

C. R. Soc. Biol., 1984, 178, 203-204.

Biologie moléculaire.

Le même accepteur d'alkyle intervient
dans la réparation du DNA
contenant de l'O⁶-méthylguanine
ou de l'O⁶-éthylguanine

par MARC LEMAÎTRE et WALTER G. VERLY

Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Liège,
Sart Tilman B6, 4000 Liège I, Belgique.

(reçue le 15 décembre 1983).

Summary. — Repair of O⁶-methylguanine and O⁶-ethylguanine in DNA by chromatin proteins is a transalkylation onto cystein residues of probably two acceptor proteins. The repair is limited by the amount of acceptors. Competition experiments have shown that the same acceptors are involved in the repair of both kinds of damages.

Résumé. — La réparation du DNA contenant de l'O⁶-méthylguanine ou de l'O⁶-éthylguanine est une transalkylation qui fait passer le groupe méthyle ou éthyle sur des cystéines appartenant vraisemblablement à deux protéines différentes. La quantité de dommages réparés est limitée par la quantité d'accepteurs. Des expériences de compétition ont montré que les mêmes accepteurs intervenaient dans la réparation des deux sortes de dommages.

La méthylation ou l'éthylation de l'O-6 de la guanine dans le DNA donne une lésion qui est potentiellement cancérogène. L'O⁶-méthylguanine (O⁶-meG) et l'O⁶-éthylguanine (O⁶-etG) disparaissent du DNA, mais il y a une limite à cette réparation. Notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe de David B. Ludlum à Albany (USA), a montré que la réparation était un transfert du méthyle ou de l'éthyle de la guanine modifiée sur le groupe — SH de restes cystéines dans des protéines acceptrices (1). La limite à la réparation est vraisemblablement fixée par la quantité de protéines acceptrices. Dans le foie de Rat où la réparation est très active, le système de réparation est localisé principalement dans la chromatine (2).

Nous isolons les noyaux des cellules de foie de Rat, nous préparons de la chromatine à partir des noyaux purifiés, nous dissociions la chromatine avec de l'héparine-Sépharose et le complexe est extrait avec du KCl 0,3 M (2). Les protéines non histoniques ainsi préparées sont incubées avec du DNA qui a été traité par de la méthylnitrosourée ou

de l'éthylnitrosourée marquées au ^3H dans le groupe alkyle. DNA et protéines sont ensuite analysées séparément.

La réparation du DNA est suivie par dépurination acide suivie de séparation des bases par HPLC : on mesure la disparition de l' $\text{O}^6\text{-meG}$ ou de l' $\text{O}^6\text{-etG}$. Les protéines du milieu d'incubation sont digérées à la trypsine et le DNA est précipité par le bromure cétyltriméthylammonium (CTAB). Le surnageant, analysé par HPLC, montre deux oligopeptides qui contiennent une radioactivité égale à celle de l' $\text{O}^6\text{-meG}$ ou $\text{O}^6\text{-etG}$ qui a disparu du DNA. Une digestion complète de ces oligopeptides suivie d'analyse HPLC montre que la radioactivité se trouve dans de la S-méthyl- ou S-éthyl-cystéine (1).

Le problème est de savoir si les deux cystéines qui se font alkyliser appartiennent ou non à la même protéine. Il semble bien qu'il s'agisse de protéines différentes : nous avons observé la perte sélective de l'un ou l'autre de ces oligopeptides quand les protéines étaient isolées par centrifugation isopycnique ou filtration sur tamis moléculaire, et soumises à une dialyse avant d'être digérées par la trypsine; l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS permet une séparation partielle de deux protéines radioactives. La question à résoudre est si chaque protéine est, à la fois, une transalkylase et un accepteur, ou si plutôt l'une serait la transalkylase pouvant porter transitoirement le groupe alkyle sur une cystéine du centre actif, tandis que l'autre serait un simple accepteur.

Pour voir si les mêmes accepteurs du groupe alkyle interviennent dans la réparation de l' $\text{O}^6\text{-meG}$ et de l' $\text{O}^6\text{-etG}$, nous avons mis les protéines chromatiniennes en présence d'un excès de DNA méthylé et constaté que la disparition de l' $\text{O}^6\text{-meG}$ avait cessé après 60 minutes; si, à ce moment, on ajoute du DNA éthylé, on n'observe aucune réparation de l' $\text{O}^6\text{-etG}$. Inversement, si on incube d'abord les protéines chromatiniennes avec du DNA éthylé avant d'ajouter du DNA méthylé, on n'observe aucune réparation de l' $\text{O}^6\text{-etG}$. Ces résultats ne sont pas dus à une instabilité du système de réparation qui, non utilisé, serait inactif après 60 minutes d'incubation à 37°C . L'hypothèse que le facteur de réparation, en s'adsorbant sur le premier DNA qui lui est offert, ne serait plus disponible pour réparer le deuxième DNA, doit aussi être exclue : la présence de DNA non alkylé au cours d'une préincubation ne diminue pas l'activité du système de réparation, mais l'augmente au contraire probablement en stabilisant les facteurs de réparation. Il semble donc bien que ce soit les mêmes accepteurs d'alkyle qui interviennent dans la réparation de l' $\text{O}^6\text{-meG}$ et de l' $\text{O}^6\text{-etG}$ (3).

BIBLIOGRAPHIE

1. Mehta J. R., Ludlum D. B., Renard A. & Verly W. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1981, 78, 6766-6770.
2. Renard A. & Verly W. G., *FEBS Letters*, 1980, 114, 98-102.
3. Lemaître M., Renard A. & Verly W. G., *FEBS Letters*, 1982, 144, 242-246.