMIERES EXCEPTIONS	66
2.2. DEFINITION D'UNE IDP	66
<b>3. LES CARACTERISTIQUES DES IDPS</b>	<b>67</b>
3.1. UNE SEQUENCE PRIMAIRE PARTICULIERE	67
3.2. DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES SURPRENANTES	69
3.3. QUEL(S) AVANTAGE(S) A ETRE DESORDONNE ?	69
<b>4. DES PROTEINES AU CŒUR DES RESEAUX FONCTIONNELS</b>	<b>71</b>
<b>CHAPITRE II : A LA RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTEURS DE LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>75</b>
<b>PARTIE 1 : L'ALLELE RAD53-DL</b>	<b>77</b>
<b>1. UN ALLELE MIMETIQUE</b>	<b>77</b>
<b>2. DES SUPPRESSEURS MULTICOPIES</b>	<b>78</b>
<b>3. DES INTERACTANTS GENETIQUES</b>	<b>79</b>
<b>4. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE</b>	<b>80</b>
<b>PARTIE 2 : HUG1</b>	<b>83</b>
<b>1. DE NORF A ORF</b>	<b>83</b>
<b>2. CINQ GÈNES UNE FAMILLE</b>	<b>85</b>
2.1. SML1 (SUPPRESSOR OF MEC1 LETALITY)	86
2.2. SPD1 (S-PHASE DELAYED)	87
2.3. DIF1 (DAMAGE-REGULATED IMPORT FACILITATOR)	89
<b>3. HYPOTHESES DE LA FONCTION DE HUG1</b>	<b>91</b>
<b>CHAPITRE III : DE LA GENETIQUE A LA BIOPHYSIQUE DE HUG1</b>	<b>95</b>
<b>PARTIE 1 : LES REGULATIONS DE HUG1</b>	<b>97</b>
<b>1. QUEL(S) PHENOTYPE(S) POUR HUG1 ?</b>	<b>97</b>
<b>2. UNE REGULATION EN REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>99</b>
2.1. AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL	99
2.2. AU NIVEAU POST-TRANSCRIPTIONNEL	101

<b>2.3. AU NIVEAU SUBCELLULAIRE</b>	<b>102</b>
<b>3. UNE REGULATION AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE</b>	<b>103</b>
<b>PARTIE 2 : HUG1 EST UNE PROTEINE INTRINSEQUEMENT DESORDONNEE</b>	<b>107</b>
<b>1. PREDICTION DE STRUCTURE ET DE DESORDRE</b>	<b>107</b>
<b>2. ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION</b>	<b>108</b>
<b>3. ANALYSES PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE</b>	<b>109</b>
3.1. PRINCIPE ET APPLICATIONS	109
3.2. UN SPECTRE DE PROTEINE DESORDONNEE	112
3.3. UN PROFIL TYPIQUE D'UNE IDP	113
<b>4. CONFIRMATION PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE</b>	<b>114</b>
4.1. PRINCIPE ET APPLICATIONS	114
4.2. UNE PROTEINE TOTALEMENT DESORDONNEE	115
<b>PARTIE 3 : A LA RECHERCHE DE PARTENAIRES PHYSIQUES</b>	<b>119</b>
<b>5. ELABORATION D'UN CRIBLE DOUBLE HYBRIDE A GRANDE ECHELLE</b>	<b>119</b>
5.1. PRINCIPE GENERAL	119
5.2. MISE AU POINT DU CRIBLE	119
5.3. REALISATION DU CRIBLE UTILISANT GAL4DBD-HUG1 COMME APPAT	121
<b>6. PETIT APARTE SUR DNA2</b>	<b>123</b>
6.1. INTRODUCTION	123
6.2. ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE HUG1 ET DNA2	127
<b>CHAPITRE IV : ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE HUG1 ET LA RNR</b>	<b>131</b>
<b>PARTIE 1 : UNE INTERACTION PHYSIQUE AVEC LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE</b>	<b>133</b>
<b>1. ET LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE ?</b>	<b>133</b>
<b>2. ETUDES DE L'INTERACTION PHYSIQUE ENTRE HUG1 ET RNR2</b>	<b>134</b>
2.1. MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION IN VIVO PAR IMMUNOPRECIPITATION	134
2.2. TESTS MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION IN VITRO	135
2.2.1. PAR GST-PULL DOWN	135
2.2.2. PAR SURFACE PLASMONIQUE DE RESONANCE	136
2.2.3. PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	139
<b>PARTIE 2 : CARACTERISATION DE LA SURFACE D'INTERACTION</b>	<b>143</b>
<b>1. PAR DOUBLE HYBRIDE</b>	<b>143</b>
<b>2. PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE</b>	<b>146</b>
<b>PARTIE 3 : ETUDES BIOPHYSIQUE DU MUTANT HUG1GY</b>	<b>148</b>
<b>1. ANALYSE DU PROFIL DE CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION</b>	<b>148</b>
<b>2. PAS DE MODIFICATION DU SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE</b>	<b>149</b>
<b>PARTIE 4 : COMPARAISON DES FONCTIONS DE DIF1 ET HUG1</b>	<b>150</b>



<b>1. DEUX DOMAINES HUG</b>	<b>150</b>
<b>2. RELOCALISATION DE LA PETITE SOUS-UNITE</b>	<b>152</b>
<b>3. DECOUVERTE D'UN NOUVEAU PHENOTYPE POUR LA DELETION DE HUG1</b>	<b>154</b>
<b>CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS</b>	<b>161</b>
<b>PARTIE 1 : HUG1 EST UN NOUVEAU REGULATEUR DE LA RNR</b>	<b>163</b>
<b>1. HUG1 EST UNE PROTEINE INTRINSEQUEMENT DESORDONNEE....</b>	<b>163</b>
<b>2. ... QUI INTERAGIT PHYSIQUEMENT ET GENETIQUEMENT AVEC LA RNR</b>	<b>164</b>
<b>PARTIE 2 : PROPOSITION D'UN MODELE DE FONCTIONNEMENT DE HUG1</b>	<b>166</b>
<b>PARTIE 3 : DE NOUVELLES PERSPECTIVES DANS LA REGULATION DES REPONSES AUX DOMMAGES DE L'ADN</b>	<b>168</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>171</b>
<b>SOUCHES ET PLASMIDES</b>	<b>173</b>
<b>1. MANIPULATION DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE</b>	<b>173</b>
<b>2. SOUCHES BACTERIENNES</b>	<b>174</b>
<b>3. PLASMIDES</b>	<b>174</b>
<b>ANALYSES PHENOTYPIQUES</b>	<b>175</b>
<b>EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	<b>176</b>
<b>1. EXTRACTIONS D'ADN</b>	<b>176</b>
<b>1.1. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE ET GENOMIQUE A PARTIR DE CULTURE DE LEVURE</b>	<b>176</b>
<b>1.2. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE A PARTIR DE CULTURES DE E.COLI</b>	<b>176</b>
<b>2. EXTRACTION D'ARN A PARTIR DE CULTURES DE LEVURE</b>	<b>176</b>
<b>TRANSCRIPTION INVERSE-PCR QUANTITATIVE</b>	<b>177</b>
<b>1. TRANSCRIPTION INVERSE</b>	<b>177</b>
<b>2. PCR QUANTITATIVE</b>	<b>177</b>
<b>EXTRACTIONS PROTEIQUES DENATURANTES A PARTIR DE CULTURE DE LEVURE</b>	<b>177</b>
<b>WESTERN BLOT</b>	<b>178</b>
<b>1. GEL POLYACRYLAMIDE</b>	<b>178</b>
<b>2. TRANSFERT SUR MEMBRANE</b>	<b>178</b>
<b>3. REVELATION</b>	<b>178</b>
<b>DOUBLE HYBRIDE</b>	<b>179</b>
<b>1. CRIBLE A GRANDE ECHELLE</b>	<b>179</b>
<b>2. IDENTIFICATION DES CLONES</b>	<b>180</b>

<b>3. EXTRACTION DES « PLASMIDES PROIES »</b>	<b>181</b>
<b>4. TESTS DIRIGES</b>	<b>181</b>
ETUDES DU CYCLE CELLULAIRE	181
<b>1. SYNCHRONISATION A L'<math>\alpha</math>-FACTOR</b>	<b>181</b>
<b>2. SYNCHRONISATION AU NOCODAZOLE</b>	<b>182</b>
<b>3. ANALYSES PAR FACS (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING)</b>	<b>182</b>
IMMUNOFLUORESCENCE	182
PRODUCTION ET PURIFICATION PROTEIQUE	183
<b>1. HUG1</b>	<b>183</b>
1.1. PRODUCTION DE HUG1 RECOMBINANTE NON MARQUEE DANS E. COLI	183
1.2. PRODUCTION DE HUG1 RECOMBINANTE MARQUEE DANS E. COLI	183
1.3. PURIFICATION DE HUG1	183
<b>2. RNR2 ET RNR2-RNR4</b>	<b>184</b>
2.1. PRODUCTION DE RNR2 OU RNR2-RNR4 DANS E. COLI	184
2.2. PURIFICATION DE RNR2	185
2.3. PURIFICATION DE RNR2-RNR4	185
PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX	186
ANALYSES BIOPHYSIQUES DE HUG1	186
<b>1. DICHROÏSME CIRCULAIRE</b>	<b>186</b>
<b>2. ANALYSE PAR FILTRATION SUR GEL</b>	<b>187</b>
<b>3. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE</b>	<b>187</b>
3.1. ACQUISITION DES SPECTRES	187
3.2. ATTRIBUTION DES PICS	187
3.3. CALCUL DES INDICES DE DEPLACEMENT CHIMIQUE	190
ETUDES DE L'INTERACTION HUG1-RNR	190
<b>1. GST PULL-DOWN</b>	<b>190</b>
1.1. COEXPRESSISON DE HUG1 ET RNR2	190
1.2. CO-LYSE DE HUG1 ET RNR2 OU RNR2-RNR4	190
<b>2. ANALYSE PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (BIACORE®)</b>	<b>191</b>
2.1. AVEC IMMOBILISATION D'ANTICORPS ANTI-GST	191
2.2. AVEC IMMOBILISATION DE RNR2-RNR4	191
<b>3. RMN : TITRATION PAR RNR2-RNR4</b>	<b>191</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>193</b>
REMERCIEMENTS.	212





*Chapitre I :*  
*Introduction Générale*



---

## ***PARTIE 1 : Prélude***

---

### ***1. L'ADN : support de l'information génétique***

---

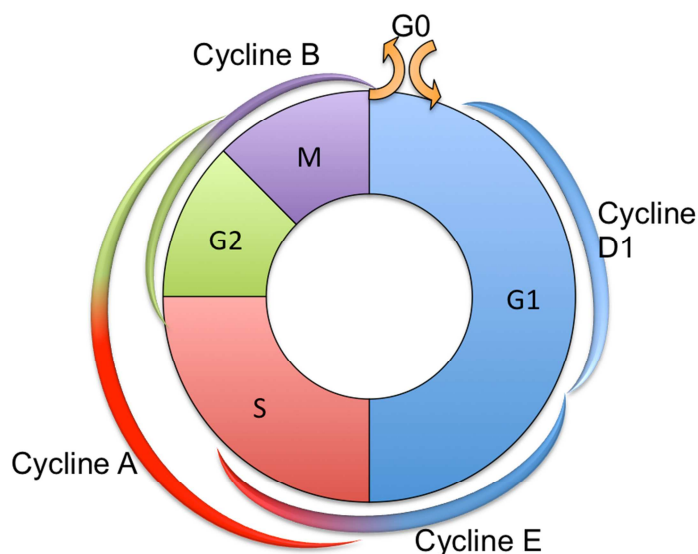
Aujourd'hui tout le monde a déjà entendu parler d'ADN (Acide Désoxyribonucléique), entre thérapie génique et police scientifique, mais qu'est-ce que vraiment l'ADN ? Pour cela il faut faire un peu d'histoire.

L'ADN est intimement lié à la génétique, toutefois la notion de génétique est antérieure à la découverte de l'ADN. La génétique est née en 1865 lorsque Gregor Mendel découvrit les lois de l'hérédité (Mendel, 1865) avec ses expériences sur les pois. L'ADN fut découvert quelques années plus tard, en 1869, par Friedrich Miescher (Dahm, 2005). Ce dernier fut le premier à précipiter l'ADN qu'il nomma nucléine car cette dernière était présente dans le noyau des cellules eucaryotes. A cette époque les théories sur la nucléine vont bon train ; stockage du phosphore dans la cellule, précurseur de la génération d'autres molécules telles que la lecithine... (Dahm, 2008), mais d'aucun ne vient l'idée que l'ADN puisse être le vecteur de l'hérédité. Plus tard Kossel détermina les constituants de l'ADN ; des bases puriques ou pyrimidiques, un sucre et un phosphate. Ce n'est qu'en 1944 que Oswald Avery, Colin McLeod et Maclyn McCarty montrèrent que l'ADN était le porteur de l'information génétique et non les protéines. C'est en travaillant sur une *Pneumococcus* de type III, qu'ils ont isolé une « substance de transformation » associée avec la fraction d'acide désoxyribonucléique (Dahm, 2008; Lederberg, 1994; McCarty, 1946). Cette observation fut confirmée plus tard par Alfred Hershey et Martha Chase (Hershey and Chase, 1952) Après cette découverte fondamentale, bien des questions subsistaient telles que ; comment cette information est-elle stockée, comment peut-elle être transmise à chaque cellule au cours de la division ? La détermination de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953, permit de répondre à bon nombre de ces questions mais également signa l'essor d'une nouvelle discipline de la biologie ; la génétique moléculaire ou comment fonctionne l'ADN. De nos jours il est clair que l'ADN joue un rôle primordial dans la transmission de l'information génétique et le maintien de son intégrité en est d'autant plus important.

## 2. Le cycle cellulaire

Il est important pour les cellules d'assurer leur propre fonctionnement et la propagation de leur information génétique. Au cours de sa vie, la cellule suit un rythme de croissance et de développement aboutissant à sa division pour donner deux cellules filles génétiquement identiques. Ce rythme que suivent les cellules est nommé cycle cellulaire. C'est un procédé ubiquitaire, complexe, impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire, le développement de l'organisme, la régulation de la réparation des dommages de l'ADN (voir partie 2) et les maladies telles que le cancer (Schafer, 1998; Schwartz and Shah, 2005).

Ce cycle cellulaire se décompose en quatre phases se succédant toujours dans le même ordre : G1 (Gap1), S (Synthèse), G2 (Gap2) et M (Mitose) (Figure I1). Les phases G1 et G2 permettent de préparer la cellule à deux mécanismes majeurs qui sont la synthèse de l'ADN et la mitose (Alberghina et al., 2012; Finn et al., 2011; Schafer, 1998). Toutefois les cellules ont la possibilité de sortir de ce cycle cellulaire pour se placer dans un état de quiescence également nommé G0 (Schafer, 1998; Schwartz and Shah, 2005).



**Figure I 1 : Représentation schématique du cycle cellulaire**

Les différentes phases G1 (Gap 1), S (Synthesis), G2 (Gap 2) et M (Mitosis). Les cellules ont la possibilité de sortir de ce cycle pour aller dans la phase G0. Quand les cellules sont en G0, un stimuli peut leur permettre de re-renter dans le cycle en G1. Autour des différentes phases du cycle est symbolisé la cinétique d'expression des différentes cyclines chez les mammifères. D'après Schafer 1998 et Friedberg et al. 2006.



Les réelles avancées sur le cycle cellulaire ont été rendues possibles par les travaux de Hartwell qui isola les mutants *cdc* (cell division cycle), qui n'étaient autre que des mutants arrêtant leur division à une étape précise du cycle cellulaire (Hartwell, 1991). Les phénotypes de ces mutants *cdc*, ont permis de mettre en avant le fait que l'exécution de l'évènement suivant du cycle n'est rendu possible que si l'évènement précédent s'est achevé, et que l'ordre des différentes phases du cycle cellulaire étaient le résultat de l'ordre de fonctionnement du produit des gènes *CDC* (Hartwell, 1991). Ses travaux sur le cycle cellulaire lui valurent un prix Nobel de médecine en 2001 avec Hunt et Nurse (Doree, 2001).

La progression des cellules à travers le cycle cellulaire chez les eucaryotes apparait donc comme étant une cascade d'évènements chacun dépendant de celui qui le précède. Ce déroulement est rendu possible par de nombreuses CDKs (Cyclin Dependent Kinases) qui, lorsqu'elles se trouvent en complexes avec des protéines cyclines, conduisent la cellule à avancer dans le cycle cellulaire (Alberghina et al., 2012; Bloom and Cross, 2007; Schafer, 1998; Schwartz and Shah, 2005). Les CDKs sont des sérines/thréonines kinases qui sont activées à des moments spécifiques du cycle cellulaire (Bloom and Cross, 2007; Schafer, 1998). Elles jouent un rôle critique dans la progression du cycle cellulaire puisque leur inactivation empêche la mitose (Parker and Piwnicaworms, 1992; van den Heuvel and Harlow, 1993). Les cyclines elles, voient leur expression varier au cours du cycle cellulaire, et ce profil d'expression spécifique définit le stade du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule (Figure I1) (Darzynkiewicz et al., 1996). Du fait de l'expression cyclique des cyclines, les CDKs se trouvent activées uniquement à un temps spécifique du cycle cellulaire. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une seule CDK ; Cdc28 (homologue de Cdk1 chez les mammifères) s'associe avec de multiples cyclines pour réguler le cycle cellulaire (Bloom and Cross, 2007; Finn et al., 2011). L'expression cyclique des cyclines est due à la régulation de leur dégradation. En effet, ces dernières possèdent des séquences PEST, c'est-à-dire des régions riches en P (proline), E (glutamate), S (sérine) et T (thréonine) qui sont les cibles d'ubiquitylation en vue de leur dégradation par le protéasome à un temps spécifique (Bloom and Cross, 2007; Schafer, 1998). Il existe également des inhibiteurs des CDKs (les CDKIs), qui eux-mêmes voient leur dégradation régulée de manière ubiquitine-dépendante (Bloom and Cross, 2007). De manière générale, avant que la cellule n'entre dans une nouvelle phase du

cycle cellulaire, la cycline de la phase précédente est dégradée tandis que celle de la phase à venir est synthétisée.

Les CDKs une fois activées sont capables de phosphoryler de multiples substrats (par exemples les lamines chez les mammifères et les microtubules) qui par la suite catalysent le processus de division cellulaire (Finn et al., 2011; Schafer, 1998).

Au cours du cycle cellulaire, il existe des points de contrôle nommés checkpoints qui permettraient la dépendance de chaque évènement du cycle à celui qui lui précède (Hartwell, 1991; Hartwell and Weinert, 1989). Le concept de checkpoint vient de l'observation que certains gènes sont requis pour coordonner la progression du cycle cellulaire quand l'évènement amont n'est pas encore terminé ou que des dommages préjudiciables pour la division cellulaire sont présents (Nurse et al., 1998). Ainsi la mitose est dépendante de la synthèse totale de l'ADN et le cycle cellulaire s'arrêtera temps que la réplication ne sera pas complète sauf si on inactive le checkpoint de la mitose : *RAD9* (Hartwell and Weinert, 1989). Les dommages de l'ADN activent les checkpoints ayant pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire (voir partie 2), et l'arrêt sera effectif tant que le défaut ne sera pas corrigé (Nurse et al., 1998; Schafer, 1998). Un arrêt en G1 permettra de réparer l'ADN avant la réplication de ce dernier, alors qu'un arrêt en G2 permettra la réparation avant la séparation des chromosomes lors de la mitose (Schafer, 1998). Les checkpoints sont désormais considérés comme des voies de transduction du signal assurant la coordination des différentes voies de réponses (arrêt ou ralentissement du cycle cellulaire, activation de la réparation, activation de la transcription de certains gènes, mort cellulaire chez les eucaryotes supérieurs ...)

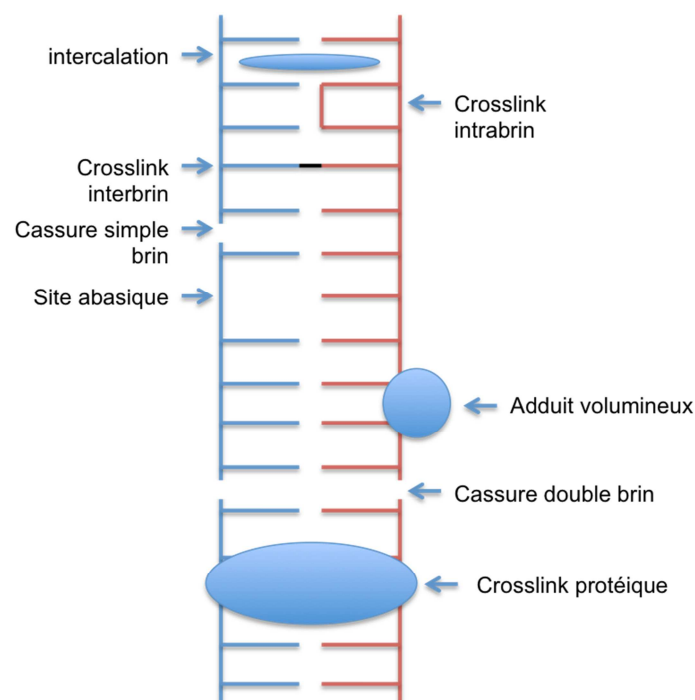
## ***PARTIE 2 : La réponse aux dommages de l'ADN***

---

Nous avons donc vu qu'il existait des mécanismes de surveillance tout au long du cycle cellulaire afin d'assurer la bonne conduite de la division cellulaire. Il en est un qui nous intéressera plus particulièrement ; celui activé en réponse aux dommages de l'ADN. Dans cette partie nous allons nous poser quelques instants sur ce sujet afin de mieux comprendre comment la cellule réagit face à ce problème.

## 1. Le point de départ : les dommages de l'ADN

Le génome est exposé de manière constante à des agents endogènes et environnementaux qui peuvent provoquer des lésions dans l'ADN (Figure I2). Ces lésions ont la capacité d'affecter la fidélité de la réplication et de la transcription générant des mutations dans la séquence codante des protéines. La protéine mutée, pouvant avoir un effet sur de multiples procédés biologiques, serait capable de conduire à une instabilité génomique. Si ces dommages persistent dans les lignées germinales, ils seront héréditaires et potentiellement dangereux pour la nouvelle génération, lui transmettant une maladie héréditaire. Dans les lignées somatiques, les dommages de l'ADN jouent des rôles importants dans les mécanismes de cancérisation et de vieillissement. Les agents endommageant l'ADN peuvent avoir un effet génotoxique et cytotoxique sur la cellule. Les causes des dommages sont subdivisées en deux groupes ; les causes exogènes et les causes endogènes (Friedberg et al., 2006). Quelques exemples de dommages à l'ADN sont présentés dans la Figure I2.



**Figure I 2 : Schématisation de quelques exemples de lésions à l'ADN.**

Les stress exogènes ou endogènes induisent diverses formes de dommages à l'ADN dans la cellule. Des molécules sont capables de s'intercaler entre les bases de l'ADN, ou de modifier ces dernières. Dû à l'action de certains agents chimique, des liaison covalentes ADN protéines peuvent avoir lieu ou entre les deux brins de l'ADN. Enfin l'action de certains génotoxiques crée des cassures simple ou double brin de l'ADN. D'après Tuteja et al. 2001

Les dommages de cause exogènes sont ceux provoqués par des agents externes à la cellule, comme par exemple pour l'Homme ; les radiations UV, les radiations gamma, la fumée de cigarette, certains agents chimiques... Les radiations ionisantes peuvent endommager l'ADN de manière directe (ionisation du sucre ou de la base) ou indirecte (quand l'ADN réagit avec des produits issus de la radiolyse de l'eau) (Friedberg et al., 2006). Ces dernières entraînent la modification de bases, des liaisons (crosslink) inter-brin mais également ADN-protéine, des cassures dans l'ADN (Ciccia and Elledge, 2010; Friedberg et al., 2006)... Les radiations UV quant à elles, engendrent des dimères de pyrimidine. Il existe également de nombreux agents chimiques qui endommagent l'ADN. On peut citer comme exemple les agents alkylants (Methyl methanesulfonate (MMS), ethyl methanesulfonate (EMS), le cisplatine, 4-Nitroquinoline-1-Oxyde (4NQO)...). A signaler que nombre de ces agents alkylants sont utilisés en chimiothérapie pour traiter les cancers. Le 4NQO (utilisé plus tard dans nos expérimentations), provoque divers types d'adduits (Friedberg et al., 2006). Le 4NQO après conversion en 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxyde provoque l'introduction de groupement quinoline dans l'ADN, mais il peut également provoquer la formation de 8-hydroxyguanine. Les agents liants (« cross-linkant ») quant à eux peuvent engendrer des liaisons inter brin. Certains produits chimiques créent des cassures de l'ADN comme c'est le cas de la Bléomycine et de la camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase I). D'autres agents chimiques sont capables d'endommager l'ADN de manière indirecte. C'est le cas de l'hydroxyurée, qui est un inhibiteur de la Ribonucléotide réductase et entraîne une diminution du pool de nucléotides engendrant indirectement des cassures dans l'ADN (voir Partie 2).

Les dommages de cause endogènes sont ceux provoqués par le métabolisme cellulaire, on les nomme aussi dommages spontanés. Les agents provoquant ces dommages sont par exemple les radicaux libres ou espèce réactives de l'oxygène (ROS), les défauts de réplication (Ciccia and Elledge, 2010; Friedberg et al., 2006)... L'oxygène, bien qu'essentiel à la vie, est aussi capable d'endommager l'ADN, les ROS sont d'ailleurs la source majeure de dommages spontanés (Friedberg et al., 2006). Ils oxydent les bases de l'ADN provoquant divers types de lésions comme les cassures de l'ADN, la modification de bases, la perte de base... On peut observer des déaminations de l'ADN, qui apparaissent spontanément de manière température et pH-dépendants. Les bases peuvent également être éliminées de

l'ADN formant un site abasique, ceci ayant lieu principalement à des pH acides. Enfin la réplication a également son lot d'erreur générant des mésappariements dans l'ADN, mais elle peut également conduire à l'incorporation de nucléotides modifiés par oxydation (Friedberg et al., 2006).

## 2. Une voie de transduction du signal...

Face à ces agressions constantes que subit l'ADN, les cellules ont développé des mécanismes permettant d'éliminer ces dommages (Tableau I1). Les dommages sont pris en charge par des systèmes de réparations variés (voir paragraphe 3.3). Il se peut que le dommage soit difficile à réparer et par conséquent persistant ou que le nombre de dommages soient trop important pour la cellule, dans ce cas il existe des mécanismes de surveillance qui consistent en une voie de transduction du signal allant de la reconnaissance du dommage dans l'ADN, aux multiples réponses cellulaires permettant de tout mettre en œuvre afin d'éliminer cette lésion et ainsi poursuivre la division cellulaire (Tableau I1). Ces voies de surveillance font

Réversion du dommage	
Excision du dommage, mésappariement	Réparation par excision de base (BER)
	Réparation par excision de nucléotides(NER)
	Réparation des mésappariement (MMR)
Réparation des cassures	Recombinaison Homologue (HR)
	Non Homologous end joining (NHEJ)
	Single Strand annealing (SSA)
Tolérance du dommage	Synthèse translésionnelle (TLS)
	Progression de la fourche de réplication
Activation des checkpoints	
Apoptose	

**Tableau I 1 : Réponse aux dommages de l'ADN et exemple de mécanismes mis en jeu.**

Après un dommage de l'ADN plusieurs voies peuvent être mises en jeu allant de la réparation du dommage à l'apoptose (mort de la cellule). Adapté de Friedberg et al. 2006

intervenir trois groupes de protéines majeures conservées au cours de l'évolution, cependant il existe de nombreuses différences entre les organismes dans le déroulement de la réponse aux dommages de l'ADN (Tableau I2) (Branzei and Foiani, 2009; Elledge, 1996; Melo and Toczyski, 2002; Nyberg et al., 2002; Polo and Jackson, 2011; Putnam et al., 2009).

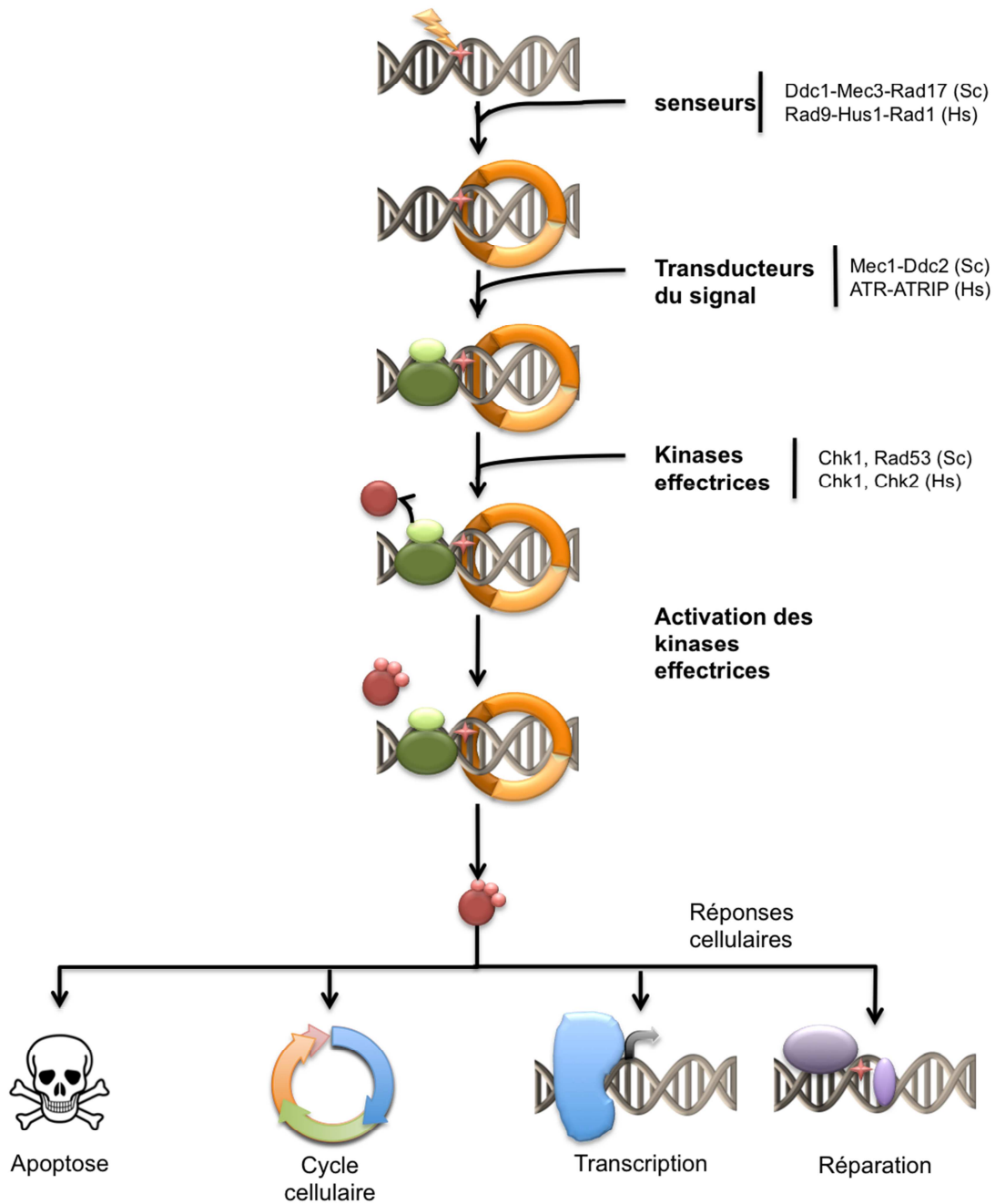
Catégorie	Fonction	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i>	Mammifères
Senseurs des dommages de l'ADN	RFC-like clamp loader	Rad 24	Rad17	RAD17
	Clamp loader	Rfc2-5	Rfc2-5	RFC2-5
	PCNA-like clamp	Ddc1	Rad9	RAD9
		Rad17	Rad1	RAD1
		Mec3	Hus1	HUS1
Senseurs de la phase S	Pole	Pol2/Dun2	Cdc20	Pole
		Dpb1	Cut5/Rad4	TopBP1
		Drc1/Sld2	Drc1	-
	Hélicase ADN	Sgs1	Rqh1	WRN, BLM, RTS
Senseurs/transducteurs	PI3K-like kinases	Mec1	Rad3	ATR
	Partenaire d'ATR	Lcd1/Ddc2	Rad26	ATRIP
Transducteurs	PI3K-like kinases	Tel1	Tel1	ATM
Adaptateurs	Médiateurs des dommages	Rad9	Crb2	BRCA1, MDC1, 53BP1
		Médiateurs de la phase S	Mrc1	Mrc1
		Tof1	Swi1	-
		Csm3	Swi3	-
Effecteurs	Kinases	Rad53	Cds1	CHK2
		Chk1	Chk1	CHK1
		Pds1	Cut2	PTTG
	Kinases	Dun1	-	-

**Tableau I 2 : Homologie entre les protéines de réponse aux dommages de l'ADN et aux blocages de réplication chez différents eucaryotes (Elledge, 1996; Melo and Toczyski, 2002; Nyberg et al., 2002; Putnam et al., 2009).**

Typiquement on trouve les senseurs qui reconnaissent la lésion, ces derniers signalent la présence des dommages aux transducteurs du signal qui une fois activés activent à leur tour des protéines effectrices qui alors peuvent agir sur leurs cibles dans différentes voies cellulaires (Figure I3) (Fu et al., 2008; Harper and Elledge, 2007).

### 2.1. La reconnaissance du dommage

Quand une lésion dans l'ADN est générée, un problème se pose, comment signaler à la cellule que son ADN est endommagé ? De manière générale la lésion au niveau de l'ADN est modifiée, un processus de maturation du dommage se met en place générant des structures protéines-ADN, qui selon le type de dommage sont reconnaissables par des protéines dites senseurs (Lazzaro et al., 2009; Warmerdam and Kanaar, 2010). Le recrutement de ces différents acteurs au niveau des lésions de l'ADN doit se faire d'une manière



**Figure 1 3 : Représentation schématique des réponses aux dommages de l'ADN chez les eucaryotes.**

Des protéines senseurs de type PCNA repèrent la lésion. Au même moment, d'autres senseurs (transducteurs du signal) déclenchent la voie de signalisation par phosphorylation des kinases effectrices. S'en suit une amplification du signal aboutissant à de multiples réponses cellulaires. L'apoptose peut être activée chez les mammifères. Selon le type de dommages, ce ne seront pas forcément les mêmes protéines qui seront impliquées, ni les mêmes réponses cellulaires qui seront mis en jeu. Des exemples de protéines impliquées chez *S. cerevisiae* (Sc) et chez l'Homme (Hs) sont indiqués en marge du schéma.

spatiotemporelle précise (Ciccia and Elledge, 2010). D'ailleurs il est démontré que le simple recrutement de ces facteurs au niveau de l'ADN permettait l'activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN et ce même en absence de tout dommage (Ciccia and Elledge, 2010; Wood and Chen, 2008). Ces facteurs sont recrutés au niveau de la lésion, notamment au niveau des cassures double brins, où ils forment des foci ou IRIF (Ionizing-Radiation-Induced-Foci) visualisables en immunofluorescence par microscopie (Lukas et al., 2004; Polo and Jackson, 2011; Wood and Chen, 2008).

Ainsi selon le dommage de l'ADN présent, différentes protéines sont recrutées. Il existe au moins cinq complexes indépendants qui reconnaissent et signalent les différents types de dommages (les complexes Ku70/Ku80, MRN, RPA, RFC-like, PCNA-like) (Harper and Elledge, 2007), nous allons nous focaliser sur certains d'entre eux.

Les cassures de l'ADN simple et double brins sont directement reconnues par les deux doigts de zinc de la protéine PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Protein). A noter qu'il n'existe pas d'homologue de cette protéine chez la levure. Ceci conduit à l'activation de PARP1 et PARP2 qui synthétisent alors des chaînes de Poly(ADP-ribose) (PAR) sur les histones, entre autre, au niveau de la lésion (Ciccia and Elledge, 2010). La PARylation des histones entraîne une réorganisation de la chromatine et le recrutement des complexes de réparation. PARP1, ainsi joue un rôle d'initiation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN en facilitant l'activation de la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (voir paragraphe 2.2) (Haince et al., 2007).

Les cassures double brins de l'ADN peuvent également être reconnues de manière indépendante par le complexe Ku70-Ku80 et par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (MRX chez *S. cerevisiae* : Mre11-Rad50-Xrs2) qui entrent en compétition pour la liaison à la cassure double brins non modifiée (Finn et al., 2011). Le complexe MRN permet la résection<sup>1</sup> des cassures double brins pour initier la réparation, mais il participe également, au recrutement d'ATM au niveau de la cassure (Ciccia and Elledge, 2010; Polo and Jackson, 2011).

---

<sup>1</sup> La résection consiste en la dégradation d'un brin de l'ADN de 3' vers 5' pour former des extrémités flottantes simple brin reconnu par certaines protéines de la réparation.



La résection des cassures double brins et la formation d'ADN simple brin (lors du blocage des fourches de réplication) conduit à l'accumulation du complexe RPA (Protéine de Réplication A) (Ciccina and Elledge, 2010; Polo and Jackson, 2011). RPA est un complexe hétérotrimérique (RPA1, RPA2, RPA3) qui joue un rôle dans la stabilisation de l'ADN simple brin, mais joue également un rôle critique dans l'activation de la voie ATR (ATM and Rad3 Related) (Branzei and Foiani, 2009; Ciccina and Elledge, 2010; Huen and Chen, 2010). Par son interaction directe avec ATRIP (ATR Interacting Partner), RPA recrute au niveau du dommage le complexe ATR/ATRIP (Zou and Elledge, 2003). De plus, il stimule l'activation du « clamp loader » RFC-like (Replication Factor C like : Rad17-Rfc2-5) qui charge le complexe PCNA-like (Proliferating Cell Nuclear Antigen) composé des protéines Rad9, Hus1 et Rad1, nommé également complexe 9-1-1 (Ddc1-Mec3-Rad17 chez *S. cerevisiae*), et ce dernier stimule l'activation de la voie ATR (Ellison and Stillman, 2003; Zou et al., 2003).

## 2.2. La transduction du signal

La détection des dommages a donc pour effet d'activer l'une des deux voies majeures de signalisation chez les mammifères ; la voie ATM et la voie ATR (Huen and Chen, 2010). ATM (Tel1 chez *S. cerevisiae*) et ATR (Mec1 chez *S. cerevisiae*) sont ce que l'on nomme des transducteurs du signal, c'est-à-dire qu'ils initient la transduction d'une cascade d'activation qui propage et amplifie le signal conduisant entre autre à l'arrêt du cycle cellulaire, néanmoins ils sont parfois classés parmi les protéines senseurs car ils sont capables de reconnaître certaines configurations ADN-protéines. Ces protéines font partie de la famille des PI3K-like kinases (Phosphatidylinositol 3-kinase like) (Ciccina and Elledge, 2010; Finn et al., 2011). Bien qu'il existe des homologues de ATM et ATR chez *S. cerevisiae* ; Tel1 et Mec1 respectivement, les fonctions que ces derniers effectuent sont différentes. En effet, alors qu'ATM et ATR sont activés en fonction du type de lésion présente dans l'ADN (ATM est principalement activé en réponse aux cassures doubles brins (Suzuki et al., 1999) et ATR généralement activé suite à un blocage de fourche (Dart et al., 2004; Zou and Elledge, 2003)), chez *S. cerevisiae*, Mec1 joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN de manière générale (Finn et al., 2011), alors que Tel1 intervient principalement dans la maintenance des télomères (Greenwell et al., 1995). A noter que ATR chez les mammifères, et Mec1 chez *S. cerevisiae* sont des gènes essentiels pour la croissance

cellulaire alors que ATM et Tel1 ne le sont pas (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009; Morrow et al., 1995). Cela suggère que leurs fonctions ne sont redondantes qu'en partie.

Les transducteurs du signal, modifient les histones H2A (chez la levure) ou le variant H2AX (chez les mammifères) se trouvant au niveau du dommage en les phosphorylant (on parle de  $\gamma$ H2A(X)) (Burma et al., 2001; Downs et al., 2000; Ward and Chen, 2001). Cette modification joue un rôle important dans la détection des dommages et procédés aval de la réponse aux dommages de l'ADN. Un remodelage de la chromatine a lieu, rendant la lésion plus accessible aux protéines senseurs (voir paragraphe 2.3) (Downs et al., 2000; Downs et al., 2007; Shroff et al., 2004).

Suite à leur activation, les PI3K-like kinases permettent l'activation des kinases effectrices agissant en aval de la voie de réponse (Branzei and Foiani, 2009; Finn et al., 2011). L'activation des protéines kinases effectrices par les PI3K-like kinases est régulée par une protéine médiatrice ; Rad9 chez la levure bourgeonnante, 53BP1, BRCA1 et MDC1 chez les mammifères. Ces protéines adaptatrices fonctionnent comme des adaptateurs moléculaires pour le recrutement des protéines aux sites de dommage et relaient la phosphorylation des cibles par les PI3K-like kinases (Finn et al., 2011).

### 2.3. Les kinases effectrices

Les effecteurs sont typiquement des Sérines/Thréonines kinases ; CHK1 et CHK2 chez les mammifères, Chk1 et Rad53 (voir paragraphe 2.4) chez *S.cerevisiae*. CHK1 et CHK2 possèdent toutes les deux des domaines kinases conservés, mais elles sont structurellement et fonctionnellement distinctes (Stracker et al., 2009).

L'activation de CHK1 et CHK2 se fait par des mécanismes distincts. L'activation de CHK1 se fait *via* ATR et la protéine adaptatrice Claspin (Mrc1 chez *S. cerevisiae*) (Branzei and Foiani, 2009; Finn et al., 2011), alors que celle de CHK2 se fait principalement *via* ATM ((Stracker et al., 2009). Chez *S. cerevisiae* c'est différent, l'activation de Rad53 se fait *via* Mec1 et la protéine adaptatrice Rad9 (voir paragraphe 2.4). Chez cette dernière, la protéine adaptatrice Rad9 permet aussi l'activation de Chk1, au même titre que Rad53 (Branzei and Foiani, 2009; Finn et al., 2011). Le même processus est utilisé chez les mammifères, où les homologues de scRad9 ; 53BP1, BRCA1 et MDC1 sont requis pour la phosphorylation et l'activation de la kinase effectrice CHK1 (Shibata et al., 2010; Stewart et al., 2003; Yarden et al., 2002).

Toujours chez les mammifères, 53BP1 joue le rôle d'un adaptateur moléculaire qui facilite la phosphorylation radiation-induite de certaines des cibles de ATM, à savoir la kinase effectrice CHK2, BRCA1 et SMC1 (une sous-unité de la cohésine) (Finn et al., 2011)

Mrc1 régule quant à lui l'activation de Rad53 en réponse aux stress réplicatifs en jouant le rôle d'un adaptateur entre Mec1 et Rad53 alors que chez les vertébrés, la claspin ne participe qu'à l'activation de CHK1 (Branzei and Foiani, 2009; Finn et al., 2011).

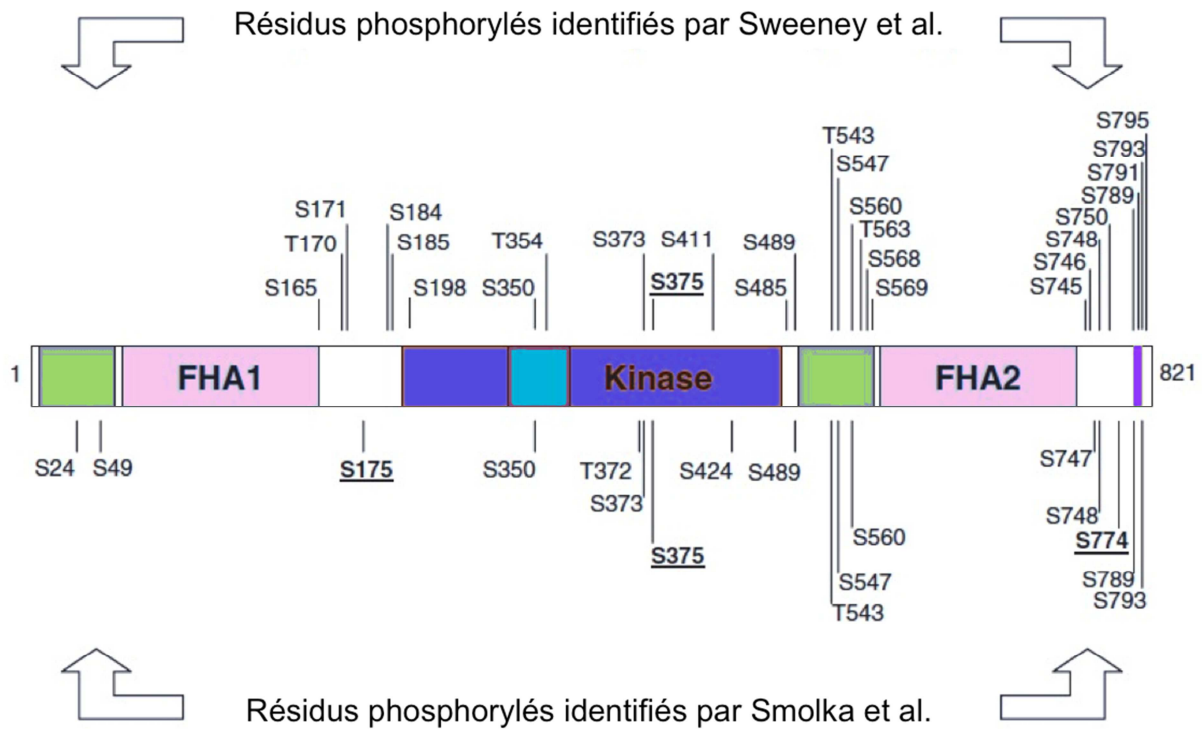
Contrairement à ce qui est observé chez *S.cerevisiae* où Rad53 (hCHK2) est la protéine kinase effectrice principale, chez les mammifères, c'est CHK1 qui joue ce rôle, CHK2 jouant plutôt un rôle dans le maintien de l'activation du checkpoint (Finn et al., 2011).

#### 2.4. Rad53 une kinase clé

Les protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN sont très conservées chez les eucaryotes (Tableau I2) et la plupart des recherches initiales sur cette voie a été menée chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* et la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe* (Branzei and Foiani, 2009).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine kinase effectrice Rad53 joue un rôle central dans ces voies. Cette protéine est essentielle pour la survie de la cellule et il est communément admis que son rôle essentiel réside dans la maintenance de l'intégrité du génome qui se trouve être strictement dépendant de la maintenance d'un niveau adéquat de dNTPs dans la cellule (voir partie 3) (Branzei and Foiani, 2009; Fiorani et al., 2008).

Rad53 est composée de deux domaines FHA (Forkhead-Associated) ainsi que d'un domaine kinase (Figure I4). Les domaines FHA permettent la liaison protéine-protéine, plus précisément aux phosphopéptides pour Rad53 en tous cas (Durocher et al 1999). Son activation se fait notamment par le biais de Mec1 qui la phosphoryle. Rad53 s'associe à la protéine adaptatrice Rad9 afin d'être activé par Mec1.

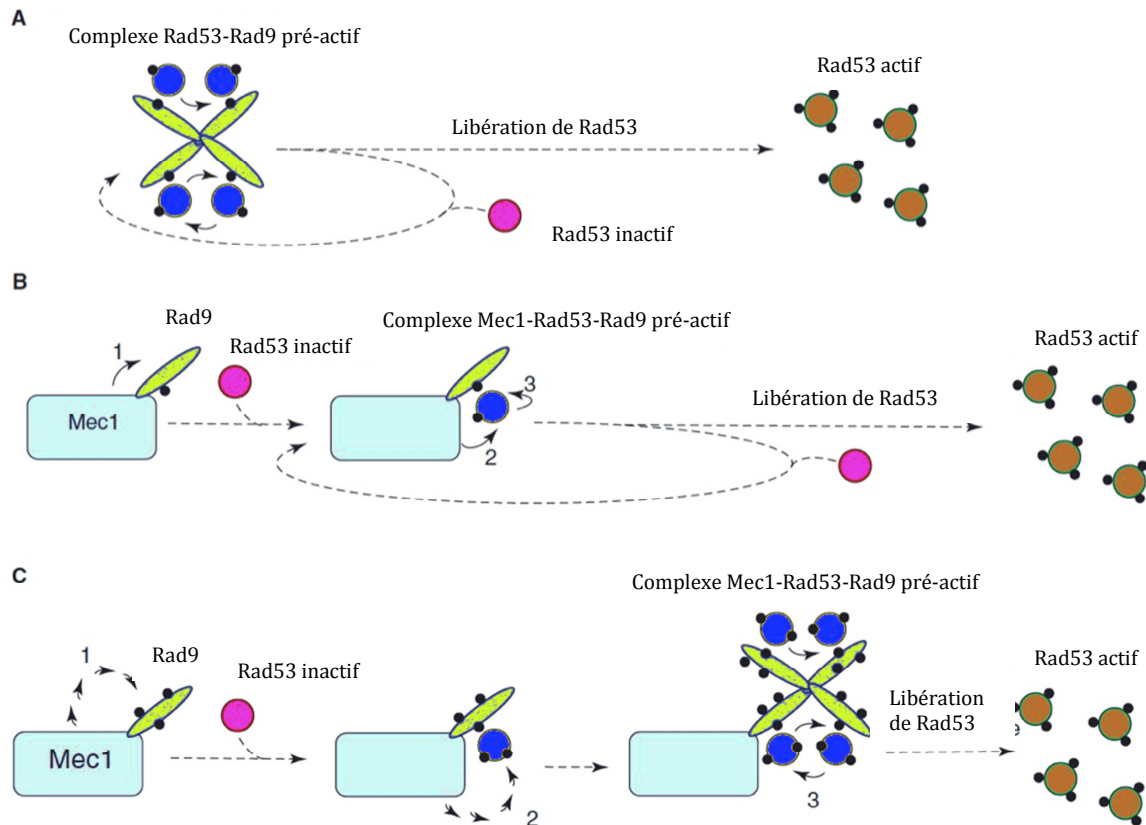


**Figure 14 : Représentation schématique de Rad53 et localisation des sites de phosphorylation identifiés dans les études de Sweeney et al. et de Smolka et al.** Adapté de Pellicoli et al. 2005

En bleu foncé sont schématisés les sites SQ/TQ. En vert : signal de localisation nucléaire. En rouge à l'intérieur du domaine kinase : segment d'activation.

Un premier modèle d'activation de Rad53 par le biais de Rad9 a été proposé en 2001 (Figure 15.A). Ce modèle, nommé « solid state catalyst » (Gilbert et al., 2001) proposait qu'un complexe Rad9 hyperphosphorylé par Mec1 permettait le recrutement de Rad53 le concentrant localement ce qui faciliterait son autophosphorylation en trans. Ce dernier se trouvant sous sa forme hyperphosphorylée se décrocherait alors du complexe Rad9 pour agir sur ses différentes cibles.

Un deuxième modèle dit « adaptor based » proposé en 2005 (Figure 15.B) (Sweeney et al., 2005) dit que l'hyperphosphorylation de Rad9 par Mec1 permet le recrutement de Rad53, rapprochant physiquement Rad53 de Mec1 qui pourra alors la phosphoryler. De cette manière, Rad53 serait donc capable de s'autophosphoryler pour atteindre un état hyperphosphorylé et ainsi actif.



**Figure 15 : Modèles d'amplification du signal Rad53 (adapté de Pellicoli et al. 2005).**

- Modèle « solid-state catalyst » : Rad9 permet le recrutement de Rad53 et facilite l'autophosphorylation en trans de ce dernier.
- Modèle « adaptor based » : Rad9 est hyperphosphorylé par Mec1 permettant le recrutement de Rad53. Mec1 va pouvoir ainsi phosphoryler Rad53
- Modèle « adaptor catalyst » : Rad9 est hyperphosphorylé par Mec1 permettant le recrutement de Rad53. Mec1 va phosphoryler Rad53 facilitant l'oligomérisation de Rad9 permettant l'autophosphorylation en trans de Rad53.

Le dernier modèle a été proposé également en 2005 (Figure 15.C) (Pellicoli and Foiani, 2005). Ce modèle « d'adaptor catalyst » est un mélange des deux autres modèles cités ci-dessus. Dans ce cas, il est proposé qu'une fois recruté au niveau des lésions de l'ADN, Rad9 est hyperphosphorylé par Mec1, cette hyperphosphorylation de Rad9 agit comme un adaptateur moléculaire facilitant l'amplification du signal : la phosphorylation de plusieurs sites SQ/TQ<sup>2</sup> sur Rad9 permet l'accrochage de Rad53 qui se fixe au niveau de ces sites de phosphorylation *via* ces deux domaines FHA (Durocher et al., 1999; Finn et al., 2011). Ainsi Rad53 se rapproche physiquement de Mec1 facilitant la phosphorylation de Rad53 par Mec1. Rad9 en s'oligomérisant agit également en permettant le rapprochement de plusieurs molécules de Rad53 ce qui engendre leur autophosphorylation en trans (Finn et al., 2011).

<sup>2</sup> Le site SQ/TQ est un site constitué d'une sérine ou une thréonine suivie d'une glutamine et qui est la cible de phosphorylations.

L'oligomérisation de Rad9 n'apparaît pas comme étant indispensable pour l'activation initiale de Rad53, cependant elle est requise pour maintenir l'activation de Rad53 et l'arrêt du cycle cellulaire induit par les réponses aux dommages de l'ADN (Usui et al., 2009).

En analysant Rad53 en réponse aux dommages de l'ADN par spectrométrie de masse, Sweeney et al. (Sweeney et al., 2005) ainsi que Smolka et al. (Smolka et al., 2005) ont chacun identifié différents sites de phosphorylation (Figure I4), au final ce ne sont pas moins de trente-deux sites phosphorylés qui ont été révélés (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009). Parmi ces sites, certains sont phosphorylés par Rad53 lui-même. A noter que sept d'entre eux sont constitutivement phosphorylés en absence de tout dommage de l'ADN (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009).

Une hypothèse intéressante a été proposée par Pellicoli et Foiani, suggérant qu'en fonction de la nature de la lésion dans l'ADN, la phosphorylation en trans de Rad53 par Mec1 est non seulement requise pour l'activation de Rad53, mais également permettrait de diriger Rad53 vers les cibles cellulaires appropriées, en créant une phospho-interface spécialisée de Rad53 (Fiorani et al., 2008; Pellicoli and Foiani, 2005).

### **3. ... aux multiples effets**

---

L'activation de cette voie de transduction du signal aboutit alors à de multiples effets (Figure I3) permettant de réparer la lésion avant que la cellule ne passe à la phase du cycle cellulaire suivante.

#### **3.1. La régulation du cycle cellulaire**

Lorsqu'un dommage est difficile à réparer, la machinerie de réponse aux dommages de l'ADN ralentit la progression du cycle cellulaire pour laisser plus de temps à la cellule pour réparer la lésion (Bartek et al., 2007).

Rad53 a diverses cibles dans le cycle cellulaire, dont notamment le complexe Cdc7-Dbf4 (Dohrmann et al., 1999). *CDC7* code une kinase sérine/thréonine essentielle pour l'initiation de la phase S chez *S.cerevisiae* (Dohrmann et al., 1999; Donaldson et al., 1998), son activité kinase est requise pour l'initiation de la réplication (Dohrmann et al., 1999; Donaldson et al., 1998; Hollingsworth et al., 1992; Jackson et al., 1993). Cdc7 interagit physiquement avec la protéine Dbf4, qui voit son expression varier au cours du cycle cellulaire, et l'association de

ces deux protéines est requise pour activer l'activité kinase de Cdc7 (Dohrmann et al., 1999; Jackson et al., 1993). Rad53 est capable d'interagir physiquement avec Dbf4 et d'en moduler son expression à la fois transcriptionnellement et au niveau protéique (Dohrmann et al., 1999). Rad53 activé en réponse à un blocage de fourche phosphoryle Dbf4 ce qui conduit à sa libération du complexe de reconnaissance des origines de réplication (ORC) (Duncker et al., 2002). Par conséquent, il inhiberait l'activation des origines tardives (Duncker et al., 2002).

Rad53 a, également, pour cible la protéine Swi6, l'un des composants du facteur de transcription SBF (Swi4/6-dependant cell cycle box binding factor) qui inhibe la transcription des cyclines G1/S (Cln1 et Cln2) (Sidorova and Breeden, 1997). L'activation de Rad53 et Chk1 inhibe l'entrée en anaphase en inhibant notamment la dégradation de Pds1 (Finn et al., 2011).

Lors d'un stress répliatif, la progression dans la phase S ralentit en partie grâce à la phosphorylation de RPA et l'inhibition de la polymérase  $\alpha$ -primase (Finn et al., 2011). Rad53 inhibe indirectement la phosphorylation de cette polymérase empêchant l'initiation de la synthèse d'ADN en aval de la lésion (Finn et al., 2011).

Chez *S. cerevisiae*, Rad53 phosphoryle également la protéine Sld3 rendant impossible son interaction avec les protéines de réplication Dpb11 et Cdc45 qui sont toutes les deux requises pour l'initiation de la réplication de l'ADN, ainsi l'activation des origines tardives sera empêchée (Finn et al., 2011; Lopez-Mosqueda et al., 2010). Le même phénomène est observable chez les mammifères, en réponse à un stress répliatif, la voie ATM/ATR-CHK1/CHK2 prévient l'initiation de la réplication en inhibant le chargement du facteur d'initiation de la réplication Cdc45 au niveau des origines de réplication (Andreassen et al., 2006; Finn et al., 2011).

De même, l'activation de CHK2 chez les mammifères entraîne la phosphorylation de la phosphatase Cdc25A, la dirigeant vers sa dégradation par le protéasome (Andreassen et al., 2006; Finn et al., 2011; Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009). La dégradation de Cdc25A empêche la déphosphorylation et donc l'activation du complexe CDK2-cycline E qui est requis pour l'entrée en phase S. L'activation de CHK2 conduit également à une stabilisation du suppresseur de tumeur p53 qui active l'induction de la transcription de l'inhibiteur de

CDK ; p21, qui lui-même inhibe l'activité du complexe CDK2-cycline E (Finn et al., 2011; Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

Chez la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe*, Chk1 inhibe l'activité de la CDK Cdc2 en ciblant la kinase Wee1 et la phosphatase Cdc25. La phosphorylation de Wee1 stabilise la protéine assurant la phosphorylation de Cdc2, alors que la phosphorylation de Cdc25 favorise son association avec la protéine Rad24 qui séquestre alors Cdc25 dans le cytoplasme empêchant ce dernier de déphosphoryler Cdc2 (Finn et al., 2011).

### 3.2. La régulation de la transcription de certains gènes

Les protéines kinases effectrices ciblent aussi la transcription de certains gènes.

Par ailleurs de nombreuses analyses transcriptomiques ont été réalisées chez *S.cerevisiae* afin d'identifier de nouveaux composants des voies répondant à divers dommages de l'ADN ; les radiations ionisantes, les radiations UV, les agents alkylants (principalement le MMS), la camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase I), la bléomycine, et le cisplatine (Davidson and Brown, 2009).

Un premier crible chimio-génomique (criblage d'une librairie de fusion *lacZ* en présence d'UV, 4NQO, methotrexate ou radiations gamma) a été réalisé par Szostak (Fu et al., 2008; Ruby et al., 1983; Ruby and Szostak, 1985) et a permis d'isoler six gènes « damage-inducible » (DIN). Un second crible réalisé en 1984 par McClanahan et McEntee a permis lui d'isoler quatre gènes « DNA Damage Responsive » (DDR), mais il a également permis d'isoler des gènes dont l'expression diminuait en réponse aux dommages de l'ADN (Fu et al., 2008; McClanahan and McEntee, 1984). A eux deux, ces cribles ont identifié dix nouveaux gènes induits par les dommages de l'ADN (DIN/DDR) et quatre gènes sous exprimés (Fu et al., 2008; McClanahan and McEntee, 1984).

