

Résumé

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

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

Abstract

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

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