La première réelle analyse transcriptomique a été réalisée en 1999 par Jelinsky et Samson (Fu et al., 2008; Jelinsky and Samson, 1999). Cette dernière a été effectuée en présence de l'agent alkylant MMS à 0,1% durant une heure (Jelinsky and Samson, 1999). Dans ces conditions, pas moins de 325 gènes (dont *RNR1*, *RNR2*, *RNR3*, *RNR4* (voir partie 3)) étaient induits par le traitement au MMS et 76 avaient leur expression diminuée (Fu et al., 2008; Jelinsky and Samson, 1999). Dans une autre de leurs études transcriptomiques, toujours en réponse aux dommages de l'ADN, Jelinsky et al. ont identifié Rpn4 comme un régulateur



transcriptionnel putatif d'un grand nombre de gènes (Fu et al., 2008). Rpn4 est une protéine associée au protéasome et est connu pour réguler 26 des gènes du protéasome. Cette découverte pointe la possibilité que la voie ubiquitine-protéasome puisse jouer un rôle dans la réponse transcriptionnelle aux dommages de l'ADN. Cependant des études de l'équipe de Brown montreront par la suite que cette induction n'est pas spécifique des dommages de l'ADN, signe d'une réponse plutôt globale aux stress (Gasch et al., 2001).

Néanmoins un problème majeur se pose dans ces analyses transcriptomiques, les agents génotoxiques utilisés engendrent l'activation de voies annexes qui ne sont pas spécifiques des réponses aux dommages de l'ADN. Pour pallier ce problème l'équipe de Brown a comparé les « transcriptomes » obtenus en réponse aux dommages de l'ADN (MMS et radiations ionisantes) avec ceux obtenus en présence de stress environnementaux (choc thermique, stress oxydatif, stress réducteur, choc osmotique, carence en acides aminés) (Gasch et al., 2001). Au total ce sont 95 puces à ADN qui ont été analysées. Il est ressorti de ces études qu'un seul groupe de gènes était spécifique aux traitements MMS et aux radiations ionisantes (Gasch et al., 2001). Ce groupe de gènes comprend les gènes de réparation *RAD51* et *RAD54*, les sous-unités de la Ribonucléotide Réductase *RNR2* et *RNR4*, la kinase *DUN1* et les gènes *YER004W (FMP52)* et *YBR070C (ALG14)* (Gasch et al., 2001).

Dun1 est une cible majeure de Rad53. Cette kinase est requise pour l'induction transcriptionnelle de nombreux gènes inductibles par les dommages de l'ADN, comme par exemple les sous-unités de la ribonucléotide réductase (RNR) (voir partie 3) (Branzei and Foiani, 2009; Ciccia and Elledge, 2010; Finn et al., 2011; Fu et al., 2008). La ribonucléotide réductase est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de synthèse des nucléotides, plus de détails sur ce complexe seront donnés dans la partie 3. Par ailleurs, il a été montré que la délétion de *DUN1* affectait la transcription de plus de 1000 gènes en réponse au MMS (Fu et al., 2008) et que cette réponse était sensiblement comparable à celle observée dans les cellules mutées pour *MEC1*, suggérant que les effets principaux de Mec1 sur l'expression du génome passent par Dun1 (Gasch et al., 2001)

Dernièrement, une analyse transcriptomique du laboratoire de Hoshi en 2010 a révélé que seulement cinq gènes étaient induits en réponse à différents types d'irradiations (radiations ionisantes à haute énergie de transfert linéaire (LET-IR), radiations gamma) ; *HUG1* (voir

chapitre II), *YNL194C*, *RNR4*, *RNR2* et *FMP16*, et un seul gène était sous exprimé de manière reproductible ; *SFG1* (Mizukami-Murata et al., 2010).

A la vue des résultats obtenus dans les différentes expérimentations d'analyse transcriptomique, nous remarquons que les principaux gènes induits en réponse aux dommages de l'ADN sont ceux codant les différentes sous-unités de la RNR (voir partie 3).

### 3.3. L'activation de la réparation

Il existe divers voies de réparation qui prennent en charge les lésions de l'ADN. Le mésappariement des bases est réparé par mismatch repair (MMR), les petites altérations des bases de l'ADN sont réparées par excision des bases (BER). Les lésions un peu plus complexes de l'ADN telles que les dimères de pyrimidine, les liaisons intra-brin sont réparées par excision des nucléotides (NER) (Ciccia and Elledge, 2010; Warmerdam and Kanaar, 2010). En ce qui concerne les cassures de l'ADN, les cassures simples brins sont réparées par un système nommé SSB (Single Strand Break Repair), alors que les cassures doubles brins sont réparées soit par recombinaison non homologue (NHEJ) ou recombinaison homologue (HR) (Ciccia and Elledge, 2010). A noter que la recombinaison homologue est activée spécifiquement au cours de la phase S contrairement au NHEJ qui est plutôt favorisé au cours de la phase G1 chez les mammifères (Andreassen et al., 2006; Lazzaro et al., 2009).

L'interconnexion entre la voie de réponse aux dommages de l'ADN et la réparation est supportée par le fait que de nombreux facteurs de réparation subissent des modifications post-traductionnelles de manière dépendante des checkpoints. Par exemple la voie de réponse aux dommages de l'ADN régule la maturation des cassures double brins, ce qui est une étape cruciale dans le processus de recombinaison homologue (Lazzaro et al., 2009). Les kinases des voies de réponses aux dommages de l'ADN interviennent également à des étapes plus tardives en phosphorylant et en régulant les facteurs de recombinaison Srs2, Rad55 et Slx4 (Lazzaro et al., 2009).

### 3.4. La mort cellulaire

Si la cellule de mammifère ne parvient pas à réparer la lésion de l'ADN, cette dernière sort alors de la prolifération. Cet évènement peut être accompli par un procédé cellulaire nommé sénescence ou alors activer la mort de la cellule (Bartek et al., 2007; Bitomsky and Hofmann, 2009).

Lors d'un dommage de l'ADN, la voie ATR cible notamment le suppresseur de tumeur p53 pour conduire à sa phosphorylation (Batista et al., 2009; Bitomsky and Hofmann, 2009). Suite à cette activation, p53 régule un grand nombre de protéines qui contrôlent la mort cellulaire par apoptose (Batista et al., 2009). Il induit par ailleurs la transcription de différents gènes conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose. Comme exemple de cibles de p53 on peut citer Puma (p53 up-regulated modulator of apoptosis), p53AIP1 (p53 regulated apoptosis-inducing protein 1) et Bax (breakpoint cluster-2-associated x protein) (Bitomsky and Hofmann, 2009). p53 est également phosphorylé par HIPK2 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). HIPK2 est une autre cible de la voie ATM/ATR; en réponse aux dommages de l'ADN, ATM/ATR phosphoryle Siah1 (une ubiquitine ligase) qui se sépare alors de HIPK2 permettant la stabilisation et l'activation de ce dernier (Winter et al., 2008).

L'ADN non réparé induit une activation constante de ATM/ATR. Le maintien prolongé de cette activation pourrait être la clé de la régulation du basculement vers l'induction de l'apoptose à travers la stabilisation et l'activation prolongée de HIPK2 (Bitomsky and Hofmann, 2009).

Une autre protéine jouant un rôle clé dans la mort cellulaire induite par les dommages de l'ADN est le facteur de transcription et suppresseur de tumeur p73 (Bitomsky and Hofmann, 2009).

CHK2 est également impliqué dans la régulation de l'apoptose p53-indépendante, en partie à travers la modification de la protéine PML (promyelocytic leukemia protein) (Stracker et al., 2009).

#### ***4. L'inactivation des checkpoints***

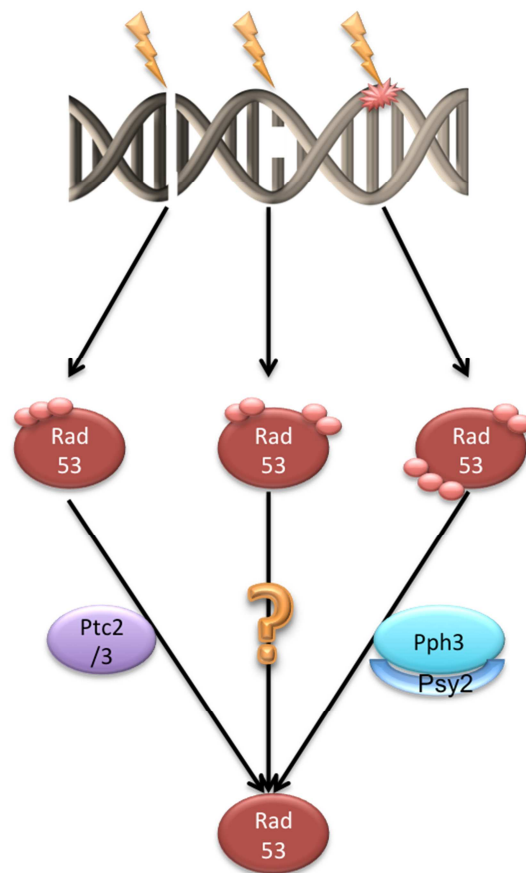
---

Une fois que l'ADN a été réparé, la voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN est stoppée par un processus nommé « recovery », et les cellules retournent alors dans le cycle cellulaire (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Finn et al., 2011; Heideker et al., 2007).

Bien que beaucoup de choses soient connues sur l'activation des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN, peu le sont sur leur désactivation.

La cinétique de déphosphorylation de Rad53 suit de près le processus de « recovery », d'où l'hypothèse première que des Sérines/Thréonines phosphatases seraient à l'origine de cette déphosphorylation (Marsolier et al., 2000; Stracker et al., 2009). Ainsi l'équipe de Marsolier-Kergoat a découvert deux phosphatases Ptc2 et Ptc3 (voir chapitre II), les premières phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de Rad53 (Leroy et al., 2003; Marsolier et al., 2000). Depuis d'autres phosphatases incluant PP1, PP2A, PP2C, PP5 chez d'autres organismes ont été montrées comme étant importantes pour la régulation des réponses aux dommages de l'ADN (Heideker et al., 2007).

Chez la levure bourgeonnante, il existe une autre Sérine/Thréonine, cette fois de type 2A ; Pph3, qui a été montrée comme étant importante pour la déphosphorylation de Rad53, mais également celle des histones  $\gamma$ H2A (Heideker et al., 2007; Stracker et al., 2009). Cependant Pph3 requiert la présence d'une protéine adaptatrice Psy2 pour déphosphoryler Rad53 (Heideker et al., 2007).



**Figure I 6 : Voies d'inactivation de Rad53 en fonction du dommage à l'ADN.**

Les dommages de l'ADN entraînent la phosphorylation de Rad53 suivant différents profils (en fonction du dommage). Pour désactiver Rad53 différentes phosphatases interviennent en fonction du profil de phosphorylation et déphosphorylent Rad53. Adapté d'Heideker et al. 2007

Il existe donc plusieurs phosphatases qui régulent Rad53. Toutefois toutes n'interviennent pas en même temps. Ainsi Ptc2 et Ptc3 inactivent Rad53 après une cassure double brin de l'ADN, alors que Pph3-Psy2 intervient dans l'inactivation de Rad53 après un traitement au MMS (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Heideker et al., 2007). Il existe sûrement d'autres phosphatases impliquées dans l'inactivation de Rad53 puisque après un traitement à l'hydroxyurée, Rad53 continue à être déphosphorylé même en l'absence de Ptc2, Ptc3 et Pph3 (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009). En résumé, cela suggère que plusieurs phosphatases agissent de manière plus ou moins redondante pour déphosphoryler différentes formes de Rad53 induites par différents types de stress génotoxiques (Figure 16) (Clemenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Heideker et al., 2007).

La protéine Chk1 de *S.pombe* est régulée par une phosphatase de type PP1-like ; la protéine Dis2 (Stracker et al., 2009). Chez les mammifères, la phosphatase de type 2C Wip1 inhibe à la fois CHK1 et CHK2 (Oliva-Trastoy et al., 2007; Stracker et al., 2009). Ces deux kinases sont également régulées par PP2A (Stracker et al., 2009).

## ***5. Les pathologies liées à un défaut de la réponse aux dommages de l'ADN***

---

Il a été montré qu'une défaillance des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN altère de manière significative la résistance aux stress génotoxiques, mais peut également provoquer un arrêt de la réplication conduisant à une instabilité génomique pouvant mener au cancer (Bartkova et al., 2005; Branzei and Foiani, 2009; Poehlmann and Roessner, 2010). D'ailleurs la phosphorylation de CHK2 et d'autres marqueurs de la réponse aux dommages de l'ADN ont pu être observés dans de nombreuses lésions pré-malignes et les cancers (Stracker et al., 2009). Ces observations ont conduit à la proposition que la réponse aux dommages de l'ADN agissait comme une barrière contre la tumorigenèse (Rai et al., 2007; Stracker et al., 2009).

Comme nous avons pu le voir, la protéine ATM joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN. A l'origine, le gène codant cette protéine a été découvert comme étant responsable d'une maladie génétique humaine : Ataxia Telangiectasia (d'où le nom du gène) (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009; Poehlmann and Roessner, 2010). Dans cette maladie, les cellules répondent de manière anormale aux irradiations et aux instabilités génomiques ce

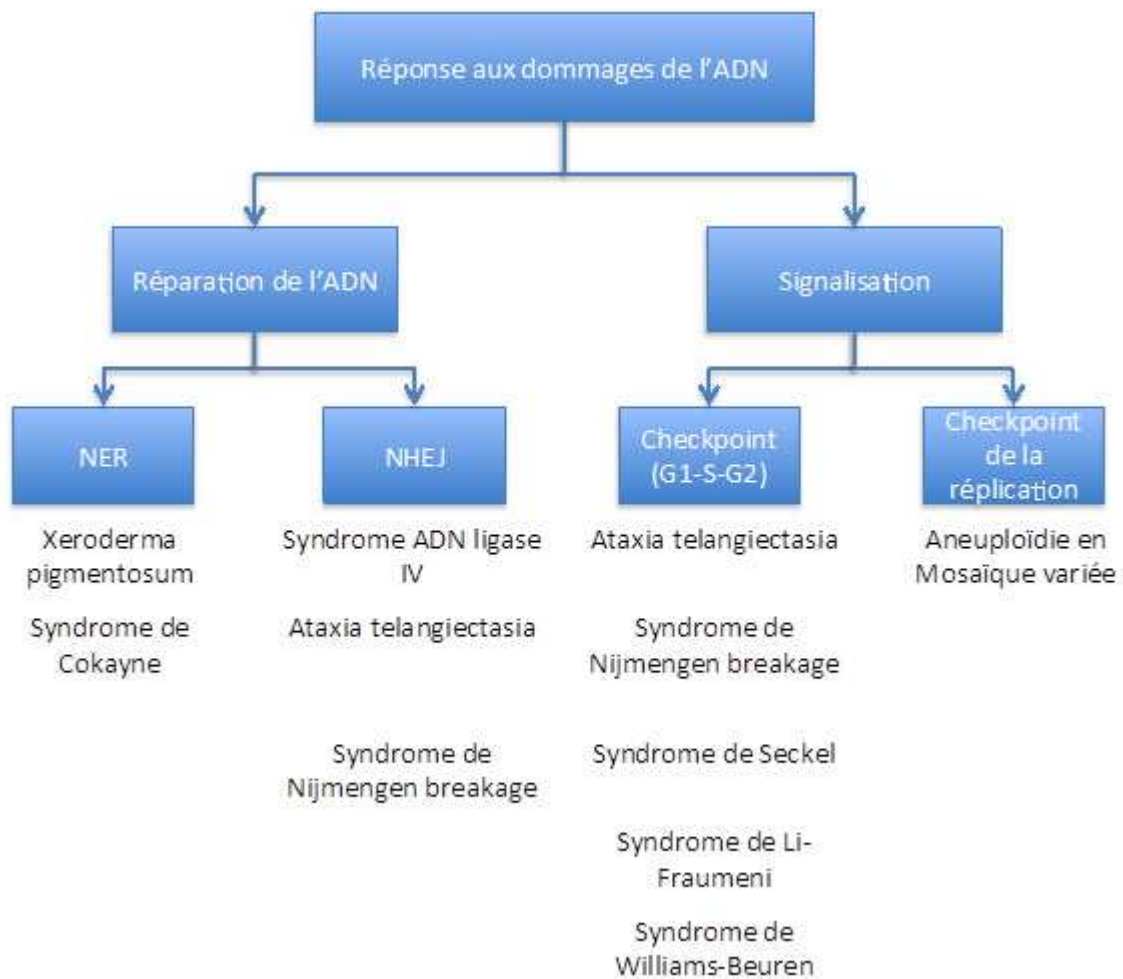
qui entraîne une déficience immune et une forte prédisposition au cancer (Poehlmann and Roessner, 2010). Le défaut typique de cette maladie résulte en une incapacité à phosphoryler et à activer p53 et CHK2 (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

Une haploinsuffisance de CHK1 chez la souris induit de multiples phénotypes liés à la tumorigenèse (Stracker et al., 2009). La mutation d'ATR est associée au syndrome de Seckel, une maladie développementale qui induit une microencéphalie (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009; Poehlmann and Roessner, 2010; Stracker et al., 2009), et la mutation de CHK2 est trouvée dans un grand nombre de cancers (Poehlmann and Roessner, 2010).

On trouve également la mutation de p53 dans 50% des tumeurs (Poehlmann and Roessner, 2010).

L'incapacité à reconnaître les lésions dans l'ADN cause également un certain nombre de maladies, comme c'est le cas du syndrome Nijmegen breakage (NBS) et de l'Ataxia Telangiectasia-like disorder qui consistent en la mutation du complexe MRN (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).

Il existe une liste croissante de pathologies humaines liées à des défauts d'efficacité des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN, quelques exemples sont donnés dans la Figure I7 (Kerzendorfer and O'Driscoll, 2009).



**Figure 17 : Quelques exemples de pathologies liées à un défaut de la réponse aux dommages de l'ADN.**

Pour certaines de ces pathologies le(s) gène(s) défectueux a (ont) été identifié(s) : ATM pour Ataxia Telangiectasia., Xeroderma pigmentosum est provoqué par la mutation de divers composants du NER, le syndrome de Cockayne est dû à la mutation des gènes CSA ou CSB impliqués dans le NER.. Le syndrome de Nijmegen breakage est la conséquence d'une mutation du complexe MRN, la mutation du gène BUB1B à pour conséquence l'aneuploïdie en mosaïque. D'après Kerzendorfer and O'Driscoll2009

## ***PARTIE 3 : La régulation du pool de nucléotides***

---

### ***1. Une régulation critique***

---

Les dNTPs sont requis, à la fois pour la réplication et pour différents aspects de la réparation. Le ratio entre les différents nucléotides et leur concentration absolue est hautement régulés.

Chez tous les organismes, la synthèse des dNTPs augmente au cours de la phase S pour satisfaire la demande lors de la réplication (Hofer et al., 2012; Niida et al., 2010b). La modification du niveau intracellulaire de nucléotides affecte la dynamique de la réplication chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Poli et al., 2012). Le niveau de nucléotides peut occasionnellement s'avérer insuffisant, en particulier lors de la réparation en dehors de la phase S (Poli et al., 2012). Une incapacité à fournir et à maintenir suffisamment de nucléotides dans la cellule peut conduire à des substitutions de bases voire la délétion ou l'insertion de nucléotides dans l'ADN lors de la réplication ou de la réparation (Bebenek et al., 1992; Kumar et al., 2011; Mathews, 2006), ce qui provoque des anomalies génétiques et entraîne la mort cellulaire (Chabes et al., 2003; Hofer et al., 2012; Poli et al., 2012).

L'équipe de Thelander a montré que le fait de maintenir le pool de nucléotides élevé confère une résistance aux stress génotoxiques, suggérant une corrélation directe entre l'augmentation du pool de dNTPs et la survie cellulaire en réponse aux stress génotoxiques (Chabes et al., 2003).

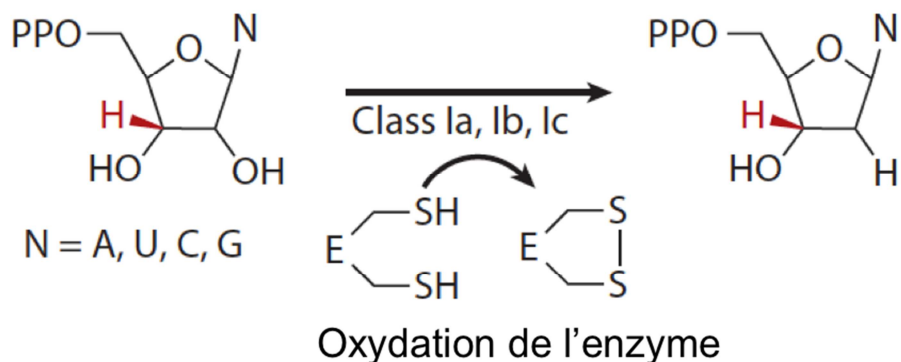
La concentration relative de chacun des dNTPs varie d'un organisme à un autre (Hofer et al., 2012). Par exemple, chez les mammifères on trouve le dGTP en faible concentration (5 $\mu$ M), suivi par le dATP (24 $\mu$ M), le dCTP (29 $\mu$ M) pour finir avec le dTTP (37 $\mu$ M) (Traut, 1994). La concentration en nucléotides est probablement optimisée pour minimiser le taux de mutation dépendant de l'affinité de l'ADN polymérase pour les différents nucléotides (Gon et al., 2011; Hofer et al., 2012). L'équipe de Chabes a d'une part montré qu'un déséquilibre du pool de nucléotide induisait une augmentation du taux de mutations spontanées, et d'autre part que le type de mutation et leur localisation était dépendante des nucléotides en déséquilibre (Kumar et al., 2011).



## 2. La ribonucléotide réductase

Dans la voie de synthèse des nucléotides, trois enzymes sont sujettes à une régulation allostérique ou à un rétro-contrôle : les dCMP/dCTPs déaminases, la désoxynucléoside kinase et la ribonucléotide réductase (RNR) (Hofer et al., 2012). La RNR est impliquée dans la synthèse des quatre nucléotides et joue un rôle critique dans la régulation du pool de nucléotides et leur équilibre (Mathews, 2006). Dans cette partie, nous allons nous arrêter quelques instants sur la ribonucléotide réductase (RNR).

La RNR est un complexe enzymatique qui joue un rôle central dans la synthèse *de novo* des nucléotides, nécessaire pour la synthèse de l'ADN et la réparation. Elle est impliquée dans l'étape limitante de synthèse des nucléotides en permettant la réduction du groupement 2' OH des ribonucléotides (di ou tri phosphates selon les organismes) pour donner des désoxyribonucléotides (Figure I8) (Cotruvo and Stubbe, 2011; Kolberg et al., 2004; Nordlund and Reichard, 2006). Cette réaction se fait à l'aide d'un radical thiyl au niveau de leur site actif. La réaction de réduction du ribose du ribonucléotide en désoxyribose induit une oxydation de l'enzyme, cette dernière est régénérée par un système de redoxines pour retrouver un état réduit et actif (Figure I8).



**Figure I 8 : Synthèse des nucléotides par la RNR.**

Réaction de réduction réalisée par les RNR (Cotruvo and Stubbe, 2011). Le NTP ou NDP (selon les organismes) se localise au niveau du site actif de l'enzyme. La réaction de réduction du ribose en 2' conduit à l'oxydation du centre catalytique de l'enzyme (formation d'un pont disulfure). Le site actif de l'enzyme doit alors être régénéré pour être en conformation réduite et pouvoir entrer dans un nouveau cycle catalytique.

### 2.1. Un complexe conservé au cours de l'évolution

Les ribonucléotides réductases ont été découvertes dans les années 1950 par Peter Reichard et existent dans les trois règnes du vivant (Follmann, 2004; Lundin et al., 2010). Cette enzyme est essentielle pour la survie cellulaire car elle est trouvée, à quelques exceptions près, dans tous les organismes vivants (y compris les virus et bactériophages. RNR database : <http://rnrd.b.molbio.su.se>) (Kolberg et al., 2004; Lundin et al., 2010; Lundin et al., 2009). Un ancêtre de la RNR était un prérequis pour la transition du monde ARN au monde ADN il y a plus de 3,5 milliards d'années (Lundin et al., 2010). Toutes les RNRs actuelles dérivent d'un ancêtre commun compte tenu de la relative conservation structurale de leur domaine catalytique (Jordan and Reichard, 1998; Lundin et al., 2010; Nordlund and Reichard, 2006). L'une des similarités les plus visibles se trouve être une structure tertiaire en tonneau  $\alpha/\beta$ , un motif unique qu'elles partagent avec les enzymes à radical glycyI (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004).

	Classe Ia	Classe Ib	Classe Ic	Classe II	Classe III
Métal/ cofacteur	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe Mn-O-Mn	Mn-O-Fe	Cobalamine	4Fe-4S, SAM
Structure	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha$ ou $\alpha 2$	$\alpha 2\beta 2$
Radical impliqué dans le turnover	Tyrosyl, thiyl	Tyrosyl, thiyl	Tyrosyl, thiyl	Deoxyadenosyl, thiyl	Deoxyadenosyl, glycyl, thiyl
Dépendance à l'oxygène	aérobique	aérobique	aérobique	indépendant	anaérobique
Substrats	NDP	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
Réducteur/ régénération	Thiorédoxine, glutarédoxine	NrdH- redoxine, glutarédoxine	nc	Thiorédoxine	Formate
Sites allostériques	2	1	2	1	2
Inhibition par le dATP	oui	non	oui	non	oui
Occurences	Eucaryotes Bactéries Bactériophages virus	Bactéries	Bactéries Archaeobactéries	Archaeobactéries Bactéries Eucaryotes	Archaeobactéries Bactéries Bactériophages Eucaryotes

**Tableau I 3 : Synthèse des caractéristiques de chacune des classes de ribonucléotides réductases**

D'après Kolberg et al., Cotruvo et al 2011  
SAM : S-adenosylméthionine  
Nc : non connu

Des travaux phylogénétiques de Lundin et al., en vue de retracer l'histoire de la RNR depuis LUCA (Last Universal Common Ancestor) et LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor) ont permis de mettre au jour des transferts horizontaux de gènes de la RNR des eucaryotes vers les bactéries et *vice-versa* (Lundin et al., 2010).

Les RNRs peuvent être regroupées en trois classes basées sur la manière dont elles interagissent avec l'oxygène et le métal utilisé pour générer le radical thyl au niveau du site actif de l'enzyme (tableau I3) (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004; Nordlund and Reichard, 2006).

A l'intérieur de chaque classe, les enzymes montrent une nette homologie de séquence, alors qu'entre différentes classes ce n'est pas le cas, toutefois elles se ressemblent par leur structure tertiaire. A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'identifier quelle classe de RNR actuelle est la plus proche de la RNR ancestrale (Lundin et al., 2010).

## 2.2. Trois classes de RNR

### 2.2.1. Un mode de fonctionnement commun

Mis à part certaines différences, leur mode de fonctionnement est sensiblement comparable (Sjöberg, 1997). Le site actif possède trois cystéines. La fixation du substrat conduit à un transfert couplé d'électron/proton d'une des cystéine du site actif de la sous unité R1, qui se trouve ainsi sous sa forme oxydée en radical thyl ( $-S\bullet$ ), vers le radical de la sous-unité R2. Puis la réduction du ribose induit l'oxydation des deux cystéines restantes du site actif (formation d'un pont disulfure S-S). A la fin de la réaction, un transfert d'électron/proton permet la réoxydation de la tyrosine de la sous-unité R2 en radical tyrosyl, et le radical thyl de la sous-unité R1 est réduit en cystéine. La paire de cystéines, de la sous-unité R1, formant le pont disulfure est à son tour réduite par le biais d'une paire de cystéine présente à l'extrémité C-terminale de la sous-unité R1, qui forment à leur tour un pont disulfure. La réduction de ce pont disulfure implique la présence d'un système de régénération de l'enzyme, variant en fonction de la classe de RNR (tableau I3) (Eklund et al., 2001; Graslund and Ehrenberg, 2007; Holmgren and Sengupta, 2010).

### 2.2.2. Leurs particularités

Les RNRs de classe I sont prédominantes chez les eucaryotes, mais on les trouve également chez les bactéries, les virus et quelques rares archae. Elles ont pour substrat les 5'-

nucléosides diphosphates (NDPs). Les RNRs de classe II sont principalement trouvées chez les bactéries et les virus mais également chez quelques eucaryotes unicellulaires. Certaines des RNRs de cette classe utilisent comme substrat les NDPs, mais la plupart utilisent les 5'-nucléosides triphosphates (NTPs). On trouve principalement les enzymes de classe III chez les bactéries, les Archae, les bactériophages et quelques eucaryotes. Ces enzymes utilisent les NTPs comme substrat (Hofer et al., 2012).

Leur répartition dans le monde vivant est en partie due à leur mode de fonctionnement, ainsi les RNRs de classe I sont strictement aérobies, alors que les RNRs de classe III sont strictement anaérobies, quant à celles de classe II elles n'ont pas de « préférence » (Cotruvo and Stubbe, 2011; Hofer et al., 2012; Jordan and Reichard, 1998; Nordlund and Reichard, 2006). Il est possible de trouver au sein du même organisme deux classes de RNR. Il s'avère même que 5% des bactéries, une Archae et trois eucaryotes unicellulaires (RNR database : <http://rnrdm.molbio.su.se> (Lundin et al., 2009)) possèdent les trois classes de RNR.

La réduction des ribonucléotides implique la présence d'un système qui réduit les ponts disulfures formés à chaque cycle catalytique. Ainsi les RNRs de classe I et de classe II utilisent les thioredoxines et les glutarédoxines, tandis que celles de classe III utilisent le formate comme donneur d'électrons (Hofer et al., 2012; Nordlund and Reichard, 2006).

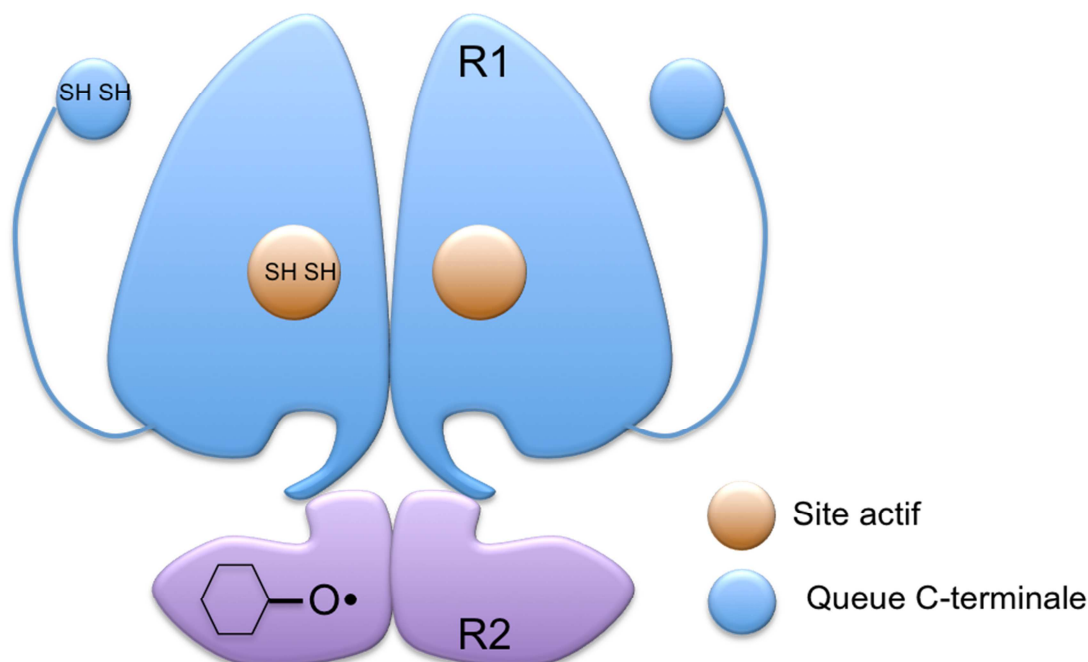
### 2.2.3. Aparté sur les RNRs de classe I

Tous les eucaryotes possèdent une RNR de classe I, c'est pourquoi nous allons nous arrêter quelques instants sur son fonctionnement général avant d'entrer dans le détail de sa régulation (voir paragraphe 4).

Toutes les RNRs de classe I possèdent deux sous-unités, une grosse appelée R1 (un dimère  $\alpha_2$ ) et une petite nommée R2 (un dimère  $\beta_2$ ), qui sont toutes les deux essentielles pour l'activité de l'enzyme (Figure I9)(Hofer et al., 2012; Jordan and Reichard, 1998; Kolberg et al., 2004; Nordlund and Reichard, 2006). La sous-unité R1 possède le site catalytique abritant le radical thiyl et parfois deux sites de régulation allostérique (voir paragraphe 4.1) (Figure I9), Les sous-unité R1 possèdent également une extrémité C-terminale flexible possédant un motif CXXC (Cystéine-deux acides aminés aléatoires-cystéine), nécessaire à la viabilité cellulaire, permettant de régénérer le site catalytique (Jordan and Reichard, 1998; Kolberg et al., 2004; Zhang et al., 2007). La sous-unité R2, possède un centre métallique permettant la

formation d'un radical tyrosyl qui est capable de générer le radical thiyl au niveau du site actif de la sous-unité R1.

De multiples structures des sous-unités de RNRs de classe I sont présentes dans la banque de données protéiques (PDB), cependant il n'existe pas de structure du complexe entier. Dans tous les cas, la structure de la sous-unité R1 est incomplète, son extrémité C-terminale étant flexible. Il a été montré que le mode d'interaction entre la grosse sous-unité et la petite sous-unité était vraisemblablement conservé (Xu et al., 2006). En analysant la liaison de nonapetides des parties C-terminale de R2, l'équipe de Dealwis a pu définir la zone d'interaction entre R1 et R2 ; chez la levure *S.cerevisiae*, la partie C-terminale de R2 se loge



**Figure I 9 : La RNR de classe Ia de la levure *Saccharomyces cerevisiae***

La sous-unité R1 possède le site catalytique abritant le radical thiyl et une queue C-terminale flexible permettant la régénération du site actif. La sous-unité R2 possède un centre métallique permettant la formation du radical tyrosyl qui est capable de générer le radical cytéinyl au niveau du site actif (Camier et al., 2007).

dans une poche formée par les hélices  $\alpha 13$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha H$ ,  $\alpha I$  et le brin  $\beta I$  de la sous-unité R1 (Xu et al., 2006).

La classe I est subdivisée en trois sous-classes qui diffèrent par la nature du centre métallique de la petite sous-unité (Figure I9) (Cotruvo and Stubbe, 2011; Hofer et al., 2012). Ainsi les eucaryotes possèdent tous presque exclusivement des RNRs de classe Ia.

Comme évoqué précédemment, les RNRs utilisent des systèmes réducteurs de type « rédoxines » pour réduire les ponts disulfures à chaque cycle catalytique. Pour les RNRs de classe I, ces systèmes sont les thiorédoxines et les glutarédoxines. Des études ont été menées chez la bactérie *E.coli*, afin d'étudier l'importance relative des systèmes « rédoxines » dans la régénération de la RNR en comparant l'implication des différentes thiorédoxines (Trx1 et Trx2) et glutarédoxines (Grx1, Grx2 et Grx3)(Potamitou et al., 2002). Chez *E.coli*, la glutarédoxine Grx1 est le donneur majeur d'électrons pour la RNR, suivi de la thiorédoxine Trx1 (Potamitou et al., 2002). L'équipe de Marsolier-Kergoat a découvert que chez la levure *S.cerevisiae*, les thiorédoxines sont utilisées préférentiellement pour réduire les ponts dissulfure formés lors du cycle catalytique de la RNR (Camier et al., 2007). Ce qui montre une utilisation variable des systèmes réducteurs en fonction des organismes.

### ***3. Le cas particulier de Saccharomyces cerevisiae***

---

Contrairement aux autres RNRs de classe Ia, chez *S. cerevisiae*, la ribonucléotide réductase est composée de quatre sous-unités distinctes. La grosse sous-unité R1 peut être formée d'un homodimère de Rnr1 ou d'un hétérodimère Rnr1-Rnr3, et la petite sous-unité R2 est formée d'un hétérodimère Rnr2-Rnr4 (Kolberg et al., 2004; Nordlund and Reichard, 2006). Rnr3 est la seule sous-unité non essentielle (Elledge and Davis, 1990). L'équipe de Davis a montré que *RNR3* code une sous-unité fonctionnelle puisque sa surexpression permet de sauver la létalité de souches *rnr1Δ* (Elledge and Davis, 1990). Le gène *RNR3* est faiblement exprimé en conditions standard de croissance et son expression est fortement induite en présence de dommages de l'ADN (Kolberg et al., 2004).

Les petites sous-unités Rnr2 et Rnr4 ne présentent que 47% d'identité entre elles (Kolberg et al., 2004). Selon les contextes, les mutants *rnr4* sont inviables ou présentent une croissance fortement altérée (Huang and Elledge, 1997; Wang et al., 1997). En plus de la tyrosine permettant la formation du radical tyrosyl, Rnr2 possède la séquence typique des sous-unités R2, avec tous les résidus utilisés pour la formation du centre diferrique présents dans R2 de *E. coli* (His179, His276, Glu176, Glu239, Glu273 et Asp145 dans Rnr2p). Trois des 6 acides aminés conservés impliqués dans la liaison du fer chez Rnr2 sont modifiés chez Rnr4 (2 des histidines sont substituées par des tyrosines et un des glutamates par une arginine). En conséquence, Rnr4 ne lie pas le fer et n'est donc pas capable de former un radical tyrosyl

(Kolberg et al., 2004; Voegtli et al., 2001), il est néanmoins important pour la viabilité cellulaire. Il a été proposé que Rnr4 stabiliserait une hélice dans Rnr2 et participerait à la stabilisation du centre di-ferrique au sein de Rnr2 (Xu et al., 2006). Rnr2 et Rnr4 se lient à Rnr1 par leur partie C-terminale qui se trouve être désordonnée (Xu et al., 2006). A noter que une sous-unité Rnr1 peut lier indifféremment Rnr2 ou Rnr4, mais elle ne peut pas lier les deux en même temps (Xu et al., 2006).

#### ***4. Une enzyme hyper régulée***

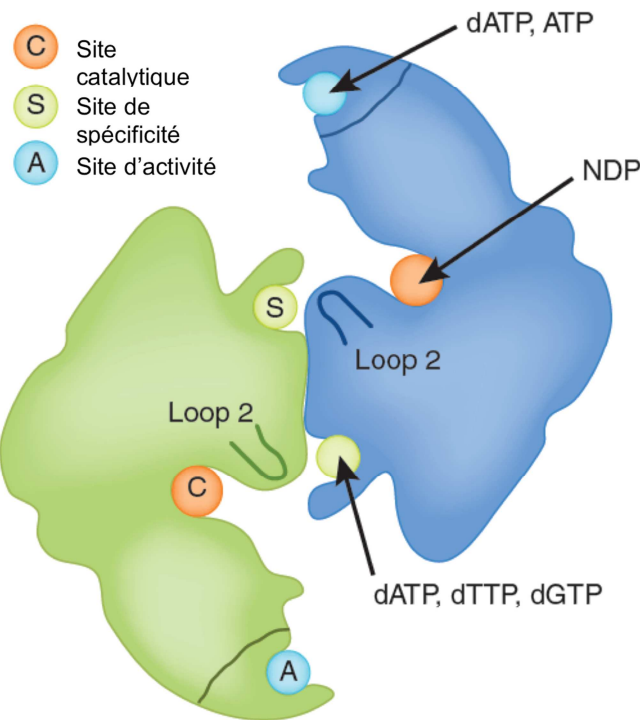
La RNR est cruciale pour la synthèse des dNTPs. Comme indiqué précédemment, la régulation du pool de nucléotides est critique pour le maintien de la stabilité génomique. Ce contrôle critique du pool de déoxyribonucléotides passe par la régulation étroite du complexe enzymatique RNR à de multiples étapes ; allostériquement, transcriptionnellement et à différents autres niveaux.

L'objet de ma thèse portant sur la régulation de la RNR chez *S.cerevisiae*, nous nous attarderons principalement sur les régulations effectives chez cet organisme modèle, en évoquant néanmoins certaines des régulations observées dans d'autres organismes. Par conséquent cette partie ne traitera que de la spécificité des RNRs de classe Ia.

##### *4.1. Allostériquement*

La régulation allostérique de la RNR telle que nous la connaissons aujourd'hui a été découverte pour la première fois par Reichard en 1969 lors de ses travaux sur la RNR Ia de *E.coli* (Reichard, 2002). Pour cette régulation, les RNR de type Ia possèdent deux sites ; un site de spécificité (site-S), et un site d'activité (site-A) (Figure I10) . Le site-S sert à déterminer quel substrat sera réduit par le site catalytique (et donc participe au contrôle de la concentration relative des différents nucléosides/nucleotides produits), tandis que le site-A agit comme un interrupteur sur l'activité de l'enzyme (il s'agit d'une régulation générale de l'activité de l'enzyme, régulation positive par l'ATP et négative par le dATP) (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004; Reichard, 2002). Alors que les enzymes de classe Ia possèdent ces deux sites de régulation, celles de classe Ib ont perdu la région N-terminale portant le site-A et de ce fait ne possèdent que le site-S (Hofer et al., 2012; Jordan and Reichard, 1998). Cependant, les enzymes de classe I procaryotes sont régulées par NrdR, une protéine qui

contient le domaine de liaison à l'ATP/dATP qui mime donc le site-A (Cotruvo and Stubbe, 2011). Il existe peu d'enzymes de classe II possédant le site-A (Hofer et al., 2012; Reichard, 2002).



**Figure I 10 : Vue schématique des modes de régulation allostérique de la RNR Ia et III.**

Le site actif et les deux sites de régulation se trouvent sur la grosse sous-unité de la RNR (seule à être représentée ici). L'activité de la RNR est gouvernée par la fixation de l'ATP (activateur) et du dATP (inhibiteur) au niveau du site d'activité dans la partie N-terminale de la sous-unité catalytique (site-A). La spécificité du substrat est régulée par la liaison des dNTPs au niveau du site de spécificité qui se situe à l'interface d'interaction (site-S). La boucle 2 est une boucle flexible impliquée dans la transmission du signal de spécificité. (Loop 2) D'après Logan 2011

La régulation allostérique par le site-S évite que la concentration de chaque dNTP n'augmente trop par rapport à celle des autres nucléotides. Rappelons que la concentration relative de chaque dNTPs varie d'un organisme à un autre. Le site-S peut lier l'ATP, le dATP, le dTTP et le dGTP, (Reichard, 2002) par contre il ne lie pas efficacement le dCTP par conséquent, une régulation des dCMP (ou dCTP chez *E. coli*) deaminase est nécessaire pour réguler le ratio dCTP/dTTP (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004). La liaison de l'ATP ou du dATP stimule la réduction du CDP et de l'UDP, tandis que la liaison du dTTP et du dGTP stimule respectivement la réduction du GDP et de l'ADP (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004; Logan, 2011; Reichard, 2002). Leur synthèse suit une régulation précise, ainsi il a été montré dans les cellules de mammifères que suite à une inhibition de la RNR par



l'hydroxyurée (voir paragraphe 4.3), le premier dNTP à voir sa concentration augmentée, après la levée de l'inhibition à l'hydroxyurée, était le dGTP, suivi du dATP puis du dCTP, le dTTP restant élevé après ce blocage car il peut être obtenu à partir de la thymidine présente dans le milieu de culture (Hofer et al., 2012; Hofer et al., 1998).

La liaison de l'effecteur allostérique au site-S, pour les enzymes de classe I, stimule la dimérisation de la sous-unité R1 et sa liaison avec la sous-unité R2, pour former un complexe actif  $\alpha_2\beta_2$  (Kashlan et al., 2002). Le site-S est en contact avec le site catalytique *via* une boucle flexible nommée boucle 2 (Figure I10) (Larsson et al., 2004). Quand l'effecteur allostérique se lie au site-S, cela engendre une modification de la conformation de cette boucle qui modifie la capacité du site actif à lier un substrat plutôt qu'un autre (Hofer et al., 2012).

Quant au site-A, c'est un « cône ATP » (composé de quatre hélices  $\alpha$ , surmontées d'une petite épingle à cheveux  $\beta$ ) situé en partie N-terminale de la sous-unité catalytique (Figure I10) (Hofer et al., 2012). Il peut lier l'ATP qui jouera un rôle d'activateur, ou le dATP, qui lui jouera un rôle d'inhibiteur (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004; Reichard, 2002). Il a été montré que le dATP, par l'absence du groupement 2'-OH, était capable de s'insérer plus profondément dans le cône que l'ATP, expliquant la différence de régulation observée suite à la liaison de l'un ou l'autre (Hofer et al., 2012). Cette régulation est requise pour stopper l'activité de l'enzyme quand le niveau de dNTPs intracellulaire devient trop important. Le dATP présente une affinité dix à vingt fois plus faible pour le site-A que pour le site-S chez les cellules de mammifères et chez *E.coli* (Hofer et al., 2012; Kolberg et al., 2004; Reichard et al., 2000). Par conséquent, selon sa concentration, le dATP ne lie que le site-S ou lie à la fois le site S et le site A et inactive l'enzyme. L'ATP a, lui, une affinité comparable pour le site-S et le site-A.

Les enzymes de classe I des eucaryotes, sont capables de former des complexes  $\alpha_6\beta_2$  qui seront soit actifs soit inactifs, tout dépendra si c'est l'ATP ou le dATP qui est lié au site-A (Kashlan et al., 2002). Il a même été proposé par l'équipe de Cooperman qu'il existait un troisième site sur la sous-unité R1 des mammifères ; le site-H pour hexamérisation (Kashlan et al., 2002). Une oligomérisation inhibitrice (mais cette fois de type  $\alpha_4\beta_4$ ) a également été observée chez *E.coli* en présence de dATP (Rofougaran et al., 2008).

Le site-A et le site-S sont capables de communiquer entre eux (Hofer et al., 2012). Le dNTP lié au site-S peut également avoir un effet sur l'affinité pour le site-A (Rofougaran et al., 2008), bien que la distance entre ces deux sites soit grande.

#### 4.2. Transcriptionnellement

##### 4.2.1. Au cours du cycle cellulaire

La transcription des gènes de la RNR est couplée au cycle cellulaire.

Chez les mammifères, lors de la réplication en phase S, il y a besoin de la RNR, plus précisément du complexe formé de R1 et R2 (Hakasson et al 2006). Les deux gènes sont transcrits différemment au cours du cycle cellulaire (Jordan and Reichard, 1998). La sous-unité R2 est faiblement transcrite en phase G1, mais sa transcription augmente fortement en limite de phase G1/S (Bjorklund et al., 1992). Il en est de même pour la transcription de la sous-unité R1 (Bjorklund et al., 1992).

Chez la levure bourgeonnante *S.cerevisiae*, l'expression des sous-unité Rnr1 et Rnr2 est également régulée au cours du cycle cellulaire, plus précisément, elle augmente en fin de phase G1 puis en phase S, tout comme les gènes de l'ADN polymérase afin de préparer les cellules à la réplication de l'ADN (Elledge and Davis, 1990).

Chez la plante *Nicotiana tabacum* on retrouve également une régulation de la transcription des gènes de la RNR dépendante du cycle cellulaire avec un maximum obtenu en phase S (Chabouté et al., 1998). L'induction de la transcription de *RNR2* est dépendante de la présence du facteur de transcription E2F-like (Chabouté et al., 2000). Le gène *RNR2* possède des éléments cis-régulateur dont un motif pour la fixation du facteur de transcription E2F (Chabouté et al., 2000). Ces éléments cis-régulateurs sont protégés à certains moments du cycle cellulaire par des protéines nucléaires (Chabouté et al., 2000). Ces motifs de fixation E2F-like sont également présents au niveau du promoteur de *RNR1* (Chabouté et al., 2000).

##### 4.2.2. En réponse aux dommages de l'ADN

De nos jours, la régulation des gènes de la RNR est l'exemple le plus décrit de réponse transcriptionnelle consécutive aux dommages de l'ADN chez les eucaryotes (Fu et al., 2008; Gasch et al., 2001). D'ailleurs la transcription des gènes de la RNR augmente en réponse aux dommages de l'ADN, aussi bien chez les entérobactéries que chez les eucaryotes (Jordan and Reichard, 1998).

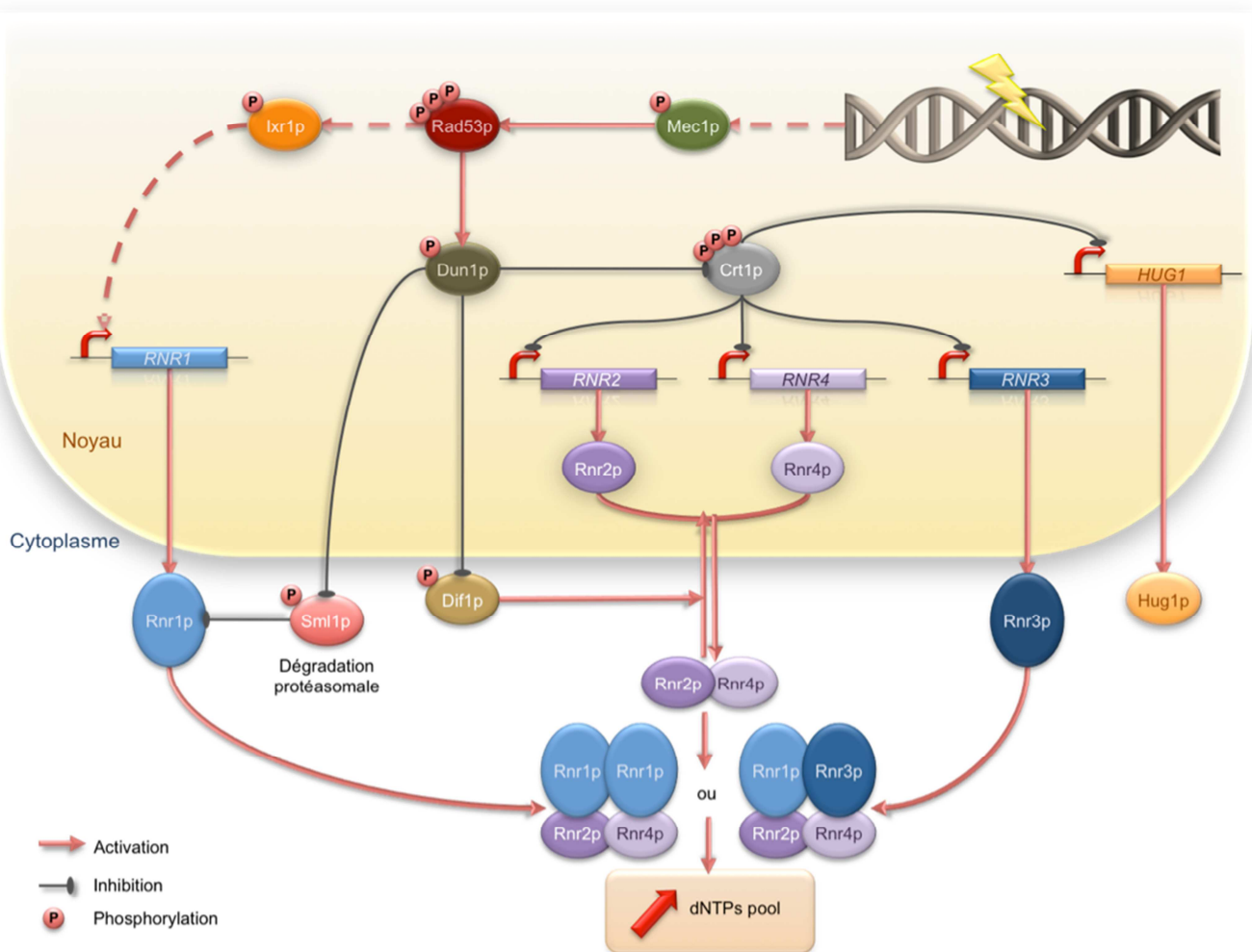
Chez les mammifères, il existe une deuxième petite sous-unité R2 nommée p53R2. Cette sous-unité est induite en réponse aux dommages de l'ADN et le monoxyde d'azote<sup>3</sup> (NO) (Guittet et al., 2008; Holmgren and Sengupta, 2010; Tanaka et al., 2000) et son induction se fait par le biais de p53 d'une manière dépendante de la voie ATM/CHK2 (Tanaka et al., 2000). Il se trouve que l'inhibition de la transcription de p53R2 réduit l'activité de la RNR, la réparation de l'ADN, la survie des cellules après traitement avec divers stress génotoxiques (Tanaka et al., 2000). L'activation de p53R2 en réponse au NO se fait dans certains cas même en absence de p53, ce qui suggère l'existence d'une voie de régulation indépendante de p53 (Guittet et al., 2008). En effet, en utilisant des mutants dominants négatifs de p73 (un membre de la famille p53), l'équipe de Lepoivre a montré que les différents membres de la famille p53 pouvaient réguler p53R2 (Guittet et al., 2008). Par contre, la sous-unité R2 est sous exprimée en réponse au NO (Guittet et al., 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois sous-unités R2 : *AtTSO2*, *AtRNR2A*, *AtRNR2B* (Roa et al., 2009). Ces sous-unités répondent de manière différente aux stress génotoxiques. Ainsi, alors que la transcription de *AtRNR2A* et *AtRNR2B* est induite par l'hydroxyurée (qui induit un stress répliatif), la transcription de *AtTSO2* est induite par un traitement à la bléomycine (qui induit des cassures double brin) tout comme la transcription du gène codant pour la grosse sous-unité R1 (*AtRNR1*) (Roa et al., 2009). La transcription du gène *AtTSO2* est contrôlée par le facteur de transcription *AtE2Fa* qui lui-même est induit en réponse à un traitement à la bléomycine de manière ATM-dépendante (Roa et al., 2009). En conclusion, l'induction transcriptionnelle de *AtRNR2A* et *AtRNR2B* est un marqueur des stress répliatifs alors que l'induction de la transcription de *AtTSO2* est un marqueur de la réponse aux cassures double brin (Roa et al., 2009).

Chez *S. cerevisiae*, l'induction de la transcription des gènes de la RNR est maximale en réponse aux dommages de l'ADN et à un stress répliatif. Chez *S. cerevisiae*, *Rnr3*, *Rnr2* et *Rnr4* sont régulés transcriptionnellement par la protéine *Crt1* (aussi nommé *Rfx1*) (Figure

---

<sup>3</sup> Le monoxyde d'azote est un messager endogène possédant une variété d'effets biologiques. Le NO est une importante molécule effectrice dans la défense immunitaire contre les pathogènes et les tumeurs. Le NO et ses dérivés peuvent modifier les bases de l'ADN engendrant des cassures de l'ADN ou des cross-link. Il a été montré que les effets pathologiques du NO activaient la voie p53.



**Figure I 11 : Vue schématique de la régulation de la ribonucléotide réductase en réponse aux dommages de l'ADN.**

En réponse aux dommages de l'ADN, Rad53 est activé par phosphorylation par Mec1 ce qui permet l'activation par phosphorylation de la kinase Dun1. Dun1 peut alors agir sur ses multiples cibles qui se trouvent tous être des inhibiteurs de la ribonucléotide réductase (RNR).

Dun1 inhibe Crt1 en le phosphorylant ce qui entraîne la transcription de trois des gènes de la RNR.

Dun1 inhibe Dif1 en le phosphorylant ce qui entraîne la relocalisation vers le cytoplasme de la petite sous unité de la RNR.

Enfin Dun1 inhibe également par phosphorylation la protéine Sml1 permettant la levée de l'inhibition de la grosse sous unité RNR1.

111). Il a été montré que l'induction de la transcription des gènes de la RNR, en réponse aux dommages de l'ADN, était indépendante du cycle cellulaire (Elledge and Davis, 1989; Elledge and Davis, 1990). Crt1 est l'une des protéines effectrices de la réponse aux dommages de l'ADN. C'est une protéine de liaison à l'ADN, elle reconnaît une séquence (X-box) en position 5' UTR des gènes. Ce motif est similaire à celui reconnu chez les mammifères par les facteurs de transcription RFX qui interviennent dans la régulation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. En se fixant à l'ADN, Crt1 agit en recrutant des répresseurs généraux de la transcription qui sont Cyc8 (aussi nommé Ssn6) et Tup1 (Zaim et al., 2005). En réponse aux

dommages de l'ADN, Crt1 est phosphorylé par Dun1, une des cibles de Rad53. Crt1 sous sa forme hyperphosphorylée se décroche alors de l'ADN empêchant la formation d'un complexe répresseur, conduisant à la levée de la répression transcriptionnelle de ces trois gènes de la RNR (Zaim et al., 2005). De plus la transcription de *RNR3* est régulée également par des histones déacétylases (HDACs) qui régulent son expression en déacétylant les histones au niveau de l'URS du promoteur de *RNR3* (Sharma et al., 2007).

Pour Rnr1, la situation est plus complexe. En effet ce dernier ne possède pas le motif de reconnaissance par Crt1. Environ sept régions ont été identifiées comme de potentiels sites de régulation (Mao and Brody, 2010), néanmoins sa régulation transcriptionnelle demeure énigmatique. On sait que l'expression de *RNR1* requiert la présence de Ixr1 ; un facteur de transcription de la famille HMG (High mobility group), cible indirecte de Rad53 (Tsaponina et al., 2011). Cependant, Ixr1 n'aurait qu'une action indirecte sur la transcription de *RNR1*.

#### 4.3. et autrement

##### 4.3.1. Régulation de la stabilité des sous-unités

Chez la souris, le niveau des ARNs messagers des gènes codant pour R1 et R2 varie de la même manière au cours du cycle cellulaire (Jordan and Reichard, 1998). Cependant la quantité de protéines de la sous-unité R1 reste constante alors que la quantité de protéines de la sous-unité R2 fluctue au cours du cycle cellulaire (Jordan and Reichard, 1998). La différence de quantité protéique est due à la différence de demi-vie des deux sous-unités (3 heures pour R2, 20 heures pour R1) (Engström et al., 1985; Eriksson et al., 1984; Mann et al., 1988). R2 est spécifiquement stabilisé durant la phase S (sa stabilité est telle que sa demi-vie passe à plus de 20h) et dégradé rapidement durant la mitose (Mann et al., 1988). En testant un inhibiteur du protéasome sur des cellules synchronisées en phase S, il a été observé que les cellules restaient bloquées en mitose, signe qu'une protéine doit être dégradée pour passer la mitose (Chabes and Thelander, 2000). Il se trouve que R2 est phosphorylé sur la sérine 20 par des kinases régulées par le cycle cellulaire, ce qui en fait un bon candidat pour une dégradation dépendante du cycle cellulaire (Chabes and Thelander, 2000). Cette phosphorylation est effective durant les phases S et G2 et disparaît en mitose, donc R2 est présente en phase S (Chabes and Thelander, 2000). Par conséquent la régulation dépendante du cycle cellulaire de la RNR est contrôlée par la régulation de la petite sous-unité (Engström et al., 1985).

#### 4.3.2. Régulation de la compartimentation sub-cellulaire des sous-unités

Chez *S. cerevisiae*, la grosse sous unité est cytoplasmique. La petite sous-unité est quant à elle nucléaire. Ce n'est qu'en période de synthèse de l'ADN ou en réponse aux dommages de l'ADN que la petite sous-unité est délocalisée vers le cytoplasme, permettant ainsi sa rencontre avec la grosse sous-unité et la formation d'un complexe actif. Cette régulation se fait en partie par le biais de Dif1 (chez *S.cerevisiae*) et Spd1 (chez *S.pombe*) (voir chapitre II) (Lee et al., 2008; Nestoras et al., 2010; Wu and Huang, 2008). Ainsi, en dehors de la phase S et des réponses aux dommages de l'ADN, la petite sous-unité est importée vers le noyau par Dif1 où elle est maintenue dans le noyau par l'ancrage opéré par Wtm1. Quand la cellule nécessite la synthèse de nucléotides, par exemple en réponses aux dommages de l'ADN, Dif1 est phosphorylé par Dun1 conduisant à sa dégradation et stoppant l'import nucléaire de Rnr2/Rnr4, entraînant l'accumulation de R2 dans le cytoplasme, ce qui favorise son association à R1.

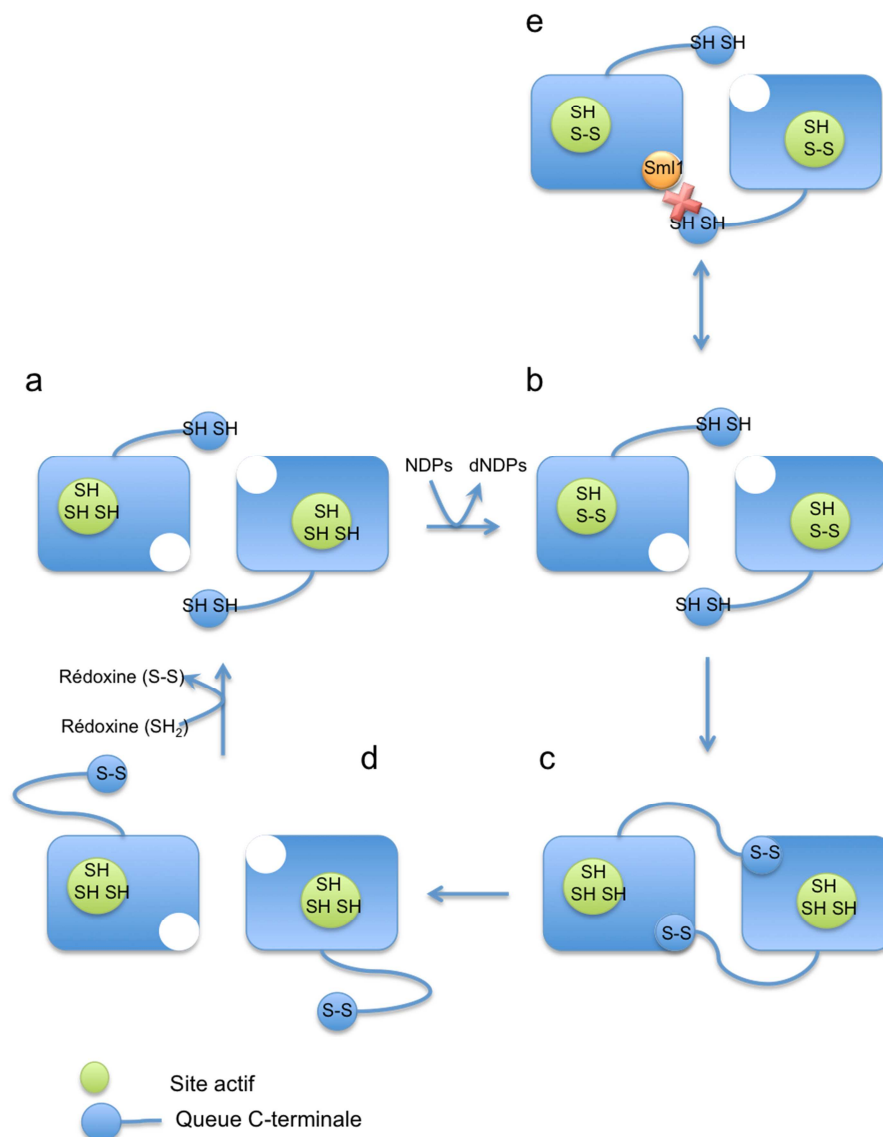
Chez la levure fissipare *S. pombe*, il existe un homologue de Dif1 ; Spd1 (voir chapitre II) qui agit selon un mode comparable de Dif1 à la seule différence qu'il est capable de lier à la fois la grosse sous-unité et la petite sous-unité (Håkansson et al., 2006; Liu et al., 2003; Nestoras et al., 2010).

Chez les mammifères, la concentration totale en dNTPs n'augmente pas de façon notable en réponse aux dommages de l'ADN. Cependant le complexe RNR est recruté au niveau des cassures double brin au cours du processus de réparation, favorisant une forte concentration locale en dNTPs. Ce recrutement se fait par le biais de l'association entre R1 et l'histone acétyl-transférase Tip60 (Niida et al., 2010a). Le niveau global de Tip60-R1 présent sur la chromatine n'est pas affecté par les dommages de l'ADN, néanmoins une déplétion en Tip60 conduit à une diminution de la quantité de R1 à la chromatine (Niida et al., 2010a), signe que le recrutement de R1 à la chromatine est dépendante de Tip60. Toutefois les dommages de l'ADN induisent une augmentation de la liaison de Tip60 et R1 au niveau du dommage (Niida et al., 2010a).

#### 4.3.3. Inhibition par des inhibiteurs protéiques

Chez la levure *S. cerevisiae*, dans le cytoplasme, la grosse sous-unité est inhibée par la petite protéine Sml1 (Figure I12) (voir le chapitre II). En réalisant des mutants aléatoires, l'équipe de Rosthein a pu identifier que la partie C-terminale de Sml1 intervenait dans l'interaction

avec Rnr1 (Zhao et al., 2000). La partie C-terminale de Sml1 présente des similarités avec la partie C-terminale des sous-unités R2 mais ne semble pas entrer en compétition avec R2 pour la liaison à R1 (Chabes et al., 1999). Sml1 parvient à inhiber Rnr1 en entrant en compétition avec le domaine C-terminal (le motif CXXC) de Rnr1 empêchant la régénération du site actif de Rnr1 (Zhang et al., 2007).



**Figure I 12 : Modèle du rôle de la queue C-terminale de Rnr1 dans la régénération du site actif et son inhibition par Rnr1.**

(a) la RNR est sous sa forme active. (b) En réduisant le ribose du NDP un pont disulfure se forme au niveau du site actif de la sous-unité R1. (c) Un échange entre la queue C-terminale et le site actif de l'enzyme permet de régénérer le centre catalytique. A noter que cette régénération s'opère en trans entre le site catalytique d'une des sous-unités R1 et la partie C-terminale de l'autre sous-unité. (d) Les systèmes rédoxines prennent en charge la réduction des deux cystéines de la partie C-terminale L'enzyme retrouve son état actif. (e) Sml1 interviendrait au moment où le site catalytique est oxydé et empêcherait la partie C-terminale de Rnr1 de se fixer au domaine N-terminal. La régénération du site actif serait alors inhibée. D'après Zhang et al., 2007.

#### 4.3.4. Inhibition par des inhibiteurs non protéiques

L'activité de la RNR est cruciale pour les cellules se divisant rapidement, c'est pourquoi elle est souvent la cible de traitement anticancéreux.

Il existe des inhibiteurs non naturels de la ribonucléotide réductase ; l'hydroxyurée (HU) et la gemcitabine en font partie (Xu et al., 2006). L'hydroxyurée est un composant chimique qui a été utilisé en cancérothérapie bien avant que l'on connaisse l'existence de la RNR (Fishbein and Carbone, 1963; Yarbro, 1968). A cette époque on avait déjà identifié un des effets de l'Hydroxyurée ; le blocage de l'incorporation des nucléotides dans l'ADN (Yarbro, 1968). Ce n'est que plus tard que son mode d'action est découvert : l'hydroxyurée est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase. Il réduit le radical tyrosyl de la petite sous unité R2, inactivant ainsi l'enzyme (Yarbro, 1992).

La gemcitabine est une drogue anticancéreuse analogue à la déoxycytidine, elle est métabolisée intra-cellulairement en 5'-diphosphate-2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdCDP) qui inhibe la RNR (Heinemann et al., 1990; Pereira et al., 2004). Cette inhibition est du type suicide : l'inhibiteur est pris en charge par l'enzyme qui le prend pour un nucléotide, et réagit avec R1 ou R2 (dépendant de la présence de réducteurs ou non) ce qui conduit à la formation d'un produit anormal et la perte de l'activité catalytique de la RNR (Pereira et al., 2004; van der Donk et al., 1998). La liaison du dFdCDP se fait différemment de celle de la déoxycytidine au niveau du site actif de Rnr1 et fait que la boucle 2 adopte une conformation différente (Xu et al., 2006).

Le monoxyde d'azote (NO) est un inhibiteur de la RNR (Roy et al., 2004). Une des causes possible de cette inhibition est une perte du radical tyrosyl de la sous-unité R2 suite à une réaction entre le radical et le NO et cette réaction est facilement réversible (Roy et al., 2004).

## ***PARTIE 4 : Les protéines intrinsèquement désordonnées***

---

De nombreuses voies de signalisation telles que la réponse aux dommages de l'ADN et la régulation de la RNR se font par le biais de protéines. Comme nous avons pu le voir pour la RNR, les protéines adoptent la plupart du temps une structure tridimensionnelle typique. Cependant, il existe une catégorie de protéines ne possédant pas cette caractéristique ; les protéines dites intrinsèquement désordonnées.



---

## ***1. Le paradigme structure-fonction***

---

Avant de commencer avec les protéines intrinsèquement désordonnées, il faut remonter dans le temps, à l'époque où un paradigme faisait règle dans le monde des protéines ; le paradigme structure-fonction. Le paradigme structure-fonction dit que la fonction d'une protéine dépend de sa structure tridimensionnelle, et la structure tridimensionnelle des protéines est la clé pour comprendre leur fonction. Ce paradigme est apparu pour la première fois en 1894 avec le modèle de la serrure et de la clé proposé par Fischer (Tompa, 2009; Turoverov et al., 2010; Uversky, 2011; Uversky and Dunker, 2010). Ce modèle a été particulièrement utilisé pour les enzymes et il a longtemps été assumé qu'il existait une parfaite complémentarité géométrique entre l'enzyme et son substrat (Tompa, 2009). L'idée de base était que le profil spatial, unique, de chaque acide aminé placé dans la structure crée un microenvironnement physico-chimique spécifique adapté pour la liaison très spécifique et restreinte de ligands, de formation de complexes macromoléculaires, la catalyse de réactions chimiques (Tompa, 2009)... Un des exemples de cette spécificité est que des extraits de levure de bière contenant de l'invertase étaient capables d'hydrolyser les  $\alpha$ -glucosides, mais pas les  $\beta$ -glucosides, alors que pour l'émulsine l'inverse se produit (Tompa, 2009). Cette observation est un bon exemple pour expliquer le modèle de Fischer.

Ces observations étaient corroborées par le fait que le traitement des enzymes avec un agent dénaturant (urée, acide ...) leur faisait perdre toute fonction (Tompa, 2009). Ces protéines une fois dénaturées perdaient la capacité de cristalliser, il en est arrivé la conclusion que la propriété caractéristique d'une protéine native ne pouvait être attribuée qu'à son unique configuration (Mirsky and Pauling, 1936; Tompa, 2009). D'où la réciproque qu'une protéine dénaturée était caractérisée par la perte d'une configuration unique, donnant une vision bidimensionnelle de l'état protéique. Le paradigme fut par la suite fortement appuyé par les premières résolutions de structures protéiques (Tompa, 2009; Wright and Dyson, 1999).

## ***2. La découverte des IDPs***

---

### *2.1. Les premières exceptions*

Puis les premières anomalies auxquelles le paradigme structure-fonction n'apportait pas de réponse apparurent. En 1950 Karush montra que le site de liaison de l'albumine pouvait prendre différentes configurations à l'équilibre et que la meilleure configuration était stabilisée par la liaison avec une molécule partenaire (Karush, 1950). Il nomma ce phénomène « adaptabilité configurationnelle » (Dunker et al., 2001; Karush, 1950; Tompa, 2009). Mais afin de pallier le problème, Koshland proposa que le site actif des protéines était flexible pour s'adapter au substrat (Koshland, 1958; Tompa, 2009).

En 1952, la caséine (une protéine du lait) fut qualifiée de protéine inusuelle. En comparant la protéine native de caséine avec des protéines globulaire natives et dénaturées par mesure de rotation optique, McMeekin détermina que la caséine était une protéine dépliée, et que cette configuration était importante pour la fonction de la protéine (McMeekin, 1952; Tompa, 2009)

Précédemment nous avons vu que les protéines dénaturées, non fonctionnelles, étaient incapables de cristalliser. Mais que dire si la protéine ne cristallisant pas est fonctionnelle ? Ce fut par exemple le cas avec la Myelin Basic Protein, Sedzik et Kirschner ont pourtant fait tout leur possible pour parvenir à la cristalliser en testant pas moins de 4 600 conditions différentes (Sedzik and Kirschner, 1992; Tompa, 2009; Uversky and Dunker, 2010)! Force est de constater qu'ils furent incapables de la cristalliser, et pourtant elle était bien fonctionnelle. Il existe encore d'autres exemples allant à l'encontre du paradigme, et leur nombre ne cesse d'augmenter avec l'essor de l'étude des protéines intrinsèquement désordonnées, si bien qu'il fallait le faire évoluer.

### *2.2. Définition d'une IDP*

De ces observations est née une nouvelle vision du monde des protéines. Les protéines existent et évoluent sous quatre états thermodynamiques (ou protein quartet) : sous forme ordonnée, de globule fondu (molten globule), de pré-globule fondu et désordonnées (Dunker et al., 2008; Tompa, 2009; Uversky, 2011). Les trois derniers états sont considérés comme étant intrinsèquement désordonnés (Orosz and Ovádi, 2011). On définit de manière générale une protéine intrinsèquement désordonnée comme étant une protéine ayant

perdu, en partie ou en totalité, un repliement unique lorsqu'elle est seule en solution (Dunker et al., 2001; Gsponer and Babu, 2009). Elles ne sont pas capables de se replier spontanément en une structure globulaire compacte (Turoverov et al., 2010).

### ***3. Les caractéristiques des IDPs***

---

Maintenant qu'une nouvelle catégorie de protéines est définie, il ne reste plus qu'à savoir comment différencier ce type de protéines des protéines dénaturées. Pour cela les protéines intrinsèquement désordonnées possèdent des caractéristiques spécifiques qui permettent de les discriminer.

#### *3.1. Une séquence primaire particulière*

La première chose que l'on peut regarder dans une protéine, est sa composition en acides aminés. En effet la capacité d'une protéine à être repliée ou non est codée dans sa séquence primaire (Turoverov et al., 2010; Uversky, 2011). Suite à l'analyse de 275 protéines ordonnées et de 91 protéines désordonnées, Uversky a montré que la combinaison d'une faible hydrophobicité et d'une charge nette élevée était la plupart du temps indicatif d'une protéine intrinsèquement désordonnée (Uversky, 2011; Uversky et al., 2000). En effet, avoir une charge nette élevée signifie qu'il y aura plus de répulsions charge-charge, et la faible hydrophobicité conduit à moins de forces pour la compaction des protéines (Gsponer and Babu, 2009; Uversky, 2011; Uversky and Dunker, 2010). Ainsi les protéines intrinsèquement désordonnées sont riches en résidus polaires et chargés (Gln, Ser, Pro, Glu et Lys) et pauvres en résidus hydrophobes (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp et Tyr) (Dyson and Wright, 2005; Uversky, 2011). Ce biais de composition a permis de développer de nombreux algorithmes de prédiction du désordre, dont le premier d'entre eux PONDR® (Predictor Of Natural Disordered Regions) (Uversky and Dunker, 2010). A présent il en existe une soixantaine ! Quelques exemples sont présentés dans le tableau I4. Néanmoins, cela ne reste que des prédictions basées sur des probabilités.

Predicteurs	Liens url	Références
Propensity based predictors		
FoldIndex	<a href="http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex">http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex</a>	(Prilusky et al., 2005)
GlobPlot	<a href="http://globplot.embl.de">http://globplot.embl.de</a>	(Linding et al., 2003b)
PreLink	<a href="http://genomics.eu.org/spip/PreLink">http://genomics.eu.org/spip/PreLink</a>	(Coeytaux and Poupon, 2005)
NORSp	<a href="http://cubic.bioc.columbia.edu/service/NORSp">http://cubic.bioc.columbia.edu/service/NORSp</a>	(Liu and Rost, 2003)
Machine-Learning Algorithms		
PONDR®	<a href="http://www.PONDR.com">http://www.PONDR.com</a>	(Li et al., 1999)
RONN	<a href="http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN">http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN</a>	(Yang et al., 2005)
DISOPRED2	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred</a>	(Ward et al., 2004a)
DisEMBL	<a href="http://dis.embl.de">http://dis.embl.de</a>	(Linding et al., 2003a)
DISpro	<a href="http://www.ics.uci.edu/~baldig/dispro.html">http://www.ics.uci.edu/~baldig/dispro.html</a>	(Cheng et al., 2005b)
Spritz	<a href="http://protein.cribi.unipd.it/spritz">http://protein.cribi.unipd.it/spritz</a>	(Vullo et al., 2006)
VSL2	<a href="http://www.ist.temple.edu/disprot/predictorVSL2.php">http://www.ist.temple.edu/disprot/predictorVSL2.php</a>	(Obradovic et al., 2005; Peng et al., 2006)
Predictors based on inter-residue contacts		
FoldUnfold	<a href="http://skuld.protres.ru/~mlobanov/ogu/ogu.cgi">http://skuld.protres.ru/~mlobanov/ogu/ogu.cgi</a>	(Garbuzynskiy et al., 2004)
IUPred	<a href="http://iupred.enzim.hu">http://iupred.enzim.hu</a>	(Dosztányi et al., 2005)
Ucon	<a href="http://www.predicprotein.org/submit_ucon.html">http://www.predicprotein.org/submit_ucon.html</a>	(Schlessinger et al., 2007)
Metaservers		
MeDOR	<a href="http://www.vazymolo.org/MeDOR/">http://www.vazymolo.org/MeDOR/</a>	(Lieutaud et al., 2008)
metaPrDOS	<a href="http://prdos.hgc.jp/meta/">http://prdos.hgc.jp/meta/</a>	(Ishida and Kinoshita, 2008)

**Tableau I 4 : Quelques exemples de prédicteurs de désordre et leur lien URL. D'après Tompa 2009.**

### 3.2. Des propriétés physico-chimiques surprenantes

Cette composition atypique leur procure des propriétés physico-chimiques contraires à ce que l'on pourrait observer pour les protéines globulaires. Ainsi, alors que les protéines globulaires sont sensibles à la température qui a tendance à les faire précipiter, les IDPs sont résistantes à la température, ceci grâce à leur faible teneur en composés hydrophobes (Tompa, 2009). L'augmentation de la température a même plutôt tendance à générer des structures au sein de ces protéines due à l'augmentation des forces hydrophobes avec la température (Uversky and Dunker, 2010).

Sur le même principe, les IDPs ne sont pas sensibles aux pH acides, qui favorisent même leur repliement (Tompa, 2009; Uversky and Dunker, 2010). Cette fois, c'est la charge nette de la protéine qui est en cause, en effet, à pH neutre la charge nette étant élevée cela induit des répulsions charge-charge, mais en rendant le pH acide ou basique, on minimise les charges, faisant diminuer les répulsions et favorisant ainsi le repliement (Uversky and Dunker, 2010).

Les protéines intrinsèquement désordonnées présentent souvent un profil de migration électrophorétique aberrant, et de ce fait ont tendance à migrer à des tailles plus élevées que leur masse théorique (Tompa, 2009).

Du fait de leur flexibilité, les protéines désordonnées ont également un rayon moléculaire supérieur (rayon de Stokes) à ce qui est attendu en théorie. On peut donc s'attendre à avoir en chromatographie d'exclusion une élution de ces protéines à un volume d'élution différent de celui observé pour une protéine globulaire de même masse moléculaire théorique (Uversky and Dunker, 2010).

Elles sont également facilement reconnaissables en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) à la vue de la faible dispersion de leurs signaux (Tompa, 2009).

Enfin ces dernières possèdent une faible proportion de structure secondaire les rendant flexibles (Uversky, 2002), mais aussi plus sensibles aux protéases (Tompa, 2009; Uversky and Dunker, 2010).

### 3.3. Quel(s) avantage(s) à être désordonné ?

On retrouve ce type de protéines dans les trois règnes du vivant, cependant leur proportion est différente d'un organisme à l'autre. Chez les eucaryotes, les IDPs représentent environ 30% du protéome alors que chez les bactéries nous descendons à 4% pour terminer à 2%

chez les Archae (Tompa, 2009; Uversky, 2011). D'où le postulat communément accepté que la proportion de protéines désordonnées augmente avec la complexité de l'organisme (Dyson and Wright, 2005; Turoverov et al., 2010). Des analyses bioinformatiques ont également révélé que plus de la moitié des protéines eucaryotes possèdent une région désordonnée et que plus de 70% des protéines impliquées dans des voies de signalisation ont de longues régions désordonnées (Uversky and Dunker, 2010). Mais alors pourquoi tant de désordre, et quel avantage y a-t-il à être désordonné ?

La flexibilité des IDPs fait qu'elles sont connues pour avoir des interactions avec de multiples partenaires et joueraient le rôle de nœud dans les réseaux d'interactions (Uversky, 2011). Il se trouve que certaines IDPs sont capables de se replier en interagissant avec leur partenaire. Uversky et Dunker proposent qu'il existe, au sein des régions désordonnées, des éléments structuraux rudimentaires qui participent à la liaison de ces régions à leurs partenaires. Ils ont nommé ces motifs de reconnaissance MoRFs (Molecular Recognition Feature). Ce sont de petits éléments structuraux, d'une vingtaine d'acides aminés, que l'on retrouve à l'intérieur de régions désordonnées et qui permettent à certaines régions désordonnées de s'ordonner en une structure spécifique stabilisée par une protéine partenaire (Gsponer and Babu, 2009; Turoverov et al., 2010; Uversky, 2011; Uversky and Dunker, 2010). Dans ces MoRFs, on retrouve souvent le peu d'acides aminés aromatiques que contiennent les séquences des protéines désordonnées (Uversky, 2011). Néanmoins toutes ne contiennent pas ces motifs et surtout toutes ne se replient pas lorsqu'elles interagissent avec leur partenaire (Sigalov et al., 2007).

En conclusion de par leurs caractéristiques physico-chimiques les IDPs présentent de nombreuses propriétés. Tout d'abord elles sont capables de présenter de larges surfaces d'interactions ce qui leur permet d'interagir avec plusieurs partenaires simultanément (Gsponer and Babu, 2009). En se repliant ou non au contact de leurs partenaires, elles offrent de multiples modalités d'interaction. Leur plasticité leur permet d'interagir avec de nombreuses cibles avec lesquelles elles sont capables d'interagir avec une grande spécificité et une faible affinité. Elles présentent des sites de modifications post-traductionnelles facilement accessibles (Uversky and Dunker, 2010).

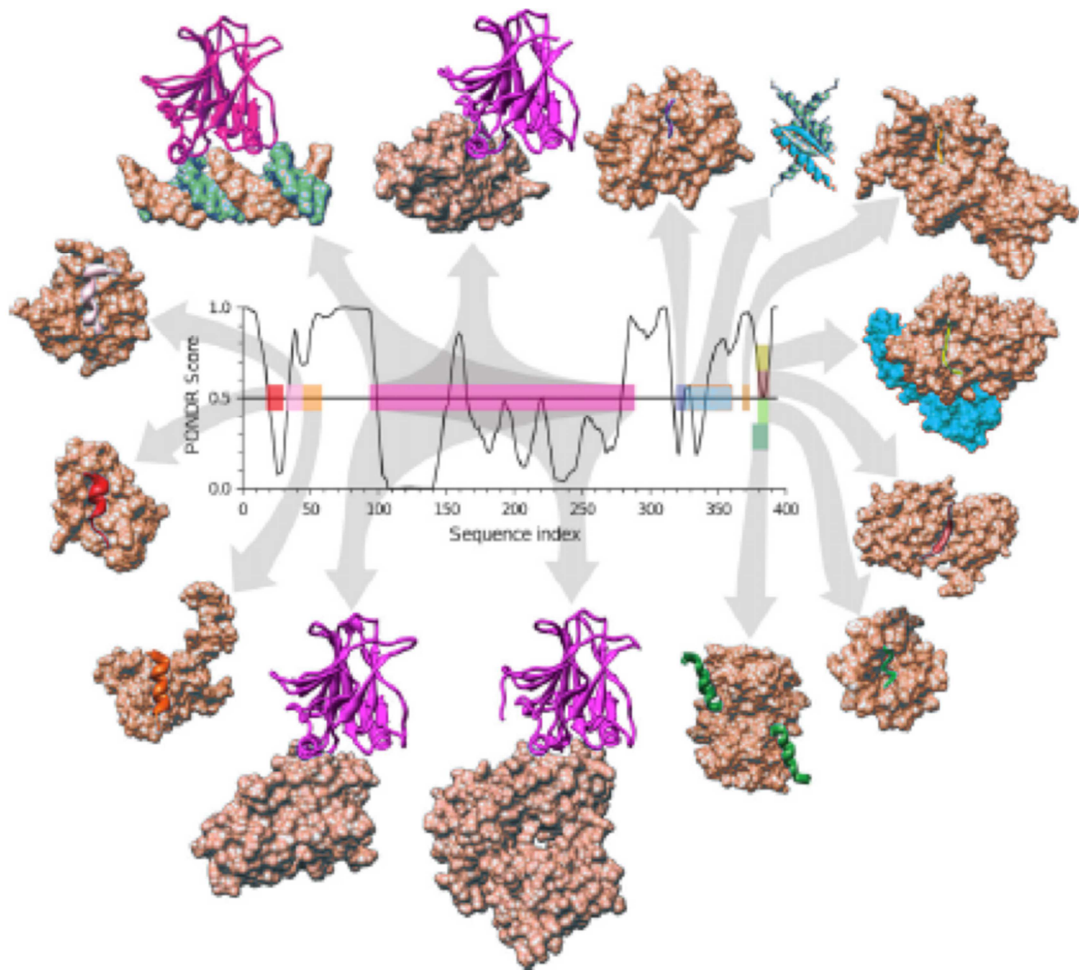
Les sites de modifications post-traductionnelles se trouvent de manière fréquente dans les zones déstructurées (Gsponer and Babu, 2009; Uversky and Dunker, 2010). Il a été montré

par ailleurs que les modifications post-traductionnelles modifient localement la charge et l'hydrophobicité affectant la structure et le repliement de la chaîne polypeptidique et sa surface accessible (Gsponer and Babu, 2009). Il a également été montré que les régions épissées alternativement codaient plus souvent des régions désordonnées que des régions ordonnées (Uversky and Dunker, 2010).

#### ***4. Des protéines au cœur des réseaux fonctionnels***

Il a été proposé que les fonctions de signalisation et de régulation sont les fonctions les plus communément portées par des IDPs (Uversky and Dunker, 2010). Leur capacité à se lier à de multiples partenaires est un atout pour leur rôle dans la signalisation, ainsi on retrouve souvent les IDPs au cœur des réseaux d'interaction protéines-protéines (les enzymes sont sous-représentées dans la catégorie des IDPs) (Uversky and Dunker, 2010). On peut prendre comme exemple p53. p53 est un suppresseur de tumeur qui se trouve au centre de nombreuses voies de signalisation (Figure I13). Il régule l'expression de plus de 150 gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, la réponse aux stress cellulaires (Uversky and Dunker, 2010). Il est capable d'interagir avec ses différents partenaires de façon variés, avec différents domaines ordonnés ou non (Figure I13).

Les protéines désordonnées sont également souvent impliquées dans certaines maladies humaines (Midic et al., 2009; Uversky, 2011; Uversky et al., 2009), notamment dans des maladies neurodégénératives telles que Alzheimer, la dystrophie myotonique, le Parkinson, le syndrome de Down...(Uversky and Dunker, 2010). Une grande proportion de protéines intrinsèquement désordonnées est aussi impliquée dans les cancers, dans les maladies cardiovasculaires, les diabètes, dans les défauts de signalisation cellulaire et dans diverses autres maladies génétiques. Reprenons l'exemple de p53, si sa fonction est abolie, cela engendre un processus de cancérisation de la cellule. Ainsi la mutation de p53 a été identifiée dans des cancers du côlon, des poumons, de l'œsophage (Uversky and Dunker, 2010)... L'hypothèse a été faite que la mutation de protéines désordonnées réduirait leur capacité à reconnaître leur partenaire ce qui conduirait à la formation d'agrégats non fonctionnels et délétères (Uversky and Dunker, 2010). Ainsi le concept de « désordre dans le désordre » ou D<sup>2</sup> a été créé.



**Figure I 13 : Illustration des multiples interactions de p53.**

Le graphique représente la prédiction de désordre de p53 (désordonné au dessus de 0,5, ordonné en dessous). Quelques exemples d'interaction entre p53 et certains de ses partenaires sont donnés. P53 est capable d'interagir avec ses partenaires par des domaines différents multipliant ses capacités à interagir. (Uversky, 2011).

Les protéines intrinsèquement désordonnées étant impliquées dans de nombreuses maladies, il semblait évident d'en faire des cibles thérapeutiques. Par exemple, des molécules se fixant sur Mdm2 ont été trouvées et bloquent ainsi la liaison de la partie désordonnée de p53. Le blocage de l'interaction, empêche l'ubiquitylation de p53 et donc sa dégradation, conduisant à une augmentation de la quantité intracellulaire de p53 dans les cellules cancéreuses, ce qui par conséquent diminue la viabilité de ces cellules en stimulant l'apoptose (Uversky and Dunker, 2010).

Plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la RNR (voir chapitre II) et notamment Sml1 et Spd1 sont des IDPs (Gupta et al., 2004; Kjaergaard et al., 2010; Nestoras et al., 2010; Zhao et al., 2000).







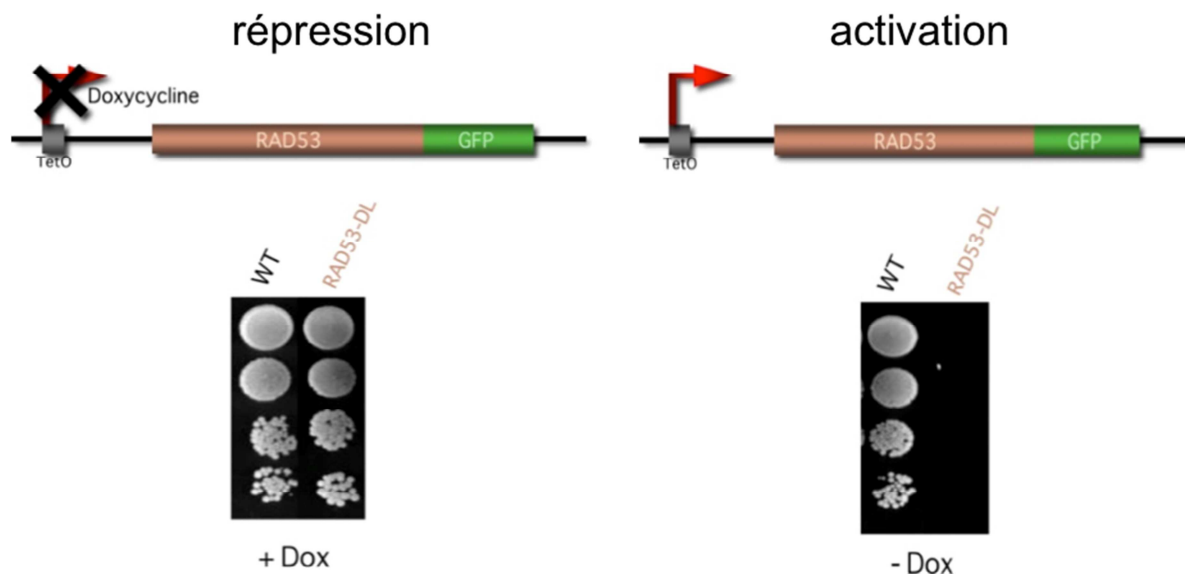
*Chapitre II : A la  
recherche de nouveaux  
acteurs de la réponse  
aux dommages de  
l'ADN*



## PARTIE 1 : L'allèle RAD53-DL

### 1. Un allèle mimétique

Au commencement de ce projet, la thématique du laboratoire portait sur les réponses aux stress génotoxiques. L'objectif premier était d'identifier et de caractériser les régulateurs et les cibles de la protéine Rad53. Pour cette étude, l'équipe de Marie-Claude Marsolier-Kergoat avait construit un allèle de *RAD53* permettant un arrêt de la croissance cellulaire, et ce, même en absence de lésions de l'ADN. Cet allèle dominant létal, nommé *RAD53-DL* (Marsolier et al., 2000), a été généré par la fusion de la séquence codante de *RAD53* et de celle de la *GFP*, puis placé sous le contrôle de l'opérateur tetO (la transcription de l'allèle est réprimée par la doxycycline), le tout placé sur un plasmide. En plus de la présence du gène *RAD53* endogène, l'expression du plasmide contenant cet allèle entraîne des défauts de croissance en présence de stress génotoxiques. L'expression de *RAD53-DL* à partir de ce plasmide est létale à 37°C sur



**Figure II 1 : Régulation de l'allèle RAD53-DL.**

Le gène de fusion *RAD53-GFP* est mis sous le contrôle de l'opérateur inducible tetO. La présence de doxycycline dans le milieu de culture inhibe la transcription de l'allèle ; les souches *RAD53-DL* présentent une croissance similaire à celle de la souche sauvage.

En absence de doxycycline, *RAD53-GFP* est fortement transcrit ce qui entraîne une létalité des souches *RAD53-DL*.

glucose et à 30°C sur galactose (Marsolier et al., 2000). Pour tester si cet allèle était bien actif, la capacité de *RAD53-DL* à activer la transcription de *RNR3-LacZ* a été examinée. Les mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase ont permis de montrer, de manière intéressante, que cet allèle est hyper actif et provoque des effets physiologiques normalement causés par les lésions de l'ADN (Marsolier et al., 2000).

Le laboratoire possède donc un outil de choix pour étudier la voie *RAD53* avec l'allèle *RAD53-DL*. En vue de trouver de nouvelles cibles et régulateurs de la voie Rad53, cet allèle a été utilisé au cours de différents cribles. Un premier crible de suppresseurs multicopies (utilisation d'une banque de plasmides 2 $\mu$ ) a permis d'identifier un régulateur direct de Rad53 ; *PTC2* (Leroy et al., 2003; Marsolier et al., 2000). Un deuxième crible multicopies a été réalisé à partir d'une autre version de l'allèle *RAD53-DL*, cette fois intégré au locus au niveau du gène *TRP1* (Figure II1). Cette nouvelle version présente des phénotypes de défaut de croissance plus marqué. Enfin cette version de l'allèle *RAD53-DL* a été par la suite introduite dans la banque de délétion systématique des ORFs (EUROSCARF) pour réaliser un troisième crible génomique et a notamment permis de relier le système ubiquitine protéasome aux réponses aux dommages de l'ADN (Le Tallec et al., 2007).

## **2. Des suppresseurs multicopies**

---

Le premier crible à l'aide de l'allèle *RAD53-DL* consistait donc à isoler des régulateurs négatifs de la voie Rad53 en cherchant des gènes qui, lorsqu'ils sont surexprimés, permettent de supprimer la toxicité conférée par l'allèle *RAD53-DL* (Marsolier et al., 2000). Pour cela, ils ont utilisé une banque d'ADNc sous le contrôle du promoteur *GAL1* qui a été introduite dans la souche *RAD53-DL* et les cellules capables de croître à 33°C sur galactose ont été sélectionnées (Marsolier et al., 2000). Au cours du crible, le gène *CRT1*, qui régule négativement la ribonucléotide réductase, a été isolé ce qui a permis de valider le crible puisque *CRT1* est un régulateur négatif des checkpoints (Marsolier et al., 2000).

Le crible a également permis d'identifier deux constructions indépendantes du gène *PTC2*, une phosphatase de la famille PP2C (voir le chapitre I). Il a notamment été montré que la surexpression de *PTC2* augmentait la sensibilité aux dommages de l'ADN et aux arrêts de la réplication (Marsolier et al., 2000). La surexpression de *PTC2* ralentit la croissance cellulaire

et devient létale si 20mM de HU sont ajoutés (Marsolier et al., 2000). La délétion de *PTC2* permet de sauver la létalité des souches *mec1Δ* mais pas de *rad53Δ* (Marsolier et al., 2000).

Plus tard, le laboratoire montrera que cette phosphatase déphosphoryle Rad53 et est requise pour l'inactivation des checkpoints après une cassure double brin (Leroy et al., 2003).

Un deuxième crible de suppresseurs multicopies a été réalisé. Cette fois, l'allèle *RAD53-DL* n'est plus sur un plasmide, mais directement intégré au locus au niveau du gène *TRP1* (données non publiées). Ce crible a permis d'isoler des fragments génomiques (portés par les plasmides multicopies) dont la surexpression supprime la létalité de l'allèle *RAD53-DL*. Le fragment le plus souvent isolé lors de ce crible contient le gène *ASF1* (un gène codant un chaperon d'histones), qui n'est autre qu'un partenaire connu de Rad53 (données non publiées (Emili et al., 2001)). L'ensemble de ces résultats indique que l'allèle *RAD53-DL* est un outil pertinent pour l'étude des voies de réponse aux dommages de l'ADN, et plus spécifiquement des fonctions et régulations de *RAD53*.

### **3. Des interactants génétiques**

---

Après avoir identifié des régulateurs de Rad53 par la surexpression de gènes, le laboratoire s'est lancé dans un nouveau crible afin d'identifier les gènes qui lorsqu'ils sont inactivés permettaient de supprimer la toxicité de *RAD53-DL* (Le Tallec, 2008; Le Tallec et al., 2007).

Au cours de ce crible, ils ont isolé plusieurs gènes répondant de manière similaire aux dommages de l'ADN, donc appartenant au même groupe épistatique : *PRE9*, *UMP1*, *POC1*, *POC2*, *POC3*, *POC4*, *HSM3*. L'équipe a analysé les simples mutants de ces gènes dans un contexte où *RAD53* est sous sa forme sauvage et ils ont décelé que ces simples mutants étaient hyper résistants à certains stress génotoxiques (4NQO, MMS et camptothécine) (Le Tallec, 2008; Le Tallec et al., 2007).

*UMP1* et *PRE9* sont décrits comme étant impliqués dans la maturation et/ou la structure du protéasome (un macrocomplexe impliqué dans la dégradation des protéines). L'hypothèse a donc été faite que les gènes restants étaient eux aussi impliqués dans ce processus (Le Tallec, 2008; Le Tallec et al., 2007; Le Tallec and Peyroche, 2012). Après diverses analyses que vous trouverez plus en détail dans la thèse de Benoît Le Tallec et dans les articles

découlant de cette thèse (Le Tallec, 2008; Le Tallec et al., 2007), l'équipe est parvenue à montrer que les 5 gènes *POC1-4* et *HSM3* codent des chaperons d'assemblage de différents sous-complexes du protéasome.

#### **4. Analyse transcriptomique**

---

Les différentes versions de l'allèle *RAD53-DL* ont donc pu montrer leur efficacité dans la découverte de nouveaux régulateurs des voies checkpoints. Cependant aucune analyse transcriptomique n'avait été réalisée jusqu'alors avec cet allèle. De nombreuses analyses transcriptomiques sur l'étude des réponses aux dommages de l'ADN ont déjà été réalisées par d'autres laboratoires, principalement en utilisant des agents génotoxiques (Benton et al., 2006; Fu et al., 2008; Gasch et al., 2001; Jelinsky and Samson, 1999; Mizukami-Murata et al., 2010). L'avantage d'utiliser l'allèle *RAD53-DL*, est que l'étude serait véritablement focalisée sur les cibles de la protéine Rad53, sans avoir déclenché d'autres voies de signalisations qui « parasiteraient » l'analyse. En effet, l'ajout d'une drogue entraîne l'activation de voies de détoxification. De même certaines voies parallèles peuvent être enclenchées telle que la réponse générale aux stress. Cette expérience fut le sujet de mon stage de fin d'étude de master 2, j'exposerai donc ici les résultats obtenus.

Les transcrits présents dans une souche sauvage ont été comparés à ceux présents dans une souche pour laquelle l'allèle *RAD53-DL* (introduit au locus *TRP1*) a été induit et provoquant ainsi l'hyperactivation de la « voie » *RAD53*. A la suite de plusieurs analyses transcriptomiques, menées de manière indépendante, il s'est avéré que pour une très grande majorité des gènes, il n'y avait que de faibles variations du transcriptome. Toutefois, nous sommes parvenus à une liste de 17 gènes différentiellement exprimés chez *S. cerevisiae* et qui n'avaient pas été isolés lors des précédents cribles réalisés au laboratoire avec cet allèle (tableau II1). Il existe certainement d'autres gènes différentiellement exprimés, mais les critères stringents (Fold change > 1,8, p-value < 10<sup>-2</sup>) utilisés n'ont pas permis de les retenir.

Parmi les gènes surexprimés, on retrouve de manière rassurante *RAD53*, mais également *TRP1*. En effet lors de la construction de la souche deux inserts (*TetO-RAD53-GFP*, *TRP1*) ont



été introduits conférant à la souche plus de copies du gène *TRP1* et par conséquent plus de transcrits. On trouve également un certain nombre de gènes décrits dans la littérature

Nom	Symbole	p-value ajustée	ratio d'expression (valeur absolue)	régulation	chromosome	Description
YPL153C	RAD53	2,30E-03	9,55	+	XVI	Protéine kinase, requise pour l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN
YML058W-A	HUG1	3,77E-05	7,55	+	XIII	Transcription induite par les dommages de l'ADN. Pas de fonction moléculaire connue
YDR007W	TRP1	1,60E-05	3,84	+	IV	Phosphoribosylanthranilate isomérase qui catalyse la troisième étape de la biosynthèse du TRP
YDR374C	YDR374C	2,30E-03	2,53	+	IV	Protéine putative de fonction inconnue
YJR078W	BNA2	3,45E-03	2,25	+	X	Dioxygénase requise pour la synthèse <i>de novo</i> du NAD à partir du TRP.
YGR243W	FMP43	2,30E-03	2,22	+	VII	Protéine putative de fonction inconnue. Expression régulée par les stress osmotiques et alcalins
YPR015C	YPR015C	1,83E-04	2,18	+	XVI	Protéine putative de fonction inconnue. Sa surexpression provoque un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire
YIL066C	RNR3	7,95E-05	2,14	+	IX	Sous-unité du complexe RNR qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des dNTPs. Régulé par la réplication et les dommages de l'ADN
YGR043C	NQM1	5,94E-03	1,91	+	VII	Transaldolase de fonction inconnue. Transcription induite par l' $\alpha$ -facteur et les shifts diauxiques
YLR327C	TMA10	4,39E-03	1,90	+	XII	Protéine de fonction inconnue associée aux ribosomes
YNR034W-A	YNR034W-A	5,85E-03	1,90	+	XIV	Protéine putative de fonction inconnue. Expression régulée par Msn2p/Msn4p
YNL194C	YNL194C	2,30E-03	1,89	+	XIV	Protéine membranaire intégrale requise pour la sporulation. Pas de fonction moléculaire connue.
YFL014W	HSP12	3,62E-03	1,84	+	VI	Protéine membranaire protégeant les membranes de la dessiccation. Induite par les chocs thermiques, les stress osmotiques et oxydatifs, les carences en glucose ...
YHL048W	COS8	4,64E-03	3,28	-	VIII	Protéine nucléaire de la famille DUP380. Pas de fonction moléculaire connue
YIR043C	YIR043C	2,29E-04	2,76	-	IX	Possible pseudogène de la famille DUP380
YDL248W	COS7	3,45E-03	1,96	-	IV	Protéine de fonction inconnue de la famille DUP380

**Tableau II 1 : Liste des gènes différentiellement exprimés suite à l'hyperactivation de RAD53 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Le nom des gènes est leur nom systématique et le symbole est le nom couramment utilisé pour les désigner (données SGD). La p-value est ajustée suivant la méthode de Benjamini-Hochberg. Le ratio d'expression du mutant par rapport à la référence est en valeur absolue, la colonne régulation indique si le gène est sur ou sous exprimé chez le mutant RAD53-DL.

comme étant régulés par les checkpoints des dommages de l'ADN ; c'est le cas de *RNR3*, *YPR015C* et *HUG1* (ce dernier faisant l'objet de notre étude il sera décrit dans le paragraphe suivant). Parmi ces gènes, seule la fonction de *RNR3* est connue. Ce gène code la seule sous-unité non essentielle de la Ribonucléotide Réductase (RNR) (voir le chapitre I). *YPR015C* a été identifié lors de recherche de gènes qui, lorsqu'ils sont surexprimés, provoquent un ralentissement du cycle cellulaire (Niu et al., 2008) et code une protéine à doigts de zinc (Mao et al., 2008). Ainsi la surexpression de *YPR015C*, conduit à un ralentissement du cycle cellulaire en phase G2/M, dépendant de la voie des checkpoints, et active la réponse aux dommages de l'ADN (Niu et al., 2008). En ce qui concerne les autres gènes isolés, ces derniers n'ont pas de fonctions clairement identifiées mises à part *HSP12*.

Ce qui est intéressant, c'est que parmi les gènes surexprimés, plusieurs ont déjà été identifiés dans les cribles transcriptomiques en réponse à des agents génotoxiques (validant par ailleurs notre approche). C'est le cas notamment de *HUG1*, identifié dans les analyses de Benton et al. en 2006 (en réponse au MMS) (Benton et al., 2006) et celles de Mizukami-Murata et al. en 2010 (en réponse aux radiations ionisantes) (Mizukami-Murata et al., 2010). Dans leurs analyses, Mizukami-Murata et al. avaient également identifié *HSP12* et *YNL194C* (Mizukami-Murata et al., 2010). *HSP12* code une petite protéine qui joue un rôle majeur dans la réponse aux chocs thermiques (Varela et al., 1995). *YNL194C* code une protéine membranaire requise pour la sporulation (données SGD : <http://www.yeastgenome.org>) et semble être impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN puisque sa protéine de fusion GFP est induite en présence de MMS (données SGD). On retrouve régulièrement dans les cribles transcriptomiques une induction de l'expression des sous-unités de la RNR *RNR2* et *RNR4*, (Benton et al., 2006; Gasch et al., 2001; Mizukami-Murata et al., 2010). Dans notre cas nous ne les avons pas identifiées, mais nous avons néanmoins isolé une des sous-unités de la RNR : *RNR3* qui se trouve être une sous-unité spécifiquement produite en réponse aux dommages de l'ADN. Cette sous-unité a également été trouvée par Jelinsky et Samson en 1999 (Jelinsky and Samson, 1999). Le fait que les sous-unités de la RNR soient presque systématiquement identifiées dans les analyses transcriptomiques montre l'importance que joue la RNR dans les réponses aux dommages de l'ADN.

Pour ce qui est des gènes sous-exprimés, les trois gènes isolés forment un groupe homogène. Tous trois appartiennent à la plus grande famille multigénique existante chez la

levure bourgeonnante : les gènes DUP pour DUPLICATED (Despons et al., 2006). Cette famille est elle-même divisée en deux sous familles : DUP240 et celle dont il est question dans notre analyse ; DUP380 (aussi appelée COS pour conserved sequence). Les gènes de la sous-famille COS ont tous la particularité d'être situés dans les régions subtélomériques des chromosomes de *S. cerevisiae*. Les gènes de cette sous-famille ont des séquences très similaires (conservées), soulevant des interrogations quant à leur fonction, qui reste inconnue. Cependant certaines études laisseraient à penser que les gènes DUP pourraient être impliqués dans le trafic membranaire (Despons et al., 2006).

## **PARTIE 2 : HUG1**

---

### **1. De NORF à ORF**

---

Le gène *HUG1* est apparu comme particulièrement intéressant. Tout d'abord, après *RAD53*, c'est le gène dont la différence d'expression est la plus grande et il n'a été découvert que récemment ; en 1999 par l'équipe de Hieter (Basrai et al., 1999). De plus, il n'est pas présent dans la banque de délétion systématique des ORFs de *Saccharomyces cerevisiae* (EUROSCARF). De par sa très petite taille, le gène *HUG1* (207 paires de bases) a longtemps été une NORF (Non-annotated Open Reading Frame). La protéine qu'il code est un polypeptide de 68 acides aminés ne possédant aucun domaine décrit dans la banque de familles protéiques (Pfam : <http://pfam.sanger.ac.uk>).

En 1999, Basrai *et al.* entreprennent une analyse globale de l'expression des gènes chez *Saccharomyces cerevisiae* par SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Ils ont ainsi caractérisé NORF5 renommé *HUG1* pour « Hydroxyurea and UV and Gamma radiation induced » (Basrai et al., 1999). Leurs travaux ont montré que la transcription de *HUG1* était spécifiquement induite par l'arrêt de la réplication et par les dommages de l'ADN (Basrai et al., 1999). Cette induction de la transcription peut s'effectuer à n'importe quel stade du cycle cellulaire et requiert les gènes de la voie *MEC1* (ce qui est cohérent avec notre analyse transcriptomique). La surexpression de *HUG1* est létale dans des cellules *mec1Δ* en présence de stress génotoxique (Basrai et al., 1999). L'équipe de Palecek, a d'ailleurs montré que *HUG1* n'était pas induit en réponse à d'autres stress (choc de température, acides, carence nutritionnelle...) (Benton et al., 2007).

*HUG1* possède une séquence « X-box » au niveau de son promoteur, motif fréquemment présent dans les régions promotrices de gènes inductibles par les dommages de l'ADN ou un arrêt de la réplication (Basrai et al., 1999; Kim and Siede, 2011). Chez *S. cerevisiae*, ce motif est reconnu par Crt1 (Kim and Siede, 2011). Crt1 agit en recrutant au niveau du promoteur deux répresseurs généraux de la transcription ; *CYC8* (aussi nommé *SSN6*) et *TUP1* (Zaim et al., 2005). Ce motif est également présent au niveau des promoteurs de certains des gènes de la Ribonucléotide réductase (RNR) : *RNR2*, *RNR3*, *RNR4*. De ce fait, *HUG1* partage les mêmes répresseurs transcriptionnels que ces gènes de la RNR. Enfin, d'autres études ont montré que l'activation de la transcription de *HUG1* est, comme pour *RNR3*, régulée par deux protéines de la famille des HDACs (Histone DeAcetylases) : *RPD3* et *HOS2* qui agissent de manière redondante (Sharma et al., 2007).

La délétion du gène directement en aval de *HUG1* ; *SML1*, permet de supprimer la létalité de *mec1Δ*, cependant *HUG1* et *SML1* sont régulés et transcrits de manière indépendante (*SML1* n'est pas induit par les dommages de l'ADN ou les arrêts de la réplication) (Basrai et al., 1999). Il est intéressant de noter que l'allèle *sm1-1* couramment utilisé dans les laboratoires pour supprimer la létalité de *mec1Δ*, permet d'abolir non seulement la transcription du gène *SML1*, mais également celle de *HUG1* (Basrai et al., 1999). Par ailleurs, la délétion de *HUG1* ne confère pas de phénotype particulier, toutefois elle permet de lever la létalité de *mec1Δ*, alors qu'inversement il faut surexprimer la RNR pour sauver la létalité de *mec1Δ* (Basrai et al., 1999)

De récents travaux de Kim et Siede montrent un retard de croissance de souches inactivées pour *HUG1* en réponse à l'hydroxyurée dans le cas où le dextrose est éliminé du milieu de culture (Kim and Siede, 2011). Les conditions utilisées pour cette étude sont pour le moins extrêmes et montre la difficulté à obtenir un phénotype pour la délétion de *HUG1*. Cette dernière équipe a notamment réalisé des analyses transcriptomiques qui ont révélé une influence majeure de la délétion de *HUG1* sur le profil de transcription (Kim and Siede, 2011).

## 2. Cinq gènes une famille

Dernièrement le groupe de Elledge, en travaillant sur un gène nommé *DIF1* a mis en évidence que ce gène faisait partie d'une famille de gènes dans laquelle apparaît *HUG1* (Figure II.2.A et B) (Lee et al., 2008). Dans leur article sont présentés cinq gènes ; *AER122c* de *Asbya gossypii*, *SPD1* de *Schizosaccharomyces pombe* et trois gènes : *DIF1*, *SML1*, *HUG1* pour *Saccharomyces cerevisiae*. Ces cinq gènes codent pour des protéines ayant des similarités de séquences regroupées en trois « domaines » ; un domaine « hug » (le seul que possède *HUG1*), un domaine « sml » et un domaine « R1B » (Lee et al., 2008) (Figure II.2.A et B). La particularité de *Saccharomyces cerevisiae* est qu'elle possède 3 de ces gènes, probablement issus de la duplication du

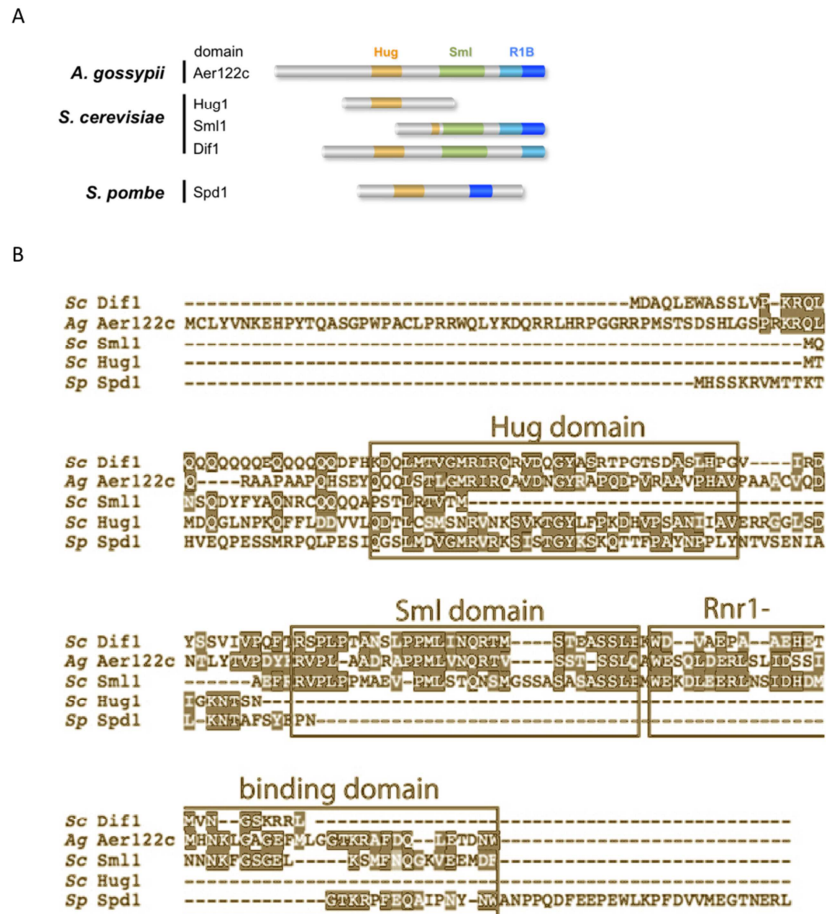


Figure II 2 : D'après Lee et al. 2008, Wu et al. 2008

- Représentation schématique des différents gènes de la famille et de leurs domaines.
- Alignement des homologues et orthologues de *DIF1* chez différents organismes. Les résidus identiques sont surlignés en noir, les résidus conservés sont surlignés en gris. Les domaines « Hug », « Sml » et « R1B » sont encadrés. D'après Lee et al 2008

génomique ; le gène ancestral sur un chromosome se serait différencié en *DIF1* tandis que sur un deuxième chromosome, le gène ancestral se serait scindé en deux gènes distincts donnant *SML1* et *HUG1* (Figure I12.A). Rappelons que *HUG1* et *SML1* sont transcrits indépendamment l'un de l'autre. Dernièrement un deuxième orthologue de Dif1 a été identifié dans les banques de données chez *S.pombe* ; la protéine Spd2. Cette dernière n'a pas de fonction décrite mais présente une très grande homologie de séquence avec Spd1, particulièrement au niveau du domaine « Hug » (mes données).

### 2.1. *SML1 (Suppressor of Mec1 Létality)*

Parmi les gènes de la famille, *SML1* est celui qui a été le plus étudié. Il a été découvert en 1998 par l'équipe de Rosthein (Zhao et al., 1998). La délétion de *SML1*, comme son nom l'indique, permet de supprimer la létalité de *mec1Δ* (Zhao et al., 1998). Les souches *sml1-1* et *sml1Δ* sont d'ailleurs très utilisées dans les laboratoires pour étudier les cellules *mec1Δ*. Si la délétion de *SML1* permet de sauver la létalité des *mec1Δ* et *rad53Δ*, elle ne supprime pas leur sensibilité aux dommages de l'ADN (Zhao et al., 1998). Le lien avec la RNR a été fait dès 1998, quand Zhao *et al.* ont remarqué que les souches invalidées pour *SML1* se comportaient comme des souches pour lesquelles *RNR1* était surexprimé (Zhao et al., 1998). De plus, le niveau de dNTPs présents est plus élevé dans les souches *sml1Δ* que dans les souches sauvages correspondantes. Comme Sml1 était capable d'interagir physiquement avec Rnr1, il a été proposé que Sml1 avait un rôle d'inhibiteur (Zhao et al., 1998). Plus tard, cette même équipe montra que Sml1 interagissait *via* son extrémité C-terminale avec Rnr1 (Zhao et al., 2000). Cette partie C-terminale possède une partie d'hélice mais principalement des coudes aléatoires, Sml1 est d'ailleurs une protéine intrinsèquement désordonnée (Figure I12) (Zhao et al., 2000). Quelques années plus tard des analyses sur son spectre de dichroïsme circulaire montreront que ce dernier est typique des protéines désordonnées et qu'il présente aussi un plateau représentatif d'une présence d'hélices  $\alpha$  (Figure I12) (Gupta et al., 2004), compatible avec les données RMN de Zhao et al. Des modèles tridimensionnels ont été proposés par l'équipe de Dealwis (Gupta et al., 2004; Uchiki et al., 2002).

Fermons cette parenthèse sur la structure de Sml1 et revenons à son interaction avec Rnr1. Un modèle a par la suite été développé par Zhang et al. qui proposaient que Sml1 interagissait plus particulièrement avec la partie N-terminale de Rnr1, entrant en compétition avec la partie C-terminale nécessaire à la régénération du site actif de la RNR

(Zhang et al., 2007). La constante de dissociation de l'interaction entre Rnr1 et Sml1 est de l'ordre du micromolaire (0,4 $\mu$ M) (Chabes et al., 1999; Danielsson et al., 2008), à peu près du même ordre de grandeur que celle de l'interaction entre R1 et R2 (de 0,1 à 0,5 $\mu$ M) (Ingemarson and Thelander, 1996). Par ailleurs, à ce jour aucun homologue de *SML1* n'a été identifié chez les mammifères, cependant, Sml1 est capable de se lier à la grosse sous unité R1 des mammifères suggérant un mécanisme d'inhibition potentiellement conservé (Chabes et al., 1999; Zhang et al., 2007; Zhao et al., 2000).

La quantité de protéines Sml1 fluctue au cours du cycle cellulaire pour atteindre une expression minimale en phase S (Zhao et al., 2001). La dégradation de Sml1 est dépendante des checkpoints et du protéasome 26S, faisant de l'absence de Sml1 un bon indicateur de l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (Andreson et al., 2010; Zhao et al., 2001; Zhao and Rothstein, 2002). En fait, Sml1 est séquentiellement phosphorylé sur les sérines S56, S58 et S60 par la protéine kinase Dun1 puis ubiquitinylé, avant d'être dégradé, durant la phase S et en réponse aux dommages de l'ADN (Andreson et al., 2010; Zhang et al., 2007). Ces sérines font partie de ce que Lee et al. ont défini comme étant le domaine « sml », qui n'est autre qu'un phosphodegron (Lee et al., 2008).

## 2.2. *SPD1 (S-Phase Delayed)*

Le gène de *S.pombe* *SPD1* a été découvert à l'origine dans un crible d'inhibiteurs de la phase S par Woollard et al. en 1996 (Woollard et al., 1996). Dans cette étude ils révèlent que la délétion de *SPD1* accélère la progression en phase S de même que la surexpression de ce gène provoque un arrêt du cycle en G1 (Borgne and Nurse, 2000; Woollard et al., 1996). Pour mieux comprendre par quel mécanisme agit Spd1, le gène a été inactivé dans des souches mutées pour le cycle cellulaire. Il se trouve que Spd1 possède des séquences PEST, ce qui est typique des protéines dont le roulement de production/dégradation est rapide (Woollard et al., 1996). Ils ont observé que la quantité de protéines Spd1 totales diminuait en phase S (Woollard et al., 1996). Suite à toutes leurs observations, ils en arrivèrent à la conclusion que Spd1 est un inhibiteur de la progression de la phase G1 à la phase S (Woollard et al., 1996).

Ce n'est qu'en 2003 qu'un premier rapprochement est fait avec la RNR, lorsque Liu et al. étudièrent le signalosome<sup>4</sup> (Liu et al., 2003). En effet, chez *S.pombe*, l'homologue de Mec1 de *S.cerevisiae* ; Rad3, n'est pas essentiel, cependant son invalidation entraîne une létalité lorsqu'elle est couplée à une délétion de *CSN1* ou *CNS2* (codant deux composants du signalosome) (Liu et al., 2003). Lancés à la recherche de supprimeurs « multicopies » de ce phénotype létal, ils identifient une des sous-unités de la RNR ; Suc22 (homologue de Rnr2p chez *S.cerevisiae*). Une première connexion avec *S.cerevisiae* est faite ; chez cette levure la fonction essentielle de Mec1 peut être levée par une surexpression de la RNR ou la délétion de *SML1*, donc une augmentation de l'activité de la RNR. L'équipe a donc judicieusement supposé qu'il existait chez *S.pombe* un équivalent de *SML1* capable de supprimer la létalité *rad3-ts csn1-d* : le gène *Spd1* (Liu et al., 2003). Ils ont également montré que la dégradation en phase S de *Spd1* pouvait être corrélée avec la relocalisation de Suc22 du cytoplasme vers le noyau, et que cette dégradation était dépendante du système ubiquitine-protéasome, tout comme la dégradation de *Sml1* chez *S. cerevisiae*. Leur hypothèse principale était que *Spd1* agirait comme une ancre pour maintenir Suc22 dans le noyau.

L'équipe de Håkanson et al. quant à elle fit l'hypothèse que *Spd1* était un inhibiteur de la RNR en se liant à la grosse sous unité Cdc22 (R1) et non à la petite sous unité (Håkansson et al., 2006). Pour en venir à cette conclusion, ils ont réalisé des tests de réduction de CDP sur les complexes Rnr1-Suc22 et Cdc22-Suc22, puis ils ont ajouté progressivement la protéine *Spd1* (Håkansson et al., 2006). Il est apparu qu'il y avait une faible inhibition du complexe Rnr1-Suc22 comparé au complexe Cdc22-Suc22, d'où l'hypothèse que l'inhibition de *Spd1* passerait par le biais de son interaction avec Cdc22 plutôt qu'avec Suc22 (Håkansson et al., 2006). Des études par Biacore® ont également été menées afin de valider cette hypothèse.

Ce n'est qu'après la sortie de la publication de Lee et al. portant sur le rôle de *DIF1* (voir paragraphe suivant) que les choses se sont clarifiées pour *Spd1*.

Une étude fonctionnelle très approfondie de *Spd1* a été récemment effectuée (Nestoras et al., 2010). Cette étude montre également que *Spd1* est capable de se lier à la fois à la petite sous unité de la RNR et à la grosse sous unité de la RNR, mettant en accord les observations

---

<sup>4</sup> Le signalosome est un complexe initialement identifié comme étant un régulateur négatif de la photomorphogenèse des plantes. Ce complexe est composé chez l'Homme de 8 sous-unités qui partagent une homologie avec le couvercle du protéasome 19S. Le signalosome est impliqué dans la régulation de certaines E3 ubiquitines ligases.



précédentes qui pouvaient sembler contradictoires (Håkansson et al., 2006; Liu et al., 2003). 41 mutants indépendants de Spd1 ont été construits en faisant des mutations successives de 3 acides aminés en 3 acides aminés (méthode dite d' « alanine-scanning »). Pour chacun de ces mutants, la relocalisation de la petite sous-unité de la RNR a été analysée, la capacité à supprimer la létalité de *rad3-d csn1-d*, ainsi que la capacité des deux sous unités de la RNR à s'associer ont été testées (Nestoras et al., 2010). Focalisons-nous sur les mutants du domaine Hug ; la majorité de ces mutants présente un défaut de localisation de la petite sous-unité principalement en présence de stress génotoxique, et perd la capacité d'association des deux sous-unités R1-R2. Suite à leurs observations, Nestoras *et al.* démontrent que Spd1 permet d'importer au noyau la petite sous-unité mais n'agit pas comme une ancre contrairement à ce qui avait été préalablement proposé par Liu et al (Liu et al., 2003). En ce qui concerne la fonction de Spd1, ils font l'hypothèse que cette protéine sert d'intermédiaire pour la formation de complexes RNR immatures et inactifs (Nestoras et al., 2010). Dans cette étude, ils révèlent également que Spd1 est une protéine intrinsèquement désordonnée (IDP) tout comme Sml1 (Nestoras et al., 2010).

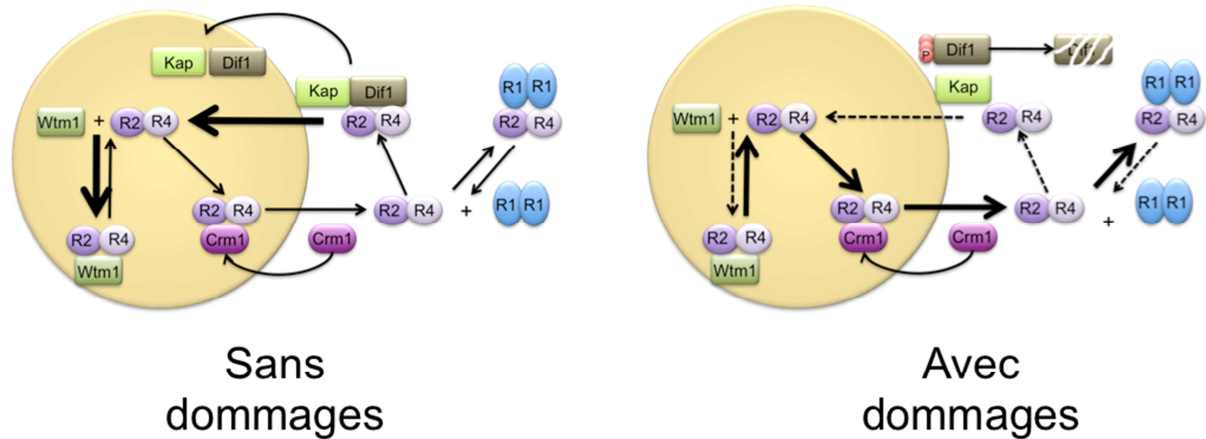
### 2.3. *DIF1 (Damage-regulated Import Facilitator)*

C'est le dernier gène de la famille à avoir été étudié parallèlement par l'équipe de Elledge (Lee et al., 2008) et celle de Huang (Wu and Huang, 2008). Une analyse par BLAST de *DIF1* a permis d'identifier ses homologues/orthologues parmi les Saccharomycetaceae, mais aucun n'a été identifié chez les autres champignons et eucaryotes supérieurs (Wu and Huang, 2008). Comme *SML1*, *DIF1* est phosphorylé et dégradé en réponse aux dommages de l'ADN de manière dépendante des checkpoints. Ces deux protéines partagent d'ailleurs le domaine « sml » ; qui est un phosphodegron (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008) (voir paragraphe précédent sur *SML1*). Tout comme *SML1*, la délétion de *DIF1* permet de supprimer la létalité *mec1Δ*, suggérant un rôle inhibiteur dans le métabolisme des nucléotides. Etant donné son homologie avec le gène *SPD1*, et afin d'évaluer le rôle de *DIF1* dans la régulation de la RNR, les deux équipes ont étudié la localisation de la petite sous-unité Rnr2p-Rnr4p dans les mutants inactivés pour *DIF1* (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008). Dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, la petite sous unité est séquestrée dans le noyau en dehors de la phase S et en absence de dommages de l'ADN. Par contre, en absence de Dif1, la petite sous unité se distribue de manière homogène entre cytoplasme et noyau voire principalement

dans le cytoplasme, et ce quel que soit la phase du cycle cellulaire (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008). Une mutation de sept des acides aminés au début du domaine « hug » de Dif1p perturbe la localisation de la petite sous unité de la RNR : on observe le même phénotype que pour une souche *dif1Δ* (Lee et al., 2008). Ces données semblent indiquer que le domaine « hug » participe au contrôle de la localisation de R2. Comment le domaine Hug peut-il avoir une influence sur la relocalisation de la petite sous unité de la RNR ? Des analyses par Biacore® ont permis de déterminer que le domaine Hug est indispensable à la liaison *in vitro* de Dif1 au complexe Rnr2-Rnr4 (Lee et al., 2008).

Chez *S.cerevisiae*, il existe deux autres protéines impliquées dans la localisation nucléaire de la petite sous-unité de la RNR ; Wtm1p et Kap122p. Wtm1p sert d'ancre nucléaire à la petite sous-unité de la RNR tandis que Kap122p est requis pour la localisation nucléaire de Wtm1p (Wu and Huang, 2008). Les phénotypes observés pour *dif1Δ* sont très comparables à ce qui est observé pour *wtm1Δ* et *Kap122Δ* (Wu and Huang, 2008). Les deux équipes ont donc cherché à voir si ces trois gènes se trouvaient dans la même voie. Le phénotype des doubles mutants *dif1Δ wtm1Δ* et *dif1Δ kap122Δ* est aggravé comparativement aux simples mutants, indiquant que Dif1p agit dans une voie différente de *WTM1* et *KAP122* (Wu and Huang, 2008). Pour déterminer si Dif1p jouait un rôle dans l'import de la petite sous unité et/ou un rôle d'ancrage comme c'est le cas de Wtm1p, Wu *et al.* ont testé la localisation de Rnr4p dans un contexte où l'export nucléaire de Rnr4p est bloqué (Wu and Huang, 2008). Dans le cas de souches *wtm1Δ*, l'inhibition de l'export permet de retrouver une localisation nucléaire de Rnr4p (Wu and Huang, 2008). Par contre, dans le cas de souches *dif1Δ*, l'inhibition de l'export ne permet pas de retrouver une localisation nucléaire de Rnr4p, indiquant que Dif1p joue un rôle dans l'import de la petite sous unité de la RNR et non pas uniquement dans son maintien dans le noyau (Wu and Huang, 2008).

L'ensemble de ces données a permis de proposer un modèle concernant l'import et la rétention nucléaire du complexe Rnr2-Rnr4 chez *S. cerevisiae* (Figure II3) (Lee et al., 2008).



**Figure II 3 : Modèle de la régulation de la localisation de la petite sous unité de la RNR sans et en réponse aux dommages de l'ADN.**

Sans dommages de l'ADN, Dif1p facilite l'import nucléaire de la petite sous unité tandis que Wtm1 maintient Rnr2p-Rnr4p dans le noyau, favorisant ainsi la localisation nucléaire de la petite sous unité de la RNR.

En présence de dommages de l'ADN, Dun1p phosphoryle Dif1p conduisant à la dégradation de ce dernier. L'import nucléaire se trouve réduit. D'autres mécanismes non identifiés permettent de relarguer Rnr2p-Rnr4p du noyau ; soit en diminuant leur affinité pour Wtm1p soit en augmentant l'export par Crm1. D'après Lee et al. 2008

### 3. Hypothèses de la fonction de Hug1

Nous avons vu que Hug1 faisait partie d'une famille de gènes. L'étude de ces gènes a permis de mettre en évidence trois domaines fonctionnels ; le domaine « R1B » qui est le domaine de liaison à la grosse sous-unité de la RNR, le domaine « sml » qui se trouve être un phosphodégéron et le domaine « hug » qui est proposé comme étant le domaine d'interaction avec la petite sous-unité de la RNR (Lee et al., 2008; Nestoras et al., 2010). Parmi les gènes de cette famille tous ceux qui ont été étudiés sont décrits comme étant des inhibiteurs de la RNR. Ainsi chez la levure bourgeonnante *S.cerevisiae*, deux protéines sont connues pour inhiber la RNR ; Sml1 qui va inhiber la grosse sous-unité Rnr1 via sa partie C-terminale, et Dif1 qui va importer au noyau la petite sous-unité Rnr2-Rnr4. Ces inhibiteurs agissent en dehors de la phase S et des réponses aux dommages de l'ADN, puis ils sont dégradés durant ces deux phases.

Vu les homologies de Hug1 avec ces inhibiteurs de la RNR, on peut raisonnablement suggérer que Hug1 serait aussi un inhibiteur. Pour terminer, puisque Hug1 possède un domaine « hug » on peut supposer qu'il serait un inhibiteur de la petite sous-unité de la RNR, mais avec une régulation différente.

Maintenant il reste à valider ces hypothèses, et à réaliser des analyses pour comprendre le mode de fonctionnement de Hug1.





*Chapitre III : De la  
généétique à la  
Biophysique de Hugl*





---

## **PARTIE 1 : Les régulations de Hug1**

---

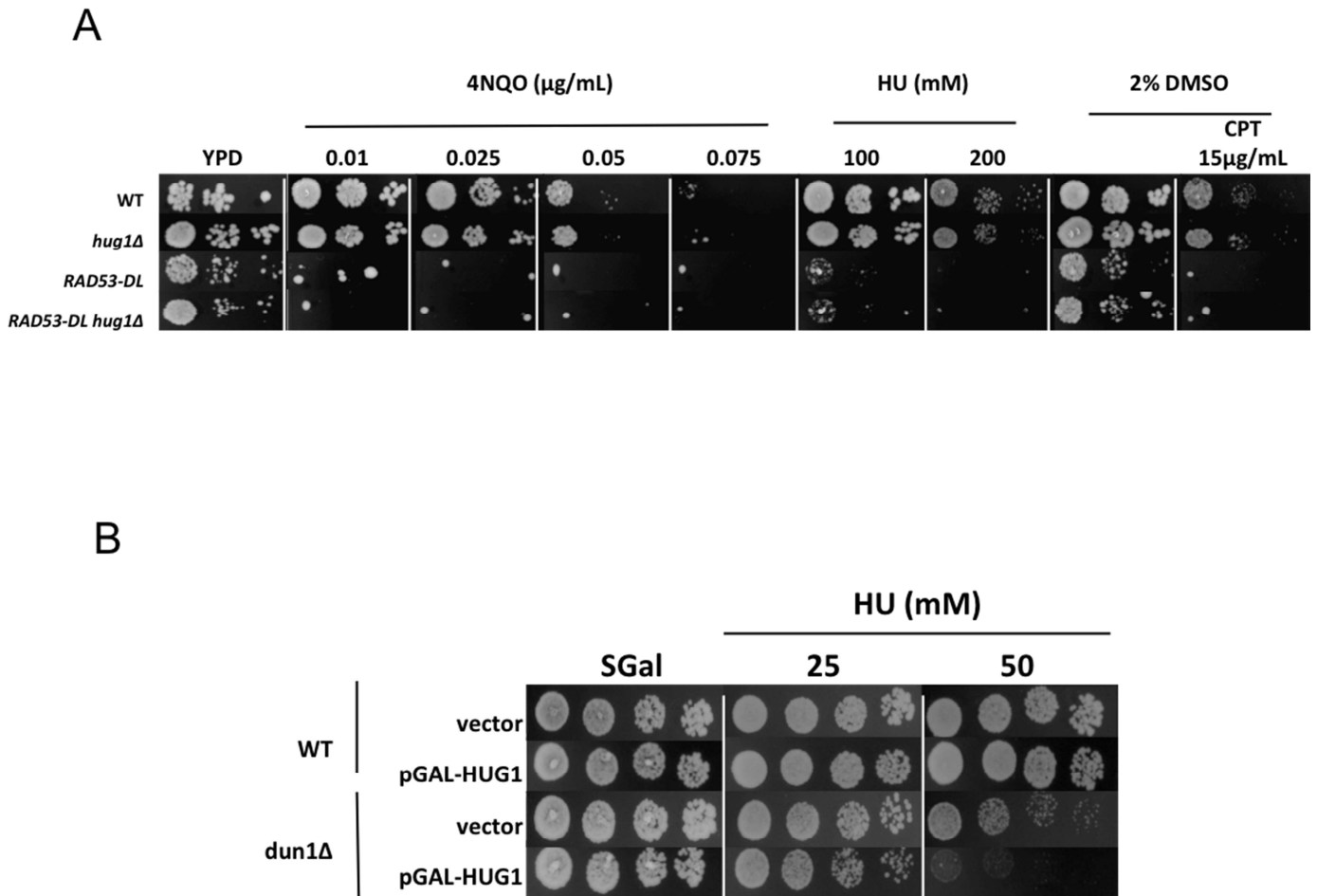
### **1. Quel(s) phénotype(s) pour Hug1 ?**

---

Mis à part les données de l'équipe de Hieter (Basrai et al., 1999), peu de données sur les fonctions que pouvaient avoir Hug1 étaient connues au début de notre étude, peu de phénotypes liés à l'inactivation ou la surexpression de *HUG1* également. Il a été montré que la délétion du gène *HUG1* permettait de sauver la létalité de souches *mec1Δ* (Basrai et al., 1999). Comme la délétion de *HUG1* permet de supprimer la létalité de *mec1Δ*, nous avons supposé que la délétion de *HUG1* pourrait également supprimer la létalité de *rad53Δ*. Nous avons délété *RAD53* ou *MEC1* dans des souches diploïdes (nous avons vérifié les tétrades obtenues à partir de ces diploïdes), puis nous avons délété *HUG1* ou *SML1* dans les diploïdes. Nous avons alors analysé les tétrades obtenues. Conformément à ce qui était attendu, nous avons obtenu de manière significative des doubles mutants *sm1Δ rad53Δ* ou *mec1Δ*, par contre pour ce qui est de *hug1Δ*, nous ne sommes parvenus à obtenir qu'une seule spore double mutante dans chaque cas sur 16 tétrades analysées, ce qui n'est pas statistiquement significatif. Dans les conditions utilisées, il semblerait donc que l'inactivation de *HUG1* ne supprime pas la létalité de *mec1Δ* ou *rad53Δ*.

Aucun phénotype particulier de croissance en réponse à différents stress génotoxiques n'avait été observé pour la souche invalidée pour *HUG1* dans l'étude de Basrai et al. (Basrai et al., 1999). Nos observations vont dans le même sens, la délétion de *HUG1* n'aggrave ni n'améliore la croissance des souches sauvages en présence des différents stress génotoxiques testés (Figure III.1.A).

Nous avons identifié *HUG1* dans nos analyses transcriptomiques à l'aide de l'allèle *RAD53-DL*, comme *hug1Δ* n'existe pas dans la banque EUROSCARF, le laboratoire est peut être passé à côté d'un potentiel suppresseur de la létalité de *RAD53-DL* lors du crible génétique. Nous avons alors testé si la délétion de *HUG1* modifiait la croissance de souches *RAD53-DL* en présence ou non de stress génotoxiques et n'avons observé aucun effet. *HUG1* n'est donc pas un suppresseur de la létalité de *RAD53-DL* (Figure III.1.A).



**Figure III 1 : Tests de croissance en présence de stress génotoxiques**

- A. La délétion de *HUG1* ne modifie pas la croissance de souches WT ou *RAD53-DL*.  
 B. La surexpression de *Hug1* aggrave la sensibilité aux stress génotoxiques de souches délétées pour *DUN1*.

Basrai et al. ont montré que la délétion de *HUG1* supprimait la sensibilité de souches *dun1Δ* aux stress génotoxiques. La logique voudrait donc que la surexpression de *HUG1* aggrave la sensibilité aux stress génotoxiques de souches *dun1Δ*. Nous avons donc construit deux plasmides de surexpression ; un plasmide multicopie (2 $\mu$ ) dans lequel *HUG1* est sous le contrôle de son propre promoteur (pJM07), et un autre plasmide multicopie (2 $\mu$ ) dans lequel *HUG1* est sous le contrôle du promoteur *GAL1* (pJM02). Puis nous avons transformé des souches *dun1Δ* avec ces plasmides. Nous observons un très léger effet négatif sur la croissance de *dun1Δ* en présence d'hydroxyurée quand *HUG1* est sous le contrôle de son propre promoteur. Cela n'est pas étonnant puisque dans les conditions où *DUN1* est délété, le promoteur de *HUG1* est réprimé par *CRT1*, donc dans ce cas l'effet de la surexpression est probablement minime. Par contre nous observons un effet négatif plus marqué de la surexpression de *HUG1* quand ce dernier est sous le contrôle du promoteur *GAL1*, en

présence d'HU (Figure III1.B). Nous avons testé d'autres stress génotoxiques tels que la camptothécine, et le 4NQO mais nous n'avons pas vu d'effets majeurs.

Le fait que la délétion de *HUG1* supprime la létalité de *mec1Δ* et la sensibilité aux stress génotoxiques de *dun1Δ* et que la surexpression aggrave la sensibilité aux HU (Figure III1.B), laisse présager un rôle d'inhibiteur de la ribonucléotide réductase pour Hug1.

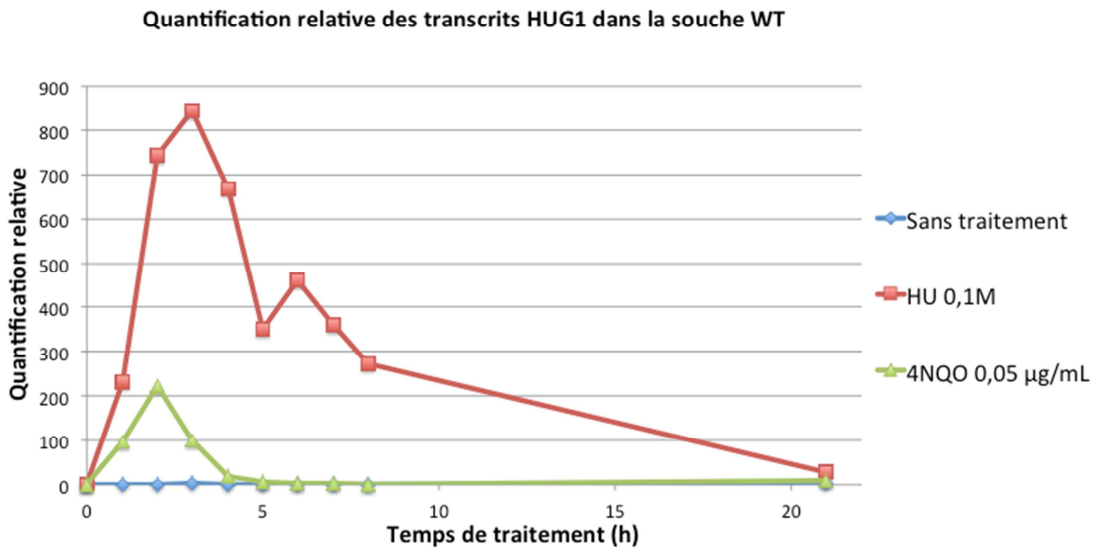
## **2. Une régulation en réponse aux dommages de l'ADN**

### **2.1. Au niveau transcriptionnel**

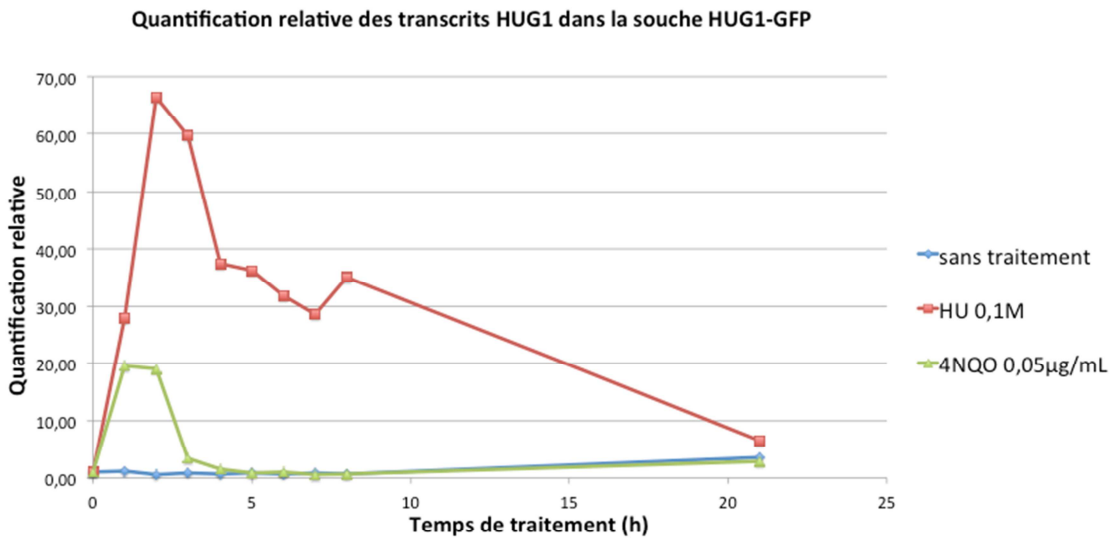
Il a été montré que le niveau du transcrite *HUG1* augmentait en réponse aux dommages de l'ADN (Basrai et al., 1999). Nous l'avons identifié, quant à nous, dans une analyse transcriptomique en réponse à l'activation de *RAD53*. Nous avons voulu connaître la cinétique d'activation de la transcription de *HUG1* en réponse aux dommages de l'ADN.

Tout d'abord, nous avons créé des souches étiquetées pour suivre, par la suite, *HUG1* au niveau protéique. Puis nous avons réalisé une cinétique en présence de HU ou de 4NQO avec deux souches étiquetées (13Myc ou GFP), la souche sauvage et la souche délétée pour *HUG1*. Des prélèvements sont effectués toutes les heures puis le lendemain matin. Ensuite les ARNs totaux sont extraits suivant le protocole décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Ces ARNs sont ensuite rétrotranscrits et analysés par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Les données obtenues sont ensuite analysées et normalisées. Les analyses des Ct (cycle treshold) sont réalisées en triplicatas, tout d'abord nous moyennons les données avant de les normaliser par rapport aux données obtenues pour un gène contrôle (*ACT1*) :  $\Delta Ct = Ct_{HUG1} - Ct_{ACT1}$ . Puis les données sont normalisées par rapport à un calibre (nous normalisons par rapport à la souche délétée pour *HUG1*) :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{souche_i} - \Delta Ct_{souche_\Delta}$ . Enfin une quantification relative est effectuée en utilisant la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec comme prérequis que les efficacités de PCR sur les gènes *HUG1* et *ACT1* sont proches. On peut déjà voir que le taux de transcrits en présence de 100mM de HU est plus fort que celui en présence de 0,05μg/mL de 4NQO (Figure III2.A,B,C). Il se trouve que Benton et al. ont également mesuré de manière différente la quantité de transcrits

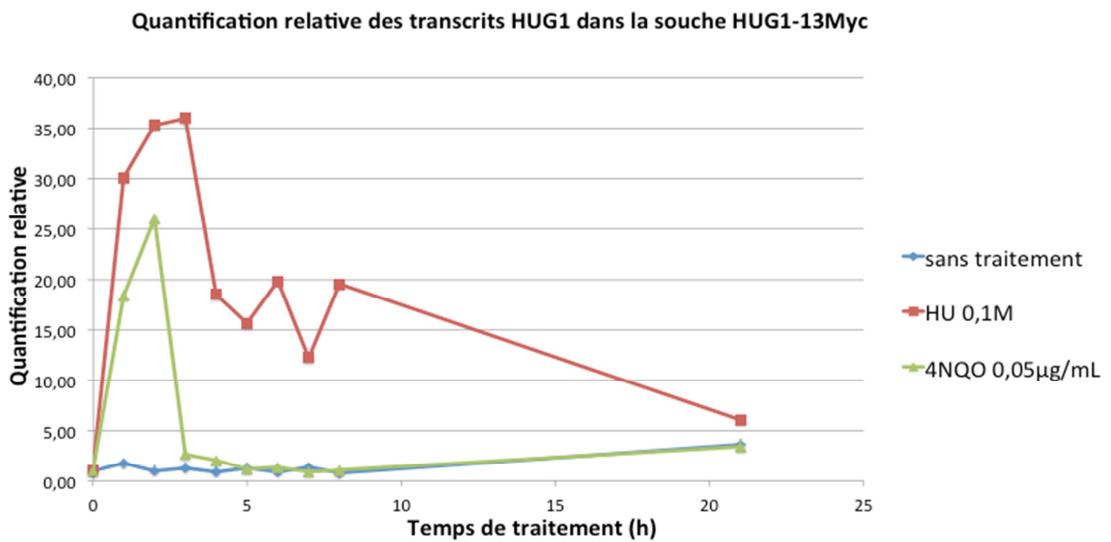
A



B



C



**Figure III 2 : Cinétique d'induction de la transcription de Hug1 en présence de différents stress génotoxiques.**

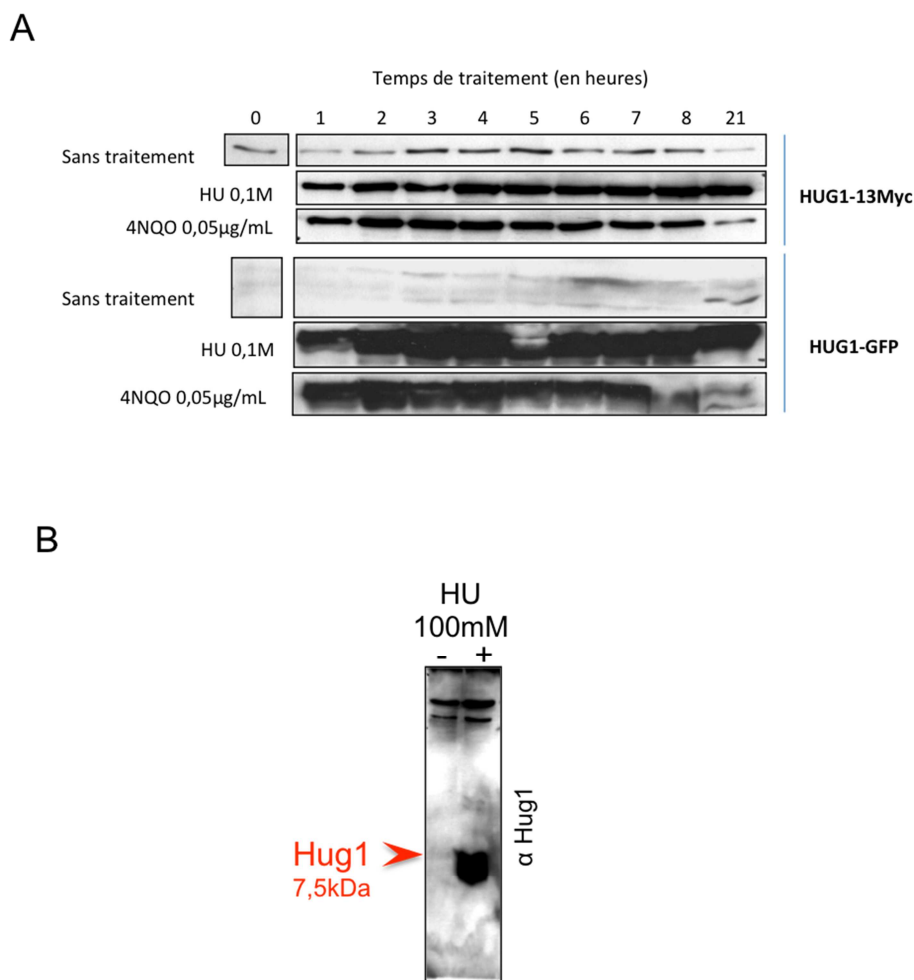
Les cellules sont cultivées pendant 21 heures avec 100mM de HU (en rouge) ou 0,05µg/mL de 4NQO (en vert) ou sans traitement (en bleu). Différentes souches sont utilisées pour ces analyses ; la souche sauvage (A) Hug1-GFP (B), Hug1-13Myc (C). Les ARNs totaux sont extraits et rétro transcrits avant d'être analysés par PCR quantitative en temps réel.

*HUG1* en réponses à différentes intensités de stress génotoxiques et ils ont remarqué une réponse maximale de la transcription de *HUG1* avec 100mM de HU et également avec 0,5µg/mL de 4NQO (Benton et al., 2007). On remarque que la quantité de transcrits présents dans la souche étiquetée 13Myc est plus importante au départ que celle de la souche étiquetée GFP (Figure III2.A,B). Mais globalement les cinétiques restent les mêmes. On atteint un pic 1-2 heures après ajout de stress génotoxiques. Puis le taux de transcrits diminue. La forte quantité de transcrits trouvés au temps 21 heures est probablement due à un problème de calibration ; le contrôle endogène choisi n'est pas adéquat pour des analyses de phase stationnaire (Teste et al., 2009). Il aurait mieux valu utiliser comme contrôle endogène, les gènes *ALG9*, *TAF10*, *TFC1* ou *UBC6* pour ces conditions de phase stationnaire (Teste et al., 2009).

2.2. Au niveau post-transcriptionnel

A partir de ces mêmes cinétiques, nous avons réalisé des prélèvements en vue de suivre la quantité de protéines Hug1 en réponse aux stress génotoxiques. Nous avons suivi l'expression de la protéine par western blot (Figure III3.A et B). On peut voir qu'alors que le niveau basal de Hug1, en absence de dommages à l'ADN, est à peine visible pour la souche étiquetée GFP celui-ci est très nettement observable dans la souche étiquetée 13Myc. Certes l'anticorps utilisé pour détecter le tag Myc est plus efficace néanmoins, lorsque l'on applique des stress génotoxiques l'induction semble plus faible pour la souche 13Myc que pour la souche GFP. Le signal étant saturant dans les deux cas, nous ne pouvons pas quantifier précisément le niveau d'induction. L'étiquetage semble donc avoir un effet sur la production ou la stabilité de la protéine d'où l'intérêt d'étudier la protéine endogène, c'est pourquoi nous avons choisi de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre Hug1 (voir la section matériels et méthodes). Grâce à ces anticorps, nous avons pu voir que la protéine endogène était très fortement produite en réponse à un stress génotoxique (Figure III3.B), on peut voir également, même si le signal est plus faible, que la protéine endogène est présente même en absence de stress génotoxiques.

Il était important de contrôler si l'augmentation de la quantité des transcrits était corrélable avec la quantité de protéines produites. En effet il peut y avoir une régulation post traductionnelle favorisant la dégradation de la protéine. Ici l'induction observée par l'analyse des transcrits est également visible par analyse des protéines (Dyavaiah et al., 2011).

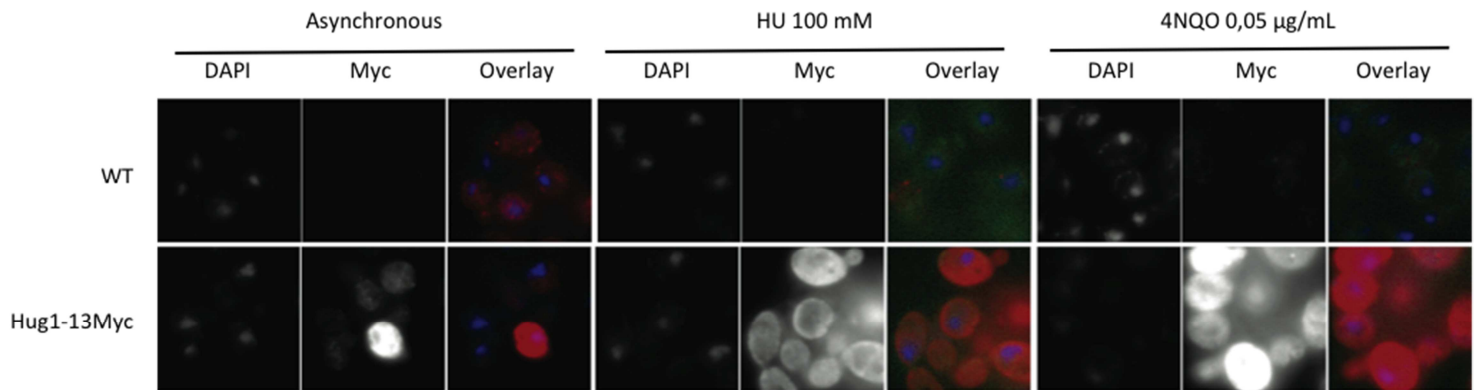


**Figure III 3: Production de la protéine Hug1 en présence de stress génotoxique**

- A. Cinétique de la production de Hug1 dans différentes conditions de culture. Les cellules sont cultivées pendant 21 heures avec 100mM de HU ou 0,05µg/mL de 4NQO. Différentes souches sont utilisées pour ces analyses ; Hug1-GFP et la souche Hug1-13Myc. Les protéines sont extraites et analysées par western blot à l'aide d'anticorps anti Myc ou anti GFP
- B. Induction de la protéine Hug1 endogène en présence ou non d'HU. La protéine Hug1 endogène est détectée à l'aide d'anticorps polyclonaux produits chez le lapin.

### 2.3. Au niveau subcellulaire

Au début de l'étude, nous ne connaissons pas la localisation subcellulaire de Hug1. Nous avons donc réalisé des analyses par immunofluorescence avec et sans stress génotoxiques (HU 100mM et 4NQO 0,05µg/mL) et avons regardé où était localisé Hug1 (Figure III4).



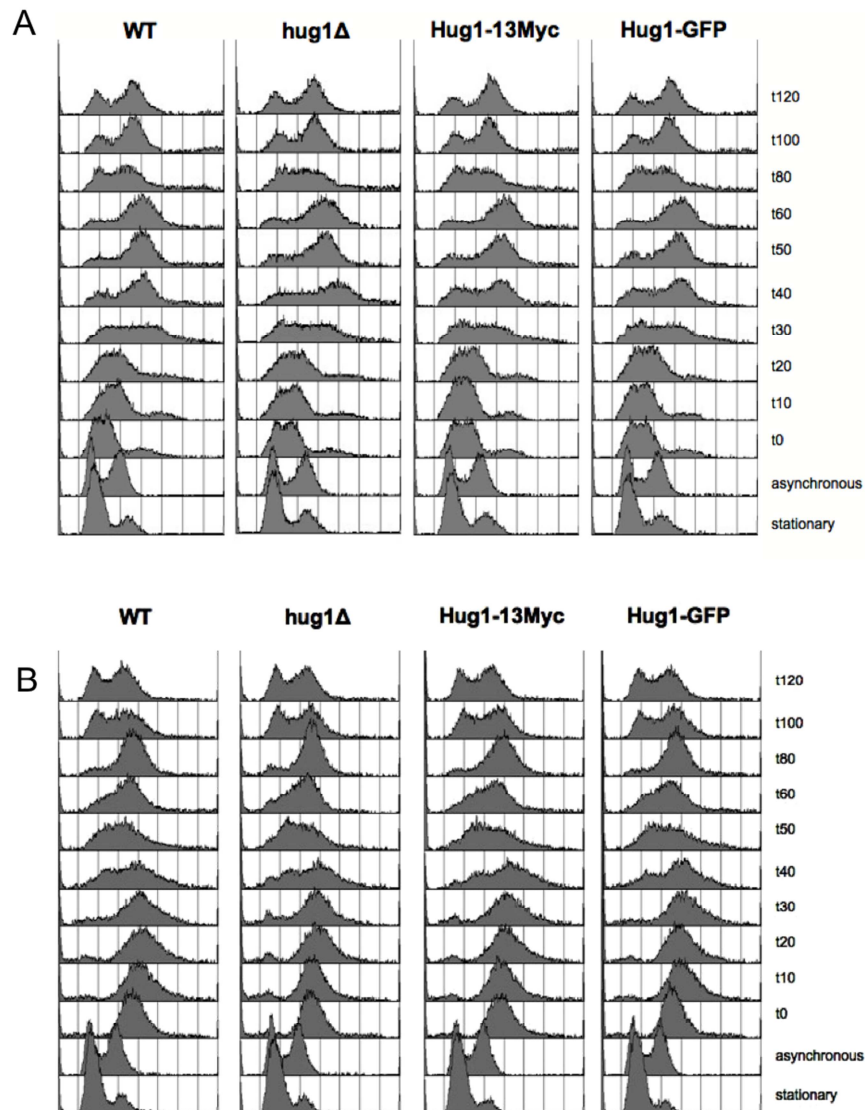
**Figure III 4 : Visualisation de la localisation sub-cellulaire de Hug1-13Myc**

Les cellules sont mises en culture en présence de 100mM de HU ou 0,05µg/mL de 4NQO durant 8 heures, puis la localisation de Hug1-13Myc est observée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-Myc.

On peut voir en absence de stress génotoxique exogène, mis à part quelques cellules (probablement dû à des dommages spontanés ou à une phase particulière du cycle), le signal correspondant à Hug1-13Myc est très faible (signe que Hug1 est continuellement présent dans la cellule mais à un faible niveau) et semble ne pas correspondre à une localisation précise dans la cellule : il y a du signal à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Lorsqu'on applique un stress génotoxique on peut voir très nettement une augmentation du signal, ce dernier devient presque saturant. Dans ces conditions, on peut voir que Hug1-13Myc se trouve majoritairement dans le cytoplasme, il pourrait y avoir une petite exclusion du noyau, peu évidente à voir et sans certitude car le signal est très fort. En conclusion on peut dire que Hug1 est préférentiellement localisé dans le cytoplasme et qu'il ne semble pas il y avoir de relocalisation massive vers le noyau en présence de stress génotoxiques.

### ***3. Une régulation au cours du cycle cellulaire***

Aucune étude n'a été publiée concernant la régulation de Hug1 au cours du cycle cellulaire. Tout d'abord, nous avons regardé si la délétion de *HUG1* pouvait avoir un impact sur le déroulement du cycle cellulaire. Nous avons réalisé deux types de synchronisation, une synchronisation au facteur alpha et une synchronisation au nocodazole. Le facteur alpha (ou  $\alpha$ -factor) est une phéromone de levure sécrétée par les cellules de type sexuel Mat  $\alpha$ .



**Figure III 5 : Etudes du déroulement du cycle cellulaire dans différentes souches en fonction de la méthode de synchronisation.**

Les cellules sont synchronisées durant 2 heures avec soit de l'alpha factor (A) soit du nocodazole (B), puis lavées et relarguées dans le cycle cellulaire. Les cellules sont ensuite fixées et marquées à l'iodure de propidium avant d'être analysées par cytométrie en flux.

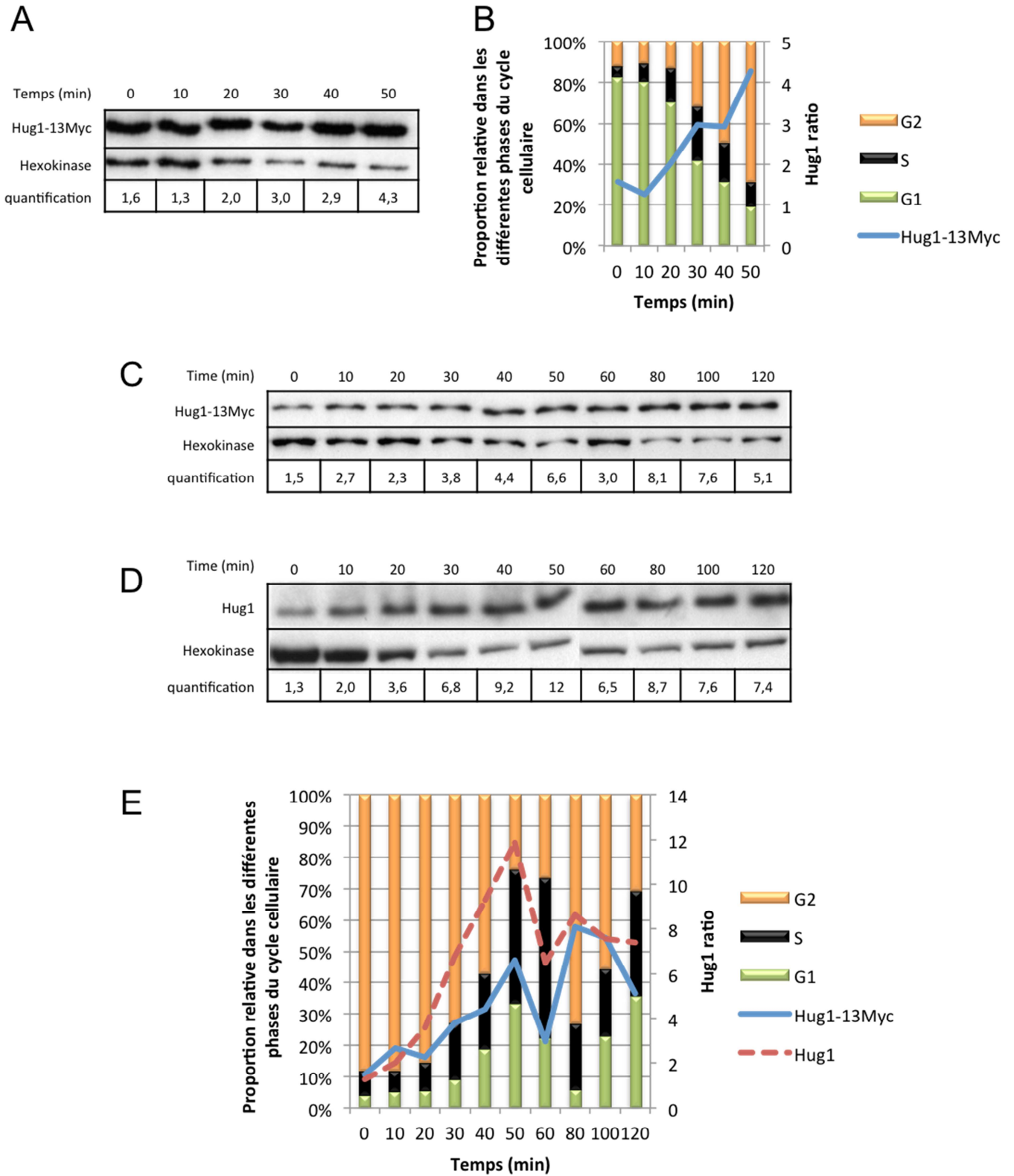
La phéromone se lie au récepteur de la cellule cible de type sexuel opposé pour induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, la production d'agglutinine à la surface de la cellule, des changements morphologiques et la transcription de certains gènes requis pour la conjugaison (Fujimura, 1990). Le nocodazole, quant à lui, est une drogue antiméiotique provoquant la dépolymérisation des microtubules bloquant ainsi les cellules en mitose (G2/M). Dans les deux cas, le blocage du cycle cellulaire est réversible : le cycle cellulaire reprend dès lors que le facteur alpha ou le nocodazole est ôté du milieu de culture.



Après avoir synchronisé les cellules nous les relâchons dans le cycle en les transférant dans un milieu dépourvu de facteur  $\alpha$  ou de nocodazole et des prélèvements sont effectués à différents temps. Ces extraits sont traités comme décrit dans la section « Matériels et méthodes » pour réaliser des analyses par cytométrie de flux (FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting). Les profils de FACS obtenus montrent que la délétion ou l'étiquetage de Hug1 ne perturbe pas significativement le déroulement du cycle cellulaire (Figure III5.A et B).

Par la suite, à partir de ces mêmes cellules synchronisées, nous avons suivi la quantité de Hug1 produite. La synchronisation en  $\alpha$ -factor révèle une augmentation graduelle de la quantité de protéines au cours de la progression dans le cycle cellulaire (Figure III6.A). Si on se reporte à la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, on peut voir que la quantité de Hug1 augmente en même temps que la quantité de cellules en phase S et G2 (Figure III6.B). La synchronisation au nocodazole montre elle aussi une augmentation graduelle de la quantité de Hug1 jusqu'au temps 50 minutes (Figure III6.C et D). Si on se réfère à la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, cette augmentation est corrélable avec une augmentation de la quantité de cellules en phase S, mais plus en G2 (Figure III6.E), allant plutôt dans le sens d'une accumulation en S de Hug1 jusqu'au début de la phase G2. De manière surprenante on peut voir une chute de la quantité de protéines au temps 60 minutes, qui pourtant, en terme de répartition est très comparable au temps 50 minutes. Ceci est observable à la fois chez la souche étiquetée 13Myc mais également la souche sauvage (Figure III6.E). Le fait que cette diminution soit visible dans 2 souches différentes, préparées des jours différents suggère qu'il ne s'agit pas d'un artéfact, on peut supposer que ce temps correspond à la transition du passage de la phase S à la phase G2 et qu'à ce moment Hug1 n'est plus produit, même plutôt dégradé.

En combinant les données obtenues, nous avons pu déterminer à quel moment du cycle cellulaire Hug1 était produit. Nos données suggèrent une production progressive au cours de la phase S jusqu'à atteindre un maximum en fin de phase S début G2.



**Figure III 6 : Analyse de la production de Hug1 au cours du cycle cellulaire.**

- A. Suivi de la production de Hug1-13Myc après une synchronisation à l'alpha factor par western blot. Les quantifications sont rapportées à la quantité d'hexokinase et normalisées par rapport au temps asynchrone (non présenté sur la Figure).
- B. Les ratios mesurés en A sont reportés en fonction du cycle cellulaire. Les proportions relatives des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire sont évaluées à l'aide du logiciel CellQuest Pro.

- C. Suivi de la production de Hug1-13Myc par western blot après une synchronisation au nocodazole. Les quantifications sont rapportées à la quantité d'hexokinase et normalisées par rapport au temps asynchrone (non présenté sur la Figure).
- D. Suivi de la production de Hug1 endogène par western blot après une synchronisation au nocodazole. Les quantifications sont rapportées à la quantité d'hexokinase et normalisées par rapport au temps asynchrone (non présenté sur la Figure).
- E. Les ratios mesurés en C et D sont reportés en fonction du cycle cellulaire. Les proportions relatives des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire sont évaluées à l'aide du logiciel CellQuest Pro.

## ***PARTIE 2 : Hug1 est une Protéine Intrinsèquement Désordonnée***

---

Il s'avère que parmi les membres de la famille de Hug1, deux membres au moins Sml1 (Gupta et al., 2004) et Spd1 (Nestoras et al., 2010) sont décrits comme étant des protéines intrinsèquement désordonnées, Hug1 pourrait donc en être une également.

### ***1. Prédiction de structure et de désordre***

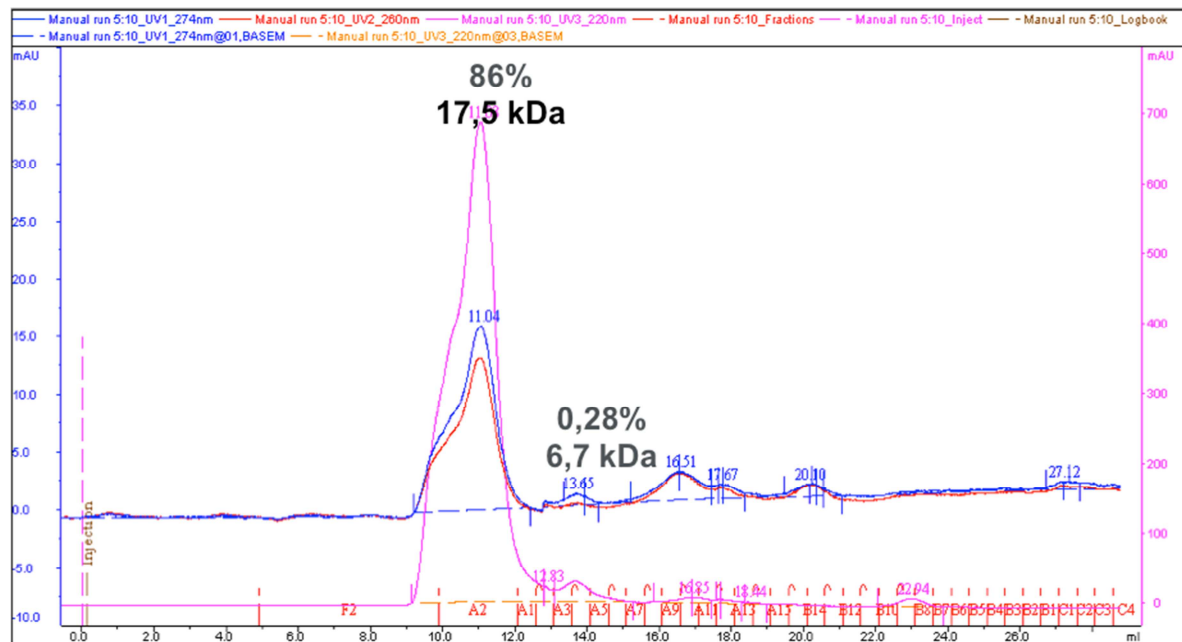
---

La première chose qu'il nous était possible de faire pour vérifier notre hypothèse était d'avoir recours aux analyses *in silico*. Il existe nombre de serveurs grâce auxquels il est possible de prédire la structure mais également le désordre des protéines. Comme décrit dans l'introduction, il en existe pas moins d'une soixantaine pour la simple prédiction du désordre protéique (Tompa, 2009). Nous avons choisi d'utiliser les plus courants.

Si on regarde les données *in silico* obtenues (Figure III7) on peut voir que ce sont principalement les extrémités N-terminales et C-terminales qui sont prédites comme étant désordonnées (Figure III7). En ce qui concerne la prédiction de structure, la majorité des logiciels prédisent la présence d'une hélice, plutôt dans la moitié N-terminale de la protéine, et un brin beta en partie C-terminale de la protéine. Pour le reste de la protéine il ne semble pas il y avoir de conformation particulière. Mais peut-on parler de protéine intrinsèquement désordonnée pour autant ? Ces données ne sont qu'indicatives et ne permettent pas de conclure quant au comportement réel de la protéine.



En réalisant successivement ces calculs, nous avons trouvé pour le pic majoritaire, un poids moléculaire apparent de 17,5kDa pour Hug1 soit plus de deux fois sa masse théorique (Figure III8). Deux hypothèses sont possibles ; soit Hug1 existe majoritairement sous forme dimérique, soit Hug1 est déplié rendant ainsi son volume moléculaire supérieur à son volume théorique (Uversky and Dunker, 2010).



**Figure III 8 : Etude de Hug1 par chromatographie d'exclusion**

La protéine Hug1 recombinante est produite et purifiée à 99% avant d'être analysée par chromatographie d'exclusion. La proportion relative des différents pics d'élution est évaluée en fonction de la totalité des pics obtenus lors de la chromatographie (tous n'apparaissent pas). Le poids moléculaire correspondant à chaque pic est calculé en fonction du volume d'élution par rapport au volume total de la colonne.

### 3. Analyses par dichroïsme circulaire

#### 3.1. Principe et applications

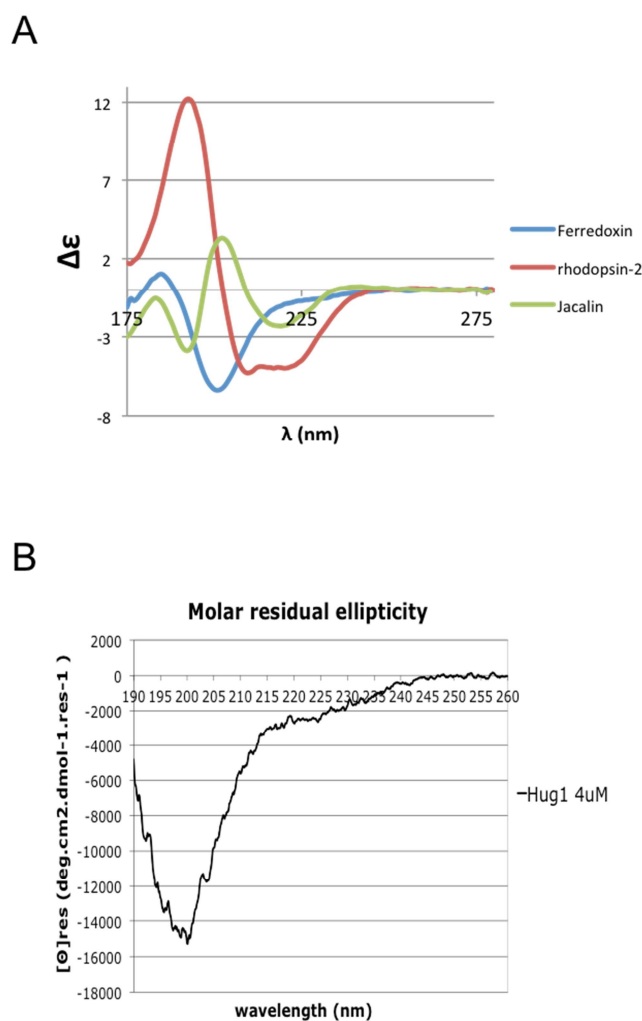
Le dichroïsme circulaire est une méthode rapide pour déterminer la composition en structure secondaire d'une protéine.

On dit d'un matériau qu'il présente un dichroïsme circulaire s'il absorbe différemment la lumière selon que sa polarisation est circulaire droite ou circulaire gauche.

En général le dichroïsme circulaire apparaît dans les molécules biologiques du fait de leur chiralité (asymétrie). C'est le cas de certains sucres et des acides aminés. Dans les protéines, ce qui donne l'information sur la structure secondaire sont les liaisons amides du squelette

peptidique et les chaînes latérales aromatiques. Leur signal de dichroïsme circulaire apparaît dans deux régions distinctes.

La première région est celle des UV lointains qui correspond au signal émis par les liaisons peptidique se situe entre 190 et 205nm. Les chaînes polypeptidiques peuvent former divers type de structure secondaire qui sont elles-mêmes chirales, ces motifs modulent le spectre de dichroïsme circulaire de la liaison peptidique de la protéine et par conséquent donne des informations sur la structure secondaire de la protéine (Wallace and Janes, 2009)



**Figure III 9 : Analyse de la structure secondaire de protéine par dichroïsme circulaire**

- Spectre de dichroïsme circulaire de trois protéines de la PCDDB (Whitmore et al., 2011). La rhodopsine-2 est une protéine contenant majoritairement des hélices alpha, la Jacaline est une protéine contenant majoritairement des brins beta et la Ferrédoxine est une protéine contenant majoritairement des coudes aléatoires.
- Etude de la structure secondaire de Hug1 par dichroïsme circulaire. 4 $\mu$ M de Hug1 pure à 99% dans de l'eau sont déposés dans une cuve de 2mm et scannés à différentes longueurs d'ondes.

Dans cette zone d'UV lointain, on considère trois spectres de références (Figure III9.A) selon que la protéine possède uniquement des hélices  $\alpha$ , des brins  $\beta$  ou alors qu'elle n'adopte pas de structure secondaire régulière. Ainsi, une protéine contenant uniquement des hélices  $\alpha$  possède deux minima, l'un à 208nm l'autre à 222nm et un maximum aux alentours de 190nm (Figure III9.A) (Wallace and Janes, 2009). En ce qui concerne les structures en brins  $\beta$ , le spectre présentera un minimum aux alentours de 215nm et un maximum vers 195nm avec des intensités moindre que ce qui est observé pour les protéines « tout  $\alpha$  ». Pour ce qui est des protéines possédant plusieurs types de structures secondaires, le spectre de dichroïsme circulaire correspondra à la moyenne pondérée de chacun des spectres de référence. Les protéines désordonnées présentent un pic négatif minimum vers 200nm et parfois des signaux de faibles valeurs autour de 220-230nm.

La seconde région informative en dichroïsme circulaire est celle des UV proches entre 250 et 300nm. Dans cette zone se sont principalement les acides aminés aromatiques qui contribuent à l'information. Le repliement tridimensionnel d'une protéine peut placer les chaînes latérales des acides aminés aromatiques dans des environnements chiraux à l'origine d'un signal de dichroïsme circulaire dans la région des UV proches. Ce signal constitue en quelque sorte une empreinte de la structure tridimensionnelle.

Ces informations permettent de réduire énormément les possibilités de structure de la protéine étudiée, mais elles ne donnent pas les emplacements des structures secondaires détectées. Le dichroïsme circulaire reste néanmoins un outil de choix pour observer les modifications de conformations. Par exemple, cette analyse peut être utilisée pour montrer que la structure secondaire change en fonction de la température ou du pH. Le dichroïsme circulaire donne moins d'informations sur la structure des protéines que la diffraction aux rayons X ou la RMN (Résonance Magnétique nucléaire), mais il permet de faire des mesures rapidement sans nécessiter une grande quantité de protéines (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ).

Le dichroïsme circulaire présente cependant quelques limitations, entre autre des difficultés résident dans le fait que les tampons utilisés couramment absorbent souvent la lumière dans la gamme de pH favorable au dichroïsme circulaire.

### 3.2. Un spectre de protéine désordonnée

Nous avons réalisé plusieurs expériences de dichroïsme circulaire sur Hug1 recombinant purifié à homogénéité. Tout d'abord, nous avons réalisé des mesures dans du tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7 10mM avec 40μM de Hug1, cependant la haute tension dépassait rapidement 500V (au-delà de ce voltage le rapport signal sur bruit est petit, rendant les données inexploitable). Nous avons alors décidé de diluer notre échantillon initial au ¼ dans de l'eau. Ceci nous a permis d'améliorer notre rapport signal sur bruit, mais ce n'était pas encore optimal. Finalement nous avons obtenu un signal optimal dans les conditions où Hug1 est à une concentration de 4μM dans de l'eau en utilisant une cuve de 2mm. Le spectre obtenu montre un minimum à 200nm et un léger plateau entre 215 et 230nm (Figure III.9.B).

Dans un premier temps nous avons comparé ce spectre avec ce qui était présent dans la banque protéique de dichroïsme circulaire (PCDDDB : <http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php> (Whitmore et al., 2011)). On peut voir très clairement que ce spectre ne ressemble pas du tout à ce qui est obtenu pour des protéines riches en hélice ou riches en brins β (Figure III.9.A). Par contre on note une forte ressemblance avec la ferrédoxine, qui dans la PCDDDB est qualifiée comme étant une protéine désordonnée.

Pour pouvoir analyser ce spectre il a fallu le déconvoluer, pour se faire nous avons utilisé le serveur DICHROWEB (disponible à l'adresse suivante : <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> (Lobley et al., 2002; Whitmore and Wallace, 2004, 2008)). Nous avons testé plusieurs algorithmes de déconvolution ; SELCON3 (Lees et al., 2006; Sreerama et al., 1999; Sreerama and Woody, 1993), CONTIN (Lees et al., 2006; Provencher and Glöckner, 1981; van Stokkum et al., 1990) et CDSSTR (Compton and Johnson, 1986; Lees et al., 2006; Manavalan and Johnson, 1987; Sreerama and Woody, 2000). Dans tous les cas, nous trouvons une très large proportion de régions désordonnées (de l'ordre de 45% de la protéine) (tableau III.1). D'après ces résultats, on peut estimer que Hug1 est une protéine intrinsèquement désordonnée.



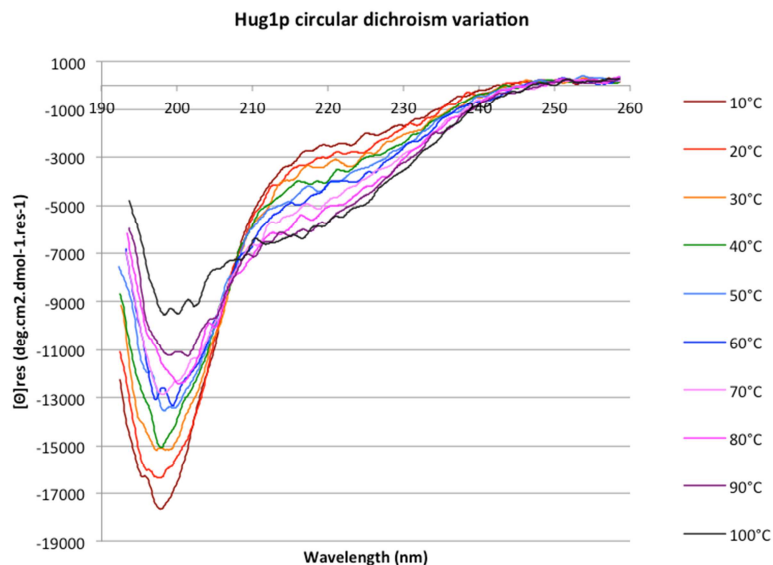
Algorithm	Regular $\alpha$ -Helix	Distorted $\alpha$ -Helix	Regular $\beta$ -strands	Distorted $\beta$ -strands	Turns	Unordered	Total
SELCON3	0,025	0,088	0,146	0,122	0,166	0,438	0,985
CONTIN	0,004	0,099	0,159	0,119	0,157	0,462	1
CDSSTR	0,00	0,05	0,21	0,12	0,15	0,47	1

**Tableau III 1 : Analyse de la composition en structure secondaire de Hug1 après déconvolution du signal de dichroïsme circulaire.**

### 3.3. Un profil typique d'une IDP

Nous avons souhaité avoir accès à la stabilité de la protéine, pour cela nous avons réalisé des analyses à différentes températures afin de dénaturer la protéine. Tout d'abord nous nous sommes placés à une longueur d'onde fixe pour suivre la variation du signal de dichroïsme circulaire aux différentes températures testées, et ainsi déterminer à partir de quel moment la protéine commence à se dénaturer et donc les conditions dans lesquelles on peut la maintenir dans un bon état de stabilité. Dans la théorie en se plaçant à une température fixe, la variation du signal de dichroïsme en fonction de la température donne un profil en sigmoïde. Dans notre cas en nous plaçant à 200nm (le pic majoritaire) nous avons obtenu un profil plat indiquant que la protéine semble stable aux différentes températures testées. Par la suite nous avons envisagé une autre stratégie, dans ce cas nous avons décidé d'observer le profil entier de dichroïsme circulaire à différentes températures pour confirmer que la protéine est stable (Figure III10). Le pic négatif majoritaire tend à disparaître alors que le signal du plateau aux alentours de 220nm tend à s'amplifier (Figure III10). Ces observations vont plutôt dans le sens que la protéine s'ordonne avec l'augmentation de la température. Les travaux de Kjaergaard et al. (Kjaergaard et al., 2010) vont d'ailleurs dans le même sens. Ce dernier a réalisé des études sur les protéines intrinsèquement désordonnées, et l'impact des variations de température sur leur structure. Il s'est avéré, que lors d'expérimentations comparables aux nôtres, cette équipe a obtenu les mêmes profils de « dénaturation » que nous, et ils démontrent que des changements conformationnels ont lieu, en augmentant la température, de manière commune dans les protéines intrinsèquement désordonnées, principalement la formation d'hélices.

Nous pouvons donc résolument affirmer que Hug1 est une protéine intrinsèquement désordonnée.



**Figure III 10: Superposition de spectres de dichroïsme circulaire de Hug1 mesurés à différentes températures.**

Les spectres sont obtenus à partir de la protéine Hug1 recombinante purifiée à 99% à une concentration de  $9\mu\text{M}$  dans de l'eau introduits dans une cuve de 1mm et analysés à différentes températures (10°C à 100°C avec un pas de 10°C) sur un spectrophotomètre JASCO.

#### **4. Confirmation par résonance magnétique nucléaire**

Les prédictions *in silico* laissent présager la présence d'une hélice en partie N-terminale et les données de dichroïsme circulaire semblent montrer la présence d'une petite zone structurée. Dans le but d'étudier la structure secondaire de Hug1 nous avons alors décidé d'initier des analyses par résonance magnétique nucléaire.

##### **4.1. Principe et applications**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène qui a lieu quand certains atomes sont mis en présence dans un champ magnétique fixe et qu'ils sont exposés à un second champ magnétique oscillant. Elle désigne une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ...)(Canet, 1991). L'environnement dans lequel se trouve le noyau apporte un effet perturbateur. Cela conduit à une différenciation des fréquences de résonance en fonction de l'environnement électronique du noyau et donc de la nature du groupement chimique auquel il appartient.

Cet effet est nommé déplacement chimique et s'exprime en parties par million (ppm) (Canet, 1991).

A côté de la diffraction aux rayons X, la RMN est devenue une méthode d'étude des macromolécules biologiques en biologie structurale. Des protéines de masse moléculaire de 10 à 30 kDa peuvent être analysées ainsi que des oligonucléotides de plusieurs dizaines de paires de bases. Et en plus la RMN donne accès à certaines informations non accessibles en cristallographie.

On peut réaliser différents types de spectres donnant des informations différentes sur la protéine. La RMN du proton ( $^1\text{H}$ ) permet d'évaluer rapidement la faisabilité de son étude structurale par RMN.

La RMN bidimensionnelle  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ , pour la plus simple de type HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), permet de corréler, pour chaque groupe amide, les fréquences des noyaux d'hydrogène et d'azote. La carte ainsi obtenue est souvent qualifiée d'empreinte caractéristique de la structure protéique considérée. C'est en particulier le type de spectre utilisé pour explorer les interactions intermoléculaires à partir d'un titrage de la protéine marquée au  $^{15}\text{N}$  avec un partenaire non marqué. La variation des déplacements chimiques indique la formation d'un complexe et l'identification des résidus dont les fréquences sont affectées permet de déterminer les régions d'interaction.

Pour finir la RMN tridimensionnelle  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  permet la détermination de la structure d'une protéine et elle est basée sur l'évaluation des distances moyennes entre les protons de la protéine. L'attribution complète des déplacements chimiques du squelette peptidique permet de connaître précisément la structure secondaire d'une protéine. En effet les déplacements chimiques de certains noyaux sont des indicateurs de structure secondaire.

#### 4.2. Une protéine totalement désordonnée

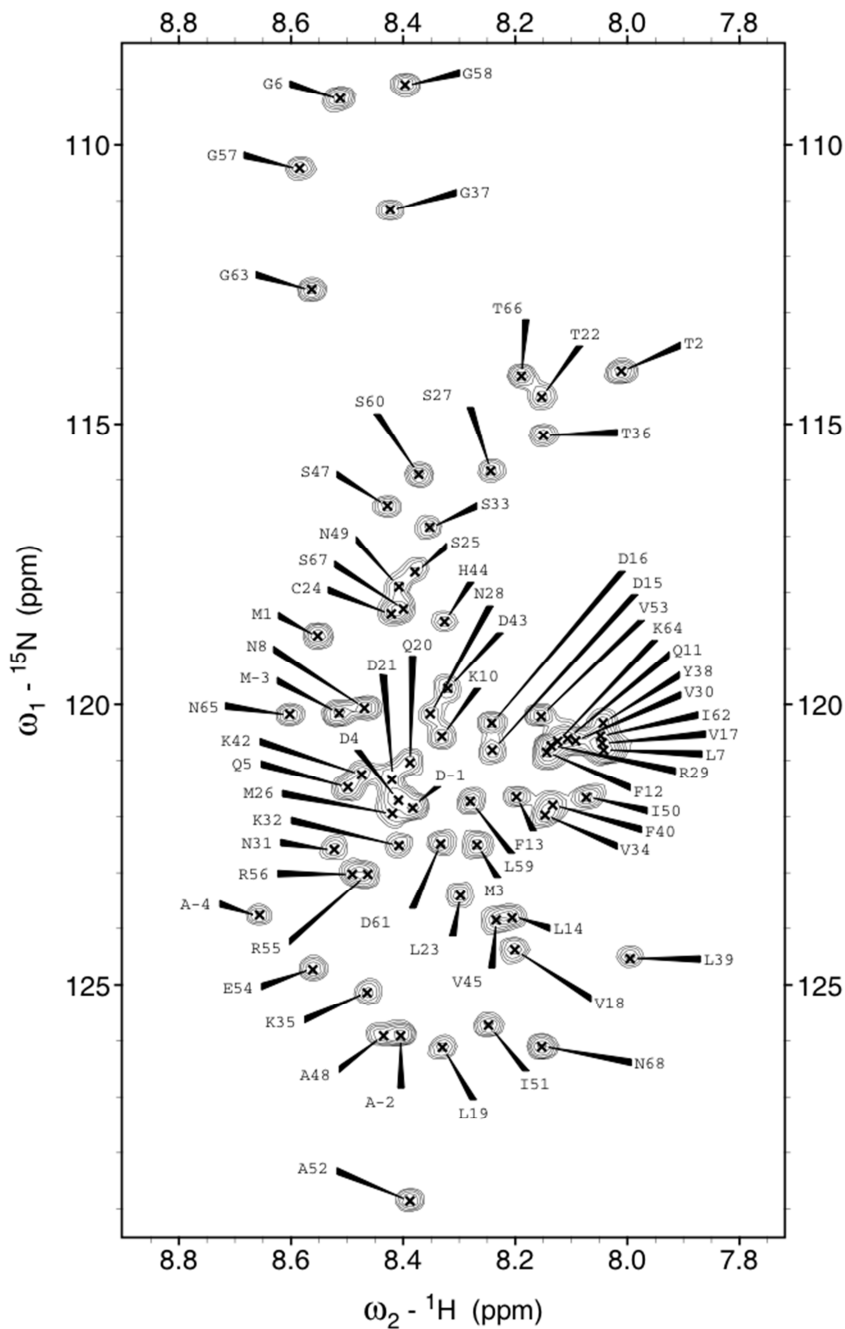
La protéine que nous étudions est de petite taille ce qui est un prérequis pour réaliser des expérimentations en RMN. Pour réaliser ces expériences il a fallu marquer notre protéine avec de l'azote lourd  $^{15}\text{N}$  comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Ayant dû changer de milieu de culture pour le marquage des protéines, nous avons rencontré des difficultés à produire Hug1 en grande quantité. Les bactéries transformées avaient une faible croissance dans le milieu synthétique M9. Nous avons un rendement de l'ordre de 10% de

ce que nous étions capables de produire en Magic Media. Ainsi nous n'obtenions que 30 $\mu$ M de protéines alors que la limite basse pour les expériences de RMN est de 10 $\mu$ M. Dans un premier temps nous avons augmenté le volume de production en passant de 1 à 4L de culture, mais ceci n'a pas augmenté considérablement la concentration de protéines obtenues à la fin des étapes de purification (de l'ordre de 40-50 $\mu$ M). Après un dernier test infructueux de changement de protocole de préparation du milieu M9, nous avons choisi d'utiliser un milieu riche commercial (ISOGRO) et avec seulement 200mL de culture, nous sommes parvenus à produire la protéine Hug1 à une concentration de 60 $\mu$ M. Une fois la protéine marquée produite, nous avons réalisé les premières étapes de purification jusqu'au clivage à la protéase TEV inclus et la purification Ni-NTA. Après cette étape, les contaminants restants étant de grande taille et donc non visibles en RMN, nous nous passons de l'étape de purification sur une échangeuse d'ions.

Nous avons alors pu initier, en collaboration avec l'équipe de Françoise Ochsenbein, les analyses par RMN. Sur le spectre obtenu en deux dimensions (spectre HSQC) nous couvrons la totalité des résidus constituant Hug1, plus ceux présents dans le site de clivage à la TEV. Le profil du spectre ne laisse présager aucune structure secondaire (Figure III11). Ce dernier est plutôt ramassé sur lui-même signe que la protéine est désordonnée (Tompa, 2009).

Ainsi, les approches *in silico* nous ont permis de proposer une hypothèse quant à la structuration de Hug1, hypothèse qui a été confirmée par la suite par des approches expérimentales. Nous avons donc pu montrer que Hug1 fait bien partie de la catégorie des protéines intrinsèquement désordonnées.

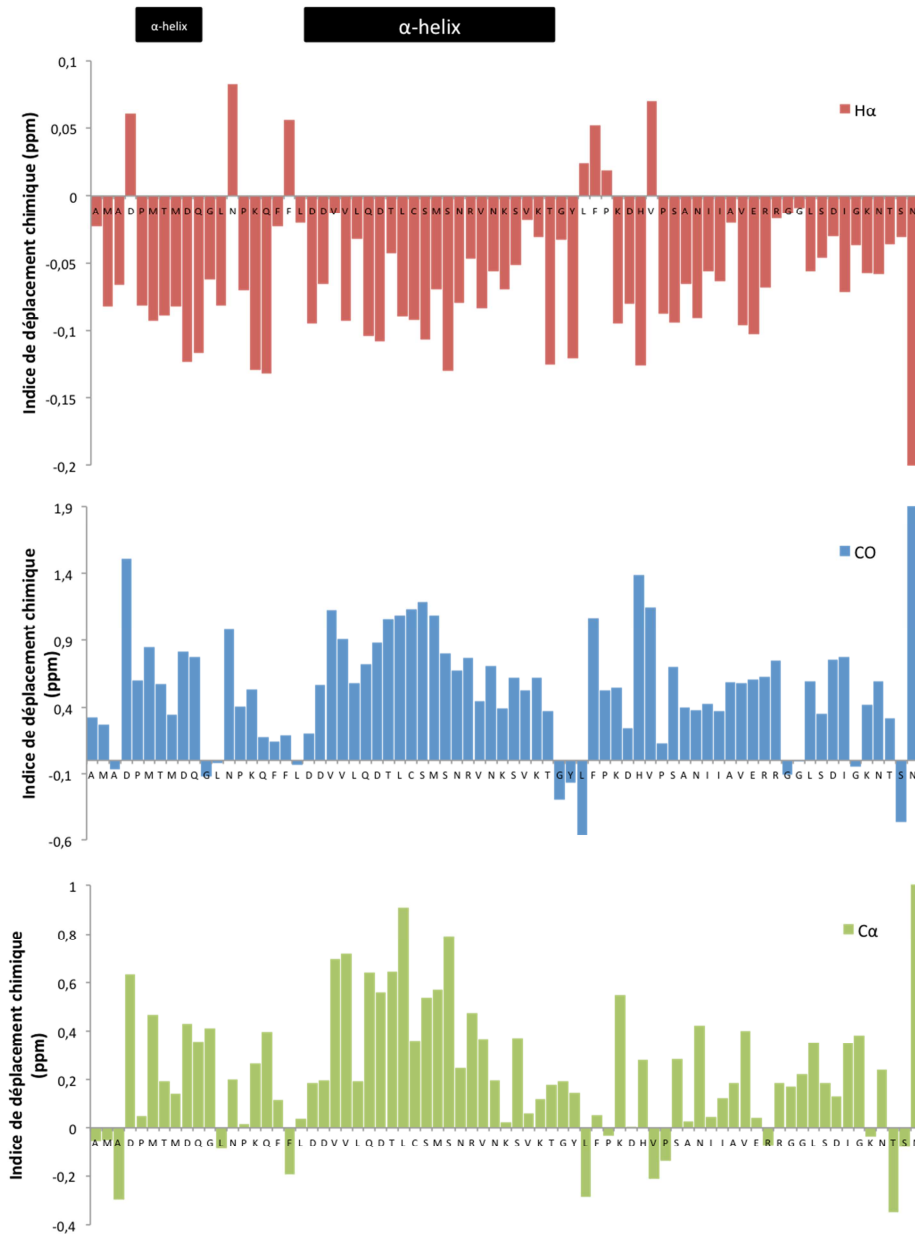
Nous avons initié des analyses en trois dimensions afin d'attribuer les pics obtenus. Pour se faire il faut marquer Hug1 ; à la fois avec du carbone  $^{13}\text{C}$  et de l'azote  $^{15}\text{N}$ . Nous avons également utilisé du milieu commercial pour nous placer dans les conditions les plus proches de ce que nous avons fait précédemment. Là encore les bactéries transformées avec His<sub>6</sub>-GST-Hug1 avaient une croissance lente, mais au final nous sommes quand même parvenus à purifier suffisamment de protéine Hug1 (environ 70 $\mu$ M) pour réaliser les analyses en trois dimensions. Ainsi nous avons pu initier de multiples spectres tridimensionnels (HNCA, CBCA(CO)NH, HNCO, HBHA(CO)NH, NOESY-HSQC, DIPSIHSQC (ou TOCSY-HSQC), HN(CA)CO) afin de pouvoir attribuer les pics (attribution réalisée en collaboration avec Nicolas Richet et Françoise Ochsenbein du LBSR au CEA Saclay).



**Figure III 11 : Spectre HSQC de Hug1 marqué au  $^{15}\text{N}$  et attribution.**

Le spectre bidimensionnel est obtenu à partir de protéine recombinante Hug1 purifiée et analysée sur un spectromètre Bruker 700MHz. Puis les données d'attributions, réalisées à partir de spectres tridimensionnels, ont été transférées ce spectre 2D. Les résidus correspondant à Hug1 sont numérotés de 1 à 68. Les résidus -1 à -4 correspondent aux acides aminés restant après la coupure à la TEV.

A partir de cette attribution, les indices de déplacement chimiques ont été calculés. Ces indices nous permettent d'avoir accès à la structure secondaire de la protéine (Figure III12).



**Figure III 12 : Indice de déplacement chimique des H $\alpha$ , CO et C $\alpha$  de Hug1 (d'après les données 3D)**

Les indices de déplacement chimiques sont calculés à partir des analyses tridimensionnelles. Ils permettent de définir les structures secondaires présentes dans la protéine. Les structures secondaires identifiées sont reportées en haut du schéma. Les valeurs calculées sont faibles et suggère que les hélices identifiées ne sont pas structurellement stables.

Dans notre cas, nous observons la présence d'une pseudo hélice du résidu D15 à T36 (car les valeurs des déplacements chimiques sont faibles, donc elle n'est pas structurellement stable). La localisation de la pseudo hélice majoritaire correspond à peu près à ce qui était proposé lors des analyses *in silico* (voir paragraphe 1).

L'ensemble des ce résultats expérimentaux montrent que Hug1 est une IDP.

---

## ***PARTIE 3 : A la recherche de partenaires physiques***

---

Certaines IDPs sont connues pour avoir de nombreux partenaires physiques, et afin de mieux comprendre le rôle que Hug1 pourrait jouer dans les mécanismes de réponses aux dommages de l'ADN, nous avons réalisé un crible double hybride à grande échelle.

### ***5. Elaboration d'un crible double hybride à grande échelle***

---

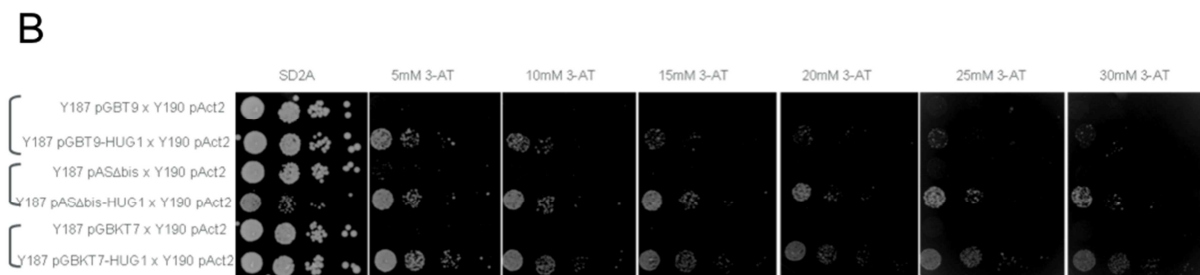
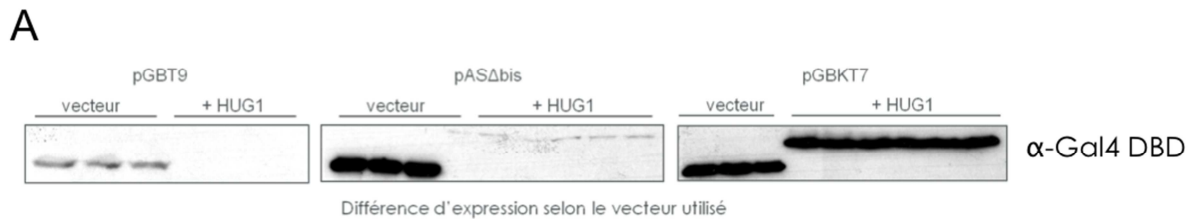
#### ***5.1. Principe général***

Le principe du double hybride repose sur une utilisation particulière du facteur de transcription Gal4. Ce système a été décrit pour la première fois par Fields et Song en 1989 (Fields and Song, 1989). Ce facteur est constitué de deux domaines fonctionnellement indépendants, un domaine de liaison à l'ADN ou DNA Binding Domain (DBD), et un domaine d'activation de la transcription ou Activating domain (AD). Pris séparément ces domaines ne sont plus capables d'activer la transcription du gène Gal4 (Fields and Song, 1989; Young, 1998), mais leur rapprochement physique permet de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel. Ainsi en fusionnant le domaine Gal4-DBD à une protéine X et le domaine Gal4-AD à une protéine Y, il est possible de reconstituer un facteur de transcription Gal4 fonctionnel si les protéines X et Y interagissent, permettant la transcription de gènes rapporteurs (mis sous le contrôle de la séquence activatrice (UAS) que lie Gal4). Des marqueurs prototrophiques (*LEU2* ou *HIS3*) sont généralement utilisés comme gènes rapporteurs car ils permettent une sélection positive sur un milieu dépourvu de l'acide aminé pour lequel la souche est devenue prototrophe (Young, 1998). Un autre moyen de sélection se fait par le biais du gène *LacZ* qui permet une lecture colorimétrique après réaction enzymatique. De nombreux systèmes double hybride utilisent deux gènes rapporteurs pour minimiser les « faux positifs », ce qui est notre cas, nous utilisons les gènes rapporteurs *HIS3* et *LacZ*. Lors de cribles à grande échelle, une protéine fusionnée au domaine Gal4-DBD sert d'appât et est coexprimée avec une banque de protéines fusionnées avec le domaine Gal4-AD servant de proie.

#### ***5.2. Mise au point du crible***

Pour commencer il a fallu construire un plasmide permettant l'expression de Hug1 fusionné au domaine Gal4-DBD. Pour cela, nous possédons plusieurs plasmides permettant de créer

des fusions avec le domaine Gal4-DBD ; pGBT9, pGBKT7 et pAS $\Delta$ bis. Nous avons donc inséré la séquence codante de Hug1 en 3' du domaine de Gal4 dans chacun de ces 3 plasmides. L'expression de Hug1 est testée par western blot. On peut déjà voir une différence de comportement de l'expression de Hug1 à partir des différents plasmides (Figure III13.A). Notamment l'expression à partir du plasmide pGBT9 est très faible, celle à partir du plasmide pAS $\Delta$ bis également, seule l'expression dans pGBKT7 est clairement détectée.



**Figure III 13 : Mise au point du crible double hybride**

- Les plasmides Gal4-DBD dans lesquels ont été clonés la phase codante de *HUG1* sont transformés dans la souche Y187 puis leur expression est testée par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre le domaine Gal4-DBD.
- Le niveau d'activation du promoteur UAS-Gal est évalué en test de croissance sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine et contenant des concentrations variables de 3-AT. Le plasmide pAct2 est un plasmide contenant la partie activatrice du facteur Gal4.

Avant de réaliser le crible, il faut également tester la croissance des souches transformées sur un milieu de sélection. Le premier gène rapporteur est l'histidine, le problème est que le niveau de fuite du promoteur permet quand même aux cellules de pousser sur un milieu sans histidine. Il est donc nécessaire de supplémenté le milieu en 3AT (3-Amino-1,2,4, triazole), un inhibiteur de l'enzyme codée par *HIS3*. En présence de 3AT, seules les souches produisant suffisamment de *HIS3* pourront pousser (Figure III13.B). Afin de décider quelle concentration de 3AT sera nécessaire pour le crible nous réalisons une gamme de concentration. Le second gène rapporteur code la  $\beta$ -galactosidase.



Le plasmide pAS $\Delta$ bis semble être toxique puisque les cellules ont du mal à pousser sur SD2A (Figure III13.B). En présence de 3AT, on peut voir que les cellules poussent bien que le domaine Gal4-AD ne soit fusionné à aucun partenaire de Hug1. Ceci suggère que la fusion Hug1-Gal4-DBD en se liant à l'UAS Gal4 présente une activité d'activation transcriptionnelle. Nous avons alors décidé de nous placer, pour le crible, dans les conditions de concentration en 3AT minimale pour laquelle on n'observe plus qu'une croissance résiduelle des cellules contenant le plasmide pGBT9-Hug1 (soit 25 mM de 3AT).

### 5.3. Réalisation du crible utilisant Gal4DBD-Hug1 comme appât

Pour le crible, nous utilisons comme proie une banque d'ADN permettant de couvrir l'intégralité du génome de *S. cerevisiae* sous forme de fragments aléatoires (banque FRYL (Fromont-Racine et al., 1997)). Cette banque a été introduite par transformation dans la souche Y190 (Aucher et al., 2010). Le crible est ensuite effectué comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Nous avons pu estimer le nombre de diploïdes testé à  $8,064 \cdot 10^6$  ce qui équivaut à une couverture de la banque de 80%. Les clones apparaissant sur les boîtes de sélection sont ensuite restreints sur SD2A+3AT 25mM pour vérifier qu'ils sont bien capables de pousser en présence de cette concentration de 3AT, puis des tests colorimétriques d'activité de la  $\beta$ -Galactosidase sont effectués. Parmi les 235 clones isolés seulement 15 (tableau III2) se sont avérés positifs pour tous les tests effectués. Pour ces clones, le fragment génomique inséré en fusion avec Gal4AD a été amplifié par PCR puis séquencé.

Globalement on peut noter une forte diversité quant à la fonction des protéines identifiées (réplication/réparation de l'ADN, protéine de structure ou protéines impliquées dans le trafic membranaire...), nous avons même trouvé des fragments correspondant à des intergènes, sans doute reste-t-il des protéines à découvrir.

Le fragment le plus fréquemment isolé se trouve être une partie de la protéine Dna2 (voir paragraphe 2), une enzyme qui possède des activités hélicase et endonucléase et qui est notamment impliquée dans la résolution des fragments d'Okazaki (Bae and Seo, 2000).

On retrouve aussi plusieurs fois un fragment appartenant à la protéine Pkh2. Cette protéine est une Sérine/thréonine kinase impliquée dans les voies de signalisation des sphingolipides (Roelants et al., 2002). Pkh2 joue un rôle redondant avec une autre protéine kinase Pkh1

(Roelants et al., 2002). Ces kinases participent à l'activation des protéines Ypk1, Ypk2 et Pkc1 qui sont des protéines notamment impliquées dans l'endocytose (Dickson et al., 2006). Pkc1 peut aussi être activé par une autre voie de signalisation impliquant les protéines Rom1 et Rom2 (trouvé également dans le crible à grande échelle) (Dickson et al., 2006). De manière intéressante, nous avons trouvé dans le crible, une autre protéine impliquée dans l'endocytose ; Ypp1. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la signalisation des phosphoinositides au niveau de la membrane plasmique (Zhai et al., 2008).

Proie	Coordonnées	Résumé	Occurrences
DNA2	ChrVIII 429180-42612	DNA replication factor ; required for Okazaki fragment processing; involved in DNA repair; cell-cycle dependent localization	4
intergene DAM1-SPT6	ChrVII 719922- 720231		3
PKH2	ChrXV 129237- 132482	Serine/threonine protein kinase involved in sphingolipid-mediated signaling pathway that controls endocytosis	3
TID3	ChrIX 78074- 80149	Component of the evolutionarily conserved kinetochore-associated Ndc80 complex ; involved in chromosome segregation, spindle checkpoint activity, kinetochore assembly and clustering	2
NUP82	ChrX 320010- 322151	Nucleoporin, subunit of the nuclear pore complex (NPC) ; required for proper localization of Nup116p in the NPC	2
DNF3	ChrXIII 583920- 578950	Aminophospholipid translocase (flippase) that maintains membrane lipid asymmetry in post-Golgi secretory vesicles	1
ROM2	ChrXII 862713- 866783	GDP/GTP exchange protein (GEP) for Rho1p and Rho2p	1
DRS1	ChrXII 131728- 133986	Nucleolar DEAD-box protein required for ribosome assembly and function, including synthesis of 60S ribosomal subunits; constituent of 66S pre-ribosomal particles	1
FRE2	ChrXI 11227- 9092	Ferric reductase and cupric reductase ; expression induced by low iron levels but not by low copper levels	1
HFA1	ChrXIII 683563- 677192	Mitochondrial acetyl-coenzyme A carboxylase, catalyzes the production of malonyl-CoA in mitochondrial fatty acid biosynthesis	1
REP1	2micron 3008- 1887	Master regulator that acts in concert with Rep2p to regulate transcript levels of the FLP1 gene that promotes plasmid copy amplification; autoregulates levels of its own transcript	1
intergene FLOS-YHRCΔ14	ChrVIII 529261- 529714		1
YPP1	ChrVII 894698- 897151	Cargo-transport protein involved in endocytosis; YGR198W is an essential gene	1
intergene YAL066W-YAL065C	Chri 10405- 10847		1
KRS1	ChrIV 525438- 527213	Lysyl-tRNA synthetase	1

### Tableau III 2 : Fragments de gènes isolés lors du crible double hybride

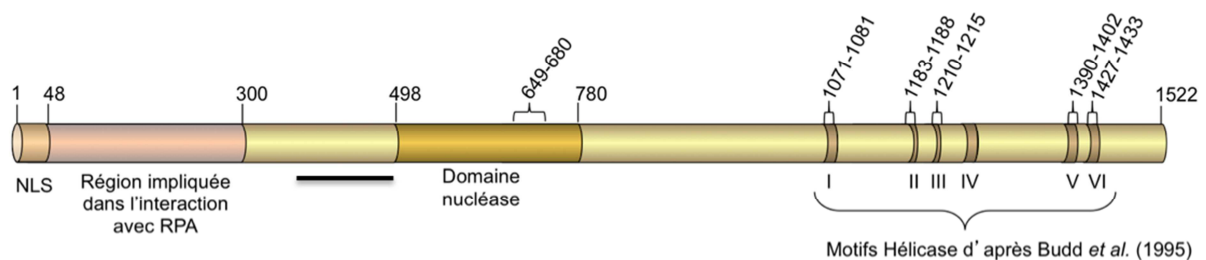
Le nom du gène identifié ainsi que ses coordonnées génomiques sont indiquées. Les occurrences correspondent au nombre de fois que le gène est identifié au cours du crible double hybride.

Nous trouvons également plusieurs fois un fragment correspondant à la protéine Tid3 (plus communément appelé Ndc80). Cependant il se trouve que cette protéine est couramment retrouvée dans les cribles doubles hybrides effectués au laboratoire ce qui laisse supposer que cette dernière serait un autoactivateur (faux positif).

## 6. Petit aparté sur Dna2

### 6.1. Introduction

*DNA2* code une protéine nucléaire de 172kDa essentielle pour la viabilité cellulaire. Ce gène a été découvert pour la première fois par l'équipe de Campbell en 1995 lors de la recherche de mutants thermosensibles au cours d'un crible qu'ils avaient établi afin d'identifier des mutants de la réplication (Budd and Campbell, 1995). En étudiant cette protéine, ils ont notamment découvert qu'elle contenait les motifs hélicases I, II, III, V et VI dans sa moitié C-terminale. Les hélicases sont une classe d'enzymes qui catalysent le déroulement de l'ADN en brisant les liaisons hydrogènes entre les deux brins complémentaires, elles sont notamment caractérisées par la présence de sept régions I, Ia, II-VI composant le domaine hélicase (Figure III14) (Fiorentino and Crabtree, 1997). Il a été découvert que cette enzyme possédait une activité ATPase, qui, conformément aux autres hélicases, se trouve être dépendante de la présence de l'ADN (Budd and Campbell, 1995). Dna2 ne présente une activité hélicase qu'en présence d'un substrat présentant une structure en fourche ce qui suggère que Dna2 est une hélicase répllicative (Budd and Campbell, 1995). Toutefois cette activité ne semble pas être importante (Bae et al., 1998), elle est même plutôt contestée chez l'Homme tant il faut d'enzyme pour pouvoir l'observer (Kang et al., 2010). Une des hypothèses serait qu'il faudrait une protéine additionnelle pour stimuler la faible activité hélicase 5'→3' de Dna2 chez l'Homme (Kang et al., 2010).

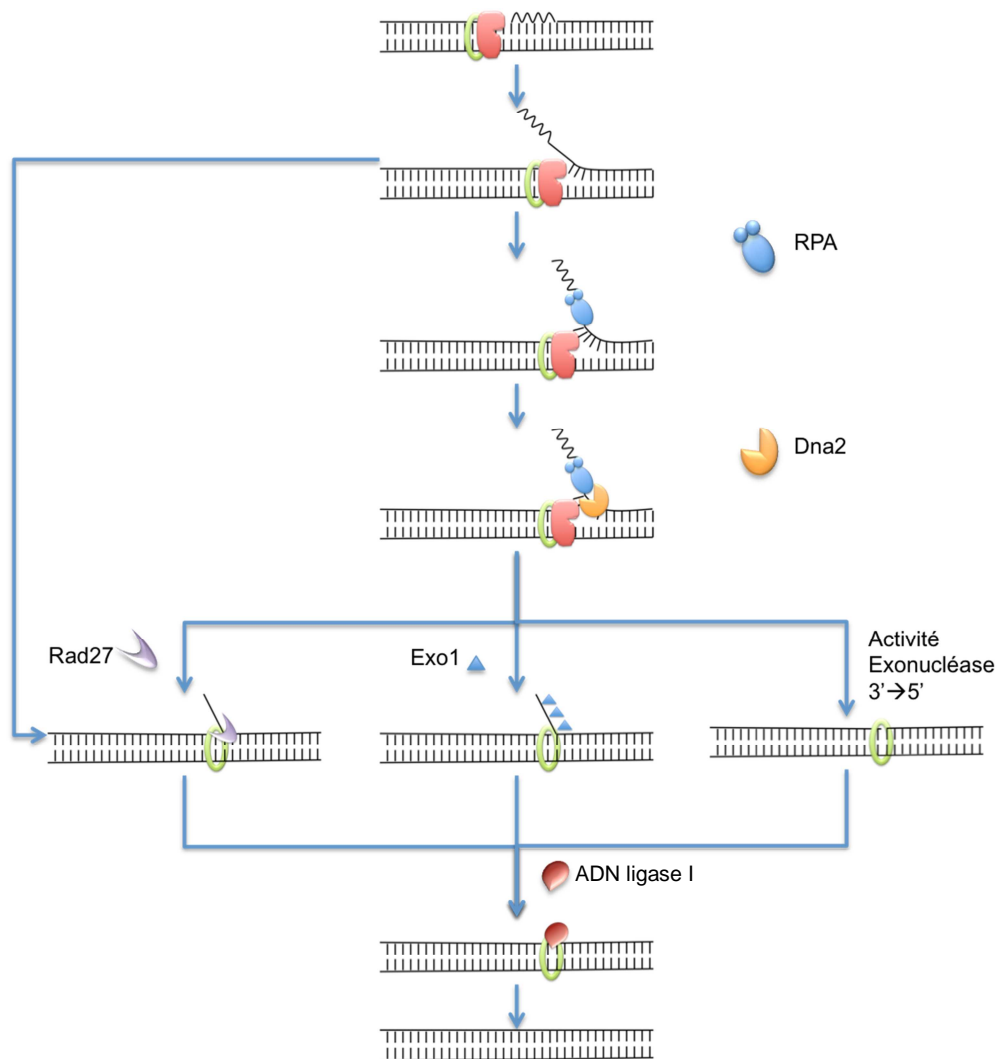


**Figure III 14 : Représentation schématique de la protéine de *Saccharomyces cerevisiae* Dna2**

La barre noire représente le fragment isolé lors du crible double hybride (acide aminé 343 à 492). Le domaine d'homologie avec RecB se trouve en position 649-680. (Budd et al., 1995; Budd, 2000; Lee et al., 2000).

La moitié N-terminale de Dna2 ne présente, quant à elle, aucune similarité de séquence avec quoique ce soit de connu (Budd et al., 1995). Toutefois la mutation ou la délétion de cette partie N-terminale est létale (Budd and Campbell, 1997). Cette même équipe a fait l'hypothèse que ce domaine interviendrait dans la dimérisation de Dna2 ou l'interaction avec d'autres protéines dont notamment RPA (Protéine de Réplication A) (Budd and Campbell, 1997; Kang et al., 2010).

Dans la première étude de Budd et al., il est fait état que Dna2 possède également une activité endonucléase qui peut être distinguée de l'activité hélicase (Budd and Campbell, 1995). A l'époque, il avait été suggéré que l'activité nucléase pourrait être portée par une seconde entité, associée à Dna2. Par ailleurs, il a été montré que Dna2 était capable d'interagir avec la nucléase Rad27 (l'homologue de FEN-1 chez l'Homme), il fut donc supposé que l'activité nucléase observée provenait de Rad27 (Budd and Campbell, 1997). L'existence de cette interaction a suggéré que Dna2 pouvait assister Rad27 dans la maturation des fragments d'Okazaki (Budd and Campbell, 1997; Budd et al., 2011). Cependant l'équipe de Bae et al. a montré plus tard que l'activité nucléase dépendante de l'ADN simple brin était intrinsèque à Dna2 (Bae et al., 1998). Pour son activité nucléase, Dna2 nécessite une extrémité 5' libre (Kang et al., 2010), il se fixe à cette extrémité de l'ADN simple brin, puis glisse le long de cet ADN jusqu'au point de clivage. Au cours de la maturation des fragments d'Okazaki, il y a synthèse d'ADN à la place de l'amorce d'ARN, la polymérase « pousse » cette amorce ce qui génère la formation d'une extrémité 5' « flottante » (Figure III15). La longueur de cette extrémité « flottante » détermine la manière dont elle sera éliminée (Kang et al., 2010); alors que les fragments courts seront pris en charge par Rad27, les fragments long eux, seront pris en charge séquentiellement par Dna2 puis Rad27 (Figure III15). L'activité nucléase de Dna2 est stimulée par RPA (Kang et al., 2010).



**Figure III 15 : Maturation des fragments d'Okazaki d'après Kang et al. 2010 ((Kang et al., 2010)**

Lors de la maturation des fragments d'Okazaki, l'ADN polymérase (en rouge) couplée au PCNA (en vert) synthétise l'ADN de 5' vers 3' déplaçant l'amorce d'ARN (en vaguelette sur le schéma) généré pour la synthèse du fragment d'Okazaki. Si le fragment déplacé est court, il y aura directement dégradation du fragment par Rad27 ou Exo1, sinon l'activité exonucléase 3'→5' de la polymérase dégrade l'ADN néosynthétisé permettant au fragment de se repositionner par complémentarité de séquence. Si le fragment d'ADN simple brin est long le complexe RPA se fixe alors sur l'ADN simple brin formé, Dna2 est recruté et clive une partie du fragment d'ADN en aval de RPA. Après l'action de Dna2, il reste toujours un petit fragment d'ADN qui est traité comme indiqué précédemment. Puis l'ADN ligase ligature les deux fragments d'ADN pour former un brin d'ADN intègre.

Il a été montré que Dna2 intervenait également dans la réparation de l'ADN (Bae et al., 1998; Budd and Campbell, 2000; Kang et al., 2010; Shim et al., 2010), plus précisément dans la réparation des cassures double brin. Il se trouve que les mutants de *DNA2* sont sensibles aux stress génotoxiques (Kang et al., 2010). Dna2 intervient avec Sgs1 dans la résection des cassures double brin (Kang et al., 2010), et est requis en l'absence de Rad50 (Budd and Campbell, 2000). Son activité nucléase est essentielle pour la résection de l'ADN double brin, ce qui n'est pas le cas de l'activité hélicase de Dna2 (Budd and Campbell, 2000). Dna2 est

recruté au niveau des cassures double brin par le complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) (Shim et al., 2010), et la résection par Dna2 est régulée par Cdk1 (Chen et al., 2011). Dna2 est phosphorylée par Cdk1 et Mec1 en réponse aux dommages de l'ADN ce qui stimule son recrutement au niveau des cassures double brin (Chen et al., 2011).

Dna2 est également une cible des voies checkpoints chez la levure fissipare *S. pombe* (Hu et al., 2012). Au cours de la phase S, en réponse à un stress réplicatif, il y a blocage des fourches de réplication, parfois il peut y avoir formation de structure en « chicken foot » provoqué par une réversion de fourches (Hu et al., 2012). L'équipe de Kong a montré que Dna2, phosphorylé sur la sérine 220 par Cds1 (homologue de Rad53), s'associe à la chromatine au niveau des fourches de réplication bloquées. La phosphorylation de Dna2 et son activité nucléase sont toutes deux nécessaires pour éviter la réversion des fourches de réplication (Hu et al., 2012). Dna2 en clivant les brins naissant, empêcherait la réversion des fourches et stabiliserait donc les fourches bloquées, contribuant ainsi au maintien de la stabilité du génome au cours du stress réplicatif (Hu et al., 2012).

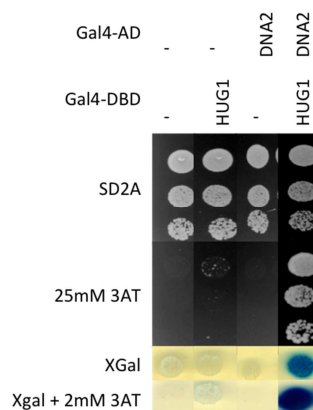
Les activités nucléases et hélicases de Dna2 sont couplées (Pokharel and Campbell, 2012). Dna2 possède un putatif centre Fer-soufre (Fe-S) au niveau du domaine nucléase (Pokharel and Campbell, 2012). La mutation des cystéines composant ce cœur Fe-S inhibe bien sûr l'activité nucléase mais aussi l'activité ATPase ADN simple brin-dépendante de Dna2, et par conséquent son activité hélicase (Pokharel and Campbell, 2012). La réciproque est aussi vrai, certaines mutations dans le domaine hélicase perturbent l'activité nucléase de Dna2 (Pokharel and Campbell, 2012).

Dna2 joue également un rôle dans la maintenance des télomères (Kang et al., 2010). En effet il a été montré que la surexpression de Dna2 provoquait une réduction de la taille des télomères (Kang et al., 2010). Dna2 pourrait être impliqué dans la régulation du « silencing » des gènes (Kang et al., 2010). D'ailleurs, Dna2 colocalise avec les télomères durant la phase G1 de manière dépendante de son interaction avec Sir3 (un composant du « silencing » de la chromatine) (Kang et al., 2010), puis il se disperse en phase S. L'hypothèse a été faite que Dna2 pourrait réguler la longueur des télomères en se liant directement aux télomères et en contrôlant l'activité télomérase (Kang et al., 2010).

Il a été montré que la mutation de *DNA2* n'est pas synthétique létale avec les mutations de certaines protéines des checkpoints (*mec1*, *rad53*, *rad9*, *rad24*, *rad17*, *ddc1* et *mec2*), cependant, de manière intéressante, la mutation de *RAD9* permet de supprimer la létalité des souches *dna2Δ* (Budd et al., 2011), et certains mutants du domaine hélicase de Dna2 sont sauvés par une mutation des checkpoints, entre autre celle de *MEC1* (Fiorentino and Crabtree, 1997). *SML1* se trouve aussi être un suppresseur multicopie de certains mutants de *DNA2* (Kang et al., 2010).

## 6.2. Etude de l'interaction entre Hug1 et Dna2

Hug1 est capable d'interagir avec un fragment de Dna2 par la méthode du double-hybride (Figure III16 et tableau III2). Le fragment identifié se trouve juste en amont de ce qui est décrit comme étant le domaine nucléase de Dna2 (Figure III13) (Lee et al., 2000).



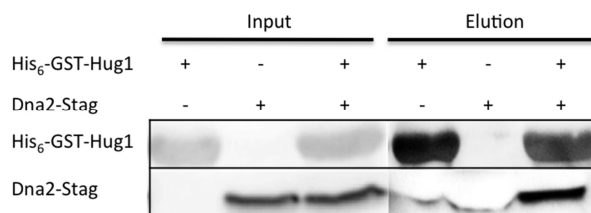
**Figure III 16 : Etude dirigée de l'interaction entre Hug1 et Dna2**

Hug1 est placé en fusion de la phase codante de Gal4-DBD puis transformé dans la souche Y187. Ses partenaires putatifs sont eux clonés en fusion avec la phase codante de Gal4-AD puis transformés dans la souche Y190. Les souches transformées Y187 et Y190 sont ensuite croisées entre elles puis spottées sur milieu sélectif. Seules les souches possédant deux protéines capables d'interagir sont capables de croître sur le milieu 3-AT. Un test d'activité de la bêta galactosidase est ensuite effectué pour confirmer les interactions.

L'interaction que nous avons identifiée avec Dna2 est parmi les plus fortes que nous ayons trouvées (Figure III16). De plus cette interaction s'avère spécifique de Hug1 : nous avons testé l'interaction face à Dif1 (autre protéine possédant un domaine « hug ») et n'avons décelé aucune interaction. Intrigués par cette interaction, nous avons cherché à la confirmer par d'autres méthodes. Nous avons en particulier produit les protéines recombinantes dans le système *E. coli* pour tester l'interaction *in vitro*. Malheureusement, le fragment de Dna2 est très peu soluble et en ce qui concerne la fraction soluble, cette dernière tend à se fixer de manière non spécifique sur les résines de nickel que nous utilisons pour les

chromatographies d'affinité. Après plusieurs essais, nous ne sommes pas parvenus à trouver des conditions pour lesquelles il y aurait moins d'accrochage aspécifique.

Nous avons alors souhaité montrer cette interaction *in vivo* par co-immunoprécipitation, mais là un autre problème s'est posé à nous, nous étions incapable de visualiser la protéine Dna2 entière étiquetée au chromosome. Nous avons vérifié la séquence de la fusion, qui s'avérait correcte néanmoins, nous n'arrivions pas à voir la protéine en western blot.



**Figure III 17 : Hug1 co élue avec Dna2**

Les deux protéines sont produites dans des cultures séparées dans *E.coli*. Les cellules provenant de ces deux cultures sont alors colysées. His<sub>6</sub>-GST-Hug1 est purifié sur une résine GST-agarose et élué avec de la GSH. Les différentes fractions obtenues sont déposées sur gel et analysés par western blot. His<sub>6</sub>-GST-Hug1 est révélé avec un anticorps anti His<sub>6</sub> (QIAGEN) et Dna2-Stag est révélé avec un anticorps anti Stag (Novagen).

Par une approche *in vitro*, nous sommes parvenus, à visualiser l'interaction en GST pull-down dans le cas où les cellules *E. coli* produisant Dna2 à 20°C sont co-lysées avec celles produisant Hug1 à 37°C. Des expériences de reproductibilité sont en cours (Figure III17).

Nous avons donc au moins provisoirement mis de côté l'étude de cette interaction pour nous concentrer sur l'étude d'une autre interaction (voir chapitre IV).







*Chapitre IV : Etude de  
l'interaction entre  
Hug1 et la RNR*



---

## ***PARTIE 1 : Une interaction physique avec la Ribonucléotide Réductase***

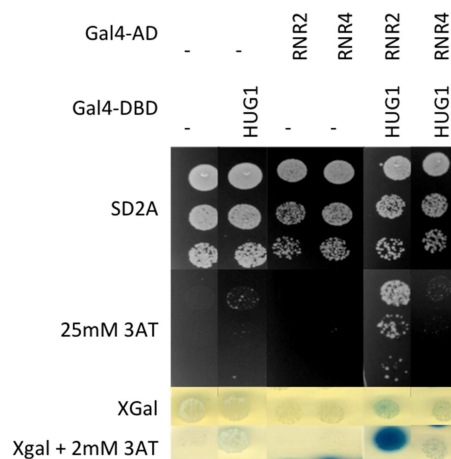
---

### ***1. Et la Ribonucléotide Réductase ?***

---

Compte tenu de la fonction des protéines présentant des homologues de séquence avec Hug1 ; Dif1 et Spd1, nous pouvions nous attendre à trouver comme partenaire physique au moins l'une des sous-unités de la ribonucléotide réductase dans notre crible à grande échelle, ce qui ne fut pas le cas. Plusieurs hypothèses sont alors possibles ; soit Hug1 n'interagit avec aucune des sous-unités de la ribonucléotide réductase, soit Hug1 interagit avec la ribonucléotide réductase mais la concentration de 3AT utilisée ne nous permet pas de mettre en évidence cette interaction ou alors, comme nous ne couvrons la banque qu'à 80% cette interaction serait passée au travers, il est également possible que le fragment ne soit pas présent dans la banque. Nous avons donc décidé de tester de manière dirigée les interactions avec la RNR. Pour ce faire, nous avons cloné la séquence codante de chacune des sous-unités de la RNR en phase avec le domaine d'activation de Gal4 dans le plasmide pAct2. Les plasmides obtenus sont contrôlés par séquençage et l'expression des protéines de fusion est testée par western blot.

Des levures sont ensuite transformées avec les différents plasmides exprimant les différentes sous-unités de la RNR en fusion avec le domaine activateur de Gal4 d'un côté, et la souche de type sexuel opposé est transformée avec le plasmide pGBT9-Hug1 exprimant une fusion Gal4-DBD-Hug1. Nous pouvons voir que les levures diploïdes contenant les deux protéines de fusion, Gal4-AD-Rnr2 et Gal4-DBD-Hug1, sont capables de croître sur milieu 3AT à des concentrations supérieures à celles pour lesquelles ces protéines présentes seules peuvent pousser (donc supérieur au niveau de fuite) (Figure IV1). Ceci indique une potentielle interaction entre ces deux protéines. La croissance des diploïdes contenant Hug1 et Rnr4 est quant à elle très proche de celle observée pour le bruit de fond. Pour vérifier ces observations, nous avons réalisé des tests d'activation de la  $\beta$ -galactosidase. Dans ce cas nous avons bien observé une coloration pour l'interaction Rnr2-Hug1 et une très légère coloration pour l'interaction Rnr4-Hug1 (Figure IV1). Donc Hug1 est capable d'interagir avec la petite sous-unité de la RNR dans le système double hybride.



**Figure IV 1 : Hug1 est capable d'interagir physiquement avec la petite sous-unité de la RNR**

Hug1 a été fusionné au domaine Gal4-DBD alors que les petites sous unités de la RNR sont fusionnées avec le domaine Gal4-AD. Des souches de levures *S. cerevisiae* sont transformées avec ces constructions puis croisées avant d'être sélectionnées et spottées sur 3-AT. Puis un test colorimétrique d'activité de la B-galactosidase est effectué pour valider les interactions.

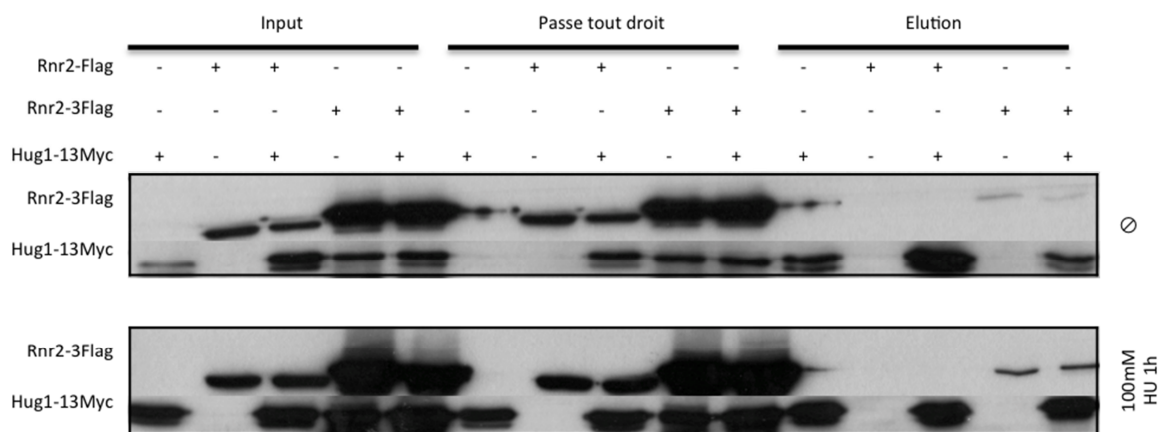
A noter que nous n'observons pas de croissance dans les souches exprimant Gal4DBD- Hug1 et Gal4-AD-Rnr1 ou Gal4-AD-Rnr3. Par la suite, nous avons testé l'interaction entre les différentes sous-unités de la RNR, nous sommes parvenus à trouver une interaction entre Rnr2 et Rnr2 mais également dans une moindre mesure entre Rnr2 et Rnr4, en revanche nous ne sommes pas parvenus à observer l'interaction entre la petite sous-unité et la grosse sous-unité. Il est possible que la fusion avec le domaine d'activation perturbe ces interactions de ce fait nous ne sommes pas en mesure de les observer dans ce système.

## ***2. Etudes de l'interaction physique entre Hug1 et Rnr2***

### ***2.1. Mise en évidence de l'interaction in vivo par immunoprécipitation***

Nous avons donc trouvé par double hybride dirigé une interaction entre Hug1 et la petite sous unité de la RNR. Nous allons maintenant nous focaliser sur l'interaction la plus forte parmi ces sous-unités ; Rnr2-Hug1. Il restait à confirmer cette interaction par d'autres techniques présentant des biais différents du double hybride. Comme nous avons à notre disposition des souches étiquetées pour Rnr2 (Rnr2-3HA, Rnr2-Flag et Rnr2-3Flag), nous avons décidé de commencer par étudier l'interaction *in vivo* avec une autre technique ; l'immunoprécipitation. Nous avons alors créé des souches étiquetées à la fois pour Rnr2 et Hug1. Puis nous avons immunoprécipité Hug1 via son étiquette (13Myc ou GFP) et analysé

par western blot si Rnr2 co-éluit avec Hug1 étiqueté (Figure IV2). Pour cette expérience nous avons fait une cinétique d'induction à l'hydroxyurée en espérant favoriser l'interaction entre les deux partenaires dans le cas où il y aurait des dommages à l'ADN (Figure IV2). Nous observons bien une induction de la quantité de Rnr2 suite à l'ajout de HU, mais l'induction de Hug1-13Myc n'est pas aussi importante que ce qu'on avait pu observer jusque là. Malheureusement il y avait un accrochage aspécifique de Rnr2-Flag et Rnr2-3Flag aux billes magnétiques utilisées pour fixer Hug1-13Myc (Figure IV2).



**Figure IV 2 : Immunoprécipitation de Hug1 et Rnr2**

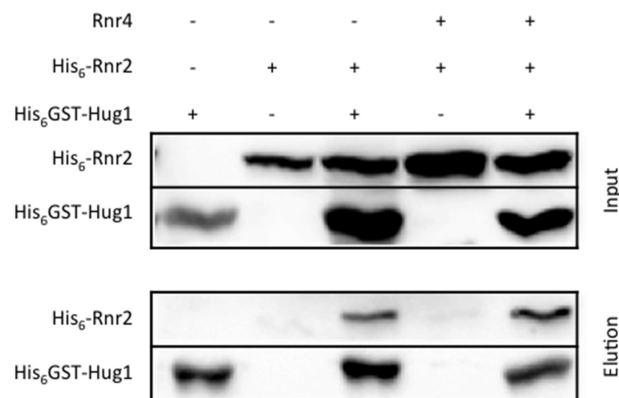
Rnr2 et Hug1 sont étiquetés au chromosome. Les souches sont cultivées en présence ou non de 100mM de HU durant 1 heure. Une immunoprécipitation de Hug1-13Myc est réalisée et l'élué se fait dans des conditions dénaturantes. Rnr2-3Flag est élué, même en absence de Hug1-13Myc. Les bandes de la taille de Hug1-13Myc qui sont présentes dans les puits où Hug1 n'est pas étiqueté correspondent au produit de dégradation de Rnr2 étiqueté.

## 2.2. Tests Mise en évidence de l'interaction in vitro

### 2.2.1. Par GST-Pull down

Nous avons souhaité visualiser l'interaction *in vitro* par la technique du GST pulldown. Dans un premier temps, nous avons fait le choix de coexprimer dans la même cellule Rnr2 et Hug1 à partir de deux plasmides différents (Hug1 : His6-GST-HUG1, Rnr2 : His6-Rnr2 (don d'Andrei Chabes (Chabes et al., 2000))). Nous avons observé une coélution, mais ne parvenions pas à reproduire l'expérimentation. Un problème se posait à nous ; Rnr2 est très peu soluble lorsqu'il est produit dans *E.coli* à 37°C. Nous avons alors choisi de le produire à 20°C (à cette température le métabolisme est ralenti favorisant souvent le repliement des protéines, et donc leur solubilité). Nous sommes parvenus à observer la coélution, mais là encore nous ne sommes pas parvenus à reproduire nos expérimentations. Un autre problème se présentait alors. Nous supposons que l'affinité de Hug1 pour le complexe Rnr2-Rnr4 est du même ordre que celle que Dif1 a pour le complexe Rnr2-Rnr4 (0,6µM mesuré en

Biacore®) (Lee et al., 2008), l'interaction serait donc faible et plutôt labile. Il est donc nécessaire de produire beaucoup de chacun des partenaires pour pouvoir visualiser quelque chose. Or, la production de Hug1 à 20°C n'est pas optimale, contrairement à ce qui est observé à 37°C. Comme Rnr2 et Hug1 n'ont pas une température de culture compatible, nous avons fait le choix de les cultiver séparément, dans deux bactéries différentes ; Rnr2 à 20°C et Hug1 à 37°C. Ensuite nous avons effectué des colyses de ces deux cultures. Nous sommes parvenus à revoir l'effet déjà observé (Figure IV3). Dans un dernier temps, nous avons souhaité savoir si la coexpression de Rnr2-Rnr4 (don d'Andrei Chabes) modifiait (de préférence améliorerait) l'interaction entre Hug1 et Rnr2. En plus de permettre de savoir si Hug1 est capable de coéluer avec le complexe, le fait de coexprimer Rnr2 et Rnr4 dans la même cellule favorise la solubilisation de Rnr2. Nous avons effectué une colyse des deux cultures et avons pu observer que Hug1 était capable d'interagir avec le complexe Rnr2-Rnr4 (Figure IV3).



**Figure IV 3 : Co-élution de Rnr2 avec His<sub>6</sub>-GST-Hug1 en GST Pull down**

Hug1 et Rnr2+/-Rnr4 sont produits séparément respectivement à 37°C et 20°C puis les cultures correspondantes sont colysés. Hug1 est purifié sur une résine GST-agarose et élué avec 10mM GSH. « L'input » et les élués sont analysés par western blot et révélés à l'aide d'un anticorps anti-His<sub>6</sub>

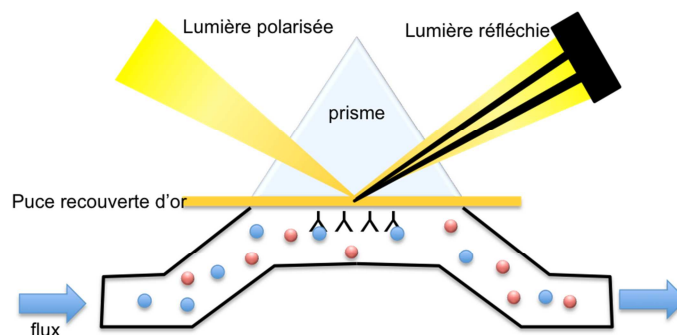
### 2.2.2. Par Surface plasmonique de résonance

Nous avons alors souhaité quantifier l'affinité de l'interaction entre ces deux protéines et par là confirmer l'interaction entre Hug1 et Rnr2 par une troisième méthode. Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) ou plus communément appelée Biacore®.



### 2.2.2.1. *Principe*

Le principe du Biacore® est d'utiliser la Surface Plasmonique de Résonance (SPR) comme technique optique pour mesurer les changements d'indice de réfraction sur un film modifié recouvert d'or (Malmqvist and Karlsson, 1997). La combinaison du phénomène de SPR et d'un flux miniaturisé permet d'étudier de nombreuses interactions en temps réel sans avoir à utiliser de marquages pour la de détection des protéines (Malmqvist and Karlsson, 1997). En règle générale un des partenaires (le ligand) est immobilisé à la surface d'une puce (sensor chip) et l'autre partenaire (l'analyte) qui interagit avec le ligand, est en solution et passé sur le film d'or selon un flux continu (Malmqvist and Karlsson, 1997). Une lumière polarisée illumine la puce au niveau de la surface d'or (où se passe l'interaction), et est réfléchiée vers un détecteur (Figure IV4.A).



**Figure IV 4 : Principe du Biacore ®.**

Représentation schématique du Biacore ®. Une lumière polarisée vient frapper la puce d'or sur laquelle est fixé l'analyte, et réfracte la lumière selon un angle précis. Un flux de ligand passe en dessous de la puce d'or, si il y a interaction il y aura modification de l'indice de réfraction qui se représente sous la forme d'un sensogramme.

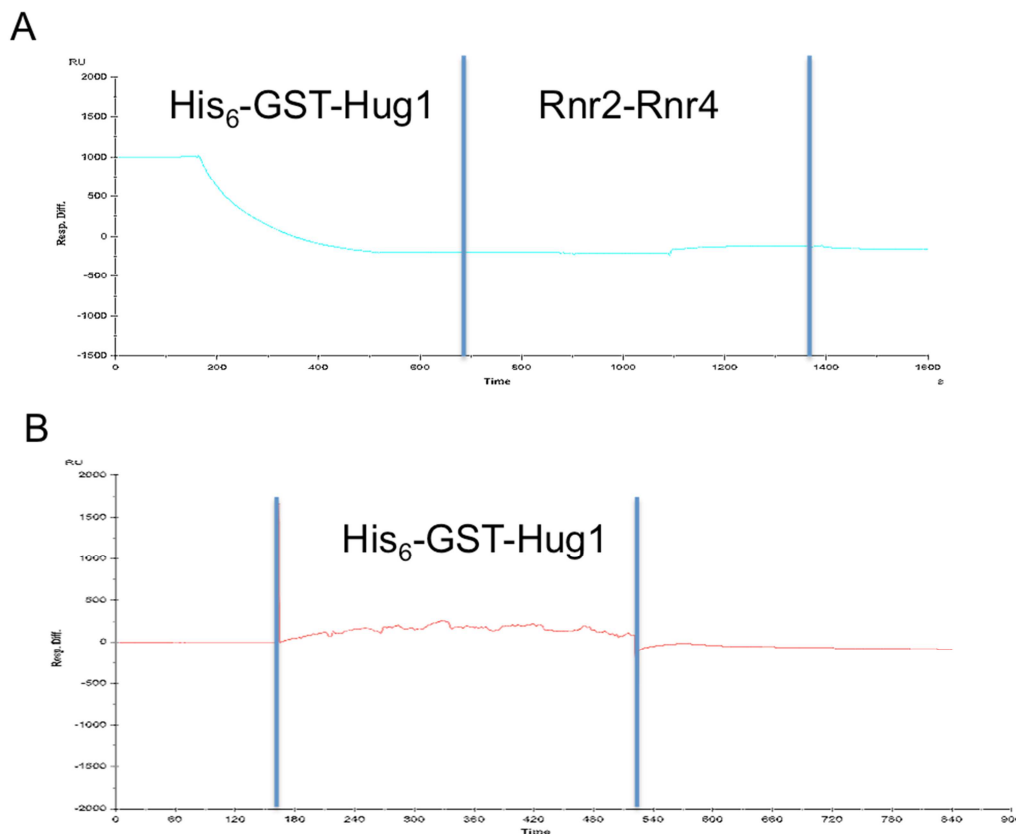
L'indice de réfraction change quand un partenaire soluble se lie à son ligand immobilisé sur une surface d'or. Le « sensogramme » de Biacore® se présente comme montré dans la Figure IV4.B ; l'association de l'analyte avec son ligand engendre une modification de l'indice de réfraction ce qui provoque un signal réponse (mesuré en unité de réponse RU) correspondant à la phase ascendante du « sensogramme » ou phase d'association. Lorsque le ligand se sépare de l'analyte, le signal de réponse diminue correspondant à la phase descendante du « sensogramme » ou phase de dissociation.

#### 2.2.2.2. Application à l'interaction Hug1-Rnr2/4

Dans un premier temps, nous avons fixé His<sub>6</sub>-GST-Hug1 à la puce comme indiqué dans la section « Matériels et méthodes » et avons fait passer le complexe Rnr2-Rnr4 sur la puce. Dans ce cas, la puce est d'abord fonctionnalisée avec un anticorps anti-GST qui permet de fixer Hug1. Durant cette étape, nous avons bien observé une augmentation du nombre d'unité de réponse (RU) indiquant que l'anticorps s'est correctement fixé à la puce. Puis nous avons fixé Hug1 à l'anticorps, là encore nous voyons une augmentation du nombre de RU (Figure IV5.A), signe que Hug1 s'est bien fixé à l'anticorps. Pour finir nous avons fait passer le complexe Rnr2-Rnr4 et là notre « sensogramme » est resté plat indiquant qu'il n'y a pas eu d'interaction entre Hug1 et la petite sous-unité de la RNR (Figure IV5.A).

Parfois, la technique de Biacore® fonctionne mieux dans un sens de fixation que dans l'autre. Donc, dans un deuxième temps, nous avons fixé le complexe Rnr2-Rnr4 à la puce et fait passer His<sub>6</sub>-GST-Hug1 sur la puce. Même constat que précédemment, la fonctionnalisation de la puce s'est correctement passée, mais le « sensogramme » reste toujours plat (Figure IV5.B) ; avec ce système, et dans les conditions utilisées, nous ne sommes pas capables de détecter l'interaction entre Hug1 et la petite sous unité de la RNR ; Rnr2-Rnr4.

Plusieurs explications à ces observations sont possibles ; la première, la fixation à la puce s'est faite telle que le site de fixation du partenaire est peu ou pas accessible. Enfin, peut-être que le tampon Biacore® utilisé n'est pas adapté à notre expérience.



**Figure IV 5 : Sensogrammes de Biacore®**

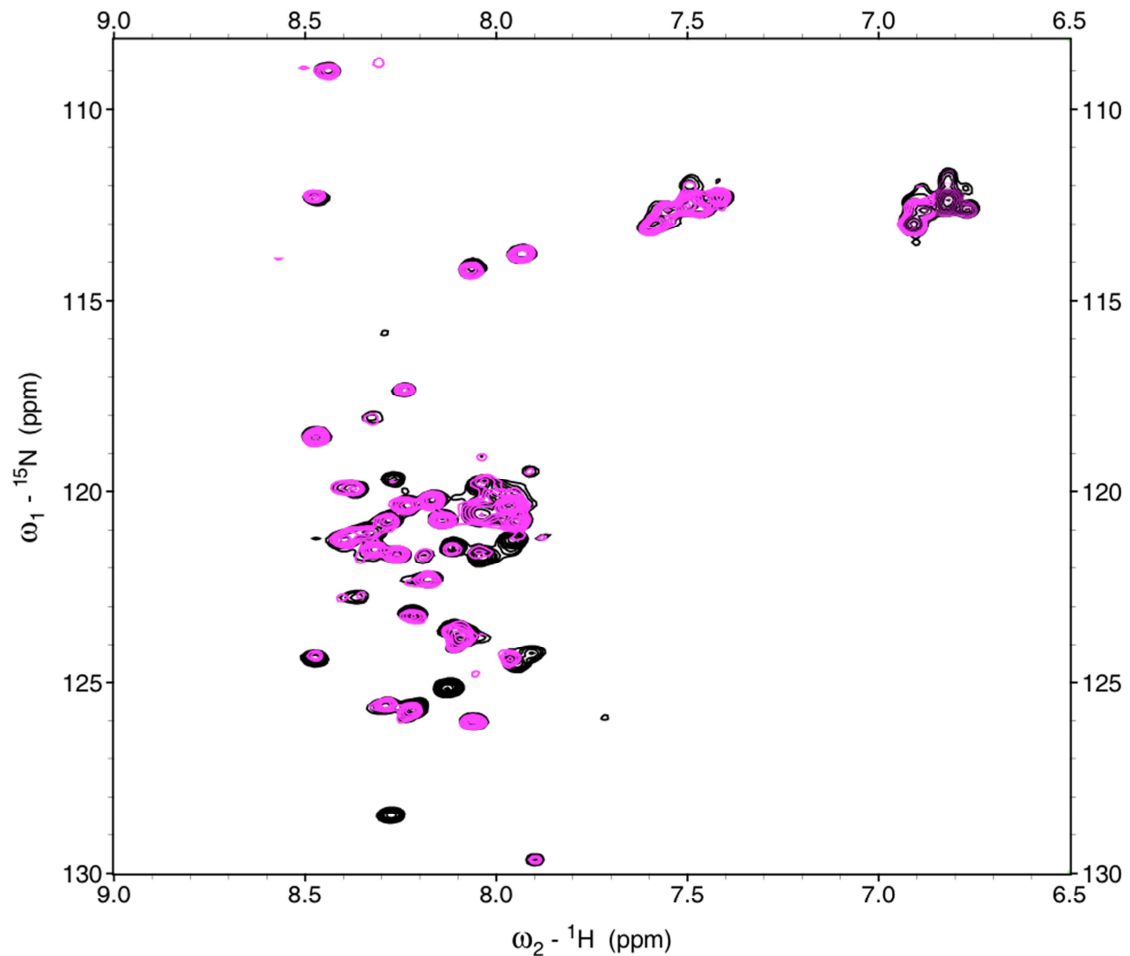
- La fonctionnalisation de la puce avec l'anticorps anti GST est réalisée (non présenté sur la Figure), puis la protéine recombinante Hug1 est ajoutée et se fixe sur l'anticorps (phase descendante sur le sensogramme car les pistes contrôle et expérimentales ont été inversée). Enfin le complexe Rnr2-Rnr4 a été ajouté et le sensogramme reste plat.
- La fonctionnalisation de la puce est effectuée avec le complexe Rnr2-Rnr4 (non présenté sur la Figure). Puis la protéine recombinante Hug1 est ajoutée et le sensogramme reste plat.

### 2.2.3. Par résonance magnétique nucléaire (RMN)

En vue de confirmer puis le cas échéant de caractériser la surface d'interaction entre Hug1 et Rnr2 (voir Partie 2 paragraphe 2), nous avons décidé d'avoir recours à la technique de RMN. Comme expliqué précédemment nous avons eu quelques difficultés pour produire Hug1 marqué au  $^{15}\text{N}$  à une concentration de 50-60 $\mu\text{M}$ . Disposant des protéines recombinantes purifiées obtenues, il nous était possible d'effectuer des spectres RMN. En ce qui concerne la production du complexe Rnr2-Rnr4, nous n'avons pas eu de difficultés majeures pour le produire et le purifier. Néanmoins, l'étape de purification sur échangeuse d'ions avait tendance à dissocier le complexe entre Rnr2 et Rnr4, il nous a donc fallu regrouper plusieurs fractions pour reformer un complexe entier pur à 90% (nous l'avons obtenu à une concentration d'environ 145 $\mu\text{M}$ ).

Toutefois un problème se posait à nous. Lors du premier spectre obtenu pour évaluer la structure secondaire de Hug1 (voir Chapitre III), nous avons placé Hug1 dans du tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à pH5, or le complexe Rnr2-Rnr4 n'est pas soluble et précipite dans ce tampon. En tamponnant à un pH supérieur à 9 on peut resolubiliser le complexe dans ce même tampon. Ce pH n'étant pas compatible avec les expériences de RMN, il nous a donc fallu trouver un tampon dans lequel le complexe Rnr2-Rnr4 reste soluble à un pH compris entre 4 et 8 (pH compatible avec les expériences de RMN). Les purifications de Rnr2-Rnr4 sont réalisées dans du Tris-HCl pH8 50mM. Nous avons donc testé le Tris deutéré 10mM (Tris D11) à un pH 7,4 pour solubiliser la petite sous-unité de la RNR. Le complexe Rnr2-Rnr4 est effectivement soluble dans ce tampon tout en restant dans une gamme de pH compatible avec la RMN.

Nous avons tout d'abord réalisé un premier spectre dans ce tampon avec Hug1 seul (spectre noir sur la Figure IV6) afin de pouvoir le comparer avec celui obtenu précédemment à pH5 (Figure III11). En comparant les deux spectres, nous pouvons voir que certains pics ont disparu (effets du changement de pH), mais le spectre est tout de même exploitable. Nous avons alors initié une première expérience de titrage afin de voir si l'interaction entre Hug1 et la petite sous-unité de la RNR était détectable par la technique de RMN. Nous avons réalisé les trois spectres dans différentes conditions de rapport molaire entre les partenaires 1(Rnr2) :2(hug1), 1 :1 et 2 :1. En superposant les trois spectres, nous pouvons suivre le déplacement chimique des résidus impliqués dans l'interaction, dans notre cas, nous remarquons qu'au moins sept des pics tendent à disparaître, cela indique qu'il y a bien une interaction entre Hug1 et le complexe Rnr2-Rnr4 (spectre en magenta sur la Figure IV6).



**Figure IV 6 : Hug1 interagit avec Rnr2-Rnr4 en RMN**

La protéine Hug1 est produite dans un milieu contenant du  $^{15}\text{N}$  puis purifiée successivement sur une résine GST puis une résine NiNTA.

Un premier spectre HSQC de Hug1 seul (en noir) est réalisé afin d'obtenir une empreinte de la protéine. Puis le complexe Rnr2-Rnr4 (froid) est ajouté à différentes concentrations afin de suivre les pics touchés par cet ajout (en magenta).

Nous avons tiré parti de ces expériences pour déterminer l'affinité de Hug1 pour le complexe Rnr2-Rnr4.

Nous avons réalisé un titrage du signal Hug1 en RMN par ajout du complexe Rnr2-Rnr4, mais cette fois en utilisant une gamme rapprochée de ratios molaires Rnr2 : Hug1 (1 : 0,6 ; ... ; 1 : 8). Nous avons alors sélectionné les quatre pics pour lesquels le signal de disparition était le meilleur afin d'évaluer la constante de dissociation ( $K_d$ ) de l'interaction à l'aide des équations suivantes :

$Kd = \frac{[H][R]}{[HR]}$  avec  $[H]$ =concentration en Hug1 libre,  $[R]$ =concentration en Rnr2 libre,  $[HR]$ =concentration en complexe Rnr2-Hug1.

$[H]_0 = [H] + [HR]$  avec  $[H]_0$ =concentration en Hug1 total

$[R]_0 = [R] + [HR]$  avec  $[R]_0$ =concentration en Rnr2 total

A partir de ces équations on trouve :

$$[H]^2 + [H]([R]_0 - [H]_0 + Kd) - Kd[H]_0 = 0$$

Qui se trouve être une équation du second degré dont la solution est :

$$[H] = \frac{-([R]_0 - [H]_0 + Kd) \pm \sqrt{([R]_0 - [H]_0 + Kd)^2 + 4Kd[H]_0}}{2}$$

Si  $[R]_0=0$  on doit trouver  $[H]=[H]_0$ , ceci n'est possible qu'en utilisant la solution

$$[H] = \frac{-([R]_0 - [H]_0 + Kd) + \sqrt{([R]_0 - [H]_0 + Kd)^2 + 4Kd[H]_0}}{2}$$

A partir de cette équation nous pouvons tracer une courbe d'ajustement de l'intensité normalisée en fonction de la concentration en Rnr2-Rnr4 ajoutée et déterminer le Kd (Figure IV7). Dans notre cas, en prenant les quatre résidus répondant le plus, nous trouvons un  $Kd=1,61 \pm 0,59 \mu M$  ce qui est une affinité comparable à celle qui a été trouvée pour l'association de Dif1 à Rnr2-Rnr4 (Lee et al., 2008).

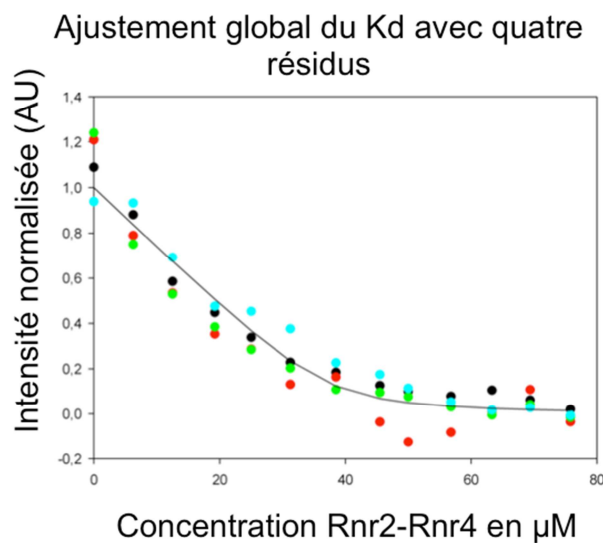


Figure IV 7 : Courbe d'ajustement du Kd pour quatre résidus en fonction de la concentration en Rnr2.

## PARTIE 2 : Caractérisation de la surface d'interaction

### 1. Par double hybride

Maintenant que nous avons montré que Hug1 interagit physiquement avec Rnr2, il nous restait à déterminer la surface d'interaction entre ces deux partenaires.

En premier lieu nous nous étions basés sur les travaux du laboratoire de Liu (Nestoras et al., 2010). Ce dernier a réalisé des mutations successives dans le gène *SPD1* tels qu'ils ont obtenu une collection de 41 mutants contenant tous trois acides aminés successifs mutés en alanines. Une de ces mutations, dans le domaine « Hug », a particulièrement retenu notre

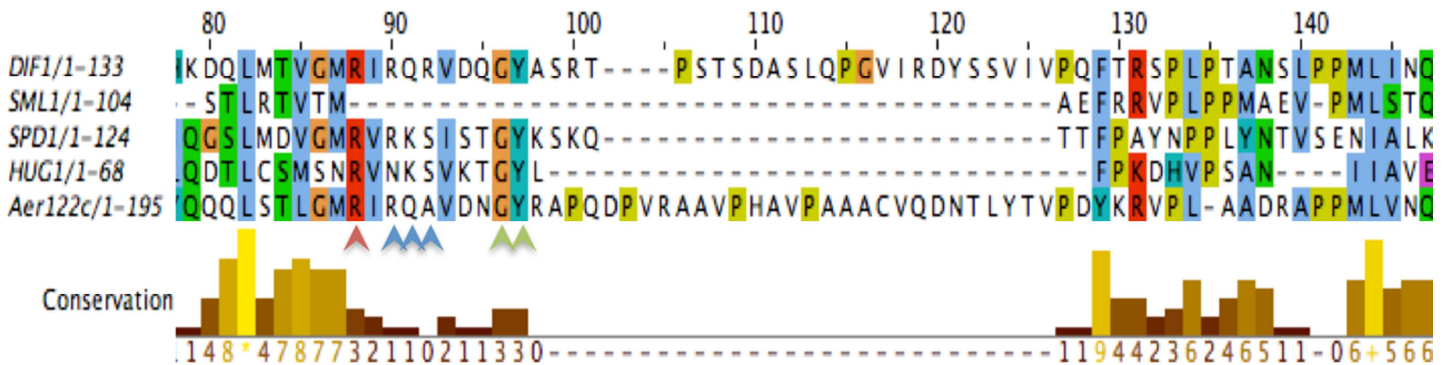


Figure IV 8 : Alignement muscle du domaine Hug des protéines Dif1, Sml1, Spd1, Hug1 et Aer122c.

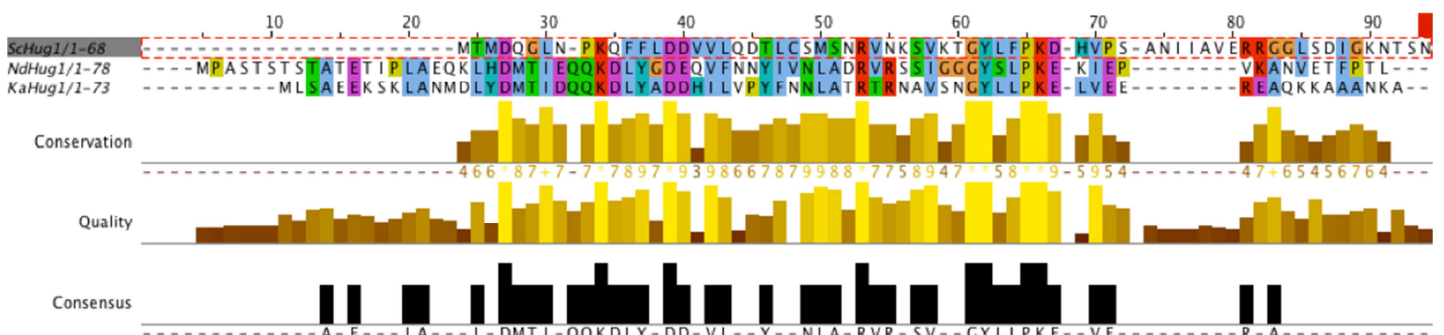
L'alignement a été réalisé au laboratoire en utilisant l'algorithme Muscle. Les couleurs représentent le niveau d'identité. Le niveau de conservation est indiqué en dessous de l'alignement. L'alignement est différent de celui obtenu par Lee et al.

Les flèches indiquent les acides aminés mutés dans la mutagenèse dirigée de Hug1.

attention. Le mutant *spd1-14* correspond à une mutation au centre du domaine « Hug », et il a la particularité de n'avoir aucune petite sous-unité de la RNR dans le noyau, et ce même en absence de stress génotoxique. Cette seule mutation engendre le même phénotype qu'une invalidation totale de *SPD1* (Nestoras et al., 2010). En regardant les alignements qu'ont réalisé Elledge et son équipe (Lee et al., 2008), nous avons cherché la correspondance de ce mutant chez Hug1 (le mutant NKS). Nous avons procédé comme dans l'article précédemment cité en mutant ces trois résidus en alanine. Nous avons alors introduit les mutations correspondantes et inséré le gène muté dans le plasmide double hybride pGBT9. Nous avons observé que Hug1<sub>NKS</sub> est toujours capable d'interagir avec Rnr2 ainsi qu'avec Dna2 que nous utilisons pour contrôler l'interaction (Figure IV10.B). En regardant de plus

près les alignements de Lee et al. nous avons remarqué que cette région n'était pas des plus conservées, ce qui peut expliquer pourquoi nous conservons cette interaction.

Alors nous avons choisi de nous référer aux alignements que nous avons réalisés (Figure IV8). Nos alignements diffèrent de ceux de Lee et al., le domaine « Hug » notamment semble plus court dans nos alignements. Par la suite nous avons réalisé de nouvelles recherches d'alignements et avons identifié par des méthodes itératives de PSI-BLAST deux nouvelles protéines « Hug1-like » chez *Naumovozya dairenensis* et *Kazachstania africana* (deux Saccharomycetaceae) (Figure IV9). A notre connaissance, aucune de ces protéines n'a été identifiée comme appartenant à la famille HUG. Jusqu'à présent Hug1 était considérée comme une protéine « orpheline » uniquement présente chez *S. cerevisiae* mais nos données indiquent que cela n'est pas tout à fait le cas. Ces nouveaux alignements pourront nous donner de nouvelles informations quant aux résidus à cibler pour la mutagenèse dirigée.



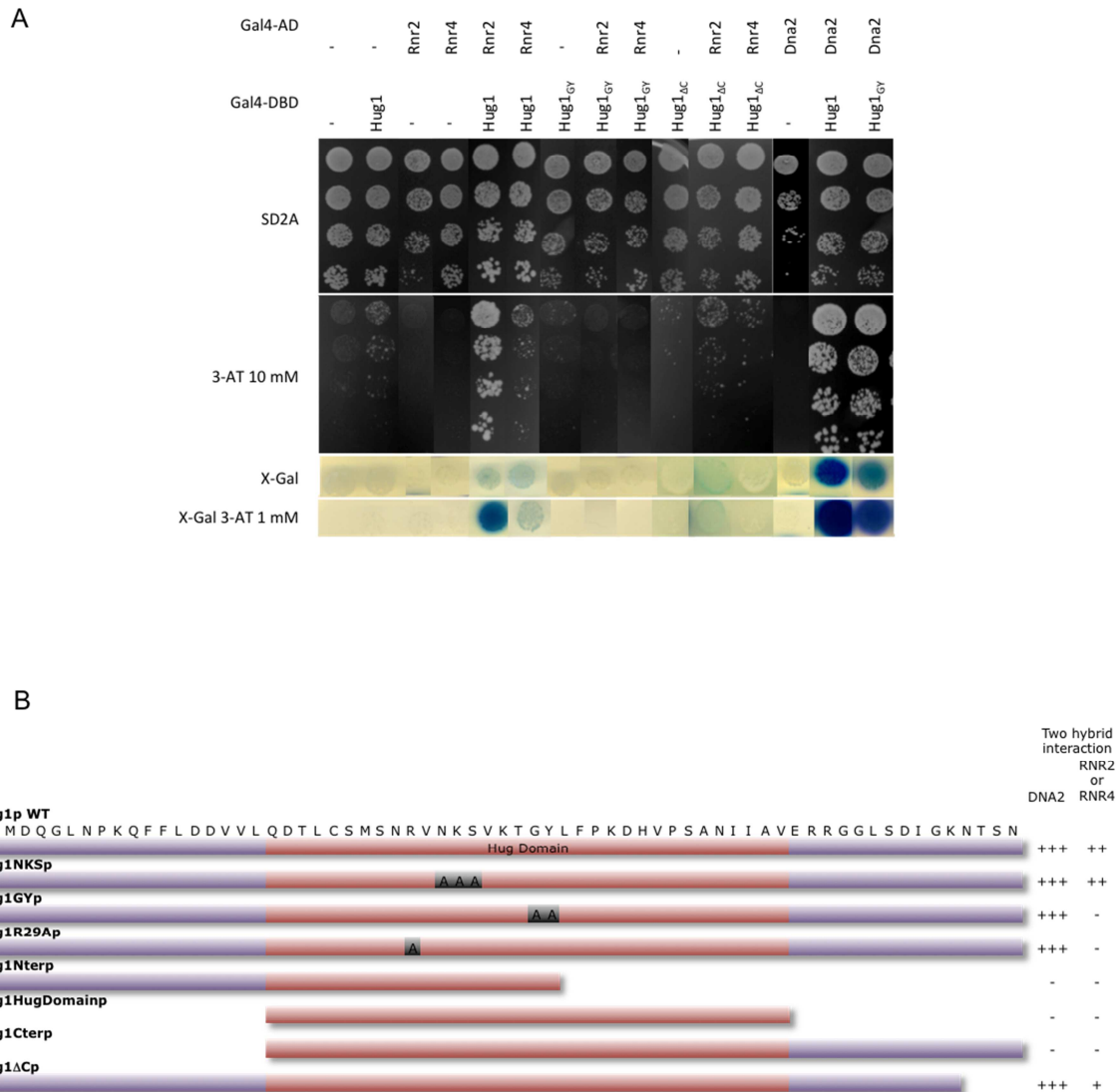
**Figure IV 9 : Alignement de trois protéines Hug1 et Hug1 « like »**

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Nd : *Naumovozya dairenensis*, Ka : *Kazachstania africana*. La coloration est faite selon clustal X pour révéler les résidus conservés et les résidus identiques. Le taux de conservation est schématisé en dessous sous forme d'un histogramme. Enfin la séquence consensus en fonction des résidus conservés est affichée en bas de la Figure.

Nous avons décidé de nous focaliser sur les acides aminés qui étaient conservés chez tous les homologues de Hug1 sauf Sml1 (qui ne possède pas de domaine Hug). Nous avons repéré trois résidus très conservés au sein de la famille ; le résidu R en position 29 et les résidus G et Y respectivement en position 37 et 38 (les flèches sur la Figure IV8). Nous les avons mutés en alanine et avons testé les interactions en double hybride (Figure IV10.A,B). Le mutant R29A de Hug1 a tendance à autoactiver de manière plus importante que la forme sauvage de Hug1. Toutefois nous observons une perte d'interaction entre Hug1<sub>R29A</sub> et Rnr2, mais un



maintien de l'interaction avec Dna2. De même les mutations G37A et Y38A perturbent l'interaction avec Rnr2 mais pas avec Dna2 dans le système double hybride (Figure IV10.B). Cela indique que la protéine Hug1 est toujours fonctionnelle.



**Figure IV 10 : Certaines mutations de Hug1 font perdre l'interaction avec Rnr2 mais pas avec Dna2.**

- Tests d'interaction dirigée entre différents mutants de Hug1 avec Rnr2 ou Dna2. La capacité à interagir est testée sur milieu 3-AT et X-Gal
- Certaines mutations font perdre à la fois l'interaction avec Rnr2 et Dna2. Schématisation des constructions testées en double hybride dirigé et les résultats obtenus pour chacune d'entre elles.

Pour avoir une idée plus générale de la zone d'interaction entre Hug1 et Rnr2, nous avons réalisé des mutants de troncature de Hug1. Parmi ces mutants, trois (Nter, Cter et HugDomain) perdaient leurs interactions à la fois avec Rnr2 et Dna2. Nous ne pouvons donc pas savoir s'ils sont fonctionnels (Figure IV10.B), bien que nous ayons vérifié que les protéines étaient bien exprimées par western blot. Le dernier ( $\Delta C$ ) semble perdre

légèrement sa capacité à se lier à Rnr2 mais nous n'avons pas réussi à reproduire le résultat pour le moment (Figure IV10.A).

Ainsi nous avons identifié trois résidus du domaine Hug importants pour l'interaction avec Rnr2.

## ***2. Par résonance magnétique nucléaire***

---

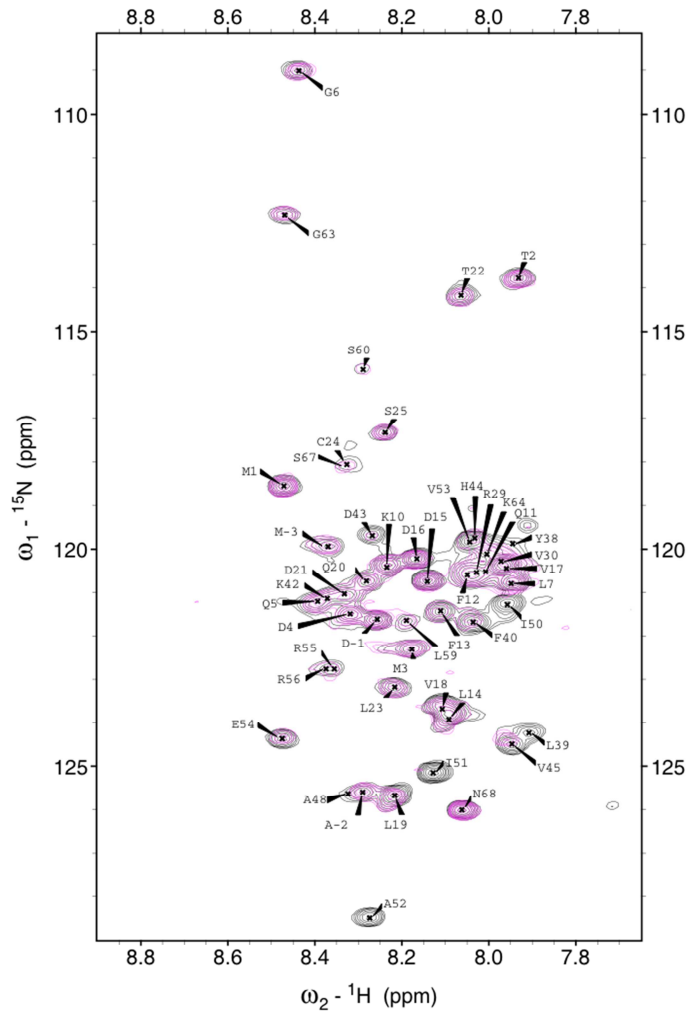
Nous avons établi, par RMN, que Rnr2-Rnr4 liait Hug1. Nous avons même pu déterminer par titrage qu'il y avait au moins sept résidus de Hug1 impliqués dans l'interaction avec Rnr2-Rnr4. Avec les spectres HSQC réalisés en deux dimensions, nous ne sommes pas en mesure d'attribuer ces pics, c'est-à-dire d'identifier à quel acide aminé correspond chaque pic, pour cela il faut utiliser des spectres en trois dimensions.

Pour rappel, nous avons effectué le spectre d'attribution à pH5 alors que les analyses d'interaction ont été réalisées à pH7,4. Or on observait des différences entre le spectre de Hug1 seul à pH7,4 et celui à pH5, notamment la disparition de certains pics. Afin d'obtenir une correspondance fiable entre les pics obtenus pour Hug1 à pH7,4 et ceux obtenus à pH5, nous avons dû réaliser des expériences de variation du pH, avec un pas de 0,5 unité de pH, en suivant les déplacements chimiques de chacun des résidus.

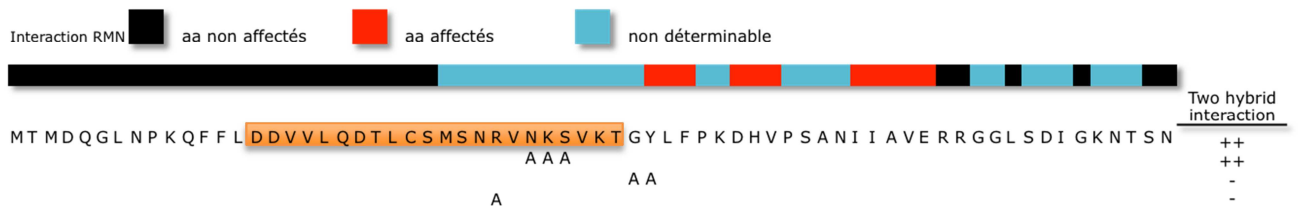
Nous avons aussi réalisé une expérience de variation de la température car pour les petites protéines dépliées nous nous plaçons plutôt à faible température (10°C) alors qu'en complexe avec de grosses protéines nous nous plaçons à une température de 20°C. Pour établir une correspondance entre les pics détectés à 10°C et ceux perturbés par l'ajout du complexe Rnr2-Rnr4 à 20°C, nous avons réalisé une expérience de variation de la température avec un pas de 2°C.

Une fois ces spectres réalisés, il reste à identifier, c'est à dire à attribuer, chacun des pics présents, ainsi nous pourrions définir une première catégorie d'acides aminés ; ceux disparaissant avec l'augmentation du pH et de la température dont on ne pourra, par conséquent, pas déterminer qu'ils sont ou non impliqués dans l'interaction (non déterminables pour l'interaction). Ensuite une fois les pics attribués, nous pouvons les transférer sur les spectres de Hug1 seul à pH 7,4, et de celui supplémenté en Rnr2-Rnr4

A



B



**Figure IV 11 : Détermination des acides aminés de Hug1 impliqués dans l'interaction avec Rnr2-Rnr4.**

A. Superposition des spectres HSQC de Hug1 seul (en noir), et de Hug1 auquel le complexe Rnr2-Rnr4 a été ajouté (en magenta). En translatant les attributions de la Figure III11 sur ces spectres, nous avons pu identifier avec précision les acides aminés (aa) impliqués dans l'interaction avec Rnr2-Rnr4.

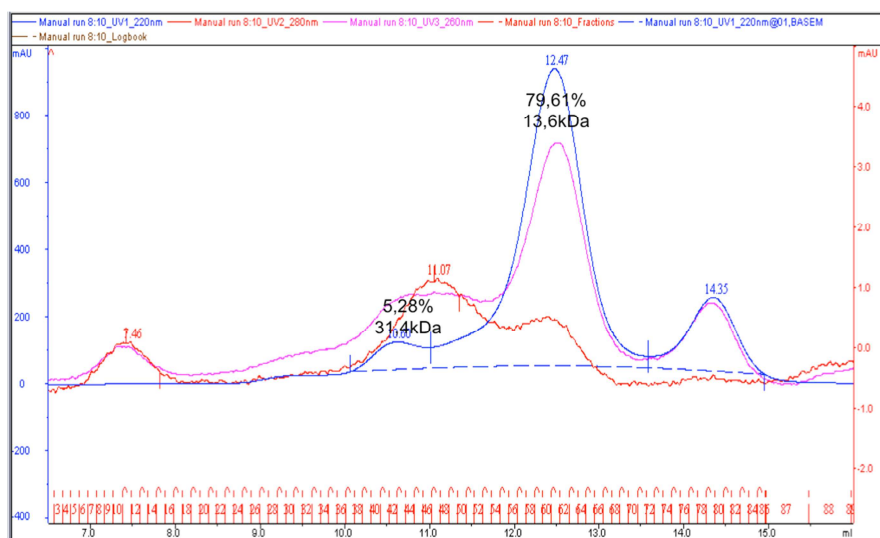
B. Schématisation de Hug1 avec sa séquence protéique. Les acides aminés sont représentés en trois couleurs ; en noir sont représentés les aa non affectés, c'est à dire présents sur les deux spectres en A, en rouge sont représentées les aa affectés, c'est à dire absents sur le spectre magenta en A, et enfin en bleu, sont figurés les aa non déterminables, c'est à dire totalement absents des deux spectres en A ou alors dans une zone de superposition où il est impossible de discriminer les pics. Les correspondances avec les mutants réalisés en double hybride sont données à titre indicatif. L'hélice identifiée lors des calculs des indices de déplacements chimiques est indiqué en orange.

(Figure IV11.A). Ainsi nous pouvons déterminer deux nouvelles catégories d'acides aminés ; ceux non affectés par la présence de Rnr2-Rnr4, donc pour lesquels les pics correspondants sont invariants après l'ajout de Rnr2-Rnr4, et enfin ceux affectés par l'ajout de Rnr2-Rnr4, par conséquent, dont les pics correspondants bougent ou disparaissent (Figure IV11.B), en présence du complexe Rnr2-Rnr4. Ainsi nous pouvons observer que ce ne sont pas sept mais au moins onze résidus de Hug1 qui sont impliqués dans l'interaction avec Rnr2 (Y38-F40, D43-V45, I50-E54). La figure IV 11B résume les résultats obtenus.

Pour rappel, lors de l'étape d'attribution, nous avons pu définir une région en pseudo hélice. Les résidus impliqués dans l'interaction ne sont pas impliqués dans la formation de la pseudo-hélice (figure IV 11B). Au contraire, les résidus de Hug1 impliqués dans l'interaction avec Rnr2-Rnr4 se trouvent dans une région déstructurée. Ainsi, Hug1 fait partie de ces IDP pour lesquelles l'interaction avec le partenaire (ici Rnr2-Rnr4) n'induit pas forcément un repliement. Cependant, il est possible que l'interaction de Hug1 avec un autre de ses partenaires (Dna2 par exemple) implique la pseudo-hélice ou induise un repliement de Hug1.

### **PARTIE 3 : Etudes biophysique du mutant Hug1GY**

#### **1. Analyse du profil de chromatographie d'exclusion**

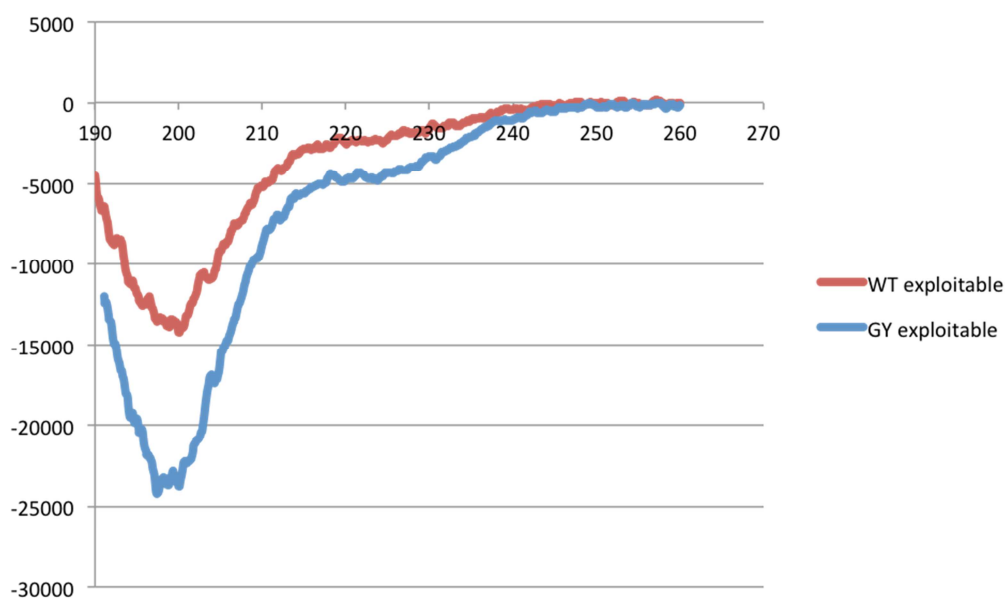


**Figure IV 12 : Spectre d'éluion de la protéine Hug1GY.**

La protéine Hug1GY est produite dans *E.coli* et purifiée à 95% avant d'être analysée par chromatographie d'exclusion sur une Superdex 75 10/300.

Nous allons nous arrêter quelques instants sur l'un des mutants d'interaction identifié au cours de l'analyse par double hybride ; le mutant G37A Y38A ou mutant GY. Tout d'abord nous avons effectué des analyses par chromatographie d'exclusion pour vérifier le profil d'éluion de la protéine mutée. Comme ce fut le cas pour Hug1 sauvage, nous avons produit une protéine recombinante Hug1<sub>GY</sub> et nous l'avons purifié comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Une fois purifié à plus de 95% nous avons effectué une filtration sur gel analytique afin de vérifier la globularité de la protéine (maintenant que nous savons que Hug1 sauvage est désordonné, il y a de fortes probabilités pour que la forme mutée le soit également). Entre temps nous avons recalibré la colonne de chromatographie d'exclusion et avons trouvé un volume d'exclusion de 7,44mL avec une courbe de calibration d'équation  $-0,3164x + 1,6171 = 0$ . En reprenant les formules décrites dans le chapitre III, nous avons pu évaluer que la forme mutée de Hug1 éluait majoritairement à une taille de 13,6kDa, ce qui est du même ordre que ce que nous avons évalué pour Hug1 (Figure IV12), ceci conforte notre hypothèse que Hug1<sub>GY</sub> tend à se comporter comme Hug1.

## 2. Pas de modification du spectre de dichroïsme circulaire



**Figure IV 13 : Spectre de dichroïsme circulaire de Hug1<sub>GY</sub>. Et Hug1 sauvage**

Hug1<sub>GY</sub> est produit et purifié à 95%. La protéine recombinante Hug1GY (9μM) est dialysée contre de l'eau avant d'être analysée par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain. Le signal obtenu pour Hug1 sauvage dans les mêmes conditions est superposé en rose. Les profils sont comparables.

A partir de la protéine Hug1<sub>GY</sub> purifiée, nous avons évalué la composition en structure secondaire de Hug1<sub>GY</sub> à l'aide de la technique de dichroïsme circulaire. Nous avons utilisé des conditions expérimentales similaires à celles utilisées pour Hug1 sauvage (Hug1<sub>GY</sub> à 4μM en eau dans une cuve de 2mm). L'analyse du spectre (Figure IV13) a permis de montrer que la protéine Hug1<sub>GY</sub> se comporte de manière très proche de Hug1 sauvage, mis à part la diminution globale du signal, le profil général reste le même que celui de Hug1, la mutation ne semble donc pas perturber l'état de déstructuration de la protéine.

## ***PARTIE 4 : Comparaison des fonctions de Dif1 et Hug1***

---

Ayant établi que Hug1 est une IDP qui fixe de manière directe la petite sous-unité de la RNR, il restait à évaluer un éventuel rôle de Hug1 en relation avec le métabolisme des nucléotides.

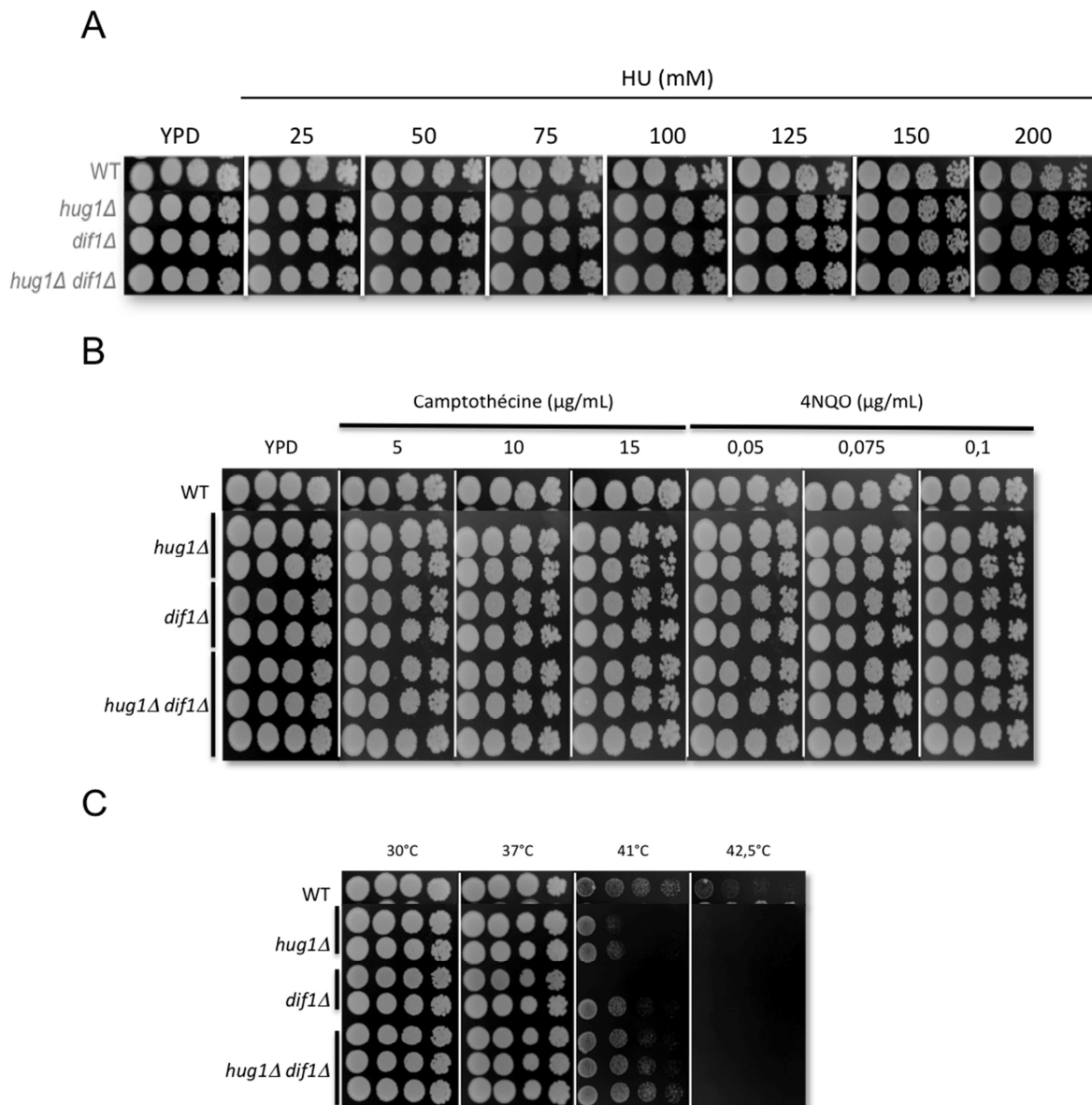
### ***1. Deux domaines Hug***

---

Comme présenté dans le chapitre II, il existe un homologue de Hug1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ; la protéine Dif1 (Lee et al., 2008). Ces deux protéines possèdent un domaine Hug. L'étude de Lee et al. suggère que le domaine « Hug » de Dif1 pourrait intervenir dans la liaison à la petite sous-unité de la RNR (Lee et al., 2008). En effet une version mutée de Dif1 correspondant à une mutation de sept résidu en alanine au début du domaine Hug perd sa capacité à interagir avec Rnr2-Rnr4 par la technique du visible en Biacore®. Comme il existe deux protéines à domaines « Hug » chez *S. cerevisiae* (Hug1p et Dif1p) nous avons pensé qu'il y avait peut-être une redondance de fonction entre ces deux protéines. Nous avons donc choisi de comparer par diverses analyses ces deux protéines en espérant avoir plus d'indication sur la fonction que pourrait avoir Hug1.

Une des premières choses que nous avons souhaité savoir était si la perte des deux protéines à domaines « Hug » de la cellule pouvait perturber la croissance cellulaire. Nous avons donc construit des souches délétées à la fois pour *HUG1* et pour *DIF1*. Ensuite nous avons spotté ces souches sur une gamme de milieu supplémenté avec différentes drogues (HU, Camptothécine, 4NQO). Aucun défaut de croissance n'est observé dans la souche *hug1Δdif1Δ* (Figure IV14.A et B). On peut voir qu'avec les gammes de drogues utilisées, nous

ne parvenons pas à rendre les souches sauvages sensibles aux stress, de ce fait, nous ne sommes pas en mesure de dire si la double délétion de *HUG1* et *DIF1* améliore la croissance des souches en présence de stress génotoxiques (Figure IV14.A et B). Pour éventuellement observer un effet il faudrait utiliser des gammes plus importantes de drogue, uniquement possible avec le 4NQO, pour les deux autres nous sommes déjà aux concentrations maximales.



**Figure IV 14 : Test de croissance de souches délétées pour *HUG1* et *DIF1*.**

- A. En réponse à l'hydroxyurée
- B. En réponse à la camptothécine et au 4NQO
- C. En réponse à la température

Une étude récente de Kim et al. publiée en 2011 montre que la délétion de *SML1*, *DIF1* ou *HUG1* confère une hyper-résistance à la température en sortie de phase stationnaire (Kim and Siede, 2011). Nous avons fait une expérience en « spottant » les levures sur milieu riche et nous les avons placées directement à différentes températures (30°C, 37°C, 41°C et 42,5°C). Après quatre jours de croissance nous avons observé nos boîtes. Nous notons une légère sensibilité des simples mutants comparés à la souche de référence (Figure IV14.C). En ce qui concerne les doubles mutants sur les trois testés, nous avons une variabilité interne ne permettant pas de conclure, néanmoins on peut conclure qu'il n'y a pas d'effet majeur de la combinaison des mutations.

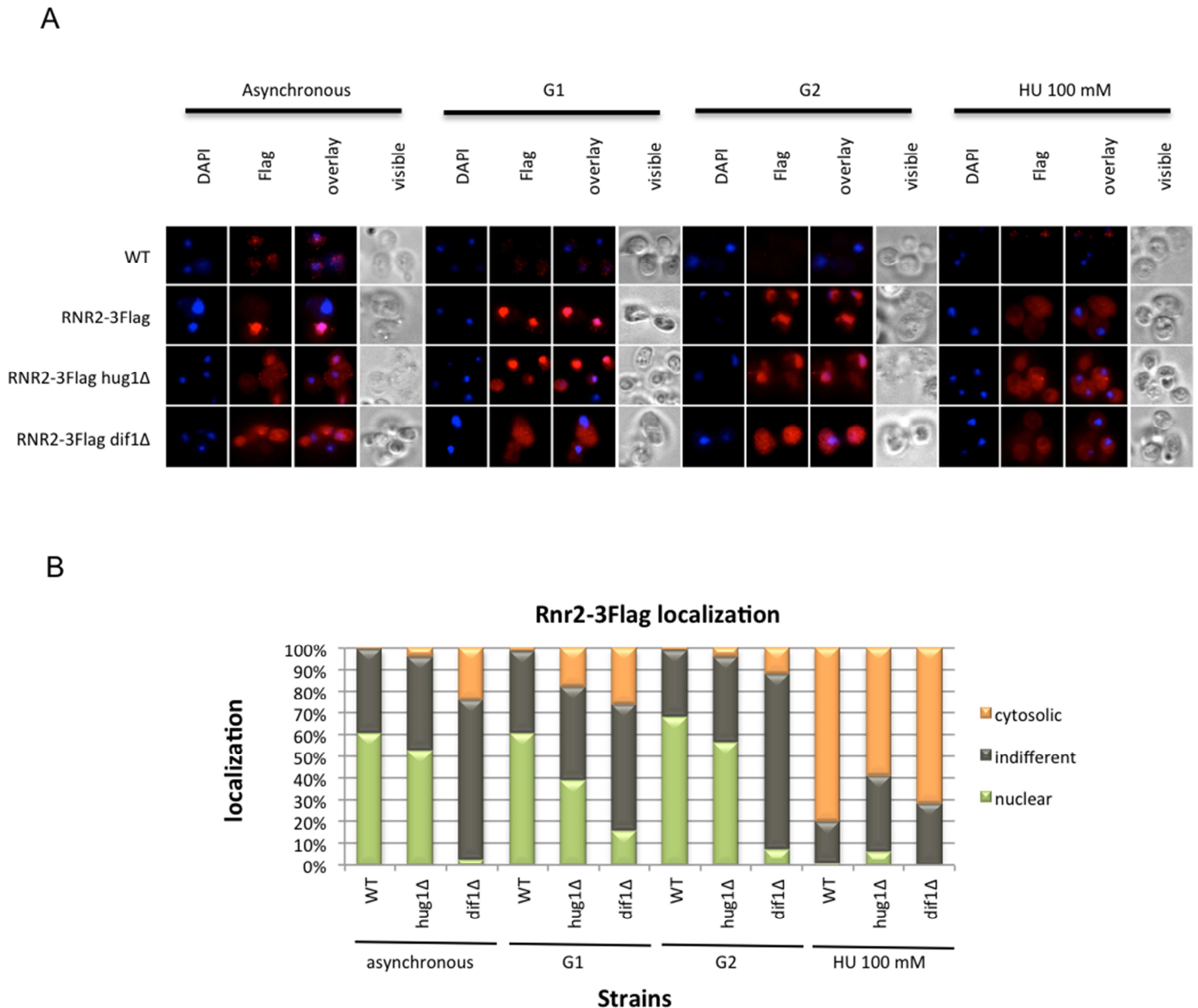
## **2. Relocalisation de la petite sous-unité**

---

Pour rappel, au cours du cycle cellulaire la petite sous-unité de la ribonucléotide reductase est amenée à être relocalisée vers le cytoplasme en réponse aux dommages de l'ADN et au cours de la phase S (voir chapitre I). Nous avons montré par la technique du double hybride que Hug1, tout comme cela a été montré pour Dif1, interagit avec la petite sous-unité de la RNR. Dif1 intervient dans la relocalisation de la petite sous unité (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008). Lee et al. ont notamment montré qu'une mutation dans le domaine Hug perturbait cette relocalisation (Lee et al., 2008). De même l'étude de Nestoras et al. concernant Spd1 suggère que le domaine Hug interviendrait dans la relocalisation de la petite sous-unité de la RNR (Nestoras et al., 2010). Nous avons donc cherché à savoir si Hug1 jouait un rôle redondant avec Dif1 et pouvait intervenir dans la relocalisation de la petite sous-unité.

Pour cela, nous avons dû étiqueter Rnr2 au locus. Nous avons ainsi généré deux souches différentes ; une souche étiquetée avec un épitope Flag (1Flag) et une souche étiquetée avec trois épitopes Flag (3Flag). Dans un premier temps, nous avons mis au point l'expérience afin d'identifier les conditions optimales pour pouvoir visualiser Rnr2 en contrôlant la détection de Rnr2 étiqueté. Ceci nous a permis de déterminer l'étiquette la plus adaptée pour la visualisation par immunofluorescence (IF) et la concentration d'anticorps primaire à utiliser. Il s'est avéré que l'étiquette 3Flag était la plus adaptée avec une utilisation de l'anticorps primaire à une dilution de 1/1000<sup>ème</sup>. Pour suivre la relocalisation de la petite sous unité de la RNR, nous avons synchronisé nos cellules en G1 et G2, et nous avons également traité une





**Figure IV 15 : Localisation sub cellulaire de la petite sous-unité de la RNR dans différentes conditions de croissance.**

Le gène RNR2 est étiqueté au locus pour être visualisé par immunofluorescence. Les cellules sont visualisées au microscope à épifluorescence (A) et un comptage supérieur à 200 cellules est effectué (B). Les cellules sont réparties dans différents groupe selon que la localisation de Rnr2 soit exclusivement nucléaire, exclusivement cytosolique ou qu'elle soit à la fois nucléaire et cytosolique.

partie d'entre elles à l'hydroxyurée. Les cellules sont ensuite traitées comme indiqué dans la section « Matériels et méthodes » et la fluorescence visualisée à l'aide d'un microscope droit à épifluorescence (Figure IV15.A). Pour chaque traitement un comptage des cellules présentant une localisation nucléaire, cytoplasmique ou indifférenciée (autant dans le noyau que dans le cytoplasme) de Rnr2 étiqueté est effectué sur plus de 200 cellules (Figure

IV15.B). Conformément à ce qui a été publié, nous observons bien une localisation majoritairement nucléaire de Rnr2 étiqueté dans la souche sauvage et que cette localisation varie lorsque l'on applique un stress génotoxique, pour devenir majoritairement cytoplasmique. Nous avons également vérifié que nos observations sur la souche *dif1Δ* concordaient avec celles de Wu et Huang en ce qui concerne la relocalisation de la petite sous-unité dans les souches délétées pour *DIF1* (Wu and Huang, 2008). Nous observons effectivement une majorité des cellules avec une localisation indifférenciée de Rnr2 dans le cas de cellules asynchrones quand le gène *DIF1* est invalidé (Figure IV15.B). Maintenant, si on s'intéresse aux résultats obtenus pour la délétion de *Hug1*, on peut voir que globalement, la localisation subcellulaire de la petite sous-unité dans ces souches est plus proche de ce qui est observé dans une souche sauvage que dans une souche *dif1Δ*. En effet, dans les cellules asynchrones et les cellules synchronisées en G1 et G2/M, la localisation subcellulaire de Rnr2-3Flag est majoritairement nucléaire, mis à part une petite différence pour la synchronisation en G1, mais nous sommes encore loin de ce qui est observable dans les souches *dif1Δ*. Quand les cellules sont traitées avec 100mM de HU, Rnr2-3Flag est principalement cytoplasmique comme ce qui est observé dans les souches sauvages et *dif1Δ* (Rnr2-3Flag, *hug1Δ* et *dif1Δ*).

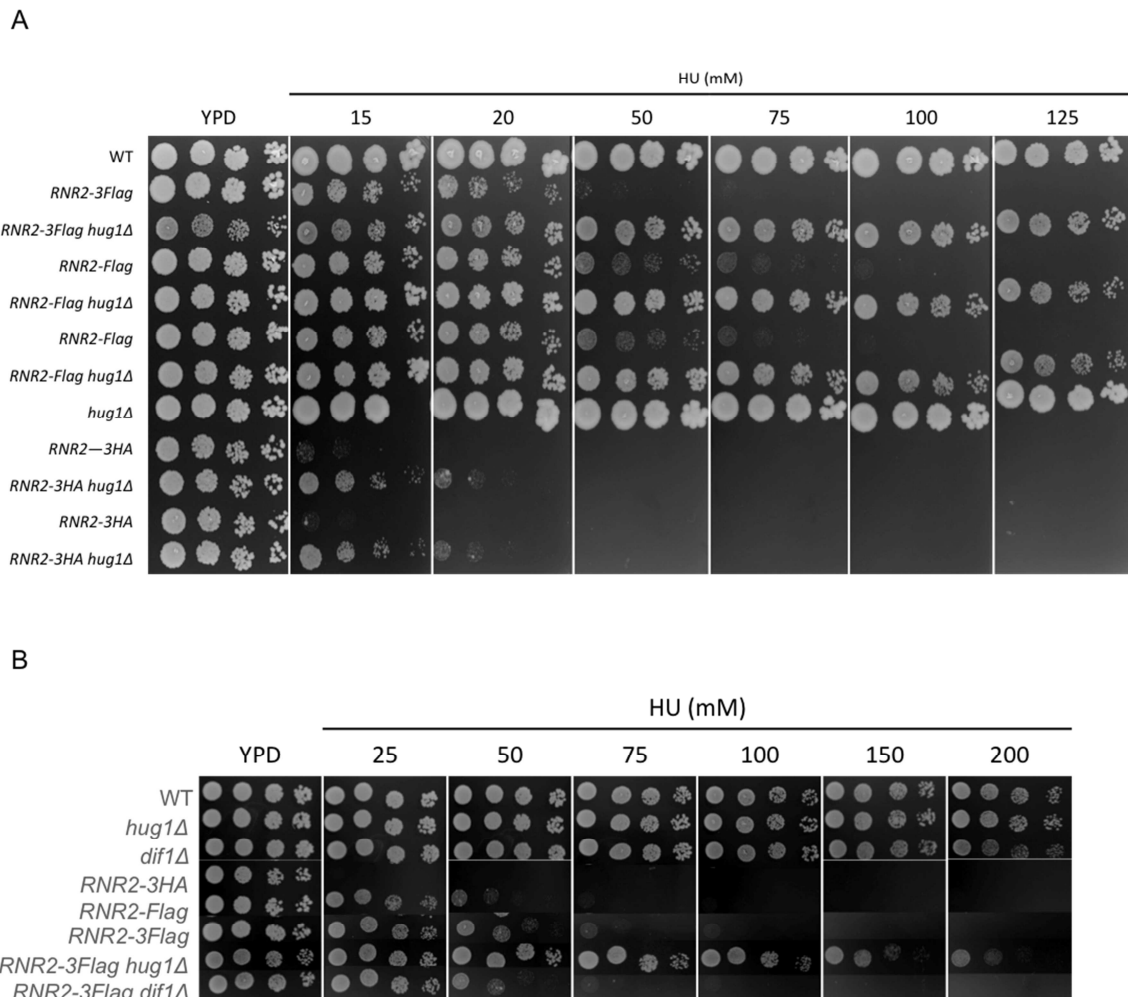
Donc quelles que soient les conditions de culture *Hug1* ne semble pas intervenir de manière significative dans la relocalisation de la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase.

### **3. Découverte d'un nouveau phénotype pour la délétion de HUG1**

Nous avons décidé de tester les souches étiquetées en test en goutte pour vérifier leur fonctionnalité. Ce fut une agréable surprise quand nous découvrîmes que le fait d'étiqueter Rnr2 en position C-terminale avec une étiquette Flag ou 3Flag perturbait la croissance des souches en présence d'hydroxyurée (Figure IV16.A) Une explication simple à cet effet est que la partie C-terminale de Rnr2 est celle qui intervient dans l'interaction avec Rnr1, de ce fait en plaçant notre étiquette en position C-terminale de Rnr2 nous perturbons sans doute cette interaction (Xu et al., 2006).

Ces observations sont visibles quelle que soit l'étiquette utilisée, avec toutefois des niveaux de sensibilité différents. En effet, on note une corrélation inverse entre la taille de

l'étiquette et la sensibilité aux stress génotoxiques, ainsi, l'étiquette la plus petite (3HA) présente une hypersensibilité accrue comparée à celle des étiquettes Flag et 3Flag (Figure IV16.A). L'interaction entre Rnr2 et Rnr1 se fait dans une poche formée d'hélices (Xu et al., 2006), on peut supposer que les étiquettes plus longues sont capables de se replier pour



**Figure IV 16 : La délétion de HUG1 supprime partiellement la sensibilité des souches étiquetées pour Rnr2 à l'hydroxyurée.**

Les souches étiquetée pour Rnr2 sont sensibles à l'hydroxyurée. La délétion de *HUG1* permet de soulager partiellement cette sensibilité (A,B) ce qui n'est pas le cas pour la délétion de *DIF1* (B).

sortir de la poche d'interaction alors que l'étiquette 3HA étant plus courte ne peut pas se replier et génère un encombrement stérique aggravant la sensibilité aux stress génotoxiques. La surprise fût d'autant plus agréable que la délétion de *HUG1* dans ces souches étiquetées supprime la sensibilité aux stress génotoxiques, ce qui nous offrait un nouveau phénotype pour Hug1 (Figure 16.A). Cet effet suppresseur quand *HUG1* est inactivé suggère un rôle d'inhibiteur de la RNR. Nous avons vu cet effet avec des souches *hug1Δ*

*RNR2-3Flag*, mais cela est-il aussi vrai si on étiquette Rnr2 autrement ? Qu'à cela ne tienne, nous testons avec les étiquettes 1Flag et 3HA. Dans ces deux cas on voit une suppression partielle de l'hypersensibilité à l'hydroxyurée, même si avec le 3HA cette suppression n'est pas aussi impressionnante qu'avec le simple flag (Figure IV16.A et B). Toutefois, comme déjà évoqué, la sensibilité de la souche 3HA est très prononcée.

Le plus intéressant restant que cette suppression n'est pas observable dans les cas où l'on abroge la fonction de *DIF1* (Figure IV16.B), à noter qu'en réponse au stress génotoxiques nous sommes dans des conditions où Dif1 est dégradé. Donc Hug1 et Dif1 jouent clairement des rôles différents, faisant de Hug1 un nouveau régulateur de la RNR.

Nos souches étiquetées bien qu'étant perturbées en termes de croissance, l'étiquette ne semble pas perturber leur relocalisation. Nous observons bien, un problème de relocalisation dans le cas de souches inactivées pour *DIF1*, comme décrit dans la littérature (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008).

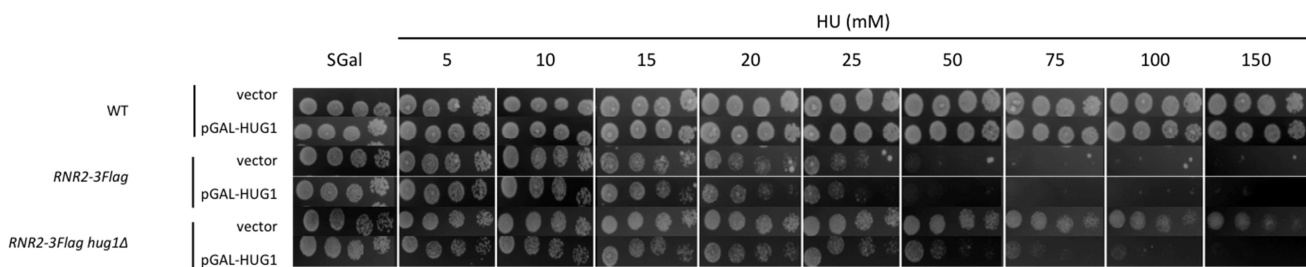
Nous avons bien-sûr voulu vérifier que l'effet que nous voyions était bien causé par une absence de *HUG1* en réintroduisant le gène *HUG1* dans les souches *RNR2-3Flag hug1Δ*. Au moment de l'étude, nous ne disposons que de deux plasmides « multicopies ». Comme l'inactivation de *HUG1* soulage la croissance en présence de stress génotoxiques, on peut raisonnablement supposer que sa surexpression aggrave la sensibilité à ces stress. Nous avons donc testé l'effet d'une réintroduction de *HUG1* dans la souche étiquetée la moins sensibilisée aux stress génotoxiques. Pour se faire, nous avons fait le choix d'utiliser le plasmide multicopie permettant l'expression de *HUG1* sous le contrôle du promoteur Gal1. Nous pouvons observer que l'expression de *HUG1* à partir de ce plasmide dans les souches *RNR2-3Flag* a un léger effet négatif sur la croissance en présence de HU.

Nous avons ensuite introduit ce plasmide dans une souche *RNR2-3Flag hug1Δ*. Comme vous pouvez le constater, le fait de réexprimer *HUG1* dans une souche *RNR2-3Flag hug1Δ* permet de restaurer en grande partie la sensibilité des souches à l'hydroxyurée montrant que la résistance au HU observée dans une souche *RNR2-3Flag hug1Δ* est bien liée à l'absence de Hug1 (Figure IV17).

Ces observations peuvent sembler contradictoires : dans la souche *RNR2-3Flag*, l'expression de Hug1 à partir du plasmide multicopie pGal1-HUG1 entraîne un effet négatif sur la

croissance en présence de HU que l'on peut interpréter comme un effet négatif de la surexpression de Hug1. Or dans la souche *RNR2-3Flag hug1Δ* on observe un effet similaire à un effet de complémentation et non pas de surdosage de Hug1. L'explication est assez simple, nous avons calculé sur des westerns blots le taux d'induction de Hug1 lorsqu'il est sous le contrôle du promoteur Gal1 et nous l'avons comparé à ce qui est observé quand l'expression de Hug1 endogène est (donc sous le contrôle de son propre promoteur) induite au HU. Nous avons mesuré qu'il y avait de 3,7 fois plus de protéine Hug1 dans le cas où il est induit au HU sous le contrôle de son propre promoteur que lors de l'induction par le galactose. L'induction au galactose ne permet donc pas de surexprimer Hug1 au même niveau que ce que fait la cellule lorsqu'il est induit par le HU, c'est pourquoi, dans la souche *RNR2-3Flag hug1Δ* nous observons plutôt un effet de complémentation et non pas d'une réelle surexpression. Par contre, dans la souche *RNR2-3Flag*, l'expression à partir de pGal1-HUG1 s'ajoute à celle de Hug1 endogène, on a alors effectivement un surdosage de Hug1.

En tous cas cela montre bien que l'effet observé est provoqué par la délétion de HUG1.

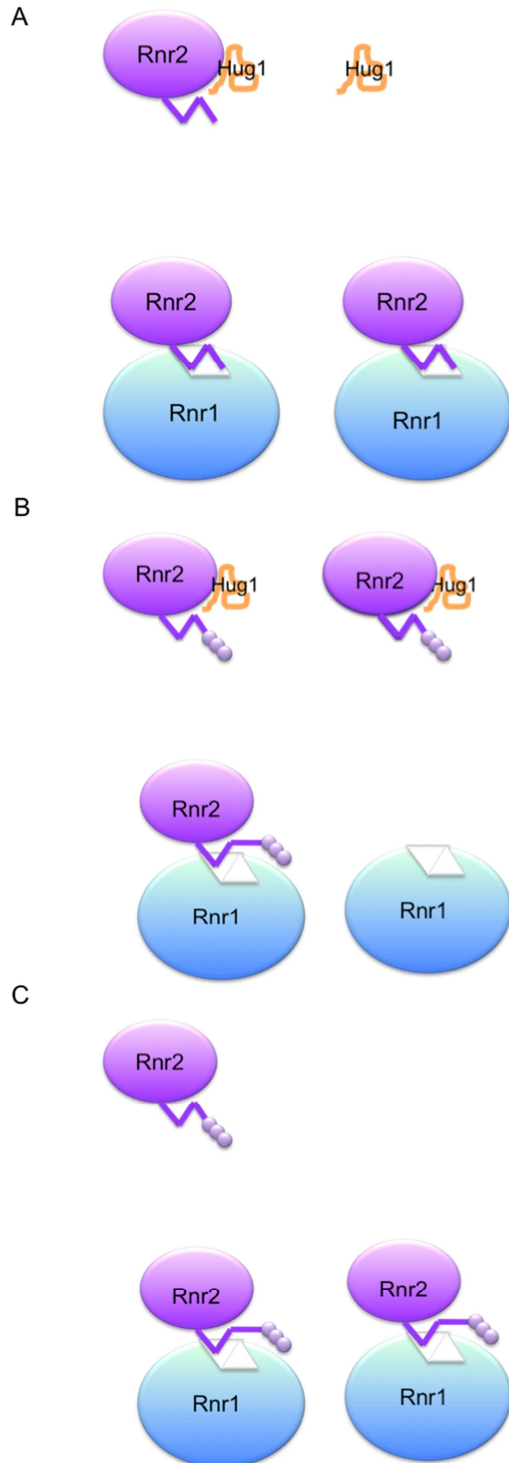


**Figure IV 17 : Surexpression de HUG1 dans un contexte Rnr2- 3Flag**

Un plasmide 2 $\mu$  (contenant le gène *HUG1* ou non) inducible au galactose a été introduit dans différentes souches ; la souche sauvage (WT), la souche *RNR2-3Flag* et la souche *RNR2-3Flag hug1Δ*. La croissance de ces souche est ensuite testée sur boîte galactose avec différentes concentrations d'hydroxyurée

Dans tous les cas, nos observations vont dans le sens où Hug1 serait un inhibiteur de la RNR. Pour mieux comprendre, nous proposons le petit modèle présenté dans la Figure IV18. Dans les conditions standard de croissance la petite sous-unité de la RNR se fixe préférentiellement à la grosse sous-unité, toutefois une petite partie des petites sous unités serait séquestrée par Hug1 (Figure IV18.A). Lorsque l'on étiquète en C-terminal Rnr2 l'interaction entre la petite sous-unité et la grosse sous-unité est perturbée, par conséquent l'affinité entre la petite sous-unité et la grosse sous-unité pourrait être plus faible voire

déstabilisée (Figure IV18.B). Il y aurait donc une compétition entre Hug1 et la grosse sous-unité pour la fixation à la petite sous-unité, en faveur de Hug1. Ainsi les souches se trouveraient sensibilisées à l'hydroxyurée. Maintenant si on supprime Hug1, il n'y a plus de compétition, et l'interaction entre la grosse sous-unité et la petite sous-unité bien qu'étant moins affine reste toujours possible et ainsi on supprimerait la sensibilité au stress génotoxiques (Figure IV18.C).



**Figure IV 18 : Modèle de régulation de la RNR par Hug1.**

Pour simplifier toutes les sous unités de la RNR ne sont pas représentées.

Dans les conditions standards de croissance lorsque l'on applique un stress génotoxique (A), Rnr2 se lie préférentiellement à Rnr1 mais une petite quantité de Rnr2 est séquestré par Hug1. Dans les conditions ou Rnr2 est étiqueté (B) l'interaction entre Rnr2 et Rnr1 se trouve perturbée, Hug1 pourra séquestrer beaucoup plus de Rnr2, les souches se trouvent sensibilisées au HU. Si on supprime HUG1 (C) Rnr2 n'est plus séquestré par Hug1 et pourra se fixer à Rnr1, les souches ne sont plus sensibles au HU.







*Chapitre V :*  
*Conclusions et*  
*Discussions*



---

## ***PARTIE 1 : Hug1 est un nouveau régulateur de la RNR***

---

### ***1. Hug1 est une protéine intrinsèquement désordonnée....***

---

Le monde des protéines intrinsèquement désordonnées ne cesse de s'étendre depuis ces dernières années. Petit à petit l'importance que ces dernières semblent jouer grandit aussi. Une nouvelle protéine vient agrandir la famille ; la protéine Hug1.

Comme indiqué dans le chapitre II, Hug1 fait partie d'une famille de gènes partageant certains domaines communs ; « Hug », « Sml » et « R1B » (Lee et al., 2008; Nestoras et al., 2010). Cette famille est en expansion, et parmi ses membres, deux ; Sml1 et Spd1 sont décrits comme étant des protéines intrinsèquement désordonnée (Gupta et al., 2004; Nestoras et al., 2010; Zhao et al., 2000). C'est tout naturellement que nous avons testé cette hypothèse pour Hug1. Même si les analyses *in silico* ne prédisent pas de façon claire que Hug1 est une IDP, nos données expérimentales indiquent bien que Hug1 fait partie des IDPs. Hug1 semble même être totalement désordonnée à en juger par les analyses de RMN, à l'exception peut-être d'une pseudo-hélice s'étendant des résidus D15 à T36.

De nombreux travaux proposent que les IDPs jouent un rôle dans les nœuds d'interaction, grâce aux avantages que procure leur flexibilité (Dyson and Wright, 2005). Toutefois nous n'avons trouvé que 17 potentiels partenaires physiques pour Hug1 lors du crible à grande échelle, mais la découverte de deux nouvelles interactions de manière dirigée suggère que de nombreuses autres interactions pourraient impliquer Hug1. Toutefois la variété de fonction de potentiels interactants trouvés dans le crible double-hybride (à condition que ces interactions soient confirmées par d'autres méthodes) pourrait présager d'un rôle de Hug1 dans de nombreux procédés. Notre étude a permis de mettre en évidence un lien entre Hug1 et la réponse aux dommages de l'ADN et/ou la réplication *via* une interaction physique avec Dna2, Rnr2 et Rnr4. Toutefois une question majeure se pose : quel est le rôle de Hug1 dans ces interactions ? Pourrait-il jouer un rôle de plateforme pour mettre en relation certaines protéines ? De nombreuses IDPs sont impliquées dans des voies de signalisation (Tompa, 2009), parmi les partenaires physiques identifiés on retrouve des protéines impliquées dans le trafic membranaire et l'intégrité cellulaire (Pkh2, Dnf3, Hfa1, Ypp1), Hug1 permettrait-il de faire le lien entre ces voies et les dommages de l'ADN ?

Si tant est que Hug1 joue un rôle de nœud dans les réseaux d'interaction, comment se fait-il qu'il ait été si difficile de trouver un phénotype ? Un phénomène de redondance de fonction avec Dif1 n'était pas à exclure car ces deux protéines possèdent un domaine « Hug » (Lee et al., 2008). Nous avons donc inactivé ces deux gènes afin de supprimer tous les domaines « Hug » de la cellule et n'avons pas observé de défaut de croissance cellulaire. Certes les conditions testées ne nous permettent pas de voir une éventuelle amélioration de la croissance, cette théorie n'est donc pas à exclure.

Pour finir nous avons étudié Hug1 par RMN et avons observé que Hug1 ne se replie pas en contact avec son partenaire Rnr2. Même si de nombreuses IDPs sont connues pour être capables de se replier au contact de leur partenaire, on sait désormais que certaines d'entre elles interagissent avec leur partenaire en restant sous forme dépliée (Sigalov et al., 2007; Tompa, 2009). Ceci signifie-t-il pour autant que Hug1 est incapable de se replier ? Peut-être adopte-t-il une conformation particulière en interagissant avec d'autres de ses partenaires.

Cette dernière question peut être testée avec Dna2, nous possédons les outils nécessaires pour évaluer la capacité de Hug1 à se replier en présence de Dna2 (protéines recombinantes, RMN). Par ailleurs nous savons que Hug1 interagit avec Dna2 par des modalités différentes de celles de son interaction avec Rnr2, pour preuve, les mutants GY et R29A perdent leur capacité à interagir avec Rnr2 mais pas avec Dna2.

## ***2. ... Qui interagit physiquement et génétiquement avec la RNR***

---

Chez *S.cerevisiae*, la RNR est connue pour être exprimée en fin de phase G1 et en phase S (Elledge and Davis, 1990). En étudiant la cinétique d'expression de Hug1, nous avons pu déterminer que la protéine était exprimée en fin de phase S, début G2. Donc les protéines de la RNR et Hug1 se croisent à un moment du cycle cellulaire ; la fin de la phase S. Hug1 appartenant à une famille d'inhibiteur de la RNR (Lee et al., 2008), les données expérimentales suggèrent que Hug1 serait effectivement un inhibiteur de la RNR, par conséquent nous avons testé sa capacité à se lier à ce complexe. Grâce à des études dirigées de double hybride nous avons pu montrer que Hug1 est capable d'interagir physiquement avec Rnr2. Cette observation a été confirmée par des méthodes *in vitro* de biochimie et de biophysique. Toutefois, nous ne savons pas si Hug1 interagit seulement avec Rnr2 ou avec le

complexe Rnr2-Rnr4, ceci reste encore à déterminer, même si nous avons détecté une interaction entre Rnr4 et Hug1 cette dernière s'avérait plus faible et n'a pas été testée par d'autres méthodes. Hug1 est de toute façon capable d'interagir avec Rnr2 sans la présence de Rnr4. A noter que les RNR de *E.coli* et de *S.cerevisiae* appartiennent toutes les deux à la catégorie Ia, on ne peut pas exclure la possibilité de la formation d'un complexe chimérique lors des études *in vitro*, nombre protéines d'organismes différents sont capables d'interagir entre elles. Pour exemple on peut citer Sml1 qui est capable d'interagir avec la RNR humaine (Zhao et al., 2000). De plus les séquences, qui plus est les structures des RNR sont très conservées entre elles (Lundin et al., 2010). Mais cela reste peu probable compte tenu du niveau de surexpression de la protéine Rnr2 de *S.cerevisiae*.

Nous n'avons pas décelé d'interaction avec la grosse sous-unité, cependant avec les constructions doubles hybrides réalisées nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence l'interaction existant entre la grosse sous-unité et la petite sous-unité de la RNR. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que Hug1 puisse interagir avec la grosse sous-unité de la RNR.

Par des analyses biophysique nous avons pu déterminer qu'au moins onze acides aminés de Hug1 étaient impliqués dans l'interaction avec Rnr2. Il serait bon aussi de pouvoir déterminer la surface de Rnr2 impliquée dans l'interaction avec Hug1. Pour cela nous avons initié des expériences doubles hybrides en tronquant la partie C-terminale de Rnr2. Deux mutants ont été réalisés, un pour lequel les 9 derniers acides aminés ont été éliminés (nonapeptide impliqué dans l'interaction avec Rnr1), et un deuxième pour lequel les 34 derniers acides aminés ont été éliminés (région de Rnr2 non résolue en cristallographie). Il s'est avéré que le mutant  $\Delta C9$  voyait sa croissance très légèrement affectée, par contre, chose surprenante, le mutant  $\Delta C34$  voyait sa croissance améliorée. Peut-être que la partie C-terminale de Rnr2 gène pour la fixation de Hug1 et en la supprimant on stabilise l'interaction Rnr2-Hug1. Par contre le fait de supprimer les 34 derniers acides aminés, déstabilise l'homodimérisation de Rnr2, et son interaction avec Rnr4, ce qui suggère une implication de la partie C-terminale de Rnr2 dans la surface de dimérisation, ce qui n'est pas visible en cristallographie.

En étiquetant la partie carboxy-terminale de la protéine Rnr2 nous avons créé un mutant hypersensible aux stress génotoxiques. Et chose étonnante la suppression de *HUG1* permet

d'abroger cette hypersensibilité, ce qui n'est pas observé lorsque l'on inactive *DIF1*. Cela indique que Hug1 joue un rôle bien différent de Dif1.

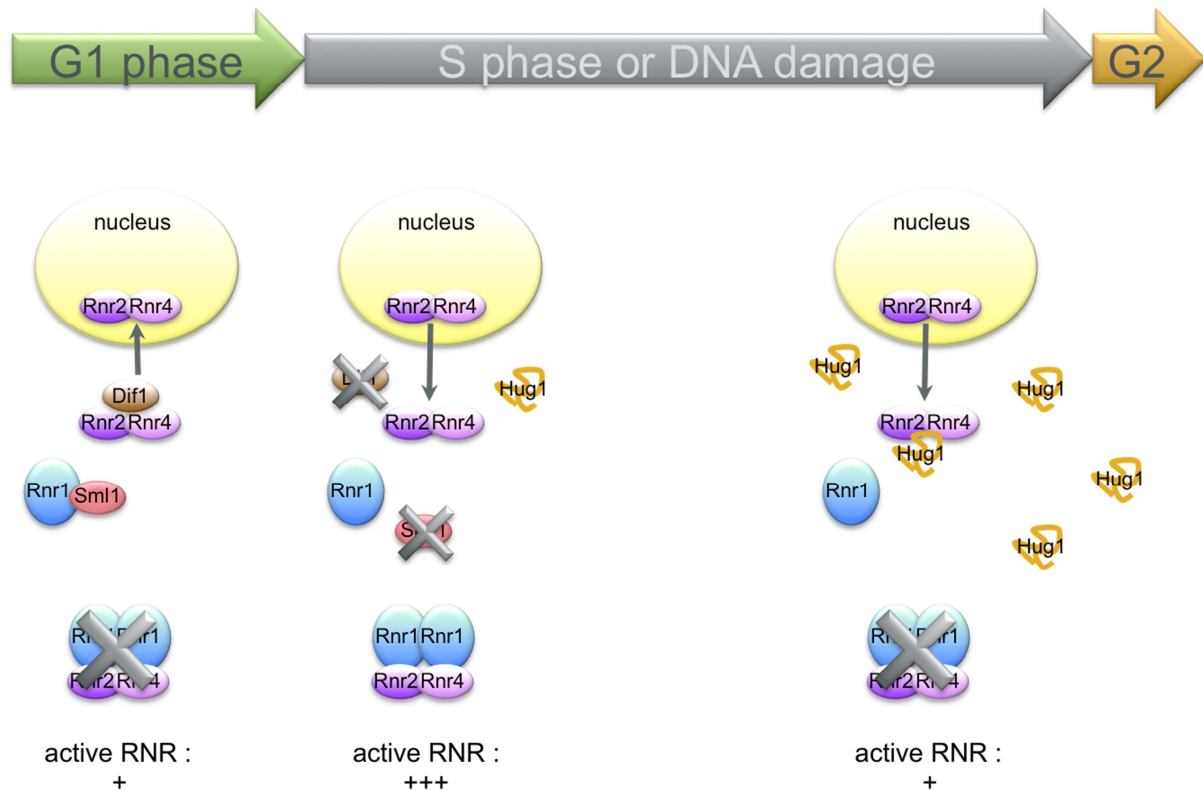
## ***PARTIE 2 : Proposition d'un modèle de fonctionnement de Hug1***

---

Les observations de nos prédécesseurs suggéraient que Hug1 était un inhibiteur de la RNR (Basrai et al., 1999), nos observations vont également dans le même sens notamment grâce au nouveau phénotype d'hypersensibilité à l'hydroxyurée des mutants Rnr2 étiquetés.

Nous pouvons expliquer cette hypersensibilité par la déstabilisation de l'interaction entre Rnr2 et Rnr1 à cause de la présence de l'étiquette (Figure IV17.B). Dans ce cas, nous supposons que Hug1 inhibe la liaison entre la petite sous unité et la grosse sous-unité en se liant au complexe Rnr2-Rnr4. Dans les conditions où Rnr2 n'est pas étiqueté et qu'il y a des stress génotoxiques, Hug1 est fortement produit mais il ne séquestrerait qu'une partie des sous-unités Rnr2 car l'interaction entre Rnr2 et Rnr1 est optimale (Figure IV17.A). Il exerce donc probablement un rôle de modulateur négatif dans ces conditions mais cet effet n'est pas suffisamment fort pour aboutir à un phénotype de type hypersensibilité à l'hydroxyurée. Ce en quoi Hug1 ressemble aux autres régulateurs négatifs connus chez *S.cerevisiae* et *S.pombe*. En effet, la délétion (dans un contexte par ailleurs sauvage) de chacun de ces régulateurs négatifs (*SML1*, *DIF1* ou *SPD1*) ne permet pas d'améliorer la croissance en présence de HU. Par contre, dans un contexte où l'interaction entre Rnr2-Rnr4 et Rnr1 est défavorisée par la présence de l'étiquette en position carboxy-terminale dans Rnr2, l'interaction Rnr2-Hug1 est suffisamment significative pour peser sur le taux de complexe R2-R1, et ce d'autant plus que Hug1 s'accumule en présence d'hydroxyurée (Figure IV17.B). Par contre, l'absence de *HUG1* permet une disponibilité de la totalité du pool de Rnr2-Rnr4 pour une interaction avec Rnr1. La délétion de *HUG1* permet donc de lever l'inhibition de croissance observée en présence d'hydroxyurée dans les souches Rnr2 étiquetées en C-terminal (Figure IV17.C).

Ce qui nous amène à notre modèle présenté dans la Figure V1. En phase G1 il y a peu de RNR active compte tenu des multiples inhibitions : Crt1 inhibe la transcription des gènes *RNR2*, *RNR3* et *RNR4* (Huang et al., 1998; Zhou and Elledge, 1992), le peu de petite sous-



**Figure V 1 : Modèle de régulation de la RNR au cours du cycle cellulaire et en réponse aux dommages de l'ADN.**

En phase G1/G2 et en dehors des réponses aux dommages de l'ADN la petite sous-unité est importée au noyau par Dif1 et la grosse sous-unité est inhibé physiquement par Sml1. Ces deux inhibitions font diminuer le pool de RNR active. Au début de la phase S et en réponse aux dommages de l'ADN les protéines Dif1 et Sml1 sont dégradées levant l'inhibition de la petite et de la grosse sous-unité respectivement, Hug1 est produit en trop faible quantité pour pouvoir réprimer suffisamment de RNR. Par conséquent, le pool de RNR active augmente. A la fin de la phase S et en réponse aux dommages de l'ADN, Hug1 est produit en quantité suffisante pour pouvoir inhiber l'assemblage de la petite sous-unité et de la grosse sous-unité, il en résulte que le pool de RNR active diminue pour revenir à un niveau basal.

unité présente est importée vers le noyau par Dif1 (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008) et séquestrée par Wtm1 (Lee and Elledge, 2006). La grosse sous-unité voit sa transcription régulée par au moins Ixr1 (Mao and Brody, 2010; Tsaponina et al., 2011) et elle est inhibée par sa liaison à Sml1 (Chabes et al., 1999; Zhao et al., 2000). En début de phase S et au début des réponses aux dommages de l'ADN, Crt1, Dif1 et Sml1 sont dégradés levant les différentes inhibitions. Hug1 serait produit mais pas en une assez grande quantité pour pouvoir séquestrer toutes les petites sous-unités de la RNR. Il y aurait donc beaucoup de RNR active. A la fin de la phase S et des réponses aux dommages de l'ADN, Crt1, Dif1 et Sml1 sont toujours dégradés, il y a également beaucoup plus de Hug1 produit qui pourrait séquestrer beaucoup plus de petites sous-unités, exerçant ainsi un rôle négatif sur l'activité de la RNR.

Ce qui ressort de ce modèle, c'est que Hug1 est donc un régulateur négatif de la RNR au même titre que Dif1 et Sml1, mais alors que ces derniers sont réprimés en phase S et en réponse aux dommages de l'ADN, Hug1 lui est produit. D'où l'hypothèse que Hug1 interviendrait comme un rhéostat pour diminuer l'activité de la RNR.

Maintenant il nous reste à valider ce modèle. La première chose à vérifier serait de tester si Hug1 agit bien comme un compétiteur de Rnr1 pour la fixation à Rnr2. Pour cela nous pouvons effectuer des tests de compétition par GST-Pull down, mais également par microcalorimétrie.

### ***PARTIE 3 : De nouvelles perspectives dans la régulation des réponses aux dommages de l'ADN***

---

Ainsi nous avons mis au jour un nouveau régulateur de la RNR et par la même occasion un nouvel acteur de l'inactivation des voies de réponse aux dommages de l'ADN. La RNR est une cible des traitements anticancéreux. La compréhension de sa régulation peut être une aide au développement de nouveaux anticancéreux ciblant spécifiquement la RNR. Des peptides pourraient donc être développés sur la base d'inhibiteurs naturels de la RNR tels que Sml1 ou Hug1. Même si Hug1 n'a pour le moment pas été identifié chez les eucaryotes supérieurs, au même titre que Sml1, on peut supposer que comme c'est le cas pour Sml1 (Zhao et al., 2000), Hug1 pourrait être capable d'interagir avec la RNR humaine.

Hug1 pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la réparation de l'ADN ou le déroulement de la réplication par son interaction avec Dna2. Resterait donc à comprendre le rôle de cette interaction. Pour rappel l'interaction entre Hug1 et Dna2 est spécifique de Hug1 puisque Dif1 est incapable d'interagir avec Dna2. Ce qui suggère un rôle indépendant pour Hug1, qui pourrait permettre un couplage direct entre la réparation et la synthèse de l'ADN.

Il nous reste de nombreuses pistes à explorer quant à la régulation des réponses aux dommages de l'ADN, ne serait-ce que par les potentiels cibles de RAD53 identifiées lors des analyses transcriptomiques. On peut citer comme exemple la protéine Ypr015c aux fonctions inconnues, mais dont on sait que la surexpression active la réponse aux dommages



de l'ADN (Niu et al., 2008), mais également qu'il est activé par cette même voie (nos données transcriptomiques).



# *Matériels et Méthodes*



## Souches et plasmides

### 1. Manipulation de *Saccharomyces cerevisiae*

Les souches utilisées pour nos études sont présentées dans le tableau 1.

Souche	Génotype	Référence
BLT12	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Palpha-NATMX4-TRP1-TetO</i>	LeTallec et al.
BLT15	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::Palpha-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP</i>	LeTallec et al.
BLT18	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 trp1::(Palpha-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP)2</i>	LeTallec et al.
BY4741	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4741 dif1D	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dif1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4742	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4742 dif1D	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dif1::KANMX4</i>	EUROSCARF
JMY002	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HUG1-13Myc-KANMX6</i>	cette étude
JMY004	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HUG1-GFP-KANMX6</i>	cette étude
JMY010	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY011	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hug1::KANMX6 trp1::Palpha-NATMX4-TRP1-TetO-RAD53-GFP</i>	cette étude
JMY015	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY057	<i>Mata bar1::LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HUG1-13Myc-KANMX6</i>	cette étude
JMY058	<i>Mata bar1::LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HUG1-GFP-KANMX6</i>	cette étude
JMY059	<i>Mata bar1::LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	cette étude
JMY060	<i>Mata bar1::LEU2 his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY061	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-3HA-HISMX6</i>	cette étude
JMY078	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-FLAG-hphMX6</i>	cette étude
JMY080	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-3FLAG-hphMX6</i>	cette étude
JMY087.16b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dif1::KANMX4 hug1::hphMX6</i>	cette étude
JMY087.3b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dif1::KANMX4 hug1::hphMX6</i>	cette étude
JMY089	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-3FLAG-hphMX6 hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY090	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-3FLAG-hphMX6 dif1::KANMX6</i>	cette étude
JMY099.1b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 RNR2-3HA-HIS5+</i>	cette étude
JMY099.1d	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-3HA-HIS5+ hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY099.2a	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 RNR2-3HA-HIS5+ hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY099.2c	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 RNR2-3HA-HIS5+</i>	cette étude
JMY100.1b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-FLAG-hphMX6</i>	cette étude
JMY100.2b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-FLAG-hphMX6</i>	cette étude
JMY100.2d	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-FLAG-hphMX6 hug1::KANMX6</i>	cette étude
JMY100.3b	<i>Mat his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RNR2-6Gly-FLAG-hphMX6 hug1::KANMX6</i>	cette étude
MCM124	<i>MATa, can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 dun1Δ::HIS3</i>	Allen et al.
Y187	<i>Mata ade2-101 gal4Δ gal80Δ his3-200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 met- ura3::GAL1UAS-GAL1-lacZ</i>	Clontech
Y190	<i>Mata ade2-101 gal4Δ gal80Δ his3-200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 ura3::GAL1-LacZ lys2::GAL1-HIS3cyhR</i>	Clontech

Tableau 1 : Liste des souches *S. cerevisiae* utilisées pour cette étude

Les délétions de gènes ainsi que leur étiquetage au chromosome ont été réalisés suivant le protocole décrit par Longtine *et al.* (Longtine et al., 1998) à partir de la série de plasmide pFA6. Les changements de marqueur de sélection en un autre (marker swap) ont été réalisés à partir des plasmides pAG32 (Goldstein et al., 1999) digéré par NotI et pAG60 (Goldstein et al., 1999) digéré par NotI pour changer les marqueurs respectivement en HphMX6 et CaURA3. Pour la délétion du gène BAR1 nous utilisons le plasmide pbar1::LEU2 digéré par XbaI.

Pour transformer les levures avec ces cassettes ou avec un plasmide, les levures sontensemencées dans un milieu adéquat puis placées sous agitation à 30°C jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. 8 unités DO (uDO) sont prélevées et lavées avec 0,1M d'Acétate de Lithium (AcLi) et 1X de Tris-EDTA (TE) pH7,5. L'étape de transformation s'effectue dans un milieu contenant 0,1M d'AcLi, 1X de TE pH7,5 et 40% PEG, 100µg/mL d'ADN carrier et environ 1mg de plasmide ou de cassette de transformation. Selon que la transformation soit une simple introduction de plasmide dans la cellule ou une recombinaison homologue au locus, le temps d'incubation dans le milieu de transformation sera variable (de 30 minutes à 2h30 pour une recombinaison). Suite à la transformation les cellules subissent un choc thermique à 42°C en présence de 7% de DMSO. Puis les cellules sont centrifugées, resuspendues en YPD puis étalées sur milieu de sélection approprié.

## **2. Souches bactériennes**

---

Pour l'amplification des plasmides nous utilisons la souche bactérienne *E.coli* XL1 Blue électrocompétente. Pour l'extraction des plasmides doubles hybrides nous utilisons la souche *E.coli* 1066 électrocompétente. Enfin pour les productions protéiques, nous utilisons la souche *E.coli* BL21 (DE3) gold électrocompétente.

## **3. Plasmides**

---

Les plasmides utilisés pour ces études sont listés dans le tableau 2.

La mutagenèse dirigée de HUG1 a été effectuée comme décrit par Sambrook *et al.* (Sambrook et al., 2001). Le couple d'oligonucléotides HUG1-23f  
5'AAGACCGCGGCTTTATTCCCAAGGATCA3' et HUG1-24r

5'GAATAAAGCCGCGGTCTTGACACTCTTGTTGA3' ont été utilisés pour muter les acides aminés G37 et Y38 en alanine et permettent l'introduction d'un site de restriction SacII. Le couple d'amorces HUG1-25f 5'TGAGCAACGCTGTTAACAAAGAGTGCAAGA3' et HUG1-26r 5'TTAACAGCGTTGCTCATTGAGCACAAAG3' a été utilisé pour la mutation de l'acide aminé R29 en alanine et permet l'introduction d'un site de restriction HpaI.

Plasmide	Construction	Référence
pAct2	2 $\mu$ , Gal4_AD-HA, LEU2	Clontech
pAG32	HphMX6	Goldstein <i>et al.</i>
pFA6a-13Myc-KanMX6	pBR322, 13Myc, KanMX6	Watch <i>et al.</i>
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	pBR322, GFP(S65T), KanMX6	Watch <i>et al.</i>
pFA6a-KANMX6	pBR322, KanMX6	Watch <i>et al.</i>
pGBT9	2 $\mu$ , GAL4_DBD, TRP1	Clontech
pH6Rnr2, AmpR	PT7-HIS6-RNR2	Chabes <i>et al.</i>
pH6Rnr2, KanR	PT7-HIS6-RNR2	Chabes <i>et al.</i>
pJM01	RSF, PT7-HIS6-GST-TEV-HUG1	cette étude
pJM02	2 $\mu$ , PGAL1-HUG1, URA3	cette étude
pJM03	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1, TRP1	cette étude
pJM07	2 $\mu$ , HUG1, LEU2	cette étude
pRnr4	PT7-RNR4	Chabes <i>et al.</i>
2Hc5	2 $\mu$ , Gal4_AD-HA-DNA2(343-491), LEU2	cette étude
pJM13	2 $\mu$ , Gal4_AD-HA-RNR2, LEU2	cette étude
pJM15	2 $\mu$ , Gal4_AD-HA-RNR4, LEU2	cette étude
pJM16	RSF, PT7-HIS6-GST-TEV, PT7-DNA2343-491-Stag	cette étude
pJM19	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1NKS, TRP1	cette étude
pJM22	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1GY, TRP1	cette étude
pJM23	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1R29A, TRP1	cette étude
pJM24	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1Nter, TRP1	cette étude
pJM30	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1HugD, TRP1	cette étude
pJM31	2 $\mu$ , PADH1-Gal4_DBD-HUG1Cter, TRP1	cette étude
pJM32	RSF, PT7-HIS-GST-TEV-HUG1GY	cette étude
pJM35	2 $\mu$ , Gal4_DBD-HUG1DC, TRP1	cette étude
pJM36	2 $\mu$ , GAL4_AD-HA-RNR2DC9, LEU2	cette étude
pJM37	2 $\mu$ , GAL4_AD-HA-RNR2DC34, LEU2	cette étude
pRS425	2 $\mu$ , LEU2	
pYES2	2 $\mu$ , PGAL1, URA3	Invitrogen

Tableau 2 : Liste des plasmides utilisés pour cette étude

## Analyses phénotypiques

Les levures sont mises en culture dans un milieu adéquat jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 0,5. Puis une première dilution est effectuée afin d'avoir des cultures à une DO<sub>600nm</sub> d'environ 0,1. A partir de cette dilution, 3 à 4 dilutions successives au 1/5 sont réalisées. Selon le milieu utilisé, 3 à 12 $\mu$ L (dépendant de la tension de surface) de chacune des dilutions sont déposés sur boîte. Les boîtes sont ensuite placées à 30°C, et la croissance cellulaire est observée régulièrement.

## ***Extraction des acides nucléiques***

---

### **1. Extractions d'ADN**

---

#### **1.1. Extraction d'ADN plasmidique et génomique à partir de culture de levure**

Prélever 5mL de levures en phase stationnaire de croissance. Culotter et laver avec 1mL d'eau avant de transférer dans un microtube. Culotter à nouveau et ajouter le même volume de billes de verre au culot, de tampon A (triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1M Tris 10mM pH8, EDTA 10mM) et enfin de PCI (Phénol Chloroforme Isoamyl). Broyer 10 minutes (Vibrax) et ajouter du tampon TE. Séparer les deux phases par centrifugation. Prélever la phase aqueuse et transférer dans un microtube. Précipiter l'ADN en ajoutant de l'éthanol absolu glacé. Culotter et laver avec de l'éthanol 80%. Culotter et faire sécher l'ADN au speed-vacuum. Reprendre l'ADN dans du Tris 10mM pH8 + 20µg/mL de RNase A.

#### **1.2. Extraction d'ADN plasmidique à partir de cultures de E.Coli**

L'ADN plasmidique de bactérie est extrait et purifié suivant le protocole donné dans le kit Miniprep (QIAGEN ou Fermentas)

### **2. Extraction d'ARN à partir de cultures de levure**

---

Reprendre les cellules dans du tampon AE (NaAc 50mM pH 5,3, EDTA 10mM). Ajouter 0,5% de SDS, des billes de verre et du phénol pH5,3-8-hydroxyquinoline 0,1%. Broyer 10 minutes à 65°C (thermomixer Eppendorf), congeler dans un mélange d'éthanol et de carboglace et décongeler à 65°C. Séparer les phases par centrifugation et transférer la phase aqueuse dans un microtube. Ajouter du PCI et centrifuger. Prélever la phase aqueuse et y ajouter 0,2 volumes de LiCl 10mM et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Laisser l'ARN précipiter au moins 1 heure à -80°C. Centrifuger et laver le culot deux fois à l'éthanol 70%. Sécher l'ARN dans un speed-vacuum et resuspendre dans de l'eau « RNase-free ».



## ***Transcription inverse-PCR quantitative***

---

### ***1. Transcription inverse***

---

Pour la reverse transcription nous utilisons 1µg d'ARNs. Ces ARNs sont préalablement traités avec de la RQ1 (RNA-Qualified) DNase I (Promega). Les premières expériences de transcription inverse ont été réalisées comme indiqué dans le protocole de la SuperScript II RT d'Invitrogen à l'aide d'Hexanucléotides provenant de chez Roche. Par la suite nous avons utilisé le « First Strand cDNA synthesis kit for qPCR » de Fermentas pour nos transcriptions inverses.

### ***2. PCR quantitative***

---

Nous utilisons le SYBR Green PCR master mix 2X d'Eurogentec. A 1X de ce mix, nous ajoutons 300nm de chacun des oligonucléotides et 10µL d'ADNc généralement dilué au 1/100. La quantité d'ADNc utilisé peut varier selon les gènes étudiés et la qualité de la reverse transcription. C'est pourquoi une première qPCR de calibration est réalisée avec différentes dilutions d'ADNc afin de choisir la quantité optimale à utiliser pour nos études.

## ***Extractions protéiques dénaturantes à partir de culture de levure***

---

Faire pousser des levures jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Prélever et centrifuger 5uDO de cellules. Laver le culot avec du PBS1X. Centrifuger et reprendre les levures dans du TCA 20%. Ajouter des billes de verre. Broyer les cellules 15 minutes à 4°C puis transférer le surnageant dans un microtube. Laver les billes de verre avec du TCA 5% et transférer le surnageant dans le microtube précédent. Précipiter les protéines par centrifugation. Resuspendre les protéines en ajoutant du tampon de Laemmli à pH basique et 2% de β-Mercaptoéthanol. Chauffer 5 minutes à 95°C et centrifuger pour faire tomber les protéines insolubles.

## Western Blot

### 1. Gel Polyacrylamide

Préparer un gel de polyacrylamide de concentration adaptée à la taille de la protéine. Nous utilisons généralement des gels Tris-Glycine pour nos analyses (Sambrook et al., 2001), sauf dans le cas de l'étude de Hug1 sauvage où nous utilisons des gels précoulés Bis-Tris 12% (Invitrogen).

Placer les gels dans un tampon adéquat (Glycine pour les gels Tris-Glycine, MES (2-(N-morpholino)Ethane Sulfonic Acid) pour les gels Bis-Tris (Sambrook et al., 2001)). Faire migrer 1 heure à 200V pour les gels Tris-Glycine, 35 minutes à 200V pour les gels Bis-Tris.

### 2. Transfert sur membrane

Utilisation d'un système de transfert liquide. Superposer dans cet ordre : une éponge, trois papiers watman, une membrane de nitrocellulose, le gel, trois papiers watman et une éponge. Placer le tout dans un système de transfert tel que la membrane soit du côté du pôle positif de la cuve et le gel du côté du pôle négatif. Transférer 1h05 à 30V.

### 3. Révélation

Anticorps	dilution
9E10 (Anti-Myc) (CEA/SPI)	1/5000
Living Colors peptide A.V JL-8 (Anti-GFP) (Clontech)	1/1000
Sérum anti-hexokinase (don de M. Riva (CEA))	1/50000
Sérum anti-Hug1 (S5_1966)	1/10000
Anti-STag (Novagen)	1/5000
Anti-Flag M2 (SIGMA)	1/5000

**Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour nos études et leur dilution d'utilisation**

Contrôler le transfert en ajoutant du rouge Ponceau. Laver la membrane avec de l'eau milliQ. Bloquer la membrane avec une solution de blocage (PBS1X, 0,005% tween 20, lait (jour après jour de lactel) 20%). Mettre en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage (tableau 3). Incuber la nuit à 4°C ou trois heures à température ambiante.

Laver la membrane trois fois 5 minutes avec une solution de lavage (PBS1X, 0,005% tween 20). Mettre en présence de l'anticorps secondaire (anticorps anti-IgG couplé à la HRP) dilué au 1/5000 dans la solution de blocage. Incuber une heure à température ambiante. Laver la membrane trois fois 5 minutes avec la solution de lavage. Puis révélation à l'aide d'un kit ECL (selon la « force du signal » utilisation du kit ECL de Amersham ou Pierce, ou ECL plus de Amersham ou ECL Prime de Amersham). Utilisation d'une développeuse Agfa pour révéler les films ou d'un Gel Imager Fusion FX7 de Vilber Lourmat couplé au logiciel Fusion. Les quantifications sont effectuées à l'aide du logiciel quantity one (BioRad) ou Bio1D (Vilber Lourmat)

## **Double hybride**

---

### **1. Crible à grande échelle**

---

Le gène entier de HUG1 a été cloné en fusion au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-DBD) dans le plasmide pGBT9 et transformé ensuite dans la souche *S. cerevisiae* Y187. Les cellules sont mises en culture jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0,5-0,75. 40 unités DO sont prélevées et mélangées avec 20mL de  $4 \cdot 10^8$  levures *S. cerevisiae* Y190-FRYL (banque de fragments aléatoires d'ADN recouvrant l'ensemble du génome de *S. cerevisiae*). Les cellules sont récoltées par centrifugation et reprises dans 2mL de YPD avant d'être étalées sur boîte. La boîte est placée à 30°C durant 4h30. Les levures sont récupérées en lavant la surface de la boîte deux fois avec 3mL de YPD. Puis les levures sont étalées sur des boîtes de milieu SD2A + 3-AT 25mM. Les clones poussant sur le milieu sont restreints sur milieu sélectif (SD2A + 3-AT 25mM).

Un test de coloration à la  $\beta$ -galactosidase est en plus effectué avec ces clones dans le but d'éliminer les faux positifs. Mélanger dans l'ordre pour 1 boîte : 5mL d'agarose 1%, un

mélange de 0,2mL de XGal + 0,5mL de DMF (Diméthylformamide), 5 mL de tampon KPO (Sambrook et al., 2001), 0,1mL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10%.

## 2. Identification des clones

Les fragments d'ADN sélectionné sont amplifiés par PCR sur « colonie ». Prelever un clone, mettre au fond d'un tube à PCR, passer au micro-onde 2 minutes 30s à puissance maximale. Ajouter 1X de tampon de PCR (Invitrogen), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de chaque nucléotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2μM d'oligonucléotide ABS1 (GCGTTTGGAACTACTACAGG), 0,2μM d'oligonucléotide ABS2 (CACGATGCACAGTTGAAGTG), 2,5 unité de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), eau en quantité suffisante pour 50μL. Réaliser la PCR selon le programme suivant :

94°C :	4'	30 à 40 cycles
94°C :	30''	
55°C :	1'	
72°C :	3'	
72°C :	5'	

6μL de produits de PCR sont ensuite purifiés avec 10 unités d'ExoI ( ) et 1 unité de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). Incuber 30 minutes à 37°C puis inactiver 15 minutes à 80°C.

Puis réaliser la réaction de PCR linéaire en ajoutant 1μL de Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystem), 3,5μL de diluant (Applied Biosystem), 1μL d'oligonucléotide JCR90 à 2,5μM (CGATGATGAAGATACCCACCAAAA), eau en quantité suffisante pour 20μL. Réaliser la PCR selon le programme suivant :

95°C :	5'	30 cycles
95°C :	20''	
50°C :	30''	
60°C :	4'	
60°C :	5'	

Précipiter l'ADN avec un mélange de 55μL d'éthanol pré-refroidi et 6μL d'acétate d'ammonium. Centrifuger et éliminer le surnageant. Laver avec de l'éthanol 70% pré-refroidi. Centrifuger et éliminer le surnageant. Sécher le culot au speed-vacuum. Resuspendre le culot dans 10μL de HiDi (Applied Biosystem). Nous utilisons un séquenceur 3130x/Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Les séquences sont analysées à l'aide du logiciel Sequencher (Gene Code).

### **3. Extraction des « plasmides proies »**

---

L'ADN des levures est extrait comme décrit précédemment (paragraphe 1.1). 10µL d'ADN sont dialysés 1 heure sur une membrane 0,022µm. La totalité du volume de dialyse est introduit par électroporation dans la souche *E.coli* 1066. Les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif Drop Out –Leucine. Les plasmides des clones transformants sont extraits par selon le protocole décrit au paragraphe 1.2 et électroporés dans la souche *E.coli* XL1 Blue. Les bactéries sont étalées sur LB + Ampicilline. L'ADN plasmidique des bactéries transformantes est extrait par selon le protocole décrit au paragraphe 1.1 et séquencé.

### **4. Tests dirigés**

---

Les plasmides portant le domaine de liaison de Gal4 à l'ADN (Gal4-DBD) sont introduits dans la souche *S. cerevisiae* Y187 tandis que les plasmides contenant le domaine d'activation de Gal4 (Gal4-AD) sont introduits dans la souche *S. cerevisiae* Y190. Les souches Y190 et Y187 ainsi transformées sont croisées sur milieu YPD puis les diploïdes sont sélectionnés sur milieu –L-W. Les diploïdes sont ensemencés dans du milieu SD2A jusqu'à atteindre une DO de 0,5. A partir de ces cultures plusieurs dilutions sont réalisées et ces dernières sont ensuite déposées sur une gamme de milieu 3-AT.

## **Etudes du cycle cellulaire**

---

### **1. Synchronisation à l' $\alpha$ -factor**

---

Les levures doivent être de type sexuel Mat a et il est préférable d'utiliser des souches ayant été délétées pour *bar1* afin d'économiser l' $\alpha$ -factor (Futcher, 1999). Les cellules sont mises en culture jusqu'à atteindre une DO de 0,2. A ce moment, ajouter 1µg/mL (5µg/mL si les cellules ne sont pas *bar1*Δ) et attendre 2 heures. Observer au microscope visible. Quand 90% au moins des levures sont synchronisées en G1 (présence de shmoo<sup>5</sup>), laver deux fois

---

<sup>5</sup> Les shmoo sont une structure particulière des levures lorsqu'elles sont en phase de conjugaison. A ce stade elles ont une forme de poire, elles forment une longue excroissance en direction de la cellule de type sexuel opposé.

les cellules avec du YPD. Reprendre les cellules dans le même volume de YPD qu'avant lavage pour faire repartir les levures dans le cycle.

## **2. Synchronisation au nocodazole**

---

Le protocole est comparable à celui utilisé pour synchroniser en  $\alpha$ -factor sauf qu'il faut se placer dans un milieu supplémenté de 1% de DMSO (diluant du nocodazole). Pour synchroniser les levures en G2/M, il faut ajouter 15 $\mu$ g/mL de nocodazole.

## **3. Analyses par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)**

---

Prélever et centrifuger environ  $10^7$  cellules soit environ 1 uDO. Laver le culot avec du PBS1X. Fixer les cellules en les resuspendant dans de l'éthanol 70%. Réhydrater les cellules dans du PBS1X. Centrifuger et traiter les cellules avec 1mg/mL de RNase A. Laisser incubé au moins une heure à 37°C. Centrifuger et marquer les cellules avec 50 $\mu$ g/mL de Iodure de Propidium (PI) dilué dans du PBS1X. Incuber 15 minutes à température ambiante. Centrifuger puis resuspendre dans du PBS1X + 5 $\mu$ g/mL final de PI. Soniquer brièvement les levures afin d'éliminer les agrégats cellulaires. Les analyses de cycle cellulaire sont effectuées sur un cytomètre de flux FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson) couplé au logiciel CellQuest Pro (Becton Dickinson).

## **Immunofluorescence**

---

Prélever 5 à 6 uDO de cellules et les laver avec du PBS1X. Les cellules sont ensuite fixées dans du formaldéhyde 3,7% avant d'être lavées dans du tampon KP sorbitol (50mM KPO<sub>4</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2M Sorbitol). Les cellules sont alors resuspendues dans 1mL de tampon Kp sorbitol. Un volume de 50 $\mu$ L de suspension cellulaire sont ensuite digérées à 30°C avec 10% de  $\beta$ -Mercaptoéthanol et 4mg/mL de zymolyase. La formation des sphéroplastes est suivie au microscope puis la digestion est stoppée en plaçant les cellules dans la glace. Une première série de lavage est effectuée, consistant en un lavages avec du PBS + 0,4% fish gelatine (ci-après nommé PBS-gélatine), puis 2 lavages avec du PBS-gélatine + 0,1% Triton X-100 (ci-après nommé PBS-triton) et enfin de nouveau un lavage avec du PBS-gélatine. Les cellules sont mises en présence de l'anticorps primaire au moins 1 heure à température

ambiante. Puis une deuxième série de lavage identique à la première est effectuée. Les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore au moins une heure à l'obscurité. Une dernière série de lavages est effectuée comme précédemment, sauf qu'entre le deuxième lavage au PBS-triton, et le dernier lavage au PBS-gélatine, les cellules sont mises en présence de 0,5µg/mL de DAPI pendant une à 2 minutes à l'obscurité. Enfin les cellules marquées sont observées avec un microscope droit à fluorescence.

## ***Production et purification protéique***

---

### ***1. Hug1***

---

#### ***1.1. Production de Hug1 recombinante non marquée dans E. coli***

Hug1p est produit à partir du plasmide pJM01. Les bactéries sont mises en préculture dans du milieu LB supplémenté en Kanamycine avant d'être ensemencées dans du Magic Media (Invitrogen) + Kanamycine à 37°C sur la nuit.

#### ***1.2. Production de Hug1 recombinante marquée dans E. coli***

Pour la production de Hug1 marqué au <sup>15</sup>N, nous utilisons le même plasmide, mais la culture s'effectue dans un milieu minimum M9 (Sambrook et al., 2001) pour lequel la source d'azote a été remplacée par du <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl et auquel sont ajoutés 0,4% D-glucose, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1mM CaCl<sub>2</sub>, 1µg/mL de Biotine, 1µg/mL de Thiamine, de la Kanamycine à 50µg/mL et 1X d'oligoéléments pH7,2 (solution 100X : 13,4mM EDTA, 5mM FeCl<sub>3</sub>, 616µM ZnCl<sub>2</sub>, 76µM CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 42µM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 162µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). Pour les dernières productions nous avons utilisé du milieu ISOGRO (SIGMA).

Enfin pour la production de Hug1 marqué au <sup>13</sup>C <sup>15</sup>N nous utilisons du milieu ISOGRO (SIGMA).

Ensuite les cultures sont placées à 37°C jusqu'à atteindre une DO de 0,8-1 puis mises à 20°C le temps que la température soit homogène. Enfin l'expression est induite avec 1mM d'IPTG et se fait durant au moins 18 heures à 20°C.

#### ***1.3. Purification de Hug1***

Les cellules sont récoltées par centrifugation et reprises dans du tampon S complet pH8 (50mM Tris, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 5% glycérol, 1% Triton X-100, 10mM PMSF,

Aprotinine et 0,25 $\mu$ M DTT). Les cellules sont ensuite lysées avec 1,5mg/mL de lysozyme suivi de plusieurs cycles de sonications d'intensités allant de 25% à 55%. Le tout est centrifugé afin de séparer la fraction soluble de la fraction insoluble.

Une première étape de purification sur GST-agarose (SIGMA) est réalisée. La fraction soluble est incubée « en batch » pendant ½ heure avec la résine, puis coulé dans une colonne. Un premier lavage au tampon S complet est effectué, puis un second avec du Tris-HCl 50mM pH8. Enfin la résine est lavée une dernière fois avec du Tris-HCl 50mM pH8 avant de procéder à l'élution des protéines avec du Tris-HCl 50mM pH8 + GSH 10mM (SIGMA). Les protéines éluées sont dosées par spectrophotométrie à 280nm. L'éluât est ensuite traité la protéase TEV à hauteur de 1/100<sup>ème</sup> de la concentration en protéine totale pendant 3 heures à 30°C avant de passer à la deuxième étape de purification sur résine Ni-NTA-agarose (QIAGEN). De l'imidazole est ajouté à la solution protéique à hauteur de 10mM final. La résine est mise à incuber avec les protéines durant une heure à 4°C puis est coulée dans une colonne. Le « flow through » est collecté et dosé à l'aide de la méthode Bradford. A la fin de la purification sur Ni-NTA, il reste des protéines contaminantes. Pour éliminer ces dernières, nous effectuons une dernière étape de chromatographie échangeuse de cations (Ressource S de GE Healthcare). Tous d'abord l'échantillon à purifier est dialysé contre du MES 20mM pH5 + DTT 1mM (tampon A) à l'aide d'une membrane de 1000 MWCO,. Enfin les protéines sont éluées en plusieurs fractions suivant un gradient de NaCl sur un appareil äkta purifier (GE Healthcare). Un gradient de 50% de tampon A + NaCl 1M est effectué sur 20mL à un débit de 1mL/minute. La protéine Hug1 recombinante est éluée au début du gradient pour à une concentration d'environ 75mM en NaCl.

Chaque étape est contrôlée sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel) puis coloré à l'aide de Protein Safe Blue (Invitrogen).

## **2. Rnr2 et Rnr2-Rnr4**

---

### **2.1. Production de Rnr2 ou Rnr2-Rnr4 dans E. coli**

Rnr2 et Rnr4 sont produits respectivement à partir des plasmides pHis<sub>6</sub>Rnr2,Kan<sup>R</sup> et pRNR4,Amp<sup>R</sup> (don de Chabes et al. (Chabes et al., 2000)). Rnr2 et Rnr4 sont coexprimés dans la même bactérie afin de favoriser la solubilisation de Rnr2. La culture se fait dans du



milieu LB supplémenté en antibiotiques. Une première préculture dans 50mL de milieu est effectuée, puis utilisée pour ensemer 800mL de milieu afin d'avoir une DO initiale à 600nm d'environ 0,05. Les cultures sont placées sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 0,8-1. Les cultures sont alors transférées à 20°C. Quand la température de la culture est homogène, 1mM d'IPTG est ajouté pour induire l'expression protéique. L'induction se fait sur la nuit à 20°C sous agitation.

Les cellules sont récoltées et lysées comme décrit précédemment à l'exception que le tampon S ne contient pas d'EDTA (paragraphe 1.3)

### 2.2. Purification de Rnr2

Les cellules sont lysées comme indiqué précédemment (paragraphe 1.3) puis une unique purification sur résine NiNTA-agarose est réalisée. Les protéines sont resuspendues dans du tampon S sans EDTA + 10mM d'Imidazole puis mises à incuber avec la résine 1 heure à 4°C. La résine est alors coulée dans une colonne puis lavée une fois avec du Tris-HCl 50mM pH8 + Imidazole 10mM. Puis les protéines sont éluées avec une solution de Tris-HCl 50mM pH8 + Imidazole 300mM. L'imidazole est éliminé par dialyse contre du tampon Tris-HCl 50mM pH8 à l'aide d'une membrane 6-8000 MWCO. Ensuite l'éluât est passé sur une colonne échangeuse d'anions (ResQ de GE Healthcare) où les protéines sont éluées suivant un gradient de NaCl sur un appareil äkta purifier (GE Helthcare). Un gradient de 50% de Tris-HCl 50mM pH8 + NaCl 1M est effectué sur 20mL à un débit de 1mL/minute.

### 2.3. Purification de Rnr2-Rnr4

Les cellules sont lysées comme indiqué précédemment puis une unique purification sur résine NiNTA-agarose est réalisée. Les protéines sont incubées avec la résine et 10mM d'imidazole durant une heure avant d'être coulées dans une colonne. La résine est lavée une avec du Tris-HCl 50mM pH8 + NaCl 150mM + Imidazole 10mM, puis du Tris-HCl 50mM pH8 + NaCl 1M + Imidazole 10mM et pour finir avec du Tris-HCl 50mM pH8 + NaCl 150mM + Imidazole 30mM. Les protéines sont ensuite éluées avec une solution de Tris-HCl 50mM pH8 + Imidazole 300mM. L'imidazole est éliminé par dialyse contre du tampon Tris-HCl 50mM pH8 à l'aide d'une membrane 6-8000 MWCO. Ensuite l'éluât est passé sur une colonne échangeuse d'anions (ResQ de GE Healthcare) où les protéines sont éluées suivant un

gradient de NaCl sur un appareil äkta purifier (GE Helthcare). Un gradient de 50% de Tris-HCl 50mM pH8 + NaCl 1M est effectué sur 20mL à un débit de 1mL/minute.

## ***Production d'anticorps polyclonaux***

---

Les anticorps polyclonaux sont produits chez des lapins blancs de Bouscat. Pour immuniser un lapin préparer une solution contenant 150µg d'antigènes (ici Hug1 recombinant produit selon le protocole décrit au 1.3) resuspendus dans 500µL d'eau auxquels sont ajoutés 500µL de Freund's Complete (SIGMA). Mélanger à la seringue afin d'obtenir une émulsion. Injecter au lapin. Une semaine plus tard, récupérer le sang du lapin (environ 50mL pour les saignées intermédiaires et 100mL pour la saignée finale), laisser la nuit à 4°C. Transférer dans un tube 15mL et centrifuger 15 minutes à 4000 rpm. Aliquoter par 1ml et conserver le sérum à -20°C. Le cycle est à répéter toutes les 6 semaines, six fois.

## ***Analyses biophysiques de Hug1***

---

### ***1. Dichroïsme circulaire***

---

Les protéines Hug1p recombinantes purifiées sont dialysées contre de l'eau en utilisant une membrane d'un MWCO de 1000. La concentration en protéines dialysées est estimée par dosage Bradford. 500µL à 4µM sont utilisés pour les mesures dans les cuves de 2mm, et 300µL à 10µM sont utilisés pour les mesures dans les cuves de 1mm. Les mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre JASCO J-815. Les données sont acquises via le logiciel Spectra Manager. Les mesures de spectre se font entre 260nm et 190nm avec un pas de 0,1nm à une vitesse de 50nm/min et une fenêtre de lecture de 4nm. Pour les mesures du blanc, nous faisons des accumulations de 3 spectres alors que pour les spectres protéiques nous accumulons 10 spectres. Les valeurs de Haute tension (HT) supérieures à 500V sont éliminées de l'analyse car le rapport signal sur bruit de fond est trop faible. Les données obtenues sont ensuite analysées sur le serveur DICHROWEB (Whitmore and Wallace, 2004). Pour l'estimation du contenu en structure secondaire, plusieurs déconvolution avec différents algorithmes ; SELCON3 (Lees et al., 2006; Sreerama et al., 1999; Sreerama and Woody, 1993), CONTIN (Lees et al., 2006; Provencher and Glöckner, 1981; van Stokkum et

al., 1990) et CDSSTR (Compton and Johnson, 1986; Lees et al., 2006; Manavalan and Johnson, 1987; Sreerama and Woody, 2000), sont effectuées et comparées.

## ***2. Analyse par filtration sur gel***

---

Les protéines Hug1p purifiées sont dialysées contre du tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM pH7 + NaCl 150mM à l'aide d'une membrane de MWCO de 1000. La concentration en protéines dialysées est estimée par dosage Bradford. 140 $\mu\text{g}$  à 180 $\mu\text{g}$  de protéines (environ 200 $\mu\text{L}$ ) sont injectés dans une colonne de gel filtration (Superdex 75 10/300 GE Healthcare) montée sur un système äkta purifier.

## ***3. Résonance Magnétique Nucléaire***

---

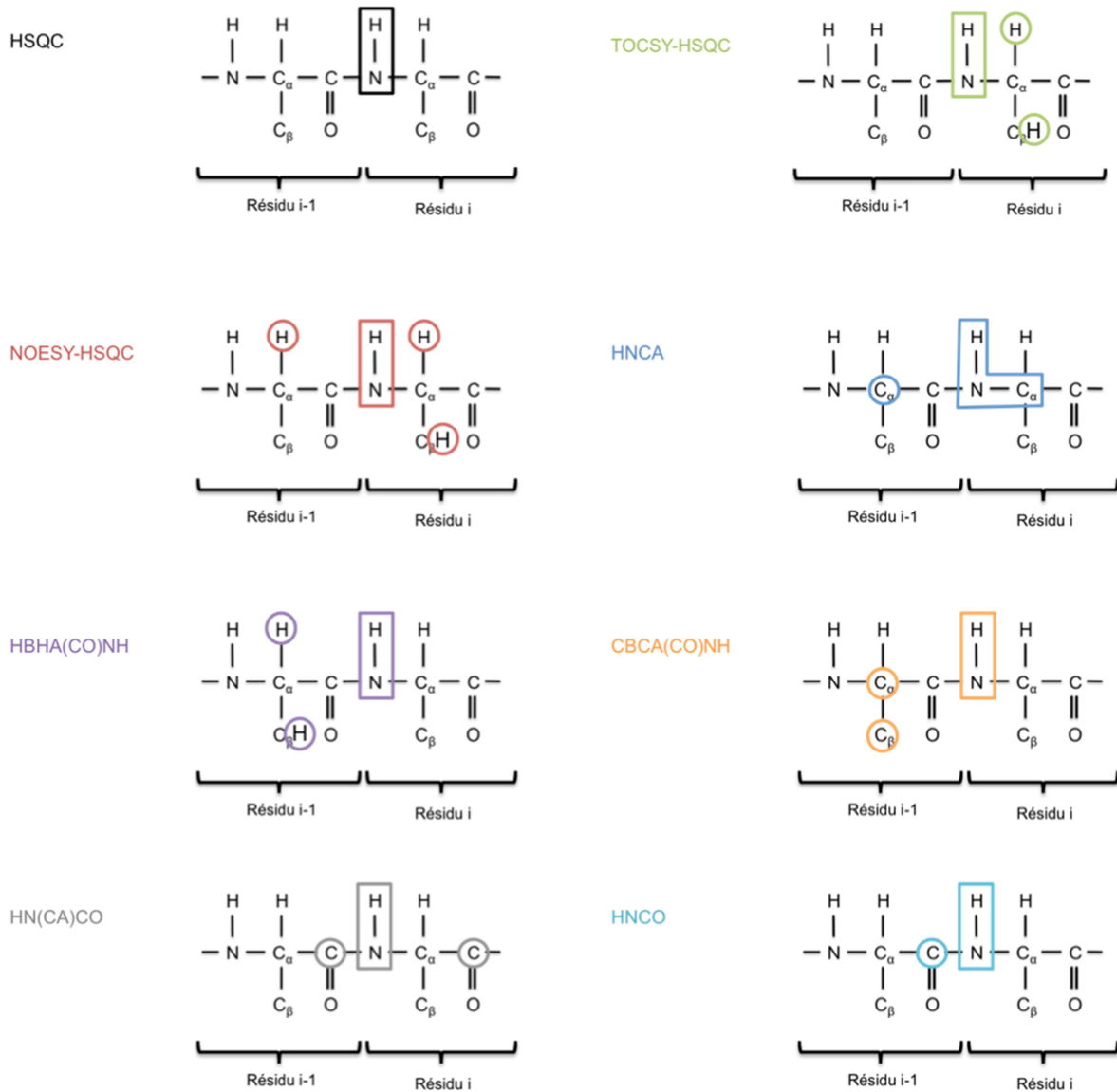
### *3.1. Acquisition des spectres*

Pour la RMN, il faut un volume de 500 $\mu\text{L}$  à au moins 10 $\mu\text{M}$  de protéines. Ajouter à l'échantillon ; 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , 1 $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  10%, 1 $\mu\text{L}$  d'EDTA 1mM et 1 $\mu\text{L}$  de DSS 0,1M. Des spectres à une dimension puis des spectres HSQC à deux dimensions sont effectués à l'aide d'un spectromètre RMN 700MHz couplé au logiciel Topspin. Pour les spectres en trois dimensions, ils sont effectués sur un spectromètre 600MHz. Les spectres sont ensuite analysés avec le logiciel Sparky.

### *3.2. Attribution des pics*

500 $\mu\text{L}$  de Hug1 à 67,3 $\mu\text{M}$  marqué au  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  dans un tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20mM + NaCl 50mM pH5 sont placés dans un tube RMN avec 25 $\mu\text{L}$  d'inhibiteurs de protéase Compete (Roche), 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , 1 $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  10%, 1 $\mu\text{L}$  d'EDTA 1mM et 1 $\mu\text{L}$  de DSS 0,1M. Le tout est placé à 10°C. Des spectres à 1 dimension, des HSQC et divers spectres à trois dimensions (HNCA, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH, NOESY-HSQC, DIPSI-HSQC (c'est un spectre TOCSY), HN(CA)CO) sont réalisés à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker 600MHz couplé au logiciel Topspin. Les spectres sont ensuite analysés avec le logiciel Sparky. Une attribution séquentielle est réalisée. Elle consiste à enregistrer des spectres permettant de visualiser des interactions entre deux ou trois types de noyaux. L'expérience de NOESY-HSQC connecte tous les protons proches dans l'espace d'un groupe  $\text{H}^{\text{N}}_i$ - $^{15}\text{N}_i$  à celui-ci (Figure 1). L'expérience TOCSY-HSQC connecte les fréquences des protons de la chaîne latérale d'un résidu  $i$  à son

amide (Figure 1). L'expérience HBHA(CO)NH relie les protons  $\alpha$  et  $\beta$  d'un résidu i-1 à l'amide du résidu i (Figure 1). Les autres expériences permettent d'associer les fréquences des carbones et celle des amides (Figure 1).

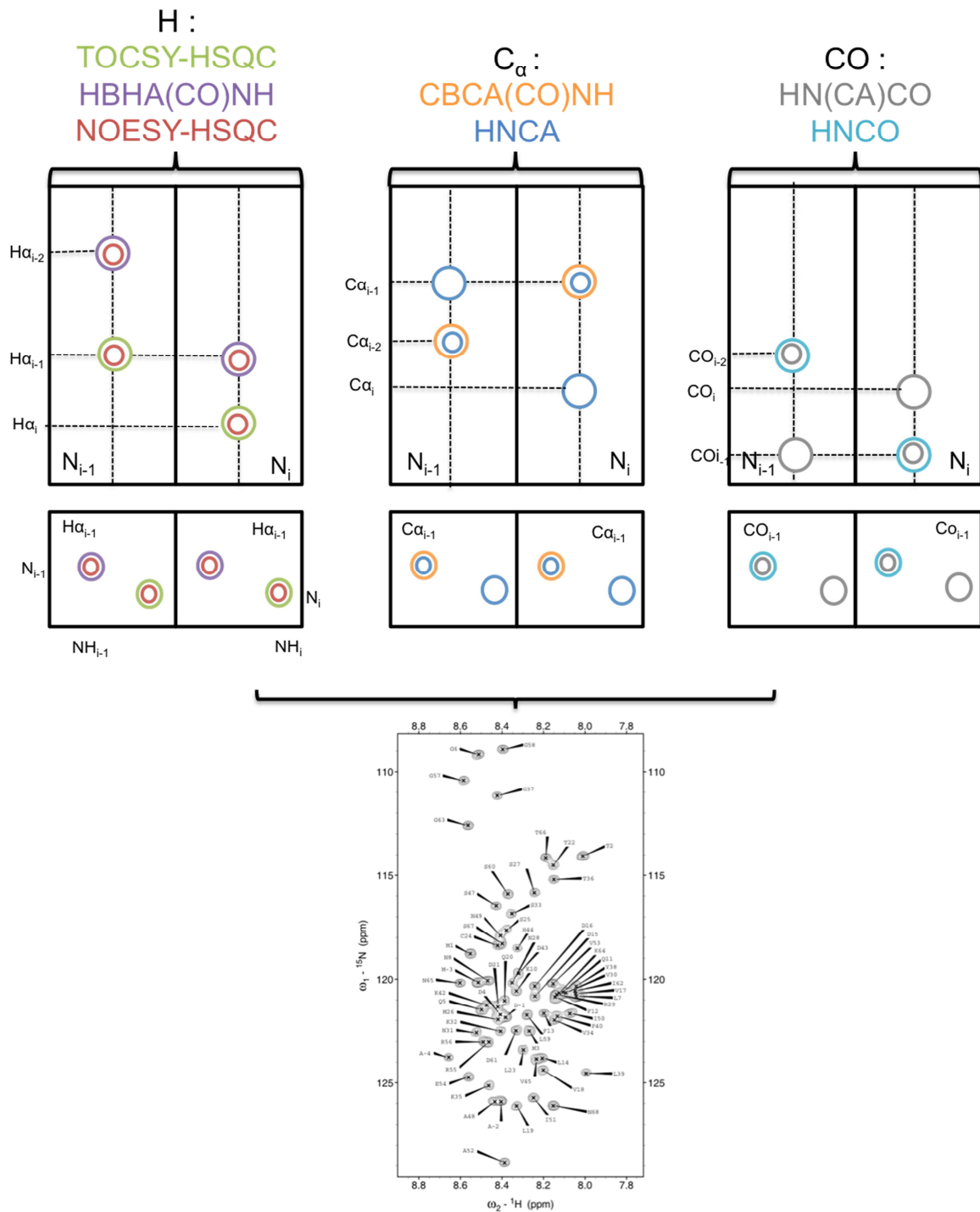


**Figure 1 : Représentation schématique des corrélations observées pour chacune des expériences utilisées pour l'attribution séquentielle.**

Les noyaux corrélés sont encadrés ou encerclés.

Pour l'attribution séquentielle réaliser trois superpositions de spectres distinctes et placez-les comme indiqué sur la figure 2. Pour chaque résidu ( $N_i$ ) identifier le  $C_{\alpha}$ , le CO et le  $H_{\alpha}$  (en fonction de la valeur des déplacements chimiques). Sur la verticale repérer le résidu  $N_{i-1}$  sur le plan  $^{15}N_i$ , puis le repérer sur l'horizontale sur le plan  $^{15}N_{i-1}$ . Une fois les résidus  $N_i$  et  $N_{i-1}$

identifiés, les repérer sur les plan HSQC correspondants. Puis attribuer sur le spectre  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC.



### 3.3. Calcul des indices de déplacement chimique

Récupérer les valeurs de résonance ( $\delta$ ) pour les H $\alpha$ , C $\alpha$ , C $\beta$  et CO. Pour le calcul se baser sur les valeurs du « Random Coil » (RC) publié par Wright (Merutka et al., 1995). Apporter la correction des RC selon les descriptions de Wright (Schwarzinger et al., 2001) qui prennent en considération l'influence d'un résidu sur les résidus au voisinage direct de celui-ci.

$$CSI = \delta_{mesuré} - \delta_{RC\ corrigé}$$

## **Etudes de l'interaction Hug1-RNR**

---

### **1. GST pull-down**

---

#### 1.1. Cooexpressison de Hug1 et Rnr2

H<sub>6</sub>GST-Hug1 et H<sub>6</sub>-RNR2 sont co-transformés dans la même bactérie et mis en culture dans du magic media à 20°C. Les bactéries sont lysées dans un tampon de lyse ; Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 300mM, Tween 0,05% dans lequel est ajouté un cocktail d'anti-protéases. La lyse s'effectue en présence de 1mg/mL de lysozyme. L'extrait soluble est récupéré par centrifugation puis déposé sur une résine GST-agarose préalablement équilibrée dans du tampon de lyse. L'hybridation sur la résine se fait la nuit à 4°C. Puis la résine est déposée dans des eppendorf Spin-X (Unicorn) et centrifugée pour récupérer le flow trough. Un premier lavage en Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 300mM est réalisé, suivi d'un second lavage avec du Tris-HCl 50mM pH8. Puis les protéines sont éluées avec une solution de Tris-HCl 50mM pH8 + GSH 20mM.

#### 1.2. Co-lyse de Hug1 et Rnr2 ou Rnr2-Rnr4

His6-GST-Hug1, His6-Rnr2 sont exprimés dans des bactéries différentes, alors que His6-Rnr2 et Rnr4 sont exprimés dans la même bactérie. Les bactéries transformées avec His6-GST-Hug1 sont cultivées à 37°C dans du magic media, alors que les autres sont cultivées à 20°C dans du magic media. Les cultures sont ensuite mélangées comme souhaité volume à volume. Puis la lyse et le pull down se déroulent comme décrit précédemment.

---

## ***2. Analyse par résonance plasmonique de surface (BIAcore®)***

---

On utilise un appareil de type Biacore 3000 (Biacore).

### ***2.1. Avec immobilisation d'anticorps anti-GST***

Fonctionnaliser la puce senseur (« sensorchip ») en injectant deux fois 35µL d'un mélange équimolaire de NHS : EDC (Biacore) pour activer la surface de la puce. Immobilisation de l'anticorps anti-GST (GST Capture kit Biacore). Préparer une solution d'anticorps à 50µg/mL dans du tampon acétate à pH5. Injecter 35µL, environ 10 000 RU d'anticorps doivent se fixer à la puce. Saturer la sensorchip en injectant 35µL d'éthanolamine. Injecter 120µL de protéine fusionnée à la GST à 5µg/mL, puis injecter le partenaire potentiel (100µL). Régénérer la sensorchip en injectant 40µL de solution de régénération (Biacore)

### ***2.2. Avec immobilisation de Rnr2-Rnr4***

Fonctionnaliser la « sensorchip » en injectant deux fois 35µL d'un mélange équimolaire de NHS : EDC (Biacore) pour activer la surface de la puce. Immobiliser le complexe Rnr2-Rnr4 à 50µg/mL en injectant 35µL. Saturer la sensorchip en injectant 35µL d'éthanolamine. Puis injecter 120µL du partenaire potentiel. Régénérer la sensorchip en injectant 40µL de solution de régénération (Biacore).

---

## ***3. RMN : titration par Rnr2-Rnr4***

---

500µL de Hug1 à 50µM marqué au <sup>15</sup>N dans un tampon Tris D11 10 mM pH7,5 sont placés dans un tube RMN avec 25µL d'inhibiteur de protéase Compete (Roche), 50µL de D<sub>2</sub>O, 1µL de NaN<sub>3</sub> 10%, 1µL d'EDTA 1mM et 1µL de DSS 0,1M. Le tout est placé à 20°C. Puis Rnr2-Rnr4 à une concentration de 145µM est ajouté successivement à raison de 24µL par ajout. Des spectres à 1 dimension et des spectres HSQC à deux dimension sont réalisés à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker 700MHz couplé au logiciel Topspin. Les spectres sont ensuite analysés avec le logiciel Sparky. L'intensité des pics est mesurée afin de tracer la courbe d'intensité relative des pics en fonction de la concentration en Rnr2-Rnr4.





# *Références*



- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., and Vanoni, M. (2012). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnology Advances* 30, 52-72.
- Andreassen, P., Ho, G., and D'Andrea, A. (2006). DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis* 27, 883-892.
- Andreson, B.L., Gupta, A., Georgieva, B.P., and Rothstein, R. (2010). The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research* 38, 6490-6501.
- Aucher, W., Becker, E., Ma, E., Miron, S., Martel, A., Ochsenbein, F., Marsolier-Kergoat, M.-C., and Guérois, R. (2010). A strategy for interaction site prediction between phospho-binding modules and their partners identified from proteomic data. *Molecular & cellular proteomics* 9, 2745-2759.
- Bae, S., Choi, E., Lee, K., Park, J., Lee, S., and Seo, Y. (1998). Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* possesses a single-stranded DNA-specific endonuclease activity that is able to act on double-stranded DNA in the presence of ATP. *The Journal of biological chemistry* 273, 26880-26890.
- Bae, S., and Seo, Y. (2000). Characterization of the enzymatic properties of the yeast Dna2 helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *The Journal of biological chemistry* 275, 38022-38031.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26, 7773-7779.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
- Basrai, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., and Hieter, P. (1999). NORF5/HUG1 is a component of the MEC1-mediated checkpoint response to DNA damage and replication arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7041-7049.
- Batista, L.F.Z., Kaina, B., Meneghini, R., and Menck, C.F.M. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 681, 197-208.
- Bebenek, K., Roberts, J., and Kunkel, T. (1992). The Effects of Dntp Pool Imbalances on Frameshift Fidelity During Dna-Replication. *Journal of Biological Chemistry* 267, 3589-3596.
- Benton, M.G., Glasser, N.R., and Palecek, S.P. (2007). The utilization of a *Saccharomyces cerevisiae* HUG1P-GFP promoter-reporter construct for the selective detection of DNA damage. *Mutat Res* 633, 21-34.
- Benton, M.G., Somasundaram, S., Glasner, J.D., and Palecek, S.P. (2006). Analyzing the dose-dependence of the *Saccharomyces cerevisiae* global transcriptional response to methyl methanesulfonate and ionizing radiation. *BMC Genomics* 7, 305.
- Bitomsky, N., and Hofmann, T.G. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *The FEBS journal* 276, 6074-6083.
- Bjorklund, S., Skogman, E., and Thelander, L. (1992). An S-phase specific release from a transcriptional block regulates the expression of mouse ribonucleotide reductase R2 subunit. *The EMBO journal* 11, 4953-4959.

- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 149-160.
- Borgne, A., and Nurse, P. (2000). The Spd1p S phase inhibitor can activate the DNA replication checkpoint pathway in fission yeast. *Journal of cell science* 113 Pt 23, 4341-4350.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2009). The checkpoint response to replication stress. *DNA repair* 8, 1038-1046.
- Buchan, D.W.A., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C.O., Bryson, K., and Jones, D.T. (2010). Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Research* 38, W563-568.
- Budd, M., and Campbell, J. (1997). A yeast replicative helicase, Dna2 helicase, interacts with yeast FEN-1 nuclease in carrying out its essential function. *Molecular and Cellular Biology* 17, 2136-2142.
- Budd, M., Choe, W., and Campbell, J. (1995). Dna2 Encodes a Dna Helicase Essential for Replication of Eukaryotic Chromosomes. *The Journal of biological chemistry* 270, 26766-26769.
- Budd, M.E. (2000). The Nuclease Activity of the Yeast Dna2 Protein, Which Is Related to the RecB-like Nucleases, Is Essential in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16518-16529.
- Budd, M.E., Antoshechkin, I.A., Reis, C., Wold, B.J., and Campbell, J.L. (2011). Inviability of a DNA2 deletion mutant is due to the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle* 10, 1690-1698.
- Budd, M.E., and Campbell, J.L. (1995). A yeast gene required for DNA replication encodes a protein with homology to DNA helicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7642.
- Budd, M.E., and Campbell, J.L. (2000). The pattern of sensitivity of yeast dna2 mutants to DNA damaging agents suggests a role in DSB and postreplication repair pathways. *Mutation research* 459, 173-186.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 276, 42462-42467.
- Camier, S., Ma, E., Leroy, C., Pruvost, A., Toledano, M., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2007). Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radical Biology and Medicine* 42, 1008-1016.
- Canet, D., ed. (1991). *La RMN*, Inter Edition edn.
- Chabes, A., Domkin, V., Larsson, G., Liu, A., Graslund, A., Wijmenga, S., and Thelander, L. (2000). Yeast ribonucleotide reductase has a heterodimeric iron-radical-containing subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2474-2479.
- Chabes, A., Domkin, V., and Thelander, L. (1999). Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 274, 36679-36683.
- 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.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 275, 17747-17753.

- Chabouté, M., Clément, B., Sekine, M., Philipps, G., and Chaubet-Gigot, N. (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* *12*, 1987-1999.
- Chabouté, M.E., Combettes, B., Clément, B., Gigot, C., and Philipps, G. (1998). Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Molecular Biology* *38*, 797-806.
- Chen, X., Niu, H., Chung, W.-H., Zhu, Z., Papusha, A., Shim, E.Y., Lee, S.E., Sung, P., and Ira, G. (2011). Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nature structural & molecular biology* *18*, 1015-1019.
- Cheng, J., Randall, A.Z., Sweredoski, M.J., and Baldi, P. (2005a). SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research* *33*, W72-76.
- Cheng, J., Sweredoski, M., and Baldi, P. (2005b). Accurate prediction of protein disordered regions by mining protein structure data. *Data Mining and Knowledge Discovery* *11*, 213-222.
- Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular cell* *40*, 179-204.
- Clemenson, C., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: Adaptation and recovery. *DNA repair* *8*, 1101-1109.
- Coeytaux, K., and Poupon, A. (2005). Prediction of unfolded segments in a protein sequence based on amino acid composition. *Bioinformatics* *21*, 1891-1900.
- Cole, C., Barber, J.D., and Barton, G.J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* *36*, W197-201.
- Compton, L.A., and Johnson, W.C. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry* *155*, 155-167.
- Cotruvo, J.A., and Stubbe, J. (2011). Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annual Review of Biochemistry* *80*, 733-767.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S.a.i., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., *et al.* (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nature cell biology* *4*, 11-19.
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology* *278*, 274-288.
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics* *122*, 565-581.
- Danielsson, J., Liljedahl, L., Bány-Wallje, E., Sønnderby, P., Kristensen, L.H., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., Wright, P.E., Poulsen, F.M., Måler, L., *et al.* (2008). The intrinsically disordered RNR inhibitor Sml1 is a dynamic dimer. *Biochemistry* *47*, 13428-13437.
- Dart, D.A., Adams, K.E., Akerman, I., and Lakin, N.D. (2004). Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. *The Journal of biological chemistry* *279*, 16433-16440.
- Darzynkiewicz, Z., Gong, J.P., Juan, G., Ardelt, B., and Traganos, F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* *25*, 1-13.

- Davidson, M.B., and Brown, G.W. (2009). Dissecting the DNA damage response using functional genomics approaches in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 8, 1110-1117.
- Despons, L., Wirth, B., Louis, V.L., Potier, S., and Souciet, J.-L. (2006). An evolutionary scenario for one of the largest yeast gene families. *Trends Genet* 22, 10-15.
- Dickson, R.C., Sumanasekera, C., and Lester, R.L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in lipid research* 45, 447-465.
- Dohrmann, P.R., Oshiro, G., Tecklenburg, M., and Sclafani, R.A. (1999). RAD53 regulates DBF4 independently of checkpoint function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 965-977.
- Donaldson, A., Fangman, W., and Brewer, B. (1998). Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins. *Genes & Development* 12, 491-501.
- Doree, M. (2001). For medicine to Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, Paul M. Nurse - Key regulators of the cell cycle - Cell cycle awarded. *M S-Medecine Sciences* 17, 1226-1229.
- Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21, 3433-3434.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-1004.
- Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447, 951-958.
- Duncker, B., Shimada, K., Tsai-Pflugfelder, M., Pasero, P., and Gasser, S. (2002). An N-terminal domain of Dbf4p mediates interaction with both origin recognition complex (ORC) and Rad53p and can deregulate late origin firing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16087-16092.
- Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., *et al.* (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19, 26-59.
- Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N., and Sussman, J.L. (2008). Function and structure of inherently disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 756-764.
- Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A.R., and Jackson, S.P. (1999). The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Molecular cell* 4, 387-394.
- Dyavaiah, M., Rooney, J.P., Chittur, S.V., Lin, Q., and Begley, T.J. (2011). Autophagy-dependent regulation of the DNA damage response protein ribonucleotide reductase 1. *Molecular Cancer Research* 9, 462-475.
- Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197-208.
- Eklund, H., Uhlin, U., Färnegårdh, M., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2001). Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 77, 177-268.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1989). DNA damage induction of ribonucleotide reductase. *Mol Cell Biol* 9, 4932-4940.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* 4, 740-751.

- Ellison, V., and Stillman, B. (2003). Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS biology* 1, E33-243.
- Emili, A., Schieltz, D., Yates, J., and Hartwell, L. (2001). Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Molecular cell* 7, 13-20.
- Engström, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L., and Tribukait, B. (1985). Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *The Journal of biological chemistry* 260, 9114-9116.
- Eriksson, S., Graslund, A., Skog, S., Thelander, L., and Tribukait, B. (1984). Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 259, 11695-11700.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Finn, K., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2011). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci*.
- Fiorani, S., Mimun, G., Caleca, L., Piccini, D., and Pellicoli, A. (2008). Characterization of the activation domain of the Rad53 checkpoint kinase. *Cell Cycle* 7, 493-499.
- Fiorentino, D.F., and Crabtree, G.R. (1997). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dna2 mutants suggests a role for the helicase late in S phase. *Molecular biology of the cell* 8, 2519-2537.
- Fishbein, W.N., and Carbone, P.P. (1963). Hydroxyurea : Mechanism of Action. *Science* 142, 1069-1070.
- Follmann, H. (2004). Deoxyribonucleotides: the unusual chemistry and biochemistry of DNA precursors. *Chemical Society reviews* 33, 225-233.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T., eds. (2006). *DNA repair and mutagenesis*, 2nd edition, ASM Press edn (Washington).
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature genetics* 16, 277-282.
- Fu, Y., Pastushok, L., and Xiao, W. (2008). DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 32, 908-926.
- Fujimura, H. (1990). Identification and characterization of a mutation affecting the division arrest signaling of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124, 275-282.
- Futcher, B. (1999). Cell cycle synchronization. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* 21, 79-86.
- Garbuzynskiy, S., Lobanov, M., and Galzitskaya, O. (2004). To be folded or to be unfolded? *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13, 2871-2877.
- Gasch, A.P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S.J., and Brown, P.O. (2001). Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* 12, 2987-3003.
- Gilbert, C., Green, C., and Lowndes, N. (2001). Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Molecular cell* 8, 129-136.
- Goldstein, A.L., Pan, X., and McCusker, J.H. (1999). Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 507-511.

- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 19311-19316.
- Graslund, A., and Ehrenberg, A. (2007). Tyrosyl radical, diiron center and enzyme mechanism in ribonucleotide reductase. *Applied Magnetic Resonance* *31*, 447-455.
- Greenwell, P., Kronmal, S., Porter, S., Gassenhuber, J., Obermaier, B., and Petes, T. (1995). Tel1, a Gene Involved in Controlling Telomere Length in *Saccharomyces-Cerevisiae*, Is Homologous to the Human Ataxia-Telangiectasia Gene. *Cell* *82*, 823-829.
- Gsponer, J., and Babu, M.M. (2009). The rules of disorder or why disorder rules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *99*, 94-103.
- Guittet, O., Tebbi, A., Cottet, M.-H., Vesin, F., and Lepoivre, M. (2008). Upregulation of the p53R2 ribonucleotide reductase subunit by nitric oxide. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* *19*, 84-94.
- Gupta, V., Peterson, C.B., Dice, L.T., Uchiki, T., Racca, J., Guo, J.-t., Xu, Y., Hettich, R., Zhao, X., Rothstein, R., *et al.* (2004). Sml1p is a dimer in solution: characterization of denaturation and renaturation of recombinant Sml1p. *Biochemistry* *43*, 8568-8578.
- Haince, J.-F., Kozlov, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Hendzel, M.J., Lavin, M.F., and Poirier, G.G. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry* *282*, 16441-16453.
- Håkansson, P., Dahl, L., Chilkova, O., Domkin, V., and Thelander, L. (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* replication inhibitor Spd1 regulates ribonucleotide reductase activity and dNTPs by binding to the large Cdc22 subunit. *J Biol Chem* *281*, 1778-1783.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* *28*, 739-745.
- Hartwell, L. (1991). 25 Years of Cell-Cycle Genetics. *Genetics* *129*, 975-980.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* *246*, 629-634.
- Heideker, J., Lis, E.T., and Romesberg, F.E. (2007). Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle* *6*, 3058-3064.
- Heinemann, V., Xu, Y., Chubb, S., Sen, A., Hertel, L., Grindey, G., and Plunkett, W. (1990). Inhibition of Ribonucleotide Reduction in Ccrf-Cem Cells by 2',2'-Difluorodeoxycytidine. *Molecular Pharmacology* *38*, 567-572.
- Hershey, A.D., and Chase, M. (1952). Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology* *36*, 39-56.
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T., and Sjöberg, B.-M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *47*, 50-63.
- Hofer, A., Ekanem, J.T., and Thelander, L. (1998). Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase studied in vitro and in vivo. *J Biol Chem* *273*, 34098-34104.
- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M.L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nature cell biology* *4*, 1-10.



- Hollingsworth, R.E., Ostroff, R.M., Klein, M.B., Niswander, L.A., and Sclafani, R.A. (1992). Molecular genetic studies of the Cdc7 protein kinase and induced mutagenesis in yeast. *Genetics* 132, 53-62.
- Holmgren, A., and Sengupta, R. (2010). The use of thiols by ribonucleotide reductase. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1617-1628.
- Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W., *et al.* (2012). The intra-s phase checkpoint targets dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell* 149, 1221-1232.
- Huang, M., and Elledge, S.J. (1997). Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6105-6113.
- Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* 94, 595-605.
- Huen, M.S.Y., and Chen, J. (2010). Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 101-108.
- Ingemarson, R., and Thelander, L. (1996). A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry* 35, 8603-8609.
- Ishida, T., and Kinoshita, K. (2008). Prediction of disordered regions in proteins based on the meta approach. *Bioinformatics* 24, 1344-1348.
- Jackson, A., Pahl, P., Harrison, K., Rosamond, J., and Sclafani, R. (1993). Cell-Cycle Regulation of the Yeast Cdc7 Protein-Kinase by Association with the Dbf4 Protein. *Molecular and Cellular Biology* 13, 2899-2908.
- Jelinsky, S.A., and Samson, L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1486-1491.
- Jordan, A., and Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67, 71-98.
- Kang, Y.-H., Lee, C.-H., and Seo, Y.-S. (2010). Dna2 on the road to Okazaki fragment processing and genome stability in eukaryotes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45, 71-96.
- Karush, F. (1950). Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin. *Journal of the American Chemical Society* 72, 2705-2713.
- Kashlan, O.B., Scott, C.P., Lear, J.D., and Cooperman, B.S. (2002). A comprehensive model for the allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase. Functional consequences of ATP- and dATP-induced oligomerization of the large subunit. *Biochemistry* 41, 462-474.
- Kerzendorfer, C., and O'Driscoll, M. (2009). Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA repair* 8, 1139-1152.
- Kim, E., and Siede, W. (2011). Phenotypes associated with *Saccharomyces cerevisiae* Hug1 protein, a putative negative regulator of dNTP Levels, reveal similarities and differences with sequence-related Dif1. *J Microbiol* 49, 78-85.
- Kjaergaard, M., Nørholm, A.-B., Hendus-Altenburger, R., Pedersen, S.F., Poulsen, F.M., and Kragelund, B.B. (2010). Temperature-dependent structural changes in intrinsically disordered proteins: formation of alpha-helices or loss of polyproline II? *Protein Sci* 19, 1555-1564.

- Kolberg, M., Strand, K., Graff, P., and Andersson, K. (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1699, 1-34.
- Koshland, D.E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44, 98-104.
- Kumar, D., Abdulovic, A.L., Viberg, J., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., and Chabes, A. (2011). Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Research* 39, 1360-1371.
- Larsson, K.-M., Jordan, A., Eliasson, R., Reichard, P., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2004). Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nature structural & molecular biology* 11, 1142-1149.
- Lazzaro, F., Giannattasio, M., Puddu, F., Granata, M., Pellicoli, A., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2009). Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)* 8, 1055-1067.
- Le Tallec, B. (2008). Identification et caractérisation de nouveaux facteurs d'assemblage du protéasome 26S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. In ED 426 Gènes Génomes Cellules (Université Paris Sud 11).
- Le Tallec, B., Barrault, M.-B., Courbeyrette, R., Guérois, R., Marsolier-Kergoat, M.-C., and Peyroche, A. (2007). 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* 27, 660-674.
- Le Tallec, B., and Peyroche, A. (2012). Using DNA damage sensitivity phenotypes to characterize mutations affecting proteasome function. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 832, 363-371.
- Lederberg, J. (1994). The Transformation of Genetics by Dna - an Anniversary Celebration of Avery, Macleod and McCarty (1944). *Genetics* 136, 423-426.
- Lee, K.H., Kim, D.W., Bae, S.H., Kim, J.A., Ryu, G.H., Kwon, Y.N., Kim, K.A., Koo, H.S., and Seo, Y.S. (2000). The endonuclease activity of the yeast Dna2 enzyme is essential in vivo. *Nucleic Acids Research* 28, 2873-2881.
- Lee, Y.D., and Elledge, S.J. (2006). Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Dev* 20, 334-344.
- Lee, Y.D., Wang, J., Stubbe, J., and Elledge, S.J. (2008). Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol Cell* 32, 70-80.
- Lees, J.G., Miles, A.J., Wien, F., and Wallace, B.A. (2006). A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* 22, 1955-1962.
- Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbien, F., Guerois, R., Haber, J.E., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* 11, 827-835.
- Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A., and Obradovic, Z. (1999). Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome informatics Workshop on Genome Informatics* 10, 30-40.
- Lieutaud, P., Canard, B., and Longhi, S. (2008). MeDor: a metaserver for predicting protein disorder. *BMC Genomics* 9 Suppl 2, S25.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003a). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* 11, 1453-1459.

- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V., and Gibson, T.J. (2003b). GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Research* *31*, 3701-3708.
- Liu, C., Powell, K.A., Mundt, K., Wu, L., Carr, A.M., and Caspari, T. (2003). Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev* *17*, 1130-1140.
- Liu, J., and Rost, B. (2003). NORSp: predictions of long regions without regular secondary structure. *Nucleic Acids Research* *31*, 3833-3835.
- Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* *18*, 211-212.
- Logan, D.T. (2011). Closing the circle on ribonucleotide reductases. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 251-253.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953-961.
- Lopez-Mosqueda, J., Maas, N.L., Jonsson, Z.O., DeFazio-Eli, L.G., Wohlschlegel, J., and Toczyski, D.P. (2010). Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature* *467*, 479-U133.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair* *3*, 997-1007.
- 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 evolutionary biology* *10*, 383.
- Lundin, D., Torrents, E., Poole, A.M., and Sjöberg, B.-M. (2009). RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* *10*, 589.
- Malmqvist, M., and Karlsson, R. (1997). Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Current opinion in chemical biology* *1*, 378-383.
- Manavalan, P., and Johnson, W.C. (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry* *167*, 76-85.
- Mann, G.J., Musgrove, E.A., Fox, R.M., and Thelander, L. (1988). Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. *Cancer research* *48*, 5151-5156.
- Mao, G., and Brody, J.P. (2010). Reverse engineering the yeast RNR1 transcriptional control system. *PloS one* *5*, e13895.
- Mao, J., Habib, T., Shenwu, M., Kang, B., Allen, W., Robertson, L., Yang, J.Y., and Deng, Y. (2008). Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking C2H2 zinc finger proteins. *BMC Genomics* *9 Suppl 1*, S14-.
- Marsolier, M.C., Roussel, P., Leroy, C., and Mann, C. (2000). Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *154*, 1523-1532.
- Mathews, C.K. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *The FASEB Journal* *20*, 1300-1314.
- McCarty, M. (1946). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types : III. An improved method for the isolation of

- the transforming substance and its application to Pneumococcus types II, III and VI. *Journal of Experimental Medicine* **83**, 97-104.
- McClanahan, T., and McEntee, K. (1984). Specific transcripts are elevated in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 2356-2363.
- McMeekin (1952). Milk proteins. *Journal of Food Protection* **15**, 57-63.
- Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 237-245.
- Mendel, G. (1865). Experiments in plant hybridization (1865). Read at the meetings of February 8th.
- Merutka, G., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (1995). 'Random coil' <sup>1</sup>H chemical shifts obtained as a function of temperature and trifluoroethanol concentration for the peptide series GGXGG. *Journal of biomolecular NMR* **5**, 14-24.
- Midic, U., Oldfield, C.J., Dunker, A.K., Obradovic, Z., and Uversky, V.N. (2009). Protein disorder in the human diseasome: unfoldomics of human genetic diseases. *BMC Genomics* **10 Suppl 1**, S12-.
- Mirsky, A.E., and Pauling, L. (1936). On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **22**, 439-447.
- Mizukami-Murata, S., Iwahashi, H., Kimura, S., Nojima, K., Sakurai, Y., Saitou, T., Fujii, N., Murata, Y., Suga, S., Kitagawa, K., *et al.* (2010). Genome-wide expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* in response to high-LET ionizing radiation. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 855-870.
- Morrow, D., Morrow, M., Tagle, D., Shiloh, Y., Collins, F., and Hieter, P. (1995). Tel1, an *Saccharomyces-Cerevisiae* Homolog of the Human Gene Mutated in Ataxia-Telangiectasia, Is Functionally Related to the Yeast Checkpoint Gene Mec1. *Cell* **82**, 831-840.
- Nestoras, K., Mohammed, A.H., Schreurs, A.-S., Fleck, O., Watson, A.T., Poitelea, M., O'Shea, C., Chahwan, C., Holmberg, C., Kragelund, B.B., *et al.* (2010). Regulation of ribonucleotide reductase by Spd1 involves multiple mechanisms. *Genes & Development* **24**, 1145-1159.
- Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., *et al.* (2010a). Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes & Development* **24**, 333-338.
- Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., and Nakanishi, M. (2010b). Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Science* **101**, 2505-2509.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V.R., and Marcotte, E.M. (2008). Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* **4**, e1000120.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**, 681-706.
- Nurse, P., Masui, Y., and Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Nature Medicine* **4**, 1103-1106.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**, 617-656.

- Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., and Dunker, A.K. (2005). Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 61 Suppl 7, 176-182.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, A., Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.-C., Mann, C., and Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* 26, 1449-1458.
- Orosz, F., and Ovádi, J. (2011). Proteins without 3D structure: definition, detection and beyond. *Bioinformatics* 27, 1449-1454.
- Parker, L.L., and Piwnicaworms, H. (1992). Inactivation of the P34(Cdc2)-Cyclin-B Complex by the Human Wee1 Tyrosine Kinase. *Science* 257, 1955-1957.
- Pellicoli, A., and Foiani, M. (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Current biology* : CB 15, R769-771.
- Peng, K., Radivojac, P., Vucetic, S., Dunker, A.K., and Obradovic, Z. (2006). Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. *BMC Bioinformatics* 7, 208-.
- Pereira, S., Fernandes, P., and Ramos, M. (2004). Mechanism for ribonucleotide reductase inactivation by the anticancer drug gemcitabine. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1286-1294.
- Poehlmann, A., and Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathology Research and Practice* 206, 591-601.
- Pokharel, S., and Campbell, J.L. (2012). Cross talk between the nuclease and helicase activities of Dna2: role of an essential iron-sulfur cluster domain. *Nucleic Acids Research*.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbé, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *The EMBO journal* 31, 883-894.
- Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & Development* 25, 409-433.
- Potamitou, A., Holmgren, A., and Vlamis-Gardikas, A. (2002). Protein levels of Escherichia coli thioredoxins and glutaredoxins and their relation to null mutants, growth phase, and function. *J Biol Chem* 277, 18561-18567.
- Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., and Sussman, J.L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 21, 3435-3438.
- Provencher, S.W., and Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
- Putnam, C.D., Jaehnig, E.J., and Kolodner, R.D. (2009). Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 8, 974-982.
- Rai, R., Peng, G., Li, K., and Lin, S.-Y. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer genomics & proteomics* 4, 99-106.
- Reichard, P. (2002). Ribonucleotide reductases: the evolution of allosteric regulation. *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 149-155.
- Reichard, P., Eliasson, R., Ingemarson, R., and Thelander, L. (2000). Cross-talk between the allosteric effector-binding sites in mouse ribonucleotide reductase. *The Journal of biological chemistry* 275, 33021-33026.

- Roa, H., Lang, J., Culligan, K.M., Keller, M., Holec, S., Cognat, V., Montané, M.-H., Houlné, G., and Chabouté, M.-E. (2009). Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* 151, 461-471.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., Bezman, N., and Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell* 13, 3005-3028.
- Rofougaran, R., Crona, M., Vodnala, M., Sjöberg, B.-M., and Hofer, A. (2008). Oligomerization status directs overall activity regulation of the Escherichia coli class Ia ribonucleotide reductase. *The Journal of biological chemistry* 283, 35310-35318.
- Roy, B., Guittet, O., Beuneu, C., Lemaire, G., and Lepoivre, M. (2004). Depletion of deoxyribonucleoside triphosphate pools in tumor cells by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 36, 507-516.
- Ruby, S., Szostak, J., and Murray, A. (1983). Cloning Regulated Yeast Genes From a Pool of LacZ Fusions. *Methods in Enzymology* 101, 253-269.
- Ruby, S.W., and Szostak, J.W. (1985). Specific Saccharomyces cerevisiae genes are expressed in response to DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 5, 75-84.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T., eds. (2001). *Molecular cloning*, third edition, CSHL Press edn.
- Schafer, K. (1998). The cell cycle: A review. *Veterinary Pathology* 35, 461-478.
- Schlessinger, A., Punta, M., and Rost, B. (2007). Natively unstructured regions in proteins identified from contact predictions. *Bioinformatics* 23, 2376-2384.
- Schwartz, G., and Shah, M. (2005). Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 23, 9408-9421.
- Schwarzinger, S., Kroon, G.J., Foss, T.R., Chung, J., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2001). Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society* 123, 2970-2978.
- Sedzik, J., and Kirschner, D.A. (1992). Is myelin basic protein crystallizable? *Neurochem Res* 17, 157-166.
- Sharma, V.M., Tomar, R.S., Dempsey, A.E., and Reese, J.C. (2007). Histone deacetylases RPD3 and HOS2 regulate the transcriptional activation of DNA damage-inducible genes. *Molecular and Cellular Biology* 27, 3199-3210.
- Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2010). Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3371-3383.
- Shim, E.Y., Chung, W.-H., Nicolette, M.L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T.T., Ira, G., and Lee, S.E. (2010). Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *The EMBO journal*, 1-11.
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Current biology* 14, 1703-1711.
- Sidorova, J.M., and Breeden, L.L. (1997). Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. *Genes & Development* 11, 3032-3045.

- Sigalov, A.B., Zhuravleva, A.V., and Orekhov, V.Y. (2007). Binding of intrinsically disordered proteins is not necessarily accompanied by a structural transition to a folded form. *Biochimie* 89, 419-421.
- Sjöberg, B.M. (1997). Ribonucleotide reductases - A group of enzymes with different metallosites and a similar reaction mechanism. *Metal Sites in Proteins and Models* 88, 139-173.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., Schmidt, K.H., Wei, X.X., Kolodner, R.D., and Zhou, H.L. (2005). Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Molecular & cellular proteomics* 4, 1358-1369.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8, 370-380.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* 209, 32-44.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* 287, 252-260.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H.J. (2009). Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 8, 1047-1054.
- Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M. (1999). Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry* 274, 25571-25575.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Durocher, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Current biology* 15, 1364-1375.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404, 42-49.
- Teste, M.-A., Duquenne, M., François, J.M., and Parrou, J.-L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol* 10, 99.
- Tompa, P. (2009). *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*, CRC Press edn.
- Traut, T.W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry* 140, 1-22.
- Tsaponina, O., Barsoum, E., Aström, S.U., and Chabes, A. (2011). Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. *PLoS Genet* 7, e1002061.
- Turoverov, K.K., Kuznetsova, I.M., and Uversky, V.N. (2010). The protein kingdom extended: Ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 102, 73-84.
- Uchiki, T., Hettich, R., Gupta, V., and Dealwis, C. (2002). Characterization of monomeric and dimeric forms of recombinant Sml1p-histag protein by electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 301, 35-48.

- Usui, T., Foster, S.S., and Petrini, J.H.J. (2009). Maintenance of the DNA-Damage Checkpoint Requires DNA-Damage-Induced Mediator Protein Oligomerization. *Molecular cell* **33**, 147-159.
- Uversky, V.N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 2-12.
- Uversky, V.N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 1090-1103.
- Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1231-1264.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415-427.
- Uversky, V.N., Oldfield, C.J., Midic, U., Xie, H., Xue, B., Vucetic, S., Iakoucheva, L.M., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2009). Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* **10 Suppl 1**, S7-.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- van der Donk, W., Yu, G., Perez, L., Sanchez, R., Stubbe, J., Samano, V., and Robins, M. (1998). Detection of a new substrate-derived radical during inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by gemcitabine 5'-diphosphate. *Biochemistry* **37**, 6419-6426.
- van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., and Groen, F.C. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry* **191**, 110-118.
- Varela, J., Praekelt, U., Meacock, P., Planta, R., and Mager, W. (1995). The *Saccharomyces Cerevisiae* Hsp12 Gene Is Activated by the High-Osmolarity Glycerol Pathway and Negatively Regulated by Protein-Kinase-A. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6232-6245.
- Voegtli, W.C., Ge, J., Perlstein, D.L., Stubbe, J., and Rosenzweig, A.C. (2001). Structure of the yeast ribonucleotide reductase Y2Y4 heterodimer. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10073-10078.
- Vullo, A., Bortolami, O., Pollastri, G., and Tosatto, S.C.E. (2006). Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines. *Nucleic Acids Research* **34**, W164-168.
- Wallace, B.A., and Janes, R.W. (2009). *Modern Techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy*, IOS Press edn.
- Wang, P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L., and Huffaker, T.C. (1997). Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6114-6121.
- Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47759-47762.
- Ward, J.J., McGuffin, L.J., Bryson, K., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004a). The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **20**, 2138-2139.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004b). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of molecular biology* **337**, 635-645.



- Warmerdam, D.O., and Kanaar, R. (2010). Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. In *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, pp. 2-11.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32, W668-673.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Whitmore, L., Woollett, B., Miles, A.J., Klose, D.P., Janes, R.W., and Wallace, B.A. (2011). PCDDB: the Protein Circular Dichroism Data Bank, a repository for circular dichroism spectral and metadata. *Nucleic Acids Research* 39, D480-486.
- Winter, M., Sombroek, D., Dauth, I., Moehlenbrink, J., Scheuermann, K., Crone, J., and Hofmann, T.G. (2008). Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nature cell biology* 10, 812-824.
- Wood, J.L., and Chen, J. (2008). DNA-damage checkpoints: location, location, location. *Trends Cell Biol* 18, 451-455.
- Woollard, A., Basi, G., and Nurse, P. (1996). A novel S phase inhibitor in fission yeast. *EMBO J* 15, 4603-4612.
- Wright, P., and Dyson, H. (1999). Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology* 293, 321-331.
- Wu, X., and Huang, M. (2008). Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Mol Cell Biol* 28, 7156-7167.
- Xu, H., Faber, C., Uchiki, T., Racca, J., and Dealwis, C. (2006). Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4028-4033.
- Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et biophysica acta* 1804, 996-1010.
- Yang, Z.R., Thomson, R., McNeil, P., and Esnouf, R.M. (2005). RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* 21, 3369-3376.
- Yarbro, J.W. (1968). Further studies on the mechanism of action of hydroxyurea. *Cancer research* 28, 1082-1087.
- Yarbro, J.W. (1992). Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars in oncology* 19, 1-10.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature genetics* 30, 285-289.
- Young, K. (1998). Yeast two-hybrid: So many interactions, (in) so little time ... In *Biology of Reproduction*, pp. 302-311.
- Zaim, J., Speina, E., and Kierzek, A.M. (2005). Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 28-37.
- Zhai, C., Li, K., Markaki, V., Phelan, J.P., Bowers, K., Cooke, F.T., and Panaretou, B. (2008). Ypp1/YGR198w plays an essential role in phosphoinositide signalling at the plasma membrane. *The Biochemical journal* 415, 455-466.

- Zhang, Z., Yang, K., Chen, C.-C., Feser, J., and Huang, M. (2007). Role of the C terminus of the ribonucleotide reductase large subunit in enzyme regeneration and its inhibition by Sml1. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 2217-2222.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J* *20*, 3544-3553.
- Zhao, X., Georgieva, B., Chabes, A., Domkin, V., Ippel, J.H., Schleucher, J., Wijmenga, S., Thelander, L., and Rothstein, R. (2000). Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of mec1 and rad53 lethality. *Mol Cell Biol* *20*, 9076-9083.
- Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* *2*, 329-340.
- Zhao, X., and Rothstein, R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 3746-3751.
- Zhou, Z., and Elledge, S. (1992). Isolation of Crt Mutants Constitutive for Transcription of the Dna Damage Inducible Gene Rnr3 in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Genetics* *131*, 851-866.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542-1548.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S.J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 13827-13832.



## *Remerciements.*

---

Je ne vais pas le cacher, ces années de thèses ont été faites de hauts et de bas. Souvent j'ai voulu baisser les bras, toujours j'ai trouvé des personnes là pour moi capables de me redonner de l'énergie pour franchir ces caps difficiles. Ces pourquoi je tenais à commencer ces remerciements par ces remerciements spéciaux envers : Marie, sans qui, en plus, les pauses café auraient été bien moroses, Cécile, Arounie avec qui j'ai pu partager mes doutes et mes joies, Ilektra (prend soin de toi et de ta petite), Trinh (be srong and we will go to Giverny one day), Nicolas, Céline B., Kathye qui a été un vrai rayon de soleil, Erwann mon collègue des nocturnes au CEA, Emilie (tu nous a manqué quand tu as été mutée), Chloé pour son intégrité, Cyril toujours de bon conseil, Adeline V. qui a su me comprendre. Enfin merci également à ma famille qui m'a soutenue et a porté un grand intérêt à ma thèse.

Je remercie également les membres du laboratoire ; Marie-Claude, Arach, François, Thomas, et Gwenaëlle L. qui faisait presque parti du labo

Ces études n'auraient pas été ce qu'elles sont sans également l'aide au Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie de Jean-Baptiste CHARBONNIER, Françoise OCHSENBEIN et Nicolas RICHET qui m'ont beaucoup aidée et ont pris de leur temps pour m'expliquer les expérimentations, répondre à mes question et m'assister, vraiment un grand merci, ça m'a fait prendre goût à la biophysique que je connaissais très mal au départ.

Merci aux animaliers ; Anne Sophie, Sylvain, Jean Charles et Marine qui m'ont assistée pour la production des anticorps anti-Hug1

Que serait une thèse sans toutes celles et ceux qui font la vie du bâtiment, toutes ces personnes que j'ai pu croiser au détour d'un couloir, avec qui j'ai partagé de nombreuses conversations scientifiques ou non. Catherine, Chantal et ses bijoux, Linda et sa bonne humeur, Arlette, Stéphanie. Toute la clique du LBSR ; Adeline P., Flavie, Mayssa pour les fous rires qu'on a pu avoir, Jessica, Guilhem (j'ai pris soin de ton cadeau), Petit Benjamin, Gwenaëlle M., Albane, Bérangère, Jérémy A., Isaline, Virginie, Yann Vaï, grand Benjamin (j'ai

fini par réussir à purifier autre chose que des bulles), Emeric, Anne, Guillaume G. (bon courage pour la suite), Chantal. Sans oublier les personnes du rez-de-chaussée, même si on se croisait peu on a réussi à partager de bon moments ; Fanny, Helen, Camille, Nad'a, les petits nouveaux ; Jérémie, Thaiz, Cindy, Guillaume P.

Merci à mes élèves de l'école centrale Paris qui ont su rester attentifs et ont été indulgent face à une débutante, ce fût une très bonne expérience de l'enseignement.

J'allais oublier les membres de mes comités de thèse et de mon jury ; Serge BOITEUX, Marie-Édith CHABOUTÉ, Suzanne SOMMER, Michel LEPOIVRE et ma tutrice de thèse Patricia UGUEN.

Merci aussi à la famille Irtelis et son responsable de l'époque Christophe CARLES. Donc merci à tous ; Jérémy D., Albane, Mazhoura, Elma, Catherine, Alexandra, Véronique, Yan, les repas vont me manquer, Matthieu, Julie, Timothé, Mathieu, Jeanne, Mickaël, Laure, Thi Hoa Mai, Kahina, Valery, Romain, Benjamin, Olivier, Claire. Merci aussi à notre responsable des formations Sylvie ESTERLIN et toutes les personnes invitées pour ces formations très instructives.

Durant ces trois années de thèse j'ai appris énormément tant au niveau scientifique et technique qu'au niveau personnel. Je terminerai ces remerciements par la personne sans qui cela n'aurait pu être possible, à savoir ma directrice de thèse Anne PEYROCHE qui m'a accordé sa pleine confiance pour réaliser ces travaux.

J'espère n'avoir oublié personne, sinon qu'ils ne m'en veuillent pas.

Et comme le dirait si bien Emilie « Je sers la science et GEMSA »



